

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mateja ČRMELJ SVEČAK

**UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI PROTITELES
RAZREDA IgM, IgG IN IgA PRI BOLNIKI Z
LAJMSKO BORELIOZO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Mateja ČRMELJ SVEČAK

**UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI PROTITELES RAZREDA IgM, IgG
IN IgA PRI BOLNIKI Z LAJMSKO BORELIOZO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE DETERMINATION OF THE PRESENCE OF ANTIBODIES OF
CLASS IgM, IgG and IgA IN PATIENTS WITH LYME BORRELIOSIS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

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 leptospiroze na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije je na seji dne, 8. 6. 2016 odobrila temo diplomske naloge in za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Evo Ružić-Sabljić in za recenzentko doc. dr. Darjo Keše.

Mentorica: prof. dr. Eva Ružić-Sabljić

Recenzentka: doc. dr. Darja Keše

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR- BERTOK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Eva RUŽIĆ-SABLJIĆ

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

Članica: doc. dr. Darja KEŠE

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

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Mateja Črmelj Svečak

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.61+577.2:616.993(043)=163.6
KG	borelioza/lajmska borelioza/ <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato/diagnostični testi/serološke metode/imunofluorescenčni test/imunski odziv/specifična protitelesa/protitelesa IgA/navzkrižne reakcije
VA	ČRMELJ SVEČAK, Mateja
SA	RUŽIĆ-SABLJIČ, Eva (mentorica)/KEŠE, Darja (recenzentka)
KZ	SI-1001 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2016
IN	UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI PROTITELES RAZREDA IgG, IgM in IgA PRI BOLNIKI Z LAJMSKO BORELIOZO
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 78 str., 16 pregl., 16 sl., 146 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Povzročiteljica lajmske borelioze je spiralna bakterija <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato. Prenašajo jo klopi iz rodu <i>Ixodes</i>. V Sloveniji je endemična. Po vbodu klopa navadno nastane značilna kožna sprememba erythema migrans, ki zadostuje za diagnozo bolezni, hkrati pa okužba v bolniku izzove nastanek imunskega odziva s tvorbo specifičnih protiteles IgM, IgG. Namen naše naloge je bil ugotoviti, ali med okužbo z borelijami nastajajo poleg specifičnih protiteles IgM in IgG tudi specifična protitelesa IgA, ali so ta sočasno prisotna z IgM in/ali IgG, ter pripraviti in ovrednotiti posredni IFT za dokaz specifičnih IgA. V raziskavo smo vključili 300 serumov bolnikov s sumom na lajmsko boreliozo ali že potrjeno diagnozo. Vse vzorce smo testirali s posrednim IFT. Pri tem smo dokazali protitelesa IgG v titru 256 ali več pri 120 (40 %) vzorcih, protitelesa IgM v titru 256 ali več pa pri 50 (16,7 %) vzorcih. Glede na vrednotenje protiteles IgG in IgM ter vseh podatkov iz literature, smo se odločili, da pri testu IFT brez absorpcije za protitelesa IgA opredelimo pozitivne titre višje od 64, kot mejne titre vrednosti 32 in negativne titre manjše od 16. V testu IFT z absorpcijo smo za pozitivne vrednosti opredelili titre višje od 16, manjše kot 16 pa kot negativne. Pri IFT brez absorpcije smo ugotovili 62/300 (20,7 %) pozitivnih IgA vzorcev, pri IFT z absorpcijo pa 50 (41,7 %) pozitivnih IgA vzorcev. Med testoma smo za protitelesa IgM ugotovili statistično značilno razliko, za protitelesa IgA pa nismo ugotovili statistično značilne razlike. Ugotovili smo, da se protitelesa IgA pojavljajo sočasno s protitelesi IgM in IgG, in da protitelesa IgG motijo vezavo protiteles IgM in IgA in dajo lažno negativne rezultate

KEY WORD DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 579.61+577.2:616.993(043)=163.6

CX *Borrelia burgdorferi* sensu lato/Lyme borreliosis/immune response/specific antibodies/IgA antibodies/IFT/indirect immunofluorescence assay/cross reaction/preabsorption

AU ČRMELJ SVEČAK, Mateja

AA RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva (supervisor)/KEŠE, Darja (reviewer)

PP SI-1001 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

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

PY 2016

TI THE DETERMINATION OF THE PRESENCE OF ANTIBODIES OF CLASS IgM, IgG and IgA IN PATIENTS WITH LYME BORRELIOSIS

DT Graduation thesis (University studies)

NO XII, 78 p., 16 tab., 16 fig., 146 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Lyme borreliosis is caused by the spirochete *Borrelia burgdorferi* sensu lato and is transmitted by the bite of a small *Ixodes* tick. It is endemic in Slovenia. The disease has early manifestations with a characteristic skin lesion, erythema migrans after tick bite, which is enough for diagnosis of the disease. At the same time the infection provokes immune response in the human body with specific IgM and IgG antibodies. The aim of the present work was to find out either occur during the infection with spirochetes *B. Burgdorferi* beside specific IgM and IgG antibodies there also specific IgA antibodies, if IgA are there, at the same time with IgM and IgG. We wanted to prepare and evaluate indirect IFT for proof of specific IgA antibodies. We included serums of 300 patients with suspicion of the Lyme borreliosis or with confirmed Lyme disease. All samples were tested with indirect IFT test. The test has shown IgG antibodies in titer 256 or more in 120 samples (40%). IgM antibodies in titer 256 or more in 50 samples (16,7%). Depending on the evaluation of the antibodies IgG and IgM and with all the data from literature we decided to use IFT test without absorption for IgA antibodies that define titers higher than 64 like positive, as border titer, titer with the value 32 and titers lower than 16 as negative. Titers higher than 16 were determined as positive values, as negative values were determined titers lower than 16 in IFT test with absorption. We have found 62/300 (20,7%) IgA positive samples with IFT test without absorption and 50 samples (41,7%) IgA positive with IFT test with absorption. Antibodies IgM were confirmed with statistically significant difference between both tests (IFT whit and without absorption). Antibodies IgA were not confirmed with a statistically significant difference between both tests. We determined that body synthesise IgA, IgG and IgM antibodies at the same time. IgG antibodies disturb binding of IgG and IgM antibodies and that generate false-negative results.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SPLOŠNO O BORELIJAH	3
2.2 TAKSONOMIJA BORELIJ	4
2.3 OBLIKA IN STRUKTURA BORELIJ	7
2.3.1 Genom	8
2.3.2 Beljakovine in antigeni	9
2.4 GOJITEV BORELIJ <i>IN VITRO</i>	11
2.5 ŽIVALSKI REZERVOAR IN PRENAŠALCI	12
2.6 LAJMSKA BORELIOZA	15
2.6.1 Patogeneza bolezni	15
2.6.2 Klinična slika	16
2.6.2.1 Lokalizirana zgodnja okužba	17
2.6.2.2 Diseminirana zgodnja okužba	18
2.6.2.3 Pozno bolezensko obdobje	19
2.7 EPIDEMIOLOGIJA LAJMSKE BORELIOZE	20
2.8 IMUNSKI ODZIV	21
2.8.1 Oblika in zgradba protiteles	21
2.8.2 Strukturne značilnosti in biološke lastnosti posameznih razredov protiteles	22
2.8.2.1 IgG	23
2.8.2.2 IgA	23
2.8.2.3 IgM	25
2.8.3 Imunski odziv gostitelja na borelijsko okužbo	26

