

Diagnostyka laboratoryjna chorób odkleszczowych



Rekomendacje Grupy Roboczej:
Krajowa Izba Diagnostów Laboratoryjnych¹,
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowy Zakład Higieny²,
Konsultant Krajowy w dziedzinie chorób zakaźnych³,
Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji Uniwersytet Medyczny w Białymstoku⁴
Polskie Towarzystwo Wirusologiczne⁵

Warszawa 2014

²dr hab. Tomasz Chmielewski, ⁴dr Justyna Dunaj, ²dr hab. Elżbieta Gołąb prof. NIZP-PZH,
^{2,5}dr hab. Włodzimierz Gut prof. NIZP-PZH, ³dr hab. Andrzej Horban, ⁴prof. dr hab. Sławomir Pancewicz,
^{1,5}dr Elżbieta Puacz, ²dr Danuta Szelenbaum-Cielecka, ²prof. dr hab. Stanisława Tylewska-Wierzbanowska

Kleszcze jako wektor i rezerwuuar chorób infekcyjnych

Styl życia współczesnych społeczeństw post-industrialnych, aktywny wypoczynek, rozwój turystyki, sporty ekstremalne, chęć poznawania i zajmowania nowych, kiedyś nieosiągalnych terenów, niosą za sobą czasami ujemne skutki i są nowymi czynnikami zwiększonego ryzyka zakażenia się drobnoustrojami przenoszonymi przez wektor jakim są kleszcze. Wiele z tych zakażeń występuje sezonowo, w okresie aktywności różnych gatunków pajęczaków. W naszej strefie klimatycznej, mogą one być wektorem przenoszącym zakażenia od wiosny do jesieni.

Kleszcze są to pasożyty, o dużym znaczeniu dla medycyny ludzkiej i weterynaryjnej. Są one rezerwuarem i wektorem wielu chorobotwórczych dla człowieka wirusów, bakterii i pierwotniaków. W organizmie kleszcza dochodzi do namnażania się i zmian właściwości antygenowych drobnoustrojów oraz utrzymywania się w organizmie przenosiiciela przez kolejne jego stadia i pokolenia. Są one wektorem biologicznym, w odróżnieniu od innych stawonogów, mogących przenosić różne drobnoustroje z jednego osobnika na drugiego w sposób mechaniczny i przypadkowy. Powszechnie stosowane zabiegi higieniczne w stosunku do tych drobnoustrojów są mało skuteczne.

Wzrost temperatury otoczenia powoduje wzrost aktywności kleszczy, która rozpoczyna się na przełomie marca i kwietnia i trwa do października/listopada. Maksimum aktywności zależy od czynników klimatycznych i przebiega w Europie Środkowej w dwóch fazach, tzn. w maju/czerwcu i we wrześniu/październiku. W Polsce rozpoczyna się od połowy kwietnia (czasem wcześniej, w marcu) i trwa do początku listopada, z dwoma szczytami – pierwszym od maja do połowy czerwca, drugim we wrześniu.

W Polsce, największe znaczenie medyczne i weterynaryjne obok kleszcza pospolitego *Ixodes ricinus*, mają: *Argas reflexus* (obrzeżek gołębi) i *Dermacentor reticulatus* (kleszcz łąkowy). Na terenie Polski kleszcze te mogą być przenosicielami: boreliozy z Lyme, anaplazmozy, bartonelozy, kleszczowego zapalenia mózgu, tularemii, gorączki Q, babeszjozy, a także riketsjoz z grupy gorączek plamistych.

Tabela 1. Najczęściej występujące choroby przenoszone przez kleszcze

Czynnik etiologiczny	Gatunek kleszcza	Choroba	Rejon występowania
<i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>	<i>Ixodes sp.</i>	Borelioza z Lyme	Ameryka Północna, Europa, Azja
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>Ixodes sp.</i>	Anaplazmoza	Ameryka Północna, Europa
TBEV	<i>Ixodes sp.</i>	Kleszczowe zapalenie mózgu	Europa, Azja
<i>Babesia sp.</i>	<i>Ixodes sp.</i>	Babeszjoza	Cały świat
<i>Rickettsia conori</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> <i>Hyalomma plumbeum</i> , <i>Dermacentor marginatus</i> , <i>D. reticulatus</i> .	Gorączka guzkowa	Europa, Afryka, Azja pld.
<i>R. rickettsii</i>	<i>Dermacentor variabilis</i> , <i>D. andersoni</i>	Gorączka plamista Gór Skalistych	Ameryka Północna, Środkowa i Południowa
<i>R. sibirica</i>	<i>Dermacentor nuttallii</i> , <i>D. marginatus</i> , <i>D. reticulatus</i> , <i>Hyalomma asiaticum</i>	Północno-azjatycka gorączka kleszczowa	Azja
<i>R. slovaca</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i>	TIBOLA/DEBONEL	Europa
<i>R. haelvetic</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i>	Gorączka bezwysypkowa (Aneruptive fever)	Europa
<i>R. africae</i>	<i>Amblyomma hebraeum</i> and <i>A. variegatum</i>	Afrykańska gorączka odkleszczowa	Afryka, Europa (zawleczenia)
<i>Bartonella sp.</i>	<i>Ixodes sp.</i>	Bartoneleza	Ameryka Północna, Europa
<i>Ehrlichia chaffensis</i>	<i>Ixodes sp.</i>	Erlichioza	Ameryka Północna, Europa, Mali
<i>Francisella tularensis</i>	Różne gatunki kleszczy	Tularemia	Ameryka Północna, Europa
<i>Coxiella burnetii</i>	Różne gatunki kleszczy	Gorączka Q	Cały świat

DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA

1. Informacje ogólne i wymagania prawne

1.1. Zlecenie badania laboratoryjnego

Medyczne laboratorium opracowuje, wdraża i stosuje procedurę zlecenia badań laboratoryjnych oraz formularz zlecenia badania laboratoryjnego zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia o standardach jakości w medycznym laboratorium diagnostycznym.

Dokumentacja medyczna w medycznym laboratorium, w tym zlecenia badań laboratoryjnych, jest prowadzona, przechowywana i przetwarzana zgodnie z przepisami dotyczącymi dokumentacji medycznej.

2. Rodzaje badań diagnostycznych

2.1. Badania mikroskopowe

Osoby wykonujące badania mikroskopowe muszą posiadać ukończony 24-godzinny kurs: badania mikroskopowe zabarwionych rozmazów krwi w kierunku zarażeń pierwotniakami, rekomendowany przez Krajową Izbę Diagnostów Laboratoryjnych. Złoty standard w diagnostyce zarażeń pierwotniakami stanowi badanie mikroskopowe zabarwionych rozmazów krwi. Rozmazy, co najmniej dwa cienkie i dwa grube, należy wykonać **bezpośrednio po pobraniu krwi**.

- ❑ Krew pełna pobrana na antykoagulant (EDTA), najlepiej krew włośniczkowa z opuszki palca pobrana do probówki z kapilarą (200-500 μ l), albo krew z żyły (2 ml)
- ❑ Krew dostarczyć do laboratorium jak najszybciej w czasie 2 godzin od pobrania.
- ❑ Jeżeli przewiduje się długi czas transportu wskazane jest zrobienie ze świeżej krwi dwóch cienkich i dwóch grubych rozmazów. Po ich wyschnięciu (w temperaturze pokojowej) w odpowiednim opakowaniu do transportu szkiełek mikroskopowych, należy dostarczyć je do laboratorium, w raz z próbką krwi pobranej do probówki.
- ❑ Zwłoka przy wykonaniu rozmazów może spowodować zmiany w morfologii pasożytów i zmianę ich charakterystycznego zabarwienia.

Próbki krwi włośniczkowej

Próbki należy pobierać do kapilar z EDTA:

- u dorosłych: z 3 lub 4 palca ręki lub płatka ucha,
- u dzieci: z dużego palca u nogi lub z pięty.

Materiały pomocnicze

- cienkie szkiełka podstawowe z matowym końcem, bez odprysków i zadrapań, odtłuszczone przed użyciem,
- rylec lub ołówek do naniesienia danych identyfikacyjnych na matowej części szkiełka,
- alkohol,
- pipeta jednorazowa cienka lub pipeta nastawna z jednorazowymi końcówkami.

Sporządzenie rozmazów

- rozmaz cienki: 3 μ l (kroplę) krwi umieścić na końcu szkiełka podstawowego a następnie rozprowadzić na 1/3 powierzchni za pomocą drugiego szkiełka o oszlifowanych krawędziach. Szkiełko, pochylone pod kątem 30-45 $^{\circ}$, przeciągamy ruchem jednostajnym ku przodowi. Rozmaz powinien być jednolity i zawierać jedną warstwę komórek.
- rozmaz gruby: (gruba kropla) 6 μ l (dwie krople) krwi należy rozprowadzić rogiem innego szkiełka, na powierzchni odpowiadającej średnicy 16-20 mm (monety 10-20 groszowe).

Rozmazy pozostawiamy do wyschnięcia w pozycji poziomej, w temperaturze pokojowej (21 $^{\circ}$ C \pm 4 $^{\circ}$ C), zabezpieczone przed zanieczyszczeniem.

Tak przygotowane rozmazy należy przesłać do laboratorium wykonującego badania parazytologiczne.

Barwienie metodą Giemsy

- 5% roztwór Giemsy w objętości około 5 ml nanieść na preparat i pozostawić przez 40 min.,
- spłukać delikatnie niewielką ilością wody,
- pozostawić do wyschnięcia najlepiej w pozycji skośnej.

UWAGA: Przed barwieniem cienki rozmaz należy utrwalić metanolem i pozostawić do wysuszenia. Preparatów z grubą kroplą nie należy utrwalać!

Ocena mikroskopowa zabarwionego preparatu

Ocena jest przeprowadzana po naniesieniu olejku immersyjnego, pod powiększeniem obiektywu 100x. Ocena powinna obejmować 1 cm² rozmazu lub co najmniej 300 pól widzenia lub co najmniej 20 000 krwinek. **Czas badania jednego preparatu wynosi nie mniej niż 20 min.**

Wynik badania

Wynik powinien zawierać opis kształtu, wielkości, liczby i ułożenia w krwince wykrytych pasożytów. W sprawozdaniu z badania powinny znaleźć się także informacje o parazytemii (intensywność inwazji).

Intensywność inwazji

- w cienkim rozmazie określa się odsetek krwinek zarażonych przypadających na co najmniej 500 policzonych (wg wzoru: liczba zainfekowanych RBC/całkowita liczba oglądanych RBC x 100).
- w grubej kropli jest to liczba pasożytów przypadających na 1 μl krwi, którą określa się licząc pasożyty oraz białe krwinki w wielu polach widzenia, w odniesieniu do standardowej liczby 8000 białych krwinek w 1 μl krwi, wg wzoru: liczba pasożytów x (8000/liczba policzonych białych krwinek).

2.2. Badania serologiczne

Definicje związane z procedurą

ELISA – metoda immunoenzymatyczna, w której jeden z elementów jest związany chemicznie z enzymem, którego aktywność oznaczana jest w reakcji z substratem i odczytywana kolorymetrycznie.

RF – czynnik reumatoidalny – przeciwciało klasy IgM o charakterze antyimmunoglobuliny, reagujące z kompleksem IgG-antygen.

Szara strefa – zakres pomiarów lub wyliczonych stężeń, w którym nie jest możliwe jednoznaczne określenie czy próba jest dodatnia czy ujemna. Zakres szarej strefy jest powiązany z niepewnością wyniku i nie może być mniejszy niż ustalona niepewność.

Materiał do badań serologicznych

We wczesnej fazie zakażenia, przed zastosowaniem leczenia, należy pobrać 5-10 ml krwi na skrzep w celu uzyskania surowicy. Drugą próbkę krwi należy pobrać po 2 tygodniach. Jeśli w drugiej próbce krwi nie zostanie stwierdzony czterokrotny wzrost miana przeciwciał, należy rozważyć pobranie trzeciej próbki po 4-6 tygodniach od pobrania pierwszej.



- ❑ Surowica krwi. Uzyskaną surowicę krwi umieścić w lodówce w temperaturze 5°C±3°C. Jeżeli badanie będzie wykonywane w dniu przyjęcia lub dnia następnego to uzyskaną surowicę krwi należy umieścić w lodówce w temperaturze 5°C±3°C. Jeżeli przewidywany termin wykonania badania jest dłuższy niż 24 godziny należy surowicę umieścić w zamrażarce. Jeżeli próbka jest transportowana w stanie zamrożonym, należy natychmiast umieścić ją w temperaturze -20°C lub niższej według przyjętego schematu przechowywania próbek oczekujących na badania.

Przed wykonaniem badań, próbki wyjmowane są z zamrażarki na godzinę przed nastawieniem testu. Wszelkie powtórzenia badania lub ustalenie ostatecznego miana w badaniu metodą immunofluorescencji powinno być wykonywane w ciągu 48 godzin od momentu rozmrożenia próbki.

Po wykonaniu i zakończeniu badania próbka powinna być ponownie zamrożona i przechowywana przez okres zgodny z okresem przechowywania przyjętym w danym laboratorium.

- ❑ Surowica lub plazma w ilości około 1 ml, bez hemolizy, należy pobrać jałowo do szczelnie zamykanej probówki. Do 24 godzin od momentu pobrania materiału, próbki można przechowywać i transportować w temperaturze pokojowej (21 ± 4°C), jednak zaleca się przechowywać i transportować w warunkach chłodni (5 ± 3°C). Jeżeli próbka będzie przechowywana powyżej

24 godzin należy ją zamrozić i transportować w warunkach uniemożliwiających rozmrożenie;

- ❑ Krew pełna w ilości około 5 ml, pobrana jałowo „na skrzep”. **Próbkę należy dostarczyć do laboratorium bezzwłocznie w przeciągu 2 h od pobrania;**
- ❑ Płyn mózgowo-rdzeniowy (PMR) w ilości około 1 ml, pobrany jałowo do szczelnie zamykanej probówki. Do 24 godzin od momentu pobrania materiału, próbki można przechowywać i transportować w temperaturze pokojowej ($21 \pm 4^{\circ}\text{C}$), jednak zaleca się przechowywać je i transportować w warunkach chłodni ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$). Jeżeli próbka będzie przechowywana powyżej 24 godzin należy ją zamrozić i transportować w warunkach uniemożliwiających rozmrożenie.

UWAGA: Oznaczenia obecności swoistych przeciwciał w płynie mózgowo-rdzeniowym należy zawsze wykonywać równolegle z oznaczeniami w surowicy pobranej w tym samym czasie. Płyn mózgowo-rdzeniowy do oznaczania miejscowej syntezy przeciwciał w OUN nie może być zamrożony.

Algorytm postępowania diagnostycznego

Badanie przeciwciał pośrednią metodą ELISA

Badanie składa się z dwóch faz działania:

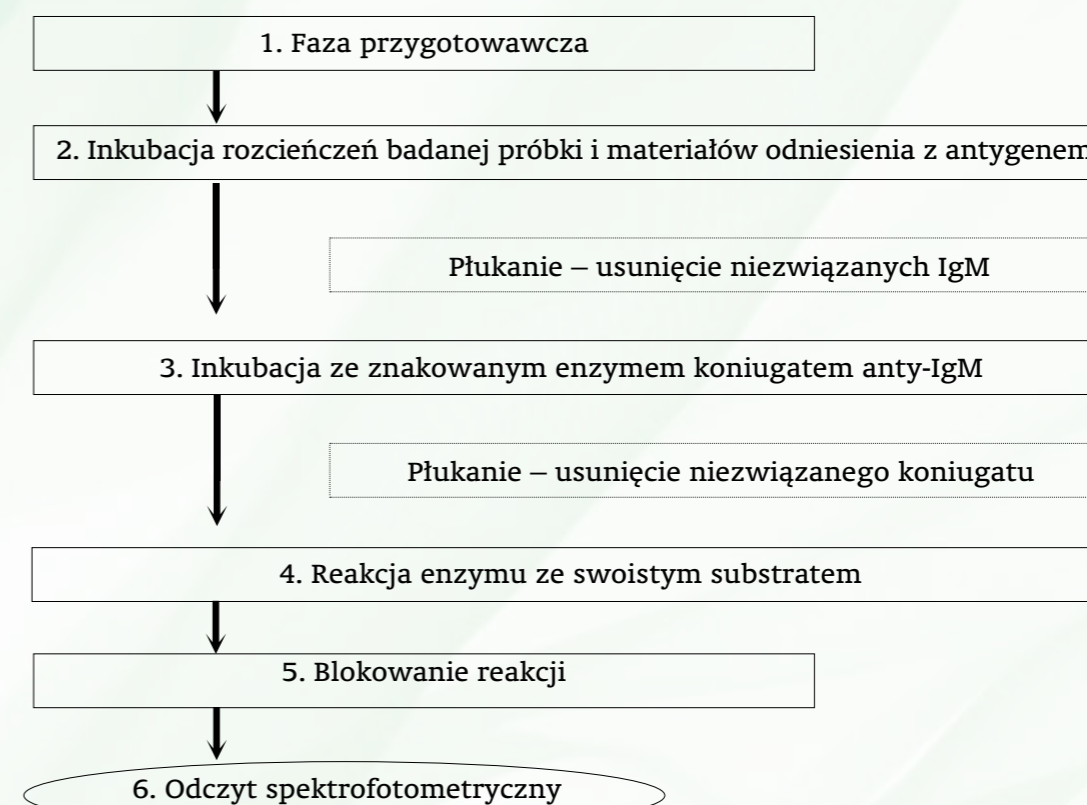
- fazy przygotowawczej;
- fazy właściwego wykonania testu

Faza przygotowawcza obejmuje:

- ostateczną ocenę przydatności próbek do badania,
- sprawdzenie zgodności oznakowania próbki do dołączonej karty badań,
- sprawdzenie instrukcji badań i formularzy,
- sprawdzenie wyposażenia,
- przygotowanie zestawów diagnostycznych i materiałów odniesienia zgodnie z instrukcją,
- opracowanie próbki odczynnikiem eliminującym fałszywie dodatnie wyniki oznaczeń związane z występowaniem w badanych materiałach czynnika reumatoidalnego (**dotyczy tylko oznaczeń IgM w surowicy/osoczu**).

Pozostałe etapy stanowią właściwe wykonanie testu, a obowiązujące parametry wykonania zawarte są w instrukcjach do poszczególnych zestawów diagnostycznych.

Schemat wykonania testu ELISA dla oznaczeń przeciwciał IgM/IgG



Elementy kontroli i weryfikacji.

