

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Simona DREV

**PRIMERJAVA DVEH SEROLOŠKIH METOD PRI  
DOKAZOVANJU LYMSKE BORELIOZE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Simona DREV

**PRIMERJAVA DVEH SEROLOŠKIH METOD PRI DOKAZOVANJU  
LYMSKE BORELIOZE**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF TWO SEROLOGICAL METHODS FOR LYME  
BORRELIOSIS DETECTION**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroz na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije je na seji, dne 29.05.2009, odobrila temo diplomske naloge in za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Evo Ružič-Sabljić, dr. med., za somentorico dr. Tjašo Cerar, univ. dipl. mikr., ter za recenzentko prof. dr. Katjo Seme, dr. med.

Mentorica: prof. dr. Eva Ružič- Sabljić, dr. med.

Somentorica: dr. Tjaša Cerar, univ. dipl. mikr.

Recenzentka: prof. dr. Katja Seme, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR- BERTOK, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Eva RUŽIĆ-SABLJIĆ, dr. med

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: dr. Tjaša CERAR, univ. dipl. mikr.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Katja SEME, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in Imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Simona Drev

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

ŠD	Dn
DK	UDK 579.61 : 616.993-078 (043)=163.6
KG	lymska borelioza/ <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato/ mikrobiološka diagnostika/ antigeni borelij/ navzkrižne reakcije/ LIAISON®/ imunoluminiscenčni test/ IFT/ imunofluorescenčni test/
AV	DREV, Simona
SA	RUŽIČ-SABLJIČ, Eva (mentorica)/ CERAR, Tjaša (somentorica)/ SEME, Katja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2009
IN	PRIMERJAVA DVEH SEROLOŠKIH METOD PRI DOKAZOVANJU LYMSKE BORELIOZE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 49 str., 10 pregl., 6 sl., 50 vir.
IJ	sl
JI	sl/an
AI	<p>Lymska borelioza je v Sloveniji endemična bolezen, ki prizadane različne organe in organske sisteme. Diagnoza lymške borelioze temelji na prepoznavanju značilnih kožnih sprememb in/ ali seroloških testih. Kadar klinična slika ni jasna, je za potrditev bolezni potrebna mikrobiološka diagnostika, zlasti uporaba različnih seroloških testov. Rezultati posameznih seroloških testov istega vzorca lahko prinesejo veliko nejasnosti. Trenutne težave s serološko diagnostiko lymške borelioze so pomanjkljivost standarizacije testov in slaba merila vrednotenja za specifičnost in občutljivost, kar je posledica heterogenosti antigena in geografske razširjenosti različnih borelij. V diplomski nalogi smo primerjali dve metodi, in sicer imunofluorescenčni test (IFT) in (imunofluorescenčni) test in imunoluminiscenčni test LIAISON®, ki se uporabljata za dokazovanje specifičnih borelijskih protiteles. V raziskavo smo vključili 157 bolnikov z diagnozo lymške borelioze ali s sumom nanjo. Pri tem smo testirali serum in likvor istega bolnika. Namen naloge je bil dokazati protitelesa IgM in IgG proti bakteriji <i>B. burgdorferi</i> sensu lato, primerjati občutljivost dveh seroloških testov in ovrednotiti testa. Z raziskavo smo dokazali, da je test LIAISON® bolj občutljiva metoda pri dokazovanju serumskih protiteles IgM (33,76 %) kot tudi IgG (64,33 %). Prav tako pa se je izkazal za bolj občutljivega pri testiranju vzorcev likvorja, pri čemer smo dokazali protitelesa IgM pri 28,23 % bolnikov, protitelesa IgG pa pri 36,72 % bolnikov. Razlike med testoma so bile statistično značilne tako pri dokazovanju protiteles IgM kot tudi pri dokazovanju protiteles IgG. Razlike med testoma si lahko razlagamo z uporabo različnih seroloških metod ter različnih antigenov.</p>

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

DN Dn

DC UDC 579.61 : 616.993-078 (043)=163.6

CX Lyme disease/ *Borrelia burgdorferi* sensu lato/ microbiological diagnostics/ antigen/ cross reaction/ LIAISON®/ luminescent immunoassay technology/ IFT/ imunofluorescence test/

AU DREV, Simona

AA RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva (supervisor)/ CERAR Tjaša (co-advisor)/ SEME, Katja (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology

PY 2009

TI COMPARISON OF TWO SEROLOGICAL METHODS FOR LYME BORRELIOSIS DETECTION

DT Graduation thesis (university studies)

NO XI, 49 p., 10 tab., 6 fig., 50 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Lyme borreliosis is endemic in Slovenia. Infection affects different organs and organic systems. Diagnosis of Lyme disease is based on recognition of typical skin lesions and/ or serological testing. In the case of unclear clinical manifestation, diagnosis of the disease is based on microbiological methods, mostly on serological testing. But, in some cases, even the serological test can result false. Current problems with serodiagnosis Lyme disease are lack of standarization of tests and bad evaluation criteria for specificity and sensitivity as a result heterogeneity of antigen and geographical distribution of different *Borrelia*. The aim of our study was to compare two different commercial serological tests: (imunofluorescence test (IFT) and LIAISON® test (luminescent immunoassay technology). They are used to detect specific antibodies IgM and IgG against the bacteria *B. burgdorferi* sensu lato. With both tests, we have tested serum and cerebrospinal fluid of 157 patients with Lyme borreliosis or suspected Lyme borreliosis. The results of our study showed that the LIAISON® test is more sensitive than IFT test as it detected serum IgM in 33,76 % and IgG in 64,33 % patients. It was also proved to be more sensitive in testing cerebrospinal fluid samples, where IgM were detected in 28,23 % patients and IgG in 36,72 % patients. Difference between sensitivitiy of the tests was statistically significant in detection of both, IgM and IgG antibodies. The differences between tests could occur because different serological methods were used and different antigens were present in the testing.

**KAZALO VSEBINE**

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION.....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE.....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>	<b>X</b>
<b>SLOVARČEK.....</b>	<b>XI</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA .....	2
1.2 NAMEN DELA.....	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV.....</b>	<b>3</b>
2.1 TAKSONOMIJA.....	3
2.2 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI BAKTERIJE <i>BORRELIA BURGDORFERI</i> SENSU LATO .....	4
<b>2.2.1 Morfologija borelij .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2.2 Metabolizem.....</b>	<b>5</b>
<b>2.2.3 Genom.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.4 Antigeni borelije <i>B. burgdorferi</i> sensu lato.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.5 Imunski odziv na borelijsko okužbo .....</b>	<b>8</b>
2.2.5.1 Nespecifični odziv gostitelja .....	9
2.2.5.2 Nastanek specifičnega imunskega odziva .....	10
2.2.5.3 Posebnosti imunskega odziva pri borelijski okužbi .....	10
2.3 KLINIČNA SLIKA.....	11

2.4	REZERVOAR IN PRENAŠALCI.....	12
2.5	EPIDEMIOLOGIJA.....	13
2.6	MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA.....	15
<b>2.6.1</b>	<b>Kultivacija borelij.....</b>	<b>15</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....</b>	<b>16</b>
<b>2.6.3</b>	<b>Serološko dokazovanje lymške borelioze.....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>19</b>
3.1	TEST IMUNOFLUORESCENCE.....	19
<b>3.1.1</b>	<b>Princip testa IFT.....</b>	<b>19</b>
3.1.1.1	Uporabljeni reagenti.....	20
3.1.1.2	Material za izvedbo IFT.....	20
3.1.1.3	Priprava serumskih razredčin v mikrotitrski ploščici.....	21
3.1.1.4	Priprava razredčin likvorja v mikrotitrski ploščici.....	21
3.1.1.5	Izvedba testa za analizo protiteles seruma in likvorja z IFT.....	22
3.1.1.6	Vrednotenje rezultatov IFT testa pri serumu in likvorju.....	22
3.2	TEST IMUNOLUMINISCENCE.....	23
<b>3.2.1</b>	<b>Princip LIAISON® testa.....</b>	<b>23</b>
3.2.1.1	Vzorci.....	23
3.2.1.2	Uporabljeni reagenti v integralu.....	24
3.2.1.3	Material za izvedbo testa LIAISON®.....	25
3.2.1.4	Izvedba LIAISON® testa za analizo protiteles seruma in likvorja.....	25
3.2.1.5	Ovrednotenje rezultatov testa LIAISON®.....	26
3.2.1.5.1	Interpretacija rezultatov pri določanju koncentracije IgM in IgG v serumu.....	26
3.2.1.5.2	Interpretacija rezultatov pri določanju koncentracije IgM in IgG v likvorju.....	27
3.3	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV.....	28
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>29</b>
4.1	DOKAZOVANJE SPECIFIČNIH PROTITELES IGM IN IGG Z IFT.....	29
<b>4.1.1</b>	<b>Rezultati testiranja serumov s testom imunofluorescence.....</b>	<b>29</b>

<b>4.1.2</b>	<b>Rezultati testiranja likvorjev s testom imunofluorescence.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2</b>	<b>DOKAZOVANJE SPECIFIČNIH PROTITELES IGM IN IGG Z LIAISON®..</b>	<b>30</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Rezultati testiranja serumov s testom LIAISON® .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Rezultati testiranja likvorjev s testom LIAISON®.....</b>	<b>31</b>
<b>4.3</b>	<b>PRIMERJAVA REZULTATOV TESTA IFT IN LIAISON® .....</b>	<b>31</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Primerjava rezultatov IFT in LIAISON® testa pri določanju protiteles IgM in IgG v serumu bolnikov .....</b>	<b>31</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Primerjava rezultatov IFT in LIAISON® testa pri določanju protiteles IgM in IgG v likvorju bolnikov .....</b>	<b>33</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Primerjava rezultatov IFT in testa LIAISON® pri določanju protiteles IgM v serumih in likvorjih posameznega bolnika .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Primerjava rezultatov IFT in testa LIAISON® pri določanju protiteles IgG v serumih in likvorjih posameznega bolnika.....</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>43</b>

**ZAHVALA**

**KAZALO SLIK**



Slika 1: <i>B. burgdorferi</i> sensu lato (Rosa in sod., 2005) .....	4
Slika 2: Struktura in morfologija <i>B. burgdorferi</i> sensu lato (Rosa in sod., 2005).....	5
Slika 3: Razvojne stopnje klopa (Humair in Gern, 2000) .....	12
Slika 4: Geografska razširjenost obolenja z lymsko boreliozo (Eisen in Lane, 2002) ....	14
Slika 5: Prijavljeni primeri lymske borelioze po mesecih, Slovenija, 2006-2008 (IVZ, 2009).....	14
Slika 6: Indirektna imunofluorescenca, pri čemer je sekundarno protitelo označeno s fluorokromom (Rotter, 1994 ) .....	19

**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1: Rezultati testiranja 157 serumov s testom imunofluorescence pri določanju protiteles IgM in IgG .....	29
Preglednica 2: Rezultati testiranja 128 likvorjev s testom imunofluorescence pri določanju protiteles IgM in IgG .....	30
Preglednica 3: Rezultati testiranja 157 serumov z LIAISON® testom pri določanju protiteles IgM in IgG .....	30
Preglednica 4: Rezultati testiranja 128 likvorjev z LIAISON® testom pri določanju protiteles IgM in IgG .....	31
Preglednica 5: Primerjava rezultatov IFT in LIAISON® testa pri določanju protiteles IgM v serumu bolnikov .....	32
Preglednica 6: Primerjava rezultatov IFT in LIAISON® testa pri določanju protiteles IgG v serumu bolnikov .....	32
Preglednica 7: Primerjava rezultatov IFT in LIAISON® testa pri določanju protiteles IgM v likvorju bolnikov .....	33
Preglednica 8: Primerjava rezultatov IFT in LIAISON® testa pri določanju protiteles IgG v likvorju bolnikov .....	34
Preglednica 9: Primerjava rezultatov IFT in LIAISON® testa pri določanju protiteles IgM v serumih in likvorjih 128 bolnikov s sumom na lymsko boreliozo .....	35
Preglednica 10: Primerjava rezultatov IFT in LIAISON® testa pri določanju protiteles IgM in IgG v serumih in likvorjih 128 bolnikov s sumom na lymsko boreliozo .....	36

**OKRAJŠAVE IN SIMBOLI**

ACA	kožna sprememba (lat.: <u>a</u> crodermatitis <u>c</u> hronica <u>a</u> trophicans)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
ELISA	encimskoimunski test (angl.: <u>e</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>i</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>a</u> ssay)
EM	kožna sprememba (lat.: <u>e</u> rythema <u>m</u> igrans)
Erp	<u>e</u> xported <u>r</u> epeated <u>p</u> roteins
FITC	<u>f</u> luorescein <u>i</u> zo <u>t</u> io <u>c</u> ianat
IFT	imunofluorescenčni test
IgM	imunoglobulin razreda M
IgG	imunoglobulin razreda G
kDa	kilodalton, enota za molekulsko maso
LIAISON®	imunoluminiscenčni test
Osp	zunanji površinski protein (angl. <u>o</u> uter <u>s</u> urface <u>p</u> rotein)
PBS	fosfatni pufer (angl. <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffer <u>s</u> aline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
RLU	relativne luminiscenčne enote (angl. <u>r</u> elative <u>l</u> uminscence <u>u</u> nits)
RNK	ribonukleinska kislina
VlsE	protein (angl. <u>v</u> ariable major protein- <u>l</u> ike <u>s</u> equen <u>e</u> , <u>e</u> xpressed)
UV	ultravijolična svetloba

**SLOVARČEK**

encefalitis	vnetje možganov
meningitis	vnetje možganske ovojnice
meningoencefalitis	vnetje možganske ovojnice in možganskega tkiva
pleocitoza	povečano število celic

## 1 UVOD

Lymška borelioza je ena od najbolj razširjenih zoonoz v Sloveniji, ki jo povzroča bakterija iz kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Pri človeku, ki je naključni gostitelj, povzročajo lymško boreliozo *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto in *B. spielmanii*. Borelije spadajo v red *Spirochaetales*, družino *Spirochaetaceae*, rod *Borrelia*, kamor sodijo vrste kompleksa *B. burgdorferi* sensu lato (Wang in sod., 1999).

