

СЕРОЛОГИЧНИТЕ МЕТОДИ В ДИАГНОСТИКАТА НА ЛАЙМСКАТА БОЛЕСТ - ПРЕДИЗВИКАТЕЛСТВО В ЛАБОРАТОРНАТА ПРАКТИКА

Станислава Попова¹, Теодора Катранджиева^{2,3}, Габриела Цанкова²,
Цветелина Костадинова^{1,3}, Татина Тодорова^{2,3}, Живка Стойкова^{2,3}

¹УС „Медицински лаборант“, Медицински колеж, Медицински университет – Варна

²Катедра „Микробиология и вирусология“, Факултет по медицина,
Медицински университет – Варна

³Лаборатория по вирусология, УМБАЛ „Св. Марина“ – Варна

SEROLOGICAL METHODS IN THE DIAGNOSIS OF LYME DISEASE: A CHALLENGE IN LABORATORY PRACTICE

Stanislava Popova¹, Teodora Katrandzhieva^{2,3}, Gabriela Tsankova²,
Tsvetelina Kostadinova^{1,3}, Tatiana Todorova^{2,3}, Zhivka Stoykova^{2,3}

¹TS Medical Laboratory Assistant, Medical College, Medical University of Varna

²Department of Microbiology and Virology, Faculty of Medicine,
Medical University of Varna

³Laboratory of Virology, St. Marina University Hospital, Varna

РЕЗЮМЕ

Лаймската болест се причинява от бактерии от комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* и е най-честата инфекция преносима от кърлежи в Европа и Северна Америка. Одобрени за лабораторна диагностика са серологичните методи, като CDC продължава да изисква двустепенен алгоритъм в използването им. Серологичните методи имат сериозни ограничения, които трябва да се имат предвид при интерпретация на резултатите. Направихме преглед на литературни източници с фокус стандартния (STTT), който се прилага в нашата страна, и модифицирания двустепенен алгоритъм (MTTT).

Ключови думи: *Borrelia burgdorferi*, лаймска болест, стандартен двустепенен тест (STTT), модифициран двустепенен тест (MTTT)

ABSTRACT

Lyme disease is caused by bacteria of the *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex and is the most common tick-borne infection in Europe and North America. Serological methods are approved for laboratory diagnosis, and the CDC continues to recommend a two-step algorithm for their use. However, serological methods have significant limitations that must be considered when interpreting results. We reviewed literature sources with a focus on the standard two-tiered testing (STTT), which is applied in our country, and the modified two-tiered testing (MTTT).

Keywords: *Borrelia burgdorferi*, Lyme disease, standard two-tiered testing (STTT), modified two-tiered testing (MTTT)

ОБЗОР

Лаймската болест е кърлежово-преносима инфекция с ендемично широко разпространение. Честотата ѝ е най-висока в умерените климатични зони на северното полукълбо, по-специално в Северна Америка и Европа. В Европа честотата варира от ниска до незначителна в Обединеното кралство, до 80 случая на 100 000 души в Холандия, Белгия, Австрия, Словения, Италия, Литва и Естония. Географското разпространение на заболяването е свързано с векторите и с изменението на климата (13,36). Кърлежите са силно чувствителни към промените в сезонния климат и това вероятно ще улесни разпространението в някои региони, като същевременно ще намали честотата в райони, които стават по-горещи и по-сухи (15). В България от началото на 2024 г. до 35-ата седмица в епидемиологичния бюлетин на НЦЗПБ се съобщава за 262 регистрирани случая (със 113 повече за същия период през 2023 г.). За сравнение случаите на марсилска треска за същия период са 64 (16).

Причинители на заболяването са извити бактерии от комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* (sl), характеризирайки се с определени геновидове, предаващи се с кърлежи от рода *Ixodes* и с резервоар дребни гризачи, насекомоядни, зайци, птици и др. (33). Геновидовете са различни по отношение на клинична проява, разпространение в човешкото тяло, а също и по отношение на експресията на антигени. Към това трябва да се прибави и различното им разпространение в Европа и САЩ. В Европа се срещат най-много видове, поне 5 от комплекса *B. burgdorferi sl*, като *B. afzelii*, *B. garinii* и *B. burgdorferi sensu stricto* (ss) са най-честите и важни патогени за човека. *B. burgdorferi ss* се манифестира по-често с артритна симптоматика, *B. afzelii* причинява кожни инфекции, а *B. garinii* е невротропна. Всеки вид обаче носи потенциала да засегне и друга система (8,13).