2.8.3.1	Nespecifičen imunski odziv	27
2.8.3.2	Specifičen imunski odziv	28
2.8.4	Diagnostika lajmske borelioze	29
2.8.4.1	Osamitev borelij	30
2.8.4.2	Dokazovanje molekule DNK	30
2.8.4.3	Dokazovanje specifičnih protiteles	31
2.8.4.3.1	Imunofluorescenčni test – IFT	32
2.8.4.3.2	Encimskoimunski test- IEA oz. ELISA	34
2.8.4.3.3	Imunska blot metoda- test Westrn blot (WB)	34
2.9	ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE	35
2.9.1	Zdravljenje	35
2.9.2	Preprečevanje	36
2.9.3	Cepljenje	36
3	MATERIAL IN METODE	37
3.1	BOLNIKI IN VZORCI	37
3.2	METODE TESTIRANJA	37
3.2.1	Material in oprema za IFT z in brez absorpcije	37
3.2.2	Posredni imunofluorescenčni test brez absorpcije	39
3.2.2.1	Princip testa	39
3.2.2.2	Izvedba IFT testa brez absorpcije	39
3.2.3	Posredni imunofluorescenčni test z absorpcijo	40
3.2.3.1	Princip testa	40
3.2.3.2	Izvedba IFT testa z absorpcijo	41
3.3	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	42
4	REZULTATI	43
4.1	PREGLED REZULTATOV	43
4.1.1	Določanje protiteles IgM, IgG in IgA	43
4.1.1.1	IFT test brez absorpcije	43
4.1.1.2	IFT test z absorpcijo	44
4.1.1.3	Opredelitev mejnega titra za protitelesa IgA s testom IFT z in brez absorpcije	45
4.1.1.4	Primerjava pozitivnih IgM in IgA vzorcev pred in po absorpciji	45

	protiteles IgG	
4.1.2	Določanje protiteles IgA v serumu bolnikov glede na sočasno prisotnost ali odsotnost IgM in / ali IgG	48
4.1.2.1	Določanje protiteles IgA pri bolnikih IgG pozitivni / IgM negativni	49
4.1.2.2	Določanje protiteles IgA pri bolnikih IgG pozitivni / IgM pozitivni	50
4.1.2.3	Določanje protiteles IgA pri bolnikih IgG negativni / IgM pozitivni	51
4.1.2.4	Določanje protiteles IgA pri bolnikih IgG negativni / IgM negativni	52
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	53
5.1	RAZPRAVA	53
5.2	SKLEPI	57
6	POVZETEK	59
7	VIRI	61
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Taksonomska uvrstitev bakterijskega rodu <i>Borrelia</i> (Wang in sod., 1999; Margos in sod., 2009; Wang in Schwartz, 2011).	5
Preglednica 2:	Pregled borelij, ki jih prenašajo klopi rodu <i>Ixodes</i> , z * so označeni sevi, ki povzročajo bolezen pri človeku (Richter, 2006; Wang in Schwartz, 2011; Margos in sod., 2011; Adeolu in Gupta, 2014).	5
Preglednica 3:	Glavni klinični znaki lajmske borelioze (Müllegger, 2004; Strle in Stanek, 2009; Murray in Shapiro, 2010; Stanek in sod., 2011).	16
Preglednica 4:	Rezultati IFT testa brez absorpcije za prisotnost protiteles IgM, IgG in IgA. Sivo so označeni mejni, rumeno pa pozitivni titri za protitelesa IgM in IgG.	44
Preglednica 5:	Rezultati IFT testa z absorpcijo za prisotnost protiteles IgM in IgA pri vzorcih, ki so imeli prisotna protitelesa IgG z IFT brez absorpcije. Sivo so označeni mejni, rumeno pa pozitivni titri za protitelesa IgM.	45
Preglednica 6:	Prikaz rezultatov za protitelesa IgM in IgA pred in po odstranitvi protiteles IgG (IgG pozitivni vzorci). Sivo so označeni mejni titri za protitelesa IgM in IgA, rumeno pa pozitivni titri za IgM in IgA.	46
Preglednica 7:	Primerjava rezultatov IFT brez absorpcije in IFT z absorpcijo pri določanju protiteles IgM v serumu bolnikov.	47
Preglednica 8:	Kontigenčna tabela rezultatov testiranja IFT brez absorpcije in IFT z absorpcijo pri določanju protiteles IgM v serumu bolnikov za izvedbo McNemerjevega testa.	47
Preglednica 9:	Primerjava rezultatov IFT brez absorpcije in IFT z absorpcijo pri določanju protiteles IgA v serumu bolnikov.	48
Preglednica 10:	Kontigenčna tabela rezultatov testiranja IFT brez absorpcije	48

	in IFT z absorpcijo pri določanju protiteles IgA v serumu bolnikov za izvedbo McNemerjevega testa.	
Preglednica 11:	Rezultati IFT testa brez absorpcije za prisotnost protiteles IgA ob sočasni prisotnosti protiteles IgG; bolniki niso imeli protiteles IgM.	49
Preglednica 12:	Rezultati IFT testa z absorpcijo za prisotnost protiteles IgA in IgM po odstranitvi protiteles IgG.	49
Preglednica 13:	Rezultati IFT testa brez absorpcije za prisotnost protiteles IgA pri bolnikih, ki so imeli sočasno prisotnost protiteles IgM in IgG.	50
Preglednica 14:	Rezultati IFT testa z absorpcijo za prisotnost protiteles IgA in IgM po odstranitvi protiteles IgG v skupini 30 bolnikov, ki so s testom IFT brez absorpcije imeli sočasno pozitivna protitelesa IgM in IgG.	51
Preglednica 15:	Rezultati IFT testa brez absorpcije za prisotnost protiteles IgA ob sočasni prisotnosti protiteles IgM in odsotnosti protiteles IgG.	51
Preglednica 16:	Rezultati IFT testa brez absorpcije za prisotnost protiteles IgA v odsotnosti protiteles IgM in IgG.	52

KAZALO SLIK

Slika 1:	Geografska razširjenost lajmske borelioze (Stanek in sod., 2012)	4
Slika 2:	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato v temnem polju (Nelson, 2016)	7
Slika 3:	Shema strukture bakterije <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato (Rosa in sod., 2005)	8
Slika 4:	Razvojne stopnje klopa <i>I. ricinus</i> od leve proti desni: larva, nimfa, samec klopa, samica klopa (Ticks, 2016)	14
Slika 5:	Življenjski krog klopa <i>I. ricinus</i> in prenos bakterije <i>B. burgdorferi</i> sensu lato (Stanek in sod., 2012)	15
Slika 6:	<i>Erythema migrans</i> (Erythema migrans na roki, 2016)	17
Slika 7:	Borelijski limfocitom na ušesni mečici (Müllegger, 2004)	18
Slika 8:	<i>Acrodermatitis chronica atrophicans</i> (a in b) na roki in (c) na nogi (Stanek in sod., 2012)	19
Slika 9:	Shematična zgradba imunoglobulina (Structure of immunoglobulin, 2016)	22
Slika 10:	Shematična zgradba protitelesa IgG (The structure of antibody molecules, 2016)	23
Slika 11:	Shematična zgradba protitelesa IgA (The structure of antibody molecules. 2016)	24
Slika 12:	Nastanek sekrecijske oblike protitelesa IgA (Kindt in sod., 2007)	25
Slika 13:	Shematična zgradba protitelesa IgM, a) monomer in b) pentamer (The structure of antibody molecules. 2016)	26
Slika 14:	Imunski odziv gostitelja po vdoru borelij (Steer, 2004)	27
Slika 15:	Neposredni imunofluorescenčni test (Direct IFT, 2016)	33
Slika 16:	Posredni imunofluorescenčni test (Indirect immunofluorescence assay, 2016)	33