Bakterije reda *Spirochaetales* so monofiletskega izvora in imajo skupne nekatere morfološke, antigenske in patogenetske značilnosti. *B. burgdorferi* sensu lato je povzročiteljica lymške borelioze pri ljudeh. Z borelijami so pogosto okužene mnoge živali, zlasti mali glodalci in ptice (Gern in Humair, 2002). Lymška borelioza predstavlja velik zdravstven problem. Za humano patologijo so najpomembnejši prenašalci ščitasti klopi rodu *Ixodes* (Eisen in Lane, 2002). *B. burgdorferi* sensu lato povzroča pri ljudeh širok spekter bolezni od nastanka kožne lezije imenovane erythema migrans na mestu vboda okuženega klopa, do raznih kliničnih znakov, ki nastanejo po nekaj tednih ali mesecih od začetka primarne okužbe. Klinični znaki borelioze koesistirajo s specifičnim in močnim imunskim sistemom proti povzročitelju. V začetku infekcije delujejo mikroorganizmi neposredno na gostiteljeve celice, pozneje pa se bolezen zaplete zaradi spodbuditve imunskega odziva, ki je pri okuženih bolnikih počasen, šibek ali pa do njega celo ne pride (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005). Protitelesa proti *B. burgdorferi* sensu lato se tvorijo dokaj pozno. Borelijsko okužbo lahko ugotovimo na osnovi značilnih kožnih sprememb in/ali seroloških testov. Ker pa kompleks *B. burgdorferi* sensu lato vsebuje heterogene antigene, ki pri bolnikih sprožijo nastajanje specifičnih protiteles, so lahko rezultati seroloških metod nezanesljivi, možni so tako lažno pozitivni kot tudi lažno negativni rezultati, kar je poleg nestandariziranosti postopkov pomanjkljivost. Vendar pa se serološki testi vedno bolj uveljavljajo v mikrobiološki diagnostiki zaradi preprostega načina in lahke dostopnosti.

## 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Borelijski antigeni spodbudijo različen imunski odziv, ki se pojavlja z različno dinamiko, zato dokaz protiteles predstavlja problem. Prav tako pri seroloških testih predstavlja problem antigensko strukturna podobnost borelij z drugimi bakterijami kar privede do lažno pozitivnih rezultatov. Tako najdemo na tržišču veliko različnih testov, ki so zasnovani tako, da premostijo zgoraj omenjene omejitve.

## 1.2 NAMEN DELA

Naš namen je bil uporabiti dva serološka testa, imunofluorescenčni test (IFT) in imunoluminiscenčni test LIAISON®, in z njima dokazati specifična protitelesa razreda IgM in IgG proti bakteriji *B. burgdorferi* sensu lato. Želeli smo ugotoviti imunski odziv pri naključno izbranih vzorcih seruma in likvorja bolnikov, ki so bili poslani na testiranje v laboratorij. Rezultate seroloških testov smo primerjali med seboj ter primerjali občutljivost in uporabnost posamezne metode.

## 1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Pred pričetkom raziskovanja smo postavili naslednje predpostavke:

- Predpostavljamo, da se pri bolnikih z lymsko boreliozo razvije specifični imunski odziv, ki ga bomo dokazali s serološki testi.
- Predpostavljamo, da lahko imunski odziv dokažemo tako z IFT kot tudi s testom LIAISON®.
- Predpostavljamo, da se rezultati med testoma ne bodo razlikovali.
- Predpostavljamo, da je izvedba z LIAISON® testom bolj enostavna kot z IFT.

## 2 PREGLED OBJAV

Lymška borelioza je dobila ime po kraju Lyme v ameriški državi Connecticut, kjer se je kot epidemija pojavila v poznih 80-tih letih, kjer je zbolelo večje število otrok s »sklepno revmo«. Takratne epidemiološke raziskave so pokazale, da so otroci obolevali sezonsko in večina je bila izpostavljena vbodom klopa. Leta 1982 je William Burgdorfer skupaj s sodelavci etiološki agens iz klopov *I. dammini* (sedaj imenovano *I. scapularis*) osamil in identificiral svedrasto bakterijo, spiroheto, ki jo je imenoval *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Pri nas, v Sloveniji, je lymško boreliozo leta 1981 prvi opisal Janko Lešničar (Strle, 1992).

### 2.1 TAKSONOMIJA

Spirohete delimo v dve družini in 5 rodov, ki so heterogene v fiziologiji in okolju, kjer se nahajajo (Johnson in sod., 1984). Na osnovi ugotovljene analize 16S rRNA so spirohete monofiletskega izvora. Glede na analizo 16S rRNA delimo spirohete filogenetsko v šest skupin: *Treponema*, *Spirochaeta*, *Borrelia*, *Serpula*, »Shrew« spiroheta in *Leptospira* (Paster in sod., 1991).

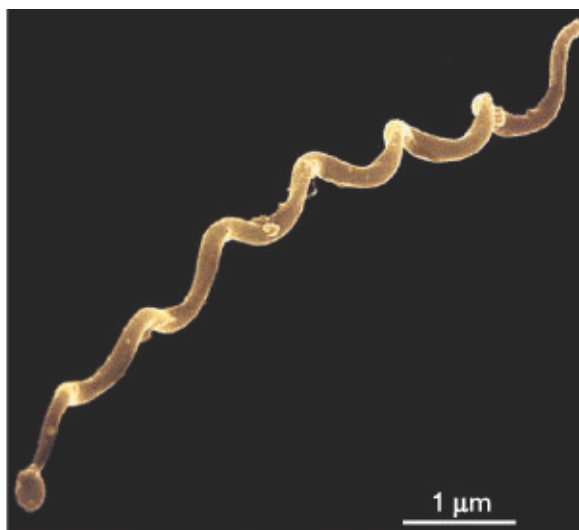
V rod *Borrelia* uvrščamo dve patogeni skupini glede na razvoj bolezni, ki jih povzročajo pri človeku, in sicer povratno mrzlico in lymško boreliozo, med katerima se kažejo ekološke in genetske razlike (Barbour in Hayes, 1986). Šele novejšje metode molekularne biologije (npr. restrikcijska analiza celokupne DNA, sekveniranje odseka DNA) so pokazale, da so izolati *B. burgdorferi* sensu lato genetsko in fenotipsko divergentni, in so dalje omogočile natančnejšo analizo borelijskih vrst in njihovo porazdelitev (Wang in sod., 1999). Ker borelije kažejo veliko genetsko diverziteto, spada v kompleks *B. burgdorferi* sensu lato 13 vrst: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. spielmanii*, *B. garinii* in *B. afzelii*, ki povzročajo lymško boreliozo pri ljudeh, ter nepatogene borelije kot so *B. japonica*, *B. andersonii*, *B. bissettii*, *B. sinica*, *B. turdi* in *B. tanukii*. *B. valaisiana* in *B. lusitaniae* sta potencialno patogena (Richter in sod., 2006b). Pred kratkim so v jugovzhodnem delu ZDA opisali še eno genomsko vrsto, ki spada v isti kompleks, *Borrelia carolinensis* sp.nov (Rudenko in sod., 2009). V Evropi najpogosteje povzročajo lymško boreliozo *B. afzelii*, *B.*

*garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, redko *B. spielmanii*, *B. bissettii*, in *B. lusitaniae* (Collares-Pereira in sod., 2004; Agüero-Rosenfeld in sod., 2005).

## 2.2 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI BAKTERIJE *Borrelia burgdorferi* sensu lato

### 2.2.1 Morfologija borelij

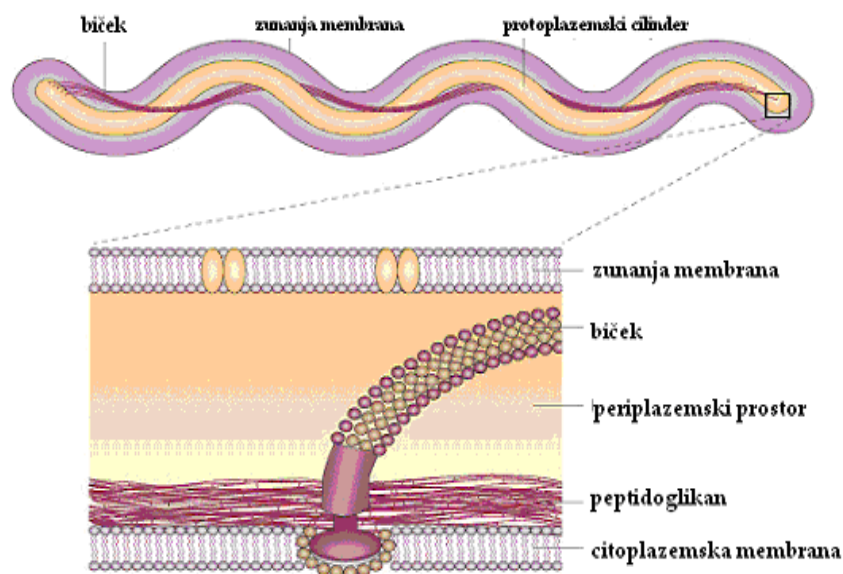
Spirohete imajo značilne številne morfološke, strukturne, ekološke in genetske karakteristike, ki se razlikujejo od ostalih prokariontov (Barbour in Hayes, 1986; Agüero-Rosenfeld in sod., 2005). Njihova dolžina se giblje med 8  $\mu\text{m}$  do 20- 30  $\mu\text{m}$ . Širina celic dosega 0,2 do 0,5  $\mu\text{m}$  (slika 1). Dolžina celic je odvisna od starosti bakterije, količine hranil v gojišču ali poskusnih živalih ter okoliščin (Barbour in Hayes, 1986).



Slika 1: *B. burgdorferi* sensu lato (Rosa in sod., 2005)

Ultrastruktura borelij obsega zunanjo površinsko plast, ki je obdana s sluzjo (S-plast). Zunanjo membrano obdaja periplazemski prostor skupaj z periplazemskimi bički in protoplazemski cilindri, kar kaže slika 2 (Agüero-Rosenfeld in sod., 2005). Zunanja membrana borelij je zelo fluidna in vsebuje redke transmembranske proteine in zunanje površinske proteine ter so pomembni kot borelijski antigeni. Membrana borelij ne vsebuje lipopolisaharidov kot je značilno za gram negativne bakterije ampak vsebuje glikolipide (Barbour in Hayes, 1986; Ben-Menachem in sod., 2003).





Slika 2: Struktura in morfologija *B. burgdorferi sensu lato* (Rosa in sod., 2005)

Za *B. burgdorferi sensu lato* je značilen citomorfološki polimorfizem, saj ima lahko poleg spiralne oblike še različne druge oblike (cistična oblika v neugodnih razmerah) (Gruntar, 2000).

Borelije vsebujejo bičke, ki so po sestavi podobni bičkom evbakterij. Posamezne izolirane bakterije *B. burgdorferi* imajo 7 do 11 bičkov. Nahajajo se v periplazemskem prostoru, notranja razporeditev bičkov pa jim omogoča gibljivost v viskoznih medijih. Borelije se premikajo z obračanjem, s svedrastim zavijanjem ali upogibanjem na mestu. Bički z molekularno maso 41 kDa predstavljajo pglavitne antigene. Na zunanji celični membrani bakterije *B. burgdorferi sensu lato* je prisotnih okoli 100 polipeptidov, imenovanih zunanji površinski proteini (Osp), ki igrajo pomembno vlogo pri patogenezi (Barbour in Hayes, 1986).

### 2.2.2 Metabolizem

Borelije so mikroaerofilne bakterije (Barbour in Hayes, 1986). Značilna je počasna rast, čas delitve se giblje med 7 in 20 urami, odvisno od prilagoditve na umetno gojišče (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005). Borelijske vrste so biokemijsko neaktivne, vendar pa

bakterija za uspešnejšo rast izrablja poleg glukoze tudi druge sladkorje (Barbour in Hayes, 1986).

### 2.2.3 Genom

Njihova genska struktura sestoji iz linearnega kromosoma, dolgega 950 kbp, 9 krožnih in 12 linearnih plazmidov, ki vsebujejo 40 % celotne DNA (Fernandez in sod., 1997; Casjens in sod., 2000). Borelije so edine spirohete in redke med bakterijami, pri katerih najdemo linearni kromosom (Barbour in Hayes, 1986). Velikost plazmidov se giblje med 1,5 in 50 kb (Fernandez in sod., 1997). Borelije imajo nizek delež citozina in gvanina (28-30,5 %) (Bergstroem in sod., 2002).

### 2.2.4 Antigeni borelije *B. burgdorferi* sensu lato

*B. burgdorferi* sensu lato ima na membrani imunogene integralne membranske proteine in Osp proteine, ki so lipoproteini. Proteini predstavljajo najpomembnejše antigene, ki spodbudijo imunski odziv (Haake, 2000; Fernandez in sod., 1997). Večina proteinov imajo močno antigensko variabilnost. Prva diferenciacija borelij je bila serotipizacija glede na OspA. Serotip 1 je predstavljal *B. burgdorferi* sensu stricto, serotip 2 *B. afzelii* in serotipi 3-7 pa *B. garinii* (Wilske in sod., 1988; Fernandez in sod., 1997). Antigeni se uspešno uporabljajo v diagnostičnih testih in pri izdelavi cepiva (Lam in sod., 1994). Najbolj raziskani so zunanji površinski proteini OspA-F. Zapisi za zunanje površinske proteine se nahajajo na linearnih in krožnih plazmidih (Fernandez in sod., 1997). Funkcija Osp ni še povsem razjasnjena, prav tako tudi njihov pomen pri patogenezi lymške borelioze (Malovrh, 2000). Predpostavljajo, da igrajo pomembno vlogo pri virulenci, prenosu borelij in razmnoževanju v klopu (Fernandez in sod., 1997).

OspA protein ima molekularno težo 30,5-33,0 kDa. Nahaja se na velikem linearnem plazmidu. Homogenost znotraj vrste se giblje med 78 in 100 %, kar kaže na veliko heterogenost proteina OspA, med vrstami pa je 73-83 % homogenost. To pove, da je med vrstami in znotraj vrste velika antigenska raznolikost beljakovine OspA (Fernandez in sod.,

1997). *B. burgdorferi* sensu lato je izpostavljena izraziti metamorfozi kot je sprememba ekspresije genov različnih lipoproteinov ob spremembi okolja iz vektorja na sesalca. Ob prisotnosti borelij v črevesju nehranjenega klopa poteče ekspresija gena *ospA* v veliki koncentraciji (Kumaran in sod., 2001; Haake, 2000). Ob hranjenju klopa, pri čemer pridejo borelije v stik s gostiteljevo krvjo se prekine regulacija gena *ospA* in borelije začno na svoji površini izražati OspC proteine. Vključno s sintezo proteina OspC poteka istočasno migracija borelij iz črevesja v žleze slinavke klopa (Haake, 2000; Kumaran in sod., 2001).