За клинични цели лаймската болест се разделя на ранен локализиран, ранно дисеминиран и късен стадий. Заболяването обикновено се манифестира с кожна лезия (еритема мигранс, ЕМ) в около 70% от ранните случаи, представляваща разширяващо се зачервяване описвано като „биболско око“. Появява се от няколко дни до няколко седмици на мястото на ухапване от кърлеж. ЕМ може да се представи и в морфологично различни форми и да затрудни разпознаването ѝ. Въпреки че е лечимо с антибиотици заболяване, инфектиращите патогени могат да се разпространят в други тъкани и органи и да засегнат нервната система, ставите, сърцето и кожата.

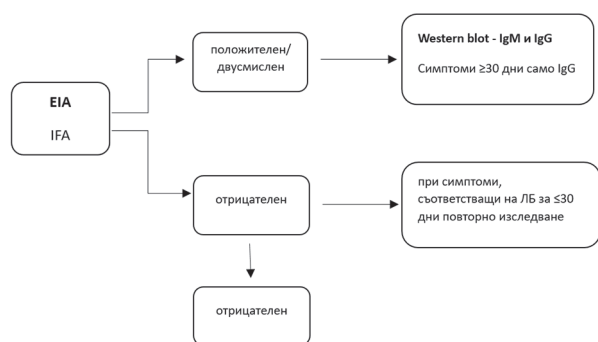
Различните геновидове *B. burgdorferi* в Европа и в САЩ, значителната хетерогенност между щамовете в рамките на всеки вид и различните проявления на лаймската болест изискват прецизна и подходяща диагностика (32).

Диагноза на лаймската болест

Диагнозата лаймска борелиоза се основава на наличието на специфични симптоми, данни за епидемиологично разпространение, анамнеза за ухапване от кърлеж и лабораторни данни. Лабораторното потвърждение е от съществено значение в случай на неспецифични прояви и при късните фази на заболяването. Методите за диагностика са директни, откриващи причинителя, неговата нуклеинова киселина или антигени и индиректни, основаващи се на имунния отговор. Директното микроскопско наблюдение е ограничено поради ниската концентрация на бактерии в телесните течности (40). *Borrelia* е взискателен микроорганизъм и може да расте на много специфични и обогатени среди при продължително култивиране, което прави този подход неприемлив за клинични цели (3). Откриване на антиген е с ниска надеждност поради същите ограничения като микроскопското откриване (24). PCR методът в лабораторната диагностика на лаймската болест дава възможност за потвърждаване на инфекцията преди образуването на антитела. Кожните лезии при повечето пациенти с ЕМ имат положителни PCR резултати за *B. burgdorferi* ДНК (10). Но молекулярните анализи, въпреки че имат висока специфичност, нямат последователна чувствителност и трябва да се използва само в комбинация със серологични тестове. Откриването на ДНК в клинични проби като кръв, урина и ликвор не е достатъчно надеждно, а откриването ѝ невинаги означава активна инфекция, тъй като ДНК на мъртвия микроб присъства месеци след успешно лечение (18). PCR сега се използва при пациенти с артрит, при които ДНК на причинителя може да бъде открита в 70% до 85% в проби синовиална течност, което не означава непременно, че инфекцията е активна (22).

STTT и MTTT лабораторни диагностични подходи

Към момента официално одобрени за диагностика на лаймска болест са серологичните методи, които се основават на откриване на антитела. Двустепенната методология е предпочитана и през 1995 г. е приет стандартизиран двустепенен алгоритъм за тестване (STTT), който се използва като референтен стандарт за оценка на нови подходи (фиг. 1).