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ACA	akrodermatitis kronika atroficans-kronična borelijska sprememba kože (angl. acrodermatitis chronica atrophicans)
BbHtrA	proteaza A <i>B. burgdorferi</i> (angl. <i>B. burgdorferi</i> High Temperature Requirement A proteaza)
BSA	goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumin)
BSK	Barbour-Stoenner-Kellyjevo gojišče
C _H	konstantna regija težke verige imunoglobulina (angl. heavy chain constant regions)
C _L	konstantna regija lahke verige imunoglobulina (angl. light chain constant regions)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EM	erythema migrans
FITC	florescein izotiocianat
HSP	stresna beljakovina (angl. heat shock protein)
IFT	imunofluorescenčni test
IgA	imunoglobulin A, protitelo razreda A
IgG	imunoglobulin G, protitelo razreda G
IgM	imunoglobulin M, protitelo razreda M
kb	kilobaza
kDa	kilodalton
MKP	modificirano Kelly-Pettenkoferjevo gojišče
Osp	beljakovina zunanje membrane (angl. outer surface protein)
PBS	fosfatni pufer (angl. phosphate buffer saline)
RF	revmatoidni faktor

V_H variabilna regija težke verige imunoglobulina (angl. heavy chain hypervariable regions)

V_L variabilna regija lahke verige imunoglobulina (angl. light chain hypervariable region)

1 UVOD

Lajmska boreliosa je zoonosa. Povzročajo jo spiralna bakterija *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sensu lato - v širokem pomenu), katere rezervoar so ptiči in mali glodalci, prenašajo pa jo klopi iz rodu *Ixodes*. V to skupino spada vsaj pet različnih borelijskih vrst, ki povzročajo bolezen pri ljudeh, in sicer: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto (sensu stricto – v ozkem pomenu), *B. spielmanii* in *B. bavariensis* (Belfaiza in sod., 1993; Picken in sod., 1996; Richter in sod., 2004; Richter in sod., 2006; Margos in sod., 2009). Znano je, da so znaki bolezni deloma odvisni od vrste povzročitelja. Tako *B. garinii* največkrat povzroča okvare živčevja, *B. afzelii* okvare kože, *B. burgdorferi* sensu stricto, ki je edini povzročitelj lajmske borelioze v ZDA, pa okvare sklepov (Stanek in Strle, 2003). Najpogostejši in najzgodnejši znak lajmske borelioze, ki zadostuje za potrditev diagnoze je kožni izpuščaj erythema migrans. V tem začetnem obdobju okužbe je imunski odziv počasen, šibek ali celo odsoten, s časom trajanja okužbe pa postaja imunski odziv vedno bolj intenziven, klinični znaki pa vedno bolj izraženi (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005). Pojavijo se lahko prizadetost živčevja, sklepov, srca in oči, v pozni fazi pa kronična prizadetost kože (acrodermatitis chronica atrophicans-ACA), sklepov in živčevja (Stanek in sod., 2012). Ker pa se lajmska boreliosa mnogokrat kaže tudi z neznakičnimi bolezenskimi spremembami, je mikrobiološka potrditev borelijske okužbe nujno potrebna. V diagnostiki lajmske borelioze se najpogosteje uporabljajo serološki testi, ki temeljijo na dokazu specifičnih protiteles. Specifična protitelesa nastanejo kot odziv na borelijske antigene, ki so zelo heterogeni. Ravno heterogenost borelijskih antigenov lahko vodi v lažno pozitivne ali lažno negativne rezultate in posledično napačno interpretacijo diagnoze. Raznolikost borelijskih antigenov predstavlja tudi svojevrsten izziv tako pri odkrivanju cepiv, kot tudi pri uvajanju novih testov, saj se testi med seboj razlikujejo po občutljivosti in specifičnosti, kakor tudi klinični uporabnosti. Kljub pomanjkljivostim in preprekam, pa se serološki testi zaradi svoje enostavnosti in dostopnosti vse bolj uveljavljajo v mikrobiološki diagnostiki lajmske borelioze.

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Borelijski antigeni v okuženem bolniku izzovejo nastanek specifičnega imunskega odziva, ki ima nekaj posebnosti. Protitelesa se pojavijo dokaj pozno, in sicer IgM šele 3 do 6 tednov po okužbi, protitelesa IgG pa mesece po okužbi. Zaradi antigenske heterogenosti borelij pride do različnega imunskega odziva. Za diagnostiko so na voljo diagnostični testi z različno specifičnostjo in občutljivostjo, ki pa niso standardizirani, kar predstavlja problem. Med bolniki z borelijsko okužbo opisujejo tudi pojav specifičnih protiteles razreda IgA.

1.2 CILJI RAZISKOVANJA

- Kot odgovor na okužbo z *Borrelia burgdorferi* sensu lato nastaja specifičen imunski odziv. Naš namen je bil:
- ugotoviti, ali prihaja med borelijsko okužbo do nastanka specifičnih protiteles razreda IgA, poleg nastanka specifičnih protiteles razreda IgM in IgG
- ugotoviti, ali prihaja do sočasne prisotnosti protiteles IgA s protitelesi razreda IgM in/ali IgG
- ugotoviti odnose med posameznimi razredi protiteles
- pripraviti in ovrednotiti posredni IFT test za dokaz specifičnih protiteles razreda IgA

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- Predpostavljamo, da se pri bolnikih z lajmsko boreliozo razvije imunski odziv s tvorbo specifičnih protiteles IgG in IgM
- Predpostavljamo, da bomo v serumih bolnikov dokazali prisotnost protiteles IgA v določenem deležu
- Predpostavljamo, da bo IFT ustrezen test za opredelitev protiteles IgA kakor tudi IgM in IgG
- Predpostavljamo, da bomo z IFT z absorpcijo pridobili več pozitivnih vzorcev IgA in IgM

2 PREGLED OBJAV

2.1 SPLOŠNO O BORELIJAH

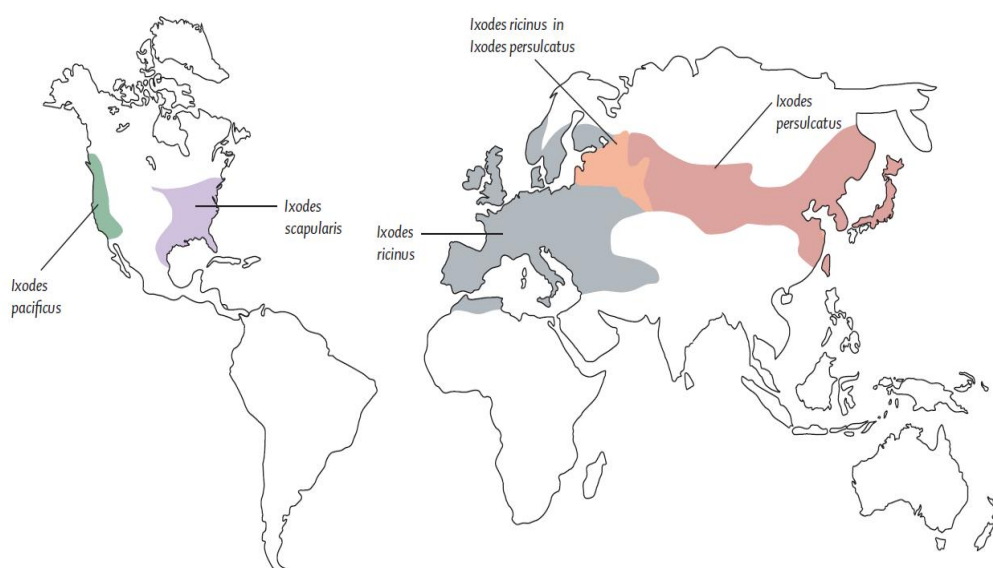
Lajmsko boreliozo povzroča izredno gibljiva spiroheta *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sensu lato – v širšem pomenu), ki jo prenašajo klopi. Okužba sodi med zoonoze (Picken in sod., 1996; Stanek in Strle, 2003; Stanek in sod., 2011, 2012).