Wszystkie niezbędne do kontroli elementy wchodzące w skład zestawów muszą być używane w trakcie każdego badania stanowiąc element nadzoru bieżącego nad jakością pracy. **Uzyskane z wykorzystaniem materiałów wyniki służą do sterowania jakością badania.**

Czynnikami interferującymi w badaniu są:

- ❑ **Obecny w surowicach czynnik reumatoidalny**, będący przyczyną fałszywie dodatnich wyników oznaczeń swoistych IgM i musi być usunięty. Alternatywą jest usunięcie IgG z badanej próbki co zapobiega również zjawisku opisanemu w następnym punkcie poniższego fragmentu;
- ❑ **Swoiste dla antygeny przeciwciała IgG**, które w wysokich stężeniach mogą blokować wiązanie swoistych IgM. Jeśli producent zestawu usuwa tylko czynnik reumatoidalny interpretacja wątpliwych wyników oznaczeń IgM przy jednoczesnym wysokim poziomie swoistych IgG jest poważnym błędem. Wymagane jest powtórzenie badania po usunięciu IgG;
- ❑ **Jony żelaza** (hemoglobina) – utleniające substraty dla peroksydazy, co może być przyczyną nieswoistych oznaczeń;
- ❑ **Zabarwienie próbki** (szczególnie PMR) – hemoliza uniemożliwia prawidłową interpretację wyniku, wskazane powtórne pobranie materiału od chorego;

- ❑ **Zanieczyszczenia bakteryjne** powodują albo nieswoisty dodatni wynik poprzez wiązanie koniugatu albo degradują przeciwciała będąc przyczyną fałszywie ujemnych wyników materiał z wyraźnym zanieczyszczeniem bakteryjnym nie nadaje się do badania;
- ❑ **Wielokrotne zamrażanie** i odmrażanie próbki powoduje wytracenie IgM – w przypadku obecności krioprecypitatu badanie powtórzyć z nowego materiału;
- ❑ U osób z **bakteryjnymi zakażeniami ośrodkowego układu nerwowego** (szczególnie krętkami) obserwowano nieswoiste reakcje w oznaczeniach IgG i IgM w płynie mózgowo-rdzeniowym i (ale słabsze) w surowicy. Było to przyczyną zmiany przez niektórych producentów zakresu szarej strefy.

Formułowanie i wydawanie wyników

Wyniki oznaczeń przeciwciał IgM i IgG ze względu na możliwą nieswoistość reaktywności właściwą każdemu testowi immunologicznemu, należy formułować następująco:

- „niereaktywne” – ujemne,
- „reaktywne” – dodatnie,
- „wątpliwe” – mieszczące się w szarej strefie podanej przez producenta testu.

2.3. Badania metodą PCR

Wybór materiału do badań metodą PCR jest uzależniony od patogenu, którego poszukujemy lub typu zakażenia i należy to uzgodnić z laboratorium, które ma przeprowadzić badania. W przypadku badań PCR materiał powinien być pobierany do jałowych, szczelnie zamykanych probówek lub pojemników. Przy pobieraniu należy zachować maksymalną ostrożność, aby nie doprowadzić do kontaminacji materiału. Przykłady materiałów podane są poniżej:

- ❑ Krew pobrana na antykoagulant – pełna krew w ilości około 3 ml, pobrana na antykoagulant (najlepiej EDTA, **nie należy używać heparyny**). Próbkę nie należy odwirowywać. Jeżeli próbka zostanie dostarczona do laboratorium w ciągu 24 godzin może być transportowana w temperaturze pokojowej ($21 \pm 4^\circ\text{C}$), jednak zaleca się temperaturę chłodni ($5 \pm 3^\circ\text{C}$). Przy dłuższym okresie czasu (maksymalnie do 5 dni) próbkę krwi bezwzględnie należy przechowywać i transportować w temperaturze chłodni ($5 \pm 3^\circ\text{C}$).
- ❑ Płyn mózgowo-rdzeniowy (PMR) – w ilości 1 – 2 ml, próbka PMR po pobraniu powinna być dostarczona do laboratorium tak szybko, jak to jest możliwe, najlepiej w temperaturze chłodni ($5 \pm 3^\circ\text{C}$). Jeżeli próbka PMR nie może być dostarczona w ciągu 24 godzin, należy ją zamrozić i transportować do laboratorium w warunkach uniemożliwiających jej rozmrożenie.
- ❑ Wymaz z miejsc chorobowo zmienionych należy pobrać jałową wymazówką. Następnie koniec wymazówki należy zanurzyć w 1 – 1,5 ml jałowego roztworu

solii fizjologicznej umieszczonej w jałowej probówce. Koniec wymazówki, którym był pobierany materiał nie może być suchy. Materiał powinien być dostarczony do laboratorium natychmiast po pobraniu. Jeżeli materiał nie może być dostarczony do laboratorium od razu po pobraniu, należy go zamrozić i transportować w warunkach uniemożliwiających jego rozmrożenie. Dopuszcza się również pobieranie materiału za pomocą specjalnych zestawów transportowych przewidzianych do pobierania materiału klinicznego w kierunku diagnostyki zakażeń wirusowych (wymazówka + podłoże w probówce).

UWAGA: Wymaz /zeskrobiny/ płyn z komory oka – zlecony i pobrany tylko przez lekarza specjalistę zgodnie z obowiązującymi procedurami medycznymi. Po pobraniu materiał należy zabezpieczyć tak jak wymaz z miejsc chorobowo zmienionych.

- ❑ Mocz – w ilości 10 – 20 ml (z pierwszego strumienia, po dokładnej higienie osobistej miejsc intymnych). Ważne by mocz oddany do badania był minimum dwie godziny w pęcherzu. Próbkę moczu powinna być dostarczona do laboratorium tak szybko jak to jest możliwe, najlepiej od razu po pobraniu. Jeżeli próbka będzie dostarczona od razu, może być transportowana w temperaturze pokojowej, jeżeli nie, należy ją umieścić w temperaturze chłodni ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) i dostarczyć tak szybko, jak to możliwe.
- ❑ Popłuczyny oskrzelowo – pęcherzykowe (BAL) – w ilości 1 – 2 ml należy dostarczyć do laboratorium w temperaturze chłodni ($5 \pm 3^\circ\text{C}$). Jeżeli próbka będzie przechowywana dłużej, należy ją zamrozić i dostarczyć do laboratorium w warunkach uniemożliwiających rozmrożenie.
- ❑ Wycinki tkanek – w ilości nie mniejszej niż 0,2 g należy pobierać do jałowej probówki lub pojemnika zawierającego niewielką ilość sterylnej wody lub roztworu soli fizjologicznej. Jeżeli materiał będzie dostarczony do laboratorium bezzwłocznie, może być transportowany w temperaturze pokojowej, jeżeli nie należy go przechowywać i transportować w temperaturze chłodni ($5 \pm 3^\circ\text{C}$). Przy dłuższym przechowywaniu materiał należy zamrozić i dostarczyć do laboratorium w warunkach uniemożliwiających jego rozmrożenie.
- ❑ Surowica, osocze lub inne płyny ustrojowe – w ilości 1 – 2 ml. Jeżeli materiał do badań stanowi surowica, a nie pełna krew, surowicę należy oddzielić jak najszybciej po pobraniu krwi i przesłać do laboratorium najlepiej w temperaturze chłodni ($5 \pm 3^\circ\text{C}$). Jeżeli surowica nie może być dostarczona natychmiast po pobraniu, należy ją zamrozić i transportować do laboratorium w warunkach uniemożliwiających rozmrożenie.

UWAGA: W przypadku badania metodą jakościowego PCR dla wirusów zakażających elementy komórkowe krwi materiałem z wyboru jest pełna krew, a nie surowica.

3. Pobieranie i przygotowanie materiału do badań laboratoryjnych

Systemy służące do pobierania próbek pochodzące od różnych producentów różnią się między sobą, co może mieć wpływ na uzyskane wyniki. Należy ściśle przestrzegać zaleceń producenta odczynników oraz producenta probówek i używanych systemów pobrania odnośnie pozyskania materiału do badań (stosowanych antykoagulantów) i parametrów wirowania.

Krew należy pobierać do probówek w systemie zamkniętym. Takie postępowanie zmniejsza ryzyko kontaminacji na etapie przedanalizy i ogranicza prawdopodobieństwo wyników fałszywie dodatnich (zwłaszcza w badaniach prowadzonych metodami molekularnymi).

Probówka z pobranym materiałem powinna zawierać następujące dane pacjenta:

- Imię i nazwisko,
- PESEL,
- datę pobrania,
- kod paskowy.

Zamknięty pojemnik z materiałem należy przechowywać zgodnie z wytycznymi laboratorium diagnostycznego.

Należy pamiętać, że zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 23.03.2006 roku w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych. [Dz.U. nr 61 poz. 435 z późn. zm.] rodzaj badanego materiału, system pobierania i transport muszą być zawsze zwalidowane ze stosowanym testem diagnostycznym celem uniknięcia błędów przedanalizy i zapewnienia wiarygodnych wyników.

4. Transport materiału do badań

Transport materiałów biologicznych podlega jednolitym w skali świata wymaganiom prawnym. „Transport próbek diagnostycznych (kwalifikowanych jako „towar niebezpieczny”) regulowany jest umową międzynarodową pt. „Umowa europejska dotycząca międzynarodowego przewozu drogowego towarów niebezpiecznych” (powszechnie znana jako umowa ADR) opublikowana w Dz.U. z 2005 r. Nr 178, poz. 1481. a aktualne zasady pakowania i oznakowania zawarte są w Shippers Program 2013 (WHO). Wymagania prawne dotyczące lotniczego transportu materiałów o charakterze „potencjalnie zakaźny” określone są w podpisanych przez Polskę międzynarodowych przepisach ICAO (Organizacja Międzynarodowego Lotnictwa Cywilnego) i IATA (Międzynarodowe Stowarzyszenie Przewoźników Powietrznych) w Instrukcjach pakowania (Packaging Instructions-PI) 602 i 650.

4.1. Warunki i czas transportu materiałów pobranych do badania muszą być zgodne z zaleceniami laboratorium wykonującym test diagnostyczny.

4.2. Materiał do badań laboratoryjnych jest transportowany i dostarczany do medycznego laboratorium przez upoważnione osoby. Materiał jest transportowany w zamkniętych probówkach, w zamkniętym opakowaniu zbiorczym, oznakowanym „materiał zakaźny” zgodnie z opisanymi poniżej zasadami.

4.3. Zalecenia dotyczące pakowania materiałów biologicznego

Ze względu na potencjalnie zakaźny charakter próbek materiału klinicznego obowiązują następujące zasady pakowania próbek: Pojemniki z materiałem do analizy powinny być zapakowane zgodnie z ogólną zasadą pakowania wymaganą dla czynników biologicznych wywołujących choroby ludzi. Obowiązuje zasada potrójnego opakowania:

- naczynie zasadnicze zawierające materiał kliniczny,
- wtórne opakowanie wodoszczelne, odporne na uszkodzenia mechaniczne zabezpieczające opakowanie zasadnicze oraz w przypadku uszkodzenia opakowania zasadniczego uniemożliwiające skażenie środowiska; w przypadku materiałów płynnych pomiędzy opakowaniem zasadniczym a opakowaniem wtórnym powinien znajdować się materiał wchłaniający płyny w ilości wystarczającej do wchłonięcia całej próbki klinicznej,
- opakowanie zewnętrzne, na którym powinna znajdować się informacja umożliwiająca szybki kontakt z klientem zlecającym badanie.

W stosunku do poszczególnych opakowań obowiązują następujące zasady:

A. Materiał do analiz należy umieścić w pojemnikach, które powinny być:

- jednorazowe, z nietłukącego tworzywa sztucznego, odporne na zgniecenie;
- zamykane nakrętką z dodatkową uszczelką zapobiegającą wyciekowi materiału;
- otwierane i zamykane w nieskomplikowany sposób;

B. Opakowanie wtórne powinno być wykonane z odpornych na zgniecenie materiałów i hermetycznie zamknięte. Dopuszcza się możliwość umieszczenia w jednym opakowaniu wtórnym kilku naczyń zasadniczych z materiałem klinicznym pod warunkiem ich jednoznacznego oznakowania. Opakowanie wtórne musi mieć wymiary umożliwiające otwarcie go w boksie laminarnym (wymaganie BHP). Przed umieszczeniem w opakowaniu transportowym powierzchnia opakowania wtórnego powinna być wyjałowiona. Dokumentacja dołączona do próbek nie może być umieszczana w opakowaniu wtórnym.

C. Opakowanie transportowe w przypadku transportu materiałów w warunkach specjalnych (suchy lód, lód) powinno być odporne na dany czynnik. Musi być oznakowane i opisane w sposób identyfikujący klienta i umożliwiający nawiązanie z nim szybkiego kontaktu w przypadkach uszkodzenia próbek czy innych zdarzeń losowych.

Dokumentację dołączoną do badań należy umieścić oddzielnie w zamkniętych kopertach przytwierdzonych do opakowania zewnętrznego.

5. Przyjmowanie materiału do badań

5.1. Medyczne laboratorium opracowuje, wdraża i stosuje procedury przyjmowania, rejestrowania i oznakowania materiału do badań oraz udostępnia je zleceniodawcom, którzy potwierdzają pisemnie zapoznanie się z nim.

5.2. Medyczne laboratorium sprawdza zgodność danych ze zlecenia z oznakowaniem materiału oraz przydatność materiału do badania.

5.3. W przypadku stwierdzenia przez medyczne laboratorium niezgodności otrzymanego materiału z wymaganiami dotyczącymi pobierania, transportu lub innych nieprawidłowości powodujących, że materiał nie może być wykorzystany do badania, pracownik zgłasza ten fakt kierownikowi laboratorium lub osobie przez niego upoważnionej, którzy w razie potwierdzenia niezgodności mogą zakwalifikować materiał jako niezdatny do badania i odmówić wykonania badania.

Odmowę wykonania badania odnotowuje się w dokumentacji. Dalsze postępowanie medyczne laboratorium uzgadnia ze zleceniodawcą.

5.4. Medyczne laboratorium prowadzi dokumentację, dotyczącą przechowywanego materiału przed i po wykonaniu badania, z uwzględnieniem:

- miejsca,
- czasu,
- temperatury,
- danych osób odpowiedzialnych za przechowywanie materiału.

6. Kwalifikacje personelu wykonującego badania

Badania wykonuje tylko personel, który przeszedł udokumentowane szkolenie z danej dziedziny diagnostycznej. Za nadzór i autoryzację wyników odpowiada diagnosta laboratoryjny posiadający odpowiednią specjalizację (mikrobiologia medyczna, laboratoryjna genetyka medyczna, laboratoryjna parazytologia medyczna) lub lekarz, posiadający wiedzę i umiejętności w zakresie wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej uzyskanych w ramach specjalizacji zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia i posiadają udokumentowane co najmniej dwuletnie doświadczenie w diagnostyce laboratoryjnej chorób odkleszczowych.

7. Formułowanie i wydawanie wyników

7.1. Zaleca się aby wynik był autoryzowany przez diagnostę laboratoryjnego posiadającego odpowiednią specjalizację (mikrobiologia medyczna, laboratoryjna genetyka medyczna, laboratoryjna parazytologia medyczna) lub lekarza, posiadającego wiedzę i umiejętności w zakresie wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej uzyskanych w ramach specjalizacji zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 11.12.2012 roku w sprawie wykazu specjalizacji

uprawnających lekarza do samodzielnego wykonywania czynności diagnostyki laboratoryjnej w medycznym laboratorium diagnostycznym [Dz.U. 2012 poz. 1420] i posiadają udokumentowane co najmniej dwuletnie doświadczenie w diagnostyce laboratoryjnej chorób odkleszczowych.

7.2. Formularz sprawozdania z badania laboratoryjnego może być przekazany w formie elektronicznej z zachowaniem wymagań wskazanych w rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 23.03.2006 roku w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych. [Dz.U. nr 61 poz. 435 z późn. zm.]

7.3. Medyczne laboratorium archiwizuje wyniki przez okres 20 lat zgodnie z przepisami dotyczącymi dokumentacji medycznej – ustawa z dnia 6.11.2008 roku o prawach pacjenta i Rzeczniku Praw Pacjenta [tj. Dz.U. z 2012 r., poz. 159]

7.4. W formularz sprawozdania podana jest metoda diagnostyczna wykonanego badania oraz nazwa producenta testu diagnostycznego.

8. Zgłaszanie wyników inspekcji sanitarnej

Zakażenie potwierdzone uzyskaniem dodatniego wyniku:

- *Anaplasma sp.* (wykazanie znamiennej dynamiki przeciwciał swoistych dla *Anaplasma sp.* lub wykrycie ich na poziomie diagnostycznie zmienionym lub wykrycie kwasu nukleinowego *Anaplasma sp.* we krwi)
- *Borrelia burgdorferi sensu lato* (wykazanie obecności przeciwciał dla *B.burgdorferi* testem ELISA – wyniki wątpliwe i wątpliwie dodatnie po potwierdzeniu ich swoistości testem western blot)
- Przeciwciała IgM dla KZM, kierownik medycznego laboratorium ma obowiązek zgłosić w ciągu 24 godzin od momentu uzyskania wyniku, państwowemu powiatowemu inspektorowi sanitarnemu właściwemu dla siedziby laboratorium, zgodnie z ustawą z dnia 5.12.2008 roku o zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi, [Dz.U. Nr 234, poz. 1570 z późn. zm]



9. Wymagania dotyczące stosowanej aparatury i testów diagnostycznych

Medyczne laboratorium stosuje metody badawcze, które odpowiadają aktualnej wiedzy medycznej. Metody te wykonywane są zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Laboratoryjnej przy użyciu zwalidowanych metod zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 4 czerwca 2003 r. w sprawie kryteriów, które powinny spełniać jednostki organizacyjne wykonujące badania substancji i preparatów chemicznych, oraz kontroli spełnienia tych kryteriów (Dz.U. z 2003 r. Nr 116, poz. 1103).

Do diagnostyki medycznej *in vitro* należy stosować wyroby medyczne, tj. aparaturę i testy diagnostyczne spełniające wymagania określone w ustawie o wy-



robach medycznych. W związku z powyższym, aparatura i odczynniki muszą posiadać deklarację zgodności z dyrektywą 98/79/EC.

Bazę danych o wyrobach medycznych przeznaczonych do używania w Rzeczypospolitej Polskiej prowadzi Urząd Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych.

