

Zofia Czubasiewicz¹, Marek Szewczyk¹, Andrzej Wiczowski²,
Bożena Echolc¹, Bogdan Mazur¹

Received: 10.09.2016
Accepted: 24.10.2016
Published: 31.03.2017

Użyteczność diagnostyczna niektórych testów wykrywających przeciwciała przeciwko *Borrelia burgdorferi*

Diagnostic usefulness of some test kits used in detection of *Borrelia burgdorferi*

¹ Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Zabrze, Polska.

Kierownik Katedry i Zakładu Mikrobiologii i Immunologii: prof. dr hab. n. med. Wojciech Król

² Wydział Nauk o Zdrowiu, Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsku-Białej, Bielsko-Biała, Polska

Adres do korespondencji: Zofia Czubasiewicz, Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii, Wydział Lekarski z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze, ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze, tel.: +48 723 777 050, e-mail: zofia.czubasiewicz@gmail.com

¹ Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine with the Division of Dentistry in Zabrze, Medical University of Silesia, Katowice, Poland.

Head of the Department: Professor Wojciech Król, MD, PhD

² Faculty of Health Sciences, University of Bielsko-Biała, Bielsko-Biała, Poland

Correspondence: Zofia Czubasiewicz, Department of Microbiology and Immunology, School of Medicine with the Division of Dentistry in Zabrze, Jordana 19, 41-808 Zabrze, Poland, tel.: +48 723 777 050, e-mail: zofia.czubasiewicz@gmail.com

Streszczenie

Diagnostyka boreliozy często jest problematyczna. Niejednoznaczny obraz kliniczny tej choroby, a także zróżnicowana odpowiedź immunologiczna na występujące w środowisku gatunki *Borrelia burgdorferi* stwarzają trudności w rozpoznaniu zakażenia. Istotne jest zatem stosowanie takich metod diagnostycznych, które będą w możliwie najmniejszym stopniu obciążone wynikami fałszywie dodatnimi oraz ujemnymi. Przeprowadzone badania oraz porównanie wyników otrzymanych przy zastosowaniu metody ELISA i dwóch rodzajów testów Western blot ukazują znaczną liczbę wyników uznanych za fałszywie dodatnie lub ujemne. Całkowita zgodność wyników testów ELISA i Western blot wyniosła: 65,6% (IgM ELISA: Mikrogen), 69,8% (IgM ELISA: Viramed), 83,9% (IgG ELISA: Mikrogen), 81,9% (IgG ELISA: Viramed). Zaobserwowano większą zgodność wyników dla przeciwciał klasy IgG. Z kolei dla klasy IgM wykazano 11,45% (Mikrogen) i 13,5% (Viramed) ujemnych wyników w teście ELISA potwierdzonych jako dodatnie testem Western blot. Zatem mimo zastosowania bardzo czułego testu przesiewowego uzyskano znaczny odsetek wyników fałszywie ujemnych. Należy unikać takiej sytuacji przy przeprowadzaniu dwuetapowej diagnostyki, w której zakłada się potwierdzanie tylko dodatnich i wątpliwych wyników. W prezentowanym badaniu wykazano, że użyty do diagnostyki test ELISA jest zbyt mało czuły do stosowania go jako test przesiewowy. Uzyskane rozbieżności w wynikach testów Western blot mogą być efektem różnic w składach antygenów oraz sposobie ich pozyskania.

Słowa kluczowe: *Borrelia burgdorferi*, borelioza, ELISA, Western blot

Abstract

Diagnosis of Lyme disease is often problematic. Atypical clinical symptoms and diversified immunological response to the various *Borrelia burgdorferi* species present in the environment cause difficulties in a correct diagnosis. Hence the importance of using diagnostic methods least significantly affected by false positive and false negative results. The comparison of results achieved with ELISA test kit and two different Western blot test kits shows a considerable number of false positive and false negative results. The total conformity of ELISA test and Western blot tests results in our study was 65.6% (IgM ELISA: Mikrogen), 69.8% (IgM ELISA: Viramed), 83.9% (IgG ELISA: Mikrogen), 81.9% (IgG ELISA: Viramed). Higher conformity was observed in results for IgG antibodies. However, for IgM antibodies 11.45% (Mikrogen) and 13.5% (Viramed) of negative results achieved with ELISA test kit were indicated as positive using Western blot test kits. Despite the use of a very sensitive screening test, a considerable amount of false negative results was obtained. Such a situation is concerning in a two-step diagnostic procedure where only positive and equivocal results are further confirmed by Western blot method. The obtained results have demonstrated that ELISA test kit used in this study is not sensitive enough to be used as a screening test. The divergences obtained in Western blot tests results may be caused by the differences in the composition of each test and the differences in the methods of deriving antigens.

Key words: *Borrelia burgdorferi*, borreliosis, ELISA, Western blot

WSTĘP

Borelioza z Lyme jest chorobą zakaźną wywoływaną przez krętki *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Do zakażenia tą bakterią dochodzi zwykle podczas ukąszenia przez zarażonego kleszcza z rodziny *Ixodidae*, m.in. *Ixodes ricinus*, *Ixodes scapularis*, *Ixodes persulcatus* lub rodziny *Argasidae*⁽¹⁾. Pięć genogatunków *Borrelia* uznawanych jest za czynniki etiologiczne boreliozy z Lyme. Należą do nich: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bissettii* oraz *B. spielmanii*⁽²⁾. Mączka i Tylewska-Wierzbnowska wymieniają jeszcze *B. lusitaniae* i *B. valaisiana*⁽³⁾. Wszystkie one mogą wywoływać boreliozę w Europie, najczęściej jednak dotyczy to trzech gatunków: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* oraz *B. garinii*⁽⁴⁾. Poszczególne szczepy wiąże się z rozwojem różnych obrazów choroby: *B. afzelii* powoduje zazwyczaj przewlekłe zanikowe zapalenie skóry, *B. burgdorferi sensu stricto* jest najczęściej odpowiedzialna za rozwój zapalenia stawów, a neuroboreliozę mogą wywoływać *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* i *B. garinii*⁽⁴⁾.

Na podstawie danych udostępnionych na stronie internetowej Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny (NIZP-PZH)⁽⁵⁾ możliwe jest zobrazowanie zachorowalności na boreliozę w Polsce w ciągu kilkunastu ostatnich lat. Na ryc. 1 przedstawiono liczbę przypadków boreliozy w Polsce i w województwie śląskim w latach 1998–2014. Obserwuje się wzrost zachorowań w kraju, który może być związany ze zwiększonym ryzykiem zapadalności na tę chorobę, jak również z pojawianiem się coraz dokładniejszych testów diagnostycznych umożliwiających rozpoznanie tej infekcji.