Фиг. 1. Стандартен двустепенен тест (STTT)
Асоцииран по Hatchette T. Modified two-tiered testing
algorithm for Lyme disease serology: the Canadian context
(2020)

STTT включва чувствителен тест от първо ниво за откриване на IgM и IgG (самостоятелно или в комбинация) чрез различни техники, най-често ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) или хемилуминесцентен имуноанализ (CLIA). Тези тестове дават и информация за концентрацията на антитела в пробата. Индиректният имуофлуоресцентен тест намира по-ограничено приложение. В случаите на положителен или двусмислен анализ се преминава към Western blot (WB)/Immunoblot (IB) за IgM и/или IgG, за да се подобри специфичността. WB IgM тестът се оценява при пациенти с продължителност на заболяването ≤30 дни, защото тези антитела могат да персистират продължително време. За целите на лабораторното потвърждаване и двете нива трябва да са положителни. WB тестът е трудно изпълним, а и съществува субективност в отчитането, когато не се използва софтуер за денситометрично изследване на интензитета на лентите, затова не се препоръчва, ако ензимният имуноанализ е отрицателен (27,31,35).

Антигени, които се използват в имуноензимните тестове, са получени от местни бактерии *B. burgdorferi*, частично пречистени или рекомбинантни протеини от различни щамове, като някои анализи са комбинирани (31). Първоначалните тестове са приготвени с целоклетъчен соникатен материал (WCS), без ключови *in vivo* експресирани антигени и експресиращи антигени, които могат да свързват антитела, различни от *B. burgdorferi* (6). Това поколение тестове, въпреки че отчитат най-висока чувствителност, в ранната фаза имат ниска специфичност, особено при пациенти с други заболявания, именно поради кръстосано реагиращите антитела с протеини запазени между *B. burgdorferi* и други често срещани бактерии. В комбинация с WB специфичността се подобрява, обаче за сметка на чувст-

вителността (34). Търсенето на подобрени серологични тестове стимулира използването на рекомбинантни протеинови антигени и синтез на специфични пептиди от имунодоминантни региони запазени сред *B. burgdorferi* sl. Второ поколение тестове, базирани на консервативна област на VlsE (променлива главна протеиноподобна последователност, експресирана) за IgG и OspC (основен повърхностен антиген) като отделен антиген или като смес с други за откриване на специфични IgM антитела, се налагат като алтернатива на утвърдената двустепенна стратегия. Пептидите C6, VlsE и pepC10 са идентифицирани като антигени, които предизвикват ранен имунен отговор. В Европа са разрешени тестове на базата на VlsE и OspC за IgG и OspC за IgM чрез CLIA, които се използват и в нашата страна като първа стъпка. Предимството на тези тестове е бързината на анализа и апаратно изработване, което позволява всекидневно да се получават резултатите (1,9,13,35). Възможността за използване на базиран на C6 пептид EIA като тест от първо или второ ниво в серологията на лаймската болест е оценена в няколко проучвания (4,23,6). Синтетичният C6 пептид е базиран на непроменливата област 6 (IR6) на VlsE външно повърхностния липопротеин. IR6 остава непроменен по време на антигенна вариация и се запазва сред различните патогенните щамове и геновидове. Той е и силно имуногенен, предизвиквайки образуването на антитела, като IgG отговор към C6 е по-ранен от този срещу VlsE, но предизвиква по-слаб IgM отговор (25). Проблем в използването на тези тестове са критериите за тълкуване на резултатите. Според Rouhiainen M. (2021) както чувствителността, така и специфичността на C6 EIA тестовете могат да бъдат усъвършенствани чрез оптимизиране на стойностите на граничния индекс в зависимост от целите, за които се използва (12,20,30). При пациенти с дисеминирана лаймска болест чувствителността е оценена между 87 % и 98% при съответно 98% и 95% специфичност в две различни проучвания (4,27).

WB тестовете съгласно препоръките на CDC са част от втори етап на двустепенния протокол, въпреки че се използват и като самостоятелни тестове. Както по-горе посочихме, съществува значителна хетерогенност между щамове в рамките на всеки вид, също и в антигените, които са най-подходящи за серодиагностика. Затова при изготвянето на тест лентите за WB изборът на вид и щам е важен за постигане на оптималност в анализа и съответно трябва да са съобразени с

региона, в който ще се използват (5). В САЩ тестовете са на базата на антигени на *B. burgdorferi* ss, а в Европа включват и антигени получени от *B. afzelii* и *B. garinii*. В WB се използват електрофоретично разделени протеини на бактериите (обикновено целоклетъчен лизат) с помощта на полиакриламиден гел, последвано от трансфер (блотинг) на тези протеини върху нитроцелулозни мембранни ленти. Вариант на WB е Line blot с пречистени или рекомбинантни антигени, като се елиминира възможността за кръстосани реакции (28).