Wyroby medyczne (aparaty i/lub odczynniki) powinny być właściwie dostarczone, prawidłowo zainstalowane i utrzymywane, oraz używane zgodnie z przewidzianym zastosowaniem, a Użytkownik jest obowiązany do przestrzegania instrukcji użytkowania. W związku z powyższym badania należy wykonywać zgodnie z instrukcją producenta, a interpretacja wyników również musi być zgodna z instrukcją testu. Stosowanie testów wytworzonych przez medyczne laboratorium (typu in-house, homemade) jest możliwe wyłącznie po przeprowadzeniu pełnej walidacji i spełnieniu odpowiednich wymagań zasadniczych określonych przez Ministra Zdrowia. **Powyższe musi być potwierdzone wpisem do bazy prowadzonej przez Prezesa Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych.**

10. Zapewnienie jakości badań laboratoryjnych

10.1. Zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 23.03.2006 roku w sprawie standardów jakości dla medycznych laboratoriów diagnostycznych i mikrobiologicznych [Dz.U. nr 61 poz. 435 z póź. zm.] medyczne laboratorium prowadzi wewnętrzną kontrolę jakości badań i uczestniczy w zewnętrznej kontroli jakości – co najmniej raz w roku.

10.2. Za prowadzenie wewnętrznej kontroli jakości oraz uczestnictwo w programach zewnętrznej oceny jakości odpowiada kierownik medycznego laboratorium lub wyznaczony przez niego pracownik.

10.3. Dokumentacja kontroli jakości badań jest przechowywana przez okres 20 lat zgodnie z przepisami dotyczącymi dokumentacji medycznej – ustawa z dnia 6.11.2008 roku o prawach pacjenta i Rzeczniku Praw Pacjenta (tj. Dz.U. z 2012 r., poz. 159).

BORELIOZA Z LYME

Czynnik etiologiczny

Krętki należące do gatunku *Borrelia burgdorferi* sensu lato są bardzo zróżnicowaną grupą, do której obecnie zalicza się 15 genogatunków. Wśród nich siedem to drobnoustroje o udowodnionej chorobotwórczości dla człowieka:

B. burgdorferi sensu stricto

B. garinii

B. afzelii

B. bisetti

B. spielmanii

B. valaesia

B. lusitaniae

Są to długie, ruchliwe bakterie Gram-ujemne. Komórka ich jest wydłużona, silnie skręcona, z przebiegającym pod błoną zewnętrzną włóknem osiowym. Kształt komórki i zdolność ruchu umożliwiają im penetrację środowisk o różnej strukturze i gęstości.

Ściana komórkowa krętków *B. burgdorferi* ma budowę charakterystyczną dla bakterii Gram-ujemnych. W błonie zewnętrznej występują liczne białka będące silnymi antygenami i biorące udział w kolonizacji, penetracji tkanek i odpowiedzi immunologicznej gospodarza na zakażenie. Dużą grupę stanowią lipoproteiny łączące się N-końcem z cząsteczkami kwasów tłuszczowych błony plazmatycznej. Lipoproteiny te odgrywają ważną rolę w adaptacji krętków do środowiska na różnych etapach cyklu życiowego oraz związane są z ich chorobotwórczością i przebiegiem odpowiedzi immunologicznej gospodarza na zakażenie.

Opisano dużą grupę lipoprotein, które oznaczone są skrótem OspA (Outer surface protein A), OspB, aż do OspF. Ich funkcje są słabo poznane. Dotychczas zbadano rolę OspA, OspB, OspC. Są one czynnikami zjadliwości tych bakterii i umożliwiają przejście krętków z kleszcza do organizmu ssaka.

Inna lipoproteina błony zewnętrznej to białko BBK32. Wytwarzana jest w żerujących kleszczach i u ssaków. Przeciwciała dla tej lipoproteiny (białko p47) wykrywa się u chorych na boreliozę z Lyme. Kolejna grupa białek występujących w błonie zewnętrznej to białka wiążące dekorynę (decorin binding protein) DbpA i DbpB.

Większość tych białek kodowana jest na plazmidach i ekspresja ich zależy od warunków w jakich znajduje się bakteria.

Swoiste dla *B. burgdorferi* białka, które są wykorzystane jako antygeny diagnostyczne to przede wszystkim lipoproteiny błony zewnętrznej. Charakteryzuje je znaczna heterogenność. Najczęściej występujące w Europie chorobotwórcze dla człowieka *B. garinii* i *B. afzelii* i *B. burgdorferi* sensu stricto można podzielić na przynajmniej siedem serotypów, biorąc pod uwagę jedynie zróżnicowanie występujących na powierzchni komórki swoistych białek OspA. Występowanie ich związane jest z określonym genogatunkiem: *B. burgdorferi* sensu stricto należy do serotypu 1, *B. afzelii* – do serotypu 2, *B. garinii* – do serotypów 3 do 7.

W przypadku białka OspC, na podstawie różnic w sekwencji aminokwasów, wyodrębniono dotychczas 4 serotypy krętków. Białko to jest wysoce immunogenne i odpowiada przede wszystkim za wczesną odpowiedź humoralną.

Jednym z najbardziej immunogennych białek w komórce *B. burgdorferi* jest flagelina, białko wchodzące w skład wici – włókna osiowego. Wywołuje ono silną, wczesną odpowiedź humoralną. Białko to w początkowym i końcowym odcinku łańcucha, wykazuje wysoki stopień homologii z sekwencją aminokwasów flageliny *Bacillus subtilis* (65%) i *Salmonella Typhimurium* (56%). Końcowa

sekwencja tego polipeptydu wykazuje aż 80% homologii z białkiem flageliny *T. pallidum*. Krzyżowe reakcje stwierdza się także z wieloma innymi bakteriami Gram-ujemnymi i Gram-dodatnimi. Epitopy charakterystyczne dla gatunku *B. burgdorferi* zlokalizowane są tylko pomiędzy 129 i 251 aminokwasem.

Stosunkowo niedawno wykryto zlokalizowane na plazmidzie l28-1 geny *vls*, kodujące białka VlsE. Występują one na powierzchni komórki bakteryjnej i maskują dzięki temu inne powierzchniowe antygeny. Aby uniknąć swoistej odpowiedzi immunologicznej gospodarza, krętka *B. burgdorferi* gwałtownie zwiększają ekspresję genu *vlsE* i produkcję białka VlsE. Ponieważ struktura przestrzenna tego białka jest tak ukształtowana, że część zmienna zwrócona jest na zewnątrz, zakrywając część stałą, przeciwciała wytwarzane są głównie przeciw zmiennej części białka. Białko VlsE wytwarzane jest pod wpływem reakcji immunologicznych gospodarza-kręgowca.

Ekspresja genu *vlsE* i produkcja białek VlsE znacząco wzrasta u ssaków wskazując, że aktywacja następuje po opuszczeniu organizmu kleszcza i wnikięciu do ssaka. Białko to nie występuje w szczepach hodowanych w sztucznych podłożach, w warunkach *in vitro*. Obecnie białko to wykorzystywane jest w diagnostyce serologicznej jako wysoce swoisty, immunogeny antygen wytwarzany *in vivo*.

Podstawą rozpoznania boreliozy z Lyme jest obecność określonych objawów klinicznych. Badania laboratoryjne, wykrywające swoiste przeciwciała klasy IgM i/lub IgG dla antygenów *B. burgdorferi sensu lato* potwierdzają rozpoznanie kliniczne. Wykrycie swoistych przeciwciał, którym nie towarzyszą określone objawy kliniczne nie ma znaczenia diagnostycznego.

Wywoływana przez te krętka borelioza z Lyme jest najczęstszą na półkuli północnej zakaźną chorobą, przenoszoną przez kleszcze. W zależności od regionu odpowiedzialne są różne gatunki kleszczy rodzaju *Ixodes*. W Ameryce Północnej jest to głównie *Ixodes scapularis*, w Europie *Ixodes ricinus*, a w Azji *Ixodes persulcatus*.

Borelioza z Lyme jest zalecaną przez europejskich ekspertów, nazwą jednostki chorobowej wywołanej zakażeniem krętkami *B. burgdorferi* s.l. Nie powinno używać się nazwy „choroba z Lyme”, którą wprowadzono w Stanach Zjednoczonych w 1976 roku, w czasie, kiedy nieznany jeszcze był jej czynnik etiologiczny; **nie należy skracać tej nazwy do określenia „borelioza” ponieważ istnieją inne chorobotwórcze gatunki krętków rodzaju Borrelia, również skracanie nazwy do „Lyme” jest niewłaściwe. Podobnie, nazwa krętkowica odkleszczowa nie jest rekomendowana.**

Udział kleszczy w przenoszeniu zakażenia determinuje, sezonowość występowania nowych zachorowań, zgodną z cyklem życiowym tych stawonogów, jak również określa jej zasięg geograficzny, który pokrywa się z zasięgiem występowania przenoszących zakażenie kleszczy.

Krętka *B. burgdorferi* przekazywane są stransstadialnie kleszczom, zakażając zwierzęta, na których żerują. Rezerwuarem krętków *B. burgdorferi* są wszystkie zwierzęta, których krwią żywią się kleszcze.

Objawy kliniczne boreliozy z Lyme

Borelioza z Lyme w zależności od stadium zakażenia obejmuje różne układy i narządy.

Dla ułatwienia identyfikacji zakażeń jak i dla celów epidemiologicznych wprowadzono definicję przypadku boreliozy z Lyme. Pierwszą definicję sformułowano w 1991 roku w USA, a następnie 1996 roku w Europie. Europejska definicja jest szersza niż amerykańska ze względu na występowanie na naszym kontynencie, w chwili jej tworzenia, trzech chorobotwórczych dla człowieka genogatunków *B. burgdorferi sensu lato*, tj.: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* oraz *B. afzelii*, a tym samym większe zróżnicowanie objawów choroby. Definicja polska, nie różni się od europejskiej.

Najczęściej w Europie występują zakażenia *B. garinii* i *B. afzelii*, podczas gdy *B. burgdorferi sensu stricto* znacznie rzadziej i zwykle w Europie wschodniej. Zróżnicowanie genogatunków wywołujących zakażenia na kontynencie europejskim muszą być brane pod uwagę przy opracowaniu nowych testów diagnostycznych, jak np. PCR oraz antygenów diagnostycznych do badań serologicznych. Jest to bardzo ważne ponieważ w ostatnim czasie wykryto w Europie kolejne, nowe chorobotwórcze genogatunki *B. bissetii*, *B. valaisiana* i *B. spielmanii*.

1. Borelioza wczesna miejscowa

W początkowym okresie, we wczesnej fazie jest to zakażenie miejscowe. Po kilku dniach lub tygodniach od chwili zakażenia wywołanego ukłuciem kleszcza, pojawia się rumień wędrujący (*erythema migrans*), któremu mogą towarzyszyć objawy grypopodobne. Rumień wędrujący jest jedynym swoistym objawem (patognomicznym) choroby. W tym stadium choroba powinna być rozpoznana przez lekarza klinicystę.



UWAGA: Nie powinno się wykonywać badań laboratoryjnych, których wynik ujemny może prowadzić do mylnej diagnozy. Rumień wędrujący jest zakażeniem miejscowym i przeciwciała jeszcze są nieobecne. Zwykle pojawiają po 3-4 tygodniach od chwili jego pojawienia się.

2. Borelioza wczesna rozsiana

W tym okresie dochodzi do zakażenia wielu narządów i układów, pojawiają się dolegliwości ze strony ośrodkowego lub obwodowego układu nerwowego, układu kostno-stawowego lub układu krążenia.

We wczesnej neuroboreliozie, w ciągu kilku tygodni od chwili zakażenia najczęściej występują: zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie nerwu twarzowego lub innych nerwów czaszkowych, zapalenie korzeni nerwowych. Objawom tym może towarzyszyć ból głowy, uczucie zmęczenia, przeczulice lub sztywność karku, które występując osobno nie stanowią kryterium rozpoznania. Przeciwciała IgM i/lub IgG mogą nie występować, **przeciwciała IgG powinny być wykryte w fazie zdrowienia (6-8 tygodni od wystąpienia objawów).**



Borelioza stawowa charakteryzuje się nawracającymi, krótkotrwałymi (tygodnie, miesiące) bólami jednego lub kilku niesymetrycznych stawów. W surowicy chorych stwierdzany jest zawsze wysoki poziom przeciwciał klasy IgG.

3. Borelioza późna

Neuroborelioza późna występuje zwykle po około 6 miesiącach od zakażenia. Są to rzadkie przypadki podostrych encefalopatii, ataksje, zespoły pozapiramidowe, niedowład, nietrzymanie moczu, objawy spastyczne, zaburzenia mowy i pamięci, zaburzenia psychiczne, zaburzenia czucia, a także w ciężkich przypadkach porażenia połowicze lub całkowite. W późnej neuroboreliozie, w zapaleniu mózgu i rdzenia, zapaleniu korzeni nerwowych zawsze powinny być obecne przeciwciała klasy IgG w płynie mózgowo-rdzeniowym.

Nieleczona późna postać stawowa boreliozy z Lyme prowadzi do nadżerek chrząstek i kości, przerostu maziówki i odkładania się włókniaka.

Skórna późna postać to przewlekłe zanikowe zapalenie skóry (*acrodermatitis chronica atrophicans* – ACA). Jest to przewlekła, postępująca zmiana skórna, która pojawia się po kilku latach od ukłucia przez kleszcza. Charakterystyczne są czerwone, sino-czerwone plamy na powierzchni kończyn. Zmieniona skóra ulega stopniowo zanikowi, dochodzi do owrzodzeń szczególnie nasilonych w miejscach nad wyniesieniami kostnymi, co może prowadzić do zwichnięć w stawach. Towarzyszy im ból, świąd i przeczulica. **W badaniu serologicznym stwierdza się wysokie miano swoistych przeciwciał klasy IgG.**

Postępowanie diagnostyczne

UWAGA: Prawidłowe rozpoznanie boreliozy z Lyme zależy od odpowiedniego postępowania diagnostycznego. Ważny jest zarówno dobór metod jak i antygenów diagnostycznych, a następnie prawidłowa interpretacja wyników.

Stosowane obecnie zestawy diagnostyczne ELISA powinny należeć przynajmniej do II-giej generacji. Należą do tej grupy testy, w których albo antygenem diagnostycznym są wybrane, izolowane frakcje białek albo antygen diagnostyczny poddawany jest wstępnej absorpcji krętkami Reitera. Szczepy używane do produkcji antygeny muszą wytwarzać białko OspC umożliwiające wykrycie swojej odpowiedzi w klasie IgM oraz DbpA (decorin binding protein A, dawniej p17), będące dominującym antygenem w odpowiedzi IgG.

W najnowszej, III-ciej generacji testów, jako antygeny diagnostyczne stosowane są rekombinowane białka. Dotychczas otrzymano i sprawdzono pod względem przydatności w diagnostyce boreliozy z Lyme, białka p83/100, wskaźnik późnej fazy choroby, p41 (flagelina) i p41 int. wewnętrzna część cząsteczki flageliny o masie 14000, niereagująca krzyżowo z flageliną innych gatunków bakteryjnych, białka błony zewnętrznej OspA i OspC i p39. Uzupełnienie antygeny diagnostycznego o rekombinowane białka DbpA (p17/18) i p58, a także p14, p30, p43 oraz antygen VlsE i pochodzący z niego syntetyczny peptyd C6, mogą znacznie zwiększyć czułość testu.

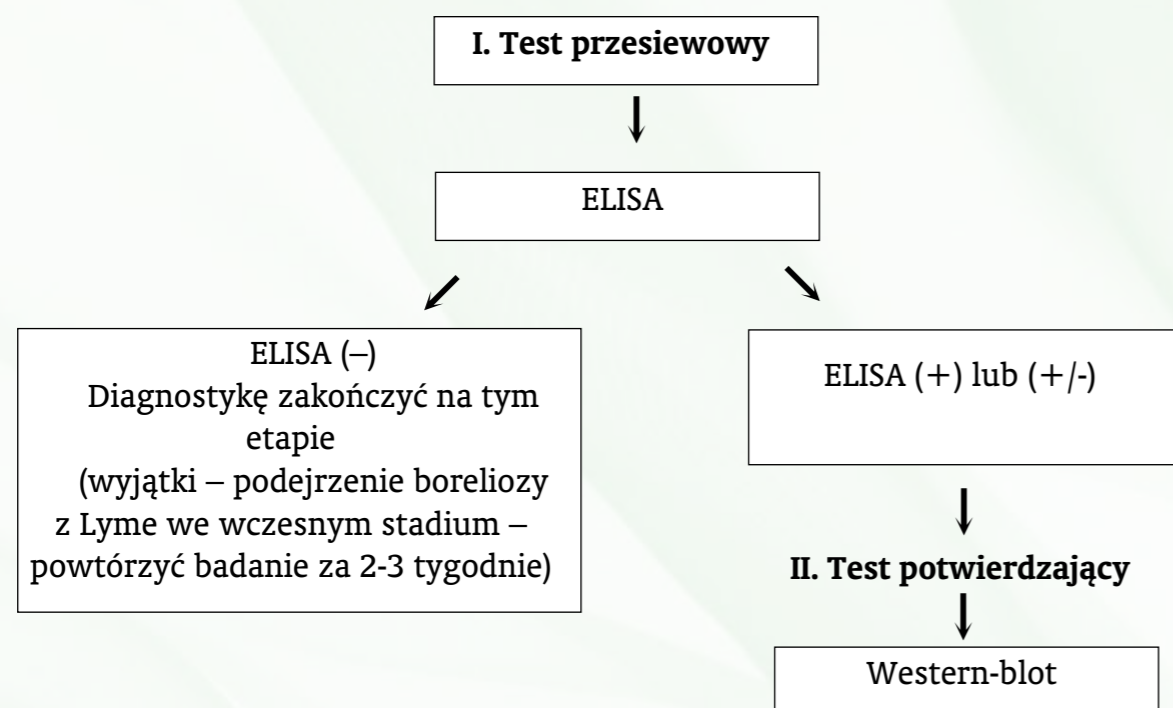
Pomimo to, nie udało się wyeliminować reakcji krzyżowych i wyników fałszywie dodatnich. Dlatego w 2000 roku opublikowano rekomendacje dotyczące prawidłowej diagnostyki laboratoryjnej boreliozy z Lyme opracowane przez międzynarodową grupę ekspertów. Angielska wersja „MiQ 12 Lyme Borreliosis” dostępna jest w internecie na stronie: <http://www.dghm.org>, w której zalecana jest dwustopniowa diagnostyka serologiczna.

Materiał do badań

Badania serologiczne w kierunku boreliozy z Lyme można wykonywać z surowicy krwi, a w przypadku objawów neurologicznych również z płynu mózgowo-rdzeniowego.

