

PRZYDATNOŚĆ DIAGNOSTYCZNA REAKCJI PCR W ROZPOZNAWANIU BORELIOZY

Weronika Graźlewska, Bartłomiej Ferra, Lucyna Holec-Gąsior*

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska

Wpłynęło w maju, zaakceptowano we wrześniu 2020 r.

Streszczenie: Borelioza jest wieloukładową chorobą wywołaną przez bakterie zaliczane do kompleksu *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Wektorem przenoszącym infekcję są kleszcze z rodzaju *Ixodes*, które zakażają kolejnych żywicieli krętka podczas spożywania ich krwi. Zróżnicowany przebieg boreliozy uniemożliwia jej rozpoznanie na podstawie objawów klinicznych. W związku z tym diagnostyka choroby z Lyme opiera się głównie na metodach laboratoryjnych, zarówno bezpośrednich (wykrycie obecności DNA lub białek czynnika zakaźnego w materiale biologicznym pobranym od pacjenta) jak i pośrednich (badania serologiczne). Powszechnie rekomendowanym podejściem jest serodiagnostyka, jednakże z powodu czasu wymaganego do wytworzenia przez organizm swoistych przeciwciał nie jest ona przydatna w początkowym okresie infekcji. Metody mikrobiologiczne, będące złotym standardem w wykrywaniu wielu infekcji bakteryjnych, nie są szeroko wykorzystywane w rozpoznaniu boreliozy ze względu na wysokie wymagania wzrostowe *B. burgdorferi* s.l. oraz długi czas oczekiwania na wynik. Potencjalnym rozwiązaniem tego problemu wydaje się być diagnostyka molekularna polegająca na wykrywaniu DNA krętka za pomocą reakcji PCR, która jest wysoko specyficzna oraz czuła. Jednakże efektywność tego podejścia zależy od wielu czynników dlatego konieczne jest opracowanie wystandaryzowanego algorytmu diagnostycznego zapewniającego powtarzalność wyników we wszystkich laboratoriach.

1. Wprowadzenie. 2. Genom *B. burgdorferi* s.l. 3. Diagnostyka boreliozy. 4. Rodzaje reakcji PCR wykorzystywane w diagnostyce boreliozy. 5. Geny wykorzystywane w detekcji DNA *B. burgdorferi* s.l. 6. Identyfikacja genogatków *B. burgdorferi* s.l. 7. Materiał kliniczny. 8. Czynniki wpływające na wydajność reakcji PCR. 9. Zalecenia dotyczące zastosowania diagnostyki PCR. 10. Podsumowanie

DIAGNOSTIC USEFULNESS OF PCR IN THE RECOGNITION OF LYME DISEASE

Abstract: Lyme disease is a multisystem disease caused by bacteria belonging to the group *Borrelia burgdorferi* sensu lato. The vector that carries the infection is a tick of the genus *Ixodes*, that infects subsequent hosts of the spirochete during blood-meal. The varied course of Lyme disease makes it impossible to recognize it on the basis of clinical symptoms. Therefore, the diagnosis of Lyme disease is based mainly on laboratory methods, both direct (detection of the presence of DNA or infectious agent proteins in the biological material collected from the patient) and indirect (mainly serological tests). A commonly recommended approach is serodiagnosis, however, due to the time required for the body to produce specific antibodies, it is not useful in the earliest period of infection. Microbiological diagnostics also can not be used to diagnose Lyme disease in the first weeks of the disease due to its low sensitivity and long waiting time for the result. The solution seems to be molecular diagnostics based on the detection of the spirochete DNA using PCR reaction that is highly specific and sensitive. However, the effectiveness of this approach depends on many factors, therefore it is necessary to develop a standardized protocol ensuring reproducibility of results in all laboratories.

1. Introduction. 2. Genome of *B. burgdorferi* s.l. 3. Diagnosis of Lyme borreliosis. 4. Types of PCR reactions used in the diagnosis of Lyme disease. 5. Target genes used to DNA detection of *B. burgdorferi* s.l. 6. Identification of *B. burgdorferi* s.l. genotypes. 7. Clinical material. 8. The factors affecting the efficiency of PCR. 9. Recommendations for the use of PCR diagnostics. 10. Summary

Słowa kluczowe: *Borrelia burgdorferi* sensu lato, borelioza, diagnostyka molekularna, PCR

Keywords: *Borrelia burgdorferi* sensu lato, Lyme disease, molecular diagnostics, PCR

1. Wprowadzenie

Borelioza jest chorobą odkleszczową wywołaną przez bakterie zaliczane do kompleksu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.). Obecnie do grupy tej należy około 20 genogatków, z czego tylko dla 5 (*Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia bavariensis*, *Borrelia burgdor-*

feri sensu stricto (s.s.), *Borrelia spielmanii*) definitywnie potwierdzono patogenność dla człowieka. Wszystkie z wyżej wymienionych genogatków występują na terenie Europy. Natomiast w Ameryce Północnej jedynym wykrywanym czynnikiem wywołującym boreliozę jest *B. burgdorferi* s.s. Jednakże najnowsze doniesienia sugerują, iż również *Borrelia bisettii* i *Borrelia*

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

mayonii mogą wywoływać chorobę z Lyme na terenie USA i Kanady [27, 52].

Borelioza to wieloukładowa choroba o przebiegu fazyowym. Na wczesnym etapie choroby (do 8 tygodni od momentu zakażenia) najczęściej jedynym objawem jest rumień wędrujący (EM, *erythema migrans*). Jest to bardzo charakterystyczna zmiana skórna, mająca postać zaczerwienienia z centralnym przejaśnieniem. Według zaleceń Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych (PTEiLCHZ) wystąpienie typowego EM jest wskazaniem do natychmiastowego rozpoczęcia antybiotykoterapii bez wykonywania badań serologicznych [37]. Niestety, EM nie występuje u wszystkich pacjentów, dotyka jedynie ok. 40–90% zakażonych [1, 31, 38, 51]. Zazwyczaj na tym etapie boreliozy nie towarzyszą pacjentom żadne inne dolegliwości lub przybierają one postać objawów grypopodobnych, dlatego też chorzy często nie zdają sobie sprawy, iż potrzebują specjalistycznej pomocy. Prowadzi to do bardzo poważnych konsekwencji, ponieważ w przypadku braku odpowiedniej antybiotykoterapii, choroba może rozwinąć się do fazy rozsianej (od 6 do 26 tygodni od momentu zakażenia). Do najczęstszych objawów fazy rozsianej należą m.in. rumień wędrujący mnogi, objawy ze strony układu nerwowego pod postacią zespołu Bannwartha, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenia korzeni nerwowych i nerwów czaszkowych, zmian zapalnych w obrębie serca oraz ostre nawracające zapalenie stawów. Innym charakterystycznym, lecz bardzo rzadkim objawem jest chłoniak limfocytowy (BL, *borrelial lymphocytoma*), który występuje u 0,3–3% chorych. BL ma postać niebolesnego, czerwonego obrzęku o średnicy kilku centymetrów zlokalizowanego głównie w lub na małżowinie usznej, mosznie i brodawkach sutkowych. Dolegliwości związane z późną fazą boreliozy, pojawiające się 6 miesięcy po zakażeniu, w znacznym stopniu uzależnione są od genogatunku krętka, który wywołał chorobę. Za boreliozowe zapalenie stawów (LA, Lyme arthritis) odpowiada głównie *B. burgdorferi* s.s., natomiast blisko ze sobą spokrewnione genogatunki *B. garinii* i *B. baviariensis* przeważnie prowadzą do postaci neurologicznej choroby (NB, neuroborelioza). *B. afzelii* jest w głównej mierze związana z zanikowym zapaleniem skóry (ACA, *acrodermatitis chronica atrophicans*). Natomiast *B. spielmannii* jest genogatunkiem sporadycznie wywołującym boreliozę u ludzi i jak dotąd izolowano go jedynie ze zmian skórnych [13, 25, 27, 50, 51].

