

LYME BORRELIOSIS: OPEN QUESTIONS AND PROBLEMS AT THE TURN OF THE MILLENNIUM

MATEICKA F, KMETY E

LYMSKÁ BORELIÓZA: OTVORENÉ OTÁZKY A PROBLÉMY NA PRELOME MILÉNIA

Abstract

Mateicka F, Kmety E:

Lyme borreliosis: open questions and problems at the turn of the millenium

Bratisl Lek Listy 2000; 101 (3): 166–169

At the beginning of new millenium, Lyme borreliosis is still the subject of intensive research, polemic discussions and open questions. The authors present minute analysis of the issues associated with Lyme borreliosis, concentrating on biological aspects and taxonomic classification of the agent, co-transmission and co-infection, diagnostic criteria and their validity, laboratory diagnostics and therapy of the disease including perspectives of active immunisation in the future. Special attention is paid to open questions in clinical and laboratory diagnostics of the disease and to the prospects for the near future. The authors also discuss the importance of international and interdisciplinary cooperation in the process of articulation of diagnostic criteria and recommended procedures for laboratory diagnostics. (Ref. 17.)

Key words: Lyme borreliosis, diagnostics, therapy.

Abstrakt

Mateička F., Kmety E.:

Lymská borelióza: otvorené otázky a problémy na prelome milénia

Bratisl. lek. Listy, 101, 2000, č. 3, s.

Lymská borelióza je stále predmetom intenzívneho výskumu, ako aj polemických diskusií a otvorených otázok aj na začiatku nového milénia. Autori podrobne analyzujú problémové okruhy spojené s lymskou boreliózou najmä z aspektu biológie a klasifikácie pôvodcu ochorenia, kotransmisie a koinfekcie, diagnostických kritérií a ich validity, laboratórnej diagnostiky ochorenia a liečby vrátane budúcnosti aktívnej imunizácie pri tejto chorobe. Osobitne sa zdôrazňujú otvorené problémy spojené s klinickou a laboratórnou diagnostikou ochorenia, ako aj výhľady do blízkej budúcnosti. Zdôrazňuje sa význam medzinárodnej a interdisciplinárnej spolupráce pri formulovaní diagnostických kritérií a odporúčaných postupov pre laboratórnú diagnostiku lymskej boreliózy. (Lit. 17.)

Kľúčové slová: lymská borelióza, liečba boreliózy, diagnostika boreliózy.

Lymskú boreliózu (LB) možno charakterizovať ako multisystémové ochorenie s heterogénnou klinickou symptomatológiou, vyvolávané infekciou spirochétami patriacimi do genoskupiny *Borrelia burgdorferi sensu lato*, prebiehajúce akútne alebo chronicky, pričom pri vývoji chronických foriem ochorenia majú s najväčšou pravdepodobnosťou významnú úlohu imunopatogenetické mechanizmy a genetické pozadie jedinca.

Napriek takmer štvrtstoročiu od nozografického rozpoznaní ochorenia a intenzívnemu výskumu vo všetkých oblastiach, vyvoláva LB neustále nezodpovedané otázky u teoretikov a budí diagnostické a terapeutické rozpaky u klinikov. Patogenéza, imunogenetické pozadie vzniku ochorenia, meniace sa klinické symptómy a prekrý-

vanie prejavov, chýbanie spoľahlivých a všeobecne akceptovaných diagnostických kritérií, objektívne ťažkosti s laboratórnou diagnostikou, ako aj problémy s terapiou najmä chronických foriem ochorenia svedčia o pokračujúcej potrebe výskumov v tejto oblasti a intenzifikácie medzinárodnej spolupráce všetkých odborníkov.

Hlavné problémové okruhy spojené s LB možno definovať v nasledujúcich piatich bodoch:

1. biológia a klasifikácia pôvodcu ochorenia,
2. kotransmisia a koinfekcia,
3. diagnostické kritériá a ich validita,
4. laboratórna diagnostika ochorenia,
5. liečba, vakcinácia a ich perspektívy.