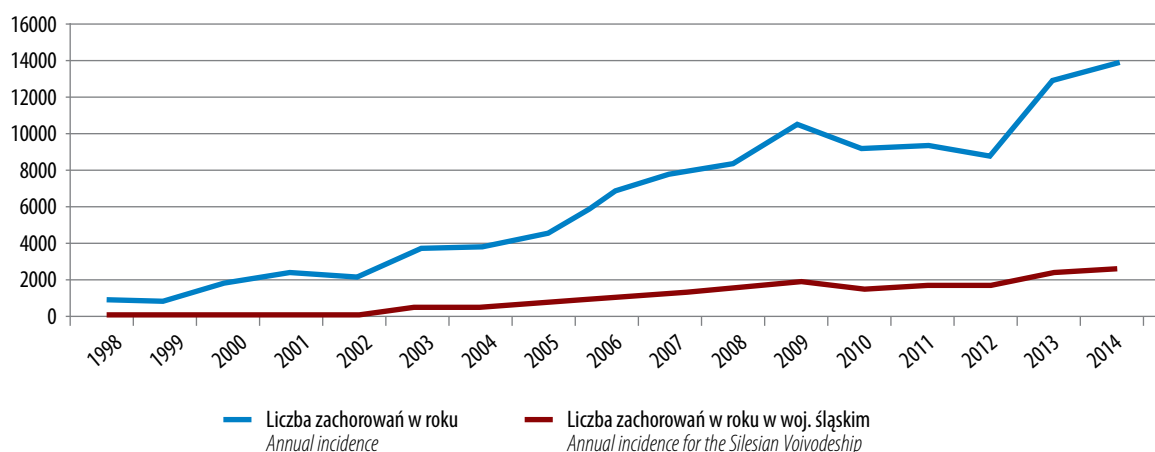
Z danych przedstawionych na ryc. 2. wynika, że zapadalność na boreliozę wśród 100 tys. mieszkańców Polski oraz województwa śląskiego rośnie⁽⁵⁾. W 2014 roku najwyższą zapadalność odnotowano dla województwa podlaskiego i wynosiła ona 106,8. Drugie pod tym względem było województwo warmińsko-mazurskie (62,5), natomiast trzecie – województwo śląskie (57,1).

INTRODUCTION

Lyme borreliosis is an infectious disease caused by spirochetal bacteria from the genus *Borrelia burgdorferi sensu lato*. It is a tick-borne infection, usually transmitted by the bite of an infected tick of the families *Ixodidae* (e.g. *Ixodes ricinus*, *Ixodes scapularis*, *Ixodes persulcatus*) and *Argasidae*⁽¹⁾. Five *Borrelia* genospecies have been implicated as the cause of Lyme borreliosis, namely *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bissettii* and *B. spielmanii*⁽²⁾. Mączka and Tylewska-Wierzbnowska have also included *B. lusitaniae* and *B. valaisiana* on their list⁽³⁾. Borreliosis in Europe may be caused by any of these species, yet infection with *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* and *B. garinii* has been known to be the most common⁽⁴⁾. Each of the species is associated with a different presentation of the disease. Infection with *B. afzelii* tends to cause acrodermatitis chronica atrophicans (ACA), *B. burgdorferi sensu stricto* commonly leads to arthritis, whereas neuroborreliosis is known to develop where *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* or *B. garinii* are involved⁽⁴⁾.

Based on the data available from the website of the National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene (Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, NIZP-PZH)⁽⁵⁾, it is possible to show the incidence of borreliosis in Poland over the last two decades. Fig. 1 shows the number of borreliosis cases in Poland and in the Silesian Voivodeship in the years 1998–2014. The rise in incidence may be associated with an increased incidence risk as well as the availability of more accurate diagnostic tests.

The data shown in Fig. 2 demonstrate the incidence rate per 100,000 citizens in the entire Poland and in the Silesian Voivodeship to be rising⁽⁵⁾. In 2014, the highest incidence was noted in the Podlaskie Voivodeship, with a rate of 106.8/100,000. The Warmińsko-Mazurskie Voivodeship came next, with incidence rate of 62.5 cases



Ryc. 1. Liczba zachorowań na boreliozę w Polsce i w województwie śląskim w latach 1998–2014 (na podstawie danych z NIZP-PZH)⁽⁵⁾

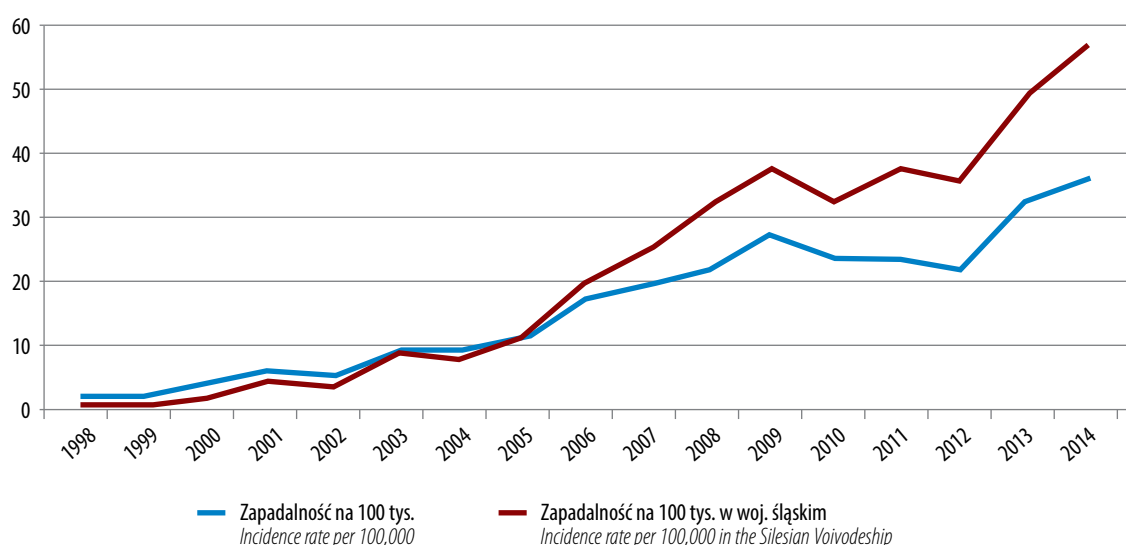
Fig. 1. The incidence of borreliosis in Poland and in the Silesian Voivodeship in the years 1998–2014 (based on data by NIZP-PZH – the National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene)⁽⁵⁾

Najniższą zapadalność na 100 tys. mieszkańców odnotowano w województwie wielkopolskim. W 2014 roku średnia zapadalność na 100 tys. mieszkańców dla Polski wynosiła 36. Obserwuje się również od roku 2005 wzrost średniej zapadalności na 100 tys. mieszkańców dla województwa śląskiego w porównaniu ze średnią zapadalnością dla Polski. Wśród podstawowych badań laboratoryjnych w diagnostyce boreliozy można wyróżnić metody bezpośrednie, tj. mikrobiologiczne, oraz pośrednie, czyli badanie serologiczne i techniki Western blot. Diagnostyka staje się problematyczna w sytuacji, gdy objawy kliniczne nie są typowe (np. brak rumienia wędrującego, brak ugryzienia przez kleszcza w wywiadzie) – wówczas bardzo istotną częścią rozpoznania są wyniki badań laboratoryjnych. Z tego powodu wskazane jest używanie takich metod diagnostycznych, które w jak najmniejszym stopniu będą obciążone wynikami fałszywie dodatnimi oraz fałszywie ujemnymi. Najbardziej swoistym badaniem jest bezpośrednie wykrycie patogenu w materiale badanym, czyli badanie mikrobiologiczne⁽⁶⁾. Niestety, w przypadku zakażenia *Borrelia* metoda ta charakteryzuje się zbyt niską czułością (50–70% – biopaty skóry; 10–30% – płyn mózgowo-rdzeniowy; około 1% – płyn stawowy). Metoda PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy, *polymerase chain reaction*) w materiale genetycznym bakterii jest skuteczniejsza jedynie w przypadku płynu stawowego (50–70%)⁽⁷⁾. Dlatego też z wyboru stosowane są metody serologiczne, wykrywające w badanym organizmie przeciwciała wytwarzane w odpowiedzi na kontakt z patogenem. Jest to jednak pośrednia diagnostyka, ponieważ wykrycie przeciwciał nie oznacza obecności patogenu w danym momencie – wskazuje jedynie na kontakt z bakterią w przeszłości. Na trudności w rozpoznaniu wpływa również to, że metody badań stosowane w diagnostyce serologicznej boreliozy często nie mają opracowanej standaryzacji⁽⁶⁾.

per 100,000 citizens, and the Silesian Voivodeship came third, with 57.1/100,000. The lowest incidence rate was registered in the Wielkopolskie Voivodeship, whereas the mean incidence rate for the entire Poland was 36/100,000. Since 2005, the mean incidence rate per 100,000 citizens in the Silesian Voivodeship has increased compared with the mean incidence rate for the entire Poland.

