



DR N. FARM. INŻ. PATRYK MATUSZEK

KIEROWNIK DZIAŁU SZKOLEŃ I INFORMACJI NAUKOWEJ,
PRODUCT MANAGER DS. BORELIOZY

Nowatorskie antygeny stosowane w testach Blot anty-Borrelia

Wstęp

Borelioza jest chorobą zakaźną wywołaną przez krętka *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Rezerwuarem *B. burgdorferi* są dziko żyjące w lesie zwierzęta: gryzonie, jelenie, dziki oraz inne ssaki i ptaki. Kleszcz, żywiąc się ich krwią, staje się źródłem zakażenia dla człowieka. Przebywając w miejscach występowania kleszcza, stajemy się jego potencjalnymi żywicielami. Krętki *Borrelia* przenoszone są na człowieka podczas ukłucia przez zainfekowanego kleszcza (*Ixodes ricinus*). W USA występuje jeden patogenny dla człowieka gatunek *B. burgdorferi sensu stricto*, podczas gdy w Europie wyróżnia się ich aż cztery: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii* oraz *B. spielmanii*.

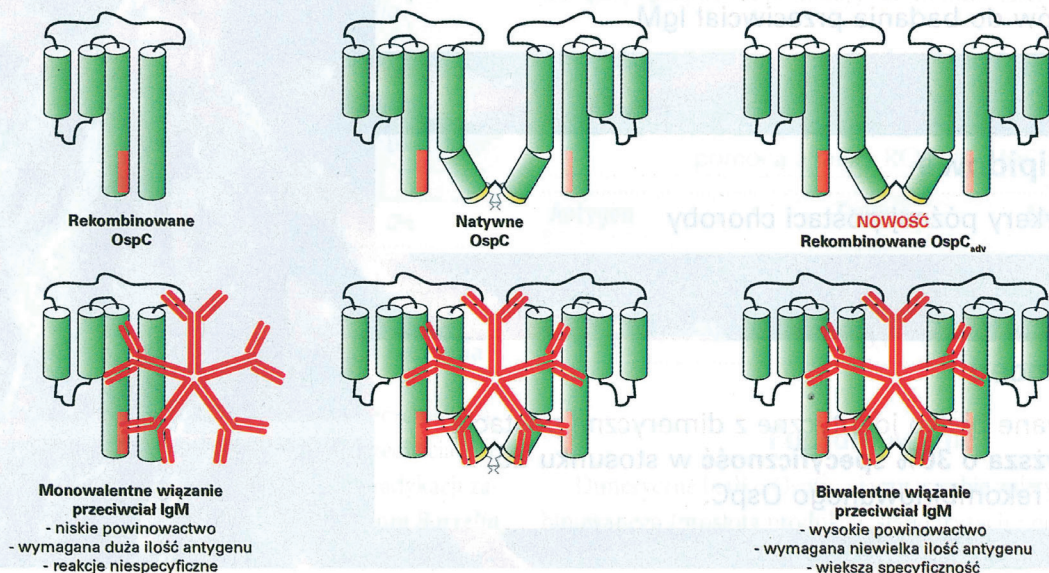
W efekcie zakażenia dochodzi do indukcji komórkowej oraz humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Mnogość antygenów z *B. burgdorferi* skutkuje pojawianiem się w surowicy chorego szeregu różnych przeciwciał. Obecnie zalecana strategia diagnostyczna zakłada wykrycie specyficznych dla *B. burgdorferi* przeciwciał poprzez zastosowanie dwuetapowej strategii: w pierwszej kolejności należy wykonać test ELISA, następnie Westernblot, jako test potwierdzenia.

Białko OspC: natywne, rekombinant monomer, rekombinant dimer

Białko OspC (ang. *Outer surface protein C*) jest **najważniejszym antygenem dla przeciwciał klasy IgM we wczesnym stadium boreliozy**. Przeciwciała IgM przeciwko OspC są **wysoko specyficznym i głównym markerem wczesnego zakażenia**. Ich **prewalencja u pacjentów ze świeżą boreliozą sięga 90%**. Białko OspC w testach Immunoblot stosowane było przez lata w postaci natywnej. Jednakże produkcja testów Blot z natywnymi antygenami wymaga czasochłonnej hodowli *in vitro* i wiąże się ze znacznymi kosztami. Ekspresja antygeny OspC jest zależna od wielu czynników, m.in. temperatury, stężenia tlenu i dwutlenku węgla, co znacznie utrudnia standaryzację produkcji natywnej postaci tego białka [1].