Research Institute of Rheumatic Diseases, Piešťany. mateicka@vurch.sk
School of Health Care and Social Work, Trnava University, Trnava, Medical School, Comenius University, Bratislava

Address for correspondence: F. Mateicka, MD, PhD, Research Institute of Rheumatic Diseases, Nabrežie I Krasku 4, SK-921 01 Piešťany, Slovakia.

Výskumný ústav reumatických chorôb v Piešťanoch, Fakulta zdravotníctva a sociálnej práce Trnavskej Univerzity v Trnave a Lekárska fakulta Univerzity Komenského v Bratislave

Adresa: Prof. MUDr. F. Mateička, CSc., Výskumný ústav reumatických chorôb, Nábřežie I. Krasku 4, 921 01 Piešťany.

Biológia a klasifikácia pôvodcu ochorenia

Pôvodne sa myslelo, že *Borrelia burgdorferi* (Johnson a spol., 1984) opísaná na americkom kontinente je jediným vyvolávateľom LB. V priebehu posledných desiatich rokov sa však potvrdila významná genetická diverzita tohto druhu. V súčasnosti možno *B. burgdorferi* (ako taxón) rozdeliť minimálne na 8 genospecies: *B. burgdorferi sensu stricto* (vyskytuje sa v Európe a USA, ale nebola opísaná v Rusku a Ázii), *B. garinii* (Baranton a spol., 1992), *B. afzelii* (Canica a spol., 1993), *B. valaisiana* (Wang a spol., 1997) a *B. lusitaniae* (vyskytujú sa v Eurázii), *B. japonica* (Kawabata a spol., 1993) (obmedzená na Japonsko), *B. andersonii* (Marconi a spol., 1995) a *B. bissettii* (Postic a spol., 1998) (vyskytujú sa v USA). Na identifikáciu jednotlivých genotypov sa najčastejšie používa metóda PCR s použitím vhodného primeru. V poslednom čase sa ukazuje, že niektoré borélie, ktoré sú fylogeneticky príbuzné skôr boréliám vyvolávajúcim relabujúcu horúčku, by tiež mohli byť asociované s LB (*B. lonestari* v USA a *B. miyamotoi* v Japonsku). Analýza intergénovej oblasti 5S-23S rRNA génov *B. burgdorferi sensu lato* poukazuje na to, že *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* a *B. japonica* sú fylogeneticky blízke *B. garinii*, kým *B. burgdorferi sensu stricto* je fylogeneticky odlišná. Zdá sa, že *B. garinii* je ancestrálnym genospecies pre celý komplex borélií asociovaných s LB. Z 8 v súčasnosti známych genospecies sú jednoznačne asociované s LB *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. valaisiana*.

Genotypová heterogenita pôvodcu LB súvisí s heterogenitou klinického obrazu a geografickými rozdielmi v zastúpení klinických prejavov ochorenia. Stále približne platí, že *B. burgdorferi sensu stricto* vyvoláva najčastejšie kĺbové postihnutie, kým *B. garinii* neurologické a *B. afzelii* kožné (najmä chronické) formy ochorenia. Táto systémová preferencia však nie je výlučná a vieme, že aj typické „kožné“ genotypy možno identifikovať u pacientov s neurologickými alebo oftalmologickými prejavmi. *B. valaisiana* je typicky asociovaná s erythema migrans. V Európe sú najpočetnejšie neurologické manifestácie ochorenia, čo potvrdzujú epidemiologické štúdie o zastúpení izolovaných genotypov v jednotlivých zdrojoch. Aj na slovenskom území (resp. v karpatskom euroregióne) sú najpočetnejšie zastúpené genotypy *B. garinii* (Mateička a spol., 1997) a *B. afzelii* (Gern a spol. 1999). V strednej Európe sa však vyskytujú aj ostatné novšie popísané genotypy *B. valaisiana* a *B. lusitaniae*.