Molekulska masa proteina OspC se giblje med 20 do 25 kDa. Gen za OspC se nahaja na 27 kb krožnem plazmidu. Igra pomembno vlogo v začetni fazi okužbe (Li in sod., 2007). OspC je močan antigen, ki sproži imunski odziv pri gostitelju. Analiza je pokazala, da se homolognost proteina OspC med vrstami giblje med 70 in 74 % (Fernandez in sod., 1997). OspC protein je variabilen, njegova biološka funkcija in patogenost nista še povsem razjasnjena. Proučevanje tridimenzionalne strukture OspC proteina vodi k intenzivnim raziskavam na področju priprave cepiva na osnovi rekombinantnega proteina OspC (Kumaran in sod., 2001).

OspB protein kaže variabilnost v molekularni teži. Pri izolatih *B. garinii* in *B. afzelii* se kaže 81 % homogenost beljakovine OspB med njima in 79 % homogenost z izolati B31 (Wilske in sod., 1988; Fernandez in sod., 1997). Proteina OspA in OspB igrata pomembno vlogo v patogenezi lymške borelioze. Vključena sta namreč v pritrditev in penetracijo na gostiteljeve celice sesalcev (Bergstroem in sod., 2002). Zaradi polimorfizma je protein OspB kot antigen neprimeren pri diagnostiki (Fernandez in sod., 1997).

OspD je domnevni virulenčni faktor velikosti 28 kDa, ki ga kodira gen *ospD*. Lociran je na 38 kb linearnem plazmidu (Fernandez in sod., 1997; Bergstroem in sod., 2002). Ekspresija gena je odvisna od dejavnikov okolja, kot na primer povečana temperatura, pri kateri se ekspresija gena poveča. OspD igra ključno vlogo pri vezavi na gostiteljske celice in je vključen v kolonizacijo spirohet v črevesju klopa (Li in sod., 2007).

Zapis za proteina OspE, z molekularno velikostjo 19 kDa, in OspF, dolg 26 kDa se nahajata na istem krožnem plazmidu, dolgem 45 kb (Fernandez in sod., 1997).

Pomembno vlogo kot Osp proteini predstavlja tudi imunogeni protein, imenovan flagelin. Flagelin z molsko maso 41 kDa je antigen periplazemskega prostora in je glavna sestavina borelijskih bičkov. Beljakovina kot tudi gen, ki jo kodira flagelin, sta zelo ohranjena med vrstama. Skladnost zapisa med sevi je 96-97 %. Flagelin je močan antigen, ki pri gostitelju sproži nastanek prvih protiteles (Malovrh, 2000). Bički prokariontov, med njimi tudi bički spirohet, so si strukturno podobni. Pri seroloških testih lahko pride do križnih reakcij protiteles med borelijskim flagelinom in flagelinom drugih bakterij, zlasti bakterij *T. pallidum*, kar privede do lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov (Brandt in sod., 1990).

Proteini kot so Bbk32 (fibronektin vezavni protein), DbpA in DbpB (decorin vezavni protein) naj bi bili pomembni pri širjenju in lokalizaciji borelij pri okuženih bolnikih (Derdáková in Lenčaková, 2005).

VlsE je površinski lipoprotein z molekularno maso 34 kDa. Vsebuje ohranjene nevariabilne in variabilne regije. Nevariabilne regije so ohranjene med sevi in vrstami kompleksa *B. burgdorferi* sensu lato. Variabilna domena je visoko imunogena in pomembna kot tarčna molekula imunskega odziva gostitelja (Liang in Phillip, 1999; Ledue in sod., 2008). Protein VlsE je podvržen antigenski variabilnosti in ima ohranjene imunogene epitope. Tako kot VlsE in DbpA sta pomembna kot visokoimunogena rekombinantna proteina v serološki diagnostiki zgodnje lymške borelioze (Schulte-Spechtel in sod., 2003).

### **2.2.5 Imunski odziv na borelijsko okužbo**

Klinični znaki lymške borelioze koesistirajo s specifičnim in močnim imunskim odzivom proti povzročitelju (Szczepanski in Benach, 1991). V začetku infekcije delujejo mikroorganizmi neposredno na gostiteljeve celice, pozneje pa se bolezen zaplete zaradi spodbuditve imunskega odziva, ki ga antigeni sprožijo v telesu gostitelja (Malovrh in Paternoster, 1998).

### 2.2.5.1 Nespecifični odziv gostitelja

Mehanizma nespecifične (prirojene) odpornosti proti borelijam sta fagocitoza in aktivacija komplementa.

Pomemben nespecifični antimikrobni mehanizem gostitelja je uničevanje bakterij s fagocitnimi celicami kot so polimorfonuklearni levkociti, monociti in makrofagi in s tem sprožijo obsežen vnetni odziv. Fagocitozo sprožijo lipopolisaharidu podobne molekule povzročitelja. V zgodnji fazi okužbe so prisotni makrofagi v lezijah erythema migrans. Kasneje, v diseminirani fazi, pa se pojavijo polimorfonuklearni levkociti in monociti. Poveča se delovanje celic ubijalk in plazmatk, ki povečano izdelujejo za antigen specifična protitelesa. Pojavi se povečan odziv specifičnih limfocitov T (Szczepanski in Benach, 1991).

Močan celični odgovor povzročajo proteini OspA kot tudi proteini flagelina. Izzoveta kemotakso polimorfonuklearnih levkocitov.

Borelijske celice aktivirajo tudi komplementni sistem. Aktivacija komplementa vodi do fagocitoze ali do uničenja borelijske celice (Szczepanski in Benach, 1991). Lipoproteini spirohet in drugi signali aktivirajo makrofage k tvorbi citokinov kot sta IL-1 (interlevkin-1) in TNF- $\alpha$ , pri čemer povzročita močan vnetni odgovor (Szczepanski in Benach, 1991; Steere in sod., 2004). Najdemo ga v sinovijski tekočini pri bolnikih z lymskim artritismom in je ključni mediator pri vnetnem odzivu. Prav tako pa IL-1 stimulira izločanje sekundarnih mediatorjev vnetja (prostaglandin E2 in kolagenaza). Povečana koncentracija le teh se kaže pri bolnikih z lymskim artritismom (Szczepanski in Benach, 1991).

Širjenje borelij v različna tkiva poteka z adherenco in penetracijo bakterij skozi endotelij, pri čemer ima pomembno vlogo imunski odziv gostitelja, saj se ob tem poveča prepustnost žil. Pritrjanje borelij na celice tkiv, humane epiteljske in endotelijske celice je v veliki meri odvisno od koncentracije bakterij in časa. Adherenca bakterij narašča s velikostjo inokuluma (Szczepanski in Benach, 1991).

### 2.2.5.2 Nastanek specifičnega imunskega odziva

Pri osebah, ki so prišle v stik z *B. burgdorferi* sensu lato, se razvijeta celični in protitelesni imunski odziv (Malovrh in Paternoster, 1998). Celičnemu odzivu sledi protitelesni imunski odziv, ki vodi v nastanek protiteles. Prvi odziv IgM protiteles doseže višek med 3 in 6 tednom po okužbi. Pogosto ga spremlja aktivacija poliklonskih B celic, pri čemer se razvije specifični protitelesni imunski odziv, kar se kaže s visokim porastom IgM protiteles, tvorbo cirkulirajočih imunskih kompleksov in krioglobulinov. Protitelesa IgM so usmerjena direktno na polipeptid, dolg 41 kDa, na komponento flagela (bička) in proti OspC. Količina IgM protiteles lahko ostane visoka med okužbo ali pa po nekaj tednih izginejo. Protitelesa IgG, ki se prav tako vežejo na komponentno bička, se pojavijo po 6 tednih od pričetka okužbe, kasneje se pri trajanju bolezni pojavljajo še druga protitelesa, ki so usmerjena proti vse večjemu številu borelijskih antigenov kot so antigeni OspA, OspB in OspC. Postopoma pa narašča tudi imunski odziv bolnikov na druge antigene (Szczepanski in Benach, 1991).

### 2.2.5.3 Posebnosti imunskega odziva pri borelijski okužbi

Avtoimunost se razvije pri nekaterih bolnikih z lymsko boreliozo. Pri razvoju kronične okužbe, ki jo povzroča bakterija *B. burgdorferi* sensu lato, je ključnega pomena razvoj imunskega odziva proti antigenom gostitelja, ta pa vodi do kroničnih obolenj ali tkivnih poškodb (Szczepanski in Benach, 1991).

Pri seroloških testih lahko dobimo lažno pozitivne rezultate, kar je posledica navzkrižnih reaktivnosti protiteles med antigensko strukturne podobnosti borelij z drugimi bakterijami. Bički bakterij *B. burgdorferi* sensu lato in *T. pallidum*, kot tudi bički drugih bakterij, ki se gibljejo z bički na primer *Bacillus* spp. in enterobakterije, imajo podobne N-terminalne konce, kar privede do navzkrižnih reakcij, saj vsebujejo podobne epitope (Szczepanski in Benach, 1991; Bruckbauer in sod., 1992). Močno navzkrižnost protiteles pri bakteriji *B. burgdorferi* pokažejo proteini HSP (angl.: heat shock proteini). Imunski odziv na HSP

proteine povzroči nastanek navzkrižnih reakcij med borelijami in drugimi mikroorganizmi, ki ravno tako imajo HSP. Borelije v času okužbe izražajo vsaj 12 HSP proteinov, njihova molekulska masa se giblje med 24 in 72 kDa, nekatere med njimi so tudi imunogene (Malovrh, 2000). Vloga HSP je stabilizacija proteinov in intracelularnih proteinskih kompleksov. Imajo veliko homologijo na aminokislinskem koncu in so prav tako pomembni antigeni, ki jih izražajo mnoge bakterijske vrste (Szczepanski in Benach, 1991). Med infekcijo so bakterije *B. burgdorferi* sensu lato izpostavljene stresnim dejavnikom, kot je povišana temperatura, ko zapustijo poikilotermni vektor in vstopijo v toplokrvnega gostitelja. Drugi stresni dejavnik je vnetno žarišče, kjer se poveča sinteza HSP, ko se ob povišani temperaturi namnožijo borelije, tako HSP sprožijo nastanek specifičnih protiteles. Imunski odziv na HSP pa lahko povzroči nastanek avtoimunske bolezni.

### 2.3 KLINIČNA SLIKA

Lymška borelioza ima izredno raznolik potek, ki je podobno kot pri sifilisu, zato jo mnogi imenujejo »veliki posnemovalec«. Kot bolezen lahko poteka asimptomatsko ali pa potek bolezni variira, in pri tem lahko delimo na zgodnje in kasno obdobje, zgodnje obdobje pa še naprej na lokalizirano in diseminirano.

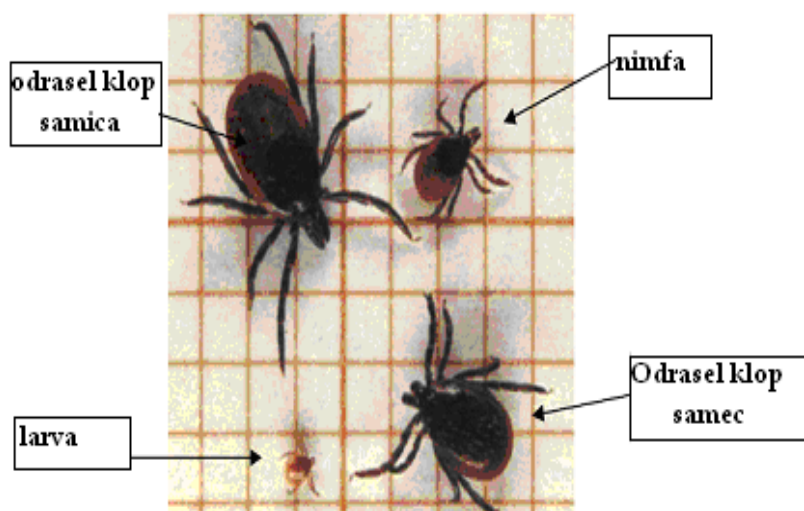
Zgodnja okužba traja do enega leta in se najprej pojavlja kot lokalizirana okužba, ki traja nekaj dni do nekaj tednov. Pri večini pacientih (90 % primerih) se lahko pojavi lokalizirana kožna sprememba erythema migrans, ki se pojavi v enem mesecu po ugrizu klopa. Na začetku se pojavlja rdeč obroč ali rdeča papula okoli mesta klopnege ugriza, ki se širi vstran od centra začetne lezije (Steere, 2001).

Kasneje lahko borelije prizadanejo kožo, živčni sistem, srce ali sklepe, kar vodi do zgodnje diseminirane (razširjene) lymške borelioze (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005). Sekundarna oblika se kaže kot meningitis, radikulonevritis, miokarditis in oligoartikularni artritis (Reed, 2002; Aguero-Rosenfeld in sod., 2005). Pozna faza lymške borelioze se pojavi po nekaj mesecih, letih in se kaže kot artritis, kasna nevroborelioza in kronično prizadetost kože (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005).

## 2.4 REZERVOAR IN PRENAŠALCI

Najpogostejši prenašalci bakterij *B. burgdorferi* sensu lato so ščitasti klopi iz rodu *Ixodidae*. Glavni prenašalec borelij v Evropi je *I. ricinus*, ki poleg borelij prenaša tudi druge mikroorganizme (virus klopnega meningoencefalitisa, *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia microtii*, *Babesia divergens* in druge). V Evraziji je glavni vektor lymške borelioze *I. persulatus*, v Severni Ameriki pa *I. scapularis* (na vzhodni obali) in *I. pacificus* (na zahodni obali) (Eisen in Lane, 2002). Vrsta *I. uriae*, ki parazitira pri morskih ptičih, naj bi prenašala borelije v različne predele sveta (Derdáková in Lenčaková, 2005).