Poimenovanje *B.burgdorferi* sensu lato obsega vsaj 20 borelijskih vrst. Izmed teh so za človeka patogene *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. spielmanii* in *B. bavariensis* (Picken in sod., 1996; Wang in sod., 1999; Richter in sod., 2004; Richter in sod., 2006; Margos in sod., 2009). *B. valaisiana* in *B. lusitaniae* sta potencialno patogeni. *B. valaisiana* so prvič dokazali v cerebrospinalni tekočini bolnika z nevrološkimi simptomi (Diza in sod., 2004), *B. lusitaniae* pa so prvič izolirali iz lezije kronično prizadete kože (Collares-Pereira in sod., 2004).

Lajmska borelioza je dobila ime po kraju Lyme v ZDA, kjer so med leti 1975 – 1980 ugotovili velik porast otrok in mladostnikov s kliničnimi znaki juvenilnega revmatoidnega artritisa, ki so ga poimenovali lajmski artritis. Vse to je vodilo v obsežne raziskave, v katerih so ugotovili, da je veliko otrok z artritisom navedlo klopov vbod, kateremu je sledil rdeč izpuščaj ali oteklina, ki se je razširila do premera 10 – 50 cm, imenovana erythema migrans (Burgdorfer in sod., 1982; Steere, 2001; Müllegger, 2004; Strle in Stanek, 2009; Stanek in sod., 2012).

Leta 1982 so spirohete izolirali iz klopov, kože, cerebrospinalne tekočine in krvi. Spirohete so identificirali in poimenovali po odkritelju Willy-u Burgdorferi-ju *Borrelia burgdorferi*. (Burgdorfer in sod., 1982; Habicht in sod., 1987).

Podobno kot v ZDA in drugod po Evropi je lajmska borelioza tudi pri nas najbolj pogosta bolezen, ki jo prenašajo klopi (Strle, 1998). Slika 1 prikazuje geografsko razširjenost lajmske borelioze in klope, ki v posameznem področju prenašajo borelije.



Slika 1: Geografska razširjenost lajmske borelioze in klopi, ki borelije prenašajo v posameznem področju (Stanek in sod., 2012)

2.2 TAKSONOMIJA BORELIJ

Spirohete so zaradi edinstvene celične morfologije in posebnega načina gibanja evolucijsko in strukturno uvrščene v posebno taksonomsko vejo bakterij (Goldstein in sod., 1996). Ti organizmi tvorijo povezan takson, ki ga sestavlja 6 glavnih skupin, kot je pokazala filogenetska analiza. Red *Spirochaetales* delimo na družine *Brachyspiraceae*, *Brevinemataceae*, *Leptospiraceae* in *Spirochaetaceae*. Slednjo delimo na 4 rodove: *Borrelia*, *Treponema*, *Spirochaeta* in *Christispira* (Wang in sod., 1999, Fraenkl in sod., 2002, Margos in sod., 2009; Wang in Schwartz, 2011). Taksonomska razvrstitev je prikazana v preglednici 1.

Preglednica 1: Taksonomska uvrstitev bakterijskega rodu *Borrelia* (Wang in sod., 1999; Margos in sod., 2009; Wang in Schwartz, 2011).

RED	DRUŽINA	ROD
<i>Spirochaetales</i>	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Spirochaeta</i>
		<i>Christispira</i>
		<i>Treponema</i>
		<i>Borrelia</i>
	<i>Brachyspiraceae</i>	<i>Brachyspira</i>
	<i>Brevinemataceae</i>	<i>Brevinema</i>
	<i>Leptospiraceae</i>	<i>Leptospira</i>
		<i>Leptonema</i>
		<i>Turneriella</i>

Rod *Borrelia* predstavlja filogenetsko vejo, ki se loči od ostalih spirohet po analizi gena *rrs* 16S rRNA. Do sedaj so identificirali več kot 20 sevov znotraj rodu *Borrelia*. Borelije pomembne za ljudi razdelimo v dve skupini, glede na bolezen, ki jo povzročajo, in sicer borelije, ki povzročajo lajmsko boreliozo in borelije, ki povzročajo povratno mrzlico. Ti dve skupini morfološko težko razlikujemo, prav tako pa je težko razlikovanje na osnovi biokemičnih testov (Adeolu in Gupta, 2014). Podrobna razdelitev borelij, ki povzročajo boreliozo, je prikazana v preglednici 2.

Preglednica 2: Pregled borelij, ki jih prenašajo klopi rodu *Ixodes*, z * so označeni sevi, ki povzročajo bolezní pri človeku (Richter, 2006; Wang in Schwartz, 2011; Margos in sod., 2011; Adeolu in Gupta, 2014).

VRSTA BORELIJE	RAZŠIRJENOST	PRENAŠALEC	GOSTITELJ
<i>B. afzelii</i> *	Evropa Azija	<i>Ixodes ricinus</i> <i>I. persulcatus</i> <i>I. hexagonus</i>	glodalci, ptice, divjad, domače živali, človek
<i>B. americana</i>	ZDA	<i>I. pacificus</i> <i>I. minor</i>	
<i>B. andersonii</i>	ZDA	<i>I. dentatus</i>	
<i>B. bavariensis</i> *	Evropa	<i>I. ricinus</i>	

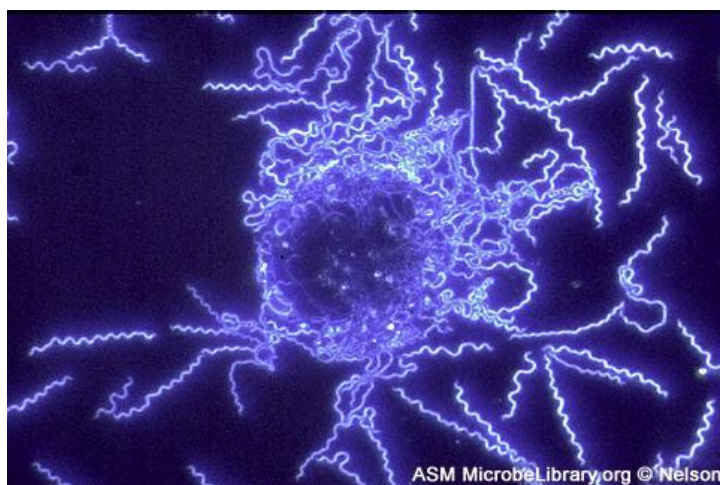
»se nadaljuje«

nadaljevanje preglednice 2: Pregled borelij, ki jih prenašajo klopi rodu *Ixodes*, z * so označeni sevi, ki povzročajo bolezen pri človeku (Richter, 2006; Wang in Schwartz, 2011; Margos in sod., 2011; Adeolu in Gupta, 2014).