Nie zaleca się badań serologicznych płynu stawowego z powodu możliwości wystąpienia nieswoistych, dodatnich reakcji.

Schemat dwustopniowego postępowania diagnostycznego w boreliozie z Lyme



Etap I. Test przesiewowy – ELISA

Oznaczenie poziomu przeciwciał **półilościowymi** testami ELISA o wysokiej czułości (testy II lub III generacji).

Etap II. Test potwierdzający – Western blot

Próbki surowic, z którymi uzyskano wynik dodatni lub wątpliwie dodatni (wartości graniczne) są badane **jakościową** metodą Western-blot o wysokiej swoistości, w celu weryfikacji rezultatów badania metodą ELISA.

Interpretacja wyników badań ELISA i Western-blot odbywa się według ściśle ustalonych kryteriów. Zalecenia te są dokładnie określone i regularnie aktualizowane.

UWAGA: Western blot (WB) jest testem potwierdzającym wynik badania przesiewowego (ELISA) i nie może być stosowany samodzielnie, z pominięciem pierwszego etapu badania diagnostycznego.

Test ten musi charakteryzować się wysoką, nie mniejszą niż 95%, swoistością. Analiza występowania przeciwciał przeprowadzona w ramach programu EUCALB, wykazała przydatność następujących 8 antygenów w diagnostyce zakażeń *B. burgdorferi* sensu lato: OspC i p41 dla IgM oraz p83/100, p58, p41, p39, OspC, DbpA (p17) dla IgG, jakkolwiek o zróżnicowanym znaczeniu. Stwierdzono, bowiem że czułość i swoistość metody zależna jest od genogatunku szczepu użytego jako antygen diagnostyczny. Ważne jest aby kryteria diagnostyczne uwzględniały odpowiedź immunologiczną na antygeny szczepów najczęściej występujących na danym terenie.

Na terenie Europy zalecany jest test Western-blot z antygenami *B. afzelii* (szczep PK0), ponieważ charakteryzuje się największą czułością.

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

Występowanie swoistych przeciwciał w różnych stadiach boreliozy z Lyme

Stadium choroby (objawy kliniczne)	Przeciwciała		Częstość wykrywania przeciwciał
	IgM	IgG	
Wczesna, miejscowa (EM)	+	-	20-50%
Wczesna narządowa (neuroborelioza, układ krążenia, stawowa)	+	-/+	70-90%
Późna narządowa (neuroborelioza, stawowa, ACA)	-	+	100%

Dodanie do zestawu antygeny VlsE znacznie zwiększa czułość testu jednak nie może zastępować w badaniu W-B białek podanych w tabeli, ponieważ jest to białko, które pochodzi ze szczepu występującego przede wszystkim w Stanach Zjednoczonych i w Europie nie została jeszcze dokładnie zbadana odpowiedź immunologiczna na to białko u chorych.

Interpretacja uzyskanych wyników zgodnie z kryteriami amerykańskimi, ustalonymi przez Center for Disease Control and Prevention (CDC) w Atlancie niekiedy zalecanymi przez producentów testów i nie rzadko automatycznie stosowanymi na kontynencie europejskim, **może prowadzić do błędów w rozpoznaniu.**

UWAGA: Opracowanie kryteriów oceny wyników badań metodą Western-blot przeprowadzonych u chorych z terenu Europy jest bardziej złożone ze względu na występowanie większej liczby chorobotwórczych genogatunków na obszarze naszego kontynentu.

Interpretacja wyników

Przyjęta interpretacja wyników powinna być powiązana z objawami klinicznymi stwierdzanymi u chorego. Aby poprawnie zinterpretować wynik badania, potrzebna jest informacja na temat czasu trwania choroby, z którym ściśle związane jest pojawienie się przeciwciał dla określonych antygenów, np.: we wczesnej boreliozie z Lyme znaczenie ma intensywność przynajmniej dwóch frakcji białkowych (p41 i OspC). **Uzyskanie ujemnego wyniku** badania serologicznego we wczesnej fazie zakażenia, w początkowym okresie występowania rumienia wędrującego (EM), **nie przesądza o rozpoznaniu.**

Zalecane jest powtórzenie badania z nową próbką surowicy po upływie 4 tygodni od wystąpienia pierwszych objawów choroby.

Interpretacja wyników testu Western blot

Antygeny diagnostyczne	Odpowiedź humoralna	
	IgM	IgG
<i>B. afzeli</i> (Szczep PKo)	p39, OspC, DbpA (p17/18), silna reakcja z antygenem p41 ¹	p83/100, p58, p43, p39, p30, OspC, p21, DbpA (p17/18), p14 ³
Białka rekombinowane	p39, OspC, p41 int., DbpA (p17/18) lub silna z OspC ²	p83/100, p58, p39, OspC, p41 int., DbpA (p17/18) ⁴

Wynik dodatni testu jest wtedy kiedy:

- 1 Przeciwciała IgM reagują z co najmniej jedną frakcją białkową, pochodzącą ze szczepu *B. afzeli*
- 2 Przeciwciała IgM reagują z co najmniej dwoma frakcjami białek rekombinowanych lub występuje silna reakcja z OspC
- 3 Przeciwciała IgG reagują z co najmniej dwoma frakcjami białek, pochodzącymi ze szczepu *B. afzeli*
- 4 Przeciwciała IgG reagują z co najmniej dwoma frakcjami białek rekombinowanych

We wczesnej boreliozie z Lyme, w przypadku ujemnych wyników badań serologicznych, badania należy powtarzać. Po 6 tygodniach od wystąpienia objawów u 100% chorych wykrywa się przeciwciała. W późnej boreliozie z Lyme (neuroborelioza, stawowa, ACA) u wszystkich chorych obecne są przeciwciała IgG. W tym stadium choroby występowanie przeciwciał IgM i brak IgG nie ma znaczenia diagnostycznego.

Należy pamiętać, że swoiste przeciwciała wykrywane są również u osób zdrowych. W zależności od stopnia narażenia na kontakt z kleszczami odsetek osób z przeciwciałami wynosi od 12% w normalnej populacji (krwiodawcy) do około 40% w grupach zwiększonego ryzyka, np. wśród leśników. **Obecność samych przeciwciał, bez objawów klinicznych, nie może być wskazaniem do leczenia.**

Przyczyną nieswoistych reakcji i fałszywie dodatnich wyników może być obecność czynnika reumatoidalnego, *lupus erythematosus*, reakcje krzyżowe oraz inne zakażenia wywoływane przez krętki lub mononukleozą zakaźną.

Indeks PMR/surowica

W przypadku objawów neuroboreliozy należy określać indeks płyn mózgowo-rdzeniowy (PMR)/surowica, pozwalający wykryć śródoponową produkcję przeciwciał. Jest to szczególnie przydatne w późnej neuroboreliozie ośrodkowego układu nerwowego. W tym celu oprócz wyniku badania swoistych przeciwciał dla *B. burgdorferi* w surowicy krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym, konieczne jest oznaczenie całkowitego stężenia albuminy lub immunoglobulin IgG w surowicy i PMR.

$$\text{Indeks PMR/surowica} = \frac{\text{PMR U/ wsp.r.} \times \text{stężenie albuminy w surowicy}}{\text{Sur U} \times \text{stężenie albuminy w PMR}}$$

PMR U – wynik oznaczenia obecności swoistych przeciwciał dla *B. burgdorferi* metodą ELISA w płynie mózgowo-rdzeniowym

wsp.r – współczynnik rozcieńczenia

Sur U – wynik oznaczenia obecności swoistych przeciwciał dla *B. burgdorferi* metodą ELISA w surowicy krwi

Interpretacja wyników:

Indeks PMR/surowica < 1,4 przeciwciała nie są wytwarzane w ośrodkowym układzie nerwowym; 1,5 – 2,0 wynik wątpliwie dodatni; > 2,0 swoiste przeciwciała dla *B. burgdorferi* są wytwarzane śródoponowo – zakażenie ośrodkowego układu nerwowego.

Inne badania

Podstawą rozpoznania laboratoryjnego boreliozy z Lyme są badania serologiczne. Jeżeli jednak mimo ujemnego wyniku badania laboratoryjnego, lekarz nadal podejrzewa na podstawie objawów klinicznych, zaawansowane stadium boreliozy, można zastosować inne, dodatkowe metody diagnostyczne, jak np. poszukiwanie DNA krętków (PCR) lub hodowlę itp. Mają one także zastosowanie u chorych z nietypowym rumieniem wędrującym, przy podejrzeniu wczesnej neuroboreliozy, w której nie zostały jeszcze wytworzone przeciwciała oraz u chorych z obniżoną odpornością.

Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

Łańcuchowa reakcja polimerazy umożliwia wielokrotne powielanie określonych, charakterystycznych dla danego drobnoustroju fragmentów genomu. W przypadku *B. burgdorferi* sensu lato, najczęściej wykrywane są sekwencje genów kodujących flagelinę, białka błony zewnętrznej (Osp), 16S-RNA i 5S-23S-RNA. PCR jest metodą bardzo czułą, a dolna granica wykrywalności wynosi około 10-1000 komórek w badanej próbce. Pomimo swych niewątpliwych zalet posiada jednak szereg ograniczeń. Do najważniejszych należy konieczność właściwego doboru materiału do badania w zależności od stadium choroby, w którym wykonuje się badanie. Materiał genetyczny krętków częściej można wykryć we wczesnej niż w późnej boreliozie z Lyme. DNA krętków wykrywa się w około 60-70% wycinków skóry pobranych z rumienia wędrującego i w około 60% wycinków ze zmian typu ACA. U chorych z rumieniem wędrującym DNA *B. burgdorferi* we krwi stwierdza się nie częściej niż u około 18% u chorych. W płynie mózgowo-rdzeniowym DNA wykrywa się w 38% przypadków w neuroboreliozie wczesnej

i w 25% w neuroboreliozie późnej. W zależności od stosowanych starterów czułość metody PCR w płynie stawowym wynosi od 48% dla starterów komplementarnych do sekwencji genu 16S rRNA do 96% dla starterów dla OspA. Na wynik badania może mieć wpływ obecność w badanym materiale DNA pochodzącego z komórek gospodarza, jak i hamujący wpływ innych składników tkankowych takich jak hemoglobina, heparyna, porfiryny. Ograniczenia te mogą prowadzić do uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich jak i fałszywie ujemnych. Poważny wpływ na otrzymany wynik mają też metody ekstrakcji DNA, gdyż ze względu na niewielką liczbę bakterii w badanym materiale może dochodzić do strat prowadzących do fałszywie ujemnego wyniku. Ponadto startery zastosowane do reakcji muszą umożliwiać amplifikację fragmentów DNA charakterystycznych dla wszystkich chorobotwórczych i potencjalnie chorobotwórczych genogatunków *B. burgdorferi* sensu lato z tą samą czułością.

UWAGA: W przypadkach kiedy badanie serologiczne jest mało wiarygodne, np. u chorych o obniżonej odporności, poddanych leczeniu immunosupresyj-nemu, jak również we wczesnym stadium choroby, zalecane jest wykonanie badania metodą PCR z:

- wycinka skóry (rumień wędrujący, ACA),
- płynu mózgowo-rdzeniowego,
- płynu stawowego lub chrząstki stawowej.

Nie należy przeprowadzać badania tą metodą krwi oraz moczu.

Hodowla

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

Do hodowli krętków *B. burgdorferii* stosowane jest bardzo bogate podłoże BSK (Barbour'a, Stoenner'a, Kelly'ego) i jego różne modyfikacje, w skład których wchodzi ponad 60 składników, takich jak aminokwasy, witaminy, elektrolity; dodatkowo są wzbogacane surowicą króliczą (6%). Inokulum nie może być mniejsze niż 10 komórek bakteryjnych. Gęstość zawiesiny bakteryjnej w podłożu BSK-H po inkubacji 14 dni nie przekracza 10^{10} komórek w 1 ml, a czas między podziałami komórkowymi wynosi około 12-16 godzin. Na podłożach stałych bakterie te rosną jeszcze wolniej.

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

Hodowla i PCR

W porównaniu z zakażeniami innymi drobnoustrojami, liczba krętków w dostępnych do badania próbkach materiału klinicznego jest bardzo mała, na granicy wykrywalności metodą PCR. Ocenia się, że w płynie mózgowo-rdzeniowym liczba tych drobnoustrojów nie przekracza 50 komórek w 1 ml, i uzyskanie wystarczającej ilości DNA krętków do amplifikacji metodą PCR jest często niemożliwe.

Można najpierw wykonać posiew, a następnie po hodowli przez 1-2 tygodnie, poszukiwać DNA *B. burgdorferi* sensu lato metodą PCR. Ma to szczególnie znaczenie w przypadkach klinicznego rozpoznania neuroboreliozy przy słabej odpowiedzi immunologicznej lub jej braku. Taki sposób postępowania z materiałem klinicznym, podnosi znacznie czułość badania diagnostycznego w kierunku boreliozy z Lyme.

Inne badania diagnostyczne niezalecane

Pojawiające się w różnych krajach nowe metody diagnostyczne, jak np. test transformacji blastycznej (LTT), czy oznaczenie poziomu przeciwciał w krążących kompleksach immunologicznych nie mogą być stosowane w rutynowej diagnostyce boreliozy z Lyme zanim nie zostaną dokładnie wystandaryzowane i zwalidowane, a uzyskane wyniki powinny być opublikowane w międzynarodowych czasopiśmie (zalecenie ECDC, które zaproponowało udostępnienie do tego celu swój biuletyn).

UWAGA: Stosowane w niektórych laboratoriach badania kleszcza usuniętego ze skóry pacjenta (poszukiwanie w nim DNA *B. burgdorferi*) nie może być uznane jako metoda diagnostyczna!

Ponieważ zakażony kleszcz nie zawsze zdąży przed usunięciem go ze skóry, zakazić człowieka jak również nie zawsze obecność DNA krętków *B. burgdorferii* jest możliwa do wykrycia (czułość tego badania nie jest określona). **Oznacza to, że wynik badania kleszcza – dodatni nie świadczy o zakażeniu, a ujemny nie wyklucza zakażenia.**

Podsumowanie

1. Podstawą rozpoznania boreliozy z Lyme są określone objawy kliniczne rozpoznane przez lekarza klinicystę. Wykrycie swoistych przeciwciał potwierdza to rozpoznanie;
2. Obecność samych przeciwciał, bez objawów zakażenia, nie jest wskazaniem do leczenia;
3. Badanie metodą ELISA jest badaniem wstępnym, które musi być potwierdzone metodą Western-blot. W każdym przypadku, powinny być oznaczone przeciwciała obu klas;
4. Test Western-blot jest badaniem potwierdzającym swoistość wyniku dodatniego lub wątpliwie dodatniego oznaczonego metodą ELISA.

5. Nie należy wykonywać testu Western-blot bez badania metodą ELISA, gdyż jako pojedyncze badanie nie ma wartości diagnostycznej.
6. Badanie kleszcza usuniętego ze skóry pacjenta nie może być uznane jako metoda diagnostyczna.

WIRUS ODKLESZCZOWEGO ZAPALENIA OPON MÓZGOWO-RDZENIOWYCH (KZM), EPIDEMIOLOGIA I PROFILAKTYKA

Wirus KZM występuje w dwóch podtypach: środkowoeuropejskim (zwanym też podtypem zachodnim – występującym w Polsce) i dalekowschodnim. Wirusy obu podtypów wykazują silne podobieństwo antygenowe a istotna różnica między nimi dotyczy ich biologicznego wektora – kleszcza. Dla podtypu europejskiego jest nim *Ixodes ricinus*, dla dalekowschodniego *Ixodes persulcatus*. Ścisły związek wirusa KZM z jego wektorem jest przyczyną sezonowości zachorowań związanej z dwoma okresami aktywności kleszczy – dominującym wiosenno-letnim i słabszym jesiennym. Przedstawiona wcześniej charakterystyka epidemiologii KZM, jak również prowadzone w okresie prawie 50 lat badania potwierdzają, że stwierdzany w Polsce wirus KZM należy do odmiany centralno-europejskiej.

Pierwsze przypadki kleszczowego zapalenia mózgu (KZM) zaobserwowano w 1937 roku w tajdze syberyjskiej. Charakteryzowały się ciężkimi uszkodzeniami mózgu i wysoką śmiertelnością dochodzącą do 25% chorych.

Pierwsze dane świadczące o obecności wirusa KZM w Polsce opisał Demiaszkiewicz gdy u kilku osób z okolic Białowieży wystąpiły kliniczne objawy zachorowań wywołanych tym wirusem. Autor ten podaje, że już przed II wojną światową zdarzało się wiele podobnych zachorowań rozpoznawanych jako grypa z powikłaniami lub dur brzuszny mimo objawów charakterystycznych dla KZM.

W 1952 roku Szajna i współpracownicy opisali 28 przypadków KZM wśród pacjentów szpitala w Nysie Kłodzkiej. W 1954 roku Góralski zaobserwował 35 przypadków podejrzanym o zakażenie wirusem KZM w województwie olsztyńskim. W późniejszych latach KZM rozpoznawano u mieszkańców innych rejonów w województwach: gdańskim, łódzkim, krakowskim, szczecińskim.

W latach 1953-1957 ekspedycje naukowe zorganizowane przez PZH pod kierownictwem prof. F. Przesmyckiego w województwach opolskim i białostockim izolowały wirusa KZM od chorych ludzi jak też od zwierząt (drobne ssaki) i wektorów-kleszczy.

W połowie lat 60-tych i na początku lat 70-tych przeprowadzono badania serologiczne około 17 tysięcy dawców krwi oraz około 20 tysięcy pracowników służby leśnej. Z badań tych wynikało, że na różnych terenach Polski odsetek osób posiadających przeciwciała dla wirusa KZM wynosił od 0,5 do 6,5% populacji a wśród pracowników leśnych od 7% do 27%. Wskazywało to również na występowanie w populacji licznych zakażeń bezobjawowych i poronnych, obok obserwowanych typowych przypadków kleszczowego zapalenia mózgu. Przedstawione badania oraz izolacje wirusa od ludzi i zwierząt ujawniły szcze-

gólnie eksponowane tereny zasiedlania wirusa kleszczowego zapalenia mózgu w północno-wschodnich obszarach kraju obejmujących województwa białostockie, olsztyńskie i suwalskie, a także w południowo-zachodniej części kraju w województwie opolskim. Znalazło to kliniczne potwierdzenie w liczbie przypadków zachorowań zgłoszonych z tych obszarów. Umożliwiło to opracowanie wszechstronnej mapy występowania wirusa kleszczowego zapalenia mózgu w Polsce.