Vektorji rodu *Ixodes* niso vrstno specifični za *B. burgdorferi* sensu lato, prenašajo lahko več borelij *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* in *B. afzelii*, ki so v Evropi patogene za človeka ter *I. scapularis* in *I. pacificus* kot vektorja *B. burgdorferi* sensu stricto v Severni Ameriki (Wang in sod., 1999). Klopi se lahko s krvjo gostitelja, ki vsebuje borelije, okužijo v treh različnih razvojnih stopnjah (larva, nimfa in odrasel klop), kar prikazuje slika 3. Tako so okuženi klopi z borelijami v stopnji larve in nimfe, ki parazitirajo na majhnih sesalcih in ptičih, nato se preobrazijo v nimfo, ki poišče gostitelja naslednjo pomlad. Po ponovnem sesanju se preobrazijo v odrasle klope, ki parazitirajo na velikih sesalcih (Humair in Gern, 2000).



Slika 3: Razvojne stopnje klopa (Humair in Gern, 2000)

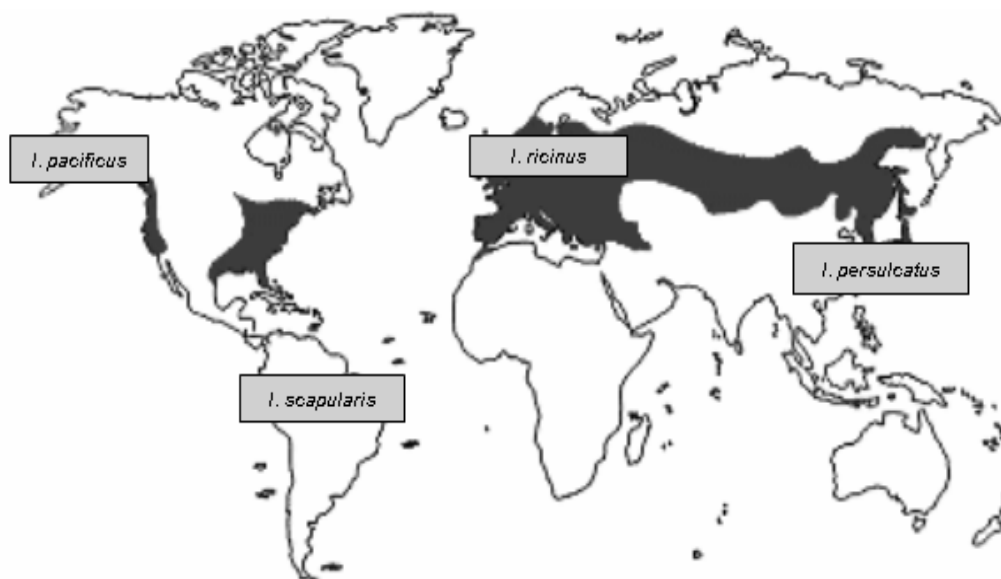


Borelije se lahko prenašajo na dva načina, vertikalno (transovarialno) in horizontalno (transstadialno). Pri horizontalnem načinu okužene larve, nimfe in odrasli klopi prenesejo borelije na živali oziroma človeka. Pri transovarialnem načinu okužene samice klopa prenesejo borelije na jajčeca, iz njih na larve, nimfe in do odraslega klopa (Strle, 1992; Humair in Gern, 2002). Kljub temu, da so odrasli klopi pogosteje okuženi z *B. burgdorferi* sensu lato kot nimfe, so nimfe za človeka najpomembnejše kot glavni prenašalec lymške borelioze na ljudi (Zore in sod., 2000). Nekateri so mnenja, da so epidemiološke, ekološke razlike in različne klinične slike lymške borelioze v povezavi z različnimi genotipi znotraj rodu *Borrelia*.

Rod *Ixodes* parazitira okoli 300 različnih vretenčarjev kot so veliki in mali sesalci, ptiči in plazilci, ki predstavljajo epidemiološki rezervoar *B. burgdorferi* sensu lato. Okužene so tudi domače živali, kot so psi, konji, mačke in govedo (Gern in Humair, 2002). Človek je naključni gostitelj. Pomemben rezervoar predstavljajo tudi ptiči, ki lahko prenašajo borelije na dolge razdalje, tudi med kontinenti. *B. afzelii* okuži godalce, medtem ko sta *B. garinii* in *B. valaisiana* pogosta povzročitelja lymške bolezni pri ptičih (Richter in Matuschka, 2006a).

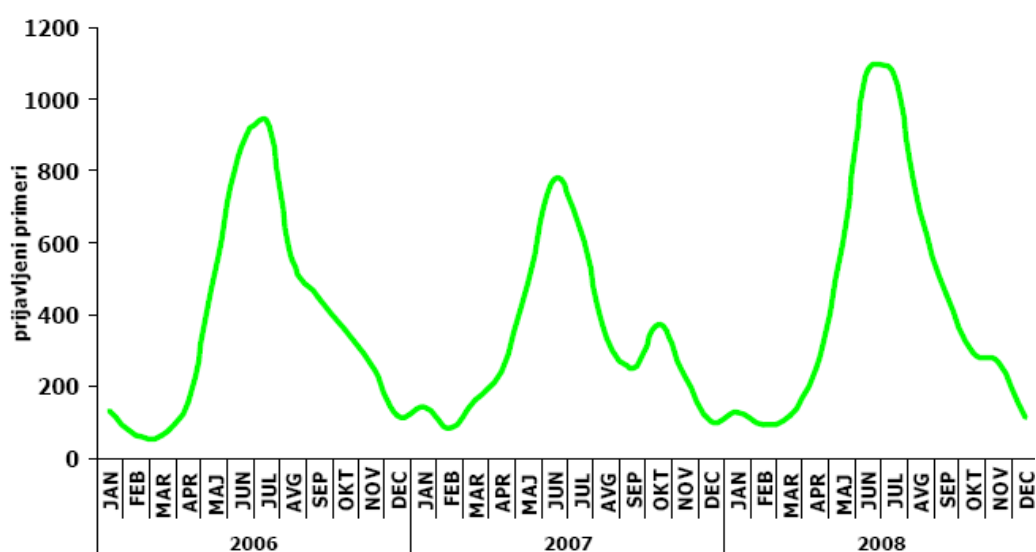
## 2.5 EPIDEMIOLOGIJA

Lymška borelioza je zoonoza in poteka v zmernotoplem pasu na severni polobli, kjer se nahajajo klopi (slika 4). V Evropi se največje število primerov okužbe z *B. burgdorferi* sensu lato pojavlja v Srednji Evropi in Skandinavdiji, posebno v Avstriji, Sloveniji in na Švedskem. Primeri lymške borelioze so vidni tudi v območju Azije, predvsem v Rusiji, Kitajskem, Japonskem ter v Severni Ameriki (Wang in sod., 1999; Eisen in Lane, 2002). Lymška borelioza je v Sloveniji endemična. Obolenje se pojavlja preko celega leta, vendar neenakomerno.



Slika 4: Geografska razširjenost obolevanja z lymsko boreliozo (Eisen in Lane, 2002)

Bolezen se pojavlja sezonsko in je povezana z aktivnostjo klopov. Spodaj je prikazan diagram prijavljenih bolnikov z lymsko boreliozo po mesecih v obdobju med 2006 in 2008. Razviden je največji izbruh obolelih v poletnih mesecih (konec spomladi in poleti), ko so klopi najbolj aktivni, ljudje pa v tem času preživljajo veliko časa v naravi in so izpostavljeni vbodom klopov (slika 5). Takrat je incidenca bolezní višja. Ker se bolezenski znaki lahko pojavijo tudi več mesecev po okužbi, se primeri pojavljajo tudi izven sezone aktivnosti klopov (Strle, 1996; IVZ, 2009).



Slika 5: Prijavljeni primeri lymške borelioze po mesecih, Slovenija, 2006-2008 (IVZ, 2009)

Incidenca v letu 2008 je bila 255 primerov/ 100.000 prebivalcev (IVZ, 2009). Zbolevajo vse starostne skupine, pogosto je pri prvih letih otrokovega življenja ter v starostnih skupinah 35 do 65 let. Med zbolelimi prevladujejo predvsem ženske. Dejansko je število obolelih znatno večje zaradi nedoslednega prijavljanja obolenja, kot tudi zaradi neprepoznavnosti vseh bolnikov (Strle, 1996).

## 2.6 MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA

Diagnoza bolezni je postavljena na osnovi značilnih kožnih sprememb ali z mikrobiološkimi preiskavami pri neznačilnih znakih okužbe (Steere, 2001). Laboratorijsko diagnostiko okužbe s *B. burgdorferi* sensu lato lahko izvedemo s posrednimi in neposrednimi metodami. Vsaka metoda ima svojo občutljivost in specifičnost.

Borelijsko okužbo lahko neposredno dokazujemo v kliničnih vzorcih z naslednjimi metodami:

- osamitev *B. burgdorferi* sensu lato
- dokazovanje molekule DNK *B. burgdorferi* sensu lato
- prikaz *B. burgdorferi* sensu lato z imunohistokemičnimi metodami ali neposrednim mikroskopiranjem.

Lymsko boreliozo lahko dokažemo tudi posredno z dokazom bolnikovega imunskega odziva na borelijske atigene in sicer z dokazovanjem specifičnih protiteles in z dokazom stimulacije limfocitov T (Ružić-Sabljić, 2000; Agüero-Rosenfeld in sod., 2005).

### 2.6.1 Kultivacija borelij

Izolacija in kultivacija borelij kot neposredna metoda je v diagnostiki ocenjena kot »zlati standard«, pri čemer uporabljamo tekoča gojišča kot sta BSK (Barbour-Stoener-Kellyjevo

gojišče) in MPK (modificirano Kelly-Pettenkoferjevo gojišče) (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005). Borelije pa uspevajo tudi na trdnih gojiščih z dodatkom agaroze pod anaerobnimi pogoji. Kultiviramo jih pri temperaturi 30-34 °C, višje temperature od 39 °C upočasnijo ali preprečijo rast. Nacepljene vzorce inkubiramo v gojišču do 12 tednov (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005).

### 2.6.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

V diagnostiki borelijske okužbe se PCR metoda uporablja predvsem za potrditev okužbe, identifikacijo izoliranih borelij in dokazovanje koinfekcije gostitelja z drugimi patogenimi mikroorganizmi (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005). Občutljivost in specifičnost testa PCR pri dokazovanju DNA bakterije *B. burgdorferi* variira v odvisnosti od kliničnih vzorcev. Občutljivost testa PCR je nizka pri uporabi vzorcev krvi in likvorja, večja pa je v sinovijski tekočini pri pacientih z lymskim artritismom ali koži erythema migrans. Rezultati so lahko možno lažno negativni (premajhna koncentracija tarčne DNA v vzorcu) ali lažno pozitivni (kontaminacija vzorcev). Pomembna je zadostna koncentracija spirohet v vzorcu bolnika oziroma velikost vzorca, ker vpliva neposredno na rezultat metode. Vpliva tudi samo ravnanje s klinični vzorci (odvzem vzorca, transport, shranjevanje in priprava DNA iz teh vzorcev). PCR je v primerjavi s kultivacijo hitra metoda, vendar ni standardizirana (Ružič-Sabljić, 2000).

### 2.6.3 Serološko dokazovanje lymške borelioze

Serološke metode kot posredne metode se pogosto uporabljajo pri dokazovanju specifičnih protiteles IgM in IgG, kot so encimskoimunski test (ELISA), imunofluorescenčni test (IFT) in Westernblot test (WB). Z njimi dokažemo specifična borelijska protitelesa v serumu, likvorju ali sinovijski tekočini (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005). Pri nekaterih bolnikih opazimo močan imunski odziv, pri drugih pa šibek ali odstoten. Odstoten imunski odziv lahko ugotavljamo pri bolnikih, ki so bili zgodaj zdravljeni z antibiotiki ali pa so preboleli le zgodnjo lokalizirano borelijsko okužbo erythema migrans. Pri zgodnji lokalizirani okužbi, kot je erythema migrans, ugotovimo približno četrtrtino bolnikov, ki so

razvili protitelesa, pri kronični obliki bolezni pa so skoraj vsi bolniki serološko pozitivni. Odstotnost imunskega odziva ne pomeni odstotnost borelijske okužbe in obratno, prisotnost imunskega odziva ne pomeni aktivno borelijsko okužbo (Ružič-Sabljić, 2000)

Za pripravo antigena v serološkem testu uporabljamo, bodisi celo borelijo lizat celice ali rekombinantne oziroma prečiščene antigene. Menijo, da borelije izražajo heterogene antigene v različnih gostiteljih in posledično so rezultati pri serološki diagnostiki nejasni, zato je pomembno, da pri izvedbi seroloških testov izberemo kot antigen ustrezen sev *B. burgdorferi* sensu lato. Ustrezen sev je tisti, ki prevladuje na območju, ki je endemično. Na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani se za določanje specifičnih borelijskih protiteles uporablja kot antigen sev *B. afzelii*.

Imunski odziv bolnika na okužbo z borelijami nastaja počasi. Po prvih nekaj tednih okužbe, preden se razvije humoralni odziv oziroma ko je nivo protiteles nizek, lahko dobimo lažno negativen rezultat (Brown in sod., 1999).

Testi se razlikujejo po metodi testiranja, pripravi antigena, občutljivosti in specifičnosti. Prednost seroloških testov je, da so že tovarniško pripravljene in zato dostopni mnogim mikrobiološkim laboratorijem po svetu, metode so hitre in poceni.