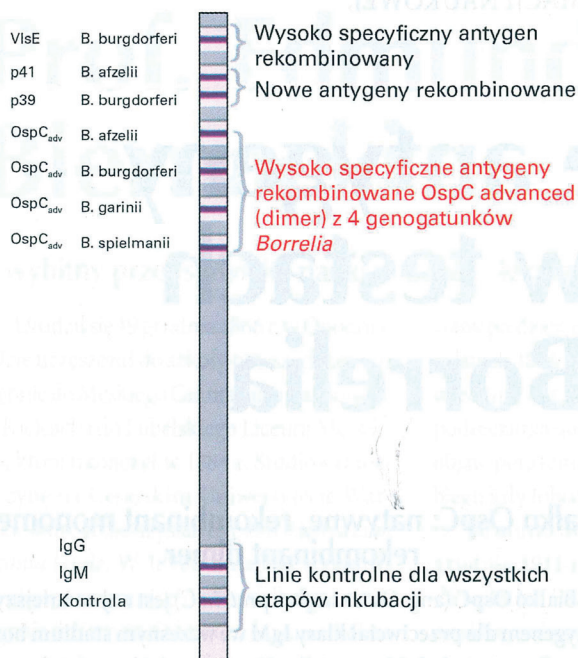
Dotychczas w testach ELISA oraz Immunoblot stosowano rekombinowane białko OspC w postaci monomeru bez N-terminalnej sekwencji sygnałowej oraz sąsiadującej reszty cysteinowej, które stanowią immunogeny fragment. Rekombinanty pozbawione reszty cysteinowej są poddawane odmiennym reakcjom potranslacyjnym, co prowadzi do obniżonej specyficzności takiego antygeny i większej liczby wyników fałszywych. Dlatego rekombinowane białko OspC było mniej specyficzne od natywnego [2].

Rysunek 1. Porównanie właściwości rekombinowanego OspC z postacią natywną i OspC_{adv}.



Rysunek 2. Skład antygenowy testu Anty-Borrelia EUROLINE RN-AT IgM_{adv}

TEKST PROMOCYJNY



Przełomem było poznanie **struktury białka OspC**, które w ścianie komórkowej bakterii występuje w postaci **dimerycznej**. Taka forma antygeny zapewnia bardziej specyficzne, bivalentne wiązanie przeciwciał IgM (Rysunek 1).

W roku 2012 naukowcom z Instytutu Immunologii Doświadczalnej EUROIMMUN AG (Lubeka) udało się stworzyć i opatentować technologię produkcji rekombinowanego OspC, w którym dwie monomeryczne podjednostki białka połączone są mostkiem disiarczkowym w dimer. W takiej postaci rekombinowane białko OspC posiada identyczne właściwości antygenowe jak postać natywna, a w porównaniu do klasycznego rekombinowanego OspC wykazuje o 30% wyższą specyficzność [1]. Różnice wynikają prawdopodobnie z bivalentnego wiązania IgM zapewniającego wyższe powinowactwo przeciwciał IgM do dimeru OspC advanced (OspC_{adv}). Ten nowy antygen zastosowany został w testach Immunoblot firmy EUROIMMUN (Anty-Borrelia EUROLINE RN-AT IgG, IgM_{adv}).

Antygeny lipidowe

Stosowane w testach serologicznych antygeny białkowe stanowią standard. Okazuje się, że również frakcje lipidowe z *B. burgdorferi* i *B. afzelii* wykazują silną immunogenność.

Prof. Bettina Wilske, autorka niemieckich standardów diagnostyki boreliozy, na które powołują się ośrodki opiniotwórcze w Polsce, opublikowała w 2009 roku pracę opisującą przydatność frakcji lipidowych w diagnostyce boreliozy [3]. W przeprowadzonych badaniach udowodniono wysoką immunogenność dwóch frakcji:

- 6-O-acylo-β-D-galaktopiranozyd cholesterolu (ACGal)
- mono-beta-D-galaktopiranozyd diacyloglicerolu (MGalD)

Przeciwciała przeciwko ACGal i MGalD wykazują wysoką specyficzność dla zakażeń *B. burgdorferi*, przy czym przeciwciała

Anty-Borrelia RN-AT IgG/IgM advanced

I. Antygeny rekombinowane różnych genogatunków Szerokie spektrum antygenów:

- 14 antygenów do badania przeciwciał IgG
- 7 antygenów do badania przeciwciał IgM