Kotransmisia a koinfekcia

Napriek mnohým diskusiám a polemikám možno stále považovať za dominantný vektor kliešťa (v Európe *Ixodes ricinus*). Pravdepodobnosť infikovania hostiteľa je stále najvyššia pri pricicaní kliešťa, k čomu ho predurčujú viaceré epizootologické a fyziologické faktory (vrátane dĺžky pricicania k hostiteľovi). V poslednom čase sa však pozornosť sústreďuje aj na niektoré iné patogény, prenášané kliešťami. V Európe prichádzajú do úvahy najmä ďalšie dva významné rody: *Babesia* a *Ehrlichia*. Z klinického hľadiska je dôležité, že mikroorganizmy patriace do týchto rodov napádajú rôzne typy hematopoetických buniek v krvi a vyvolávajú klinické symptómy, ktoré často môžu robiť diferenciálnodiagnostické ťažkosti pri odlíšení od LB, resp. klinický obraz LB modifikujú. V praxi už boli opísané prípady dvojitej infekcie (LB + ehr-

lichioza). K problematike kotransmisie a koinfekcie pristupuje aj možnosť súčasnej infekcie dvoma alebo tromi rozdielnymi genotypmi borélií asociovanými s LB, čo už bolo opísané u pacientov s neuroboreliózou. Je len samozrejmé, že táto možnosť vyvoláva tlak na skvalitnenie laboratórnej diagnostiky a čo najpresnejšie odlišenie možnosti dvojitej, prípadne aj trojitej infekcie.

Diagnostické kritériá a ich validita

Heterogenita klinických prejavov LB, ich prekryvanie a geografické rozdiely v ich výskyte často sťažujú exaktnú klinickú diagnostiku. Podmieňuje to aj skutočnosť, že stále chýbajú spoľahlivé a všeobecne akceptovateľné diagnostické kritériá. Nemožno jednoducho prenášať ani klinické dáta pozorované z rôznych oblastí (napr. z USA) do iných geografických lokalít a kontinentov. Klasickým príkladom nejednoznačností a rozporov môžu byť neurologické prejavy LB, najmä jej chronické prejavy. Prípady chronickej encefalopatie s často oligosymptomatickými prejavmi (poruchy koncentrácie, spánku, pamäte a pod.) alebo chronické periférne neurologické postihnutia pri absencii exatnej laboratórnej diagnostiky (intratekálna produkcia protilátok, dôkaz špecifických oligoklonových protilátok v likvore a pod.) vedú často k diagnostickej skepe a pochybnostiam hraničiacim s názormi, že chronická neuroborelióza je extrémne zriedkavé ochorenie (Stanek a spol., 1996). Ale je to v skutočnosti tak, že by chronické neurologické postihnutie bolo také zriedkavé, ak si uvedomíme, že v Európe by malo byť tým najčastejším prejavom ochorenia a má značnú tendenciu k chronickému priebehu? Podobne stále nevyjasnený zostáva vzťah LB k symptomatológii, ktorú obyčajne označujeme „sclerosis multiplex-like“.

Iným príkladom môže byť muskuloskeletálne postihnutie. V USA ide vôbec o najčastejší klinický prejav ochorenia (aspoň ako artritída), na európskom kontinente je však menej častejší (46 % v USA oproti 7 % v severnej Európe a 21 % v južnej Európe) (Bianchi a spol., 1993). Ak však zoberieme do úvahy celé spektrum muskuloskeletálneho postihnutia (artralgie, myalgie, úponové a iné extraartikulárne symptómy) nemusia byť rozdiely také výrazné. Podľa štúdie talianskych autorov sa výskyt reumatologických prejavov LB u talianskych pacientov približuje výskytu v USA (Cimmino a spol., 1994). Niektoré asociácie sú stále kontroverzné a môžu byť odrazom problémov s diferenciálnou diagnostikou ochorenia. Príkladom môžu byť sporadické kazuistické oznámenia sakroiliitídy asociované s LB (Kinigadner a spol., 1991) odhliadnuc od toho, že osifikujúce chronické entezopatie sa pri LB skutočne vyskytujú. V blízkej budúcnosti bude potrebné analyzovať podiel borélieovej infekcie na vzniku a rozvoji séro-negatívnej nediferencovanej oligoartritídy. Pravdepodobne jedným z najväčších diagnostických problémov je fibromyalgia a chronický únavový syndróm aj vzhľadom na etiologickú heterogenitu a nozografickú nejednoznačnosť týchto stavov. V americkej literatúre sa fibromyalgický syndróm spojený s LB obyčajne označuje ako sekundárna fibromyalgia, aj keď spoľahlivé odlišenie od primárnej fibromyalgie môže byť skutočne ťažké.