Интерпретацията на блот тестовете е въз основа на ясно дефинирани критерии, предоставени от производителя. По време на инфекция с *B. burgdorferi* се експресират много антители и вероятността дадено анти тяло да присъства и да бъде открито е ниска. Поради това за положителен тест се изисква повече от една критична лента (5 от 10 за IgG според някои производители) и две или повече за IgM. Според модифициран стандарт в Германия се изисква само една IgM лента за положителна диагноза (9,13,37,38). Плътността или интензитетът на лентата може да се сравни със слабо положителна контрола, и ако тест лентата е с плътност по-голяма или равна на контролната, резултатът се приема за положителен.

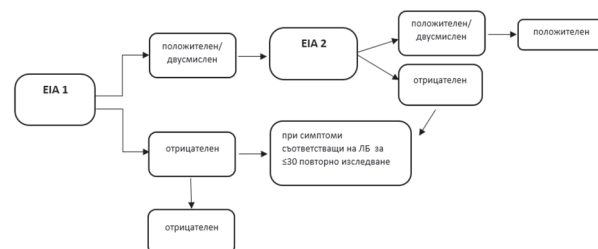
Най-важният принос на WB е, че подобрява диагностичната специфичност в комбинация с тестовете от първо ниво на STTT, но остава ниската чувствителност при ранните случаи (6). Той също генерира фалшиво положителни резултати, особено при инфекции с EBV, CMV, BKV и др. от кръстосано реагиращи антители, резултат от поликлонално активиране на лимфоцитите от вирусни супер антигени (39). За повишаване на общата чувствителност са предложени еднослойни алтернативни имуноблот анализи, често използващи антигени от множество щамове или геновидове на *B. burgdorferi* в един имуноблот включително, OspA и OspB в техния антигенен панел, в допълнение с по-малко положителни ленти от разрешените от настоящите критерии на CDC и отчитане на двусмислените резултати (28).

Одобрени от агенцията по лекарствата и храните в САЩ са 51 анализа от повече от 20 производителя, които демонстрират значителна хетерогенност на резултатите от множество проучвания (34). Метаанализ направен от Cook MJ и Puri BK (2016) определя 59,5% средна чувствителност (варира от 30,6% до 86,2%) за всички тестове, които са налични към момента на проучването в търговската мрежа, и проби, които са били

предварително определени като положителни или чрез предишен серологичен тест, или анамнеза за ЕМ, или потвърдена култура, или комбинация от тях. Най-чувствителните методи са WB и ELISA 62%. Средната стойност на тестовете, използващи синтетичния C6 пептид ELISA, е ~54%, също толкова е и чувствителността на двустепенната методология. Тя се увеличава с тежестта на симптомите и разпространението в ставите, сърцето и централната нервна система. Важно заключение от този анализ е, че чувствителността не корелира с ефективността в клиничната практика. В проучванията са включени рано взети проби, проби от пациенти вече лекувани с антибиотици или стероиди. Поради това много истински случаи могат да бъдат недостатъчно диагностицирани (9). Цялостната чувствителност на всеки двустепенен алгоритъм е равна на неговия най-малко чувствителен компонент (6).

Според проучване на Leeflang MM et al. (2016) чувствителността на серологичните тестове (ELISA или WB) в Европа е по-висока, средно ~80%, и варира значително. В случаите с ЕМ е 50%, при невробореиоза 77%, хроничен атрофичен акродерматит 97% и неуточнена лаймска бореиоза 73%. Оценката на специфичността е ~95%. Авторите отчитат като проблем високия риск от пристрастия в анализираните проучвания (21).

Проучване в САЩ на ELISA тестове, използващи VlsE1 IgG/pepC10 IgM или C6 IgG/pepC10 IgM, показват значително подобрена диагностична чувствителност (58% и 63% съответно) по време на ранната болест спрямо двустепенното тестване (38%), като същевременно поддържат висока специфичност. В по-късните стадии чувствителността на паралелните тестове и двустепенното тестване е била висока и статистически еквивалентна (2). Получаването на рекомбинантни и синтетични пептиди за ензимните имуноанализи и ограниченията в WB (вкл. и липсата му в някои региони) води до модифициране на серологичната диагностика. Модифициран дву-



Фиг. 2. Модифициран двустепенен тест (MTTT) Асоцииран no Hachette T. Modified two-tiered testing algorithm for Lyme disease serology: the Canadian context (2020)

степенен алгоритъм за тестване (МТТТ) вече е признат за приемлива алтернатива на STTT както в Канада, така и в Съединените щати (Фиг. 2).

