ADVANCEMENTS OF MICROBIOLOGY – POSTĘPY MIKROBIOLOGII
2019, 58, 4, 399–413
DOI: 10.21307/PM-2019.58.4.399

ANTYGENY REKOMBINANTOWE W DIAGNOSTYCE SEROLOGICZNEJ BORELIOZY

Weronika Grąźlewska, Lucyna Holec-Gąsior*

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk, Polska

Wpłynęło w styczniu, zaakceptowano w listopadzie 2019 r.

Streszczenie: Borelioza jest najczęstszą chorobą odkleszczową dotykającą mieszkańców półkuli północnej. Chorobę tę wywołują bakterie zakwalifikowane do grupy *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Współcześnie podstawą diagnostyki laboratoryjnej boreliozy jest dwustopniowe badanie serologiczne. Pierwszym etapem jest test immunoenzymatyczny (ELISA), jeżeli wynik badania jest dodatni lub wątpliwy jako test potwierdzający stosuje się technikę Western blot. W obu metodach jako główne źródło antygenów wykorzystuje się całkowite lizaty komórkowe *B. burgdorferi* s.l. Jednak ogromna różnorodność gatunków w obrębie *B. burgdorferi* s.l. oraz niski stopień zakonserwowania sekwencji ich białek sprawia, że wykorzystanie lizatów komórkowych jednego z genogatunków nie jest wystarczające do prawidłowego rozpoznania boreliozy. Liczne doniesienia literaturowe wykazują, że wykorzystanie antygenów rekombinantowych lub chimerycznych *B. burgdorferi* s.l. może być potencjalnym rozwiązaniem problemów występujących w immunodiagnostyce boreliozy. Jednak, aby testy diagnostyczne oparte na białkach rekombinantowych miały jak największą skuteczność należy wykorzystać w nich starannie wyselekcjonowane antygeny lub ich fragmenty. Dzięki takiemu podejściu można opracować test, którego czułość pozostanie niezależna od genogatunku *B. burgdorferi* s.l., który wywołał chorobę. Dodatkowo wykorzystanie jedynie fragmentów białek może zdecydowanie ograniczyć częstość występowania reakcji krzyżowych.

1. Wprowadzenie. 2. Charakterystyka wybranych antygenów *B. burgdorferi* s.l. 3. Diagnostyka boreliozy. 4. Problemy w serodiagnostyce boreliozy. 5. Wykorzystanie białek rekombinantowych i peptydów syntetycznych w diagnostyce boreliozy. 6. Podsumowanie

RECOMBINANT ANTIGENS IN SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF LYME BORRELIOSIS

Abstract: Lyme borreliosis, an infectious disease caused by tick-borne spirochetes of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, is regarded as the most commonly reported vector-borne infection in the Northern Hemisphere. Currently, the basis for laboratory diagnosis of Lyme disease is a two-step serological examination. The first is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). If the test result is positive or questionable, a Western blot is used as the second phase test. In both methods, the total cell lysates of *B. burgdorferi* s.l. are used as the main source of antigens. However, the huge diversity of genospecies within *B. burgdorferi* s.l. and the low degree of preservation of the sequence of their proteins means that using the cell lysates of one of the species is not sufficient to correctly diagnose Lyme disease. Numerous literature reports show that the use of *B. burgdorferi* s.l. recombinant or chimeric antigens may be a potential solution to problems occurring in Lyme disease immunodiagnosis. However, for diagnostic tests based on recombinant proteins to be as effective as possible, carefully selected antigens or fragments should be used. With this approach, a test can be developed with a sensitivity that remains independent of the *B. burgdorferi* s.l. species which caused the disease. In addition, the exclusive use of protein fragments may definitely reduce the frequency of cross-reactions.

1. Introduction. 2. Characterization of selected *B. burgdorferi* s.l. antigens. 3. Diagnosis of Lyme disease. 4. Problems in Lyme disease serodiagnosis. 5. Use of recombinant antigens and synthetic peptides in the diagnosis of Lyme disease. 6. Summary

Słowa kluczowe: antygeny rekombinantowe, borelioza, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, immunodiagnostyka
Keywords: recombinant antigens, Lyme borreliosis, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, immunodiagnosis

1. Wprowadzenie

Borelioza jest chorobą odzwierzęcą wywoływaną przez krętki należące do kompleksu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.). Schorzenie to zostało opisane po raz pierwszy u ludności zamieszkującej miejscowość Lyme (stan Connecticut, USA), dlatego też często określane jest mianem choroby z Lyme (LD, Lyme Disease) [71]. Borelioza należy do najczęstszych chorób odkleszczowych (tj. przenoszonych na człowieka w czasie ugryzienia zakażonego bakterią kleszcza z rodzaju *Ixodes*), występujących wśród mieszkańców półkuli północnej. W większości przypadków, aby doszło do zakażenia krętkiem potrzebny jest czas żerowania kleszcza wynoszący około 36 godz. przy czym ryzyko to wzrasta do 100% po upływie 72 godz. [40, 74].

Kompleks *B. burgdorferi* s.l. jest heterogenną grupą bakterii z rodzaju *Borrelia* o globalnym zasięgu występowania. Obecnie, na podstawie filogenetycznego podobieństwa, w obrębie kompleksu *B. burgdorferi* s.l.

* Autor korespondencyjny: dr hab. inż. Lucyna Holec-Gąsior, Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, e-mail: holec@pg.edu.pl

wyróżnia się około 20 genogatunków, jednakże z uwagi na podejmowane próby zidentyfikowania oraz opisania nowych szczepów uważa się, iż liczba ta nie jest ostateczna (Tab. I) [45, 64, 69].

Krętki *B. burgdorferi* s.l. to mikroaerofilne, Gram-ujemne bakterie należące do typu *Spirochaetes.* W zależności od fazy cyklu rozwojowego mikroorganizmy te zaliczane są do pasożytów zewnątrz lub wewnątrz komórkowych. Komórki bakterii mają długość od 10 do 30 µm i od 0,2 do 0,5 µm szerokości [5]. W budowie komórek *B. burgdorferi* s.l. wyróżnia się następujące elementy: zewnętrzną błonę lipidową z wieloma lipoproteinami powierzchniowymi, przestrzeń peryplazmatyczną, rzęski oraz wewnętrzną błonę cytoplazmatyczną tworzącą protoplazmatyczny cylinder. Pomiędzy błoną zewnętrzną i wewnętrzną znajduje się przestrzeń peryplazmatyczna, w jej obrębie umieszczone są rzęski (od 7 do 11), które umożliwiają komórkom krętka aktywne poruszanie [7, 36]. Bakterie należące do kompleksu *B. burgdorferi* s.l. charakteryzuje pleomorfizm, oznacza to, że są wstanie zmienić swoją morfologię w odpowiedzi na warunki środowiska [53]. Znane są 4 formy pleomorficzne *B. burgdorferi* s.l.: (i) krętek tj. wegetatywna forma spiralna; (ii) blebs czyli forma pęcherzykowa; (iii) „round bodies" (RBs) jako forma pozbawiona ściany komórkowej – nazywana również CWD (cell wall deficient), sferoplastem lub formą L; (iiii) biofilm like (BFL), czyli kolonia złożona z form krętkowych, sferycznych oraz blebs [53, 54].

Sekwencja nukleotydowa genomu *B. burgdorferi* sensu stricto B31 została określona w 1997 roku. Całkowity genom tego szczepu obejmuje 1 521 419 par zasad (pz), składa się na niego liniowy chromosom (910 725 pz), oraz 21 plazmidów (9 kolistych i 12 liniowych) o łącznym rozmiarze 610 694 pz [9, 19]. Wśród tak dużej liczby plazmidów dwa z nich (lp54 i cp26), obecne są u wszystkich genogatunków *B. burgdorferi* s.l. [25]. W obrębie chromosomu zlokalizowane są głównie geny kodujące białka odpowiedzialne za metabolizm podstawowy, a jego sekwencja jest dość silnie zakonserwowana wśród dotychczas przebadanych przedstawicieli *B. burgdorferi* s.l. Analiza sekwencji chromosomu wykazała, że patogen nie posiada genów kodujących enzymy konieczne do wielu podstawowych funkcji życiowych komórki m.in. syntezy aminokwasów, kwasów tłuszczowych, kofaktorów enzymów i nukleotydów oraz związków biorących udział w transporcie elektronów. Odkrycia, te wskazują na silne przystosowanie *B. burgdorferi* s.l. do pasożytniczego trybu życia [9, 19]. Znaczna część genów zlokalizowanych na plazmidach

Tabela I
Zasięg występowania dotychczas poznanych genogatunków należących do kompleksu *B. burgdorferi* s.l.

Genogatunek	Patogenność dla ludzi	Występowanie
B. burgdorferi sensu stricto	Tak	Ameryka Północna, Europa
B. garinii	Tak	Europa, Azja
B. bavariensis	Tak	Europa, Azja
B. afzelii	Tak	Europa, Azja
B. spielmanii	Tak	Europa
B. bissettii	Podejrzewana	Europa, Ameryka Północna
B. mayonii	Podejrzewana	Ameryka Północna
B. lusitaniae	Podejrzewana	Europa
B. valaisiana	Podejrzewana	Europa, Japonia, Tajwan, Korea
B. lanei	Nie	Ameryka Północna
B. americana	Nie	Ameryka Północna
B. andersonii	Nie	Ameryka Północna
B. californiensis	Nie	Ameryka Północna
B. carolinensis	Nie	Ameryka Północna
B. japonica	Nie	Japonia
B. kurtenbachii	Nie	Ameryka Północna
B. sinica	Nie	Chiny
B. tanukii	Nie	Japonia
B. turdi	Nie	Japonia
B. yangtze	Nie	Chiny

Na podstawie: [45, 48, 50, 61].

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

(około 15%) koduje antygeny błony zewnętrznej. Białka te określają zdolność krętka do transmisji pomiędzy żywicielami oraz szybkość rozprzestrzeniania się zakażenia po wniknięciu do kolejnego z nich. Plazmidy zawierają, więc główną informację genetyczną wpływającą na wirulencję i patogenność bakterii z rodzaju *Borrelia* [9, 10]. Nie wszystkie szczepy *B. burgdorferi* s.l. posiadają pełen komplet plazmidów, a zatem całkowity rozmiar genomu może zmieniać się wśród różnych izolatów *B. burgdorferi* s.l. [2, 49]. Wiele z plazmidów jest łatwo traconych podczas hodowli *in vitro* co jest związane z utratą patogenności. Zatem hodowla laboratoryjna w pełni wirulentnych szczepów *B. burgdorferi* s.l. jest wyjątkowo trudna [56, 62].