W okresie 23 lat, od 1970 do 1992 roku, zarejestrowano 576 przypadków KZM. Liczba zachorowań w poszczególnych latach wynosiła od 4 (1991 r.) do 60 (1970), a zapadalność wahała się od 0,01 do 0,2/100 000 mieszkańców.

W latach siedemdziesiątych XX wieku średnia roczna liczba zachorowań (38-60 przypadków) były wyższe niż w następnym dziesięcioleciu, kiedy roczne liczby zachorowań wynosiły 14-19 a zapadalność 0,04-0,05/100 000. Zjawisko to wynikało w znacznej części z zaniechania badań diagnostycznych.

W 1993 roku wystąpił trzydziestokrotny wzrost liczby zachorowań na KZM w porównaniu z 1992 rokiem, w którym zgłoszono 8 przypadków. Zarejestrowano 249 zachorowań, zapadalność wynosiła 0,65/100 000 i były to wartości najwyższe od początku rejestracji tj. 1970 roku. W następnych latach liczba zgłoszonych zachorowań ustabilizowała się na wysokim poziomie i wynosiła od 101 w 1999 roku do 267 w roku 1996. W latach następnych obserwowano oscylowanie liczby zachorowań w zakresie zbliżonym do drugiej połowy lat 90-tych XX wieku. Terytorialne rozmieszczenie zachorowań na przestrzeni lat wskazuje na utrzymywanie się największej liczby ognisk KZM w rejonach północno-wschodniej Polski. Zachorowania dominowały w sezonie wiosenno-letnim. Wiek chorych wahał się od 3 do 80 lat a objawowe zakażenia stwierdzano najczęściej u osób powyżej 20 roku życia. Zachorowania osób związanych z pracą na terenach występowania kleszczy stanowiły około 20% ogółu przypadków. Obok klasycznej drogi zakażenia człowieka przez zakażonego kleszcza w 1975 i 1995 roku udokumentowano zakażenia człowieka drogą jelitową poprzez picie surowego mleka od zakażonych zwierząt. W 1975 roku źródłem zakażenia było mleko krowie a w 1995 roku kozie.

Od 1994 śmiertelność wynosiła 0,5-2,8% i odpowiadała obserwowanej w innych krajach, w których występuje środkowoeuropejska odmiana wirusa. Obszary występowania ognisk zakażeń łączą się bezpośrednio z problemem diagnostyki. Poprawa czułości metod diagnostycznych oraz większa liczba wykonanych badań w danym roku mają istotne znaczenie dla ustalenia zarówno stopnia zagrożenia chorobą jak i obszarów, na których zagrożenie to występuje.

W zapobieganiu i zwalczaniu KZM występują dwie tendencje. Pierwsza z nich to zmniejszenie prawdopodobieństwa zakażenia, druga dotyczy immunoprofilaktyki czynnej (szczepienia). Zmniejszenie prawdopodobieństwa zakażenia jest możliwe przez: unikanie ekspozycji na kleszcze, stosowanie odpowiedniej odzieży, wczesne stwierdzenie i usunięcie kleszczy z powierzchni skóry, stosowanie środków odstrasżających kleszcze (repelenty). W przypadku zakażeń przenoszonych drogą pokarmową (mleko) skuteczną metodą jest gotowanie lub pasteryzacja mleka. Zalecenia te powinny być szczególnie przestrzegane na obszarach endemicznego występowania wirusa.

Aktualnie immunoprofilaktyka czynna oparta jest o stosowanie szczepionek inaktywowanych o wysokiej aktywności uodparniającej. Ze względu na zabity charakter wirusa są one bardzo bezpieczne wymagają jednak szeregu rewakcytacji (co 3-5lat). Wszystkie dostępne w Polsce szczepionki posiadają praktycznie identyczne właściwości: wysoki margines bezpieczeństwa i możliwości stosowania również w stanach upośledzenia odporności. Aktualna formuła uodpornienia sprowadza się do uodpornienia podstawowego (3 dawki), a następnie (w odstępach 3-5 lat) podawania dawek przypominających. Takie uodpornienie pozwala na wysoki stopień serokonwersji i wysoką skuteczność ochronną (powyżej 95%).

Kliniczny przebieg wirusowego odkleszczowego zapalenia mózgu

KZM jest chorobą z dwufazowym przebiegiem. Okres wylegania trwa od 2 do 28 dni. Wstępne objawy choroby przypominają przeziębienie. Są to: ogólna niedyspozycja, gorączka ok. 38°C, bóle głowy, stawów, mięśni, objawy nieżyty górnych dróg oddechowych, niekiedy nudności, wymioty. Ta pierwsza faza KZM trwa zwykle 1-9 dni po czym, o ile jest to poronna postać choroby, chory powraca do zdrowia. Przebieg pełnobjawowy cechuje po okresie trwającej 1-9 dni remisji, wystąpienie drugiej fazy KZM.

Drugą fazę choroby, trwającą kilka tygodni a nawet miesięcy, rozpoczyna nagły skok gorączki (ok. 40°C), zmiana nastroju (depresja), nękające bóle i zawroty głowy, wymioty, światłowstręt, oczopląs, niekiedy widzenie podwójne, niedosłuch, spadek ciśnienia krwi, drżenie zamiarowe, niedowłady wiotkie. Pojawiają się zaburzenia świadomości, aż do jej utraty. Chory pozostaje unieruchomiony, może wystąpić sztywność karku. Charakter objawów zależy od tego, czy choroba przebiega pod postacią mózgową, oponową czy rdzeniową. Wyzdrowienie dotyczy 99% chorych, chociaż nie zawsze jest ono całkowite. Trwałe niedowłady i objawy neurologiczne wywołane przez uszkodzenia poszczególnych nerwów dotyczą ok. 25% chorych. Jak dotychczas brak jest leczenia przyczynowego (antywirusowego) w terapii KZM.

Diagnostyka laboratoryjna KZM

W pierwszym okresie po stwierdzeniu występowania w Polsce wirusa KZM podstawową techniką diagnostyki wirusologicznej była izolacja wirusa z płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR) lub krwi chorego na wrażliwych zwierzętach (oseski myszy), a następnie identyfikacja wirusa metodami serologicznymi (odczynem neutralizacji – ON i wiązania dopełniacza – OWD). Podstawą serologicznego potwierdzenia zakażenia było stwierdzenie znaczącej dynamiki przeciwciał (przyrost miana) oznaczanych w ON lub OWD w dwóch próbkach surowi-

cy chorego, pobranych w ostrej i rekonwalescencyjnej fazie choroby. Znaczący postęp miał miejsce na początku lat sześćdziesiątych po stwierdzeniu własności hemaglutynacyjnych wirusa KZM. Odczyn zahamowania hemaglutynacji (OZHA) stał się w tym okresie główną metodą swoistej serologicznej diagnostyki zachorowań i oceny wrażliwości osobniczej na zakażenie ponieważ obecność wykrywanych tym odczynem przeciwciał jest ściśle powiązana z ochroną przed zakażeniem.

W latach osiemdziesiątych OZHA został zastąpiony metodami immunoenzymatycznymi (ELISA) pozwalającymi na badanie odpowiedzi immunologicznej w klasach IgG i IgM przeciwciał oraz dzięki wysokiej czułości metody, wykrywanie produkcji swoistych przeciwciał w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), co stanowi potwierdzenie udziału czynnika etiologicznego w neuroinfekcji. W związku z zaobserwowaniem nieswoistych wyników reakcji niektórych surowic z antygenem wirusowym w metodzie ELISA (na przełomie lat 80/90) rozszerzono zakres tzw. szarej strefy (wyników wątpliwych) przyjmując za dodatnie wyniki oznaczeń IgG powyżej 123 jednostek wiedeńskich (VIEU)/ ml.

Zasady ogólne:

Badanie diagnostyczne wykonuje się w przypadku wystąpienia objawów neuroinfekcji wirusem KZM czyli w **drugiej fazie zakażenia**. Ze względu na dwufazowy charakter zakażenia faza ta charakteryzuje się niskim prawdopodobieństwem wykrycia wirusa/genomu wirusa we krwi (wiremia występuje w pierwszej bezobjawowej lub grypopodobnej fazie).

UWAGA: Niska użyteczność metod wirusologicznych i molekularnych (zdolność potwierdzenia metody amplifikacji genomu – rtPCR wynosi tylko kilka procent);

Badanie obecności przeciwciał w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym jako metody z wyboru.

Ze względu na czułość i możliwość różnicowania odpowiedzi na zakażenie KZM w klasach przeciwciał stosuje się metody immunoenzymatyczne – ELISA.



Badania potwierdzające zakażenie wirusem KZM

UWAGA: Badania potwierdzające zakażenie wykonuje się technikami immunochemicznymi polegającymi na wykryciu przeciwciał anti-KZM w klasach IgG i IgM w surowicy chorego i przeciwciał IgG w płynie mózgowo-rdzeniowym chorego.

Badanie obecności swoistych IgM w płynie mózgowo-rdzeniowym można wykonywać jeśli producent testu przewiduje takie badanie a w zestawie znajduje się odpowiedni panel materiałów kontrolnych do tego badania (**stężenie IgM w płynie mózgowo-rdzeniowym jest wielokrotnie niższe niż w surowicy i użycie jako kontroli surowic może prowadzić do pozornie ujemnych wyników oznaczeń**). Badania te mogą zostać wykonane m.in. następującymi technikami: test immunoenzymatyczny (ELISA), test immunoenzymatyczny (EIA), test chemiluminescencyjny (CLIA), oraz test immunoenzymatyczno-fluorescencyjny (ELFA). Aktualnie na rynku dostępne są prawie wyłącznie zestawy diagnostyczne ELISA w wersji metody pośredniej (płytką opłaszczoną antygenem KZM; koniugat – znakowana enzymem antyimmunoglobulina).

W przypadkach wyników wątpliwych jeśli to możliwe, zaleca się pobranie od pacjenta kolejnej dodatkowej próbki w celu uzyskania wiążącego wyniku.

Badania odporności osobniczej na zakażenie wirusem KZM

Badanie wykonuje się poprzez oznaczenie poziomu przeciwciał IgG swoistych dla wirusa KZM. **Z wyboru stosowana jest półilościowa metoda ELISA.** W skład zestawu powinien wchodzić panel surowic dodatnich o znanym stężeniu swoistych przeciwciał (w VIEU/ml) umożliwiający wyznaczenie krzywej wzorcowej do odczytu stężenia tych przeciwciał w badanej próbce surowicy.

Czynnikami interferującymi w badaniu są:

Przeciwciała dla innych flawiwirusów powstałe w wyniku przechorowania lub uodpornienia (szczepienie przeciwko żółtej gorączce lub japońskiemu zapaleniu mózgu typu B). Wysoki poziom krzyżowych reakcji serologicznych pomiędzy gatunkami rodzaju *Flavivirus* uniemożliwia (z wyjątkiem badania metodą neutralizacji) jednoznaczne rozróżnienie, który z wirusów odpowiada za wytworzenie przeciwciał.

Ze względu na przepisy wykonanie badania testem neutralizacji wymaga posiadania laboratorium co najmniej 3 klasy bezpieczeństwa biologicznego (Ustawa z dnia 5 grudnia 2008 r. o zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych (Dz.U. Nr 234, poz. 1570) wraz z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia w sprawie szkodliwych czynników biologicznych dla zdrowia w środowisku pracy oraz ochrony zdrowia pracowników

UWAGA: W przypadku równoległych oznaczeń swoistych IgG w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym istotne jest określenie czy wykryte w PMR przeciwciała pochodzą z miejscowej syntezy w ośrodkowym układzie nerwowym -OUN (potwierdzenie zakażenia OUN) czy przedostały się do PMR z surowicy na skutek zwiększonego przenikania lub przerwania bariery krew mózg (zakażenie OUN niepotwierdzone).

Przeprowadzenie takiej oceny wymaga ustalenia stężenia całości IgG (i albuminy) w surowicy i PMR oraz obliczenia a następnie porównania ich stosunku w obu płynach. Alternatywną (ale i mniej czułą metodą jest porównanie względnego udziału swoistych dla KZM przeciwciał w odniesieniu do stężenia IgG w surowicy i PMR. Zwiększony udział swoistych przeciwciał w PMR wskazuje na miejscową syntezę tych przeciwciał w OUN.

UWAGA: Przy braku informacji o stężeniu białek w badanych materiałach wykazanie, że przeliczone miano swoistych przeciwciał w PMR jest wyższe od 1/16 (tzn. np. 1/10 czy 1/2) miana przeciwciał w surowicy, wskazuje na miejscową syntezę (jeśli w PMR nie obserwowano śladów hemolizy).

W przypadkach badania PMR obok informacji o wykryciu swoistych przeciwciał powinna się znaleźć adnotacja – miejscowa synteza potwierdzona/niepotwierdzona lub nieustalona.

BABESZJOZA

Babeszjoza, nazywana malarią północy, jest chorobą pasożytniczą przenoszona przez kleszcze. Przyczyną zachorowań są pierwotniaki z rodzaju *Babesia* będące obligatoryjnymi pasożytami krwinek czerwonych. Do transmisji pasożytów może również dojść przy przetoczeniach krwi i jej preparatów oraz w wyniku przeszczepu narządów, możliwa jest także przezłożyskowa droga zarażenia.

Zachorowania u ludzi wywołuje kilka spośród 100 opisanych dotychczas na świecie gatunków *Babesia*: *B. microti*, *B. divergens*, *B. venatorum*, *B. duncani*, opisano też zarażenia szczepami o nieoznaczonej jeszcze pozycji taksonomicznej. Wektorem występujących na terenie Polski *B. microti*, *B. venatorum* i *B. divergens* jest kleszcz pospolity *Ixodes ricinus*.

Większość udokumentowanych przypadków babeszjozy odnotowano u ludzi zamieszkujących obszar Półkuli Północnej. W ostatniej dekadzie w Stanach Zjednoczonych zaobserwowano geograficzną ekspansję *Babesia* i stały wzrost liczby przypadków zarażeń. W niektórych regionach tego kraju babeszjoza powodowana przez *B. microti* występuje niemal tak często jak borelioza z Lyme. W latach 2011-2012, w USA zarejestrowano 2035 przypadków zarażeń *Babesia*, głównie *B. microti*. W Europie zachorowania na babeszjozę są rozpoznawane rzadko. Od 1956 r. opisano około 40 przypadków o ciężkim przebiegu wywołanych przez *B. divergens* oraz pojedyncze zarażenia *B. venatorum* i *B. microti*. W Polsce rozpoznano przypadki objawowego zarażenia *B. microti* zawleczone z krajów Ameryki

Północnej i Południowej oraz zarażenie *B. venatorum* (dawniej szczep EU1) u pacjenta z boreliozą. W wyniku badań naukowych potwierdzono występowanie bezobjawowych zarażeń *B. microti* i *B. venatorum* na wschodnich terenach kraju.

Obraz kliniczny

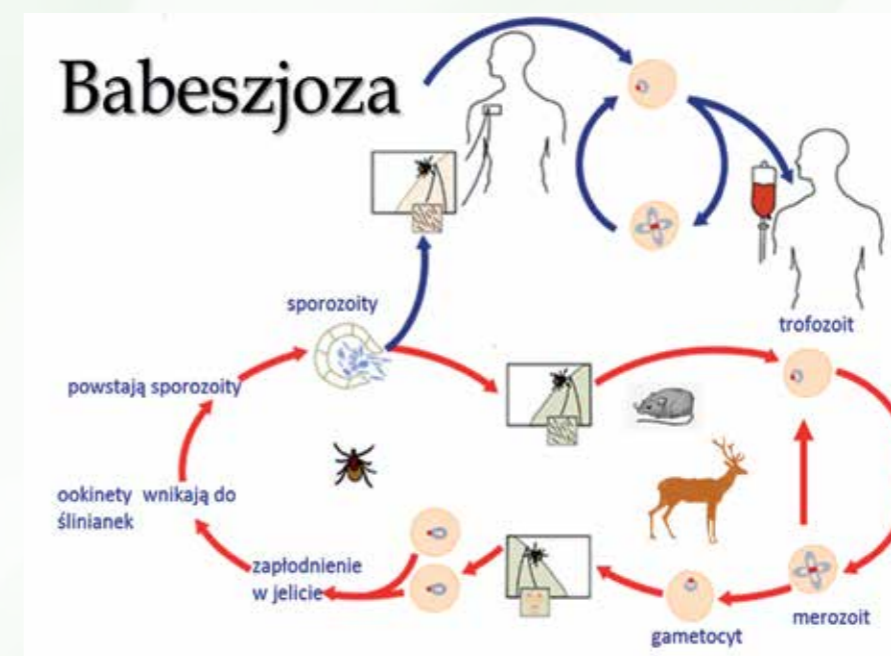
W przypadku zarażenia *B. microti* objawy pojawiają się w czasie 1 do 4 tygodni od ugryzienia przez kleszcza i zwykle 1 do 9 tygodni po przetoczeniu skażonej krwi lub jej składników. U osób zarażonych, po okresie zmęczenia i złego samopoczucia, pojawia się gorączka, w wysokości do 40,9°C, której towarzyszą dreszcze i poty. Często występują: bóle głowy i mięśni, bóle stawów, anoreksja i suchy kaszel, rzadziej: wymioty, ból gardła lub brzucha. Może pojawić się niestabilność emocjonalna, depresja, hyperestezja. W badaniu fizykalnym stwierdza się powiększenie śledziony, rzadziej powiększenie wątroby i zaczerwienienie gardła. Choroba trwa zwykle od 1 do 2 tygodni, jednak objawy znużenia i złego samopoczucia często utrzymują się przez wiele miesięcy.

UWAGA: W wynikach badań laboratoryjnych krwi osoby chorej widoczny jest niski hematokryt, niski poziom hemoglobiny i hepatoglobiny, podwyższona liczba retikulocytów i podwyższony poziom dehydrogenazy mleczanowej. Powszechnym objawem jest trombocytopenia. Odsetek krwinek zarażonych babeszjami najczęściej waha się w granicach 1-10%, czasem dochodzi do 80%.