The basic laboratory tests available for the diagnostics of borreliosis include direct (i.e. microbiological) and indirect methods, such as serology and Western blot techniques. The diagnosis is complicated by atypical presentation (e.g. no erythema chronicum migrans – EM, no credible history of tick exposure), whereupon laboratory findings become crucial. Hence, diagnostic methods which are least affected by false positive and false negative results should be employed. Direct identification of the pathogen in the sample material, i.e. microbiologic examination has the greatest specificity⁽⁶⁾. Unfortunately, in the case of *Borrelia* infection, this method is characterised by low sensitivity (50–70% for skin specimens, 10–30% for the cerebrospinal fluid, approximately 1% for the synovial fluid). Detection of the genetic material of pathogens by polymerase chain reaction (PCR) method is more effective only for the synovial fluid (50–70%)⁽⁷⁾. Thus, serological methods are considered the methods of choice, allowing for identification of antibodies produced in response to pathogen contact. This kind of diagnosis, however, is indirect, as identification of antibodies does not necessarily mean the presence of the pathogen in the system at a given moment, indicating only a history of pathogen contact. The lack of standardisation of serodiagnostic testing also causes problems with correct diagnosis of *Borrelia*⁽⁶⁾.

The aim of this study has been to determine the diagnostic usefulness of Western blot and ELISA test kits.



Ryc. 2. Zapadalność na boreliozę na 100 tys. mieszkańców w Polsce i w województwie śląskim w latach 1998–2014 (na podstawie danych z NIZP-PZH)⁽⁵⁾

Fig. 2. Borreliosis incidence rate per 100,000 citizens in Poland and in the Silesian Voivodeship in the years 1998–2014 (based on data by NIZP-PZH)⁽⁵⁾

Celem pracy jest określenie użyteczności diagnostycznej testów Western blot i ELISA wykorzystanych do badań.

MATERIAŁ I METODY

Materiał pobrano od 1819 osób mieszkających na terenie Górnego Śląska. Była to grupa ślepa. Wszyscy wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu. Na wykonanie badań uzyskano zgodę komisji bioetycznej (L.dz.KNW-6501-100/08). Krew pełna została pobrana do probówek z wykrzepiaczem w celu uzyskania surowicy krwi, następnie została odwirowana w 2500 obr./min przez 5 min. Surowicę oddzielono i zamrożono w temperaturze -20°C .

W pobranych próbach oznaczono miana przeciwciał w klasie IgM i IgG skierowanych przeciwko antygenom *Borrelia burgdorferi*. Oznaczenia wykonano testami Anty-*Borrelia* ELISA (IgM) oraz Anty-*Borrelia* Plus VlsE ELISA (IgG) firmy Euroimmun (Niemcy).

Przeprowadzono badanie potwierdzające metodą Western blot dwoma testami komercyjnymi na 96 surowicach w klasie IgM oraz na 194 surowicach w klasie IgG zbadanych wcześniej metodą ELISA. Dla oznaczeń w klasie IgM użyto testów recomLine *Borrelia* IgM firmy Mikrogen (Niemcy) oraz *Borrelia* ViraStripe IgM Testkit firmy Viramed (Niemcy). Dla oznaczeń w klasie IgG użyto testów recomLine *Borrelia* IgG firmy Mikrogen (Niemcy) oraz *Borrelia* ViraStripe IgG Testkit firmy Viramed (Niemcy).

WYNIKI

Z wyników uzyskanych za pomocą testów Anty-*Borrelia* ELISA IgM oraz Anty-*Borrelia* Plus VlsE ELISA IgG firmy Euroimmun wybrano po trzy grupy z każdego rodzaju testu, w celu przeprowadzenia dalszych badań metodą Western blot. Dla testu IgM wybrano 64 wyniki dodatnie, 17 granicznych oraz 15 ujemnych. Dla testu IgG wybrano 142 wyniki dodatnie, 10 granicznych i 42 ujemne. Następnie wykonano testy Western blot z zastosowaniem zestawów komercyjnych produkowanych przez dwie firmy, w celu porównania otrzymanych wyników. Na grupie 96 prób (IgM) wykonano oznaczenia Western blot IgM testami recomLine *Borrelia* IgM firmy Mikrogen oraz testami *Borrelia* ViraStripe IgM firmy Viramed. Za pomocą testów Mikrogen uzyskano 79 dodatnich oraz 17 ujemnych wyników, natomiast za pomocą Viramed – 89 wyników dodatnich i 7 ujemnych.

Przy użyciu testu firmy Mikrogen dla przeciwciał klasy IgM uzyskano 79 dodatnich wyników, z czego najczęściej obserwowano reakcję z antygenami z grupy OspC – 69 wyników (87,34%), w szczególności z antygenem OspC Bs – 67 wyników (84,81%). Pozostałe antygeny z grupy OspC również dawały często dodatnie wyniki, głównie OspC Bg – 58 wyników (73,42%), następnie OspC Ba – 50 wyników (63,29%), najrzadziej OspC Bss – 43 wyniki (54,43%). Innym antygenem dającym często reakcję pozytywną był p41 – 65 dodatnich wyników (82,28%). Dla antygenów p58,

MATERIAL AND METHODS

The sample material was collected from a blind group of 1,819 patients from Upper Silesia. All the blood donors provided their consent in writing. The study was approved by a bioethics committee (L.dz.KNW-6501-100/08). The blood was collected into serum separator tubes to obtain serum, and then centrifuged at 2500 rotations/min for 5 minutes. The serum was separated and frozen at -20°C .

In the collected specimens, the titres of IgM and IgG antibodies directed against *Borrelia burgdorferi* antigens were measured with Anti-*Borrelia* ELISA (IgM) and Anti-*Borrelia* Plus VlsE ELISA (IgG) test kits by Euroimmun, Germany.

Two commercially available Western blot test kits were then used to confirm the results in 96 IgM serum samples and 194 IgG serum samples previously screened with ELISA. For IgM measurements, recomLine *Borrelia* IgM test kit by Mikrogen, Germany and *Borrelia* ViraStripe IgM Testkit by Viramed, Germany were used. For IgG measurements, recomLine *Borrelia* IgG by Mikrogen, Germany and *Borrelia* ViraStripe IgG Testkit by Viramed, Germany were utilised.