Ukazuje sa, že vypracovanie spoľahlivých a overených diagnostických kritérií bude možné len na základe analýzy veľkého množstva klinických prípadov ochorenia z rôznych geografických oblastí. Príkladom môže byť publikovanie európskych klinických definícií pre LB v rámci medzinárodného projektu EUCALB (Eu-

ropean Union Concerted Action on Risk Assessment in Lyme Borreliosis) (Stanek a spol., 1996; Kmety, 1997). Treba kriticky poznamenať, že aj tieto kritériá však nepokrývajú celú šírku klinických prejavov a niektoré definície nie sú kompletne resp. možno s nimi polemizovať (chronická neuroborelióza, muskuloskeletálne prejavy). Je však bez pochyb, že medzinárodné projekty typu EUCALB zohrajú v blízkej budúcnosti významnú úlohu pri spresňovaní nielen klinických ale aj laboratórnych diagnostických algoritmov.

Laboratórna diagnostika ochorenia

Laboratórna diagnostika LB zostáva naďalej významným krokom pri určovaní konečnej diagnózy ochorenia. Možno použiť priame a nepriame metódy. V praxi sme odkázaní spravidla na nepriame potvrdenie infekcie, t.j. dôkaz špecifických protilátok v sére alebo inom biologickom materiáli. Sérodiagnostika LB je však predmetom značného množstva problémov so správnou interpretáciou výsledku a najmä štandardizáciou stanovenia. Niekedy sa zdá, že výsledok sérovyšetrenia sa príliš preceňuje a diagnóza klinika je postavená len na základe sérovyšetrenia, čo iste nie je správny postup. V súčasnosti je najrozšírenejšou a najobľúbenejšou metódou ELISA, ktorej výhodami je relatívna jednoduchosť a rýchlosť, možnosť testovania veľkých množstiev vzoriek, ako aj vylúčenie subjektívnych faktorov pri interpretácii výsledkov. Odporúča sa používať diagnostické súbory založené na antigénoch rešpektujúcich lokálnu distribúciu genotypov a prípadne použitie druhého nezávislého testu. Osobitné postavenie v sérodiagnostike LB má imunoblot (Western blot), ktorý umožňuje určenie jednotlivých protilátkových špecifickostí podľa relatívnej molekulovej hmotnosti antigénu. Možno ho použiť samostatne, ale spravidla na potvrdenie séroskríningu v rámci dvojstupňového postupu. Imunoblot napriek tomu, že sa často naň spoliehame ako na tzv. „konfirmačné“ vyšetrenie, má určité riziká. Metóda nie je dosiaľ dostatočne štandardizovaná, odčítanie výsledkov je zaťažené subjektívnou chybou a použitie objektívnych postupov (kvantitatívna denzitometria) nie je dostatočne overené. Chýbajú štandardizované kritériá pre interpretáciu pozitivity. V tejto súvislosti sa treba chrániť najmä pred mechanickým prenášaním amerických interpretačných kritérií do európskych reálií, pretože európske genotypy majú vyšší stupeň antigénovej variability (napr. pri Osp antigénoch). Na štandardizácii európskych interpretačných kritérií pre imunoblot v súčasnosti pracuje študijná skupina EUCALB. Napriek týmto skutočnostiam je imunoblot viac špecifickejší ako nepriama imunofluorescencia a ELISA a určite poskytuje viac informácií o špecifickej protilátkovej odpovedi pri LB. Tak ako pri iných sérodiagnostických postupoch, treba aj tu počítať s falošne pozitívnymi alebo falošne negatívnymi výsledkami. Falošná pozitivita v imunoblote súvisí s chýbaním špecifickosti pre určité epitopy (napr. 60 kDa alebo 41 kDa antigény). Pri interpretácii sérovýsledku treba prihliadnúť aj na to, že nemusí ísť o aktívne ochorenie (pozitivita môže pretrvávajúť aj roky po vyliečení), prípadne je iba odrazom asymptomatickej séroprevalencie. Z metodologického hľadiska bude interpretácia sérovyšetrenia vždy balansovaním medzi senzitivitou a špecifickosťou určovania, čo zase závisí od určenia hodnoty „cut-off“. Na základe odporúčenia pracovnej skupiny EUCALB, ďalších expertov z USA a Ázie, ako aj WHO sa odporúča, aby minimálna špecifickosť určenia bola