Borelioza to przewlekła, wieloukładowa choroba o fazowym przebiegu. Jak dotąd udowodniono, że u ludzi wywołuje ją 5 z dotychczas poznanych genogatunków *B. burgdorferi* s.l. tj. *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *Borrelia afzelii*, *Borrelia spielmanii*, *Borrelia garinii* i *Borrelia bavariensis.* W przeciwieństwie do Ameryki Północnej, gdzie boreliozę u ludzi wywołuje jedynie *B. burgdorferi* s.s., w Europie występują wszystkie genogatunki ostatecznie potwierdzone jako patogenne dla ludzi [45]. W przebiegu boreliozy lekarze najczęściej rozróżniają trzy fazy choroby: (i) wczesną – trwającą do 8 tygodni od momentu zakażenia; (ii) rozsianą – pojawiającą się 6–26 tygodni od kontaktu z kleszczem oraz (iii) późną – rozwijającą się po 6 miesiącach od momentu przeniknięcia krętka do organizmu człowieka [40, 59]. Najbardziej charakterystycznym objawem wczesnej boreliozy jest rumień wędrujący (EM, *erythema migrans*), nie pojawia się on jednak u wszystkich zakażonych, a jedynie u 40–80% pacjentów [2, 52, 59]. EM jest to zmiana skórna mająca początkowo postać czerwonej plamy, która rozszerza się, tworząc charakterystyczny wzór z centralnym przejaśnieniem. W tej fazie zakażenia pacjenci mogą nie doświadczać innych dolegliwości lub wykazywać objawy grypopodobne. Nieleczona choroba może rozwinąć się do wczesnej fazy rozsianej w trakcie, której możliwe jest wystąpienie rumienia wędrującego mnogiego. Dodatkowo często obserwowane są objawy neurologiczne (zespół Bannwartha, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie korzeni nerwowych i nerwów czaszkowych) lub rzadziej zapalenie serca oraz ostre nawracające zapalenie stawów [2, 40, 59]. Przebieg późnego etapu boreliozy jest w dużym stopniu uzależniony od genogatunku *B. burgdorferi* s.l., który wywołał chorobę, dlatego też łatwo zauważyć pewne rozbieżności w późniejszych fazach choroby pomiędzy Europą a Ameryką Północną. *B. afzelii* przypisuje się w głównej mierze wywoływanie zanikowego zapalenia skóry (ACA, *acrodermatitis chronica atrophicans*). Infekcje *B. garinii* i *B. bavariensis* przeważnie prowadzą do postaci neurologicznej choroby (NB, neuroborelioza), natomiast *B. burgdorferi* s.s. wywołuje głównie boreliozowe zapalenie stawów (LA, *Lyme arthritis*). *B. spielmanii* do tej pory wyizolowano jedynie ze zmian skórnych [12, 17, 69].

2. Charakterystyka wybranych antygenów *B. burgdorferi* s.l.

Najlepiej poznanymi antygenami *B. burgdorferi* s.l. są te znajdujące się na powierzchni komórki oraz białka budujące wici. Białka powierzchniowe *B. burgdorferi* s.l. dzielą się na dwie główne grupy: lipoproteiny, które są zakotwiczone w błonie zewnętrznej poprzez znajdujące się na N-terminalnym końcu ugrupowania lipidowe oraz integralne białka błony zewnętrznej (OMP, integral outer membrane proteins) zakotwiczone za pomocą domen transbłonowych [38].

Krętki *B. burgdorferi* s.l. charakteryzują się bardzo wysoką zmiennością sekwencji aminokwasowej antygenów powierzchniowych, wśród których przeważają silnie immunogenne lipoproteiny. Większość z nich jest kodowana przez liczne plazmidy. Budowa antygenowa *B. burgdorferi* s.l. zmienia się w zależności od warunków środowiska. Dlatego też inne białka są eksponowane na powierzchni krętka podczas bytowania w organizmie kleszcza, a inne we wnętrzu ssaczego żywiciela. Zmiana ekspresji poszczególnych genów zachodzi w związku ze zmianą temperatury oraz wartości pH otoczenia, w którym znajduje się krętek. Lipoproteiny powierzchniowe odgrywają ważną rolę w wirulencji oraz w interakcjach pomiędzy żywicielem a patogenem, są również zaangażowane w unikanie odpowiedzi immunologicznej żywiciela. Inna grupa dobrze poznanych antygenów to białka budujące wici, które są wytwarzane przez krętki bez względu na miejsce ich bytowania [38, 39, 62, 65]. Krótką charakterystykę wybranych antygenów *B. burgdorferi* s.l. przedstawiono poniżej oraz zebrano w tabeli II.

VlsE

Białko VlsE (variable major protein-like sequence expressed) to lipoproteina kodowana przez liniowy plazmid lp28-1. Locus zajmowane przez ten gen składa się z miejsca ekspresyjnego *vlsE* oraz 15 kaset wyciszających, w obrębie, których znajduje się po sześć regionów zmiennych (VR1 do VR6) rozdzielonych przez regiony niezmienne (IR). Szacuje się, iż masa cząsteczkowa VlsE *B. burgdorferi* s.l. wynosi około 35 kDa [41, 82]. W trakcie trwania zakażenia białko VlsE podlega zmienności antygenowej, definiowanej jako dziedziczna i odwracalna zmienność struktury antygenowej, która występuje podczas przebiegu infekcji w tempie wyższym, niż można się było spodziewać w przypadku standardowych mechanizmów rekombinacji lub mutacji. Podczas infekcji rearanżacje te prowadzą do powstania

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Tabela II
Charakterystyka wybranych antygenów *B. burgdorferi* s.l.

Etap cyklu życiowego *Bb*sl	Antygen	Umiejscowienie genu	Masa	Dodatkowe informacje	Źródło
Bytowanie w organizmie kleszcza	OspA	Plazmid lp54	31 kDa	• Niezbędne dla przetrwania *Bb*sl w ciele kleszcza • Składnik jedynej szczepionki przeciwko boreliozie	[2, 19, 66]
	OspB	Plazmid lp54	34 kDa	• Niezbędne dla przetrwania *Bb*sl w organizmie kleszcza	
Transmisja z kleszcza do organizmu ssaka	OspC	Plazmid cp26	20–25 kDa	• Niezbędne do transmisji *Bb*sl z organizmu kleszcza do ssaka • Zakonserwowane fragmenty na N i C-końcu	[3, 8, 66, 72]
Bytowanie w organizmie ssaka	DbpA/B	Plazmid lp54	20–21 kDa	• Odpowiada za adhezję *Bb*sl do komórek gospodarza – wiąże dekorynę • Bierze udział w rozprzestrzenianiu się i utrzymaniu krętka w organizmie ssaka	[18, 29, 57]
	VlsE	Plazmid lp28-1	35 kDa	• Locus złożone z miejsca ekspresyjnego *vlsE* oraz 15 kaset wyciszających • Bierze udział w unikaniu odpowiedzi immunologicznej gospodarza (zmienność antygenowa) • Posiada wysoko zakonserwowany region IR6 (pepC6)	[41, 82]
	BmpA	Chromosom	36 kDa	• Odpowiada za adhezję *Bb*sl do komórek ssaka – wiąże laminę • Wysoce zakonserwowane	[63, 68]
Bytowanie w organizmie kleszcza i ssaka	FlaA	Chromosom	37 kDa	• Buduje otoczkę wici	[15, 35, 75]
	FlaB	Chromosom	41 kDa	• Buduje rdzeń wici • Sekwencja aa wysoko rozpowszechniona wśród szerokiej gamy mikroorganizmów – głównie skrajne fragmenty białka • Wewnętrzny fragment p41/i – unikalny dla *Bb*sl	

*Bb*sl – *Borrelia burgdorferi* sensu lato

miliardów klonów, z których każdy eksprymuje inny wariant VlsE, pozwala to na uniknięcie odpowiedzi układu immunologicznego [56, 82]. VlsE to silny immunogen indukujący produkcję zarówno przeciwciał klasy IgM jak i IgG już na wczesnych etapach infekcji. Głębsze badania nad VlsE wykazały, że w jego obrębie znajduje się wysoko zakonserwowany 26-aminokwasowy region (IR6). Dodatkowo wykazano, że to właśnie ten fragment białka VlsE jest głównym antygenem stymulującym produkcję przeciwciał klasy IgG [27, 44, 82].

DbpA i DbpB

Białka DbpA oraz DbpB (decorin binding protein A/B) kodowane są przez operon *dbpB/A* zlokalizowany na plazmidzie lp54 [29]. Ich produkcja w komórce krętka wzrasta wraz z spadkiem pH oraz wzrostem temperatury do 37°C, a więc wraz z zmianami warunków jakie towarzyszą transmisji patogenu z kleszcza do organizmu ssaka. Białka te odpowiadają za adhezję bakterii do tkanek żywiciela poprzez wiązanie dekoryny – proteoglikanu oddziałującego z włóknami kolagenowymi. Wykazano, że DbpA i DbpB odgrywają kluczową rolę w późniejszych etapach infekcji: rozprzestrzenianiu się oraz utrzymaniu krętka w organizmie ssaka. O ich ogromnej roli w rozwoju zakażenia może świadczyć fakt, że szczepy *B. burgdorferi* s.l. pozbawione plazmidu lp54 są awirulentne [18, 57]. Dodatkowo białko DbpA jest silnym immunogenem, który indukuje wytwarzanie przeciwciał klasy IgG [27].

BmpA

Gen *bmpA* zlokalizowany jest na chromosomie *B. burgdorferi* s.l. w sąsiedztwie trzech genów paralogicznych o nazwach *bmpB, bmpC* i *bmpD*, które razem tworzą złożony operon [68]. Białko BmpA (basic membrane protein A) znane również jako P39 umiejscowione jest w błonie komórkowej bakterii, a jego masa cząsteczkowa wynosi około 36 kDa. Proteina ta charakteryzuje się wysokim stopniem zakonserwowania sekwencji aminokwasowej [63]. Wyniki badań wskazują, że białko BmpA wiąże składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, głównie laminy, co umożliwia krętkom adhezję do komórek ssaka. Wykryto, że domena wiążąca obejmuje osiemdziesiąt C-końcowych aminokwasów białka [73]. Uważa się, że białko to może odgrywać znaczącą rolę w indukowaniu odpowiedzi immunologicznej w komórkach błony maziowej torebki stawowej, co prowadzi do rozwoju LA [81].