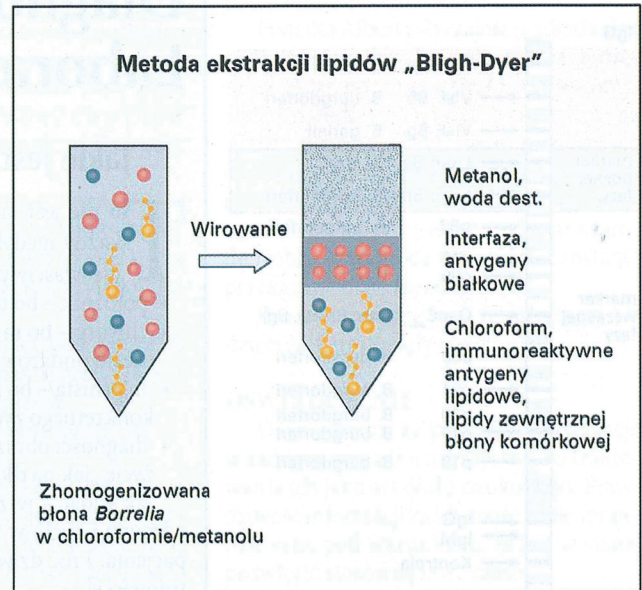
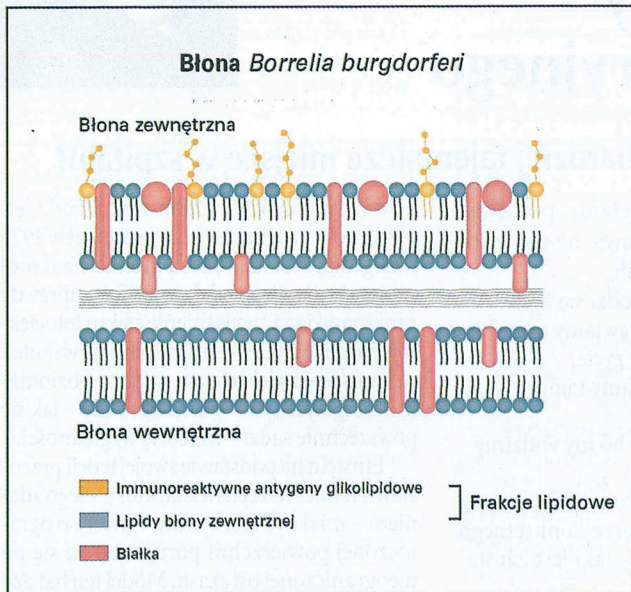
II. Antygeny lipidowe

Unikalne markery późnej postaci choroby

III. OspC advanced

Rekombinowane białko identyczne z dimeryczną postacią natywną. Wyższa o 30% specyficzność w stosunku do klasycznego, rekombinowanego OspC.

Rysunek 3. Proces ekstrakcji antygenów lipidowych z *B. afzelii* i *B. burgdorferi*.



TEKST PROMOCYJNY

anty-ACGal występują z wyższą prevalencją, co jest spowodowane obfitym występowaniem frakcji ACGal w trzech najistotniejszych klinicznie gatunkach *B. burgdorferi sensu lato*.

Przeciwciała przeciwko lipidom a postać boreliozy

W badaniach prof. Wilske oceniano, czy pacjenci z boreliozą w różnych stadiach choroby wytwarzają przeciwciała przeciwko lipidom. Zbadano 68 pacjentów: 20 z rumieniem wędrującym (EM), 19 z wczesną neuroboreliozą (NB), 14 z *Acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA) i 15 z zapaleniem stawów (*Lyme Arthritis*, LA). Przebadano również 20 próbek od zdrowych osób.

Przeciwciała przeciwko ACGal w klasie IgG stwierdza się w surowicach pacjentów wszystkich faz boreliozy, jednak najczęściej u pacjentów w późnej fazie choroby (Tabela 1). Ponad 80% chorych z późną fazą zakażenia wytwarza przeciwciała przeciwko ACGal w mianach sięgających 1:32 000 [3].

Tabela 1. Prewalencja przeciwciał przeciwko antygenom lipidowym (MGalD oraz ACGal) krętków *Borrelia* w zależności od postaci choroby [3].

Przeciwciała przeciwko:	Postać choroby			Dawcy krwi
	Rumień wędrujący	Neuroborelioza	ACA/LA	
MGalD	10%	0%	21,10%	0%
ACGal	5%	21,10%	82,80%	0%

Przeciwciała przeciwko lipidom a powodzenie leczenia

Spadek przeciwciał przeciwko ACGal i MGalD po leczeniu u pacjentów z *Lyme Arthritis* jest nieznaczny. Dlatego przeciwciała te nie mogą służyć jako marker powodzenia leczenia i eradykacji zakażenia. Przeciwnie: **odpowieź przeciwko glikolipidom *Borrelia* utrzymuje się przez lata po zakażeniu.** Co więcej, u tych pacjentów

nie obserwowano reinfekcji. Dlatego **glikolipidy wydają się przydatne do immunizacji** [4].