aspoň 98 % pri kvantitatívnom teste a test by mal vylúčiť falošné pozitivity so vzorkami pacientov s chorobami ako syfilis a pacientov s pozitívnym reumatoidným faktorom v triede IgM. Treba počítať s tým, že citlivosť sérostanovenia môže významným spôsobom limitovať nedostatočná protilátková odpoveď vo včasných štádiách ochorenia (vrátane včasnej neuroboreliózy, keď sa môže nachádzať len v likvore). Špecifickosť stanovenia naopak môžu ovplyvniť (okrem uvedených príčin falošnej pozitivity) aj narušenie hematoencefalickej bariéry (vedúce k nálezu protilátok v likvore, ktoré nie sú vyvolané intratekálnou produkciou), oligoklonová stimulácia pri niektorých infekciách (EBV, CMV a mykoplazmové infekcie), autoimunitné ochorenia.

Z priamych diagnostických metód sa za referenčnú považuje kultivácia. Izolácia pôvodcu LB kultivačnou metódou z klinických vzoriek je veľmi náročná, časovo zdĺhavá a navyše senzitivita ani v prípade kultivácie z kožných biopsií nepresahuje 50 % (pri kultivácii z cerebrospinálneho likvoru je to menej ako 5 % a zo synoviálnej tekutiny je to menej ako 1 %). Príčiny sú rôzne a medzi najdôležitejšie patria: krátkotrvajúca boreliémia, imobilizácia spirochét tvorbou imunokomplexov, tvorba aberantných morfológických foriem (blebs, L-formy, cysty a pod.) v chronickom štádiu a iné. Aj ostatné priame metódy (svetelná mikroskopia, imunoperoxidázová mikroskopia a elektrónová mikroskopia) neposkytujú dostatočnú senzitivitu stanovenia. Preto sa v poslednom čase pochopiteľne sústreďuje pozornosť na dôkaz nukleovej kyseliny pôvodcu LB molekulovými metódami. Až zavedenie amplifikačných metód (PCR = polymerázová reťazová reakcia) koncom 80. rokov umožnilo vývoj metód s takou citlivosťou a špecifickosťou stanovenia, že v súčasnosti je možné metódou PCR detegovať v klinickej vzorke menej ako 10 spirochét. Zdá sa, že detekcia borélií metódou PCR by mohla byť významným prínosom pre priamu diagnostiku tam, kde boli iné priame metódy dosiaľ len veľmi málo výťažné (synoviálna tekutina, synoviálne tkanivo, cerebrospinálny likvor). Dosiaľ však chýba dostatok štúdií na to, aby sa výsledky detekcie borélií v takýchto klinických materiáloch dali klinicky zovšeobecniť bez rizika a odporučiť pre rutinnú diagnostiku. Existuje iba jedna veľká štúdia (Nocton a spol., 1994), ktorá prináša výsledky detekcie borélií v synoviálnej tekutine u 88 pacientov, čo je dostatočne reprezentatívny súbor (85 % pozitívnych vzoriek). Viacero skutočností stále sponchybnuje bezproblémovú klinickú interpretáciu PCR detekcie borélií v klinickom materiáli (preparačné protokoly, výber špecifickej cieľovej sekvencie oligonukleotidov (templátu) pre amplifikáciu (plazmidový alebo chromozómový), výber primerov, výber PCR metódy (jednostupňová, dvojstupňová), výber detekčného systému, kontrola kontaminácie, genotypová heterogenita pôvodcu prihliadajúca na použitie species-špecifických primerov, prítomnosť inhibítorov reakcie v klinickom materiáli a pod.). DNA borélií asociovaných s LB možno detegovať v kožných biopsiách, moči, sére (resp. plnej krvi), synoviálnej tekutine a synoviálnom tkanive a cerebrospinálnej tekutine. Záchytnosť u pacientov s neuroboreliózou je v likvore 24–100 %, u týchto pacientov možno detegovať borélie aj v moči a krvi. U pacientov s lymskou artritídou možno detegovať pôvodcu v synoviálnej tekutine (resp. tkanive) a v moči. Ak sa PCR detekcia borélií pri LB dostane do klinickej praxe, bude treba jednoznačne rešpektovať zavedenie detekčných algoritmov podľa species-špecifických primerov a prípadne ďalšiu analýzu amplifikačných produktov sekvenovaním DNA, hybridizáciou (dot blotom