2. Genom *B. burgdorferi* s.l.

Bakterie należące do grupy *B. burgdorferi* s.l. podczas swojego cyklu życiowego przebywają w bardzo różnicowanym środowisku. Prawdopodobnie to ta

różnorodność warunków ich bytowania sprawiła, iż genom *B. burgdorferi* s.l. ma jedną z najbardziej skomplikowanych struktur wśród bakterii [5, 17].

Genom krętków składa się z liniowego chromosomu o długości około 910 kbp oraz 21 plazmidów (9 kolistych i 12 liniowych) o wielkościach wynoszących w przybliżeniu od 5 do 54 kbp. Ponadto charakteryzuje się on dużą zawartością genów paralogicznych, pseudogenów oraz niekodujących fragmentów DNA. Warto zaznaczyć, iż do tej pory nie poznano funkcji wielu genów, ponieważ nie wykazują one znaczącej homologii z wcześniej poznanymi sekwencjami [7, 9, 17].

Liniowy chromosom ma dość dobrze zakonserwowaną sekwencję wśród dotychczas przebadanych genogatunków *B. burgdorferi* s.l. Posiada on kowalencyjnie zamknięte końce przypominające strukturę spinki do włosów. Jego replikacja ma charakter dwukierunkowy symetryczny, jednakże jej szczegółowy mechanizm nie został dotychczas poznany. Chromosom zawiera 26 pseudogenów oraz 860 genów kodujących 797 białek, odpowiedzialnych głównie za metabolizm podstawowy bakterii. Dokładniejsza analiza sekwencji wykazała, że *B. burgdorferi* s.l. nie posiada genów kodujących enzymy niezbędne do syntezy aminokwasów, nukleotydów, kwasów tłuszczowych i kofaktorów enzymów. Prawdopodobnie zostały one utracone na skutek przystosowania się krętka do pasożytniczego trybu życia [5, 7, 9, 17, 36]. W związku z tym *B. burgdorferi* s.l. posiada wiele genów (co najmniej 52) kodujących różnego typu białka transporotowe oraz wiążące odpowiedzialne za dostarczanie komórce bakterii niezbędnych do przeżycia węglowodanów, peptydów i aminokwasów [45].

Duża liczba plazmidów, niespotykana u innych bakterii sprawia, że *B. burgdorferi* s.l. wykazuje znaczną zmienność w obrębie gatunku oraz w ciągu cyklu życiowego. Liczne plazmidy kodują głównie informację genetyczną wpływającą na wirulencję i patogenność bakterii z rodzaju *Borrelia*. Lipoproteiny, występujące na zewnętrznej błonie bakteryjnej stanowią kluczową grupę białek odpowiedzialnych między innymi za transmisję krętka, jego rozprzestrzenianie oraz przeżycie w organizmie żywiciela. Ich różnorodność oraz ogromne znaczenie w cyklu życiowym *B. burgdorferi* s.l. podkreśla fakt, iż geny kodujące lipoproteiny stanowią nawet 15% informacji genetycznej zlokalizowanej na plazmidach [7, 8, 30, 46]. Nie wszystkie szczepy *B. burgdorferi* s.l. posiadają pełen zestaw plazmidów. Jedynie plazmidy cp26, cp32 i lp54 są niezbędne do przeżycia bakterii w środowisku. Dlatego też obecne są we wszystkich izolatach *B. burgdorferi* s.l. oraz wykazują stosunkowo wysoki stopień zakonserwowania sekwencji nukleotydowej. Reszta z plazmidów jest dość łatwo gubiona, co wiąże się z dużą trudnością w hodowli laboratoryjnej w pełni wirulentnych szczepów *B. burgdorferi* s.l. [5, 8, 27, 36].

3. Diagnostyka boreliozy

Ze względu na zróżnicowany przebieg rozpoznanie boreliozy na podstawie objawów klinicznych jest bardzo trudne. Jedynie w przypadku pojawienia się typowego rumienia wędrującego można postawić prawidłową diagnozę. Niestety, nie pojawia się on u wszystkich chorych a jedynie u 40–90% z nich [1, 31, 38, 51]. Często też jest przez nich niezauważany, dlatego nie zawsze istnieje możliwość zdiagnozowania choroby na tej podstawie. Z tychże względów diagnostyka boreliozy opiera się głównie na metodach laboratoryjnych [1, 27, 38].

Dla większości chorób bakteryjnych diagnostyka oparta o laboratoryjną hodowlę patogenów z materiału biologicznego pobranego od pacjentów jest uznawana za złoty standard, cechujący się 100% specyficznością. Niestety, podejście to nie jest wykorzystywane w rozpoznaniu choroby z Lyme ze względu na bardzo duże wymagania wzrostowe krętków oraz długi czas oczekiwania na wynik [11, 27].

Obecnie w większości przypadków boreliozę rozpoznaje się na podstawie dwustopniowego badania serologicznego, którego pierwszym etapem jest czuły test immunoenzymatyczny (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay). Jeżeli wynik badania jest dodatni lub wątpliwy, jako test drugiego stopnia wykorzystuje się technikę Western blotting (WB). W obu metodach główne źródło antygenów stanowią całkowite lizaty komórkowe *B. burgdorferi* s.l. Niestety, ogromna różnorodność genogatunków w obrębie *B. burgdorferi* s.l. oraz niski stopień zakonserwowania sekwencji aminokwasowej ich białek sprawia, że wykorzystanie lizatów komórkowych jednego genogatunku nie jest wystarczające do prawidłowego rozpoznania boreliozy. Potencjalnym rozwiązaniem wyżej wymienionych problemów może być zastosowanie w serodiagnostyce niniejszej choroby antygenów rekombinantowych otrzymywanych z wykorzystaniem metod inżynierii genetycznej i biologii molekularnej. Jednakże, aby testy immunodiagnostyczne oparte na białkach rekombinantowych miały jak największą czułość i swoistość należy wykorzystać w nich starannie wyselekcjonowane antygeny lub ich fragmenty [19].

Dodatkowo czułość testów serologicznych jest silnie uzależniona od czasu trwania choroby. Ze względu na tzw. okienko serologiczne, czyli przedział czasu od momentu zakażenia do chwili pojawienia się w krążeniu swoistych immunoglobulin, które są wykrywane z wykorzystaniem laboratoryjnych metod diagnostycznych, wyniki badań serologicznych na wczesnym etapie choroby są często fałszywie ujemne. W miarę trwania infekcji odpowiedź immunologiczna stopniowo dojrzewa, w wyniku czego czułość testów serologicznych podczas późniejszych stadiów choroby znacząco wzrasta [1, 27, 31].

Rozwiązaniem problemów, które towarzyszą prawidłowemu, wczesnemu rozpoznaniu boreliozy może być zastosowanie nowoczesnych metod molekularnych polegających na wykrywaniu materiału genetycznego krętka tj. DNA w próbkach klinicznych za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, polymerase chain reaction) [11, 25, 44].

4. Rodzaje reakcji PCR wykorzystywane w diagnostyce boreliozy

Najprostszym podejściem mającym na celu amplifikację określonego fragmentu DNA jest klasyczna reakcja PCR z użyciem dwóch specyficznych starterów. Po jej zakończeniu należy określić wielkość otrzymanego produktu za pomocą elektroforezy agarozowej lub poliakrylamidowej. Istotną wadą tego podejścia jest możliwość pojawienia się niespecyficznych produktów PCR o zbliżonej wielkości do oczekiwanej. Z tego też względu niezbędna jest dodatkowa kontrola specyficzności. Zwykle do tego celu wykorzystuje się wyznakowane sondy, które są komplementarne do fragmentu amplifikowanej sekwencji DNA [11, 44].