Zastosowanie antygenów lipidowych w diagnostyce rutynowej

Pojęcie antygeny natywnego czy rekombinowanego zarezerwowane jest wyłącznie dla antygenów białkowych. W przypadku antygenów lipidowych pojęcia te nie mają sensu, gdyż rekombinować można wyłącznie białka. Dwie immunogenne frakcje lipidowe z *B. afzelii* i *B. burgdorferi* zostały zatem wyekstrahowane bezpośrednio z zewnętrznej błony komórkowej metodą „Bligh-Dyer” (Rysunek 3). Po ich oczyszczeniu zostały umieszczone na paskach membranowych w teście Anty-Borrelia EUROLINE RN-AT IgG, a następnie określono ich czułość i specyficzność (Tabela 2). **Przeciwciała przeciwko lipidom *Borrelia* często wskazują na późną fazę infekcji,** dlatego czułość, która podyktowana jest prevalencją przeciwciał, wynosi ok. 25%. Warto zwrócić uwagę, że specyficzność obu frakcji lipidów w tych badaniach sięgnęła 100%, co przemawia za tym, że antygeny lipidowe nie powodują reakcji nieswoistych.

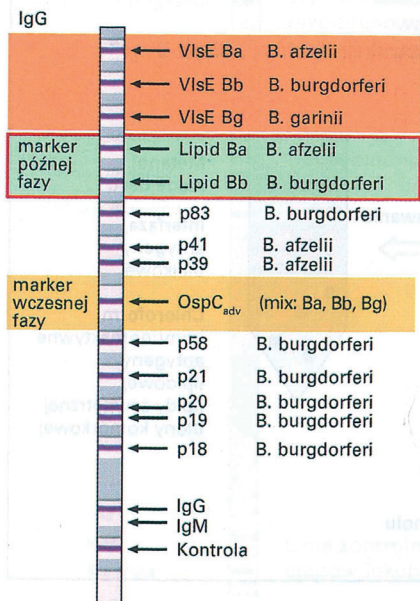
Tabela 2. Specyficzność i czułość antygenów lipidowych zastosowanych w teście Anty-Borrelia EUROLINE RN-AT do oznaczania przeciwciał klasy IgG obliczone za pomocą analizy ROC (n = 617).

Antygen	Czułość (%)	Specyficzność (%)
Lipid Ba	25,1	100
Lipid Bb	25,1	99,6

Podsumowanie

Dimeryczne białko OspC_{adv} łączy w sobie zalety białka rekombinowanego (prostota produkcji, standaryzacji i porównywalność wyników) i białka natywnego OspC (wysoka swoistość). W prze-

Rysunek 4. Skład antygenowy testu Anty-Borrelia EUROLINE RN-AT IgG.



ciwieństwie do powszechnie używanych, monomerycznych rekombinowanych OspC – OspC_{adv} pozwala na oznaczenie specyficznych dla boreliozy przeciwciał IgM ze swoistością, którą dotychczas można było osiągnąć jedynie przy użyciu natywnych antygenów.

Testy wykorzystujące antygeny lipidowe cechuje wysoka czułość (szczególnie w późnych stadiach choroby) oraz wybitna swoistość, gdyż przeciwciał tych nie wykryto u osób zdrowych. Włączenie lipidów do panelu antygenów w diagnostyce serologicznej boreliozy dostarcza lekarzowi dodatkowych informacji, a mianowicie w przypadku objawów klinicznych wskazuje na długo trwającą infekcję.

PIŚMIENNICTWO

1. C. Probst, A. Ott, T. Scheper, W. Meyer, W. Stöcker, L. Komorowski. *N-terminal disulfide-bridging of Borrelia outer surface protein C increases its diagnostic and vaccine potentials*. Ticks Tick Borne Dis. 2012; 3: 1-7.
2. P. Brouqui, F. Bacellar, B. Ranton et al. *Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe*. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10, 1108-1132.
3. G. Stübs, V. Fingerle, B. Wilske et al. *Acylated cholesteryl galactosides are specific antigens of Borrelia causing lyme disease and frequently induce antibodies in late stages of disease*. J. Biol. Chem. 2009; 284: 13326-13334.
4. K.L. Jones, R.J. Seward, G. Ben-Menachem et al. *Strong IgG antibody responses to Borrelia burgdorferi glycolipids in patients with Lyme Arthritis, a late manifestation of the Infection*. Clin. Immunol. 2009; 132: 93-102.