RESULTS

From the results obtained with Anty-*Borrelia* ELISA IgM and Anty-*Borrelia* Plus VlsE ELISA IgG test kits by Euroimmun, three groups for each test were selected for further confirmation with Western blot method. For the IgM test, 64 positive results, 17 equivocal results, and 15 negative results were selected. For the IgG test, 142 positive, 10 equivocal, and 42 negative results were selected. Next, Western blot testing was performed using commercially available test kits by two different manufacturers to compare the obtained results. In the group of 96 samples (IgM), Western blot IgM measurements were conducted with recomLine *Borrelia* IgM test kit by Mikrogen and *Borrelia* ViraStripe IgM test kit by Viramed. Seventy-nine positive and 17 negative results were obtained with Mikrogen test kits, while 89 positive and 7 negative results were obtained with Viramed test kits.

Using Mikrogen IgM test, 79 positive results were obtained, among which reactivity against OspC antigens was most frequently observed (69 results – 87.34%), of which OspC Bs antigen (67 results – 84.81%) evoked a positive reaction most commonly. The remaining OspC antigens also frequently produced positive results, particularly OspC Bg (58 results – 73.42%), and OspC Ba (50 results – 63.29%), with OspC Bss being the least common (43 results – 54.43%). Another antigen commonly evoking response was p41, with 65 positive results (82.28%). For p58, p39, OspA, p18 Bss, Ba, Bg2, and Bs antigens, no positive results were noted. Using Viramed IgM test, 89 positive results were obtained, with the most common reactivity obtained against OspC (88 positive results – 98.88%). The next most

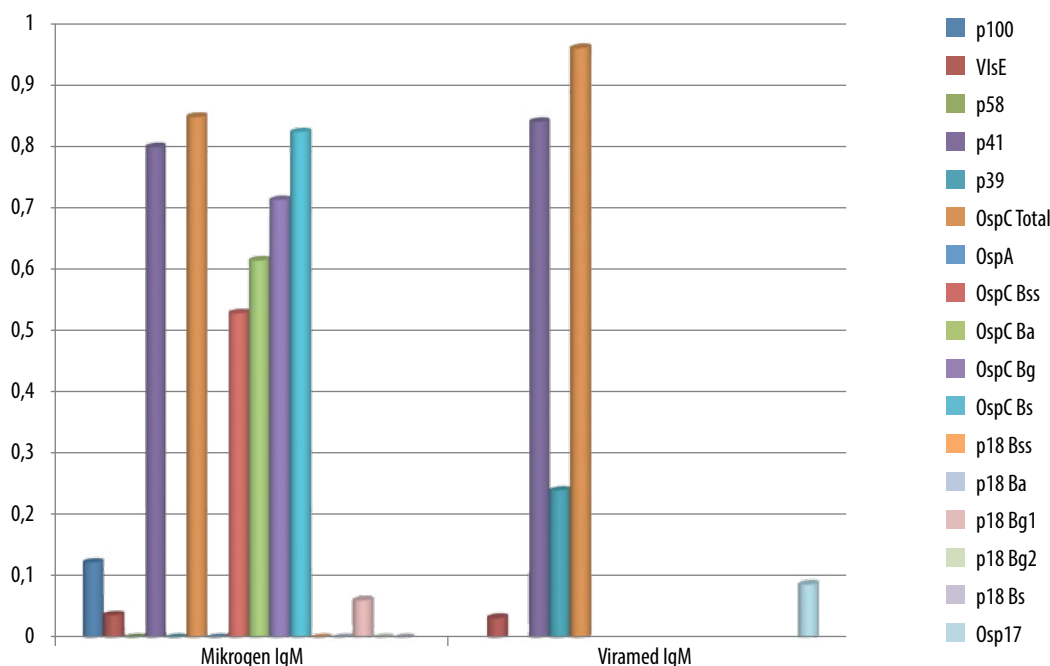
p39, OspA, p18 Bss, Ba, Bg2, Bs nie zaobserwowano żadnego dodatniego wyniku. Przy użyciu testów firmy Viramed dla przeciwciał klasy IgM uzyskano 89 dodatnich wyników, z czego najczęściej otrzymywano reakcję z antygenem OspC – 88 wyników dodatnich (98,88%). Następnym był antygen p41 – 77 dodatnich wyników (86,52%), kolejny – antygen p39 – 22 wyniki (24,72%). Najrzadziej reakcję obserwowano z antygenami Osp17 – 8 wyników (8,99%) oraz VlsE – 3 wyniki (3,37%).

W celu porównania pozytywnych reakcji otrzymanych przy użyciu obu testów zestawiono uzyskane dla nich wartości procentowe i zobrazowano je w formie wykresu na ryc. 3. Najczęściej obserwowano reakcje pozytywne dla antygenu OspC w teście Viramed. Bardzo rzadko reagował antygen VlsE w obu testach. Uzyskano również liczne pozytywne reakcje dla antygenów OspC wyizolowanych z poszczególnych szczepów *Borrelia*. Zastanawiający jest jednak fakt, że reakcje te bardzo często przebiegały dla więcej niż jednego antygenu OspC, co może sugerować liczne koinfekcje lub reakcje krzyżowe w obrębie tego antygenu. Natomiast dla antygenów p58, p39, OspA, p18 Bss, p18 Ba, p18 Bg2 oraz p18 Bs w teście Mikrogen nie zaobserwowano reakcji.

Przy użyciu testu firmy Mikrogen dla przeciwciał klasy IgG uzyskano 137 wyników dodatnich, z czego najczęściej obserwowano reakcję z antygenem VlsE – 122 wyniki dodatnie (89,05%) oraz z antygenem p41 – 120 wyników (87,59%). Często także otrzymywano reakcję dodatnią z antygenem p18 Ba – 79 wyników (57,66%) oraz z antygenem p100/p83 – 70 wyników (51,10%). Nie zaobserwowano żadnej reakcji z antygenami OspA i p18 Bs. Za pomocą testów firmy

commonly reactive antigen was p41 (77 positive results – 86,52%), and p39 (22 positive results – 24,72%), whereas the least common response was obtained against Osp17 (8 positive results – 8,99%) and VlsE (3 positive results – 3,37%). To compare the positive results rendered by the two tests, the percentages of reactions by antigen have been collated and shown in the bar plot in Fig. 3. The most common response was observed against OspC antigen in Viramed test. Response against VlsE antigen was very rare in either test. Numerous positive results were produced by OspC antigens isolated from various *Borrelia* strains. It is, however, surprising that the responses frequently occurred against more than one OspC antigen, potentially suggesting numerous coinfections or cross reactions within the antigen. No reactivity against p58, p39, OspA, p18 Bss, p18 Ba, p18 Bg2 and p18 Bs antigens was demonstrated with Mikrogen test kit.