Inną często wykorzystywaną metodą jest PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR, real-time PCR), który charakteryzuje się wyższą czułością i specyficznością niż standardowa reakcja PCR. Specyficzność reakcji jest kontrolowana poprzez hybrydyzację produktu reakcji z sondą dodaną do mieszaniny reakcyjnej lub poprzez analizę krzywej topnienia. W wyniku przyłączenia się sondy do powstałych amplikonów następuje wyemitowanie sygnału fluorescencyjnego, dzięki któremu możliwe jest monitorowanie przyrostu produktów w czasie rzeczywistym. Natomiast wyznaczenie temperatury topnienia produktu PCR jest możliwe dzięki znajdującemu się w mieszaninie reakcyjnej barwnikowi (np. SYBR Green), który zwiększa swoją fluorescencję po związaniu się z podwójną nicią DNA. Temperaturę topnienia produktu PCR wyznacza się po zakończeniu reakcji RT-PCR poprzez stopniowe ogrzewanie mieszaniny reakcyjnej. W momencie osiągnięcia temperatury właściwej dla denaturacji fragmentu DNA (przejście do pojedynczej nici DNA) sygnał fluorescencji gwałtownie spada, co jest widoczne na wykresie (tzw. krzywej topnienia) jako wyraźny pik [11, 44].

Kolejna popularna odmiana metody PCR, która znalazła zastosowanie w diagnostyce boreliozy to tzw. wewnętrzny PCR. Jest to dwuetapowa reakcja PCR z wykorzystaniem dwóch par starterów (zewnętrznych oraz wewnętrznych), które charakteryzują się dużymi różnicami w temperaturze topnienia. W pierwszym etapie reakcji otrzymuje się dłuższy produkt PCR z udziałem starterów zewnętrznych. Następnie po obniżeniu temperatury przyłączania starterów w reakcji

Tabela I
Charakterystyka najpopularniejszych celów molekularnych

Cel molekularny	Lokalizacja	Produkt translacji	Źródło
<i>ospA</i>	Plazmid lp54	Lipoproteina niezbędna do przeżycia w organizmie kleszcza	[34, 41]
<i>ospC</i>	Plazmid cp26	Lipoproteina niezbędna do transmisji z kleszcza do ciała ssaka	[14, 15]
<i>p66 (oms66)</i>	Chromosom	Jedno z integralnych białek membranowych budujących poryny	[3, 41]
<i>fla</i>	Chromosom	Białko budujące wici	[54]
<i>rrf-rrl</i>	Chromosom	Wysoco specyficzny region pomiędzy fragmentami kodującymi 23S rRNA i 5S rRNA	[11]
<i>recA</i>	Chromosom	Białko katalizujące rekombinację pojedynczych nici DNA	[11, 44]
<i>rrs</i>	Chromosom	Cząsteczka 16S rRNA wchodząca w skład małej podjednostki rybosomu	[11, 34]
<i>rrl</i>	Chromosom	Cząsteczka 23S rRNA wchodząca w skład dużej podjednostki rybosomu	[11]
<i>polC (dnaE)</i>	Chromosom	Polimeraza DNA III podjednostka α	[44]
<i>rpoC</i>	Chromosom	Polimeraza RNA, podjednostka β	[14, 15]
<i>hbb</i>	Chromosom	Histonopodobne białko wiążące DNA	[40]
<i>rplB</i>	Chromosom	Białko L2 podjednostki 50S rybosomu	[14, 15]
<i>gyrB</i>	Chromosom	Podjednostka B topoiizomerazy DNA	[14, 15]
<i>leuS</i>	Chromosom	Ligaza leucyno-tRNA	[14, 15]

bierze udział druga para oligonukleotydów, komplementarna wobec sekwencji nukleotydowej znajdującej się w obrębie pierwotnego produktu PCR. Udowodniono, iż zastosowanie wewnętrznego PCR może nawet 1000-krotnie zwiększyć czułość testu diagnostycznego w porównaniu ze standardową reakcją PCR [11, 26].

Jedną z nowszych metod jest reakcja PCR połączona ze spektrometrią masową (MS, mass spectrometry) z elektrorozpylaniem (ESI, electrospray ionization) (PCR/ESI-MS). Podstawą PCR/ESI-MS jest zastosowanie starterów zdolnych do amplifikacji fragmentów genów metabolizmu podstawowego szerokiej grupy organizmów. Po zakończeniu reakcji produkty są analizowane za pomocą spektrometrii masowej z wystarczającą dokładnością, aby można było określić w nich zawartość poszczególnych zasad azotowych (A, G, C i T). Następnie uzyskane wyniki są porównywane z bazą danych znanych organizmów, co pozwala na szybką identyfikację organizmu, z którego pochodziło amplifikowane DNA. Amplifikacja fragmentów siedmiu genów *B. burgdorferi* s.l. tj. *ropC*, *rplB*, *leuS*, *flaB*, *ospC*, *hbb*, *gyrB* pozwala nie tylko na detekcję materiału genetycznego krętka, ale również umożliwia identyfikację poszczególnych genogatunków patogenu [14, 15].

5. Geny wykorzystywane w detekcji DNA *B. burgdorferi* s.l.

Kluczowym elementem diagnostyki molekularnej jest wybór odpowiedniego genu docelowego. Aby metoda ta była wysoce czuła i specyficzna cel molekularny musi być stabilny genetycznie oraz wysoce zakonserwowany wśród wszystkich genogatunków *B. burgdorferi* s.l. Dotychczas do celów klinicznych

wykorzystywano zarówno geny zlokalizowane na chromosomie (*hbb*, *fla*, *rrs*, *rrl*, region międzygenowy *rrl-rrf*, *recA*, *bmpA*, *p66*) jak i kodowane na plazmidach (*ospA*, *ospC*, *dbpA*) (Tab. I). Znaczący wpływ na czułość metody ma również liczba kopii danego fragmentu DNA w genomie bakterii. Plazmidy często występują w komórkach bakterii w kilku kopiach, z tego powodu wydaje się, iż wybór celu molekularnego zlokalizowanego na jednym z nich może zwiększać czułość testu diagnostycznego [1, 11, 39, 44]. Wyniki potwierdzające tę tezę przedstawili Nocton i wsp. (1994) udowadniając, iż PCR ukierunkowany na kodowany plazmidowo gen *ospA* charakteryzował się wyższą czułością w detekcji DNA *B. burgdorferi* s.l. w płynie stawowym, niż ten wykrywający zlokalizowany na chromosomie gen *rrs* [34]. Jednakże, w 1997 roku Priem i wsp. badając próby moczu, płynu mózgowo-rdzeniowego i płynu maziowego pobrane od 57 pacjentów z boreliozą w kierunku obecności DNA *B. burgdorferi* s.l. otrzymali odmienne rezultaty. Badania te wykazały, iż reakcja PCR mająca na celu amplifikację sekwencji DNA zlokalizowanej na chromosomie (gen *p66*) cechowała się wyższą czułością w wykrywaniu DNA patogenu, niż oparta o kodowany plazmidowo gen *ospA* [41]. Przyczyną tej rozbieżności wyników wydaje się być wysoka heterogenność genu *ospA* wśród przedstawicieli *B. burgdorferi* s.l. [53]. Nocton i wsp. (1994) w swych badaniach wykorzystywali próbki kliniczne pobrane od pacjentów zamieszkujących USA, gdzie jedynym genogatunkiem wywołującym boreliozę jest *B. burgdorferi* s.s., prawdopodobnie więc sekwencja nukleotydowa genu *ospA* wśród poszczególnych izolatów była stosunkowo mało zróżnicowana. Natomiast Priem i wsp. (1997) badaniu poddali próby pochodzące od pacjentów zamieszkujących teren Niemiec, gdzie za wywołanie boreliozy

może być odpowiedzialnych co najmniej 5 genogatunków. Wydaje się zatem, iż zróżnicowanie genetyczne przedstawicieli *B. burgdorferi* s.l. w próbkach wykorzystywanych w powyżej przedstawionych badaniach było znacznie większe, a co za tym idzie startery wykorzystane w reakcji PCR nie rozpoznawały wszystkich wariantów sekwencji genu *ospA*, tym samym obniżając jej czułość.