VRSTA BORELIJE	RAZŠIRJENOST	PRENAŠALEC	GOSTITELJ
<i>B. bissettii</i>	Evropa, ZDA	<i>I. scapularis</i> <i>I. minor</i> <i>I. ricinus</i> <i>I. pacificus</i>	glodalci, ptice, divjad, domače živali, človek
<i>B. burgdorferi</i> *	Evropa, ZDA	<i>I. scapularis</i> <i>I. pacificus</i> <i>I. ricinus</i> <i>I. perulcatus</i>	
<i>B. californiensis</i>	ZDA	<i>I. pacificus</i>	
<i>B. carolinensis</i>	ZDA	<i>I. minor</i>	
<i>B. chilensis</i>	Amerika (Čile)	<i>I. stilesi</i>	
<i>B. finlandensis</i>	Evropa	<i>I. ricinus</i>	
<i>B. garinii</i> *	Evropa, Azija	<i>I. ricinus</i> <i>I. persulcatus</i>	
<i>B. japonica</i>	Japonska	<i>I. ovatus</i>	
<i>B. kurtenbachii</i>	ZDA	<i>I. scapularis</i>	
<i>B. lusitaniae</i>	Evropa	<i>I. ricinus</i>	
<i>B. sinica</i>	Kitajska	<i>I. ovatus</i>	
<i>B. spielmanii</i> *	Evropa	<i>I. ricinus</i>	
<i>B. tanukii</i>	Japonska	<i>I. tanukii</i> <i>I. ovatus</i>	
<i>B. turdi</i>	Japonska	<i>I. turdus</i>	
<i>B. valaisiana</i>	Evropa, Azija	<i>I. ricinus</i>	
<i>B. yangtze</i>	Azija	<i>I. granulatus</i>	

2.3 OBLIKA IN STRUKTURA BORELIJ

Borelije lajmske borelioze prepoznamo po njihovi unikatni celični strukturi in načinu gibanja. So po Gramu negativne spirohete, ki v dolžino merijo od 10 do 30 μm , v premeru pa od 0,2 do 0,25 μm . Morfologijo borelij vidimo že z mikroskopiranjem v temnem polju (Barbour in Hayes, 1986; Charon in sod., 2008). Slika 2 prikazuje borelije v temnem polju.

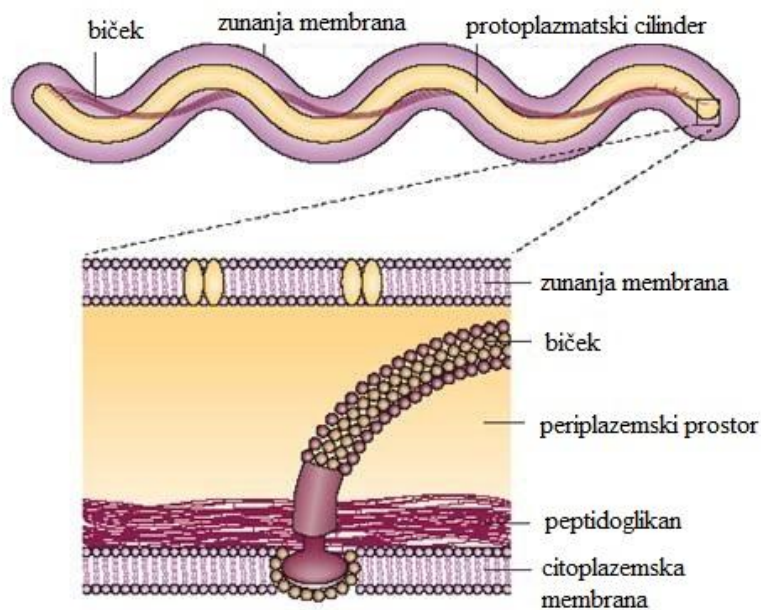


Slika 2: *Borrelia burgdorferi* sensu lato v temnem polju (Nelson, 2016)

Sestavljene so iz površinskega sloja, zunanje in citoplazemske membrane, periplazmatskega prostora in protoplazmatskega cilindra. Protoplazmatski cilinder obdaja citoplazemska membrana iz fosfolipidnega dvosloja (Barbour in Hayes, 1986; Charon in sod., 2008, 2012; Zhao in sod., 2013, 2014).

Med zunanjo membrano in protoplazmatskim cilindrom je periplazemski prostor, v katerem je 7-11 bičkov, ki bakteriji omogočijo gibanje. Pripeti so na oba pola celice in ovijajo protoplazmatski cilinder. Borelije se premikajo z obračanjem, upogibanjem na mestu in svedrastim zavijanjem, kar jim omogoča gibanje v viskoznih medijih in tkivih (Barbour in Hayes, 1986; Goldstein in sod., 1996; Charon in sod., 2012; Zhao in sod., 2013, 2014). Slika 3 prikazuje strukturo bakterije *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Zunanja membrana borelij je zelo fluidna in krhka. Njene glavne sestavne komponente so številni lipoproteini in trije visoko imunogeni glikolipidi. Dva od teh vsebujeta holesterol, kar je redkost pri prokariontih. Lipoproteini predstavljajo veliko zunanjih površinskih beljakovin (Osp – iz ang. Outer surface protein), ki so poglavitni borelijski antigeni, transmembranske beljakovine pa sodelujejo pri izmenjavi snovi in signalov med zunanostjo in notranostjo celice (Barbour in Hayes, 1986; Radolf in sod., 2012; Toledo in sod., 2014).



Slika 3: Shema strukture bakterije *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Rosa in sod., 2005)

2.3.1 Genom

Borelijski genom je eden najkompleksnejših med bakterijami. Je med najmanjšimi znanimi genomi. Sestavljen je iz linearnega kromosoma ter 21 plazmidov (12 linearnih in 9 krožnih). Linearni kromosom je redkost v kraljestvu bakterij. Velik je od 935 do 955 kilobaznih parov (kb) (Casjens in sod., 1995, 2012).

Od vseh znanih bakterij vsebujejo borelije največje število plazmidov. Večina teh plazmidov se pojavlja pri vseh borelijah, veliki pa so od 5 do 60 kb (Casjens in sod., 1995). Skoraj vsi sevi vsebujejo en velik linearni plazmid v velikosti od 50 do 57,7 bp in različno število majhnih plazmidov (Xu in Johnson, 1995). Najbolj stabilna sta linearni plazmid lp54, ki ima zapis za proteine, ki so pomembni pri naravnem ciklu infekcije in

krožni plazmid cp26, ki je bistvenega pomena za preživetje bakterije (Bestor in sod., 2010, Chan in sod., 2012; Schüller in sod., 2015).

V procesu gojenja *in vitro* se lahko nekateri linearni in krožni plazmidi spontano izgubijo že v prvih stopnjah presajanja. To je značilno za plazmide v velikosti od 9 do 41 kb, ne pa za plazmide velikosti od 50 do 68 kb. Navadno se izgubijo eden do trije plazmidi (Biškup in sod., 2011; Chan in sod., 2012). Ugotovili so, da je bila izguba plazmidov povezana z zmanjšano infektivnostjo v primeru laboratorijskih živali (Schwan in sod., 1988; Hinnebusch in Babour, 1992; Xu in Johnson, 1995).

Plazmidni geni nosijo zapis za vezavne proteine, faktorje virulence in infektivnosti. Pomembni so tudi kot nosilci patogenosti, saj kodirajo genski zapis za poglavitne borelijske antigene, kot so OspA, OspB in OspC (Barbour, 1988; Iyer in sod., 2003, Brisson in sod., 2013).

2.3.2 Beljakovine in antigeni

Borelije na zunanji membrani vsebujejo beljakovine, ki vzdržujejo strukturo membrane, sodelujejo pri encimskih reakcijah, razsoju borelij, virulenci in tiste, ki sodelujejo pri transportu skozi membrano. Imenujemo jih zunanje površinske beljakovine. Delimo jih v lipoproteine, pri katerih je lipidni del zasidran v membrano (OspA, OspB, OspC, OspD, OspE, OspF, DbpA, DbpB, CspA, VlsE, BptA) in transmembranske proteine (P13, P66, BesC, BamA, Lmp1 and BB0405) (Kenedy in sod., 2012). Značilnost borelijskih beljakovin je, da imajo na svoji površini antigenske determinante, ki pri okuženih osebah sprožijo imunski odziv. Nekatere so gensko spremenljive. Ravno antigenska heterogenost med borelijskimi sevi vpliva na nastanek in potek bolezni, istočasno pa predstavlja prepreko in izziv za razvoj cepiv (Wilske in sod., 1988; Brisson in sod., 2012; Kenedy in sod., 2012).