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

OspA i OspB

Białka OspA i OspB są eksponowanymi na powierzchni komórek *B. burgdorferi* s.l. lipoproteinami odpowiednio o masie 31 kDa i 34 kDa. Transkrybowane są z pojedynczego promotora umiejscowionego na liniowym plazmidzie lp54 [19, 34, 38]. Produkcja białek OspA i OspB zachodzi głównie, gdy bakteria znajduje się w jelitach kleszczy, ponieważ białka te są konieczne do przetrwania krętka w jego organizmie. Ekspresja regionu promotora *ospA*/*B* zanika, gdy kleszcz zaczyna żerować, jednak OspA jest wciąż obecne na powierzchni komórek znajdujących się w organizmie ssaka. Świadczą o tym przeciwciała skierowane przeciwko temu antygenowi wykryte w surowicy pacjentów nawet podczas późnej fazy infekcji [66]. Białko OspA, było składnikiem jedynej szczepionki przeciwko boreliozie stosowanej w Stanach Zjednoczonych do 2002 roku [2].

OspC

Lipoproteina OspC o masie cząsteczkowej wynoszącej, w zależności od genogatunku krętka, od 20 do 25 kDa. Kodowana jest przez locus umiejscowione na plazmidzie cp26. Białko OspC jest niezbędne do transmisji *B. burgdorferi* s.l. z organizmu kleszcza do ssaka. Jego produkcja następuje co najmniej po 24 godz. od momentu rozpoczęcia pobierania krwi przez kleszcza (szczyt przypada po 48 godz.), co tłumaczy dlaczego zakażenie ssaka przez krętki odbywa się z opóźnieniem. Po pobraniu krwi przez pajęczaka zastępuje ono białko OspA produkowane podczas bytowania krętka wewnątrz organizmu kleszcza [8, 66, 72]. OspC charakteryzuje się bardzo dużym zróżnicowaniem sekwencji aminokwasowej pomiędzy genogatunkami *B. burgdorferi* s.l. Dotychczas, wśród izolatów pochodzących zarówno z Europy jak i z Ameryki Północnej określono 16 serotypów białka OspC, w związku z tym OspC jest często stosowany do typowania szczepów *B. burgdorferi* s.l. [76, 78]. W sekwencji aminokwasowej antygenu OspC zakonserwowane fragmenty zlokalizowano jedynie na jego końcach (aminokwasy od 11 do 30 na N-końcu, oraz 10 terminalnych reszt aminokwasowych z C-końca) [3, 4, 51]. OspC jest jednym z najbardziej immunogennych białek we wczesnej fazie zakażenia *B. burgdorferi* s.l. Swoiste wobec OspC przeciwciała IgM pojawiają się wcześniej niż te skierowane przeciwko antygenowi VlsE [2, 51, 72]. Wiele badań wykazało, że OspC (obok białek wici) jest głównym antygenem wykorzystywanym do wykrywania swoistych przeciwciał IgM [27, 77].

FlaA i FlaB

Rzęski *B. burgdorferi* s.l. zbudowane są z dwóch rodzajów białek (FlaA oraz FlaB) kodowanych przez geny zlokalizowane na chromosomie. Białko FlaB (41 kDa) buduje rdzeń natomiast FlaA (37 kDa) stanowi otoczkę wici. W niektórych przypadkach powierzchnia rzęski może być tylko w niewielkim stopniu pokryta białkiem FlaA, pozostawiając odsłoniętym jej rdzeń. Spowodowane jest to faktem, iż gen *fla*A ulega ekspresji na znacznie niższym poziomie, niż ten kodujący białko FlaB [15, 22]. Porównania sekwencji aminokwasowej białka FlaB wykazały, że jest ona wysoce rozpowszechniona wśród szerokiej gamy mikroorganizmów (np. *Bacillus subtilis*, *Salmonella* typhimurium), w szczególności dotyczy to skrajnych fragmentów antygenu. Natomiast wewnętrzna część białka FlaB (fragment p41/i obejmujący aminokwasy od 129 do 251), cechuje się większą specyficznością dla *B. burgdorferi* s.l. [35, 75].

3. Diagnostyka boreliozy

Rozpoznania choroby z Lyme dokonuje się na podstawie objawów klinicznych, które są następstwem ugryzienia przez kleszcza. Najbardziej charakterystycznym z nich jest rumień wędrujący. Jego obecność jest zwykle wystarczająca do postawienia prawidłowej diagnozy. Niestety EM, jak wspomniano wcześniej, występuje jedynie u 40–80% pacjentów, więc nie zawsze istnieje możliwość rozpoznania boreliozy na tej podstawie. Dodatkowym utrudnieniem w rozpoznaniu są alergeny obecne w ślinie kleszcza, które wprowadzane do organizmu żywiciela mogą powodować miejscowy proces zapalny, przybierający postać różnej wielkości zaczerwienienia, nie świadczącego o przebiegu boreliozy. W związku z tym konieczna jest konsultacja z doświadczonym lekarzem, który będzie w stanie odróżnić EM od zwykłego odczynu zapalnego. Inne symptomy choroby z Lyme nie są wystarczająco charakterystyczne aby umożliwić na ich podstawie rozpoznanie choroby, dlatego bardzo ważną rolę odgrywa tutaj diagnostyka laboratoryjna. Dzieli się ona na dwie główne grupy: metody bezpośrednie oraz pośrednie. Metody bezpośrednie polegają na identyfikacji całej komórki patogenu, jego antygenów lub materiału genetycznego w próbach biologicznych. Natomiast metody pośrednie polegają na wykrywaniu swoistych przeciwciał w surowicy pacjenta [2, 26, 40, 52, 59, 67]. W laboratoryjnej diagnostyce boreliozy materiałem badanym może być pobrana od pacjenta surowica krwi, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn maziowy lub wycinek tkanki (np. skóry) [45, 59].

Jedną z bezpośrednich metod diagnostycznych jest laboratoryjna hodowla krętków, w której materiał wyjściowy stanowią próbki pobrane od pacjentów (bioptaty skóry, płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn stawowy, krew). Mimo 100% specyficzności podejście to nie jest wykorzystywane w rutynowej diagnostyce boreliozy, ze względu na wysokie wymagania wzrostowe krętków

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

oraz długi czas potrzebny na przeprowadzenie testu (jednoznacznie negatywny wynik można stwierdzić dopiero po 5 tygodniach hodowli). Dodatkowo test ten nie charakteryzuje się wysoką czułością, która w znaczącym stopniu uzależniona jest od rodzaju próbki stanowiącej materiał wyjściowy. Skuteczność wyżej wymienionej metody dla bioptatów pobranych z miejsca występowania EM waha się między 40% a 90% i między 20% a 60% dla próbek pobranych ze zmian ACA [33, 45, 79]. Dużo niższą czułość (10–26%) otrzymuje się dla płynu mózgowo-rdzeniowego. W przypadku hodowli z krwi wskaźnik ten wynosi zaledwie 9% dla pacjentów z Europy i wzrasta nawet do 40% przy użyciu większych objętości krwi u pacjentów z EM w USA. Płyn maziowy stanowi materiał wyjściowy, dla którego skuteczność tego podejścia diagnostycznego jest najniższa – wynik testu w tym przypadku prawie nigdy nie jest pozytywny. Z wyżej wymienionych powodów metoda ta jest głównie wykorzystywana jako narzędzie uzupełniające proces diagnostyczny u pacjentów z dysfunkcjami układu immunologicznego [45, 79].

Detekcja DNA *B. burgdorferi* s.l. przy pomocy łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, polymerase chain reaction) możliwa jest w zróżnicowanym materiale klinicznym, takim jak wycinki skórne, płyn mózgowo-rdzeniowy oraz płyn stawowy. Zastosowanie reakcji PCR jest najbardziej wskazane we wczesnych etapach choroby, gdy organizm nie wytworzył jeszcze swoistych przeciwciał. Należy pamiętać, że metoda ta nie różnicuje materiału genetycznego pochodzącego od żywych i martwych patogenów, a więc nie pozwala na stwierdzenie czy ma miejsce aktywne zakażenie, co jest jej znaczącą wadą. Czułość metody PCR zależy od liczebności krętków w organizmie żywiciela, stadium choroby oraz od rodzaju materiału klinicznego. Wykorzystanie reakcji PCR jest najbardziej skuteczne w przypadku płynu stawowego (czułość na poziomie 80%), natomiast dla materiału pochodzącego ze zmian skórnych czułość jest nieco niższa i wynosi 60–70%. Dane dotyczące czułości w wykrywaniu DNA *B. burgdorferi* s.l. w płynie mózgowo-rdzeniowym są rozbieżne i wahają się w granicach 10–30% [2, 70, 79].

Ze względu na duże ograniczenia różnych metod bezpośrednich, w rutynowej laboratoryjnej diagnostyce boreliozy najczęściej wykorzystywane są testy pośrednie bazujące na wykrywaniu przeciwciał klasy IgM i IgG. W obecnych badaniach serologicznych rekomendowane jest dwuetapowe podejście diagnostyczne, które po raz pierwszy zostało wprowadzone w 1993 roku w USA przez kilka tamtejszych agencji ochrony zdrowia [11]. W Polsce ten sposób diagnostyki zalecany jest przez Polskie Towarzystwo Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych od 2007 roku. Pierwszym etapem tego podejścia diagnostycznego jest czuły test immunoenzymatyczny (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay). Jeżeli test ELISA da wynik dodatni lub wątpliwy jako test drugiego stopnia (potwierdzający) stosuje się Western blot (WB) [2, 45].

Testy ELISA ze względu na swoją wysoką czułość pełnią rolę testów przesiewowych. Oparte są one głównie na całkowitych lizatach komórkowych krętków. Niestety takie preparaty antygenowe nie mają wysokiej specyficzności ze względu na obecność w lizacie *B. burgdorferi* s.l. antygenów reagujących krzyżowo, wśród których wymienia się np. białka wstrząsu termicznego czy białka wici, które powszechnie występują w komórkach innych mikroorganizmów. Ze względu na niezbyt wysoką specyficzność testy ELISA charakteryzują się nadrozpoznawalnością, dlatego dodatni wynik nie pozwala na postawienie ostatecznej diagnozy [6, 42]. Z tego też powodu konieczne jest wykonywanie testu potwierdzającego drugiego stopnia, którym jest Western blot, charakteryzujący się dużo większą specyficznością. Związane jest to z możliwością rozróżnienia poszczególnych pasm białkowych. W celu osiągnięcia jak najlepszej użyteczności diagnostycznej w teście WB wytypowano najbardziej reaktywne i charakterystyczne antygeny znajdujące się w lizacie komórkowym krętków. Ustalono, że dla wykrywania przeciwciał klasy IgM, najbardziej wiarygodne są testy, w których pod uwagę bierze się trzy pasma antygenowe (p23 [OspC], p39 [BmpA] i p41 [FlaB]). Taki test interpretowany jest jako pozytywny, gdy zareagują co najmniej dwa z nich [16]. Natomiast do wykrywania przeciwciał IgG, najlepszą specyficzność i czułość otrzymuje się biorąc pod uwagę 10 różnych antygenów (tj. p18 [DbpA], p23[OspC], p28, p30, p39 [BmpA], p41 [FlaB], p45, p58 [fragment białka Hsp60], p66 i p93). Test jest określany jako dodatni, gdy pojawi się co najmniej 5 z 10 oczekiwanych pasm [14, 55].