Pomanjkljivost testov je različna občutljivost in specifičnost in njihova nestandariziranost (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005). Kot presejalna testa se najpogosteje uporabljata IFT in ELISA. Encimska metoda je v primerjavi z IFT bolj občutljiva ter je primerna zlasti za laboratorije, kjer opravijo veliko testov (Magnarelli in sod., 1984). Nizka občutljivost se pri izvajanju različnih seroloških testov pojavlja, ker bolnika testiramo pred razvojem imunskega odziva. Serološke preiskave pri zgodnji okužbi pokažejo v več kot polovici primerov lažno negativne rezultate, bodisi zaradi premalo občutljive metode ali zaradi prezgodnjega odvzema vzorcev. Pri nekaterih bolnikih do izdelovanja specifičnih protiteles sploh ne pride, ali pa se gibljejo v nizkih titrih (Ružič-Sabljić, 2000). Opisujejo lažno pozitivne rezultate zaradi navkrižne reaktivnosti protiteles *B. burgdorferi* z drugimi bakterijami. Nekateri priporočajo dvostopenjsko testiranje: serološki presejalni test (npr.: ELISA ali IFT) in nato potrditveni test (Westernblot ali imunoblot). S dvostopenjskim testiranjem se poveča specifičnost (99-100%) in občutljivost, kar zmanjšuje število lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov (Depietropaolo in sod., 2005). Westerblot in imunoblot zaznata protitelesa usmerjena proti določenim antigenom *B. burgdorferi* sensu

lato in tako zmanjša število lažno pozitivnih rezultatov (Brown in sod., 1999; Ledue, 2008). Dvostopenjsko testiranje pa ne omogoča vedno dobro specifičnost in občutljivost, zato se v teh letih pojavljajo nove izboljšave seroloških testov (Bakken in sod., 1997). V zadnjih letih se je močno razvijala tretja generacija sodobnih seroloških testov z namenom, da povečajo občutljivost seroloških testov in pri tem uporabljajo kombinacijo rekombinantnih ali sintetičnih peptidov (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005; Wilske in sod., 2007). Mednje sodijo tudi testi proizvajalca DiaSorin, LIAISON® test. LIAISON® test, kot popolnoma avtomatiziran test, je indirektni kemiluminiscenčni test. Podobno kot vsi serološki testi temelji na nastanku imunskega kompleksa med specifičnimi protitelesi IgM in IgG ter antigeni. V tem primeru se uporabljajo rekombinantni antigeni, predvsem antigena VlsE, imunogenega 53 kDa zunajpovršinskega lipoproteina in OspC. LIAISON® test uporabljamo kot posredno kvantitativno metodo določanja specifičnih protiteles IgM in IgG v serumu in likvorju bolnika (Ledue in sod., 2008).

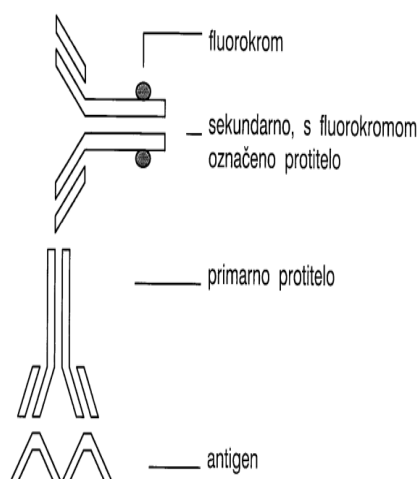
### 3 MATERIALI IN METODE

Pri dokazovanju protiteles proti *B. burgdorferi* sensu lato so podani rezultati dveh seroloških testov, IFT in LIAISON®. V raziskavo je bilo vključenih 157 vzorcev seruma in 128 vzorcev likvorja bolnikov, vzeti iz arhiva v Laboratoriju za dokazovanje borelioz in leptospiroz na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Pri tem smo testirali po 128 vzorcev seruma in likvorja od istega bolnika ter 29 vzorcev seruma bolnikov, za katere je bilo likvorja premalo za izvedbo seroloških testov. Bolniki, katerih serume in likvor smo vključili v preiskavo, so bili pregledani v obdobju med letom 2005 in 2007 na Kliniki za infektivne bolezni in vročinska stanja v Ljubljani.

#### 3.1 TEST IMUNOFLUORESCENCE

##### 3.1.1 Princip testa IFT

IFT temelji na principu reakcije antigena in protiteles, pri čemer poteka specifično imunska reakcija. Primarna protitelesa proti določenim antigenom postanejo vidna takrat, ko nanje vežemo sekundarna protitelesa označena s fluorokromom, kar prikazuje slika 7.



Slika 6: Indirektna imunofluorescenca, pri čemer je sekundarno protitelo označeno s fluorokromom (Rotter, 1994)

Specifična protitelesa IgM in IgG iz seruma bolnika se najprej vežejo na antigen, ki je pritrjen na predmetnik, v našem primeru je to objektno stekelce. Kompleksu dodamo s fluorokromom označena antihumana protitelesa proti IgM in IgG, ki prepoznajo primarna, bolnikova protitelesa, vezana v imunski kompleks z antigenom. Novonastali fluorescirajoč imunski kompleks opazujemo pod UV svetlobo fluorescenčnega mikroskopa in določamo titer protiteles (Ružič-Sabljić in sod., 2000).

### 3.1.1.1 Uporabljeni reagenti

- PBS pufer s pH 7,4 za spiranje
- antihumana protitelesa IgM in IgG, konjugirana s fluorescein izotiocianatom (FITC), ki absorbira modro svetlobo (490 nm) in oddaja močno rumenozeleno fluorescenco (517 nm). Proizvajalec konjugatov (FITC antihumani IgM in FITC antihumani IgG) je INEP (Institute for application of nuclear energy, Srbija). Paziti moramo, da niso konjugati izpostavljeni prekomerni svetlobi.
- pozitivna kontrola (serum z razredčino 1:256 oziroma likvor z razredčino 1:16)
- negativna kontrola (PBS)
- imerzijsko olje

### 3.1.1.2 Material za izvedbo IFT

- mikrotitrna ploščica (8 × 12 luknjic)
- vlažna komora
- inkubator z nastavljivo temperaturo +37°C
- kalibrirane pipete



- multikanalna pipeta in nastavki
- kadičke za spiranje
- stojala
- staničevina
- objektna stekelca z nanešenimi antigeni borelije
- fluorescenčni mikroskop
- stresalnik

### 3.1.1.3 Priprava serumskih razredčin v mikrotitrski ploščici

Pred pričetkom izvajanja testa smo pripravili protokolni list, kamor smo vpisali številko seruma, oznake bolnikov, razred protiteles in oznake razredčin serumov. Označili smo mikrotitrsko ploščico z ustreznimi razredčinami serumov in zaporedno številko posameznega seruma. Razredčine pozitivne kontrole in seruma pacientov smo pripravili tako, da smo v prve luknjice vrstice dodali 150  $\mu$ l PBS in v ostale luknjice pa 50  $\mu$ l PBS. V prvo luknjico vsake vrstice smo nakapljali 10  $\mu$ l vzorca seruma posameznega bolnika in v eno kontrolo, v ostale razredčine pa smo s pomočjo multikanalne pipete premešali vsebino luknjice v prvi vrsti in prenesli po 50  $\mu$ l razredčine do zadnje luknjice s pufrom. Tako smo dobili v prvi luknjici vsake vrste razredčino 1:16, sledile so 1:32, 1:64, 1:128 in 1:256.

### 3.1.1.4 Priprava razredčin likvorja v mikrotitrski ploščici

Kot pri pripravi serumskih razredčin smo tudi tukaj pripravili protokolni list z ustreznimi oznakami. Označili smo mikrotitrsko ploščico tako, da je vsaka vrstica pripadala posameznemu vzorcu in ob robu označili oznako L kot likvor. Razredčine pozitivne kontrole in likvorja pacientov smo pripravili tako, da smo v vse luknjice posamezne vrstice

nakapljali po 50  $\mu$ l PBS. V prvo luknjico vsake vrstice smo nakapljali 50  $\mu$ l vzorca likvorja posameznega bolnika, v ostale razredčine pa smo s pomočjo multikanalne pipete premešali vsebino luknjice v prvi vrsti in prenesli po 50  $\mu$ l razredčine do zadnje luknjice s pufrom. Tako smo dobili v prvi luknjici vsake vrste razredčino 1:2, sledile so 1:4, 1:8, 1:16 in 1:32.

### 3.1.1.5 Izvedba testa za analizo protiteles seruma in likvorja z IFT

Pripravili smo objektna stekelca z antigeni, ki so bila označena kot IgM in IgG. Vzorce smo istočasno nanesti na ploščico za dokaz IgM in IgG protiteles. Na objektna stekelca z antigeni smo nanesti PBS, ki je predstavljal negativno kontrolo, pozitivno kontrolo (z razredčino 1:256 pri serumu oziroma 1:16 pri likvorju) in razredčine serumov bolnikov 1:128 in 1:256 oziroma likvorjev 1:8 in 1:16. Objektna stekelca smo inkubirali 30 minut v vlažni komori s temperaturo +37 °C. Po inkubaciji smo ploščice takoj spirali s čisto pufrsko raztopino PBS dvakrat po 7 minut. Na objektna stekelca smo nanesti antihumana protitelesa IgM oziroma IgG, usmerjena proti primarnim protitelesom, na ustrezno označena objektna stekelca. Ponovno smo stekelca inkubirali 30 min pri +37 °C v vlažni komori. Po inkubaciji smo stekelca spirali s pufrsko raztopino PBS in jih vstavili v stojala, kjer je bil PBS pufer ter spirali dvakrat po 7 min s PBS pufrom. Ko smo ploščice posušili na zraku, smo posušenim ploščicam nakapljali kapljico imerzijskega olja in pokrili s krovnim stekelcem ter pazili, da ni bilo ujetih mehurčkov. Mikroskopirali smo pod UV svetlobo, pri čemer smo videli intenzivno rumenozelena fluorescenco kot pozitivni rezultat in na osnovi tega določili največjo razredčino, pri kateri je bila vidna intenziteta rumenozelene barve ter primerjali s pozitivnim in negativnim kontrolnim vzorcem.

### 3.1.1.6 Vrednotenje rezultatov IFT testa pri serumu in likvorju

Serum: pozitiven titer za IgM in IgG  $\geq 256$

mejni titer za IgM in IgG 128

negativen titer za IgM in IgG  $\leq 64$

likvor: pozitiven titer za IgM in IgG  $\geq 16$

mejni titer za IgM in IgG 8

negativen titer za IgM in IgG  $\leq 4$

## 3.2 TEST IMUNOLUMINISCENCE

### 3.2.1 Princip LIAISON® testa

LIAISON® test (LIAISON® Borrelia IgM Quant in LIAISON® Borrelia IgG, proizvajalca DiaSorin, Saluggia, Italija), je indirektni imunoluminiscenčni test, s katerim določamo specifična protitelesa IgM in IgG proti bakteriji *B. burgdorferi* sensu lato. Pri tem se uporabljajo magnetni delci, ki so obdani z rekombinantni borelijskimi antigeni OspC seva pKo (*B. afzelii*) za določitev protiteles IgM in VlsE seva pBi (*B. garinii*) za določitev protiteles IgG. Protitelesa iz bolnikovega vzorca se vežejo na rekombinantne antigene, njihovo vezavo pa določamo z mišjimi monoklonskimi protitelesi, konjugiranimi z izoluminolnim derivatom. Če pride do vezave konjugata na kompleks antigen-protitelo, se po dodajanju posebnega start reagenta sprosti svetlobni signal, količino signala izmeri relativne luminiscenčne enote (RLU; angl.: relative luminiscence units). RLU kažejo na koncentracijo protiteles IgM in IgG v vzorcu in kontroli kakor tudi v kalibratorju (Cerar in sod., 2006; Petersen in sod., 2008).

#### 3.2.1.1 Vzorci

Vzorci seruma in likvorjev so bili shranjeni v zaprtih plastičnih epruvetkah v zamrzovalniku pri temperaturi  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pred izvedbo testa smo vzorce odtalili pri sobni temperaturi in jih vorteksirali. Pred samo izvedbo je potrebno odstraniti zračne mehurčke.

### 3.2.1.2 Uporabljeni reagenti v integralu:

Za izvedbo imunoluminiscenčnega testa LIAISON® *Borrelia* IgM Quant in LIAISON® *Borrelia* IgG smo uporabili komplet reagentov proizvajalca DiaSorin S.p.A, Saluggia, Italija.

Integral (stojalo s posodicami, kjer so različni reagenti) za imunoluminiscenčni test za 100 vzorcev vsebuje:

- magnetni delci (2,3 ml)- magnetni delci obdani z s specifičnimi antigeni: OspC za določitev protiteles IgM in VlsE za dokaz protiteles IgG bakterije *B. burgdorferi* sensu lato
- kalibrator 1 (0,7 ml)- človeški serum, ki vsebuje nizko koncentracijo posameznih vrst protiteles IgM in IgG, poleg tega je dodan še BSA, fosfatni pufer, konzervansi in neaktivno rumeno barvilo
- kalibrator 2 (0,7 ml)- človeški serum, ki vsebuje visoko koncentracijo posameznih vrst protiteles IgM in IgG. Dodani so BSA, fosfatni pufer, konzervansi in neaktivno modro barvilo.
- razredčevalni pufer (28 ml)- dodani so BSA, fosfatni pufer, konzervansi in neaktivno rumeno barvilo
- konjugat (23 ml)- mišja monoklonska protitelesa proti humanim protitelesom IgM in IgG, ki so konjugirana z derivatom izoluminola, BSA, fosfatni pufer in konzervansi
- pozitivna in negativna kontrola za dokazovanje posameznih protiteles IgM in IgG
- reagent za spiranje
- »start« reagent

Pred uporabo morajo biti integrali z reagenti pokončno shranjeni v hladilniku pri temperaturi 2-8 °C, tudi takrat, ko so odprti. S tem se ohrani pravilno stanje magnetnih

delcev in takrat traja njihova stabilnost tudi do 4 tednov oziroma do izteka roka uporabe. Reagente pripravimo tako, da jih pred uporabo horizontalno previdno pretresemo, pri čemer preprečimo penjenje. Odstranimo pokrov s vsake posodice, obračamo kolešček na dnu posode z magnetnimi delci, dokler ne postane usedlina rjave barve. To povzroči raztopitev magnetnih delcev. Nato postavimo integral v prostor za reagente v analizator. Pred uporabo pustimo stati 30 minut, pri tem analizator premeša in resuspendira magnetne delce (DiaSorin, 2007).