BELJAKOVINE ZUNANJE MEMBRANE

OspA/OspB

OspA in OspB sta lipoproteina z molekulsko maso 31 kDa in 34 kDa. Zapis zanju se nahaj na linearnem plazmidu lp54. Navadno se izražata skupaj. V črevesju nehranjenih klopov se

izločajo velike količine OspA. Ugotovili so, da OspA posreduje stik med borelijsko celico in receptorjem TROSPA (Tick Receptor for OspA) na epitelijskih črevesnih celicah klopa. Ko klop najde ustreznega gostitelja in začne s hranjenjem, se prekine izločanje OspA, začne pa se sinteza OspC, ki omogoči migracijo borelij iz črevesja v žleze slinavke klopa (Kenedy in sod., 2012; Kung in sod., 2013; Rahman in sod., 2016).

OspC

OspC je 22 kDa velik imunodominanten lipoprotein, ki ga kodira krožni plazmid cp26. Ima pomembno vlogo v začetni stopnji kolonizacije gostitelja. Najprej omogoča borelijam migracijo v žleze slinavke klopa in tam pritrditev na protein Salp15, nato pa pritrditev na neznane ligande gostiteljeve celice ali plazminogen in razsoj borelij znotraj gostitelja (Earnhart in sod., 2010; Kenedy in sod., 2012).

OspD

OspD je 28 kDa velik protein z zapisom na linearnem plazmidu lp38. Njegovo izražanje je odvisno od dejavnikov okolja, npr. temperature in signalov gostiteljske celice. Vpleten je v kolonizacijo borelij v črevesju klopa ter vezavi in penetraciji borelij v gostiteljsko celico, vendar pa je njegova vloga pri tem veliko manjša kot pa ju imata proteina OspA in OspB (Li in sod., 2007).

OspE, OspF in CRASPs (Complement Regulator-Acquiring Surface Proteins)

Proteine kodirajo različni 32 kb veliki krožni plazmidi cp32. Vsem proteinom je skupno to, da se vežejo na serumski komplementni faktor H ali njemu podobne proteine in se tako izmikajo gostiteljevemu imunskemu sistemu (Stewart in sod., 2008; Kenedy in sod., 2012).

DbpA, DbpB, BBK32

DbpA, DbpB (dekorin vezavni proteini) in BBK32 (fibronektin vezavni proteini) so pomembni za adhezijo na gostiteljeve celice, razsoju borelij v gostitelju in pri vzpostavljanju začetnih faz kronične okužbe (Salo in sod., 2011; Kenedy in sod., 2012).

VlsE

VlsE je 35 kDa velik protein z zapisom na linearnem plazmidu lp28-1. Prisoten je lahko v vseh fazah infekcije, tudi v kronični. Med infekcijo se v gostitelju sintetizirajo velike količine VlsE. Da se izogne delovanju gostiteljevega imunskega sistema, uporablja strategijo antigenske variacije antigenov. Vsebuje 6 variabilnih in 6 visoko ohranjenih regij. Variabilna regija je visoko imunogena in pomembna kot tarčna molekula imunskega odziva gostitelja (Kenedy in sod., 2012).

FLAGELIN

Flagelin je 41 kDa velik protein. Sestavljata ga glavna beljakovina FlaB in manj pomembna beljakovina FlaA. Predstavljata 10-14 % celotne celične mase. FlaB je značilna za rod *Borrelia* in predstavlja jedro filamenta, ki ga obdaja ovoj proteina FlaA (Sze in sod., 2011; Sultan in sod., 2013). Je zelo močan antigen, ki sproži nastajanje prvih protiteles IgM in IgG v poteku okužbe (Wilske in Preac-Mursic, 1993). Bički borelij so si na določenih odsekih, predvsem odsekih FlaB strukturno podobni ali identični z nekaterimi bički drugih gibljivih bakterij, kar lahko pri serološkem testiranju da lažno pozitivne rezultate (Wilske in Preac-Mursic, 1993; Reed, 2002; Sultan in sod., 2013).

HEAT SHOCK PROTEIN (HSP)

Borelije na svoji površini izražajo tudi stresne beljakovine (ang. HSP-heat shock protein), ki jih izražajo v velikih količinah v neugodnih pogojih. Poznamo vsaj 12 stresnih beljakovin, med katerimi je najbolj poznan 60 kDa velik polipeptid, ki je močno imunogen (Seshu in Skare, 2000). Vloga HSP je, da v neugodnih pogojih stabilizirajo proteine, kar omogoča, da se pravilno zvijajo, pomagajo pa tudi pri odvijanju poškodovanih proteinov med stresom, ki bi lahko bili pomembni za preživetje bakterij (Feng in sod., 2015).

2.4 GOJITEV BORELIJ *IN VITRO*

Borelije so anaerobne bakterije, ki najbolje rastejo ob prisotnosti 2,5 % CO₂ pri temperaturi 30-34 °C in pH 7,6 (Barbour in Hayes 1986). So prehransko zahtevne bakterije, saj za svojo rast potrebujejo posebna obogatena gojišča, kot sta Barbour-Stonenger-Kelljevo gojišče (BSK) in modificirano Kelly-Petterkoferjevo gojišče (MKP)

Rastejo počasi, njihov podvojitveni čas znaša od 7 do 20 ur, zrastejo pa v 2 do 5 tednih (Preac-Mursic in sod., 1986).

Kljub zahtevnosti gojenja in počasni rasti, ostaja izolacija borelij iz kliničnih vzorcev kot so koža, kri, likvor in sinovijska tekočina, še vedno » zlati standard« diagnostike (Reed, 2002; Ružič-Sabljić in sod., 2000, 2002a; Strle in sod., 2013).

2.5 ŽIVALSKI REZERVOAR IN PRENAŠALCI

Povzročitelji lajmske borelioze, ki jih s skupnim imenom označujemo *B. burgdorferi* sensu lato, so razširjeni v evropskem in severnoameriškem prostoru ter nekaterih državah Azije, kot sta Kitajska in Japonska (Stanek in Strle, 2003). Najpomembnejši rezervoar *B. burgdorferi* sensu lato v naravi so mali sesalci, kot so gozdne voluharice, rumenogrle miši, belonoge miši, gozdne rovke, veverice in ptiči. Vse te živali predstavljajo kompetentni rezervoar za borelije iz kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Zore in sod., 2006; Rizzoli in sod., 2011). Veliki divji sesalci (srnjad, jelenjad), domače živali in nekateri plazilci pa ne predstavljajo rezervoarja za *B. burgdorferi* sensu lato, saj iz krvi teh živali zaenkrat niso izolirali borelij, pravimo jim nekompetentni rezervoar (Zore in sod., 2006; Rizzoli in sod., 2011).

V Sloveniji so najpogosteje okuženi z *B. burgdorferi* sensu lato mali sesalci od 37 % do 56 %, najpogosteje gozdna voluharica v 62 % in rumenogrla miš v 19 %. Med ptiči je okuženost 39 %. Najpogosteje so okuženi kosi, in sicer v 50 %, črnoglavke v 23, 5 % in taščice v 15 % (Zore in sod., 2006).

Ker so posamezne vrste *B. burgdorferi* sensu lato različno občutljive na serumski komplement določenih gostiteljev, to verjetno pogojuje, da so določene živalske vrste rezervoar le za posamezne vrste *B. burgdorferi* sensu lato. Tako sta vrsti *B. afzeli* in *B. bavariensis* povezani z glodalci, *B. garinii* in *B. valaisiana* s ptiči, *B. lusitaniae* s kuščarji in *B. spielmanii* s polhi. *B. burgdorferi* sensu stricto je povezana tako z glodalci kot ptiči. Okužene živali ne kažejo nikakršnih znakov bolezni (Comstedt in sod., 2011; Rizzoli in sod., 2011, 2014).