4. Problemy w serodiagnostyce boreliozy

Mimo, że to diagnostyka serologiczna stanowi podstawę w rozpoznaniu boreliozy nie jest ona wolna od problemów, z którymi codziennie boryka się wiele laboratoriów diagnostycznych. Czułość tej metody w dużym stopniu zależy od czasu trwania choroby. Jako pierwsze w organizmie żywiciela pojawiają się przeciwciał klasy IgM, ma to miejsce po około 2 tygodniach od zakażenia, natomiast produkcja przeciwciał klasy IgG rozpoczyna się zwykle po 3–6 tygodniach i w miarę rozwoju choroby zastępują one przeciwciała klasy IgM. Jednak nie u wszystkich pacjentów swoiste immunoglobuliny IgM zanikają w ciągu kilku miesięcy od momentu infekcji. W niektórych przypadkach utrzymują się one we krwi nawet przez kilkanaście lat. Dodatkowo przeciwciała IgM mogą być wykrywane zarówno podczas reaktywacji choroby oraz w przypadku ponownego zakaże-

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

nia *B. burgdorferi* s.l. Dlatego też odróżnienie świeżej infekcji od przewlekłej jedynie w oparciu o stwierdzenie obecności swoistych IgM jest niemożliwe [1, 21].

Z powodu czasu koniecznego na wytworzenie przez organizm swoistych przeciwciał w pierwszym etapie infekcji (tzw. okienko serologiczne) wyniki badań serologicznych są często negatywne [13, 37, 72]. Tylko u 10–50% pacjentów z wczesną boreliozą (EM występującym krócej niż 7 dni) są wykrywalne przeciwciała skierowane przeciwko *B. burgdorferi* s.l. W miarę trwania infekcji odpowiedź immunologiczna stopniowo dojrzewa, w wyniku czego czułość testów serologicznych podczas późniejszych stadiów choroby znacząco wzrasta. W przypadkach późnej fazy choroby swoiste przeciwciała IgG są wykrywane niemal u wszystkich badanych pacjentów [30, 31, 79].

Kolejnym z ograniczeń jest różny wzór ekspresji genów krętka w kleszczu i w organizmie ssaka [24]. Dodatkowo różnorodność białek powierzchniowych jest zwiększana poprzez zjawisko zmienności antygenowej, które jest jednym ze sposobów unikania odpowiedzi immunologicznej przez *B. burgdorferi* s.l. Oznacza to, że przeciwciała swoiste dla jednej postaci antygenu nie będą reagować z innymi jego wariantami [56].

Innym problemem jest uzyskanie lizatów komórkowych, zawierających wszystkie najbardziej immunogenne antygeny, ponieważ geny kodujące niektóre z nich ulegają ekspresji jedynie *in vivo* [24, 65]. Dodatkowo produkcja niektórych białek zanika poprzez utratę kodujących je plazmidów w wyniku wielokrotnego pasażowania. Skład antygenowy lizatów komórkowych zależy również od fazy wzrostu krętków w jakim zostały one zebrane. Wyżej wymienione czynniki są powodem problemów związanych ze standaryzacją natywnych preparatów antygenowych, co znacząco wpływa na powtarzalność wyników uzyskiwanych z wykorzystaniem testów diagnostycznych na nich opartych [13, 43, 56, 62].

Ogromna różnorodność genogatunków zaliczanych do kompleksu *B. burgdorferi* s.l. również nie pozostaje bez wpływu na skuteczność obecnej diagnostyki boreliozy. Sekwencje aminokwasowe większości najbardziej immunogennych białek są nisko zakonserwowane wśród *B. burgdorferi* s.l., a co za tym idzie wykorzystanie w serodiagnostyce jako preparatów antygenowych lizatów komórkowych jednego genogatunku niesie ze sobą ryzyko uzyskania wyniku fałszywie ujemnego. Problem ten w szczególności dotyczy Europy, gdzie występuje aż 5 patogennych dla ludzi przedstawicieli *B. burgdorferi* s.l. Jego rozwiązaniem mogłoby być wykorzystanie w pojedynczym teście diagnostycznym lizatów komórkowych kilku genogatunków. Zwiększyłoby to czułość stosowanych testów, jednakże spowodowałoby również znaczący wzrost kosztów rutynowej diagnostyki [45, 78].

Komórki *B. burgdorferi* s.l. wytwarzają wiele białek, które są homologiczne wśród drobnoustrojów, co jest przyczyną występowania częstych reakcji krzyżowych. Do antygenów tych zaliczają się wszechobecne białka szoku termicznego oraz flagelina, która jest białkiem budującym wici. Fałszywie dodatnie wyniki można otrzymać w przypadku pacjentów zakażonych takimi patogenami jak: wirus Epsteina-Barr, *Treponema pallidum*, *Borrelia hermsii*, *Borrelia recurrenitis,* cytomegalowirus oraz cierpiących na reumatoidalne zapalenie stawów [6, 30, 43].

5. Wykorzystanie białek rekombinantowych i peptydów syntetycznych w diagnostyce boreliozy

Intensywny rozwój metod biologii molekularnej i inżynierii genetycznej umożliwił otrzymywanie antygenów rekombinantowych, które stanowią nowe narzędzia diagnostyczne. Antygeny rekombinantowe są to białka wytwarzane metodami biotechnologicznymi, które mogą zawierać dodatkowe domeny fuzyjne wpływające na ich rozpuszczalność lub umożliwiające ich łatwiejsze oczyszczanie czy detekcję. Białka takie stanowią alternatywne źródło antygenów, które można wykorzystać do opracowania nowych testów serologicznych. Jednakże, aby testy serodiagnostyczne oparte na białkach rekombinantowych miały jak największą skuteczność należy wykorzystać w nich starannie wyselekcjonowane antygeny lub ich fragmenty. Dostępne w bazach danych sekwencje aminokwasowe białek *B. burgdorferi* s.l. oraz narzędzia bioinformatyczne umożliwiają wytypowanie najbardziej immunogennych oraz zakonserwowanych fragmentów poszczególnych antygenów. Wykorzystanie jedynie wyselekcjonowanych fragmentów białek może zdecydowanie ograniczyć częstość występowania reakcji krzyżowych, co znacznie ułatwi interpretację wyników testów serologicznych, ponadto biotechnologiczna produkcja antygenów może pozwolić na otrzymanie preparatów antygenowych zawierających białka wytwarzane przez krętki jedynie *in vivo*. Inną możliwością jest wykorzystanie w pojedynczym teście diagnostycznym białek pochodzących od kilku genogatunów *B. burgdorferi* s.l. Bardzo prawdopodobne jest, iż takie podejście umożliwi prawidłowe rozpoznanie boreliozy, bez względu na to jakim genogatunkiem *B. burgdorferi* s.l. nastąpiło zakażenie. Łatwiejszą standaryzację oraz większą skuteczność testów można osiągnąć konstruując antygeny chimeryczne, które powstają na skutek połączenia dwóch lub większej liczby genów w jeden gen fuzyjny. Ekspresja genu fuzyjnego prowadzi do powstania produktu chimerycznego, który łączy cechy białek kodowanych przez pojedyncze geny będące częścią takiego połączenia.

W związku z dużymi nadziejami jakie pokłada się w zastosowaniu antygenów rekombinantowych

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

i chimerycznych laboratoria na całym świecie prowadzą badania naukowe dotyczące oceny przydatności tych białek w rozpoznaniu różnych faz boreliozy (Tab. III). Obecnie na rynku dostępne są testy ELISA III generacji (zestawy diagnostyczne *Borrelia* IgM oraz *Borrelia* IgG firmy Biomedica, *Borrelia burgdorferi* IgG Recombinant Antigens firmy GenWay Biotech) oraz testy Immunoblot i Line Immunoblot (EUROLINE Borrelia firmy Euroimmiun, *recom*Line *Borrelia* IgG i *recom*Line *Borrelia* IgM firmy Microgen Diagnostic) oparte na antygenach rekombinantowych [27, 45].

W licznych laboratoriach na całym świecie prowadzone są badania mające na celu stworzenia jednoetapowego testu diagnostycznego, opartego na tańszej

Tabela III
Użyteczność białek rekombinantowych w diagnostyce boreliozy

Nazwa białka	Pochodzenie preparatu antygenowego	Test diagnostyczny	Wyniki	Źródło
VlsE (*B. burgdorferi* s.s. B31)	Priokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki *E. coli* szczep BL21	IgG ELISA	• Czułość niezależnie od czasu trwania choroby: 66% (184/280)* • Czułość w fazie wczesnej (EM): 44% (35/80)* • Czułość w fazie wczesnej po leczeniu: 59% (63/106)* • Czułość w fazie wczesnej rozsianej (wczesna NB): 100% (15/15)* • Czułość w fazie wczesnej rozsianej (wczesna NB) po leczeniu: 64% (7/11)* • Czułość w fazie późnej (LA): 97% (32/33)* • Czułość w fazie późnej (LA) po leczeniu: 88% (21/24)* • Czułość w fazie późnej (NB): 100% (11/11)* • Specyficzność: 99% (6/553)*	[4]
		IgM ELISA	• Czułość niezależnie od czasu trwania choroby: 36% (102/280)* • Czułość w fazie wczesnej (EM): 19% (15/80)* • Czułość w fazie wczesnej po leczeniu: 43% (46/106)* • Czułość w fazie wczesnej rozsianej (wczesna NB): 73% (11/15)* • Czułość w fazie wczesnej rozsianej (wczesna NB) po leczeniu: 55% (6/11)* • Czułość w fazie późnej (LA): 39% (13/33)* • Czułość w fazie późnej (LA) po leczeniu: 42% (10/24)* • Czułość w fazie późnej (NB): 9% (1/11)* • Specyficzność: 99% (6/553)*	[4]
pepC6	Synteza chemiczna	IgM/IgG ELISA	• Czułość w fazie wczesnej zlokalizowanej: 74% (29/39)* • Czułość po leczeniu: 90% (35/39)* • Czułość w fazie wczesnej rozsianej (wczesna NB): 95% (19/20)* • Czułość w fazie późnej (LA): 100% (49/49)* • Czułość w fazie późnej (NB): 100% (10/10)* • Specyficzność: 99% (2/176)*	[43]
pepC6	Synteza chemiczna	IgM/IgG ELISA (test komercyjny)	• Czułość niezależnie od czasu trwania choroby: 75% (426/569)* • Czułość w fazie wczesnej (EM): 66,5% (268/403)* • Czułość w fazie wczesnej rozsianej (wczesna NB): 88,6% (39/44)* • Czułość w fazie późnej (NB): 100% (8/8)* • Czułość w fazie późnej (LA): 98,2% (112/114)* • Specyficzność: 99,5% (2/366)*	[80]
DbpA (*B. burgdorferi* s.s. ia)	Prokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki *E. coli* szczep M15	IgG ELISA	• Czułość w fazie późnej (NB): 43% (6/14)* • Czułość w fazie późnej (LA): 60% (9/15)*	[32]
DbpA (*B. afzelii* A91)	Prokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki *E. coli* szczep M15	IgG ELISA	• Czułość w fazie późnej (NB): 50% (7/14)* • Czułość w fazie późnej (LA): 80% (12/15)*	[32]
DbpA (*B. garinii* 40)	Prokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki *E. coli* szczep M15	IgG ELISA	• Czułość w fazie późnej (NB): 50% (7/14)* • Czułość w fazie późnej (LA): 20% (3/15)*	[32]

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Tabela III. C.d.