Ogromna różnorodność genetyczna bakterii z grupy *B. burgdorferi* s.l. oraz duża liczba plazmidów utrudnia wybór celu molekularnego zlokalizowanego na plazmidzie, który umożliwiłby rozpoznanie boreliozy bez względu na to jakim genogatunkiem nastąpiło zakażenie. Z tego względu to właśnie geny umiejscowione na chromosomie, o stosunkowo wysoko zakonserwowanej sekwencji nukleotydowej, wydają się bardziej odpowiednie jako cele molekularne w diagnostyce boreliozy. Dzięki dostępnym w bazie NCBI (National Center for Biotechnology Information) sekwencjom nukleotydowym różnych genogatunków *B. burgdorferi* s.l. możliwe jest ich porównanie w celu zidentyfikowania zakonserwowanych fragmentów. W wyniku takiej analizy naukowcom udało się zlokalizować region DNA (umiejscowiony na chromosomie) kodujący fragment rdzenia białka rybosomalnego S21, który powtarza się u 31 genogatunków *B. burgdorferi* s.l. [24].

6. Identyfikacja genogatunków *B. burgdorferi* s.l.

Różni przedstawiciele grupy *B. burgdorferi* s.l. powodują inny przebieg późnej boreliozy oraz mogą odmiennie reagować na używane w leczeniu choroby z Lyme antybiotyki. Z tych powodów identyfikacja poszczególnych genogatunków pozwala na lepsze poznanie epidemiologii oraz mechanizmów wirulencji *B. burgdorferi* s.l. [32, 49].

Możliwość opracowania szybkiej i taniej metody pozwalającej na rozróżnienie poszczególnych genogatunków *B. burgdorferi* s.l. daje diagnostyka molekularna. Niestety, wybór odpowiedniej sekwencji, umożliwiającej łatwą identyfikację genogatunkową metodami molekularnymi jest bardzo trudny. Jednakże udowodniono, iż kilka specyficznych fragmentów genomu *B. burgdorferi* s.l. posiada potencjał różnicujący umożliwiający identyfikację genogatunków na podstawie analizy produktów reakcji PCR. Procedury te obejmują sekwencjonowanie, porównywanie wielkości produktów amplifikacji, wyznaczenie temperatury topnienia, analizę restrykcyjną oraz hybrydyzację ze specyficznymi sondami.

Jednym z fragmentów genomu pozwalającym na identyfikację poszczególnych genogatunków *B. burgdorferi* s.l. jest region *rrf-rrl* umiejscowiony między genami kodującymi podjednostki 23S rRNA i 5S rRNA.

Wykazano, iż przy użyciu wewnętrznego PCR skierowanego na ten niekodujący fragment DNA, można łatwo odróżnić od siebie (na podstawie wielkości produktów PCR) *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* oraz *B. garinii*, które są najczęstszą przyczyną boreliozy w Europie [54]. Na szybką identyfikację wyżej wymienionych genogatunków pozwala również analiza krzywych topnienia produktów PCR powstałych na drodze amplifikacji wysoce zróżnicowanego genu *ospA* [42].

Bardzo wysoki potencjał różnicujący posiada gen *hbb*, kodujący jedno z białek histonopodobnych. W badaniach udowodniono, iż analiza krzywej topnienia amplifikowanego fragmentu genu *hbb* pozwala rozróżnić 5 genogatunków *B. burgdorferi* s.l., tj. *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*, *Borrelia valaisiana*, *Borrelia lusitaniae* [16, 40].

Popularną, lecz stosunkowo czasochłonną metodą umożliwiającą identyfikację poszczególnych genogatunków jest PCR połączony z analizą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP, restriction fragments length polymorphism). RFLP polega na trawieniu produktu PCR odpowiednim enzymem restrykcyjnym, co prowadzi do powstania fragmentów DNA o różnych długościach, charakterystycznych dla każdego genogatunku. Unikalny wzór prążków wizualizuje się za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym. Wykazano, iż analiza PCR-RFLP wykorzystująca fragmenty genów *fla* (trawienie enzymem restrykcyjnym HpyF3I) i *rrs* (trawienie enzymem restrykcyjnym FspBI) pozwala na identyfikację sześciu genogatunków z kompleksu *B. burgdorferi* s.l., tj. *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* i *Borrelia bissetti* [54].

Metodą mającą bardzo wysoki potencjał dyskryminacyjny jest MLST (multilocus sequence typing). Polega ona na amplifikacji fragmentów kilku genów metabolizmu podstawowego, a następnie sekwencjonowaniu otrzymanych produktów PCR. Porównanie sekwencji ośmiu genów *B. burgdorferi* s.l. (*clpA*, *clpX*, *nifS*, *pepX*, *pyrG*, *recG*, *rplB*, *uvrA*) pozwala na rozróżnienie nawet bardzo blisko spokrewnionych ze sobą genogatunków, np. *B. garinii* i *B. bavariensis*. Ze względu na to, iż MLST jest metodą wyjątkowo czułą, ale zarazem kosztowną, jest ona wykorzystywana przede wszystkim w badaniach epidemiologicznych oraz w analizie filogenetycznej [29, 44].

7. Materiał kliniczny

Rodzaj badanego materiału klinicznego uzależniony jest od objawów choroby oraz czasu ich trwania. W przypadku występowania EM lub ACA pobiera się bioptaty zajętej skóry, natomiast przy podejrzeniu NB jest to płyn mózgowo-rdzeniowy (CSF, cerebrospinal

Tabela II
Czułość metod molekularnych w zależności od badanej tkanki

Materiał kliniczny	Cele molekularne	Zakres czułości [%]	Zakres specyficzności [%]
Wycinki skóry – EM	<i>p66, rrl, fla, rrf-rrl, ospA, recA, rrs, ospC</i>	30–89	98–100
Wycinki skóry – ACA	<i>p66, ospA, rrl, rrf-rrl, fla,</i>	20–100	100
Płyn stawowy	<i>rrs-rrl, ospC, ospA, p66, fla</i>	23–100	100
Płyn mózgowo-rdzeniowy	<i>ospA, fla, rrf-rrl, p66</i>	5–100	99–100
Krew, surowica, osocze	<i>polC, ospA, rrs, rrf-rrl, rpoC, rplB, leuS, flaB, gyrB, ospC</i>	0–100	95–100
Mocz	<i>fla, ospA, rrl, p66, rrs</i>	7–92	77–100

Na podstawie: [11, 14, 15, 27, 34, 41, 44].

fluid), gdy zaś występują objawy stawowe do badań pobiera się płyn stawowy. Krew jest wykorzystywana jedynie w przypadku podejrzenia wczesnej boreliozy, natomiast stosowanie moczu jako materiału klinicznego nie jest zalecane ze względu na małą powtarzalność wyników. Każdy z tych materiałów charakteryzuje się odmienną przydatnością w diagnostyce boreliozy (Tab. II), na co wpływ ma obecność inhibitorów w danym rodzaju próbki klinicznej oraz tropizm tkankowy krętków [27, 44, 52].