Kot prenašalci borelij, so glede na geografsko razporeditev pomembne štiri vrste klopov iz rodu *Ixodes*, in sicer: v Evropi *Ixodes ricinus*, v Ameriki *Ixodes scapularis* in *Ixodes pacifus*, v Aziji pa *Ixodes persulcatus* (Eisen in Lane, 2002; Gray, 2002). Možni prenašalci borelij so tudi krvosesi insekti, kot so komarji, obadi in muhe, vendar je njihova vloga pri okužbi zanemarljiva (Anderson, 1989).

Po nedavnih podatkih meta analiz je prevalenca prekuženosti klopov z borelijami v evropskem prostoru 13,7 %, in sicer so odrasli klopi prekuženi v 18,6 %, nimfe pa v 10,1 %. Na območju osrednje Evrope, ki vključuje Avstrijo, Češko, Nemčijo, Švico, Slovenijo in Slovaško pa je ta odstotek še večji, in sicer nimfe več kot 11 %, odrasli klopi pa več kot 20 % (Rizzoli in sod., 2011, 2014). Podatki za leto 2005, ki jih je opravil Laboratorij Spirohet Čezmejno sodelovanje Furlanija Julijska krajina/Slovenija za območje Furlanije Julijske krajine in obmejnega območja Slovenije kažejo, da je prekuženost klopov za celotno območje 23,3 %, vendar se razlikujejo glede na geografsko območje. Tako so ugotovili, da je največ klopov okuženih na Krasu, in sicer 45,5 %, nato pa si sledijo predalpski svet s 18,3 %, nižinski gozd s 16,9 % in nazadnje alpski svet s 11,8 %. Na preiskovanem območju se je v klopih pokazala kot najštevilčnejša vrsta *B. afzeli* (54,9 %), sledita pa *B. garinii* (31,7 %) in *B. burgdorferi* sensu stristo (6,1 %) (Okuženost klopov, 2016). Najnovejši podatki za severovzhodni del Severne Amerike kažejo, da je prevalenca prekuženosti klopov z *Borrelia burgdorferi* sensu lato 41 %, kar je v skladu s prejšnjimi podatki za to območje, ki kažejo prevalenco med 27 % in 47 % in tudi s podatki za vzhodno in centralno Kanado s prevalenco 35 % (Scott in sod., 2016).

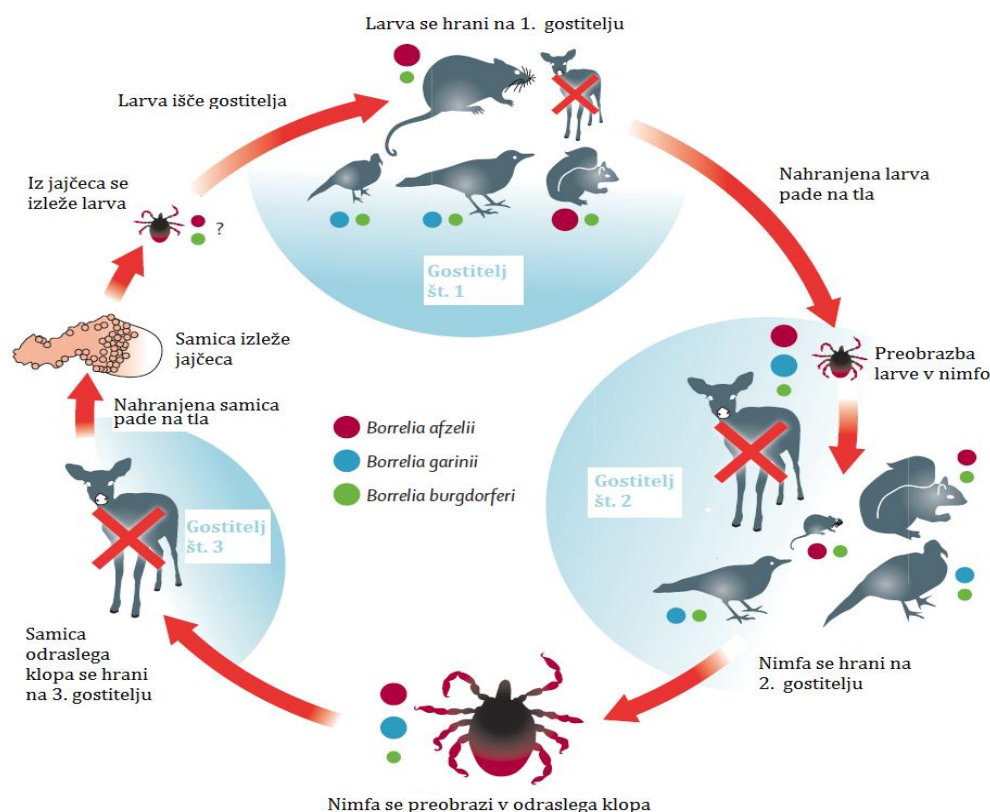
Vsi klopi imajo štiri razvojne stopnje: jajčece, larva, nimfa in odrasel klop (Eisen in Lane, 2002). Slika 4 prikazuje razvojne stopnje kropa *Ixodes ricinus*.



Slika 4: Razvojne stopnje klopa *Ixodes ricinus* od leve proti desni: larva, nimfa, samec klopa, samica klopa (Gassner, 2016)

Cikel prenosa borelij lajske borelioze se začne, ko se neokužena larva hrani s krvjo gostitelja, ki je okužen. Po hranjenju zapustijo gostitelja in se čez nekaj časa preobrazijo v naslednjo razvojno stopnjo, ki si poišče drugega gostitelja. Vsaka razvojna stopnja se hrani le enkrat. Celoten življenjski krog klopov traja od 2 do 3 leta, pri nekaterih primerih pa tudi od 5 do 6 let. Dolžina razvojnega cikla je odvisna od letnega časa, temperature in gostiteljev (Eisen in Lane, 2002; Stanek in sod., 2012). Celoten življenjski cikel *I. ricinus* prikazuje slika 5.

Pri vseh preobrazbah ostanejo borelije v klop in lahko pride do prenosa borelij iz okužene larve, nimfe ali odraslega klopa na gostitelja, živali ali človeka (Burgdorfer, 1995; Eisen in Lane, 2002; Stanek in sod., 2012). Človek je ob tem le naključni gostitelj (Zore in sod., 2006). Eden od dejavnikov, ki vpliva na prenos borelij je čas prisesanosti klopa. Čim krajši je čas prisesanosti klopa, tem manjša je verjetnost, da pride do prenosa borelij, saj morajo te po vbodu klopa pripotovati iz črevesja do žlez slinavk za kar potrebujejo nekaj dni. Ko so te enkrat namnožene v žlezah slinavkah klopa, pa jih le-ta lahko hitro vbrizga v gostitelja. Tako lahko razlagamo prenos borelij na človeka že v manj kot 12-ih urah po vbodu (Funa in sod., 1996; Strle, 1999).



Slika 5: Življenjski krog klopa *Ixodes ricinus* in prenos bakterije *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Stanek in sod., 2012)

2.6 LAJMSKA BORELIOZA

2.6.1 Patogeneza okužbe

Borelije so gibljive in s tem tudi invazivne bakterije. Poleg gibljivosti je njihova patogenost odvisna tudi od citotoksičnosti, antigenske variabilnosti, sposobnosti spodbude imunskega sistema in rezistence na aktivacijo komplementa (Wasiluk in sod., 2011). Pomembno vlogo v patogenosti lajmske borelioze imajo beljakovine Osp, Bbk32, Dbpa, Dbpb, ki ji pomagajo pri pritrditvi, penetraciji, razsoju in kolonizaciji v različna tkiva in organe. Prisotnost borelij v tkivih spremlja infiltracija z limfociti in plazmatkami, odgovorne pa so tudi za lokalna vnetna dogajanja (Murray in Shapiro, 2010). Borelije sprožijo močno tvorbo citokinov (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10), predvsem tumorje nekrotizirajočega dejavnika, interlevkina-1 β , aktivacijo komplementa po klasični in

alternativni poti ter imunski odgovor z znaki avtoreaktivnosti (Steere, 2001; Wasiluk in sod., 2011).