Nazwa białka	Pochodzenie preparatu antygenowego	Test diagnostyczny	Wyniki	Źródło
OspC (*B. burgdorferi* s.s. 297)	Prokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki *E. coli* szczep SR2	IgM ELISA	• Czułość w fazie wczesnej (zlokalizowana i rozsiana): 53% (40/75)* • Czułość w fazie wczesnej zlokalizowanej: 25% (4/16)* • Czułość w fazie wczesnej rozsianej: 61% (36/59)* • Czułość w fazie wczesnej (zlokalizowana i rozsiana) po leczeniu: 73% (55/75)* • Czułość w fazie późnej (zapalenie opon mózgowych lub porażenie twarzy): 72% (29/40)* • Czułość w fazie późnej (LA): 45% (22/49)* • Czułość w fazie późnej (NB): 20% (5/25)* • Specyficzność: 98% (2/106)*	[20]
		IgG ELISA	• Czułość w fazie wczesnej (zlokalizowana i rozsiana): 33% (25/75)* • Czułość w fazie wczesnej zlokalizowanej: 31% (5/16)* • Czułość w fazie wczesnej rozsianej: 34% (20/59)* • Czułość w fazie wczesnej (zlokalizowana i rozsiana) po leczeniu: 49% (37/75)* • Czułość w fazie późnej (zapalenie opon mózgowych lub porażenie twarzy): 65% (26/40)* • Czułość w fazie późnej (LA): 84% (41/49)* • Czułość w fazie późnej (NB): 36% (9/25)* • Specyficzność: 86% (15/106)*	[20]
OspC (*B. afzelii* A91)	Prokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki *E. coli* szczep M15	IgM ELISA	• Czułość w fazie wczesnej: 65% (11/17)* • Czułość po leczeniu: 65% (11/17)*	[60]
		IgG ELISA	• Czułość w fazie wczesnej: 53% (9/17)* • Czułość po leczeniu: 71% (12/17)*	[60]
OspC (*B. garinii* 40)	Prokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki *E. coli*IgG szczep M15	IgM ELISA	• Czułość w fazie wczesnej: 41% (7/17)* • Czułość po leczeniu: 47% (8/17)*	[60]
		ELISA	• Czułość w fazie wczesnej: 18% (3/17)* • Czułość po leczeniu: 36% (6/17)*	[60]
OspC (*B. burgdorferi* s.s. ia)	Prokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki *E. coli* szczep M15	IgM ELISA	• Czułość w fazie wczesnej: 12% (2/17)* • Czułość po leczeniu: 18% (3/17)*	[60]
		IgG ELISA	• Czułość w fazie wczesnej: 6% (1/17)* • Czułość po leczeniu: 6% (1/17)*	[60]
pepC10	Synteza chemiczna	IgM ELISA	• Czułość niezależnie od czasu trwania choroby: 38% (107/280)* • Czułość w fazie wczesnej (EM): 40% (32/80)* • Czułość w fazie wczesnej rozsianej (wczesna NB): 53% (8/15)* • Czułość w fazie wczesnej rozsianej (wczesna NB) po leczeniu: 36% (4/11)* • Czułość w fazie późnej (LA): 9% (3/30)* • Czułość w fazie późnej (LA) po leczeniu: 10% (2/22)* • Czułość w fazie późnej (NB): 18% (2/9)* • Specyficzność: 99% (6/553)*	[4]
pepC10	Synteza chemiczna	IgM ELISA	• Czułość w fazie wczesnej (EM): 41,2 % (40/97)* • Czułość w fazie późnej: 10% (2/20)*	[3]
		IgG ELISA	• Czułość w fazie wczesnej (EM): 16,3 % (16/97)* • Czułość w fazie późnej: 10% (2/20)*	[3]
OspC1	Synteza chemiczna	IgM ELISA	• Czułość w fazie wczesnej (EM): 48,5% (47/97)* • Czułość w fazie późnej: 15% (3/20)*	[3]
		IgG ELISA	• Czułość w fazie wczesnej (EM): 24,5% (24/97)* • Czułość w fazie późnej: 25% (5/20)*	[3]

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

Tabela III. C.d.

Nazwa białka	Pochodzenie preparatu antygenowego	Test diagnostyczny	Wyniki	Źródło
OspA-p93 (62 kDa) (*B. burgdorferi* s.s. B31)	Prokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki *E. coli* szczep BL21(DE3) pLysS lub B834 (DE3)	IgM/IgG ELISA	• Czułość w fazie wczesnej: 10% (2/20)* • Czułość w fazie późnej: 56% (9/16)*	[28]
OspA-p93 (97 kDa) (*B. burgdorferi* s.s. B31)	Prokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki *E. coli* szczep BL21(DE3) pLysS lub B834 (DE3)	IgM/IgG ELISA	• Czułość w fazie wczesnej: 50% (49/99)* • Czułość w fazie późnej: 89% (47/53)* • Specyficzność w przypadku choroby autoimmunologicznej (reumatoidalne zapalenie stawów/toczeń rumieniowaty układowy): 97% (1/40)* • Specyficzność w przypadku kiły: 78% (6/27)* • Specyficzność w przypadku ludzi zdrowych z terenów endemicznych: 85% (3/20)* • Specyficzność w przypadku ludzi zdrowych z terenów nieendemicznych: 100% (0/20)*	[28]
OspB-Fla (43 kDa) (*B. burgdorferi* s.s. B31)	Prokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki *E. coli* szczep BL21(DE3) pLysS lub B834 (DE3)	IgM/IgG ELISA	• Czułość w fazie wczesnej 28% (11/47)* • Czułość w fazie późnej: 48% (10/21)*	[28]
OspB-OspC--Fla (64 kDa) (*B. burgdorferi* s.s. B31)	Prokariotyczny system ekspresyjny Tabora-Studiera; komórki *E. coli* szczep BL21 (DE3) pLysS lub B834 (DE3)	IgM/IgG ELISA	• Czułość fazie wczesnej: 62% (86/139)* • Czułość w fazie późnej: 87% (60/69)* • Specyficzność w przypadku choroby autoimmunologicznej (reumatoidalne zapalenie stawów/toczeń rumieniowaty układowy): 92% (4/50)* • Specyficzność w przypadku kiły: 93% (4/56)* • Specyficzność w przypadku ludzi zdrowych z terenów endemicznych: 84% (5/30)* • Specyficzność w przypadku ludzi zdrowych z terenów nieendemicznych: 100% (0/28)*	[28]

* (liczba surowic seropozytywnych / liczba surowic przebadanych)

i łatwiejszej w interpretacji technice ELISA. Nowe narzędzia diagnostyczne jakimi są antygeny rekombinantowe i białka chimeryczne rozbudzają nadzieję na osiągnięcie tego celu. Jednak aby takie testy wykazywały się wysoką czułością i specyficznością należy wykorzystać w nich starannie wyselekcjonowane antygeny lub ich fragmenty. W związku z tym wielu naukowców prowadziło badania naukowe mające na celu przetestowanie skuteczności testów serodiagnostycznych opartych na poszczególnych antygenach *B. burgdorferi* s.l. lub ich fragmentach.

Antygen VlsE ze względu na swoją wyjątkowo silną immunogenność oraz obecność w sekwencji zakonserwowanego fragmentu, był obiektem zainteresowania wielu naukowców. W badaniach przeprowadzonych przez Bacon i wsp. ogólna czułość (niezależnie od czasu trwania infekcji) testów IgG ELISA opartych wyłącznie na antygenie VlsE (ELISA VlsE) wynosiła 66%. Nie był to wynik znacznie odbiegający od tego uzyskanego przy pomocy standardowego testu dwuetapowego (STD 68%). Gdy uwzględniono podział na fazy choroby, wykazano, że czułość testu IgG ELISA VlsE w przypadku pacjentów, u których EM występował od tygodnia, wynosiła zaledwie 16%, za to wzrastała ona znacząco pomiędzy 2 i 4 tygodniem od zakażenia osiągając w tym przedziale czasowym 61%. Podczas późnej fazy choroby testy IgG ELISA VlsE charakteryzowały się niemalże 100% czułością, a specyficzność utrzymywała się na poziomie 98% (90–100% w zależności od grupy kontrolnej pacjentów). W przypadku zastosowania testu ELISA VlsE do wykrywania przeciwciał klasy IgM uzyskano niższą czułość oznaczenia wynoszącą 36%, test ten był również mniej skuteczny w przypadku wykrywania swoistych immunoglobulin w surowicach pacjentów z chorobą trwającą od 2 do 4 tygodni (32%). Natomiast w przypadku wykrywania

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

choroby u pacjentów z EM trwającym od tygodnia, czułość tego testu była skrajnie niska i wynosiła zaledwie 3%. Specyficzność testów IgM ELISA VlsE wynosiła 99%, a więc była nieznacznie wyższa niż w przypadku wykrywania swoistych przeciwciał IgG [4].