### 3.2.1.3 Material za izvedbo testa LIAISON®

- analizator LIAISON proizvajalca DiaSorin
- stresalnik
- stojala za vzorce
- staničevina

### 3.2.1.4 Izvedba LIAISON® testa za analizo protiteles seruma in likvorja

Analizator smo upravljali v skladu z navodili proizvajalca. Integrale postavimo v prostor za reagente v analizator. Vzorce smo pred analizo na analizatorju najprej odtalili na sobni temperaturi ter premešali na vorteksu. Postavili smo jih na stojala, ki so bila posebej označena s črtnimi kodami, da jih je lahko analizator sam prepoznal. Analizator sam avtomatično premeša in resuspendira magnetne partikle. V računalniškem programu smo nato odtipkali zelene kode naših vzorcev ter zeleno analizo (za protitelesa IgM in IgG bakterije *B. burgdorferi* sensu lato). Čas obdelave analize je bil odvisen od števila vzorcev. Analiza znotraj aparata je delovala po postopku. Najprej so se redčili vzorci in kontrole z delovnim reagentom. Nato se dodajajo magnetni partikli, ki so obdani z rekombinatnimi antigeni. Sledi inkubacija, med katero se protitelesa iz vzorcev, kalibratorjev ali kontrol vežejo na magnetne partikle. Nevezan material se odstrani s spiranjem. V nadaljevanju

postopka se doda konjugat z izoluminolnim derivatom. V drugi fazi inkubacije konjugat reagira s kompleksom antigen-protitelo. Dalje se nevezan material ponovno odplakne s spiranjem. Na koncu se doda »start« reagent, ki povzroči svetlobno kemiluminiscenčno reakcijo. Pri tem se sprosti svetlobni signal in je njegova jakost odvisna od koncentracije konjugata in kompleksa antigen-protitelo. Svetlobni signal meri fotopomnoževalnik v relativnih svetlobnih enotah (RLU), ki so sorazmerne s koncentracijo specifičnih protiteles *B. burgdorferi* v vzorcih. Rezultati so podani kot AU/ml (enote/ml ali angl. arbitrary unit).

### 3.2.1.5 Ovrednotenje rezultatov testa LIAISON®

Analizator LIAISON izmeri svetlobni signal, ki ga odda novonastali konjugat in je sorazmeren s koncentracijo protiteles v vzorcih. Rezultate koncentracij poda v AU/ml.

Pri meritvah koncentracij IgM in IgG so podane tudi mejne vrednosti, znotraj katerih so meritve uspešne.

Serum oziroma plazma: IgM 0-190 AU/ml

IgG 0-240 AU/ml

V kolikor izmerjene vrednosti izstopajo od določenih mejnih vrednosti, lahko iščemo vzrok v preveč razredčenemu vzorcu.

#### 3.2.1.5.1 Interpretacija rezultatov pri določanju koncentracije IgM in IgG v serumu

Pri meritvah koncentracij IgM so rezultati podani v obliki arbitrarnih enot (AU/ml-absorpcijske enote na mililiter).

Rezultati dokazovanja protiteles IgM so ovrednoteni kot:

- vrednosti vzorca s koncentracijo IgM protiteles pod 18 AU/ml se ocenijo kot negativni
- vrednosti vzorca s koncentracijo IgM med 18 AU/ml in 22 AU/ml se ocenijo kot mejni

- vrednosti vzorca s koncentracijo IgM 22 AU/ml ali več se ocenijo kot pozitivni

Pri meritvah koncentracij IgG so rezultati podani v obliki arbitrarnih enot. Rezultate vzorcev z IgG protitelesi proti bakteriji *B. burgdorferi* sensu lato se interpretira sledeče:

- vrednosti vzorca s koncentracijo IgG protiteles pod 10 AU/ml se ocenijo kot negativni
- vrednosti vzorca s koncentracijo IgG med 10 AU/ml in 15 AU/ml se ocenijo kot mejni
- vrednosti vzorca s koncentracijo IgG 15 AU/ml ali več se ocenijo kot pozitivni

#### 3.2.1.5.2 Interpretacija rezultatov pri določanju koncentracije IgM in IgG v likvorju

Pri meritvah koncentracij protiteles IgM so rezultati ovrednoteni kot:

- vrednosti vzorca s koncentracijo IgM protiteles pod 2,5 AU/ml se ocenijo kot negativni
- vrednosti vzorca s koncentracijo IgM med 2,5 AU/ml in 3,5 AU/ml se ocenijo kot mejni
- vrednosti vzorca s koncentracijo IgM 3,5 AU/ml ali več se ocenijo kot pozitivni

Rezultati vzorcev likvorja s protitelesi IgG so opredeljeni kot:

- vrednosti vzorca s koncentracijo IgG protiteles pod 4,5 AU/ml se ocenijo kot negativni
- vrednosti vzorca s koncentracijo IgG med 4,5 AU/ml in 5,5 AU/ml se ocenijo kot mejni
- vrednosti vzorca s koncentracijo IgG 5,5 AU/ml ali več se ocenijo kot pozitivni

### 3.3 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Dobljene rezultate smo obdelali s statistično metodo McNemar, pri čemer smo določali razlike med testoma LIAISON® in IFT. Pri preizkušanju domnev smo preverjali vrednost  $p$ . Vrednost  $p < 0,05$  smo obravnavali kot statistično značilno, ni pa značilna, če je vrednost  $p > 0,05$ . Pri izračunu statistične signifikantnosti smo uporabili dostopen program na spletu: (<http://faculty.vassar.edu/lowry/propcorr.html>).



## 4 REZULTATI

Dokazovali smo protitelesa razreda IgM in IgG proti bakteriji *B. burgdorferi* sensu lato pri bolnikih z lymsko boreliozo oziroma s sumom nanjo in primerjali rezultate, ki smo jih določali s serološkima testoma IFT in LIAISON®. V raziskavo smo vključili 157 serumov in 128 likvorjev bolnikov z klinično diagnozo lymške borelioze ali sumom nanjo. Pri tem smo določali specifična borelijska protitelesa v vseh serumih in likvorjih z IFT in LIAISON® testom. Rezultati serološkega testiranja vzorcev serumov in likvorjev ter primerjava obeh seroloških testov so prikazani v preglednicah 1-10.

### 4.1 DOKAZOVANJE SPECIFIČNIH PROTITELES IgM in IgG Z IFT

#### 4.1.1 Rezultati testiranja serumov s testom imunofluorescence

Testirali smo 157 serumov. S testom IFT smo pogosteje dokazali prisotnost protitelesa IgG (14,01 %) kot protitelesa IgM (0 %) (preglednica 1).

Preglednica 1: Rezultati testiranja 157 serumov s testom imunofluorescence pri določanju protiteles IgM in IgG

IFT	IgM	IgG
≥ 256 poz	0 (0 %)	22 ( 14,01 %)
128 mejno	2 (1,27 %)	31 (19,75 %)
≤ 64 neg	155 (98,73 %)	104 (66,24 %)
skupaj	157 (100 %)	157 (100 %)

#### 4.1.2 Rezultati testiranja likvorjev s testom imunofluorescence

Testirali smo 128 likvorjev. Pogosteje smo dokazali protitelesa razreda IgG 17/128 (13,28 %) kot protitelesa IgM 2/128 (1,56 %). Rezultate prikazuje preglednica 2.

Preglednica 2: Rezultati testiranja 128 likvorjev s testom imunofluorescence pri določanju protiteles IgM in IgG

<b>IFT</b>	<b>IgM</b>	<b>IgG</b>
<b>≥ 16 poz</b>	2 (1,56 %)	17 (13,28 %)
<b>8 mejno</b>	0 (0 %)	6 (4,69 %)
<b>≤ 4 neg</b>	126 (98,44 %)	105 (82,03 %)
<b>skupaj</b>	128 (100 %)	128 (100 %)

## 4.2 DOKAZOVANJE SPECIFIČNIH PROTITELES IgM in IgG Z LIAISON®

### 4.2.1 Rezultati testiranja serumov s testom LIAISON®

Protitelesa IgM in IgG z imunoluminiscenčnim testom smo določali pri 157 bolnikih, pri čemer smo pri določanju protiteles IgM dobili pozitiven rezultat pri 53/157 (33,76 %), protiteles IgG pa pri 101/157 (64,33 %). Več serološko pozitivnih smo ugotovili pri dokazovanju protiteles IgG kot IgM. Rezultati so prikazani v preglednici 3.

Preglednica 3: Rezultati testiranja 157 serumov z LIAISON® testom pri določanju protiteles IgM in IgG

<b>LIAISON®</b>				
	<b>IgM</b>		<b>IgG</b>	
<b>poz</b>	<b>&gt; 22 AU/ml</b>	53 (33,76 %)	<b>&gt; 15 AU/ml</b>	101 (64,33 %)
<b>mejno</b>	<b>18-22 AU/ml</b>	10 (6,37 %)	<b>10-15 AU/ml</b>	6 (3,82 %)
<b>neg</b>	<b>&lt; 18 AU/ml</b>	94 (59,87 %)	<b>&lt; 10 AU/ml</b>	50 (31,85 %)
<b>skupaj</b>		157 (100 %)		157 (100 %)

#### 4.2.2 Rezultati testiranja likvorjev s testom LIAISON®

Pri določanju protiteles smo pogosteje dokazali protitelesa IgG (36,72 %) kot protitelesa IgM (28,13 %). Rezultate prikazuje preglednica 4.

Preglednica 4: Rezultati testiranja 128 likvorjev z LIAISON® testom pri določanju protiteles IgM in IgG

LIAISON®				
	IgM		IgG	
<b>poz</b>	> 3,5 AU/ml	36 (28,13 %)	> 5,5 AU/ml	47 (36,72 %)
<b>mejno</b>	2,5-3,5 AU/ml	2 (1,56 %)	4,5-4,5 AU/ml	2 (1,56 %)
<b>neg</b>	< 2,5 AU/ml	90 (70,31 %)	< 4,5 AU/ml	79 (61,72 %)
<b>skupaj</b>		128 (100 %)		128 (100 %)

#### 4.3 PRIMERJAVA REZULTATOV TESTA IFT IN LIAISON®

Pri primerjavi dveh seroloških testov smo ugotavljali, ali so med testoma razlike statistično značilne pri določanju protiteles IgM in IgG v serumu in likvorju posameznega bolnika. Pri tem smo mejne oziroma nejasne vrednosti pri testih IFT in LIAISON® šteli za pozitivno vrednost.

##### 4.3.1 Primerjava rezultatov IFT in LIAISON® testa pri določanju protiteles IgM in IgG v serumu bolnikov

Pri primerjavi dveh testov se je za bolj občutljivega izkazal test LIAISON®, s katerim smo dokazali serumska protitelesa IgM pri 53/157 (33,76 %) bolnikih. Ugotovili smo, da so razlike med testoma statistično značilne ( $p < 0,05$ ). Rezultati so prikazani v preglednici 5.

Preglednica 5: Primerjava rezultatov IFT in LIAISON® testa pri določanju protiteles IgM v serumu bolnikov

	IFT LIAISON®	≥ 256 poz	128 mejno	≤ 64 neg	skupno
	<b>IgM</b>	<b>poz</b> > 22 AU/ml	0	1	52
<b>mejno</b> 18-22 AU/ml		0	1	9	<b>10</b>
<b>neg</b> < 18 AU/ml		0	0	94	<b>94</b>
skupaj		<b>0</b>	<b>2</b>	<b>155</b>	<b>157</b>

Preglednica 6: Primerjava rezultatov IFT in LIAISON® testa pri določanju protiteles IgG v serumu bolnikov

	IFT LIAISON®	≥ 256 poz	128 mejno	≤ 64 neg	skupno
	<b>IgG</b>	<b>poz</b> > 15 AU/ml	20	27	54
<b>mejno</b> 10-15 AU/ml		1	1	4	<b>10</b>
<b>neg</b> < 10 AU/ml		1	3	46	<b>94</b>
skupaj		<b>22</b>	<b>31</b>	<b>104</b>	<b>157</b>

Test LIAISON® se je prav tako izkazal za bolj občutljivega pri dokazovanju serumskih protiteles IgG pri 101/157 (64,33 %) bolnikih. Pri dokazovanju protiteles IgG smo ugotovili statistično značilno razliko ( $p < 0,05$ ) med testoma IFT in LIAISON® (preglednica 6).

#### 4.3.2 Primerjava rezultatov IFT in LIAISON® testa pri določanju protiteles IgM in IgG v likvorju bolnikov

Primerjava metod IFT in LIAISON® je pokazala statistično značilno razliko  $p < 0,05$  pri dokazovanju protiteles IgM v likvorjih bolnikov (preglednica 7). Test LIAISON® se je izkazal za bolj občutljivega, kot je razvidno pri rezultatih dokazovanja protiteles IgM v likvorju bolnikov 36/128 (28,13 %).

Preglednica 7: Primerjava rezultatov IFT in LIAISON® testa pri določanju protiteles IgM v likvorju bolnikov

	IFT	≥ 16 poz	8 mejno	≤ 4 neg	skupno
	LIAISON®				
<b>IgM</b>	<b>poz</b> > 3,5 AU/ml	2	0	34	<b>36</b>
	<b>mejno</b> 2,5-3,5 AU/ml	0	0	2	<b>2</b>
	<b>neg</b> < 2,5 AU/ml	0	0	90	<b>90</b>
	skupaj	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>126</b>	<b>128</b>

Pri določanju protiteles IgG (36,72 %) v likvorju bolnikov kažejo rezultati, da je LIAISON® bolj občutljiv kot IFT, kot je razvidno v preglednici 8. Razlike med metodama

IFT in LIAISON® so statistično značilne ( $p < 0,05$ ) pri dokazovanju protiteles IgG v likvorjih.

Preglednica 8: Primerjava rezultatov IFT in LIAISON® testa pri določanju protiteles IgG v likvorju bolnikov

	IFT	≥ 16 poz	8 mejno	≤ 4 neg	skupno
	LIAISON®				
<b>IgG</b>	<b>poz</b> > 5,5 AU/ml	17	5	25	<b>47</b>
	<b>mejno</b> 4,5-5,5 AU/ml	0	0	2	<b>2</b>
	<b>neg</b> < 4,5 AU/ml	0	1	78	<b>79</b>
	skupaj	<b>17</b>	<b>6</b>	<b>105</b>	<b>128</b>

#### 4.3.3 Primerjava rezultatov IFT in testa LIAISON® pri določanju protiteles IgM v serumih in likvorjih posameznega bolnika

Naredili smo primerjavo rezultatov testov IFT in LIAISON® pri določanju protiteles IgM v serumu in likvorju. Na razpolago smo imeli 128 bolnikov, katerim smo določali istočasno protitelesa v serumu in likvorju z IFT in LIAISON®. Ostalih vzorcev, bodisi samo serum ali samo likvor vsakega bolnika, nismo upoštevali za primerjavo. Rezultati so prikazani v preglednici 9. Za bolj občutljiv test se je izkazal test LIAISON®, s katerim smo dokazali prisotnost protiteles IgM istočasno v serumu in likvorju.