Mikrogen IgG test rendered 137 positive results, with responses directed against VlsE (122 positive results – 89,05%) and p41 (120 positive results – 87,59%) antigens being the most common. Also reactivity against p18 Ba (79 positive results – 57,66%) and p100/p83 (70 positive results – 51,10%) was commonly evoked. No response against OspA and p18 Bs was obtained. Viramed IgG test rendered 141 positive results, with the most common responses being against VlsE (138 – 97,87%) and p41 (138 – 97,87%). Also positive results for p14 (91 positive results – 64,54%) and Osp17 (80 positive results – 56,74%) antigens were frequently noted. The least frequent positive results were registered for p21 (13 positive results – 9,22%) and p43 (only



Ryc. 3. Częstość występowania poszczególnych antygenów w pozytywnych wynikach uzyskanych za pomocą testów Mikrogen IgM oraz Viramed IgM

Fig. 3. Positive results rendered by Mikrogen IgM and Viramed IgM test kits by antigen

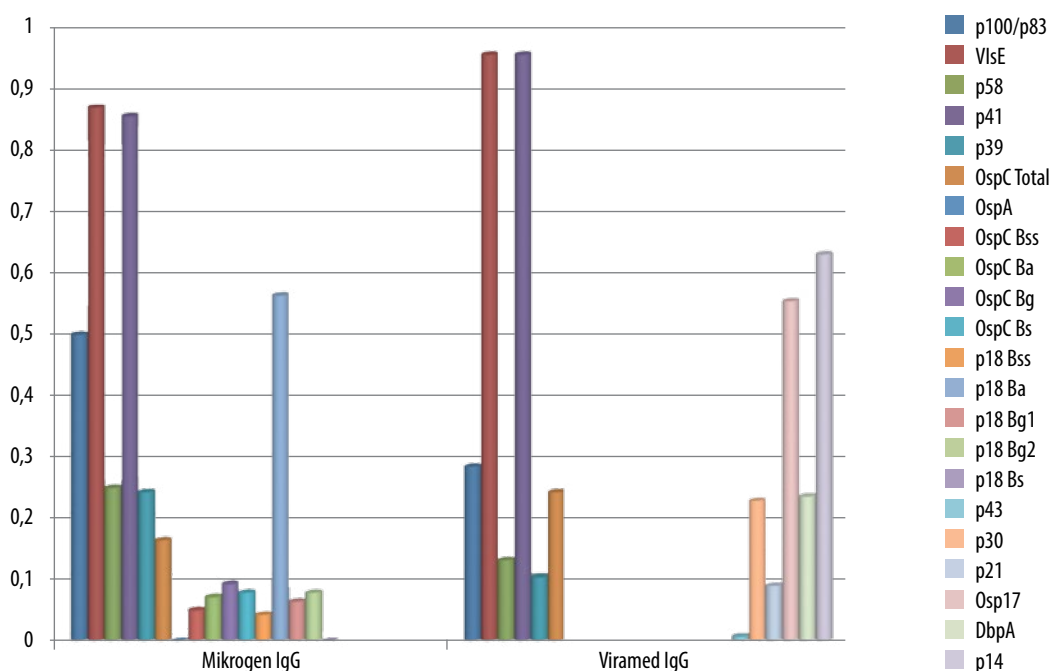
Viramed dla przeciwciał klasy IgG uzyskano 141 dodatnich wyników, z czego najczęściej obserwowano reakcje dodatnie dla antygenów VlsE – 138 wyników (97,87%) oraz p41 – 138 wyników (97,87%). Często otrzymywano również wyniki dodatnie dla antygenów p14 – 91 wyników (64,54%), Osp17 – 80 wyników (56,74%). Najrzadziej uzyskiwano dodatnie wyniki dla antygenów p21 – 13 wyników (9,22%) oraz p43 – 1 wynik (0,71%). W celu dokonania porównania pozytywnych reakcji otrzymanych przy użyciu obu testów zestawiono uzyskane w nich wartości procentowe i zobrazowano je w postaci wykresu na ryc. 4. Najczęściej obserwowano reakcje pozytywne dla antygenów VlsE oraz p41 w teście Viramed. Często występowały także przeciwciała dla antygenów p14, Osp17, p100/p83, OspC, p30 i DbpA w teście Viramed (wszystkie powyżej 20%). W teście Mikrogen najczęściej reagowały antygeny VlsE, p41 (powyżej 80%) oraz p18 Ba, p100/p83, p58, p39 (powyżej 20%). Rzadko reagowały antygeny OspC oraz pozostałe p18 poszczególnych szczepów *Borrelia* w teście Mikrogen i antygeny p58, p39, p21, p43 w teście Viramed. Natomiast dla antygenów OspA oraz p18 Bs w teście Mikrogen nie zaobserwowano reakcji. Porównując wyniki testu ELISA IgM z wynikami testu Viramed, otrzymano 89 wyników dodatnich, z czego 63 to wyniki dodatnie w teście ELISA, 13 – wyniki graniczne, a kolejne 13 – wyniki ujemne. Jeden wynik dodatni oraz 2 graniczne w teście ELISA nie zostały potwierdzone, natomiast 4 wyniki ujemne potwierdzono jako ujemne. Porównując wyniki testu ELISA IgG z wynikami testu Viramed, otrzymano 141 wyników dodatnich, z czego 126 to wyniki dodatnie w teście ELISA, 6 – wyniki graniczne,

1 positive result – 0.71%) antigens. To compare the positive results obtained with the two tests, the percentages of reactions by antigen have been collated and shown in the bar plot in Fig. 4. The most common IgG responses occurred for VlsE and p41 antigens in Viramed test. Also antibodies directed against p14, Osp17, p100/p83, OspC, p30, and DbpA antigens frequently appeared in Viramed test (all exceeded 20%). In Mikrogen test, the most commonly reactive antigens included VlsE and p41 (over 80%) as well as p18 Ba, p100/p83, p58, and p39 (over 20%). Response against OspC antigens and the remaining p18 antigens of given *Borrelia* strains was rare in Mikrogen test, and the same applied to p58, p39, p21 and p43 antigens in Viramed test. No reactivity against OspA and p18 Bs was observed in Mikrogen test.

The comparison of ELISA IgM and Viramed test results showed 89 positive results, with 63 positive ELISA results, 13 equivocal results, and 13 negative results. One positive and 2 equivocal ELISA results were not confirmed, and 4 negative results were confirmed as negative.

The comparison of ELISA IgG and Viramed test results showed 141 positive results, with 126 positive, 6 equivocal, and 9 negative ELISA results. Sixteen positive, and 4 equivocal results were not confirmed, whereas 32 negative results were confirmed as negative (Tab. 1).

The comparison of ELISA IgM results and Mikrogen test results rendered 79 positive results, with 57 positive, 11 equivocal, and 11 negative ELISA results. Seven positive and 4 equivocal ELISA results were not confirmed, while 6 negative results were confirmed as negative (Tab. 2).



Ryc. 4. Częstość występowania poszczególnych antygenów w pozytywnych i wątpliwych wynikach uzyskanych za pomocą testów Mikrogen IgG oraz Viramed IgG

Fig. 4. Positive results rendered by Mikrogen IgG and Viramed IgG test kits by antigen

ELISA	Western blot					
	Viramed IgM			Viramed IgG		
	Dodatni <i>Positive</i>	Ujemny <i>Negative</i>	Razem <i>Total</i>	Dodatni <i>Positive</i>	Ujemny <i>Negative</i>	Razem <i>Total</i>
Dodatni <i>Positive</i>	63 (65,6%)	1 (1%)	64 (66,6%)	126 (65,3%)	16 (8,3%)	142 (73,6%)
Ujemny <i>Negative</i>	13 (13,55%)	4 (4,2%)	17 (17,75%)	9 (4,7%)	33 (17,1%)	42 (21,8%)
Graniczny <i>Equivocal</i>	13 (13,55%)	2 (2,1%)	15 (15,65%)	6 (3,1%)	3 (1,5%)	9 (4,6%)
Razem <i>Total</i>	89 (92,7%)	7 (7,3%)	96 (100%)	141 (73,1%)	52 (26,9%)	193 (100%)

Tab. 1. Porównanie wyników otrzymanych w teście ELISA z wynikami testów Western blot Viramed

Tab. 1. The comparison of the results rendered by ELISA and Western blot (Viramed) test kits

a 9 – ujemne. Nie zostało potwierdzonych 16 wyników dodatnich i 4 graniczne, natomiast 32 ujemne wyniki potwierdzono jako ujemne (tab. 1).