Skuteczność pojedynczych testów IgG i IgM ELISA wykorzystujących syntetyczny 26-aminokwasowy peptyd, którego sekwencja oparta jest na regionie IR6 umiejscowionym w obrębie genu *vlsE* została oceniona przez Liang i wsp. (1999). Zespół ten przebadał surowice pobrane od pacjentów we wczesnej fazie choroby, po antybiotykoterapii oraz w fazie przewlekłej. Czułość testów IgM/IgG ELISA C6 we wczesnej fazie choroby wynosiła 74%, w fazie późnej wzrastała do 100%, a dla pacjentów po antybiotykoterapii osiągała 90%. Aby ocenić swoistość testu IgM/IgG ELISA C6 zbadano próby surowicy pobrane od pacjentów z innymi zakażeniami wywołanymi przez krętki, przewlekłymi chorobami autoimmunologicznymi lub chorobami neurologicznymi oraz od osób hospitalizowanych z terenów gdzie choroba z Lyme nie jest endemiczna. Dla tych surowic ogólna specyficzność przeprowadzonych testów ELISA wyniosła 99% [43]. Ponadto, w 2013 roku Wormser i wsp. przeprowadzili badania porównawcze między dostępnym na rynku amerykańskim testem C6 Lyme ELISA kit (Immunetics, Boston, MA, USA), a STD. Wykazano, iż ogólna czułość testu komercyjnego (bez względu na podział na fazy choroby) wynosiła 75%, co znacznie przewyższało czułość STD (50,6%), wykonanego na puli tych samych surowic. Tak duża różnica była wynikiem znacznie wyższej czułości C6 Lyme ELISA kit w przypadku badania surowic pobranych od pacjentów z EM – test komercyjny osiągał skuteczność na poziomie 66,5%, podczas gdy czułość STD wynosiła zaledwie 34,5%. W późnej fazie boreliozy czułość obu testów wzrosła do niemal 100%, jednak test ELISA C6 wciąż wykazał się nieznacznie wyższa skutecznością. Gdy dokonano porównania specyficzność obu testów, wynosiła ona 99,5% dla testu komercyjnego oraz 98,9% dla STD [80].

Kolejnym antygenem, silnie stymulującym produkcję przeciwciał IgG, jest białko DbpA, które cechuje się wysokim zróżnicowaniem sekwencji aminokwasowej wśród genogatunków *B. burgdorferi* s.l. W celu oszacowania wpływu niskiego stopnia zakonserwowania sekwencji niniejszego białka na wyniki otrzymywanych badań serodiagnostycznych wyprodukowano trzy warianty antygenu DbpA pochodzące od patogennych dla ludzi genogatunków *B. burgdorferi* s.l. występujących powszechnie w Europie ($DbpA_{bia}$ – *B. burgdorferi* s.s. ia, $DbpA_{a91}$ – *B. afzelii* A91, $DbpA_{g40}$ – *B. garinii* 40) [32]. Otrzymane preparaty białek rekombinantowych wykorzystane zostały następnie jako podstawa testów immunoenzymatycznych fazy stałej. Przeprowadzone testy ELISA wykazały, iż wszystkie surowice pobrane od pacjentów cierpiących na neuroboreliozę zawierały przeciwciała swoiste przynajmniej wobec jednego wariantu antygenu DbpA (ogólna czułość 100%). Czułością na poziomie 50% cechowały się testy ELISA oparte na białku $DbpA_{a91}$, taki sam wynik osiągnięto dla testu ELISA wykorzystującego antygen $DbpA_{g40}$. Najniższą czułością, na poziomie 43%, w wykrywaniu NB wykazywały się testy ELISA oparte na antygenie DbpA pochodzącym z *B. burgdorferi* s.s. ia. Ogólna skuteczność tych samych testów w przypadku pacjentów z LA była nieco niższa i wynosiła 93%. Tutaj również testy ELISA wykorzystujące białko $DbpA_{a91}$ cechowały się najwyższą czułością (80%), jednak w przeciwieństwie do surowic pobranych od pacjentów z NB w tym przypadku najmniej efektywnym testem był ten oparty na antygenie DbpA pochodzącym od *B. garinii* 40 (20%), którego skuteczność była znacznie niższa niż testu ELISA wykorzysującym $DbpA_{bia}$ (60%). Immunoglobuliny zawarte w surowicach pobranych od chorych w większości przypadków reagowały tylko z jednym z wariantów DbpA, a reakcje krzyżowe pomiędzy białkami były bardzo rzadkie. U pacjentów z wczesną fazą choroby (EM), czułość testów IgG lub IgM ELISA wykorzystujących różne warianty antygenu DbpA była bardzo niska, na poziomie kilku-kilkunastu procent [32].

Dane literaturowe dotyczące skuteczności testów opartych na antygenie OspC w diagnostyce wczesnej boreliozy są bardzo rozbieżne. Przeciwciała klasy IgM przeciwko OspC obserwowano u 25–80% pacjentów z EM [20, 23, 46, 47, 51, 58] oraz u 48–72% pacjentów z NB [20, 51]. Badania wykonane przez Fung i wsp. (1994) wykazują, że prawdopodobnie nawet do 50% pacjentów rozwija odpowiedź przeciwciał klasy IgM skierowaną przeciwko antygenowi OspC w pierwszym tygodniu od zakażenia, a podczas fazy wczesnej rozsianej odsetek ten wzrasta do 60%. Po upływie 2 miesięcy immunoglobuliny te można wykryć w surowicach 60–70% pacjentów [20]. Naukowcy przypuszczają, że rozbieżności te wynikają z wyjątkowo niskiego stopnia zakonserwowania sekwencji antygenu OspC wśród genogatunków. Przeciwciała zawarte w surowicach mogą rozpoznawać epitopy białka ze zróżnicowaną skutecznością w zależności od użytego w teście wariantu antygenu. W celu zweryfikowania tej hipotezy Panelius i wsp. (2002) wykonali testy IgM i IgG ELISA, gdzie każdy z nich oparty był na białku OspC pochodzącym z innego genogatunku *B. burgdorferi* s.l. (*B. afzelii* A91, *B. garinii* 40, *B. burgdorferi* s.s. ia). Jak się spodziewano otrzymano znaczące różnice w czułości testów, w których do wykrywania swoistych przeciwciał zastosowano różne białka OspC. Największą skutecznością wykazywał się test ELISA wykorzystujący białko OspC pochodzące z *B. afzelii* A91. Testy te miały znaczną przewagę bez względu na to jaką klasę przeciwciał wykrywano oraz czy badano surowice pochodzące od

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

pacjentów we wczesnej fazie choroby czy od tych będących po antybiotykoterapii. Drugim co do skuteczności testem był ten wykorzystujący białko OspC pochodzące od *B. garinii* 40. Najmniej obiecujące wyniki uzyskano dla testu ELISA opartego na białku OspC pochodzącym z *B. burgdorferi* s.s. ia, co jest zrozumiałe ponieważ ten genogatunek jest najmniej rozpowszechniony w Europie [60]. W celu rozwiązania problemów związanych z wysokim zróżnicowaniem antygenu OspC wśród genogatunków *B. burgdorferi* s.l., naukowcy przeprowadzili porównanie sekwencji aminokwasowych wyżej wspomnianego białka. W wyniku tej analizy wyodrębniono dwa zakonserwowane fragmenty antygenu OspC, zlokalizowane na jego końcach. Badania Bacon i wsp. (2003) wykazały, że testy IgM ELISA oparte na peptydzie C10 (pepC10, obejmuje 10 aminokwasów z C-końca białka) są skuteczniejsze w wykrywaniu wczesnej fazy choroby niż STD. Czułość testów IgM ELISA pepC10 u pacjentów z EM trwającym nie dłużej niż tydzień była na poziomie 27%. Wzrastała ona w miarę dojrzewania odpowiedzi immunologicznej osiągając 55% w przypadku surowic pobranych od pacjentów w ciągu 2–4 tygodni od wystąpienia EM [4]. Natomiast Arnaboldi i wsp. (2013) wykazali, że testy IgM ELISA oparte na peptydzie OspC1 (20 N-końcowych aminokwasów) wykrywały wczesną boreliozę z czułością 48,5% i specyficznością na poziomie 100%. Zarówno testy IgG ELISA wykorzystujące pepC10 jak i OspC1 wykazywały się znacznie niższą czułość niż te bazujące na wykrywaniu przeciwciał klasy IgM. Czułość testów IgG ELISA OspC1 wynosiła około 25%, natomiast dla testów IgG ELISA pepC10 spadła ona do zaledwie 15%. Uzyskane wyniki pozwoliły na wysnucie wniosku, iż to peptyd OspC1 charakteryzuje się wyższą skutecznością w serodiagnostyce wczesnej boreliozy [3].

Wiele wyników wskazuje na to, iż ciężko otrzymać czuły i specyficzny test immunodiagnostyczny wykorzystujący jedynie pojedynczy antygen. Dlatego też naukowcy próbowali udoskonalić testy diagnostyczne konstruując tzw. białka chimeryczne. W 2000 roku Gomes-Solecki i wsp. skonstruowali 17 białek chimerycznych złożonych z fragmentów antygenów powierzchniowych takich jak: OspA, OspB, OspC, flageliny (FlaB) i białka 93 kDa (p93). Do konstrukcji chimer wykorzystano głównie fragmenty antygenów pochodzące od *B. burgdorferi* s.s. B31, jednak niektóre z nich zawierały sekwencje uzyskane od *B. afzelii* Pko oraz *B. garinii* K48. Po wstępnej selekcji, za pomocą testów WB z wszystkich wyprodukowanych antygenów chimerycznych wytypowano cztery najbardziej obiecujące do dalszych testów serologicznych. Były to białka chimeryczne: OspB-Fla (43 kDa), OspB-OspC-Fla (64 kDa), OspA-p93 (62 kDa) i OspA-p93 (97 kDa). Przydatność skonstruowanych białek chimerycznych oceniono wykonując testy IgM/IgG ELISA. Najbardziej skuteczny w wykrywaniu wczesnej boreliozy był test ELISA wykorzystujący antygen OspB-OspC-Fla (62%). Charakteryzował się on również wysoką czułością w wykrywaniu późnej boreliozy (87%), jednak w tej fazie choroby najskuteczniejszym okazał się test ELISA oparty o białko OspA-p93 (97 kDa) (89%). Badania te wykazały jak ogromny wpływ na skuteczność w wykrywaniu swoistych przeciwciał ma dobór odpowiednich fragmentów białek do tworzenia chimer. Doskonale pokazuje to przykład testów ELISA opartych na białkach chimerycznych OspA-p93 (62 kDa) i OspA-p93 (97 kDa) (różniących się wielkością fragmentu antygenu p93), które charakteryzowały się odmienną czułością w wykrywaniu wczesnej jak i późnej choroby z Lyme. W celu określenia specyficzności testów ELISA opartych na wyżej wymienionych białkach chimerycznych wykorzystano surowice pacjentów cierpiących na kiłę i choroby autoimmunologiczne (reumatoidalne zapalenie stawów lub układowy toczeń rumieniowaty), a także surowice zdrowych ludzi z obszarów, na których choroba ta jest endemiczna oraz z terenów gdzie *B. burgdorferi* s.l. nie występuje. Wspomniane antygeny nie dawały reakcji krzyżowych z próbami surowic pacjentów zamieszkujących obszar, na których borelioza nie występuje endemicznie. Niestety uzyskiwano wyniki fałszywie dodatnie w przypadku surowic pacjentów cierpiących na kiłę, choroby autoimmunologiczne oraz zamieszkujących tereny występowania *B. burgdorferi* s.l. [28].