Този подход използва два последователни теста от първо ниво и елиминира WB, за да се опрости и подобри ефективността. Предимства са по-ниската цена на изследванията и по-голямата достъпност на EIA тестовете. И двата теста трябва да са двусмислени или положителни, за да се приеме, че пациентът е положителен (19). Проучването на *Pegalajar-Jurado A et al.* (2018) демонстрира по-висока чувствителност на МТТТ спрямо STTT. Комбинацията VlsE/C6 е с най-ниската, в ранните случаи на заболяването, но с по-добра специфичност от теста с най-висока чувствителност WCS/C6 EIA (27).

Проучванията продължават с оценяване на различни комбинации, които да подобряват откриване на ранно заболяване, със специфичност еквивалентна на STTT. МТТТ, използващ C10/VlsE EIA, последван от WCS EIA, открива 28% повече ранни инфекции, като същевременно поддържа специфичност от 99,6% (19). Някои МТТТ подходи обаче не идентифицират рутинно кои антигени на *B. burgdorferi* са отговорни за положителния резултат и при съмнение за потенциално кръстосано реагиращи медицински състояния по-голяма диагностична информация за имунния отговор към *B. burgdorferi* се осигурява от IgG имуноблот (28).

Като допълнение ще представим и подход използван от Университетската болница в гр. Турку във Финландия. Лабораторията по клинична микробиология използва тристепенна серология. Тест от първо ниво е in-house WCS EIA, C6 EIA се използва като второ ниво и линеен IB на базата на Lumiplex мултиантигенен анализ. Означава се като голям серологичен пакет и може да бъде заявен от клиницистите независимо от резултатите от индивидуалното тестване (30).

При интерпретация на резултатите от серологичните тестове трябва да се вземат предвид някои факти. Всички проучвания на тези тестове за диагностика на лаймска болест посочват като основно ограничение ниската чувствителност при ранните случаи. Около половината от пациентите с ЕМ са серонегативни, тъй като IgM антителата се откриват между 3-тата и 6-ата седмица от началото на заболяването, формирайки т. нар. прозоречен период, а IgG се появяват седмици след това. За това, когато е на лице типичната клиника с ЕМ, повечето автори не препоръчват лабораторно тестване. Диагнозата е клинична или могат да се използват други методи за пот-

върждаване, като PCR от кожна биопсия се оценява на 70% чувствителност или лимфоцит трансформиращ тест (LTT), препоръчван само от германското дружество. Някои центрове за лечение на заболяването вземат изходна серумна проба, за да се проследи сероконверсия в последваща или в случаите на атипична еритема (11,14).

Ранното лечение също влияе на имунния отговор и сероконверсията може да не се открие, или ако има IgM позитивност, може да не се превключи към синтеза на IgG антитела. Откриването на антитела не е доказателство за клинично налична лаймска болест и положителната прогнозна стойност на серологичния тест е много ниска в случаите на нетипични симптоми. Според *Bunikis J et al.* лабораторното изследване има за цел да обоснове клиничната преценка на лекаря дали пациентът има заболяване, или не (7).

За да се постигне максимална специфичност, насоките посочват, че само реактивността на IgM не трябва да се използва в подкрепа на диагнозата, ако симптомите са налице повече от един месец („правилото за един месец“). Обаче при ранна дисеминирана инфекция, с неврологични аномалии или лаймски кардит, понякога пациентите могат да имат само положителен IgM WB и не напълно развит отговор на IgG антитела един месец след началото (6).

Фалшиво позитивните случаи могат да се дължат на други заболявания - вирусни инфекции, инфекция с *H. pylori*, сифилис, коинфекции, пренасяни от кърлежи (напр. анаплазмоза) и др. (13). EIA от първо ниво и хемилуминесцентни анализи за поливалентни IgG/IgM антитела към *B. burgdorferi* могат да дадат фалшиво положителни резултати между 2% и 5%, когато се използват рекомбинантни протеини, и между 10% и 15%, когато се използват целоклетъчни лизати (28).