Porównując wyniki testu ELISA IgM z wynikami testu Mikrogen, otrzymano 79 wyników dodatnich, z czego 57 to wyniki dodatnie w teście ELISA, 11 – wyniki graniczne, a kolejne 11 – wyniki ujemne. Nie zostało potwierdzonych 7 wyników dodatnich oraz 4 graniczne w teście ELISA, natomiast 6 wyników ujemnych potwierdzono jako ujemne (tab. 2).

Porównując wyniki testu ELISA IgG z wynikami testu Mikrogen, otrzymano 137 wyników dodatnich, z czego 126 to wyniki dodatnie w teście ELISA, 5 – wyniki graniczne i 6 – wyniki ujemne. Nie zostało potwierdzonych

The comparison of ELISA IgG and Mikrogen test results showed 137 positive results, including 126 positive, 5 equivocal, and 6 negative ELISA results. Sixteen positive and 4 equivocal results were not confirmed, whereas 36 negative results were confirmed as negative.

A chi-square test statistic was computed to compare the results obtained with ELISA method and each of the Western blot tests, demonstrating significant differences (Tab. 3).

To compare the results obtained with each of the Western blot tests, a chi-square test was performed. The results for IgM responses differ significantly between the tests, while IgG responses for the two tests showed no significant differences (Tabs. 4 and 5).

ELISA	Western blot					
	Mikrogen IgM			Mikrogen IgG		
	Dodatni <i>Positive</i>	Ujemny <i>Negative</i>	Razem <i>Total</i>	Dodatni <i>Positive</i>	Ujemny <i>Negative</i>	Razem <i>Total</i>
Dodatni <i>Positive</i>	57 (59,4%)	7 (7,3%)	64 (66,7%)	126 (65,3%)	16 (8,3%)	142 (73,6%)
Ujemny <i>Negative</i>	11 (11,45%)	6 (6,2%)	17 (17,7%)	6 (3,1%)	36 (18,7%)	42 (21,8%)
Graniczny <i>Equivocal</i>	11 (11,45%)	4 (4,2%)	15 (15,6%)	5 (2,6%)	4 (2%)	9 (4,6%)
Razem <i>Total</i>	79 (82,3%)	17 (17,7%)	96 (100%)	137 (71%)	56 (29%)	193 (100%)

Tab. 2. Porównanie wyników otrzymanych w teście ELISA z wynikami testów Western blot Mikrogen

Tab. 2. The comparison of the results rendered by ELISA and Western blot (Mikrogen) test kits

Western blot	ELISA			Wynik testu χ^2 dla $p < 0,05 = 2,1776$ <i>Chi-square for $p < 0.05 = 2.1776$</i>
	Dodatni <i>Positive</i>	Ujemny <i>Negative</i>	Graniczny <i>Equivocal</i>	
Viramed IgM+	63	13	13	145,90 – istotna różnica <i>145.90 – significant difference</i>
Viramed IgM–	1	4	2	
Viramed IgG+	126	9	6	
Viramed IgG–	16	32	4	313,19 – istotna różnica <i>313.19 – significant difference</i>
Mikrogen IgM+	57	11	11	
Mikrogen IgM–	7	6	4	
Mikrogen IgG+	126	6	5	312,36 – istotna różnica <i>312.36 – significant difference</i>
Mikrogen IgG–	16	36	4	

Tab. 3. Porównanie wyników otrzymanych w teście ELISA z wynikami testów Western blot za pomocą testu χ^2 dla tablicy wielopolowej

Tab. 3. The comparison of ELISA and Western blot results performed with a chi-square test

IgM	Viramed	Mikrogen	Wynik testu χ^2 dla $p < 0,05 = 3,84$ <i>Chi-square for $p < 0.05 = 3.84$</i>
Dodatni <i>Positive</i>	89	79	4,76 – istotna różnica <i>4.76 – significant difference</i>
Ujemny <i>Negative</i>	7	17	

Tab. 4. Porównanie wyników otrzymanych w testach Western blot w klasie IgM za pomocą testu χ^2

Tab. 4. The comparison of IgM results rendered by Western blot by Viramed and Western blot by Mikrogen performed with a chi-square test

IgG	Viramed	Mikrogen	Wynik testu χ^2 dla $p < 0,05 = 3,84$ <i>Chi-square for $p < 0.05 = 3.84$</i>
Dodatni <i>Positive</i>	141	137	0,238 – nieistotna różnica <i>0.238 – non-significant difference</i>
Ujemny <i>Negative</i>	52	56	

Tab. 5. Porównanie wyników otrzymanych w testach Western blot w klasie IgG za pomocą testu χ^2

Tab. 5. The comparison of IgG results rendered by Western blot by Viramed and Western blot by Mikrogen performed with a chi-square test

16 wyników dodatnich i 4 graniczne, natomiast 36 wyników ujemnych potwierdzono jako ujemne.

Przeprowadzono test istotności χ^2 dla tablicy wielopolowej w celu porównania wyników testów ELISA i poszczególnych testów Western blot. Wykazano pomiędzy nimi istotne różnice (tab. 3).

Wykonano test istotności χ^2 w celu porównania wyników poszczególnych testów Western blot. Wyniki testów IgM różnią się istotnie, natomiast wyniki testów IgG nie wykazały istotnej różnicy (tab. 4 i 5).

W celu porównania wyników uzyskanych dla poszczególnych antygenów użytych w testach Western blot wykonano

To compare the results for given antigens obtained in the Western blot tests, a chi-square test was applied. Significant differences were demonstrated to exist in the results for p100/p83, p58, and p39 antigens between the IgG tests, whereas between the IgM tests significant differences were identified for OspC and p41 antigens (Tabs. 6 and 7).

DISCUSSION

The comparison of results obtained with ELISA method and two Western blot tests demonstrated a large number of false positive and false negative results. Overall, the

Antygen <i>Antigen</i>	IgG	Viramed	Mikrogen	Wynik testu χ^2 dla $p < 0,05 = 3,84$ <i>Chi-square for $p < 0.05 = 3.84$</i>
p100/p83	Dodatni <i>Positive</i>	41	70	10,63 – istotna różnica <i>10.63 – significant difference</i>
	Ujemny <i>Negative</i>	152	123	
VlsE	Dodatni <i>Positive</i>	138	122	3,016 – nieistotna różnica <i>3.016 – non-significant difference</i>
	Ujemny <i>Negative</i>	55	71	
p58	Dodatni <i>Positive</i>	19	35	5,512 – istotna różnica <i>5.512 – significant difference</i>
	Ujemny <i>Negative</i>	174	158	
p41	Dodatni <i>Positive</i>	138	120	3,787 – nieistotna różnica <i>3.787 – non-significant difference</i>
	Ujemny <i>Negative</i>	55	73	
p39	Dodatni <i>Positive</i>	15	34	8,439 – istotna różnica <i>8.439 – significant difference</i>
	Ujemny <i>Negative</i>	178	159	
OspC	Dodatni <i>Positive</i>	35	23	2,922 – nieistotna różnica <i>2.922 – non-significant difference</i>
	Ujemny <i>Negative</i>	158	170	

Tab. 6. Test χ^2 dla poszczególnych antygenów użytych w obu testach Western blot IgG