6. Podsumowanie

Rozpoznanie boreliozy jedynie na podstawie obrazu klinicznego, ze względu na jej zróżnicowaną postać, jest niezmiernie trudne, bądź często nawet niemożliwe. Z tego powodu główną rolę w diagnostyce choroby z Lyme odgrywają badania laboratoryjne. W ich zakresie w ciągu ostatnich lat nastąpił ogromny postęp. Dotyczy to w szczególności metod serologicznych, w których do wykrywania swoistych przeciwciał w surowicach pacjentów wykorzystuje się biotechnologicznie produkowane antygeny rekombinantowe. Ten intensywny rozwój zawdzięczamy nowym rozwiązaniom wykorzystywanym w inżynierii genetycznej, dzięki, którym udało się stworzyć wydajne eukariotyczne i prokariotyczne systemy ekspresji genów. Umożliwiło to łatwe otrzymywanie białek rekombinantowych i chimerycznych stanowiących nowe, obiecujące narzędzia diagnostyczne, będące podstawą do opracowania lepszych testów. Z racji tego, iż czułość dostępnych testów serologicznych w wykrywaniu późnej boreliozy (LA, ACA, NB) jest zadowalająca, głównym celem naukowców jest poprawa skuteczności metod serodiagnostycznych wykorzystywanych w rozpoznawaniu wczesnego

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

etapu choroby z Lyme. Być może pozwoli na to wykorzystanie w testach immunodiagnostycznych starannie wyselekcjonowanych antygenów lub ich fragmentów. Dzięki opracowaniu nowych testów, które umożliwią wczesną i prawidłową identyfikację zakażenia krętkiem, pacjenci szybko zostaną poddani odpowiedniej terapii, co znacznie może ograniczyć rozwój późnych postaci boreliozy. Również ważne jest zwiększenie specyficzności przesiewowych testów ELISA, które obecnie często dają wyniki wątpliwe lub fałszywie dodatnie. Dodatkowo ograniczenie liczby wykonywanych testów potwierdzających WB, znacznie obniżyłoby koszty diagnostyki boreliozy. Wiele czynników wskazuje, że najlepszym rozwiązaniem w rutynowej diagnostyce choroby z Lyme byłoby opracowanie jednoetapowego testu ELISA. Ma on znaczącą przewagę nad WB ze względu na łatwiejszą standaryzację, niższy koszt oraz zdolność ilościowego wykrywania swoistych przeciwciał w próbach pobranych od pacjenta. Niestety wiele doniesień literaturowych wskazuje, iż aby osiągnąć ten cel nie będą wystarczające testy diagnostyczne oparte jedynie na pojedynczych antygenach rekombinantowych, ponieważ ich czułość i specyficzność ze względu na niski stopień zakonserwowania sekwencji wśród genogatunków *B. burgdorferi* s.l. nie jest zadowalająca. Rozwiązaniem może być zastosowanie mieszanek odpowiednich białek rekombinantowych pochodzących od kilku genogatunków krętka lub opracowanie preparatów antygenowych nowej generacji tj. białek chimerycznych złożonych z dobrze wyselekcjonowanych fragmentów rożnych antygenów. Liczne prace w tej tematyce dają nadzieję, na opracowanie skuteczniejszych testów diagnostycznych opartych na antygenach otrzymywanych metodami biotechnologicznymi.

Piśmiennictwo

1. Aguero-Rosenfeld M.E., Nowakowski J., Bittker S., Cooper D., Nadelman R.B., Wormser G.P.: Evolution of the serologic response to *Borrelia burgdorferi* in treated patients with culture-confirmed erythema migrans. *Microbiology*, **34**, 1–9 (1996)
2. Aguero-Rosenfeld M.E., Wang G., Schwartz I., Wormser G.P.: Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 484–509 (2005)
3. Arnaboldi P.M., Seedarnee R., Sambir M., Callister S.M., Imparato J.A., Dattwyler R.J.: Outer surface protein C peptide derived from *Borrelia burgdorferi* sensu stricto as a target for serodiagnosis of early Lyme disease. *Clin. Vaccine Immunol.* **20**, 474–481 (2013)
4. Bacon R.M., Biggerstaff B.J., Schriefer M.E., Gilmore R.D., Philipp M.T., Steere A.C.: Serodiagnosis of Lyme disease by kinetic enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant VlsE1 or peptide antigens of *Borrelia burgdorferi* compared with 2-tiered testing using whole-cell lysates. *J. Infect. Dis.* **187**, 1187–1199 (2003)
5. Barbour A.G., Hayes S.F.: Biology of *Borrelia* species. *Microbiol. Rev.* **50**, 381–400 (1986)
6. Bruckbauer H.R., Preac-Mursic V., Fuchs R., Wilske B.: Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis.* **11**, 224–232 (1992)
7. Burgdorfer W., Barbour A.G., Hayes S.F., Benach J.L., Grunwaldt E., Davis J.P.: Lyme disease – a tick-borne spirochetosis? *Science*, **216**, 1317–1319 (1982)
8. Carrasco S.E., Troxell B., Yang Y., Brandt S.L., Li H., Sandusky G.E., Yang X.F.: Outer surface protein OspC is an antiphagocytic factor that protects *Borrelia burgdorferi* from phagocytosis by macrophages. *Infect. Immun.* **83**, 4848–4860 (2015)
9. Casjens S.R., Palmer N., Van Vugt R., Huang W., Stevenson B., Rosa P., Haft D.:A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* **35**, 490–516 (2000)
10. Casjens S.R., Gilcrease E.B., Vujadinovic M., Mongodin E.F., Luft B.J., Schutzer S.E., Qiu W.G.: Plasmid diversity and phylogenetic consistency in the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*. *BMC Genom.* **18**, 1–18 (2017)
11. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for test performance and interpretation from the Second National Conference on Serological Diagnosis of Lyme Disease. *Morb. Mortal. Wkly. Re.* **44**, 590–591 (1995)
12. van Dam A.P., Kuiper H., Vos K., Widjojokusumo A., de Jongh B.M., Spanjaard L., Dankert J.: Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin. Infect. Dis.* **17**, 708–717 (1993)
13. Dessau R.B., Strle F. i wsp.: To test or not to test? Laboratory support for the diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Infect.* **24**, 118–124 (2018)
14. Dressler F., Whalen J.A., Reinhardt B.N., Steere A.C.: Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J. Infect. Dis.* **167**, 392–400 (1993)
15. Eiffert H.F., Hanefeld R., Thomssen H., Christen J.: Reinfection in Lyme borreliosis. *Infection,* **24**, 437–439 (1996)
16. Engstrom S.M., Shoop E., Johnson R.C.: Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* **33,** 419–427 (1995)
17. Fingerle V., Schulte-Spechtel U.C., Leonhard S., Hofmann H., Weber K., Pfister K., Strle F., Wilske B.: Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**, 279–290 (2008)
18. Fischer J.R., Parveen N., Magoun L., Leong J.M.: Decorin-binding proteins A and B confer distinct mammalian cell type-specific attachment by *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **66**, 567–589 (2003)
19. Fraser C.M., Casjens S., Huang W.M., Sutton G.G., Clayton R., Lathigra R.: Genomic sequence of a Lyme disease *Spirochaete*, *Borrelia burgdorferi*. *Nature,* **390**, 580–586 (1997)
20. Fung B.P., McHugh J.M., Leong A., Steere A.C.: Humoral immune response to outer surface protein C of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease: role of the immunoglobulin M response in the serodiagnosis of early infection. *Infect. Immun.* **62**, 3213–3221 (1994)
21. Gąsiorowski J., Witecka-Knysz E., Knysz B., Gerber H., Gładysz A.: Diagnostyka boreliozy. *Med. Pr.* **58**, 438–447 (2007)
22. Ge Y., Li C., Corum L., Slaughter C.A., Charon N.W.: Structure and expression of the flaA periplasmic flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* **180**, 2418–2425 (1998)
23. Gerber M.A., Shapiro E.D., Bell G.L., Sampieri A., Padula S.J.: Recombinant outer surface protein C ELISA for the diagnosis of early Lyme disease. *J. Infect. Dis.* **171**, 724–727 (1995)
24. Gilmore Jr. R.D., Mbow M.L., Stevenson B.: Analysis of *Borrelia burgdorferi* gene expression during life cycle phases of the tick vector *Ixodes scapularis*. *Microb. Infect.* **3**, 799–808 (2001)