Na przebieg babeszjozy wpływ ma status immunologiczny pacjenta i gatunek pasożyta, który spowodował chorobę. U osób immunokompetentnych zarażenie *Babesia* przebiega z reguły bezobjawowo lub skąpoobjawowo. Przebieg ciężki, wymagający hospitalizacji, występuje w stanach obniżonej odporności. **Do grupy zwiększonego ryzyka ciężkiego przebiegu i powikłań babeszjozy należą pacjenci: po splenektomii, z chorobą nowotworową, hemoglobinopatią, zakażeni wirusem HIV oraz chorzy z przewlekłymi chorobami serca, płuc lub wątroby.** Powikłania odnotowywane są niemal u połowy chorych hospitalizowanych, do najczęstszych należy zespół ostrej niewydolności oddechowej i rozsiana koagulopatia wewnątrznaczyniowa. Wystąpić może również zastoinowa niewydolność serca, śpiączka, niewydolność wątroby i nerek oraz pęknięcie śledziony. Częstość występowania przypadków śmiertelnych wśród osób hospitalizowanych wynosiła 6 do 9%, a w grupie osób z immunosupresją nawet 21%. Wysoka śmiertelność występująca przy zarażeniach *B. divergens* u pacjentów asplenicznych znacząco spadła po wprowadzeniu skojarzonej terapii przeciw pasożytniczej i transfuzji wymiennych.

UWAGA: Do potwierdzenia rozpoznania babeszjozy niezbędne jest wykonanie badań laboratoryjnych.

Cykl życiowy Babesia, na podstawie CDC



Wskazania do badań laboratoryjnych

Badania laboratoryjne w kierunku babeszjozy powinny być wykonywane tylko w przypadku uzasadnionego podejrzenia u pacjentów z grup ryzyka zarażenia *Babesia*, to jest:

- zamieszkujących na terenach endemicznych lub przyjeżdżających z takich terenów,
- u chorych, którzy w okresie 6 miesięcy przed wystąpieniem objawów mieli przetoczoną krew,
- kobiet w ciąży pokłutych przez kleszcze

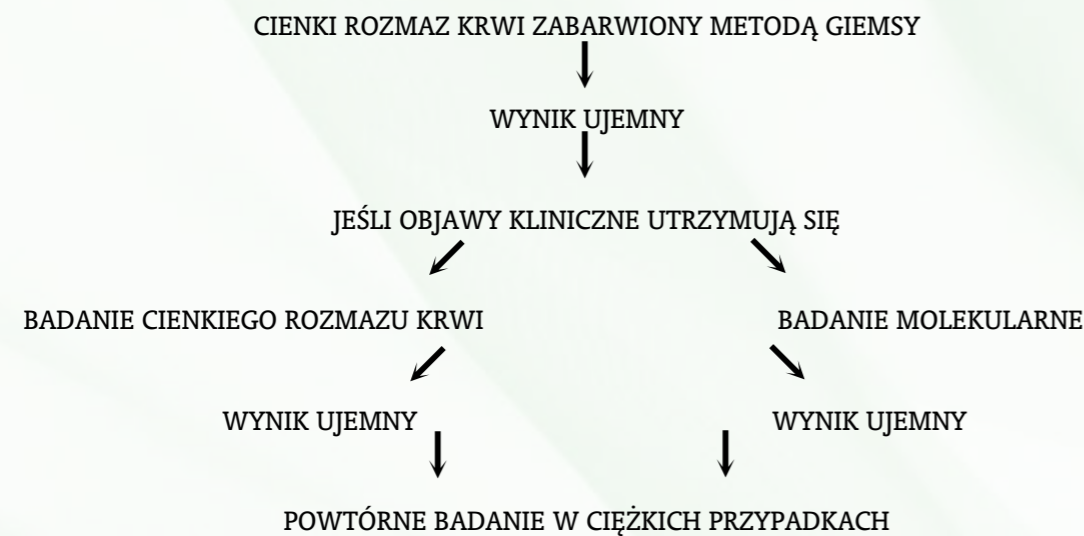
UWAGA: Wykonanie badań laboratoryjnych należy rozważyć także u pacjentów z boreliozą z Lyme lub z anaplazmozą, źle odpowiadających na standardowe leczenie lub wykazujących objawy ostrzejsze niż zwykle obserwowane w tych przypadkach.

W uzasadnionych klinicznie przypadkach u chorych powracających z terenów, na których współwystępują malaria i babeszjoza wskazane jest wykonanie badań różnicujących te choroby.

Badania laboratoryjne w kierunku Babeszjozy

Potwierdzeniem zarażenia pierwotniakami *Babesia* jest dodatni wynik badania krwi obwodowej na obecność pasożyta lub jego DNA. Materiałem do badań są próbki krwi włośniczkowej i żyłnej.

Algorytm postępowania diagnostycznego w przypadkach babeszjozy



Badania mikroskopowe

Złoty standard w diagnostyce babeszjozy stanowi badanie mikroskopowe zabarwionych rozmazów krwi. Rozmazy, co najmniej dwa cienkie i dwa grube, należy wykonać bezpośrednio po pobraniu krwi. Jeżeli nie jest to możliwe krew należy pobrać do probówki z EDTA i jak najszybciej przekazać do laboratorium diagnostycznego. Krew włośniczkowa w objętości 200 – 500 μ l, krew żylna – 2 ml.

Zwłoka przy wykonaniu rozmazów może spowodować zmiany w morfologii pasożytów i zmianę ich charakterystycznego zabarwienia.



Wynik badania

UWAGA: Wynik powinien zawierać opis kształtu, wielkości, liczby i ułożenia w krwince wykrytych pasożytów. W sprawozdaniu z badania powinny znaleźć się także informacje o parazytemii (intensywność inwazji).

Intensywność inwazji

- w cienkim rozmazie określa odsetek krwinek zarażonych przypadających na co najmniej 500 policzonych (wg wzoru: liczba zainfekowanych RBC / całkowita liczba oglądanych RBC x 100).
- w grubej kropli jest to liczba pasożytów przypadających na 1 μ l krwi, którą określa się licząc pasożyty oraz białe krwinki w wielu polach widzenia, w odniesieniu do standardowej liczby 8000 białych krwinek w 1 μ l krwi, wg wzoru: liczba pasożytów x (8000/ liczba policzonych białych krwinek). Odsetek krwinek zarażonych babeszjami jest najczęściej niski, waha się w granicach 1-10%; może dochodzić do 80%.

Przy niskiej parazytemii do wykrycia pasożytów konieczne może być powtórzenie badań w odstępach 8-12 godzinnych w kolejnych 2-3 dniach.

Parazytemia może utrzymywać się przez kilka miesięcy po wprowadzeniu standardowego leczenia, a u pacjentów nieleczonych ponad rok.

Ograniczenia diagnostyki mikroskopowej

UWAGA: Rozróżnienie zarażeń *Babesia* i *Plasmodium falciparum* za pomocą badań mikroskopowych jest trudne i wymaga dużego doświadczenia diagnosty. Badania mikroskopowe, w większości przypadków, nie pozwalają na określenie gatunku *Babesia*.

Badania molekularne

Badania molekularne są zlecane przez lekarza specjalistę chorób zakaźnych w przypadku uzyskania ujemnego wyniku mikroskopowego oraz w celu rozróżnienia zarażenia *Plasmodium* i *Babesia*. Na rynku europejskim nie ma obecnie standaryzowanych testów molekularnych przeznaczonych do rutynowych badań w kierunku babeszjozy. W laboratoriach referencyjnych wykorzystywane są różne odmiany techniki PCR do detekcji genów 18S rRNA pasożytów gatunków *Babesia* i *Theileria*. **Dodatnik wynik badania metodą PCR musi być potwierdzony wynikiem sekwencjonowania produktu, co umożliwi rozpoznanie gatunku.**

Badania serologiczne

Obecnie dostępne są standaryzowane testy immunofluorescencji pośredniej (IF) przeznaczone do badania próbek na obecność przeciwciał klas IgG i IgM przeciwko *B. microti* stosowane w USA w rejonach endemicznych. W Europie, gdzie *B. microti* nie jest dominującym czynnikiem etiologicznym babeszjozy ludzi, testy serologiczne mają ograniczoną użyteczność ze względu na silną specyficzność gatunkową antygenów *Babesia*. **W przypadku babeszjozy *B. microti* aktywne zarażenie potwierdza obecność IgM, które mogą być wykrywane już po upływie dwóch tygodni od zarażenia, i/ lub wysokie miana IgG ($\geq 1: 1024$).** U zarażonych pacjentów z immunosupresją zaobserwowano występowanie znaczącej zwłoki

w produkcji przeciwciał. Wyniki fałszywie dodatnie testu immunofluorescencji pośredniej stwierdzano u pacjentów z chorobami tkanki łącznej i autoimmunologicznymi, infekcjami bakteryjnymi i wirusowymi oraz inwazjami pasożytniczymi, w tym często u osób zarażonych *Toxoplasma gondii* i *Plasmodium spp.*

Powstałe wskutek zarażenia pierwotnego przeciwciała mogą być wykrywane w czasie od 1 roku do 6 lat.

Uwaga: Przed wprowadzeniem testu IF do diagnostyki laboratoryjnej babeszjozy *B. microti* należy określić wartość cut – off w odniesieniu do wartości uzyskanej dla puli prób zebranych na terenie Polski.

Ze względu na podobieństwo zarażenia *Babesia* do zarażenia *Plasmodium* badania w kierunku babeszjozy w Polsce powinny być wykonywane w laboratoriach referencyjnych, które dysponują personelem doświadczonym w rozpoznawaniu malarii:

- Gdynia** – Zakład Parazytologii Tropikalnej, Uniwersyteckie Centrum Medycyny Morskiej i Tropikalnej, Gdański Uniwersytet Medyczny,
Poznań – Oddział Kliniczny Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych Szpitala Klinicznego im. Heliodora Święcickiego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu,
Warszawa – Zakład Parazytologii Lekarskiej NIZP-PZH, Pracownia Parazytologii, SPZOZ Wojewódzki Szpital Zakaźny.

GORĄCZKI PLAMISTE

Epidemiologia zakażeń

Gorączki plamiste to choroby zakaźne wywoływane przez różne gatunki bakterii, należące do rzędu *Rickettsiales*. Charakterystyczna dla tych chorób jest wysoka gorączka i towarzyszące jej zmiany skórne. Najczęściej stwierdza się zmianę pierwotną w postaci strupa w miejscu ukłucia przez zakażonego stawonoga albo wysypkę plamistą, grudkową lub plamisto-grudkową.

Rezerwuarem zakażeń są różne gatunki zwierząt oraz kleszcze, z których bakterie przenoszone są na człowieka. Ze względu na czynnik etiologiczny (gatunek *Rickettsia* sp. wywołujący zakażenie), grupę gorączek plamistych na terenie Eurazji stanowią: TIBOLA/DEBONEL (Tick-borne lymphadenopathy/Dermacentor-borne necrosis erythema and lymphadenopathy), zakażenia wywoływane przez *R. helvetica*, gorączka śródziemnomorska i północnoazjatycka gorączka kleszczowa.

Badania kleszczy przeprowadzone na terenie Polski w latach 2006-2009 wykazały występowanie riketsji z grupy gorączek plamistych w kleszczach gatunku *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*. Obecność *R. raoultii* wykryto w kleszczach obu gatunków. DNA tych bakterii stwierdzono w 40,7-56,7% kleszczy *D. reticula-*

tus w województwie podlaskim, w 23% kleszczy *I. ricinus* w województwie mazowieckim i w 6% kleszczy *I. ricinus* w województwie świętokrzyskim. Ponadto 2% kleszczy *I. ricinus* z województwa świętokrzyskiego zakażonych było *R. slovacca*, których zasięg występowania, jak przyjmowano wcześniej, stanowiła południowa granica Polski. W badaniach serologicznych przeprowadzonych u leśników wykryto przeciwciała dla riketsji z grupy gorączek plamistych u blisko 15% osób, a najwyższe wykryte miano wynosiło 128. Wskazywało to na możliwość występowania rodzimych przypadków TIBOLA. Pierwsze przypadki tej choroby w Polsce opisano w 2011 roku.

Większość zachorowań występuje między marcem i majem oraz wrześniem i listopadem, w czasie najwyższej aktywności kleszczy.

Czynnik etiologiczny

Riketsje, tak jak inne Gram-ujemne bakterie, zaliczane są do grupy alfa-proteobakterii. Bakterie te są małymi Gram-ujemnymi polimorficznymi pałeczkami, bezwzględnie pasożytami wewnątrzkomórkowymi. Na podstawie analizy genetycznej, rząd *Rickettsiales* podzielono na dwie rodziny: *Rickettsiaceae* i *Anaplasmataceae*. Rodzina *Rickettsiaceae* obejmuje rodzaj *Rickettsia* i *Orientia*. Rodzaj *Rickettsia* jest podzielony na grupy riketsji wywołujących dury wysypkowe oraz gorączki plamiste (ang. Spotted Fever Group, SFG). Rodzaj ten dotychczas zawiera 25 gatunków oficjalnie uznanych, z czego 17 jest patogennych dla człowieka. Poszczególne gatunki tych bakterii wywołują określone zakażenia.

Czynnikiem etiologicznym TIBOLA/DEBONEL są trzy gatunki riketsji: *R. slovacca*, *R. raoultii* i *R. rioja*. Ich rezerwuarem są kleszcze *Dermacentor marginatus* i *D. reticulatus*, *Ixodes ricinus*, *Haemaphysalis punctata* oraz *H. sulcata*, a rezerwuarem *R. raoultii* są kleszcze *D. nutalli*, *D. silvarum*, *D. niveus* i *Rhipicephalus pumilio*.

Gorączka guzkowa wywoływana jest przez szereg podgatunków, których nazwy pochodzą od miejsca izolacji: *R. conorii* subsp. *conorii*, *R. conorii* subsp. *caspia*, *R. conorii* subsp. *israelensis*, *R. conorii* subsp. *indica*. Ponadto podobne objawy zakażenia wywołują *R. monacensis*, *R. massiliae* i *R. aeschlimannii*. Zakażenie szerzy się poprzez wektor, którym jest kleszcz psi *Rhipicephalus sanguineus*, będący jednocześnie rezerwuarem drobnoustroju oraz kleszcze *Hyalomma plumbeum*, *D. marginatus* i *D. reticulatus*. W zależności od rejonu występowania może ona przyjmować różne nazwy: Boutonneuse fever, Mediterranean spotted fever, Israeli tick typhus, Astrakhan spotted fever, Kenya tick typhus, Indian tick typhus.

Rezerwuarem i źródłem zakażeń wywoływanych przez *R. helvetica* dla ludzi są kleszcze *I. ricinus*, *I. ovatus*, *I. persulcatus*, *I. monospinus*.

Czynnikiem etiologicznym północnoazjatyckiej gorączki kleszczowej jest *R. sibirica*, a rezerwuarem i przenosicielem kleszcze z rodzaju *Dermacentor* (*D. nuttallii*, *D. marginatus*, *D. reticulatus*).

Drogi zakażenia

W cyklu krążenia riketsji w środowisku naturalnym biorą udział drobne ssaki, a w otoczeniu człowieka psy, owce, konie, kozy i bydło. Zachorowania następują w wyniku ukłucia przez kleszcza albo poprzez kontakt z materiałem po-

chodzącym z zakażonych kleszczy i przenikanie bakterii przez drobne uszkodzenia skóry. **W przypadku gorączki guzkowej do zakażenia może również dojść w wyniku wdychania zakażonego pyłu i poprzez błonę śluzową nosa i oczu.** Do zakażenia *R. helvetica* dochodzi bezpośrednio w wyniku ukłucia przez zakażonego kleszcza.

Przebieg zakażeń

Komórkami docelowymi dla riketsji są komórki śródbłonka naczyń, do których wnikają i w których następuje ich namnażanie. W wyniku tych procesów dochodzi do nacieków leukocytarnych w ścianach naczyń krwionośnych i w przestrzeniach okołonaczyniowych. Prowadzi to do uszkodzenia naczyń włosowatych, tętniczek i małych tętnic, a w konsekwencji do wybroczyn i wylewów.

UWAGA: Typową zmianą dla tego procesu, obserwowaną we wszystkich gorączkach plamistych (oprócz zakażeń wywołanych przez *R. helvetica*), jest czarny strup powstały w miejscu ukłucia przez kleszcza lub w miejscu kontaktu materiału zanieczyszczonego riketsjami z uszkodzoną skórą.

Zmiany patologiczne w naczyniach mogą powodować też uszkodzenia wielonarządowe.

Gorączka guzkowa (Febris Mediterranea)

Okres inkubacji wynosi zwykle 7 dni (od 4 do 21 dni). Choroba rozpoczyna się wystąpieniem dreszczy, bólami mięśni i stawów. Pojawia się gorączka, bóle głowy i zapalenie spojówek. **Na skórze występuje pojedyncza zmiana pierwotna w miejscu ukłucia przez kleszcza w postaci czarnego strupa „tache noire”.** Jest to przypominająca oparzenie, zabarwiona na czarno zmiana nekrotyczna, otoczona silnie zaczerwienioną strefą, z towarzyszącym zapaleniem okolicznych węzłów chłonnych. Po 3-5 dniach od wystąpienia gorączki pojawia się plamisto-grudkowa wysypka na stopach i dłoniach, a w niektórych przypadkach obejmuje także tułów lub całe ciało. Zwykle choroba ustępuje po około 10 dniach. Ciężkie formy zakażenia (około 6% przypadków) związane są z nieprawidłowym leczeniem we wczesnej fazie zakażenia, a także u osób z osłabioną odpornością immunologiczną. Najczęstszą ciężką postacią zakażenia jest zapalenie mózgu przebiegające ze sztywnością karku, z bólami głowy, objawami otępienia i drgawkami klonicznymi, rzadziej z porażeniem połowicznym i afazją. Objawom neurologicznym mogą towarzyszyć bóle brzucha, nudności oraz biegunka prowadzące do krwawienia z górnego odcinka przewodu pokarmowego. W przypadkach, gdy drogę zakażenia stanowią błony śluzowe okolicy oka, dochodzi do zapalenia spojówek, zapalenia błony naczyniowej oka i siatkówki. Rzadko obserwuje się ostrą niewydolność nerek i niewydolność układu oddechowego. Gorączka guzkowa występuje w basenie Morza Śródziemnego, na wybrzeżu Morza Czarnego i Kaspijskiego. Oprócz Europy występuje także w południowej i południowo-wschodniej Azji oraz w Afryce.

TIBOLA/DEBONEL (Tick-borne lymphadenopathy/Dermacentor-borne necrosis erythema and lymphadenopathy)

Cechą charakterystyczną tych zakażeń jest pojedynczy, bolesny strup u ponad 80% zakażonych, w miejscu ukłucia przez kleszcza na skórze owłosionej głowy. Zmianie tej towarzyszy powiększenie od 1 do 20 węzłów chłonnych szyjnych (82%), wyłysienie najbliższej okolicy i zaczerwienienie wokół strupa (20% przypadków) oraz obrzęk twarzy (19-40%). Obok tych zmian występują objawy ogólne, takie jak gorączka (25-80%), bolesność węzłów chłonnych szyjnych (69-100%), osłabienie (70-100%), bóle głowy (53-100%) oraz wysypka plamisto-grudkowa. Choroba dotyczy zwykle osób w młodym wieku do 12 lat (40-60% przypadków), które w wywiadzie podają przebywanie na terenach zalesionych. Okres wylegania choroby to zwykle jeden tydzień (1-55 dni).