Według wielu fachowców najlepszym materiałem do badań molekularnych w kierunku boreliozy są wycinki skóry z obszaru zajętego przez EM, czułość takich testów osiąga nawet 90%, natomiast swoistość waha się w zakresie 98–100%. Badania mające na celu porównanie skuteczności metod diagnostycznych w przypadku pacjentów z EM wykazały, iż najwyższą czułością charakteryzował się RT-PCR (80%). Na kolejnym miejscu znalazła się dwuetapowa diagnostyka serologiczna (66%), następnie wewnętrzny PCR (64%) oraz metoda biologiczna oparta o hodowlę krętków z próbek klinicznych (51%). Test oparty na RT-PCR wykazał dużo wyższą czułość niż badanie serologiczne, co pokazuje, o ile większą użyteczność mogą mieć metody molekularne w początkowych fazach infekcji [35, 44]. Wysoką czułość uzyskuje się również w przypadku badania biopłatów skóry pobranych ze zmian obecnych w przebiegu ACA, dodatkowo podejście to również charakteryzuje się bardzo wysoką specyficznością [11, 52].

Bardzo wysoką czułość i specyficzność testów diagnostycznych opartych na reakcji PCR otrzymuje się w przypadku badania płynu stawowego – w niektórych pracach naukowych obie te wartości wynoszą nawet 100%. Jednak w przypadku podejrzenia LA materiałem wyjściowym może być również błona maziowa. Takie podejście może prowadzić do znacznego zwiększenia czułości testu (nawet z 25% do 90%) [21, 44]. Dodatkowo udowodniono, iż po antybiotykoterapii DNA krętka dłużej utrzymuje się w tkance maziowej niż w płynie stawowym [11, 27]. Należy jednak podkreślić, iż metodyka opisana w powyższych publika-

cjach nie jest jeszcze powszechnie stosowana, dlatego te optymistyczne doniesienia o tak wysokiej czułości tego typów testów powinny być jeszcze zweryfikowane przez inne zespoły badawcze. Dodatkowo należy pamiętać, iż LA (podobnie jak ACA) jest objawem późnej boreliozy, więc u pacjentów na tym etapie choroby prawie zawsze w krążeniu występuje wysokie miano przeciwciał klasy IgG [11, 52].

Diagnostyka molekularna neuroboreliozy opiera się na analizie płynu mózgowo-rdzeniowego. Podejście to jednak ze względu na małą liczbę krętków w CSF, wysokie powinowactwo bakterii do otoczki mielinowej oraz możliwość degradacji materiału genetycznego, ma stosunkowo niską czułość (22,5%). Największe prawdopodobieństwo wykrycia DNA krętków w CSF występuje we wczesnej neuroboreliozie [18, 33, 44].

Próbki krwi, pomimo łatwości ich pozyskania, nie stanowią dobrego materiału klinicznego w diagnostyce molekularnej boreliozy. Spowodowane jest to niską liczbą krętków w krążeniu na co ma wpływ silny tropizm tkankowy patogenów (stawy, serce, tkanka nerwowa). Testy PCR z krwi są przydatne jedynie we wczesnej fazie infekcji, podczas rozprzestrzeniania się *B. burgdorferi* s.l. z miejsca wkłucia kleszcza przez układ krwionośny do innych narządów. Dodatkowo we krwi obecne są liczne inhibitory reakcji PCR (takie jak np. heparyna, hemoglobina, DNA gospodarza), co może prowadzić do uzyskania wyników fałszywie negatywnych [1, 28, 47].

Mocz jest jednym z najłatwiej dostępnych materiałów klinicznych, dlatego wielu naukowców badało jego przydatność do diagnostyki molekularnej boreliozy. Wstępne doniesienia literaturowe były bardzo obiecujące. Bergmann i wsp. (2002) opracowali reakcję PCR wykrywającą DNA *B. burgdorferi* s.l. w moczu z czułością na poziomie 85% [2]. Niestety, po przeprowadzeniu badań na większej liczbie prób pacjentów z boreliozą okazało się, iż czułość, a w szczególności specyficzność testów molekularnych wykorzystujących ten materiał kliniczny, nie jest zadowalająca. Obecnie większość europejskich i amerykańskich standardów

odradza stosowanie moczu w metodach opartych na PCR głównie z powodu często pojawiających się niespecyficznych produktów i małej powtarzalności wyników [1, 12, 23, 27, 43].

8. Czynniki wpływające na wydajność reakcji PCR

Czas pobrania próbki

Dla uzyskania wiarygodnego wyniku testu opartego o reakcję PCR ważne jest, by próbkę kliniczną pobrać od pacjenta przed rozpoczęciem leczenia. Wykazano bowiem, iż 4-tygodniowa antybiotykoterapia znacząco obniża wykrywalność DNA krętków. Natomiast przyjmowanie przez pacjenta antybiotyków przez kilka dni nie wpływa znacząco na czułość metod molekularnych [23].

Inhibitory

Jednym z najczęstszych problemów w diagnostyce molekularnej jest obecność inhibitorów w próbkach biologicznych. Związki hamujące reakcję PCR są powszechnie obecne we krwi (np. hemoglobina), w płynie mózgowo-rdzeniowym i fragmentach skóry (np. melanina). Dodatkowo wiele odczynników laboratoryjnych używanych przy pobieraniu i przechowywaniu próbek również jest silnymi inhibitorami amplifikacji (np. heparyna czy formalina). Najprostszą metodą pozwalającą na ograniczenie niepożądanego wpływu tych związków jest zmniejszenie ich stężenia poprzez rozcieńczenie wyizolowanego DNA. Aby upewnić się, że żadne związki zawarte w próbce nie hamują reakcji PCR, przyczyniając się do otrzymania wyniku fałszywie ujemnego, konieczne jest wykonanie wewnętrznej kontroli dodatniej [12, 48].

Innym czynnikiem wpływającym na wydajność reakcji PCR przy wykrywaniu kwasów nukleinowych krętka w materiale biologicznym może być zbyt duża zawartość ludzkiego DNA w stosunku do materiału genetycznego patogenu. Problem ten można jednak łatwo rozwiązać wykorzystując jeden z wielu komercyjnie dostępnych zestawów do izolacji kwasów nukleinowych pozwalających na selektywne usunięcie ludzkiego DNA, takich jak np.: MolYsis Basic5 kit (Molzym, Bremen, Germany), NEBNext Microbiome DNA Enrichment kit (New England Biolabs, USA) [44].

Zanieczyszczenia

Bardzo często uzyskuje się wyniki fałszywie pozytywne, które prowadzą do wdrożenia nieodpowiedniego leczenia pacjenta. Źródłem kontaminacji może być DNA innych patogenów spokrewnionych z *B. burgdorferi* s.l. (naturalna flora bakteryjna pacjentów), ludzkie DNA (brak specyficznych sekwencji starterów) oraz amplikony z wcześniejszych reakcji PCR, które dostały

się do przestrzeni laboratoryjnej (blaty, pipety). Aby ograniczyć liczbę wyników fałszywie pozytywnych należy wykonywać kontrole ujemne oraz bezwzględnie przestrzegać wszelkich procedur mających na celu zminimalizowanie ryzyka kontaminacji próbek [47].