Preglednica 9: Primerjava rezultatov IFT in LIAISON® testa pri določanju protiteles IgM v serumih in likvorjih 128 bolnikov s sumom na lymsko boreliozo

<b>Protitelesa IgM</b>	<b>IFT</b>	<b>LIAISON®</b>	<b>IFT in LIAISON®</b>
<b>kri</b> +	/	22	/
<b>likvor</b> +			
<b>kri</b> +	2	29	2
<b>likvor</b> -			
<b>kri</b> -	2	16	1
<b>likvor</b> +			
<b>kri</b> -	124	61	61
<b>likvor</b> -			
<b>skupaj</b>	<b>128</b>	<b>128</b>	<b>64</b>

#### 4.3.4 Primerjava rezultatov IFT in testa LIAISON® pri določanju protiteles IgG v serumih in likvorjih posameznega bolnika

Za primerjavo smo imeli na razpolago 128 bolnikov, pri katerih smo imeli razpoložljiva oba vzorca, serum in likvor. Test LIAISON® se je prav tako izkazal za najbolj občutljivega pri dokazovanju protiteles IgG, ki smo jih istočasno uspeli dokazati v serumu in likvorju posameznega bolnika (preglednica 10).

Preglednica 10: Primerjava rezultatov IFT in LIAISON® testa pri določanju protiteles IgG v serumih in likvorjih 128 bolnikov s sumom na lymsko boreliozo

<b>Protitelesa IgG</b>	<b>IFT</b>	<b>LIAISON®</b>	<b>IFT in LIAISON®</b>
<b>kri</b> + <b>likvor</b> +	19	49	19
<b>kri</b> + <b>likvor</b> -	26	36	11
<b>kri</b> - <b>likvor</b> +	4	/	/
<b>kri</b> - <b>likvor</b> -	79	43	40
<b>skupaj</b>	<b>128</b>	<b>128</b>	<b>70</b>



## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Lymška borelioza je razširjena po vsem svetu in ima izredno pester ter raznolik potek bolezni. Mikrobiološka diagnostika lymške borelioze temelji na neposrednih (izolacija, PCR) in posrednih (seroloških) testih. Kultivacija je kljub svoji pomankljivosti »zlati standard« med mikrobiološkimi metodami, skoraj vedno pa se izvajajo le serološke metode. Serološki testi so pomembne diagnostične metode za dokazovanje specifičnih borelijskih protiteles, ki so dostopne mnogim laboratorijem (Aquero-Rosenfeld in sod., 2005). Prednost teh testov je, da so hitri in poceni. Pomanjkljivost se kaže v nestandariziranosti ter omejeni specifičnosti in občutljivosti, na primer v nizki občutljivosti pri zgodnji lymski boreliozi. Protitelesa je možno odkriti v krvi. Razvijajo se razmeroma počasi. Določimo lahko ali gre za zgodnjo, akutno okužbo ali gre za preteklo oziroma dalj trajajočo okužbo. V akutni fazi je povečana predvsem koncentracija IgM, kasneje v naslednji fazi okužbe pa naraste koncentracija protiteles IgG. V prvi fazi okužbe je zaznan odziv protiteles, ki je usmerjen predvsem proti flagelinu OspC. V pozni fazi se izoblikuje odziv še na druge antigene, predvsem antigene OspA, OspB, OspC, VlsE, p100, p19 in drugih. Ker je razvoj protiteles počasen, so serološki testi neprimerni v prvih dveh tednih v zgodnji fazi bolezni zaradi nizke občutljivosti. Specifičnost in občutljivost sta večja v kasnejših fazah bolezni.

Z našo diplomsko nalogo smo želeli ovrednotiti dva različna serološka testa, IFT in LIAISON®, s katerima smo analizirali imunski odziv. Imunski odziv smo dokazali z določanjem specifičnih borelijskih protiteles. V raziskavo smo vključili 157 vzorcev seruma in 128 vzorcev likvorja bolnikov z diagnozo lymške borelioze ali s sumom nanjo. Izbrali smo bolnike, ki so bili rutinsko poslani v laboratorij in katerih je bila klinična slika le delno opredeljena tako, da nismo mogli določati občutljivost in specifičnost testov. Zato smo primerjali le analitično občutljivost dveh testov IFT in LIAISON®. Predvidevamo, da so imeli bolniki nevrološke težave, ki so jih želeli etiološko opredeliti, zato so pošiljali v laboratorij kri in likvor bolnikov, pri čemer so želeli ugotoviti imunski odziv na borelijske antigene.

Rezultati testiranja serumov in likvorjev, prikazani v preglednicah 1-4, so s testoma IFT in LIAISON® pokazali, da je več serološko pozitivnih bolnikov pri dokazovanju protiteles IgG kot pri IgM. Da je več IgG pozitivnih bolnikov, si razlagamo s tem, da gre za zgodnjo razširjeno okužbo in zato upada koncentracija IgM protiteles. Odziv protiteles IgM je pogosto prisoten v prvih nekaj tednih ali mesecih po okužbi, medtem ko je nastanek protitelesa IgG bolj izrazit kasneje v času lymške borelioze. Zato menimo, da so pri bolnikih večinoma prisotna protitelesa IgG, kar pomeni, da gre za že nekaj časa trajajočo okužbo.

V začetku lokalizirane okužbe je 20-50 % bolnikov serološko pozitivnih. V nadaljnji fazi bolezni, v času nastanka akutne nevroborelioze, se število serološko pozitivnih bolnikov poveča na 70-90 %. Več tednov po nastopu simptomov bolezni, je skoraj 100 % bolnikov serološko pozitivnih. Na splošno je lahko pri nekaterih bolnikih imunski odziv močan, pri drugih šibek, pri nekaterih pa imunskega odziva ni mogoče zaznati. Prisotnost specifičnih protiteles pa ne dokazuje vedno prisotnosti aktivne borelijske okužbe in nasprotno, odstotnost imunskega odziva ne pomeni odstotnost borelijske okužbe (Malovrh, 2000). Tako pri bolnikih, pri katerih smo dokazali prisotnost protiteles v serumu, ne moremo zaključiti, da imajo nevroboreliozo, saj rezultate serološkega testiranja vedno obravnavamo v okviru klinične slike bolnikov.

Kompleksnost antigenske sestave borelij še vedno predstavlja izziv za serološko diagnostiko lymške borelioze in razvoj tretje generacije seroloških testov, med katere spada tudi test LIAISON®. Občutljivost in standariziranost imunoblot testov so podkrepili z uporabo rekombinantnih proteinov, ki so izraženi predvsem in vivo (na primer protein VlsE) in kombinacija homolognih proteinov iz različnih sevov (na primer DbpA). VlsE je eden od bolj občutljivih antigenov za odkrivanje protiteles IgG, protein OspC za odkrivanje IgM in prav tako je pomemben antigen v zgodnji fazi okužbe. Rekombinantna proteina VlsE in OspC sta vključena v test LIAISON®, saj omogočata dobro občutljivost testa in zmanjšata vpliv navzkrižnih reakcij ter s tem prispevajo višji specifičnosti (Petersen in sod., 2008).

Da smo dobili s testom LIAISON® več seropozitivnih bolnikov pri dokazovanju protiteles IgM kot z IFT, si razlagamo z različnostjo metod, saj je LIAISON® podkrepjen z

antigenom VlsE, ki ga test IFT ne vsebuje, kar poveča občutljivost pri testiranju, prav tako pa je način mejnega »cutt off« titra drugačen.

Okužba z *B. burgdorferi* sensu lato lahko prizadane osrednje in periferno živčevje, pri čemer pride do nevroloških zapletov in pojava nevroborelioze. Nevroborelioza se pojavi v zgodnjem diseminiranem ali v poznem kroničnem obdobju okužbe. V likvorju je prisotna limfocitna pleocitoza in intratekalna sinteza protiteles. Prav tako pa pride do poškodbe krvno-možganske pregrade (Zbinden in sod., 1994). Prisotnost borelij v osrednjem živčevju sproži specifičen imunski odziv znotraj krvno-možganske pregrade, ki kvantitativno ni odvisen od imunskega odgovora v krvi. Lokalna sinteza protiteles v likvorju kaže na lokalno prisotnost borelij v likvorju. Protitelesa IgM ne gredo skozi krvno-možganske pregrade, zato se prisotnost IgM v likvorju kaže kot lokalno razmnoževanje borelij, ki se pojavi z zamikom 2 do 6 tednov po začetku nevroloških simptomov (Cimperman, 2006).

Test LIAISON® je bolj občutljiv kot IFT, kar je razvidno v preglednici 7, saj je bilo pri dokazovanju protiteles IgM v likvorju več seropozitivnih rezultatov s testom LIAISON® (36/128 bolnikov oziroma 28,13 %) kot z IFT (2/128 oziroma 1,56 %). Da je test LIAISON® bolj občutljiv kaže tudi preglednica 9, iz katere je razvidno, da je večje število seropozitivnost IgM v likvorju pokazal test LIAISON® (17/128) kot IFT (3/128). Prisotnost protiteles IgM v likvorju nakazuje na lokalno sintezo, ker protitelesa IgM ne gredo skozi krvno-možgansko pregrado.

Na osnovi podatkov iz literature je razvidno, da lahko protitelesa IgG vstopajo skozi krvno-možgansko pregrade, pri tem pa ni nujno, da so intratekalno sintetizirana, kar predstavlja problem pri diagnostiki nevroborelioze, saj je težko razlikovati intratekalno sintezo protiteles v cerebrospinalni tekočini in tvorbo protiteles IgG iz seruma, ki prehajajo skozi poškodovano krvno-možgansko pregrado v cerebrospinalno tekočino. Protitelesa IgG v likvorju, ki kažejo na lokalno razmnoževanje borelij, se pojavijo z zamikom po 6 tednih od začetka nevroloških simptomov (Zbinden in sod., 1994).

Rezultati pri primerjavi testov pri določanju protiteles IgG v likvorju (preglednica 8) kažejo, da je test LIAISON® (seropozitivnih je 36,72 % bolnikov) bolj občutljiv od IFT (seropozitivnih je 13,28 % bolnikov). Da so prisotna protitelesa IgG v likvorju, ne moremo

zaključiti, da gre za intratekalno sintezo protiteles, temveč so lahko prisotna tudi protitelesa IgG iz seruma.

Znotraj testov IFT in LIAISON® se je analitična občutljivost razlikovala. Pri dokazovanju protiteles IgM in IgG proti povzročiteljici lymške borelioze v serumu in likvorju bolnikov se je za bolj občutljivega izkazal test LIAISON®, kar je razvidno v preglednicah 5-10. Test LIAISON® je analitično bolj občutljiv, klinično pa ni nujno, da je ta test boljši. Preglednice 5-8, ki ponazorijo primerjavo rezultatov testiranja z obema testoma, nam povejo, da so razlike med testoma statistično značilne, tako pri dokazovanju protiteles IgM kot tudi pri dokazovanju protiteles IgG. P vrednost je bila zelo majhna, kar pomeni, da se rezultati testov razlikujejo zaradi resnične razlike med njima in ne zaradi naključja.

Prejšnje študije so pokazale, da prihaja do razlik med testoma, saj je imunski odziv odvisen od številnih dejavnikov, kot so značilnosti povzročitelja okužbe, tipa okužbe (lokalna ali sistemska), trajanja okužbe, zmožnost gostiteljevega imunskega odziva, učinka antibiotikov in načinom odvzemanja kliničnih vzorcev (Magnarelli in sod., 1984). V zadnjih letih so študije pokazale, da je test LIAISON® bolj občutljiv kot IFT pri bolnikih z zgodnjo obliko lymške borelioze, vendar kaže tendenco k nižji specifičnosti protiteles IgG (Cerar in sod., 2006). Nekatere raziskave so pokazale, da lahko pomeni velika občutljivost znižano specifičnost, kar je problem v endemskih področjih, kamor sodi tudi Slovenija, in obstaja velika stopnja seropozitivnosti v zdravi populaciji. Prav tako so raziskali, da s testom LIAISON® najpogosteje odkrivamo borelijska protitelesa IgM in IgG v primerjavi s testom IFT (Cerar in sod., 2006). To smo potrdili pri testiranju naših vzorcev seruma in likvorja, da je test LIAISON®, bolj občutljiv kot IFT. Testi, ki imajo visoko občutljivost, imajo prednost v primerih, ko so borelijska protitelesa prisotna v nizkih titrih in jih ne moremo dokazovati s testi z nizko občutljivostjo. Pomanjkljivost pa se kaže v primerih, ko je imunski odgovor močan (Cerar in sod., 2006).

Izvedba IFT je odvisna od izkušenosti laboratorijskega osebja in števila vzorcev, ki so vključeni v testiranje, prav tako pa ne smemo zanemariti možnosti napak v različnih fazah izvedbe testa, kot so redčenje seruma in likvorja, spiranje ter možnost kontaminacije. V nasprotju z IFT pa je metoda LIAISON® avtomatizirana, fleksibilna za izvedbo, cenejša in časovno hitra, saj omogoča istočasno analizo večjega števila vzorcev. S testom lahko odkrivamo majhno količino protiteles.

V vsakodnevni rutinski diagnostiki vzorcev seruma bi bilo smiselno uporabljati test s visoko specifičnostjo, zaradi visoke stopnje prekuženosti zdrave populacije, pri likvorju pa bolj občutljiv test, ker je koncentracija protiteles v likvorju nizka in ostanejo le kratek čas (Cerar in sod., 2006). Ker je klinična slika pestra in raznolik je tudi potek bolezni, je diferencialna diagnoza zelo široka. Zato je dokazovanje večkrat težavno in včasih ne povsem zanesljivo.

## 5.2 SKLEPI

Z našimi ekperimenti smo potrdili, da:

- se je pri bolnikih z lymsko boreliozo razvil specifični imunski odziv.
- smo s serološkima testoma IFT in LIAISON® v serumih in likvorjih dokazali prisotnost protiteles IgM in IgG.
- je izvedba LIAISON® testa je veliko bolj enostavna v primerjavi z IFT.
- smo z LIAISON® testom dokazali IgM in IgG protitelesa v večjem številu serumskih in likvorskih vzorcev kot z IFT.
- da so razlike med testoma IFT in LIAISON® bile statistično značilne, kot pri dokazovanju protiteles IgM kot tudi pri dokazovanju protiteles IgG, kar pomeni, da se rezultati testov razlikujejo zaradi resnične razlike med njima in ne zaradi naključja.