alebo Southern blotom) so species-špecifickými primermi a RFLP analýzu produktov (polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov získaných štiepením endonukleázami). To znamená, že optimálny pár primerov by mal amplifikovať všetky genospecies *B. burgdorferi sensu lato* a pre všetky by mal byť rovnako senzitivity. Aj táto striktná požiadavka je príčinou, že všeobecný pár primerov pre diagnostiku DNA borélií v klinickom materiáli nebol dosiaľ štandardizovaný. Priama detekcia metódou PCR by mohla prispieť aj k exaktnej diagnostike zmiešaných infekcií (v tomto význame infekcií vyvolaných viacerými genotypmi borélií).

Liečba, vakcinácia a ich perspektívy

Základom liečby LB stále zostáva antibiotická liečba. Výber antibiotík, dávkovanie a dĺžka liečby sa v posledných rokoch podstatne nezmenila (Sigal, 1993). Úspešnosť antibiotickej liečby však komplikuje možné zlyhanie liečby najmä pri niektorých chronických formách ochorenia, ktorý sa dáva do súvislosti aj s imunogenetickým pozadím infikovaného jedinca a možným rozvojom imunopatogeneticky sprostredkovaných chronických klinických symptómov. Ukazuje sa, že u niektorých pacientov s chronickými refraktérnymi formami kĺbového postihnutia môže byť prospesné dlhodobé podávanie hydrochlorochínu. Na definitívne overenie týchto predpokladov však bude potrebné uskutočniť kontrolované terapeutické štúdie. Vzhľadom na predpoklad o účasti imunitných mechanizmov v patogenéze niektorých chronických prejavov LB nie je vylúčené, že v budúcnosti sa môžu uplatniť v liečbe chronických prejavov LB neodpovedajúcich na antibiotiká aj klasické imunosupresíva.

Z hľadiska prevencie LB v posledných rokoch sa intenzívne pracovalo na vývoji a zavedení účinnej očkovacej látky do klinickej praxe. V súčasnosti sú síce už k dispozícii dve komerčné vakcíny založené na rekombinantnom OspA (LYMERix a ImuLyme) pre humánne použitie a prvá z nich dostala v decembri 1998 povolenie FDA, ukazuje sa však, že vakcinácia pri LB nebude celkom bezproblémová. Výsledky na zdravých dobrovoľníkoch naznačili, že 80–90 % protekcia nastáva až po tretej boostrovacej dávke, to znamená, že optimálny vakcinačný protokol vyžaduje minimálne 1 rok (Sigal, 1999). Ďalšie problémy spojené s vakcináciou zahŕňajú: nesprávne indikácie a zneužívanie vakcinácie, vakcinácia nechráni pred inými ochoreniami (problém koinfekcie), vakcinácia môže sťažiť správnu diagnózu LB, obavy pred indukciou postvakcinačnej artritídy, geografické obmedzenia (vplyva z heterogenity OspA sérotypov v Európe).