9. Zalecenia dotyczące zastosowania diagnostyki PCR

Diagnostyka molekularna ma znaczną przewagę nad standardowo stosowanymi metodami serologicznymi w początkowych fazach infekcji (zlokalizowanej i rozsianej), gdy organizm nie zdążył jeszcze wytworzyć swoistych przeciwciał. Dodatkowo, pomimo znacznych zalet reakcji PCR, również w przypadku diagnostyki molekularnej możliwe jest otrzymanie wyników fałszywie pozytywnych bądź fałszywie negatywnych. Spowodowane jest to faktem, iż na skuteczność techniki PCR wpływa wiele czynników, które zostały omówione powyżej (m.in.: rodzaj reakcji PCR, cel molekularny, materiał kliniczny, czas pobrania próbki – przed lub po rozpoczęciu leczenia, metody izolacji i oczyszczania DNA, obecności inhibitorów i/lub zanieczyszczeń) [27, 44]. Prawdopodobnie te właśnie problemy z powtarzalnością wyników przyczyniają się do tego, iż metody diagnostyczne oparte o metodę PCR nie są rekomendowane przez największe agencje zajmujące się ochroną zdrowia [6, 20, 33, 37]. Jednakże, mimo braku standaryzacji, coraz więcej placówek ochrony zdrowia dostrzega zalety metod molekularnych w rozpoznaniu boreliozy, dopuszczając to podejście diagnostyczne w niektórych przypadkach (Tab. III).

Zalecenia te dotyczą m.in. występowania nietypowych postaci rumienia wędrującego, które nie pozwalają na jednoznaczną diagnozę. Możliwe są przypadki pojawienia się krwotocznego EM (szczególnie na kończynach dolnych) przybierającego ciemnofioletowy kolor, inne doniesienia mówią także o wyjątkowo „bladych” postaciach EM, w których wyraźnie widoczne są jedynie ich obwódki. Dodatkowo w miejscu ugryzienia kleszcza, w odpowiedzi na alergeny zawarte w ślinie pajęczaka, może pojawić się odczyn zapalny przypominający swoją formą EM. W takich przypadkach diagnostyka molekularna może mieć rozstrzygające znaczenie w rozpoznaniu boreliozy [20, 25, 37].

Borrelial lymphocytoma jest rzadką postacią zakażenia *B. burgdorferi* s.l. W przypadku jego wystąpienia zalecane jest badanie serologiczne, jednak ze względu, iż BL pojawia się we wczesnej lub wczesnej rozsianej fazie boreliozy uzyskane wyniki mogą być niejednoznaczne. Zauważono również, iż BL może przybierać nietypową postać. W wyżej wymienionych przypadkach rekomenduje się wykonanie badań mających na celu bezpośrednią identyfikację krętków [10, 20, 37].

Podobne rekomendacje dotyczą pacjentów z zaniowym zapaleniem skóry. ACA jest postacią późnej

Tabela III
Rekomendacje towarzystw naukowych dotyczące wykorzystywania reakcji PCR
w rozpoznaniu boreliozy

Objaw	Warunek	Źródło
EM	Nietypowa postać (ciemnofioletowy kolor, brak centralnego przejaśnienia, średnica mniejsza niż 5 cm)	[20, 37]
NB	Wczesny etap choroby (< 6 tygodni)	[6, 33, 37]
BL	Nietypowa postać, niejednoznaczne wyniki badań serologicznych	[20, 37]
ACA	Nietypowa postać	[20, 37]
LA	Nieustąpienie objawów mimo antybiotykoterapii	[6, 37]

EM - rumień wędrujący; NB – neuroborelioza; BL - chłoniak limfocytowy;
ACA - zanikowe zapalenie skóry; LA - boreliozowe zapalenie stawów

boreliozy, dlatego też w większości przypadków rozpoznanie choroby opiera się na testach serologicznych. Jednak, w niektórych okolicznościach (nietypowy wygląd zmian skórnych, niski wzrost miana przeciwciał) zaleca się wykonanie dodatkowych testów diagnostycznych obejmujących badanie histopatologiczne oraz metodę PCR [20, 37].

W przypadku neuroboreliozy zgodnie z wytycznymi Europejskiej Federacji Towarzystw Neurologicznych wykrywanie *B. burgdorferi* s.l. w CSF ma uzasadnienie kliniczne jedynie w pierwszych 6 tygodniach NB, gdy swoiste przeciwciała nie są jeszcze obecne w surowicy pacjentów [33, 37].

Wykorzystanie metod molekularnych jest również dopuszczane w przypadkach, gdy pacjenci z podejrzeniem LA, mimo trwającej antybiotykoterapii, nadal odczuwają dolegliwości stawowe. Świadczyć to może o tym, iż rozwinęło się u nich antybiotykoooporne zapalenie stawów (AZS). W tym przypadku, w celu postawienia prawidłowej diagnozy, powinno się przeprowadzić detekcję DNA *B. burgdorferi* s.l. w płynie stawowym. Brak DNA krętka w próbce świadczy o AZS, co wiąże się z koniecznością wdrożenia innej metody leczenia [37].

10. Podsumowanie

Mimo, iż złotym standardem w rozpoznaniu boreliozy jest diagnostyka serologiczna, nie pozostaje ona wolna od wielu ograniczeń. Jednym z głównych problemów jest tzw. okienko serologiczne (trwające ok. 2–3 tygodnie), w czasie którego serodiagnostyka jest niewskazana.

Należy pamiętać, że najlepsze wyniki w leczeniu boreliozy otrzymuje się, gdy odpowiednia antybiotykoterapia zostanie wdrożona najszybciej jak to możliwe. Opóźnienie w diagnozie, związane z okienkiem serologicznym, może prowadzić do szerokiego zakresu problemów zdrowotnych dla pacjenta, takich jak zaburzenia neurologiczne, zapalenie mięśnia sercowego i zapalenie stawów. Z tego względu konieczne jest opracowanie nowych metod diagnostycznych umożliwiających roz-

poznanie boreliozy już w początkowych etapach infekcji. Innym problemem są pacjenci cierpiący z powodu dysfunkcji układu immunologicznego, u których produkcja swoistych przeciwciał może być zaburzona. Dodatkowo ze względu na wysokie wymagania wzrostowe *B. burgdorferi* s.l., długi czas oczekiwania na wynik oraz niską skuteczność, diagnostyka mikrobiologiczna nie może być alternatywą dla serodiagnostyki.

W tych przypadkach rozwiązaniem powyższych problemów wydają się być metody molekularne, charakteryzujące się prostotą wykonania oraz krótkim czasem oczekiwania na wynik. Umożliwiają one wykrycie DNA *B. burgdorferi* s.l. w organizmie człowieka jeszcze przed pojawieniem się we krwi swoistych przeciwciał. Pozwala to na bardzo wczesne wdrożenie leczenia, co uniemożliwia patogenom rozprzestrzenienie się w organizmie pacjenta.

O popularności idei wykorzystania reakcji PCR w diagnostyce boreliozy, świadczy duża liczba publikacji naukowych opisujących jej zastosowanie w detekcji DNA *B. burgdorferi* s.l. Szybki rozwój metod biologii molekularnej zaowocował opracowaniem nowych odmian reakcji PCR, które charakteryzują się wyższą czułością oraz pozwalają na dokładniejsze kontrolowanie specyficzności reakcji. Zalety te sprawiają, iż obecnie w większości doniesień naukowych wykorzystywane są nowocześniejsze metody amplifikacji DNA *B. burgdorferi* s.l., takie jak RT-PCR oraz wewnętrzny PCR. Dodatkowo, metody szybkiego i taniego sekwencjonowania DNA umożliwiły dokładne poznanie genomu wielu bakterii z rodzaju *Borrelia*. Dzięki temu można wytypować wysoko zakonserwowane fragmenty, pozwalające na detekcję wszystkich genogatunków *B. burgdorferi* s.l. lub takie, których różnice w sekwencji umożliwiają szybką ich identyfikację. Obecnie jako cele molekularne wykorzystywane są zarówno geny umiejscowione na chromosomie (wyższy stopień zakonserwowania), jak i te zlokalizowane na plazmidach (większa różnorodność).