## 6 POVZETEK

Borelije kompleksa *B. burgdorferi* sensu lato so najpogostejše spirohete, ki so patogene za živali kot tudi za ljudi. Slovenija predstavlja endemsko področje za lymsko boreliozo, ki pri ljudeh prizadane številne organske sisteme, kot so živčevje, mišice, koža, sklepi, oči in srce. Borelijska diagnostika temelji na prepoznavanju značilnih kliničnih znakov in bolnikovi izpostavljenosti na območjih, kjer je bolezen endemična. Trenutni serološki testi za dokazovanje borelijskih protiteles predstavljajo najbolj praktičen način za laboratorijsko diagnostiko lymške borelioze. Imunski odziv borelij se začne s pojavom protiteles IgM. Odziv IgM lahko traja več tednov, mesecev ali let kljub učinkoviti terapiji z antibiotiki. Kasneje se pojavijo protitelesa IgG, ko je imunski sistem zadostno spodbujen z borelijskimi antigeni, kar pomeni, da se borelije v tkivih razmnožujejo in s tem so vidni klinični znaki okužbe. Problem seroloških testov se kaže kot pomanjkanje standarizacije, slaba specifičnost zaradi navzkrižno reaktivnosti protiteles in nizka občutljivost.

V zadnjih letih se razvija tretja generacija seroloških testov, na primer LIAISON®, z uporabo občutljivih sintetičnih peptidov ali rekombinantnih proteinov. Testi LIAISON®, proizvajalca DiaSorin, uporabljajo rekombinantne borelijske antigene VlsE in OspC z namenom, da povečajo občutljivost. V raziskavo smo vključili 157 vzorcev seruma in 128 vzorcev likvorja bolnikov, pri čemer smo testirali likvor in serum istega bolnika, pri nekaterih bolnikih pa le serum, saj je bil likvor v premajhni koncentraciji. Namen naloge je bil ovrednotiti različne serološke teste in s tem dokazati specifična protitelesa razreda IgM in IgG proti bakteriji *B. burgdorferi* sensu lato, z IFT in LIAISON® testom. Rezultate seroloških testov smo primerjali med seboj ter ovrednotili posamezno metodo in njegovo klinično uporabnost. Pri dokazovanju specifičnega imunskega odziva z uporabo dveh seroloških testov, IFT in LIAISON® smo ugotovili, da se je analitična občutljivost med testoma razlikovala. Za bolj občutljiv test se je izkazal test LIAISON®, tako lahko zaključimo, da je test primeren za dokazovanje majhnih količin protiteles v serumu in likvorju. Razlike med testoma so bile v večini primerov statistično značilne, kar pomeni, da se rezultati testov IFT in LIAISON® razlikujejo zaradi resnične razlike med njima in ne zaradi naključja. Izboljšana generacija seroloških testov z uporabo rekombinantnih borelijskih antigenov bi lahko zmanjšala potrebo po dragih in zamudnih tehnikah.

## 7 VIRI

- Aguero-Rosenfeld M.E., Wang G., Schwartz I., Wormser G.P. 2005. Diagnosis of Lyme boreliosis. *Journal Clinical Microbiology Reviews*, 18, 3 : 484-509.
- Bakken L.L., Callister S.M., Wand P.J., Schell R.F. 1997. Interlaboratory comparison of test results for detection of Lyme disease by 516 participants in the Wisconsin State Laboratory of Hygiene/College of American Pathologists Proficiency Testing Program. *Journal Clinical Microbiology*, 35: 537-543.
- Barbour A. G., Hayes S. F. 1986. Biology of *Borrelia* species. *Microbiological Reviews*, 50, 4: 381-400.
- Ben-Menachem G., Kubler-Kielb J., Coxon B., Yergey A., Schneerson R. 2003. A newly discovered cholesteryl galactoside from *Borrelia burgdorferi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 13: 7913-7918.
- Bergstroem S., Noppa L., Gylfe A., Oesterg Y. 2002. Molecular and cellular biology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. V: Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control. Gray J., Kahl O., Lane R. S in Stanek G. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Wallingford, CABI Pub, 47-90.
- Brandt M. E., Riley B. S., Radolf J. D., Norgard M. V. 1990. Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins. *Infection and Immunity*, 58, 4: 983-991.
- Brown S. L. Hansen S. L, Langone J. J. 1999. Role of serology in the diagnosis of Lyme disease. *Journal of the American Medical Association*, 282, 1: 62-66.

- Bruckbauer H. R., Preac-Mursic V., Fuchs R., Wilske B. 1992. Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 11, 3: 224-232.
- Casjens S., Palmer N., van Vugt R., Huang W. M., Stevenson B., Peterson J., Dodson R. J., Haft D., Hickey E., Gwinn M., White O., Fraser C. M. 2000. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology*, 35, 3: 490-516.
- Cerar T., Ružič-Sabljić E., Cimperman J., Strle F. 2006. Comparison of immunofluorescence assay (IFA) and LIAISON® in patients with different clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 118: 686-690.
- Cimperman J. 2006. Prizadetost živčevja- Lymška nevroborelioza. V: Lymška borelioza 2006. Strle F. (ur.). Ljubljana. Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja; Društvo za boj proti lymški boreliozi, Ljubljana: 73-78.
- Collares-Pereira M., Couceiro S., Franca I., Kurtenbach K., Schäfer S. M., Vitorino L., Gonçalves L., Baptista S., Vieira M. L., Cunha C. 2004. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3: 1316-1318.
- Derdáková D, Lenčaková D. 2005. Association of genetic variability within the *Borrelia burgdorferi* sensu lato with the ecology, epidemiology of Lyme borreliosis in Europe. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 12: 165–172.
- Depietropaolo D. L., Powers J. H., Gill J. M., Foy A. J. 2005. Diagnosis of Lyme disease. *American Family Physician*, 72, 2: 297-304.
- DiaSorin. 2007. Instruction for use LIAISON® *Borrelia* IgM Quant test and LIAISON® *Borrelia* IgG test. Saluggia, Italia, DiaSorin: 10 str.



- Eisen L., Lane R. S. 2002. Vectors of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. V: Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control. Gray J., Kahl O., Lane R. S in Stanek G. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Wallingford, CABI Pub, 91-115.
- Fernandez J. G., Fernandez M. R., Murillo F. N., Maroto Vela M. 1997. Antigenic and genetic structure of *Borrelia burgdorferi*. *Microbios*, 91: 165-174.
- Gern L., Humair P. F. 2002. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. V: Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control. Gray J., Kahl O., Lane R. S in Stanek G. (eds.). 1<sup>st</sup> ed. Wallingford, CABI Pub, 149-174.
- Gruntar I. 2000. Preučevanje antigenske zgradbe cističnih oblik *Borrelie garinii*. *Medicinski razgledi*, 39, 4: 19-23.
- Haake D. 2000. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology*, 146: 1491-1504.
- Humair P. F., Gern L. 2000. The wild hidden face of Lyme borreliosis in Europe. *Microbes and Infection*, 2: 915-922.
- IVZ- Inštitut za varovanje zdravja. 2009. Lajmska borelioza. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezní v Sloveniji v letu 2008. Ljubljana, IVZ- Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: 60-62.  
[http://www.ivz.si/javne\\_datoteke/datoteke/798-Letnocporociloc2008.pdf](http://www.ivz.si/javne_datoteke/datoteke/798-Letnocporociloc2008.pdf) (14.09.2009)
- Johnson R. C., Schmid G. P., Hyde F. W., Steigerwalt A. G., Brenner D. J. 1984. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiological agent of Lyme disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34: 496-497.
- Kumaran D., Eswaramoorthy S., Luft B. J., Koide S., Dunn J. J., Lawson C. L., Swaminathan S. 2001. Crystal structure of outer surface protein C (OspC) from the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *EMBO Journal*, 20, 5: 971-978.

- Lam T. T., Nguyen T. K., Montgomery R. R., Kantor F. S., Fikrig E., Flavell R. A. 1994. Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *Infection and Immunity*, 62: 290-298.
- Ledue T. B., Collins M. F., Young J., Schriefer M. E. 2008. Evaluation of the recombinant VlsE-based liaison chemiluminescence immunoassay for detection of *Borrelia burgdorferi* and diagnosis of Lyme disease. *Clinical and Vaccine Microbiology*, 15, 12: 1796-1804.
- Li X., Neelakanta G., Liu X., Beck D. S., Kantor F. S., Fish D. 2007. Role of outer surface protein D in the *Borrelia burgdorferi* life cycle. *Infection and Immunity*, 75, 9: 4237-4244.
- Liang F. T., Philipp M. T. 1999. Analysis of antibody response to invariable regions of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity*, 67: 6702-6706.
- Magnarelli L. A., Meegan J. M., Anderson J. F., Chappell W. A. 1984. Comparison of an indirect fluorescent-antibody test with an enzyme-linked immunosorbent assay for serological studies of Lyme disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 20: 181-184.
- Malovrh T. 2000. Proučevanje imunskega odziva pri eksperimentalni okužbi miši z bakterijami *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii* in *Borrelia garinii*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 104 str.
- Malovrh T., Paternoster A. 1998. Merjenje celičnega imunskega odziva pri okužbi z *Borrelia burgdorferi*. *Medicinski razgledi*, 37: 5-15.
- Paster B. J., Dewhirst F. E., Weisburg W. G., Tordoff L. A., Fraser G. J., Hesoell R. B., Stanton T. B., Zablen L., Mandelco L., Woese C. R. 1991. Phylogenetic analysis of spirochetes. *Journal of Bacteriology*, 173: 6101-6109.

- Petersen E., Tolstrup M., Capuano F., Ellermann-Eriksen S. 2008. Population- based study of diagnostic assay for *Borrelia* infection: comparison of purified flagella antigen assay (Ideia™, Dako Cytomation) and recombinant antigen assay (LIAISON®, DiaSorin). BMC Clinical Pathology, 8: 1-8. doi: 10.1186/1472-6890-8-4.  
<http://www.biomedcentral.com/1472-6890/8/4> (30.06.2009)
- Reed K. D. 2002. Laboratory testing for Lyme disease: possibilities and practicalities. Journal of Clinical Microbiology, 40: 319-324.
- Richter D., Matuschka F. R. 2006a. Perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia lusitaniae* by lizard. Applied and Environmental Microbiology, 72: 4627-4632.
- Richter D., Postic D., Sertour N., Livey I., Matuschka F. R., Baranton G. 2006b. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp.nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56: 873-881.
- Rosa P. A., Tilly K., Stewart P. E. 2005. The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. Nature Reviews Microbiology, 3: 129-143.
- Rotter A. 1994. Določanje *Borrelia burgdorferi* v tkivu z imunofluorescentno metodo. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 98 str.
- Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L., Oliver J. H. 2009. *Borrelia carolinensis* sp.nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from the southeastern region of the United States. Journal of Clinical Microbiology, 47:134-141.
- Ružič-Sabljić E. 2000. Mikrobiološka diagnostika borelijskih okužb. V: Lymška borelioza 2000. Zbornik predavanj 2. slovenskega posvetovanja o lymski boreliozi. Ljubljana, 17-18 nov. 2000. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za lymško boreliozo: 155-160.

- Schulte-Spechtel U., Lehnert G., Liegl G., Fingerle V., Heimerl C., Johnson B., Wilske B. 2003. Significant improvement of the recombinant *Borrelia*-specific immunoglobulin G immunoblot test by addition of VlsE and DbpA homologue derived from *Borrelia garinii* for diagnosis of nearly neuroborreliosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 1299-1303.
- Steere A. C. 2001. Lyme disease. *New England Journal of Medicine*, 345, 2: 115-125.
- Strle F. 1992. Lymška borelioza. V: Klopni meningoencefalitis, lymška borelioza. Lešničar J., Strle F. (ur.). Celje, Bolnišnica Celje: 78-106.
- Strle F. 1996. Epidemija borelioze v Sloveniji. V: Lymška borelioza 1996. Zbornik predavanj 2. slovenskega posvetovanja o lymški boreliozi, Ljubljana, 29-30 nov. 2000. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za lymško boreliozo: 21-25.
- Szczepanski A., Benach J.L. 1991. Lyme borreliosis: Host responses to *Borrelia burgdorferi*. *Microbiological Reviews*, 55, 1: 21-34.
- Wang G., van Dam A.P., Schwartz I., Dankert J. 1999. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: Taxonomic, epidemiological and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 633-653.
- Wilske B., Preac-Mursic V., Schierz G., Huhbeck R., Barbour AG., Kramer M. 1988. Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 539:126-143.
- Wilske B., Fingerle V., Schulte-Spechtel U. 2007. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 49,1: 13-21.

Zore A., Trilar T., Prosenc K., Ružič- Sabljč E., Avšič- Županc T. 2000. Okuženost klopov in malih sesalcev z bakterijami *Borrelia burgdorferi* sensu lato v Sloveniji. V: Zbornik predavanj 2. slovenskega posvetovanja o lymski boreliozi, Ljubljana, 29-30 nov. 2000. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za lymsko boreliozo: 27-33.

Zbinden R., Goldenberger D., Lucchini G.M., Altwegg M. 1994. Comparison of two methods for detecting intrathecal synthesis of *Borrelia burgdorferi*-specific antibodies and PCR for diagnosis of Lyme neuroborreliosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 7: 1795-1798.

## ZAHVALA

Najprej bi se iskreno zahvalila mentorici prof. dr. Evi Ružić-Sabljić, ker mi je omogočila opravljanje diplome na področju, ki me je zanimalo. Zahvalila bi se ji za dragocen čas, ki mi ga je namenila, za koristne nasvete in spodbudne besede na poti pisanja diplomske naloge.

Somentorici dr. Tjaši Cerar in osebju Laboratoriju za dokazovanje borelioz in leptospiroz bi se zahvalila za prijaznost in pomoč ter za potrpežljivost pri mojem uvajanju v laboratoriju.

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Katji Seme za hiter in konstruktiven pregled diplome.

Zahvalila bi se tudi Viliju, ki je z jeklenimi živci prenašal moje slabe kakor tudi dobre dni, in moj vsakdanji kreativni nered na delovni mizi, na kateri sem ustvarjala svojo diplomsko nalogo. Vseskozi me je spodbujal v času študija in verjel vame ter podpiral.

Prav tako bi se rada zahvalila svoji družini, predvsem mami, ki je v večji meri prispevala k mojemu uspehu in me bodrila na poti izobraževanja, od vrtca preko osnovne šole, srednje vse do fakultete.

Zahvala velja tudi kolegicam Valeriji, Adrijani in Tanji ter vsem ostalim, ki ste prispevali k nastanku tega dela in mi polepšali študijska leta ob kavicah, kjer so padale moralne in vzpodbudne besede.