UWAGA: Objawy u osób leczonych mogą utrzymywać się od kilku dni do 6 miesięcy (średnio 2 miesiące), u nieleczonych nawet do 18 miesięcy.

Przypadki zakażeń wykrywane są na Węgrzech, we Francji, w Portugalii, we Włoszech, w Austrii, w Niemczech, w Bułgarii, w Polsce (gdzie występują pod nazwą TIBOLA) i w Hiszpanii (pod nazwą DEBONEL).

Zakażenia wywoływane przez *R. helvetica* (Aneruptive fever)

Okres wylegania choroby wynosi około 8 dni. Choroba charakteryzuje się gorączką, bólem głowy i mięśni. Strup w miejscu ukłucia kleszcza stwierdza się rzadko. **W przebiegu nieleczzonego zakażenia po kilku tygodniach może dojść do zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych.** W przypadkach tych, w badaniach dodatkowych we krwi stwierdza się podwyższony poziom CRP, leukocytozę do 12000 komórek/ μ L, trombocytopenię, a w płynie mózgowo-rdzeniowym pleocytozę (kilkadziesiąt komórek/ μ L) z przewagą komórek jednojądrzastych. Niekiedy zakażenie wywołane przez *R. helvetica* może jedynie przypominać zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i przebiegać z silnym bólem głowy, ze światłowstrętem, z osłabioną siłą mięśni oraz ze sztywnością karku wywołaną bólem mięśni szyi. Objawy te mogą utrzymywać się przez kilka miesięcy i mogą wymagać podawania sterydów (prednizon). **Badanie płynu mózgowo-rdzeniowego oraz badania obrazowe (MRI i TK) w tych przypadkach nie wykazują odchylenia od stanu prawidłowego.** *R. helvetica* może być także przyczyną zapalenia osierdzia, choć dotychczas opisywane przypadki nie są w pełni udokumentowane. Pojedyncze przypadki zakażeń ludzi stwierdzane były w Szwecji, we Francji i Włoszech, a poza Europą przypadki zakażeń stwierdzono w Tajlandii i Australii. W kleszczach, *R. helvetica* występuje w wielu krajach Europy, m. in.: we Francji, Szwecji, Słowenii, Portugalii, Włoszech, Bułgarii i Polsce.

Północnoazjatycka gorączka kleszczowa (Febris Sibirica)

Choroba rozpoczyna się bólem głowy, osłabieniem, wymiotami, bólem mięśni i stawów. Występuje gorączka dochodząca do 38-39°C. W miejscu ukłucia przez kleszcza powstaje pierwotna zmiana w postaci brązowego strupa nakrywającego zmienioną martwiczo tkankę. W okolicy tej zmiany następuje powiększenie węzłów chłonnych. Riketsjemia i toksykemia rozwijają się w ciągu następnych 2-4 dni. W tym czasie pojawia się wysypka, najpierw na skórze kończyn, a następnie przechodząca na tułów i twarz. Występują zaburzenia ze strony ośrodkowego układu nerwowego, zmiany w wątrobie, nerkach i mięśniu sercowym.

Diagnostyka laboratoryjna gorączek plamistych

Materiał do badań serologicznych

Materiałem do badań serologicznych jest surowica

Materiał do badań molekularnych

Materiał do badań w tej metodzie stanowią leukocyty krwi obwodowej, materiał biopsyjny pobrany ze zmian skórnych i /lub węzłów chłonnych. **Przed włączeniem leczenia antybiotykiem**, należy pobrać minimum 5-10 ml krwi na heparynę lub cytrynian w celu uzyskania warstwy leukocytów (ang. buffy coat). Izolację DNA bakterii z pełnej krwi lub leukocytów należy wykonać **w czasie 24 godz. od momentu pobrania lub przechować uzyskany materiał w temperaturze -20°C do izolacji materiału genetycznego w późniejszym czasie.**

Materiał do hodowli bakteryjnej

Materiał, z którego wykonywany jest posiew stanowią leukocyty krwi obwodowej, materiał biopsyjny pobrany ze zmian skórnych i /lub węzłów chłonnych. **Przed włączeniem leczenia antybiotykiem**, należy pobrać minimum 5-10 ml krwi na heparynę lub cytrynian w celu uzyskania warstwy leukocytów (ang. buffy coat). Do hodowli nie należy stosować krwi pobranej na EDTA.

UWAGA: Posiew należy wykonać w dniu pobrania materiału. W przypadkach, gdy nie jest to możliwe, krew lub uzyskany osad leukocytów, biopaty ze zmian skórnych lub z węzłów chłonnych przechowywać w temperaturze -70°C lub w ciekłym azocie.

Badania serologiczne

Metody serologiczne są głównym narzędziem badawczym w rozpoznawaniu riketsjoz z grupy gorączek plamistych. Podstawową metodą zalecaną przez WHO, a jednocześnie metodą referencyjną jest odczyn immunofluorescencji pośredniej (IFA – indirect immunofluorescence assay). Testy oparte na tej metodzie służą do wykrywania swoistych przeciwciał klasy IgM i IgG w fazie ostrej zakażenia i w okresie zdrowienia.

UWAGA: Obie klasy przeciwciał są wykrywane w czasie 7-15 dni od pojawienia się objawów choroby.

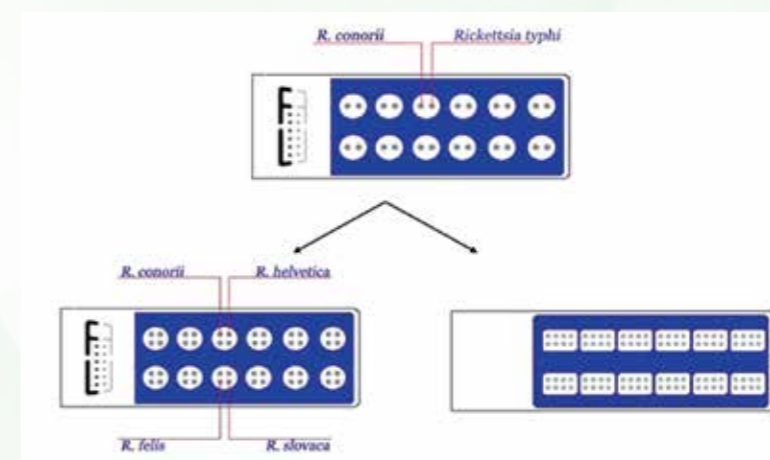
Za znamienne miano przeciwciał w zakażeniach wywoływanych przez *R. conori* przyjmuje się **miano ≥ 128 w klasie IgG i/lub ≥ 64 w klasie IgM lub czterokrotny wzrost miana w dwóch próbkach pobranych w odstępie dwóch tygodni.** W przypadku zakażeń wywoływanych przez pozostałe bakterie *Rickettsia* sp. z grupy gorączek plamistych, za znamienne przyjmuje się **miano ≥ 64 w klasie IgG i/lub ≥ 32 w klasie IgM lub czterokrotny wzrost w dwóch próbkach.**

Do wykrycia riketsjoz z grupy gorączek plamistych, a jednocześnie różnicowania tych zakażeń z riketsjozami wywołującymi dury wysypkowe, stosuje się testy mikroimmunofluorescencji (MIF) z antygenami bakterii należących do *Rickettsia* sp., wywołujących obie te jednostki chorobowe. Najczęściej stosowanymi parami antygenów są antygeny *R. typhi* lub *R. mooseri* charakterystyczne dla durów wysypkowych oraz antygeny *R. rickettsii* lub *R. conori* charakterystyczne dla gorączek plamistych. Wyższe, wykryte miano przeciwciał dla danego antygeny stanowi podstawę do rozpoznania duru wysypkowego lub gorączki plamistej.

Identyfikacja gatunku *Rickettsia* sp. wywołującego daną gorączkę plamistą, wymaga zastosowania testu mikroimmunofluorescencji (MIF) z antygenami riketsji najczęściej występujących na danym obszarze. Ze względu na występowanie reakcji krzyżowych przeciwciał z antygenami różnych gatunków riketsji należących do grupy gorączek plamistych przyjmuje się, że najwyższe miano przeciwciał uzyskuje się z antygenem gatunku wywołującego zakażenie. Dostępne są np. komercyjne testy MIF wykrywające przeciwciała swoiste dla *R. helvetica*, *R. slovaca*, *R. felis*, *R. conori*. Istnieje ponadto możliwość zakupu komercyjnego testu z panelem antygenów zaprojektowanym wg. wymagań diagnostycznych danego laboratorium opartych o dane epidemiologiczne.

Czułość diagnostyczna testów IFA, w zależności od stadium choroby i czasu trwania objawów wynosi 46%-100%, a swoistość 100%.

Schemat diagnostyki gorączek plamistych metodą MIF



UWAGA: Pierwszy etap badania serologicznego obejmuje różnicowanie między riketsjozami z grupy gorączek plamistych (np. *R. conori*) i durów wysypkowych (np. *R. typhi*). W przypadkach wykrycia przeciwciał dla grupy gorączek plamistych, w drugim etapie wykonuje się różnicowanie między gatunkami riketsji wywołujących poszczególne zakażenia.

Czynniki interferujące w badaniu serologicznym:

- Widoczna makroskopowo hemoliza, hiperlipemia mogą być przyczyną nieswoistych oznaczeń. Surowice takie nie powinny być przyjmowane do badań.
- Kontaminacje bakteryjne powodują nieswoisty dodatni wynik poprzez wiązanie koniugatu albo powodują degradację przeciwciał będąc przyczyną wyników fałszywie ujemnych. W czasie pracy z surowicami, w miarę możliwości, należy stosować aseptyczne techniki i materiały, w celu uniknięcia kontaminacji surowic.
- Obecny w surowicy czynnik reumatoidalny (głównie nieswoiste przeciwciała klasy IgM) łączący się z IgG, a następnie powstały kompleks z antygenem może być przyczyną wyników fałszywie dodatnich. Ponadto w przypadku nadmiaru IgG, istnieje możliwość zastąpienia słabo wiążących się z antygenem przeciwciał klasy IgM przez silniej wiążące się przeciwciała IgG prowadząc do fałszywie ujemnych wyników. Usunięcie poprzez absorpcję przeciwciał IgG zapobiega obu wyżej wspomnianym reakcjom.
- Reakcje krzyżowe z *Legionella* sp., *Proteus* sp., *Francisella tularensis* mogą być przyczyną wyników fałszywie dodatnich.

Badania molekularne

W diagnostyce riketsjoz ma także zastosowanie metoda PCR (wykrywanie określonych genów) z sekwencjonowaniem (identyfikacja gatunku). Daje to możliwość nie tylko potwierdzenia rozpoznania klinicznego, ale także klasyfikacji wykrytego szczepu riketsji do rodzaju, grupy i gatunku. Opiera się ona na sekwencjonowaniu amplifikowanych fragmentów pięciu genów tj. 16S rRNA, *gltA*, *ompA*, *ompB*, oraz genu białka D. Zgodnie z tymi zasadami, aby szczep zaklasyfikować do danego gatunku, stopień homologii sekwencji ich genów z sekwencjami genów danego gatunku (GenBank) musi być odpowiednio wysoki (powyżej 99%).

Hodowla

Bakterie *Rickettsia* sp. są bezwzględnyimi pasożytami wewnątrzkomórkowymi, a ich hodowla wymaga zastosowania linii tkankowych. Do tego celu najczęściej wykorzystuje się linie ciągłe wyprowadzone z fibroblastów mysich (L929) lub z embrionalnych komórek płucnych (HEL).

Wszystkie procedury związane z posiewami *Rickettsia* sp. powinny być wykonywane w komorze z przepływem laminarnym. Supernatant o objętości 1 ml (warstwa leukocytarna heparynizowanej krwi, homogenizowany materiał biopsyjny) mieszany jest z 1 ml pożywki RPMI 1640. Materiał ten dodawany jest do hodowli tkankowych znajdujących się w fiolkach typu shell-vial. Fiolki te są następnie wirowane przy obrotach 700 g/min przez 1 godzinę w temperaturze 22°C. Po wirowaniu, inokulum jest usuwane i dwukrotnie przemywane roztworem PBS. Zakażone linie komórkowe inkubowane są w pożywce MEM z płodową surowicą cielęcą i L-glutaminą w 37°C, w atmosferze 5% CO₂. Wzrost hodowli bakteryjnych oceniany jest co 7-14 dni z wykorzystaniem barwienia metodami Giemzy lub Gimeneza, metod molekularnych lub immunofluorescencji.

Ludzka anaplazmoza granulocytarna (HGA)

Czynnik etiologiczny

Anaplasma phagocytophilum [do 2001 roku trzy odrębne gatunki *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi*, czynnik ludzkiej erlichiozy granulocytarnej (HGE)] należy do rodziny *Anaplasmataceae*, rodzaju *Anaplasma* (wraz z rodzajami: *Ehrlichia*, *Aegyptianella*, *Neorickettsia* oraz *Wolbachia*, a także nie do końca jeszcze poznany mi rodzajami: *Candidatus Neoehrlichia* i *Candidatus Xenohaliotis*).

A. phagocytophilum jest niewielką (0,4 – 1,3 μm) Gram-ujemną bakterią o pleomorficznym kształcie z przewagą form kulistych lub owalnych, najczęściej ziarniaków. Jest bezwzględnie wewnątrzkomórkowym mikroorganizmem, wykazującym wysoki tropizm do granulocytów obojętnochłonnych. W wakuolach śródplazmatycznych tworzy 2-4 μm mikrokolonie zwane morulami, składające się z od 3 do 50 komórek bakteryjnych. Rozróżnia się dwa typy komórek tworzących morule – małe, owalne komórki retikularne RC (reticulate cells) o rozproszonych rybosomach i siateczkowatym nukleoidzie oraz występujące sporadycznie komórki DC (dense-cored cells) o zwartej strukturze DNA, nieregularnym kształcie i rybosomach zlokalizowanych w centralnej części cytoplazmy.

Genom *A. phagocytophilum* składający się z 1 471 282 bp jest około 4-krotnie mniejszy niż u *Escherichia coli*, 55% genomu stanowią geny metabolizmu podstawowego, a ponad 1/3 otwartych ramek odczytu (ORFs) koduje unikatowe struktury białkowe, niespotykane w innych organizmach. *A. phagocytophilum* nie potrafi wykorzystać glukozy jako podstawowego źródła energii, ale posiada geny pozwalające na biosyntezę wszystkich niezbędnych nukleotydów, witamin i koenzymów, takich jak biotyna, tiamina czy koenzym A.

Epidemiologia

Wektorem *A. phagocytophilum* są kleszcze *Ixodes*: w Europie *I. ricinus*, a w Ameryce Północnej *I. scapularis*, *I. pacificus*, *I. spinipalpis*, a w Azji *I. persulcatus* i *I. ovatus*. Rezerwuarem są dziko żyjące zwierzęta kopytne (jelenie, sarny) oraz mniejsze i większe gryzonie. Przeprowadzone przez Rymaszewską i wsp. badania wykazały obecność DNA *A. phagocytophilum* u 48% jeleni i 74% saren objętych eksperymentem. Natomiast zakażenie człowieka, psa, kota, owieczki, bydła bądź konia jest przejawem zjawiska żywicielstwa przypadkowego.

Odsetek zakażenia kleszczy na terenie Europy, w zależności od regionu oraz stosowanej metody waha się od 1,1% do 19,5%, ale w większości krajów oscyluje w granicach 2-3%. Podobnie w Polsce, zakażenie kleszczy *A. phagocytophilum* waha się od 0,59% do 19,5% w zależności od rejonu kraju i zastosowanych metod.

Tomasiewicz K. i wsp. stwierdzili metodą PCR zakażenie HGA u 13,1% kleszczy. w tym 45,7% samic i 4,5% samców i tylko w 0,9% nimf na obszarze środkowo-wschodniej Polski.

Stańczak J. i wsp. wykazali, że na obszarach zurbanizowanych Trójmiasta (Gdańsk, Gdynia, Sopot) spośród kleszczy *I. ricinus* zakażonych HGA, 14% było jednocześnie zakażonych krętkami *B. burgdorferi* a, 2,3% pierwotniakiem *B. microti*.

Ludzka anaplazmoza granulocytarna (HGA) jest chorobą odzwierzęcą występującą w strefie klimatu umiarkowanego na półkuli północnej w Europie i Ameryce Północnej, oraz Azji. Pierwsze zachorowania opisano w 1994 r. w USA, natomiast w Europie (Słowenia) trzy lata później, a w Polsce w 2001 roku.

UWAGA: Do zakażenia *A. phagocytophilum* najczęściej dochodzi w wyniku pokłucia przez zainfekowanego kleszcza, ale możliwe jest także zakażenie perinatalne, drogą transfuzji krwi i zakażenie szpitalne. Wykazano, iż *A. phagocytophilum* w preparatach krwiopochodnych jest zdolna do zakażenia nawet do 18 dni, pomimo przechowywania w temperaturze 4°C.

Obraz kliniczny

Zakażenie człowieka przez *A. phagocytophilum* ma przebieg niecharakterystyczny i zróżnicowany, od bezobjawowego przez łagodny, grypopodobny, aż do ciężkiego, który może zakończyć się śmiercią pacjenta.

W większości przypadków zakażenie *A. phagocytophilum* ma przebieg bezobjawowy, samoograniczający się, którego jedynym dowodem jest obecność swoistych przeciwciał. Na terenie stanów Nowy York i Wisconsin wykazano iż 15-36% mieszkańców posiada swoiste przeciwciała przeciw *A. phagocytophilum*.

Zachorowania występują najczęściej od kwietnia do października ze szczytem w lipcu.

Objawowe zakażenie jest chorobą gorączkową o ostrym przebiegu, z okresem wylegania od 5 do 21 dni (średnio 11 dni). Typowymi objawami są: gorączka w granicach 38-39 °C, bóle głowy, stawów i mięśni, ogólne złe samopoczucie. Mogą również wystąpić wymioty i nudności, bóle brzucha, biegunka i kaszel. Objawom choroby często towarzyszy splenomegalia i powiększenie wątroby z cechami uszkodzeniem hepatocytów. Gorączka utrzymuje się od 2 do 11 dni (średnio 10 dni). Objawy u większości chorych cofają się w ciągu 30 dni nawet bez leczenia antybiotykami.