Dotychczasowe doniesienia literaturowe udowadniają, iż diagnostyka molekularna charakteryzuje się

wysoką specyficznością (z wyjątkiem prób moczu) oraz stosunkowo dużą czułością. Niestety, pomimo tych niezaprzeczalnych zalet, testy diagnostyczne oparte na reakcji PCR muszą sprostać wielu wyzwaniom. Największym problemem jest brak wystandaryzowanych protokołów jasno opisujących poszczególne etapy testów. Testy molekularne opisane w pracach naukowych różnią się od siebie prawie w każdym aspekcie. Wykorzystują różne typy reakcji PCR (klasyczny PCR, Real-Time PCR, wewnętrzny PCR, PCR/ESI-MS), odmienne cele molekularne (*hbb*, *fla*, *rrs*, *rfl*, region międzygenowy *rfl-rrf*, *recA*, *bmpA*, *p66*, *ospA*, *ospC*, *dbpA*) oraz zróżnicowane rodzaje próbek klinicznych (wycinek skóry, płyn stawowy, CSF, krew, mocz). Brak standaryzacji metod molekularnych dotyczy również procedur mających miejsce bezpośrednio przed właściwym testem diagnostycznym tj. objętość pobieranej próbki, sposób jej przechowywania oraz metody izolacji materiału genetycznego. Mimo tego, iż wykazano wpływ przebiegu wyżej wymienionych czynności na czułość reakcji PCR [2, 3, 11], w wielu przypadkach autorzy publikacji nie zamieszczali w pracach ich opisu. Z powodu wspomnianych różnic i niedopowiedzeń uzyskane przez różne zespoły badawcze wyniki są często rozbieżne i niejednoznaczne. Konieczne wydaje się zatem przeprowadzenie wiarygodnych i rzetelnych badań porównawczych mających na celu opracowanie najbardziej optymalnego testu diagnostycznego opartego o reakcję PCR.

Prawdopodobnie właśnie z wyżej wymienionych powodów diagnostyka molekularna boreliozy stanowi obecnie jedynie wsparcie dla testów serologicznych. Jednakże, coraz więcej agencji ochrony zdrowia zaczyna dostrzegać jej potencjał i wprowadza w swoich wytycznych możliwość zastosowania testów diagnostycznych polegających na bezpośredniej detekcji DNA *B. burgdorferi* s.l. Jak na razie, rekomendacje te obejmują rzadkie przypadki nietypowych objawów EM, ACA, BL oraz wczesnych faz infekcji, jednakże jeszcze kilka, kilkanaście lat temu metody PCR nie były w ogóle uwzględnione w klinicznej diagnostyce boreliozy. Kolejną przeszkodą w powszechnym stosowaniu metod molekularnych w rozpoznaniu choroby z Lyme jest fakt, iż dostępne na rynku testy diagnostyczne, głównie oparte o reakcję RT-PCR (np. ViPrimePLUS Lyme disease qPCR Kit (Vivantis Technologies, Malezja), Lyme Disease genesig Advanced Kit (Primerdesign™, Wielka Brytania), Lyme Disease Real-time PCR Kit (NZYtech, Portugalia) w większości przypadków nie posiadają odpowiednich certyfikatów pozwalających na ich wykorzystanie w rutynowej diagnostyce pacjentów.

Na świecie nadal prowadzone są badania mające na celu opracowanie skutecznego testu do diagnostyki boreliozy opartego o reakcję PCR. Część z nich dotyczy

lepszego poznania genomu *B. burgdorferi* s.l. i ich zadaniem jest wyodrębnienie sekwencji DNA mogących być nowymi celami molekularnymi. Inne natomiast skupione są na poszukiwaniu nowych schematów diagnostycznych. Szczególnie interesująca wydaje się koncepcja łącząca reakcję PCR ze spektrometrią masową (PCR/ESI-MS), która pozwala na szybką i dokładną identyfikację patogenów. Metoda ta wykazała bardzo dużą przydatność w precyzyjnej identyfikacji szerokiej gamy patogenów we krwi, tkankach pacjentów oraz organizmach wektorowych [4, 14, 15, 22, 55]. Dlatego wydaje się, iż może stanowić ważny filar w diagnostyce boreliozy, szczególnie ze względu na swoją czułość i wysoki potencjał różnicujący.

Obecnie, mimo wielu obiecujących doniesień naukowych metody molekularne nie są wystarczająco wystandaryzowane by mogły zastąpić rutynowo stosowaną serodiagnostykę. Jednakże, szybki rozwój biologii molekularnej i intensywne badania mające na celu dokładne poznanie genomu *B. burgdorferi* s.l. dają nadzieję, iż w przyszłości diagnostyka molekularna będzie powszechnie stosowana w rozpoznaniu boreliozy.

Piśmiennictwo

1. Aguero-Rosenfeld M., Wang G., Schwartz I., Wormser G.: Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 484–509 (2005)
2. Bergmann A.R., Schmidt B.L., Derler A.M., Aberer E.: Importance of sample preparation for molecular diagnosis of Lyme borreliosis from urine. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4581–4584 (2002)
3. Brettschneider S., Bruckbauer H., Klugbauer N., Hofmann H.: Diagnostic value of PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy and urine samples from patients with skin borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2658–2665 (1998)
4. Brinkman C.L., Vergidis P., Uhl J.R., Pritt B.S., Cockerill F.R., Steckelberg J.M., Baddour L.M., Maleszewski J.J., Edwards W.D., Sampath R., Patel R.: PCR-electrospray ionization mass spectrometry for direct detection of pathogens and antimicrobial resistance from heart valves in patients with infective endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 2040–2046 (2013)
5. Brisson D., Drecktrah D., Eggers C.H., Samuels D.S.: Genetics of *Borrelia burgdorferi*. *Annu. Rev. Genet.* **46**, 515–536 (2012)
6. Canadian Public Health Laboratory Network. The Laboratory Diagnosis of Lyme Borreliosis: Guidelines from the Canadian Public Health Laboratory Network. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **18**, 145–148 (2007)
7. Casjens S., Fraser C.M. i wsp.: 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)
8. Casjens S.R., Gilcrease E.B., Vujadinovic M., Mongodin E.F., Luft B.J., Schutzer S.E., Fraser C.M., Qiu W.G.: Plasmid diversity and phylogenetic consistency in the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*. *BMC Genomics*, **18**, 1–18 (2017)
9. Casjens S.R., Khouri H.M. i wsp.: Genome stability of Lyme disease spirochetes: comparative genomics of *Borrelia burgdorferi* plasmids. *Plos One*, **7**, e33280 (2012)