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

25. Glöckner G.: Comparative analysis of the *Borrelia garinii* genome. *Nucleic Acids Res.* **32**, 6038–6046 (2004)
26. Goddard J:. Not all erythema migrans lesions are Lyme disease. *Am. J. Med.* **130**, 231–233 (2017)
27. Goettner G., Schulte-Spechtel U., Hillermann R., Liegl G., Wilske B., Fingerle V.: Improvement of Lyme borreliosis serodiagnosis by a newly developed recombinant immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VlsE and DbpA homologues. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 3602–3609 (2005)
28. Gomes-Solecki M.J., Dunn J.J., Luft B.J., Castillo J., Dykhuizen D.E., Yang X.: Recombinant chimeric *Borrelia* proteins for diagnosis of Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2530–2535 (2000)
29. Hagman K.E., Lahdenne P., Popova T.G., Porcella S.F., Akins D.R., Radolf J.D., Norgard M.V.: Decorin-binding protein of *Borrelia burgdorferi* is encoded within a two-gene operon and is protective in the murine model of Lyme borreliosis. *Infect. Immun.* **66**, 2674–2683 (1998)
30. Hansen K., Hindersson P., Pedersen S.P.: Measurement of antibodies to the *Borrelia burgdorferi* flagellum improves serodiagnosis in Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 338–346 (1988)
31. Hansen K., Asbrink E.: Serodiagnosis of erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans by the *Borrelia burgdorferi* immunodominant 60-kilodalton antigen common to. *Infect. Immun.* **27**, 545–551 (1989)
32. Heikkilä T., Seppälä I., Saxen H., Panelius J., Yrjänäinem H., Lahdenne P.: Species-specific serodiagnosis of Lyme arthritis and neuroborreliosis due to *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii* by using decorin binding protein. *J. Clin. Micobiol.* **40**, 453–460 (2002)
33. Hofmann H., Fingerl V., Hunfeld K.P., Huppert H.I., Krause A., Rauer S., Ruf B.: Cutaneous Lyme borreliosis: guideline of the German Dermatology Society. *Ger. Med. Sci.* **15**, 1–31 (2017).
34. Howe T.R., LaQuier F.W., Barbour A.G.: Organization of genes encoding two outer membrane proteins of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* within a single transcriptional unit. *Infect. Immun.* **54**, 207–212 (1986)
35. Johnson B.J., Robbins K.E., Bailey R.E., Cao B.L., Sviat S.L., Craven R.B., Dennis D.T.: Serodiagnosis of Lyme disease: accuracy of a two-step approach using a flagella-based ELISA and immunoblotting. *J. Infect. Dis.* **174**, 346–353 (1996)
36. Johnson R.C., Schmid G.P., Hyde F.W., Steigerwalt A.G., Brenner D.J.: *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **34**, 496–497 (1984)
37. Kalish R.A., McHugh G., Granquist J., Shea B., Ruthazer R., Steere A.C.: Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to. *Clin. Infect. Dis.* **33**, 780–785 (2001)
38. Kenedy M.R., Lenhart T.R., Akins D.R.: The Role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* **66**, 1–19 (2012)
39. Kraiczy P.: Hide and seek: how Lyme disease spirochetes overcome complement attack. *Front. Immunol.* **7**, 385–393 (2016)
40. Krzyczmanik D., Sińczuk-Walczak H., Wittczak T., Cyran A., Pałczyński C., Walusiak-Skorupa J.: Borreliosis in occupational medicine practice. *Med. Pr.* **63**, 483–492 (2012)
41. Lawrenz M.B., Hardham J.M., Owens R.T., Nowakowski J., Steere A.C., Wormser G.P., Norris S.J.: Human antibody responses to VlsE antigenic variation protein of *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3997–4004 (1999)
42. Leeflang M.M.G., Sprong H. i wsp.: The diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis in Europe: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* **16**, 140–157 (2016)
43. Liang F.T., Steere A.C., Marques A.R., Johnson B.J, Miller J.N., Philipp M.T.: Sensitive and specific serodiagnosis of Lyme disease by enzyme-linked immunosorbent assay with a peptide based on an immunodominant conserved region of *Borrelia burgdorferi* VlsE. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3990–3996 (1999)
44. Liang F.T., Philipp M.T.: Epitope mapping of the immunodominant invariable region of *Borrelia burgdorferi* VlsE in three host species. *Infect. Immun.* **68**, 2349–2352 (2000)
45. Lohr B., Fingerle V., Norris D.E., Hunfeld K.P.: Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis: current state of the art and future perspectives. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **55**, 1–27 (2018)
46. Magnarelli L.A., Fikrig E., Padula S.J., Anderson J.F., Flavell R.A.: Use of recombinant antigens of *Borrelia burgdorferi* in serologic tests for diagnosis of Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 237–240 (1996)
47. Magnarelli L.A., Ijdo J.W., Padula S.J., Flavell R.A., Fikrig E.: Serologic diagnosis of Lyme borreliosis by using enzyme-linked immunosorbent assays with recombinant antigens. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 1735–1739 (2000)
48. Margos G., Fedorova N., Kleinjan J.E., Hartberger C., Schwan T.G., Sing A., Fingerle V.: *Borrelia lanei* sp. nov. extends the diversity of *Borrelia* species in California. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67**, 3872–3876 (2017)
49. Margos G., Hepner S., Mang C., Sing A., Liebl B., Fingerle V.: Completed genome sequences of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto B31 (NRZ) and closely related patient isolates from Europe. *Genome Announc.* **5**, e00637 (2017)
50. Margos G., Lane R.S., Fedorova N., Koloczek J., Piesman J., Hojgaard A., Sing A., Fingerle V.: *Borrelia bissettiae* sp. nov. and *Borrelia californiensis* sp. nov. prevail in diverse enzootic transmission cycles. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 1447–1452 (2016).
51. Mathiesen M.J., Holm A., Christiansen M., Blom J., Hansen K., Østergaard S., Theisen M.: The dominant epitope of *Borrelia garinii* outer surface protein C recognized by sera from patients with neuroborreliosis has a surface-exposed conserved structural motif. *Infect. Immun.* **66**, 4073–4079 (1998)
52. Matyjasek A., Zdrojewski Z.: Borelioza – najnowsze rekomendacje w diagnostyce i leczeniu. *Forum Reumatol.* **2**, 58–64 (2016)
53. Meriläinen L., Herranen A., Schwarzbach A., Gilbert L.: Morphological and biochemical features of *Borrelia burgdorferi* pleomorphic forms. *Microbiology*, **161**, 516–527 (2015)
54. Moniuszko-Malinowska A., Penza P., Czupryna P., Pancewicz S., Zajkowska J.: *Borrelia burgdorferi*–morphological structure and motility as adaptation for transmission and survival in the habitat of a tick – vertebrate setup. *Prz. Epidemiol.* **70**, 420–427 (2016)
55. Moore A., Nelson C., Molins C., Mead P., Schriefer M.: Current guidelines, common clinical pitfalls, and future directions for laboratory diagnosis of Lyme disease, United States. *Emerging Infect. Dis.* **22**, 1169–1177 (2016)
56. Norris S.J.: The *vls* antigenic variation systems of Lyme disease *Borrelia*: eluding host immunity through both random, segmental gene conversion and framework heterogeneity. *Microbiol. Spectr.* **2**, 34–41 (2014)
57. Ojaimi C., Brooks C., Casjens S., Rosa P., Elias A., Barbour A.: Profiling of temperature-induced changes in *Borrelia burgdorferi* gene expression by using whole genome arrays. *Infect. Immun.* **71**, 1689–1705 (2003)
58. Padula S.J., Dias F., Sampieri A., Craven R.B., Ryan R.W.: Use of recombinant OspC from *Borrelia burgdorferi* for serodiagnosis of early Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* **32**, 1733–1738 (1994)
59. Pancewicz S.A., Garlicki A.M., Moniuszko-Malinowska A., Zajkowska J., Kondrusik, M., Grygorczuk S., Czupryna P., Dunaj, J. Diagnosis and treatment of tick-borne diseases recommendations of the Polish Society of Epidemiology and Infectious Diseases. *Przegl Epidemiol*, **69**, 309–316 (2015)
60. Panelius J., Lahdenne P., Heikkilä T., Peltomaa M., Oksi J., Seppälä I.: Recombinant OspC from *Borrelia burgdorferi* sensu stricto *B. afzelii* and *B. garinii* in the serodiagnosis of Lyme borreliosis. *J. Med. Microbiol.* **51**, 731–739 (2002)

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl

61. Pritt B.S, Petersen J.M. i wsp.: *Borrelia mayonii* sp. nov., a member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, detected in patients and ticks in the upper midwestern United States. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. **66**, 4878–4880 (2016)
62. Purser E., Norris J.S.: Correlation between plasmid content and infectivity in B*orrelia burgdorferi*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA,* **97**, 13865–13870 (2000)
63. Roessler D., Hauser U., Wilske B.: Heterogeneity of BmpA (P39) among European isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and influence of interspecies variability on serodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 2752–2758 (1997).
64. Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L., Oliver Jr J.H.: Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis.* **2**, 123–128 (2011)
65. Schwan T.G., Piesman J., Golde W.T., Dolan M.C., Rosa P.A.: Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA,* **92**, 2909–2913 (1995)
66. Schwan T.G., Piesman J.: Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease – associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 382–388 (2000)
67. Shapiro E.D.: Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1724–1731 (2014)
68. Simpson W.J., Cieplak W., Schrumpf M.E., Barbour A.G., Schwan T.G.: Nucleotide sequence and analysis of the gene in *Borrelia burgdorferi* encoding the immunogenic P39 antigen. *FEMS Microbiol. Lett*. **119**, 381–387 (1994)
69. Stanek G., Reiter M.: The expiing Lyme *Borrelia* complex-clinical significance of genomic species? *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 487–493 (2011)
70. Stanek G., Wormser G.P., Gray J., Strle F.: Lyme borreliosis. *Lancet,* **379**, 461–473 (2012)
71. Steere A.C., Malawista S.E., Hardin J.A., Ruddy S., Askenase, P.W., Andiman W. A.: Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. *Ann. Intern. Med.* **86**, 685–698 (1977)
72. Theel E.S.: The past present and (possible) future of serologic testing for Lyme disease. *J. Clin. Microbiol*. **54**, 1191–1196 (2016)
73. Verma A., Brissette C.A., Bowman A., Stevenson B.: *Borrelia burgdorferi* BmpA is a laminin-binding protein. *Infect. Immun.* **77**, 4940–4946 (2009)
74. des Vignes F., Piesman J., Heffernan R., Schulze T.L., Stafford III K.C., Fish D.: Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *J. Infect. Dis.* **183**, 773–778 (2001)
75. Wallich R., Moter S.E., Simon M.M., Ebnet K., Heiberger A., Kramer M.D.: The *Borrelia burgdorferi* flagellum-associated 41-kilodalton antigen (flagellin): molecular cloning, expression and amplification of the gene. *Infect. Immun.* **58**, 1711–1719 (1990)
76. Wang G., van Dam A.P., Schwartz I., Dankert J.: Molecular typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato*: taxonomic, epidemiological and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 633–653 (1999)
77. Wilske B., Fingerle V., Herzer P., Hofmann A., Lehnert G., Peters H., Weber K.: Recombinant immunoblot in the serodiagnosis of Lyme borreliosis-comparison with indirect immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assay. *Med. Microbiol. Immun.* **182**, 255–270 (1993)
78. Wilske B.: Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis. *Ann. Med.* **37**, 568–579 (2005)
79. Wilske B., Fingerle V., Schulte-Spechtel U.: Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immun. Med. Microbiol.* **49**, 13–21 (2007)
80. Wormser G.P., Schriefer M., Aguero-Rosenfeld M.E., Levin A., Steere A.C., Nadelman R.B., Dumler J.S.: Single-tier testing with the C6 peptide ELISA kit compared with two-tier testing for Lyme disease. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **75**, 9–15 (2013)
81. Yang X., Izadi H., Coleman A.S., Wang P., Ma Y., Fikrig E., Anguita J., Pal U.: *Borrelia burgdorferi* lipoprotein BmpA activates pro-inflammatory responses in human synovial cells through a protein moiety. *Microbes Infect*. **10**, 1300–1308 (2008)
82. Zhang J.R., Hardham J.M., Barbour A.G., Norris S.J.: Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. *Cell*, **89**, 275–285 (1997)

MOST WIEDZY Pobrano z mostwiedzy.pl