Zmiany skórne o charakterze wysypki plamisto grudkowej, wybroczynowej lub erythrodermii zlokalizowane na całym ciele poza twarzą, dłońmi i podeszwami stóp występują u <10% chorych

W ciężkich przypadkach niespecyficzne objawy utrudniające rozpoznanie HGA mogą prowadzić do poważnych powikłań ujawniających się w czasie trwania choroby lub w przyszłości. Do najcięższych należą: zespół wewnątrznaczyniowego wykrzepiania (DIC), płamica małopłytkowa z towarzyszącą anemią hemolityczną, krwawienia do światła przewodu pokarmowego i krwotoki wewnętrzne, niewydolność nerek, zespół ostrej niewydolności oddechowej, a także objawy neurologiczne takie jak: neuropatie, śpiączka, czy zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu z zaburzeniami świadomości i niedowładami.

Uszkodzenie ośrodkowego układu nerwowego w przebiegu HGA występuje tylko u ok. 1% chorych. Opisano uszkodzenie splotu barkowego, porażenie nerwu twarzowego i innych nerwów czaszkowych, polineuropatie utrzymujące się

kilka miesięcy. W płynie mózgowo-rdzeniowym stwierdza się pleocytozę limfocytarną i niewielki wzrost stężenia białka. Przyczyna uszkodzenia układu nerwowego w przebiegu HGA nie jest poznana, w diagnostyce różnicowej należy brać pod uwagę koinfekcję z *B. burgdorferi* i zakażenie oportunistyczne.

Śmiertelność wśród chorych wynosi poniżej 1%, ale wśród dzieci, osób z upośledzoną odpornością i starszych wynosi od 7 do 10%. Obecność *A. phagocytophilum* sprzyja rozwojowi innych zakażeń, zarówno patogenami odkleszczowymi, jak i oportunistycznymi.

Ciężki przebieg kliniczny obserwuje się, u chorych z w starszym wieku, leczonych lekami immunosupresyjnymi, z przewlekłymi chorobami zapalnymi lub chorobami nowotworowymi.

Obraz kliniczny i odchylenia w badaniach laboratoryjnych u chorych z Europy są podobne jak u chorych z USA. Jednak w Europie choroba przebiega łagodniej, bardzo rzadko występują powikłania, w tym zakażenia oportunistyczne, bardzo rzadko rejestruje się zgony. Nie opisano w Europie przebiegu o charakterze przewlekłym.

Reinfekcja

UWAGA: Zakażenie HGA powoduje trwałą odporność. U pacjentów po zakażeniu we krwi stwierdza się wysokie miana przeciwciał utrzymujące się kilka lat.

Diagnostyka laboratoryjna HGA

Odchylenia w badaniach hematologicznych i biochemicznych, chociaż niespecyficzne, są bardzo przydatne w diagnostyce HGA. W pierwszym tygodniu choroby u 90% chorych obserwuje się leukopenię, a trombocytopenię u 90% chorych. Towarzyszy temu, u 90% chorych, niewielki wzrost aktywności aminotransferaz asparaginianowej (AspAT) i alaninowej (ALAT) oraz dehydrogenazy kwasu mlekowego LDH. Stwierdza się również wzrost aktywności fosfatazy alkalicznej i niekiedy wzrost stężenia bilirubiny.

W ostrym okresie choroby obserwuje się wzrost stężenia białka CRP i kreatyniny, a u 50% chorych niedokrwistość w drugim tygodniu choroby. Niewielkiego stopnia hyponatremię stwierdza się u 50% chorych dorosłych i 70% dzieci.

U pacjentów europejskich odchylenia w badaniach laboratoryjnych cofają się w ciągu 14 dni od początku choroby.

Objawy ostrej ludzkiej anaplazmozy granulocytarnej i odchylenia w badaniach laboratoryjnych są podobne do tych obserwowanych w początkowej fazie zakażenia wirusem kleszczowego zapalenia mózgu. Dlatego u chorych pochodzących lub powracających z terenów endemicznych i z wywiadem pokłucia przez kleszcze zawsze w diagnostyce różnicowej należy uwzględnić możliwość kleszczowego zapalenia mózgu i HGA.

Zalecane metody diagnostyczne (wg. Thomas R.J., Dumler J.S., Carlyon J.A. Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and Ehrlichia ewingii ehrlichiosis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2009; 7(6): 709–722)

Czas od wystąpienia gorączki	Zalecana metoda diagnostyczna	Alternatywna metoda diagnostyczna	Niska czułość
< 7 dni	PCR, rozmaz krwi	Posiew krwi – na linię komórkową HL-60	serologiczne
7 – 14 dni	Serologiczne (Faza ostra i faza rekonwalescencji)		PCR, rozmaz krwi
> 14 dni	Serologiczne (Faza ostra i faza rekonwalescencji)		

Materiał do badań

Materiał do badań molekularnych

Materiał do badań molekularnych stanowi krew obwodowa, pobrana na EDTA lub cytrynian w pierwszym tygodniu od wystąpienia objawów klinicznych, **przed włączeniem leczenia antybiotykami**.

UWAGA: Izolację DNA bakterii należy wykonać z pełnej krwi lub frakcji leukocytów, najlepiej w czasie 24 godz. od momentu pobrania lub przechować uzyskany materiał w temperaturze -20°C do izolacji materiału genetycznego w późniejszym czasie.

Materiał do hodowli bakteryjnej

Materiał do hodowli bakteryjnej stanowi krew pełna pobrana w fazie ostrej zakażenia, **przed włączeniem leczenia antybiotykami**. Należy pobrać kilka mililitrów krwi na EDTA. Próbkę można przechowywać lub transportować w temperaturze pokojowej do 48 godzin, a jeżeli czas do posiewu będzie dłuższy to próbkę należy umieścić w temperaturze -20°C. Stwierdzono, że *A. phagocytophilum* ma zdolność przeżycia we krwi pobranej na cytrynian do 10 dni w temperaturze pokojowej i do 13 dni w lodówce w temperaturze 4°C.

Materiał do badań serologicznych

Należy pobrać krew na skrzep w celu uzyskania 2 ml surowicy, we wczesnej fazie zakażenia, **przed zastosowaniem antybiotyku**. Drugą próbkę krwi należy pobrać po 15-21 dniach. Uzyskaną surowicę krwi umieścić w lodówce w temperaturze 4 ± 3°C jeżeli badanie będzie wykonywane w dniu przyjęcia lub dnia następnego albo w zamrażarce w -20°C jeżeli przewidywany termin wykonywania badania jest dłuższy niż 24 godziny. Jeżeli próbka jest transportowana w stanie zamrożonym, należy umieścić ją w temperaturze -20°C lub niższej.

Przed wykonaniem badań, próbki należy wyjąć z zamrażarki na godzinę przed wykonaniem testu. Ustalenie ostatecznego miana w badaniu metodą immunofluorescencji powinno być wykonywane **w ciągu 48 godzin od momentu rozmrożenia** próbki.

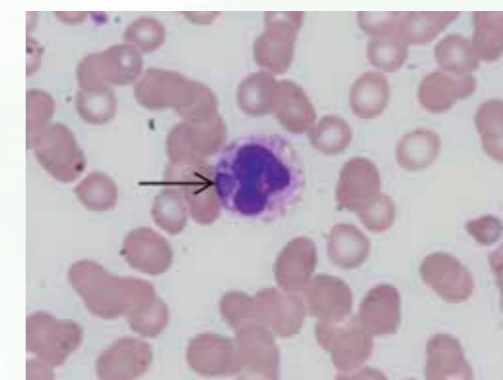
Po wykonaniu i zakończeniu badania próbka powinna być ponownie zamrożona w temperaturze -20°C na okres zgodny z okresem przechowywania przyjętym w danym laboratorium.

Metody diagnostyczne

Rozmaz krwi

Rozmaz krwi obwodowej lub frakcji leukocytarnej, **należy wykonać w pierwszym tygodniu od pojawienia się objawów**. Rozmaz wybarwić metodą Wrighte'a i oglądać w mikroskopie świetlnym. Należy poszukiwać wtretów w postaci skupionych granatowo wybarwionych komórek bakteryjnych (tzw. moruli) w cytoplazmie granulocytów (HGA). Aby wynik badania **uznać za ujemny**, konieczna jest **ocena od 800 do 1000 komórek krwi**. Czułość badania w przypadku HGA wynosi 25-75%. Metoda ta wymaga doświadczenia od badającego, ponieważ morule występują w cytoplazmie około 0,1% granulocytów, a ich obraz jest podobny do obrazu ciałek Döhla lub artefaktów na powierzchni granulocytów (wytraconych kryształów barwnika, płytek krwi, zanieczyszczeń innymi bakteriami).

Ludzka granulocytarna anaplazmoza – skupisko komórek bakteryjnych *A. phagocytophilum* w postaci tzw. moruli w cytoplazmie granulocyta obojętnochłonnego (źródło: Patnaik, Clin Med Res 2009 7:45-47)



Metody molekularne

Metoda PCR jest najczulszą metodą w pierwszym tygodniu po zakażeniu. Czułość diagnostyczna tej metody wynosi 67-90%. Stosowana jest amplifikacja fragmentów kilku genów m. in. 16S rRNA, *groESL*, *dsb*, *heat shock operone gene*, geny białek 120-kDa i 28-kDa.

Hodowla

Procedury związane z posiewami powinny być wykonywane **w komorze z przepływem laminarnym**. Bakterie *A. phagocytophilum*, *E. chaffensis* są bezwzględnie pasożytami wewnątrzkomórkowymi. Ich hodowla wymaga zastosowania linii tkankowej wyprowadzonej z komórek białaczki promielocytarnej

HL60 (ATCC, CCL240). Rzadziej wykorzystuje się linie ciągłe z embrionalnych komórek kleszczy (IDE8). Linie komórkowe HL60 inkubowane są w podłożu płynnym RPMI-1640 z 2mM glutaminy i 20% płodowej surowicy cielęcej w 37°C, w atmosferze 5% CO₂.

Do hodowli tkankowej o objętości 3 ml i gęstości około 500 tys. komórek/ml należy dodać 100 µl krwi pełnej lub 500 µl warstwy leukocytarnej lub 500 µl krwi mrożonej w -20°C. Wzrost hodowli bakteryjnych ocenia się 2-3 razy w tygodniu z wykorzystaniem barwienia metodami Giemzy, metod molekularnych lub immunofluorescencji.

Badania serologiczne

Podstawową metodą („gold standard”), a jednocześnie **metodą referencyjną jest odczyn immunofluorescencji pośredniej** (IFA – indirect immunofluorescence assay), gdzie antygenem diagnostycznym są zakażone bakteriami *A. phagocytophilum* (HGA) linie komórkowe. Testy oparte na tej metodzie służą do wykrywania swoistych przeciwciał klasy IgM i IgG w fazie ostrej zakażenia i w okresie zdrowienia. Za wynik dodatni badania przyjmuje się stwierdzenie serokonwersji do miana 128 lub wyższego lub czterokrotny wzrost miana przeciwciał w dwóch próbkach pobranych w odstępie 3-6 tygodni.

Przeciwciała **klasy IgM** dla *A. phagocytophilum* wykrywane są **po 3-5 dniach od zakażenia lub po 1 dobie od wystąpienia gorączki**. Ich poziom spada do wartości niewykrywalnej w okresie 30-60 dni. Przeciwciała **klasy IgG** dla *A. phagocytophilum* **wykrywane są po 7-10 dniach od zakażenia**, osiągają maksymalne wartości najczęściej między 14 a 21 dniem. Są one wykrywane przez około rok lub dłużej po zakażeniu. Z tego powodu prawidłowa interpretacja wyniku powinna uwzględniać objawy kliniczne.

Czułość diagnostyczna testów IFA w klasie IgM, wynosi 27-37%. Czułość IFA w klasie IgG, wynosi 82-100%.

UWAGA: Czynniki interferujące w badaniu serologicznym:

1. **Widoczna makroskopowo hemoliza, hyperlipemia mogą być przyczyną nieswoistych oznaczeń.**
2. **Kontaminacje bakteryjne powodują nieswoisty dodatni wynik poprzez wiązanie koniugatu albo powodują degradację przeciwciał będąc przyczyną wyników fałszywie ujemnych. W czasie pracy z surowicami, w miarę możliwości, należy stosować aseptyczne techniki i materiały, w celu uniknięcia kontaminacji surowic.**
3. **Najczęstszymi reakcjami krzyżowymi są reakcje krzyżowe w obrębie zakażeń wywoływanych przez bakterie z rodzaju *Anaplasma* i *Ehrlicha*. Przyczyną wyników fałszywie dodatnich mogą być także zakażenia wywoływane przez *Rickettsia* sp., *Coxiella burnetii*, *Brucella* sp., *Borrelia burgdorferi* sensu lato, wirusa Epstein-Barr, a także obecność czynnika reumatoidalnego, przeciwciał przeciwjądrowych, przeciw leukocytarnych i przeciwpltkowych.**

Piśmiennictwo

- Aguero-Rosenfeld M E, Kalantarpour F, Baluch M, Horowitz H W, Mckenna D F, Traffalli J T, Hsieh T-C, Wu J, Dumler JS, Wormser GP. Serology of culture-confirmed cases of human granulocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 635-638.
- Aliaga L., Sánchez-Blázquez P., Rodríguez-Granger J., Sampedro A., Orozco M., Pastor J., Mediterranean spotted fever with encephalitis. *J Med Microbiol.* 2009;58(Pt 4):521-5.
- Badania diagnostyczne na stronach NIZP-PZH – <http://www.pzh.gov.pl>
- Bakken JS, Aguero-Rosenfeld ME, Tilden RL, Wormser GP, Horowitz HW, Raffalli JT, Baluch M, Riddell D, Walls JJ, Dumler JS. Serial measurements of hematologic counts during the active phase of human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis.* 2001 Mar 15;32(6):862-70.
- Bakken J S, Dumler S (2000) Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin Infect Dis* 31: 554-560.
- Buczek A., Magdon T., 1999. Host location by ticks (Acari: Ixodida). *Wiadomości Parazytologiczne* 45, 3-12.
- Flisiak R., Pancewicz S., Diagnostyka i leczenie boreliozy z Lyme. *Zalecenia Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób zakaźnych. Przegląd Epidemiologiczny* 2008;62(1):193-9.
- Fournier PE., Raoult D., Current knowledge on phylogeny and taxonomy of *Rickettsia* spp. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009; 1166:1-11.
- Gouriet F., Fenollar F., Patrice J.Y., Drancourt M., Raoult D., Use of shell-vial cell culture assay for isolation of bacteria from clinical specimens: 13 years of experience. *J Clin Microbiol.* 2005;43(10):4993-5002.
- Grzeszczuk A., *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and human granulocytic anaplasmosis seroprevalence among forestry rangers in Białystok region. *Adv Med Sci.* 2006;51:283-6.
- Gut W., Kańtoch M., Żabicka J., (red Kostrzewski J., Magdzik W., Naruszewicz-Lesiuk D.) *Zakażenia arbowirusowe Choroby zakaźne i pasożytnicze i ich zwalczanie na ziemiach polskich w XX wieku.* Warszawa PZWL, 2001; 413-22.
- <http://www.dghm.org/red/index.html?cname=MIQ>
- ISW on TBE - <http://www.tbe-info.com>
- Kańtoch M., Kleszczowe zapalenie mózgu – etiopatogeneza i znaczenie dla zdrowia publicznego w Polsce. *Post. Hig. Med. Dośw.* 1988. 52, 3-18
- Lakos A., Tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA). *Wien Klin Wochenschr.* 2002;114(13-14):648-54.
- Murphy F., Emerging Zoonoses. 1998. *Emerging Infectious Diseases* 4, 429-436.
- Oteo J.A., Portillo A., Tick-borne rickettsioses in Europe. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012; 3(5-6):271-8.
- Parola P., Davoust B., Raoult D., 2005. Tick and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet Res.* 36: 469-492
- Parola P., Paddock C.D., Raoult D., Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin. Microbiol Rev.* 2005; 18, 719-756.
- Rosińska M., – red. Naruszewicz-Lesiuk D., *Zapalenia mózgu. Choroby zakaźne i pasożytnicze – epidemiologia i profilaktyka.* Bielsko-Biała 2004 *α-medica press*; 374-81
- Siuda K., *Kleszcze (Acari: Ixodida) Polski.* Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1991
- Skotarczak B., Rymaszewska A., Wodecka B. et al. PCR detection of granulocytic *Anaplasma* and *Babesia* in *Ixodes ricinus* ticks and birds in west-central Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2006;13(1):21-3.
- Stanek G., Fingerle V., Hunfeld K.P., Jaulhac B., Kaiser R., Krause A., Kristoferitsch W., O’Connell S., Ornstein K., Strle F., Gray J., Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2011, 17, 69-79.

- Stanek G., Wormser G.P., Gray J., Strle F., Lyme borreliosis. *Lancet*. 2012, 379(9814), 461-73.
- Stańczak J., Gabre R.M., Kruminis-Łozowska W. et al. *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. *Ann Agric Environ Med*. 2004;11(1):109-14.
- Sytykiewicz H., Karbowski G., Hapunik J. et al. Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* co-infections in *Ixodes ricinus* ticks in central-eastern region of Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2012 Mar 23;19(1):45-9.
- Thomas RJ, Dumler JS, Carlyon JA. Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009;7(6):709-22.
- Tylewska-Wierzbanowska S., Chmielewski T., Kondrusik M., et al. First cases of acute Human Granulocytic Ehrlichiosis in Poland. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2001; 20, 196-198.
- Tylewska-Wierzbanowska S., Spotkanie ekspertów ds. diagnostyki laboratoryjnej boreliozy z Lyme, zorganizowane przez ECDC 23-24 października 2013 r. w Amsterdamie. *Przegląd Epidemiologiczny* 2013, 67, 785-786.
- Walker D.H., Herrero-Herrero J.I., Ruiz-Beltrán R., Bullón-Sopelana A., Ramos-Hidalgo A., The pathology of fatal Mediterranean spotted fever. *Am J Clin Pathol*. 1987;87(5): 669-72.
- Wilske B., Fingerle V., Schulte-Spechtel U., Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis, *FEMS Immunol Med Microbiol*. 49, 13-21, 2007.
- Zwoliński J., Chmielewska-Badora J., Cisak E. et al. Prevalence of antibodies to *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in forestry workers from the Lublin region. *Wiad Parazytol*. 2004;50(2):221-7.