Tab. 6. The result of a chi-square test by antigen, for all antigens used in Western blot IgG test kits

Antygen <i>Antigen</i>	IgM	Viramed	Mikrogen	Wynik testu χ^2 dla $p < 0,05 = 3,84$ <i>Chi-square for $p < 0.05 = 3.84$</i>
VlsE	Dodatni <i>Positive</i>	3	3	Brak różnicy <i>No difference</i>
	Ujemny <i>Negative</i>	93	93	
P41	Dodatni <i>Positive</i>	80	65	6,339 – istotna różnica <i>6.339 – significant difference</i>
	Ujemny <i>Negative</i>	16	31	
OspC	Dodatni <i>Positive</i>	92	69	20,350 – istotna różnica <i>20.350 – non-significant difference</i>
	Ujemny <i>Negative</i>	4	27	

Tab. 7. Test χ^2 dla poszczególnych antygenów użytych w obu testach Western blot IgM

Tab. 7. The result of a chi-square test by antigen, for all antigens used in Western blot IgM test kits

analizę istotności przy użyciu testu χ^2 . Istotną różnicę w wynikach wykazano dla antygenów p100/p83, p58, p39 dla testów IgG. Natomiast dla testów IgM wykazano istotną różnicę dla antygenów OspC oraz p41 (tab. 6 i 7).

OMÓWIENIE

W porównaniu wyników otrzymanych metodą ELISA i w dwóch rodzajach testów Western blot wykazano obecność znacznej liczby wyników fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych. Całkowita zgodność wyników testów ELISA i Western blot wyniosła: 65,6% (IgM ELISA: Mikrogen), 69,8% (IgM ELISA: Viramed), 83,9% (IgG ELISA: Mikrogen), 81,9% (IgG ELISA: Viramed). Stwierdzono większą zgodność wyników w klasie IgG. Z kolei w klasie IgM zaobserwowano 11,45% (Mikrogen) i 13,5% (Viramed) wyników ujemnych w teście ELISA potwierdzonych jako dodatnie testem Western blot. Pomimo użycia bardzo czułego testu przesiewowego uzyskano znaczny odsetek wyników fałszywie ujemnych, czego należy unikać, stosując procedurę dwuetapowej diagnostyki, zakładającej potwierdzanie tylko dodatnich i wątpliwych wyników. Podobne rezultaty uzyskano w pracy Chmielewskiej-Badory i wsp., którzy wykazali całkowitą zgodność wyników dla klasy IgM na poziomie 58,9%, a dla klasy IgG – 83,9%⁽⁸⁾. Obecność wyników fałszywie ujemnych wyniosła 16,7% dla klasy IgM i 7,2% dla klasy IgG. Cytowane badania przeprowadzono za pomocą testów ELISA firmy Biomedica oraz Western blot firmy Mikrogen. Na podstawie tych wyników można stwierdzić, że konieczne jest prowadzenie dwutorowej diagnostyki boreliozy u wszystkich badanych, składającej się z badań ELISA i Western blot w klasach IgM i IgG. Traktowanie testu ELISA jako testu przesiewowego nie sprawdza się, ponieważ uzyskiwana jest ponad 10-procentowa grupa wyników fałszywie ujemnych, co często skutkuje brakiem dalszej diagnostyki, a co za tym idzie – brakiem wdrożenia właściwego leczenia. Pula wyników granicznych jest równie wysoka co fałszywie ujemnych, jednak są one najczęściej potwierdzane metodą Western blot. Przeprowadzona analiza statystyczna przy użyciu testu χ^2 dla tablicy wielopolowej

conformity of ELISA and Western blot tests was as follows: 65.6% (IgM ELISA: Mikrogen), 69.8% (IgM ELISA: Viramed), 83.9% (IgG ELISA: Mikrogen), 81.9% (IgG ELISA: Viramed). Higher conformity was determined for the results of IgG levels. In IgM class, in turn, 11.45% (Mikrogen) and 13.5% (Viramed) negative ELISA results were later confirmed as positive by Western blot testing. Despite the use of a very sensitive screening test, a high rate of false negative results was obtained, causing concerns as to the effectiveness of the two-tiered diagnostic approach where only positive and equivocal results are further confirmed with Western blotting technique. Similar results were obtained in a study by Chmielewska-Badory *et al.* where conformity of IgM results between the tests was demonstrated to be 58.9%, and of IgG results – 83.9%⁽⁸⁾. False negative results amounted to 16.7% for IgM antibodies and 7.2% for IgG antibodies. The measurements in question were performed with ELISA by Biomedica and Western blot by Mikrogen. The results suggest the necessity to perform parallel diagnostic procedures for *Borrelia*, including both ELISA and Western blot for IgM and IgG antibody classes. The use of ELISA as a screening procedure seems to be counter-effective, as more than 10% of the results it renders are false positive, whereupon the diagnostics is discontinued, and no adequate treatment is pursued. The number of equivocal results rendered by this method is also high, yet these tend to be further confirmed with Western blot technique. The statistical analysis performed using the chi-square test has indicated significant divergence to exist between the results obtained with ELISA and the two Western blot test kits. The results rendered by Western blot tests are partially consistent with those cited by Chmielewska-Badory *et al.*⁽⁸⁾, as very similar results were obtained with Western blot IgG tests by Mikrogen and Viramed. The chi-square test showed no significant differences. However, the results obtained with Western blot IgM test by Mikrogen and Western blot IgM test by Viramed analysed with the chi-square test vary significantly. The test by Viramed rendered over 10% more positive results than the test by Mikrogen. This is of particular interest, as early detection of the infection remains a challenge, owing to patients' low antibody titres. The superior performance

wskazuje na istotną różnicę pomiędzy wynikami uzyskanymi metodą ELISA i dwoma testami Western blot.

Wyniki uzyskane w testach Western blot częściowo są zgodne z tymi opisywanymi przez Chmielewską-Badorę i wsp.⁽⁸⁾ Otrzymano bowiem bardzo zbliżone do siebie wyniki testów Western blot IgG Mikrogen oraz Viramed. Test χ^2 dla tablicy wielopolowej w tym przypadku również nie wykazał istotnych różnic. Natomiast wyniki testów Western blot IgM Mikrogen i Viramed przy użyciu statystyki χ^2 dla tablicy wielopolowej istotnie się różnią. W teście firmy Viramed uzyskano ponad 10% więcej wyników dodatnich. Jest to szczególnie ważne z uwagi na fakt, że wczesne wykrywanie infekcji jest utrudnione, często z powodu niskich mian przeciwciał u osób badanych. Istotny może być tu wpływ używania przez firmę Viramed oczyszczonych antygenów natywnych, uzyskanych ze szczepów *Borrelia afzelii* oraz *Borrelia burgdorferi sensu stricto*; jedynie antygen VlsE użyty w tym teście jest antygenem rekombinowanym. Test firmy Mikrogen składa się z całości z antygenów rekombinowanych.