References

Baranton G., Postic D., Saint Girons I., Boerlin P., Piffaretti J.C., As-sous M., Grimont P.A.D.: Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov. and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42, 1992, s. 378–383.

Bianchi G., Rovetta G.: Geographic diversity of Lyme borreliosis. *Ann. Rheum. Dis.*, 52, 1993, s. 396.

Canica M.M., Nato F., du Merle L., Mazie J.C., Baranton, G., Postic D.: Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov.

associated with late cutaneous manifestations of Lyme Borreliosis. *Scand. J. Infect. Dis.*, 25, 1993, s. 441–448.

Cimmino M.A., Parisi M., Moggiana G., Accardo S.: The pattern of arthritis in Italian patients with Lyme borreliosis. In: Vth International Conference on Lyme Borreliosis, Bologna, June 19–22, 1994, abstract O013T.

Gern L., Hu C.M., Kociánová E., Výrosteková V., Řeháček, J.: Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi sensu lato* isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. *Europ. J. Epidemiol.*, 15, 1999, s. 665–669.

Johnson R.C., Schmid G.P., Hyde F.W., Steigerwalt A.G., Brenner D.J.: *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiological agent of Lyme disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34, 1984, s. 496–497.

Kawabata H., Masuzawa T., Yanagihara Y.: Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol. Immunol.*, 37, 1993, s. 843–848.

Kinigadner J., Mur E., Most J., Stanek G.: *Borrelia* infection as a possible cause of HLA-B27 negative sacroiliitis. *J. Rheumatol.*, 18, 1991, s. 484–485.

Kmety E.: Klinické definície lymsej boreliózy (EUCALB 1996). *Med. Monitor*, 1997, č. 6, s. 1–7.

Marconi R.T., Liveris D., Schwartz I.: Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme Disease Spirochetes: Phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia anderssonii* sp. nov.) isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 1995, s. 2427–2434.

Mateička F., Kozáková D., Rosa P.A., Kmety E.: Identification of *Borrelia burgdorferi Sensu Lato* Tick Isolates from Slovakia by PCR Typing with 16S rRNA Primers. *Zbl. Bakt.*, 286, 1997, s. 355–361.

Nocton J.J., Dressler F., Rutledge B.J., Rys P.N., Persing D.H., Steere A.C.: Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. *New Engl. J. Med.*, 330, 1994, s. 229–234.

Postic D., Marti Ras N., Lane R.S., Hendson M., Baranton, G.: Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *J. Clin. Microbiol.*, 36, 1998, s. 3497–3504.

Sigal L. H.: Lyme Disease: Testing and Treatment. Who Should Be Tested and Treated for Lyme Disease and How? *Rheum. Dis. Clin. North Amer.*, 19, 1993, s.79–93.

Sigal L.H.: Lyme Disease and the Lyme Disease Vaccines. *Bull. Rheum. Dis.*, 48, 1999, č. 4, s. 1–4.

Stanek G., O'Connell S., Cimmino M., Aberer E., Kristoferitsch W., Granstrom M., Guy E., Gray J.: European Union concerted action on risk assessment in Lyme borreliosis: clinical case definitions for Lyme borreliosis. *Wien. Klin. Wchr.*, 108, 1996, s. 741–747.

Wang G., Van Dam A.P., Le Fleche A., Postic D., Peter O., Baranton G., De Boer R., Spanjaard L., Dankert J.: Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 1997, s. 926–932.

Received December 16, 1999.

Accepted January 11, 2000.