Прогностичната стойност на теста се определя от неговата чувствителност, специфичност и разпространението на заболяването в популацията, която ще се тества. Следователно при пациент с ниска вероятност за заболяване отрицателният тест го изключва, докато положителният е по-вероятно да бъде фалшиво положителен (26).

Персистирането на антитела от минало заболяване продължава с месеци и дори с години вследствие на бавната им регресия. Следователно тези тестове не могат да се използват за оценка на терапията. Тяхното продължително присъствие затруднява и откриването на повторно заболяване (7,14).

Лабораторната диагностика е силно необходима в случаите на невроборелиоза. Засягане на нервната система се среща при до 15% от нелекуваните пациенти и може да се прояви в ранните, но и в късни стадии на инфекцията. Това заедно с разнообразните симптоми представлява сериозен диагностичен проблем. Преобладаващата клинична изява остава менингоградикулит с интензивна невропатична болка, известен като синдром на Bannwarth, но може да се прояви като менингит, енцефалит, лицева парализа и др. Ако има клинично съмнение, трябва да се извърши изследване на цереброспиналната течност (CSF) и серум, взети по едно и също време. CSF трябва да се подложи на цитологично, химично и серологично изследване. При повечето пациенти се открива лимфоцитна плеоцитоза, увреждане на кръвно-мозъчната бариера и интратекален синтез на IgM, IgG и понякога IgA. Интерпретацията на серологичните методи за интратекален синтез се прави чрез изчисляване на индекс на антитела въз основа на нивата им в CSF и серума (13,17,35). Специфичните anti-Borrelia антитела често позволяват окончателна диагноза. Интратекален синтез на IgM се наблюдава при 80–100%, а на IgG при около 60% от ранните случаи. Късната невроборелиоза има по-чести и по-високи нива на IgG и IgA, отколкото ранната (29). Те обаче могат да бъдат открити седмици до месеци след антибиотично лечение, което може да се дължи на забавен клирънс на CSF протеини, а не от персистиращ интратекален синтез (17).

Ограниченията на серологичните тестове е предпоставка за подобряване на съществуващите и активно разработване на други възможности. Сред тях са комерсиализирани тестове за Т-клетъчен отговор като теста за лимфоцитна трансформация (LTT и MELISA) и ензимно свързаният имуноспот тест (EliSpot) за откриване на специфични Т-хелперни лимфоцити, подходи базирани на биомаркери (определяне на CXCL13), имуно-PCR (iPCR) анализ, който се възползва от свойствата на PCR за повишаване на чувствителността на ELISA, и др. (13,35).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Няма златен стандарт за лабораторна диагностика на лаймската борелиоза, а интерпретацията на резултатите от серологията е сложна. Серологичните методи са най-широко приетите и използвани подходи, но поради неточности в случаите извън категоричната клинична манифестация

трябва да се експериментират и други съществуващи възможности за натрупване на достатъчно практични данни в полза на подобрен алгоритъм. Това, от една страна, ще облекчи работата на клиницистите и, от друга, ще подобри ползите за пациентите.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of lyme borreliosis. Clin Microbiol Rev. 2005;18(3):484-509.
2. Bacon RM, Biggerstaff BJ, Schrieffer ME, Gilmore RD Jr, Philipp MT, Steere AC, et al. 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. 2003;187(8):1187-99.
3. Berthold A, Faucillion ML, Nilsson I, Golovchenko M, Lloyd V, Bergström S, et al. Cultivation Methods of Spirochetes from Borrelia burgdorferi Sensu Lato Complex and Relapsing Fever Borrelia. J Vis Exp. 2022;(189).
4. Branda JA, Linskey K, Kim YA, Steere AC, Ferraro MJ. Two-tiered antibody testing for Lyme disease with use of 2 enzyme immunoassays, a whole-cell sonicate enzyme immunoassay followed by a VlsE C6 peptide enzyme immunoassay. Clin Infect Dis. 2011;53(6):541-7.
5. Branda JA, Strle F, Strle K, Sikand N, Ferraro MJ, Steere AC. Performance of United States serologic assays in the diagnosis of Lyme borreliosis acquired in Europe. Clin Infect Dis. 2013; 57(3):333-40.
6. Branda JA, Body BA, Boyle J, Branson BM, Dattwyler RJ, Fikrig E, et al. Advances in Serodiagnostic Testing for Lyme Disease Are at Hand. Clin Infect Dis. 2018;66(7):1133-1139.
7. Bunikis J, Barbour AG. Laboratory testing for suspected Lyme disease. Med Clin North Am. 2002;86(2):311-340.
8. Chiappa G, Perini M, Cafiso A, Nodari R, Wilhelmsson P, Lindgren PE, et al. A Novel High Discriminatory Protocol for the Detection of Borrelia afzelii, Borrelia burgdorferi Sensu Stricto and Borrelia garinii in Ticks. Pathogens. 2022;11(11):1234.
9. Cook MJ, Puri BK. Commercial test kits for detection of Lyme borreliosis: a meta-analysis of test accuracy. Int J Gen Med. 2016;9:427-440.
10. Dunaj J, Moniuszko A, Zajkowska J, Pancewicz S. The role of PCR in diagnostics of Lyme borreliosis. Przegl Epidemiol. 2013;67(1):35-9, 119-23.
11. Eldin C, Raffetin A, Bouiller K, Hansmann Y, Roblot F, Raoult D, et al. Review of European and