10. Colli C., Leinweber B., Müllegger R., Chott A., Kerl H., Ceroni L.: *Borrelia burgdorferi*-associated lymphocytoma cutis: clinicopathologic, immunophenotypic, and molecular study of 106 cases. *J. Cutan. Pathol.* **31**, 232–240 (2004)
11. van Dam A.P.: Molecular diagnosis of *Borrelia* bacteria for the diagnosis of Lyme disease. *Expert Opin. Med. Diagn.* **5**, 135–149 (2011)
12. Dunaj J., Moniuszko A., Zajkowska J., Panacewicz S.: The role of PCR in diagnostics of Lyme borreliosis. *Przegl. Epidemiol.* **67**, 35–39 (2013)
13. Eldin C., Raffetin A., Bouiller K., Hansmann Y., Roblot F., Raoult D., Parola P.: Review of European and American guidelines for the diagnosis of Lyme borreliosis. *Med. Mal. Infect.* **49**, 121–132 (2019)
14. Eshoo M.W., Crowder C.C., Rebman A.W., Rounds M.A., Matthews H.E., Picuri J.M., Soloski M.J., Ecker D.J., Schutzer S.E., Aucott J.N.: Direct molecular detection and genotyping of *Borrelia burgdorferi* from whole blood of patients with early Lyme disease. *Plos One*, **7**, 3–8 (2012)
15. Eshoo M.W., Schutzer S.E., Crowder C.D., Carolan H.E., Ecker D.J.: Achieving molecular diagnostics for Lyme disease. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **13**, 875–883 (2013)
16. Ferdin J., Cerar T., Strle F., Ružič-Sabljic E.: Evaluation of real-time PCR targeting *hbb* gene for *Borrelia* species identification. *J. Microbiol. Methods.* **82**, 115–119 (2010)
17. Fraser C.M., Venter J.C. i wsp.: Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, **390**, 580–586 (1997)
18. Gąsiorowski J., Witecka-Knysz E., Knysz B., Gerber H., Gładysz A.: Diagnostyka boreliozy. *Med. Pr.* **58**, 439–447 (2007)
19. Grąźlewska W., Holec-Gąsior L.: Antygeny rekombinantowe w diagnostyce serologicznej boreliozy. *Postępy Mikrobiol.* **58**, 399–413 (2019)
20. Hofmann H., Fingerle V., Hunfeld K.P., Huppertz H.I., Krause A., Rauer S., Ruf B., Consensus group C.: Cutaneous Lyme borreliosis: Guideline of the German Dermatology Society. *Ger. Med. Sci.* **15**, 1–31 (2017)
21. Jaulhac B., Chary-Valckenaere I., Sibia J., Javier R.M., Piémont Y., Kuntz J.L., Monteil H., Pourel J.: Detection of *Borrelia burgdorferi* by DNA amplification in synovial tissue samples from patients with Lyme arthritis. *Arthritis Rheum.* **39**, 736–745 (1996)
22. Kaleta E.J., Clark A.E., Johnson D.R., Gamage D.C., Wysocki V.H., Cherkaoui A., Schrenzel J., Wolk D.M.: Use of PCR coupled with electrospray ionization mass spectrometry for rapid identification of bacterial and yeast bloodstream pathogens from blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 345–353 (2011)
23. Kondrusik M., Grygorczuk S., Skotarczak B., Wodecka B., Rymaszewska A., Pancewicz S., Zajkowska J., Świerzińska R., Hermanowska-Szpakowicz T.: Molecular and serological diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infection among patients with diagnosed erythema migrans. *Ann. Agric. Environ. Med.* **14**, 209–213 (2007)
24. Kotłowski R., Holec-Gąsior L.: Identification of evolutionary conserved DNA sequence and corresponding S21 ribosomal protein region for diagnostic purposes of all *Borrelia spirochetes*. *Acta Biochim. Pol.* **66**, 119–122 (2019)
25. 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)
26. Lee S.H., Vigliotti V.S., Vigliotti J.S., Jones W., Pappu S.: Increased sensitivity and specificity of *Borrelia burgdorferi* 16S ribosomal DNA detection. *Am. J. Clin. Pathol.* **133**, 569–576 (2010)
27. 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)
28. Maraspin V., Ogrinc K., Ružič-Sabljic E., Lotrič-Furlan S., Strle F.: Isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from blood of adult patients with borreliac lymphocytoma, Lyme neuroborreliosis, Lyme arthritis and acrodermatitis chronica atrophicans. *Infection*, **39**, 35–40 (2011)
29. Margos G., Kurtenbach K. i wsp.: MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 8730–8735 (2008)
30. Margos G., Vollmer S.A., Ogden N.H., Fish D.: Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infect. Genet. Evol.* **11**, 1545–1563 (2011)
31. Matyjasek A., Zdrojewski Z.: Borelioza — najnowsze rekomendacje w diagnostyce i leczeniu. *Forum Reumatol.* **2**, 58–64 (2016)
32. Mursic P.: Kill Kinetics of *Borrelia burgdorferi* and bacterial findings in relation to the treatment of Lyme borreliosis. *Infection*, **27**, 9–16 (1996)
33. Mygland Å., Ljøstad U., Fingerle V., Rupprecht T., Schmuthard E., Steiner I.: EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *Eur. J. Neurol.* **17**, 8–16 (2010)
34. 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 English J. Med.* **323**, 1120–1123 (1994)
35. Nowakowski J., Schwartz I., Liveris D., Wang G., Aguerro-Rosenfeld M.E., Girao G., McKenna D., Nadelman R.B., Cavaliere L.F., Wormser G.P.: Laboratory diagnostic techniques for patients with early Lyme disease associated with erythema migrans: a comparison of different techniques. *Clin. Infect. Dis.* **33**, 2023–2027 (2002)
36. Ohnishi J., Piesman J., de Silva A.M.: Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 670–675 (2001)
37. Pancewicz S., Moniuszko-Malinowska A., Garlicki A., Czupryna P., Grygorczuk S., Dunaj J.: Diagnostyka i leczenie boreliozy z Lyme. Standardy Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych. Polskie Towarzystwo Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych, <http://www.pteilchz.org.pl/informacje/rekomendacje> (2018)
38. 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)
39. Persing D.H., Rutledge B.J., Rys P.N., Podzorski D.S., Mitchell P.D., Reed K.D., Liu B., Fikrig E., Malawista S.E.: Target imbalance: Disparity of *Borrelia burgdorferi* genetic material in synovial fluid from Lyme arthritis patients. *J. Infect. Dis.* **169**, 668–672 (1994)
40. Portnoi D., Sertour N., Ferquel E., Garnier M., Baranton G., Postic D.: A single-run, real-time PCR for detection and identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, based on the *hbb* gene sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* **259**, 35–40 (2006)
41. Priem S., Rittig M.G., Kamradt T., Burmester G.R., Krause A.: An optimized PCR leads to rapid and highly sensitive detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 685–690 (1997)
42. Rauter C., Oehme R., Diterich I., Engele M., Hartung T.: Distribution of clinically relevant *Borrelia* genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 36–43 (2002)

43. Reed K.D.: Laboratory testing for Lyme disease: possibilities and practicalities. *J. Clin. Microbiol.* **402**, 319–324 (2002)
44. Ružić-Sabljić E., Cerar T.: Progress in the molecular diagnosis of Lyme disease. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **17**, 19–30 (2017)
45. Saier M.H., Paulsen I.T.: Whole genome analyses of transporters in Spirochetes: *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**, 393–399 (2000)
46. Samuels D.S.: Gene Regulation in *Borrelia burgdorferi*. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**, 479–499 (2011)
47. Schmidt B.: PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 185–201 (1997)
48. Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L., John R.: PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* **113**, 1014–1026 (2012)
49. Sicklinger M., Wienecke R., Neubert U.: In vitro susceptibility testing of four antibiotics against *Borrelia burgdorferi*: A comparison of results for the three genospecies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, and *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 1791–1793 (2003)
50. Stanek G., Reiter M.: The expanding Lyme *Borrelia* complex – clinical significance of genomic species? *Clin. Microbiol. Infect.* **17**, 487–493 (2011)
51. Stanek G., Strle F.: Lyme borreliosis – from tick bite to diagnosis and treatment. *FEMS Microbiol. Rev.* **42**, 233–258 (2018)
52. Stanek G., Wormser G.P., Gray J., Strle F.: Lyme borreliosis. *Lancet*, **379**, 461–473 (2012)
53. Theisen M., Frederiksen B., Lebech A.M., Vuust J., Hansen K.: Polymorphism in ospC gene of *Borrelia burgdorferi* and immunoreactivity of OspC protein: Implications for taxonomy and for use of OspC protein as a diagnostic antigen. *J. Clin. Microbiol.* **31**, 2570–2576 (1993)
54. Wodecka B., Leońska A., Skotarczak B.: A comparative analysis of molecular markers for the detection and identification of *Borrelia* spirochaetes in *Ixodes ricinus*. *J. Med. Microbiol.* **59**, 309–314 (2010)
55. Wu C.J., Chen T.Y. i wsp.: Identification of fungal pathogens from clinical specimens using multi-locus PCR coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **78**, 141–143 (2014)