Według zaleceń wydanych przez Deutsche Borreliose-Gesellschaft e.V. i przetłumaczonych na zlecenie Fundacji „BARTEK” na rzecz Osób z Boreliozą i Innymi Chorobami Odkleszczowymi nie istnieją standardy, jakim mieliby sprostać producenci testów diagnostycznych, zarówno ELISA, jak i Western blot⁽⁹⁾. Dlatego też dowolnie stosują oni antygeny rekombinowane bądź natywne. W przypadku rekombinowanych używają antygeny swoistego dla danego szczepu, co ma pomóc w rozpoznaniu konkretnego szczepu u badanego. Producent testu wykorzystanego w tej pracy (Mikrogen) użył rekombinowanych antygenów OspC uzyskanych z gatunków *B. sensu stricto*, *afzelii*, *garii*, *spielmanii* i p18 uzyskanych z gatunków *B. sensu stricto*, *afzelii*, *garii*, *garii2* oraz *spielmanii*. Wyniki otrzymane w prezentowanym badaniu wyraźnie wskazują, że wymienione antygeny nie cechują się istotną swoistością co do przeciwciał, z którymi reagują. W celach porównawczych wprowadzony został dodatkowy parametr w teście firmy Mikrogen – OspC Total. Dzięki temu zobrazowano różnice pomiędzy wynikami dwóch różnych testów, a także umożliwiono porównanie liczby wszystkich wyników dodatnich dla białka OspC (Total) z liczbą dodatnich wyników antygenów rzekomo swoistych dla poszczególnych gatunków. W badaniu przeciwciał klasy IgM uzyskano w sumie 69 pozytywnych wyników dla przynajmniej jednego swoistego białka OspC i 67 dla OspC *B. spielmanii*, 58 dla OspC *B. garii*, 50 dla OspC *B. afzelii* oraz 43 dla OspC *B. sensu stricto*. Jeżeli kierowalibyśmy się zasadą podaną przez producenta, oznaczałoby to, że najwyżej w 10 przypadkach (12,66%) nie doszło do koinfekcji przynajmniej dwóch różnych gatunków *Borrelia burgdorferi*. Bardziej prawdopodobna jest możliwość reakcji krzyżowych przeciwciał anti-OspC z antygenami OspC poszczególnych gatunków.

Należałoby zatem opracować zasady, do których producenci mieliby się stosować przy tworzeniu testów – zarówno

may be due to the fact that purified native antigens derived from *Borrelia afzelii* and *Borrelia burgdorferi sensu stricto* are used by Viramed, with VlsE being the only recombinant antigen used in this test. The Mikrogen test, on the other hand, is fully composed of recombinant antigens.

According to the guidelines issued by Deutsche Borreliose-Gesellschaft e.V., translated by the “BARTEK” Foundation for Patients with Borreliosis and Other Tick-Borne Diseases (Fundacja „BARTEK” na rzecz Osób z Boreliozą i Innymi Chorobami Odkleszczowymi), currently no standards exist that would have to be met by manufacturers of diagnostic tests, be it ELISA or Western blot⁽⁹⁾. As a result, the producers utilize either recombinant or native antigens at their discretion. To facilitate identification of a particular bacterial strain in a patient, in the case of recombinant antigens strain-specific antigens are used. For the immunoblot employed in this study, Mikrogen used recombinant OspC antigens derived from *B. sensu stricto*, *afzelii*, *garii*, *spielmanii* strains, and p18 antigens derived from *B. sensu stricto*, *afzelii*, *garii*, *garii2* and *spielmanii* strains. The results discussed above seem to indicate that the listed antigens do not exhibit significant specificity for the antibodies directed against them. An additional parameter was included for comparative purposes in the Mikrogen test, namely OspC Total, helping to demonstrate the differences in the results rendered by the two tests, and compare the number of all positive results for OspC protein (Total) with the number of positive results for antigens presumed specific for given species. In the IgM test, a total of 69 positive results were obtained for at least one specific OspC protein, and 67 for OspC *B. spielmanii*, 58 for OspC *B. garii*, 50 for OspC *B. afzelii*, and 43 for OspC *B. sensu stricto*. According to the manufacturer's information, this would mean that in no more than 10 (12.66%) cases no coinfections by two different *Borrelia burgdorferi* species occurred. It seems more likely that cross reactions between anti-OspC antibodies and OspC antigens of given species are possible. Hence, standardisation of Western blot and ELISA test kits seems necessary. The type of antigens (native or recombinant), particular antigens, and strains they may be isolated from should all be specified. Up until that point, the diagnostic accuracy of the two-tiered approach to the serodiagnosis of borreliosis appears to be insufficient, leading to underdiagnosis and delayed diagnosis. ELISA and Western blot testing should, therefore, be conducted in parallel, with both IgM and IgG titres measured.

CONCLUSIONS

1. The sensitivity of the ELISA test kit used in the study is not sufficient enough to be useful for screening the two-tiered diagnostic approach.
2. The differences in antigen composition, the method of antigen derivation, and the character of immunologic response to infection within the studied population may all account for the interpretative divergences between the results of the two Western blot tests used in our study.

Western blot, jak i ELISA. Przede wszystkim powinny one określać rodzaj użytych antygenów (natywne, rekombinowane), konkretne antygeny, szczepy, z których można je izolować. Do momentu rozwiązania tej kwestii stosowanie dwuetapowej diagnostyki boreliozy jest obciążone zbyt dużym błędem, powodującym za niską oraz za późną wykrywalność choroby. Test ELISA i Western blot powinny być wykonywane w tym samym czasie z oznaczeniem przeciwciał w dwóch klasach: IgM i IgG.

WNIOSKI

1. Wykorzystany do badań test ELISA jest zbyt mało czuły do stosowania w pierwszym etapie diagnostyki boreliozy.
2. Stwierdzone rozbieżności interpretacyjne w wynikach testów Western blot mogą sugerować, że ich przyczyną są różnice w składzie antygenów, sposobie ich pozyskania oraz charakterze odpowiedzi immunologicznej na zakażenie w badanej populacji.

Konflikt interesów

Autorzy nie zgłaszają żadnych finansowych ani osobistych powiązań z osobami lub organizacjami, które mogłyby negatywnie wpłynąć na treść publikacji oraz rościć sobie prawo do tej publikacji.

Conflict of interest

The authors claim no financial or personal links to persons or organizations that could adversely affect the content of this publication or claim rights thereto.

Piśmiennictwo / References

1. Czubasiewicz Z, Strzelczyk JK, Krzakiewicz K: Przegląd metod służących do wykrycia zakażenia *Borrelia burgdorferi*. *Pediatr Med Rodz* 2013; 9: 144–149.
2. Richter D, Schlee DB, Allgöwer R *et al.*: Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 6414–6419.
3. Mączka I, Tylewska-Wierzbowska S: Cykl krążenia krętków *Borrelia burgdorferi* w środowisku. *Post Mikrobiol* 2010; 49: 25–32.
4. Hubálek Z, Halouzka J: Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur J Epidemiol* 1997; 13: 951–957.
5. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce – 1998–2014. Available from: http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/index_p.html#04.
6. Raczkiewicz A, Thustochowicz W: Borelioza (choroba z Lyme). *Medycyna po Dyplomie* 2013, 11.
7. Wilske B, Zöller L, Brade V *et al.*: MIQ, 12 : Lyme-Borreliose. In: Mauch H, Lütticken R (eds.): MIQ. Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik. Urban & Fischer Verlag, Munich 2000.
8. Chmielewska-Badora J, Cisak E, Wójcik-Fatla A *et al.*: Correlation of tests for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in patients with diagnosed borreliosis. *Ann Agric Environ Med* 2006; 13: 307–311.
9. Von Baehr R, Becker W, Bennefeld H *et al.*: Diagnostyka i leczenie boreliozy z Lyme. Wytyczne. *Deutsche Borreliose-Gesellschaft e.V.*, 2011.