- American guidelines for the diagnosis of Lyme borreliosis. *Med Mal Infect.* 2019;49(2):121-132.
12. Embers ME, Jacobs MB, Johnson BJ, Philipp MT. Dominant epitopes of the C6 diagnostic peptide of *Borrelia burgdorferi* are largely inaccessible to antibody on the parent VlsE molecule. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14(8):931-6.
13. Guérin M, Shawky M, Zedan A, Octave S, Avelle B, Maffucci I, et al. Lyme borreliosis diagnosis: state of the art of improvements and innovations. *BMC Microbiol.* 2023;23(1):204.
14. Hofmann H, Fingerle V, Hunfeld KP, Huppertz HI, Krause A, Rauer S, et al. Consensus group. Cutaneous Lyme borreliosis: Guideline of the German Dermatology Society. *Ger Med Sci.* 2017;15:Doc14.
15. https://www.ncipd.org/index.php?option=com_biuletin&view=view&month=30&year=2024&lang=bg
16. <https://www.who.int/publications/item/9789289022910>
17. Jeantin L, Rodriguez-Regent C, Martino S, De, Gayraud M, Cosserrat J. Intrathecal antibody kinetics in neuroborreliosis: A report on three cases and a literature review *Infectious Diseases Now.* 2021; 51 (7), 627-629.
18. John TM, Taeye AJ. Appropriate laboratory testing in Lyme disease. *Cleve Clin J Med.* 2019; 86(11):751-759.
19. Khan F, Allehebi Z, Shabi Y, Davis I, LeBlanc J, Lindsay R, et al. Modified Two-Tiered Testing Enzyme Immunoassay Algorithm for Serologic Diagnosis of Lyme Disease. *Open Forum Infect Dis.* 2022;9(7):ofac272.
20. Lawrenz MB, Hardham JM, Owens RT, Nowakowski J, Steere AC, Wormser GP, et al. Human antibody responses to VlsE antigenic variation protein of *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol.* 1999 ;37(12):3997-4004.
21. Leeflang MM, Ang CW, Berkhout J, Bijlmer HA, Van Bortel W, Brandenburg AH, et al. The diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis in Europe: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2016;16:140.
22. Li X, McHugh GA, Damle N, Sikand VK, Glickstein L, Steere AC. Burden and viability of *Borrelia burgdorferi* in skin and joints of patients with erythema migrans or lyme arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63(8):2238-47.
23. Lipsett JA, Branda AJ, McAdam L, Vernacchio CD, Gordon CR, Gordon LE. Nigrovic Evaluation of the C6 Lyme enzyme immunoassay for the diagnosis of lyme disease in children and adolescents *Clin. Infect. Dis.* 2016;63 (7), 922-928.
24. Lohr B, Fingerle V, Norris DE, Hunfeld KP. Laboratory diagnosis of Lyme borreliosis: Current state of the art and future perspectives. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2018;55(4):219-245.
25. Marques AR, Martin DS, Philipp MT. Evaluation of the C6 peptide enzyme-linked immunosorbent assay for individuals vaccinated with the recombinant OspA vaccine. *J Clin Microbiol.* 2002;40(7):2591-3.
26. Marques AR. Laboratory diagnosis of Lyme disease: advances and challenges. *Infect Dis Clin North Am.* 2015;29(2):295-307
27. Pegalajar-Jurado A, Schrieffer ME, Welch RJ, Couturier MR, MacKenzie T, Clark RJ, Ashton LV, Delorey MJ, Molins CR. Evaluation of Modified Two-Tiered Testing Algorithms for Lyme Disease Laboratory Diagnosis Using Well-Characterized Serum Samples. *J Clin Microbiol* 2018;56:10.1128/jcm.01943-17.
28. Porwancher R, Levin A, Trevejo R. Immunoblot Criteria for Diagnosis of Lyme Disease: A Comparison of CDC Criteria to Alternative Interpretive Approaches. *Pathogens.* 2023;12(11):1282.
29. Rauer S, Kastenbauer S, Hofmann H, Fingerle V, Huppertz HI, Hunfeld KP, Krause A, Ruf B, Dersch R; Consensus group. Guidelines for diagnosis and treatment in neurology - Lyme neuroborreliosis. *Ger Med Sci.* 2020 Feb 27;18:Doc03.
30. Rouhiainen M, Pietikäinen A, Kortela E, Kanerva MJ, Oksi J, Hytönen J. C6 peptide enzyme immunoassay in Lyme borreliosis serology. *J Microbiol Methods.* 2021;180:106122.
31. Sabin AP, Scholze BP, Lovrich SD, Callister SM. Clinical evaluation of a *Borrelia* modified two-tiered testing (MTTT) shows increased early sensitivity for *Borrelia burgdorferi* but not other endemic *Borrelia* species in a high incidence region for Lyme disease in Wisconsin. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2023;105(1):115837.
32. Schotthoefer AM, Green CB, Dempsey G, Horn EJ. The Spectrum of Erythema Migrans in Early Lyme Disease: Can We Improve Its Recognition? *Cureus.* 2022 Oct 25;14(10):e30673.
33. Stanek G, Strle F. Lyme borreliosis-from tick bite to diagnosis and treatment. *FEMS Microbiol Rev.* 2018 May 1;42(3):233-258.
34. Theel ES. The Past, Present, and (Possible) Future of Serologic Testing for Lyme Disease. *J Clin Microbiol.* 2016;54:1191-6.
35. Trevisan G, Bonin S, Ruscio M. A Practical Approach to the Diagnosis of Lyme Borreliosis: From Clinical Heterogeneity to Laboratory Methods. *Front Med (Lausanne).* 2020 ;7:265.
36. Trevisan G, Cinco M, Trevisini S, di Meo N, Chersi K, Ruscio M, et al. Part 1: *Borrelia* Lyme Group and *Echidna-Reptile* Group. *Biology (Basel).* 2021;10(10):1036.
37. Trinity Biotech EU – Lyme IgM Western Blot Western Blot Test System for the Detection of IgM Antibodies to *Borrelia afzelii* “PKO” and *Borrelia garinii* REF 44-2020M. 2010.

Available from: <http://www.trinitybiotech.com/ProductDocuments/44-2020M-29>

38. Tylewska-Wierzbanska SS, Chmielewski T. Limitation of serological testing for Lyme borreliosis: evaluation of ELISA and western blot in comparison with PCR and culture methods. *Wien Klin Wochenschr.* 2002 114(13–14):601–605.
39. Wojciechowska-Koszko I, Kwiatkowski P, Sienkiewicz M, Kowalczyk M, Kowalczyk E, Dołęgowska B. Cross-Reactive Results in Serological Tests for Borreliosis in Patients with Active Viral Infections. *Pathogens.* 2022 Feb 3;11(2):203.
40. Wormser GP, Bittker S, Cooper D, Nowakowski J, Nadelman RB, Pavia CJ. Yield of Large-Volume Blood Cultures in Patients with Early Lyme Disease, *The Journal of Infectious Diseases.* 2001; 184 (8), 1070–1072.

*Цветелина Костадинова
Медицински колеж
бул. „Цар Освободител“ 84
Варна, 9000
e-mail: ckostadinova@abv.bg*