2.6.2 Klinična slika

Lajmska boreliosa ima zelo raznolik potek. Poteka lahko asimptomatsko, brez izraženih kliničnih znakov ali kot bolezen, ki prizadene številne organske sisteme z jasno izraženimi kliničnimi znaki in simptomi. Lajmsko boreliozo delimo na zgodnjo in pozno obliko, zgodnjo pa še na lokalizirano in diseminirano (Asbrink in Hovmark, 1991; Müllegger, 2004; Strle, 2006a; Strle in Stanek, 2009; Murray in Shapiro, 2010; Stanek in sod., 2011, 2012). Preglednica 3 prikazuje najpomembnejše klinične znake okužbe.

Preglednica 3: Glavni klinični znaki lajmske borelioze (Müllegger, 2004; Strle in Stanek, 2009; Murray in Shapiro, 2010; Stanek in sod., 2011).

OBDOBJE (STADIJ) BOLEZNI	KLINIČNI ZNAKI
Zgodnje bolezensko obdobje Lokalizirana okužba (1. stadij) Diseminirana okužba (2. stadij)	• erythema migrans • borelijski limfocitom • eventuelna blaga utrujenost • multipli erythema migrans • nevroboreliosa • prizadetost srca • prizadetost sklepov • prizadetost oči • srednje huda utrujenost in glavoboli
Pozno bolezensko obdobje (3. stadij)	• kronična prizadetost živčevja • kronična prizadetost sklepov • kronična prizadetost kože (acrodermatitis chronica atrophicans) • zelo huda utrujenost in glavoboli

2.6.2.1 Lokalizirana zgodnja okužba

Erythema migrans se pojavi nekaj dni do nekaj tednov na mestu vboda klopa, kjer borelije vstopijo v kožo. Najprej se pojavi rdečina na koži, ki se veča, širi navzven, v sredini začne bledeti in dobi obliko obroča (Slika 6). Izgine spontano brez zdravljenja. Približno polovica pacientov navaja lokalne težave na mestu erythema migrans, kot so blago srbenje, pečenje in bolečine, majhen delež pa nespecifične simptome slabega počutja, utrujenosti, glavobola, bolečin v mišicah in sklepih. Erythema migrans zadostuje za klinično potrditev bolezni. Zdravljenje pričnemo takoj in ne čakamo na izvide seroloških preiskav (Steere 2001; Müllegger, 2004; Strle in Stanek, 2009; Stanek in sod., 2012).



Slika 6: Erythema migrans (Gathany, 2007).

Borelijski limfocitom je praviloma solitarna kožna sprememba v obliki modrikasto-rdečega vozliča ali plaka, s premerom do 5 cm, ki je posledica gostega prežemanja kože in podkožja z limfociti, ki nastanejo kot odgovor na prisotnost borelijskih antigenov v koži. Pri odraslih se borelijski limfocitom najpogosteje pojavlja na prsni bradavici, pri otrocih pa na ušesni mečici (Slika 7). Pojavlja se v Evropi, ne pa v Ameriki in Aziji (Müllegger, 2004; Strle, 2006a; Stanek in sod., 2012).



Slika 7: Borelijski limfocitom na ušesni mečici (Müllegger, 2004).

2.6.2.2 Diseminirana zgodnja okužba

Multipli erythema migrans so klinični znak zgodnje diseminirane borelijske okužbe. Nastanejo kot posledica razsoja borelij po krvi in/ali limfi. Pojavijo se 3 do 5 tednov po vbodu klopa (Arnež in sod., 2000; Steere in sod., 2004; Muray in Shapiro, 2010).

Nevroborelioza imenujemo prizadetost živčevja pri lymski boreliozii. Zajame lahko osrednje in/ali periferno živčevje. Tipična klinična slika je meningoradikulonevritis (Garin-Bijadoux-Bannwarthov sindrom) in/ali okvara možganskega živca (najpogosteje je prizadet obrazni živec), meningitis, ki je najpogostejši pri otrocih ali encefalitis. Običajno se pojavi nekaj tednov do mesecev po začetku okužbe (Strle in Stanek, 2009; Stanek in sod., 2012).

Prizadetost sklepov in mišic se najpogosteje kaže kot lajmski artritis, ki prizadene predvsem velike sklepe, zlasti koleno. Pri pregledu ugotovimo, da je sklep otekel, koža topla, vendar ne pordela. Najpogosteje se pojavi nekaj tednov do mesecev po okužbi. Pogostejši je v ZDA kakor v Evropi (Steere in sod., 2004; Strle in Stanek, 2009; Stanek in sod., 2012).

Prizadetost srca ali lajmski karditis se lahko razvije posamično ali v kombinaciji z erythema migrans, nevroboreliozo ali lajmskim artritisom. Najpogosteje zasledimo motnje prevajanja t.i. atrio-ventrikularnega bloka, lahko pa pride tudi do miokarditisa in perikarditisa. Okvare so praviloma prehodne in trajajo od nekaj dni do nekaj tednov (Strle, 1998; Strle in Stanek, 2009; Jansweijer in Oort, 2015; Scheffold in sod., 2015).

2.6.2.3 Pozno bolezensko obdobje

Acrodermatitis chronica atrophicans je kronična borelijska sprememba kože, ki v nasprotju z erythema migrans in borelijskim limfocitomom ne izgine spontano. Pojavlja se na akralnih delih telesa, navadno na ekstenzorni strani rok in nog (Slika 8). Na začetku je praviloma enostranska, kasneje pa postaja bolj ali manj simetrična. Prve spremembe se pojavijo mesece ali leta po vstopu borelij v organizem. Začetek bolezni se prične z rdečemodrikastim obarvanjem kože hrbtišča rok, nog ali predela kolena, ki se zelo počasi širi. Prizadeti predeli so običajno otekli, s časom pa otekline izginja in nastopi atrofija. Koža postaja tanjša in ranljivejša ter se guba. V predelih s prizadeto kožo so pogosto prizadeti tudi sklepi in periferno živčevje (Müllegger, 2004; Strle in Stanek, 2009).



Slika 8: Acrodermatitis chronica atrophicans (a in b) na roki in (c) na nogi (Stanek in sod., 2012).

Pozna nevroborelijoza je definirana kot stalno prisotno vnetje osrednjega ali perifernega živčevja, ki traja več kot 6 mesecev. Pojavnost je redka. Razvije se pri 10-15 % bolnikov, ki niso bili zdravljeni v času zgodnje okužbe. Kaže se kot kronična periferna nevropatija,

zmanjšanje kognitivnih sposobnosti koncentracije in pomnjenja ter kot kronični encefalomyelitis, katerega klinična slika spominja na multiplo sklerozo. Bolniki z acrodermatitis chronica atrophicans imajo značilno periferno nevropatijo s parestezijami, mišično slabostjo in mišičnimi krči (Cimperman, 2000; Hansen in sod., 2013).

Prizadetost sklepov in mišic je v poznem bolezenskem obdobju močno spremenljiva. Lajmski artritis je praviloma ponavljajoč in lahko traja več let. Pri 10 % bolnikov se razvije v kronično obliko artritisa, ki traja eno ali več let. Vzrok za nastanek kronične oblike je lahko v dolgotrajni perzistenci borelij znotraj sklepa ali pa zaradi nastalega imunskega dogajanja. V poznem bolezenskem obdobju lahko nastopi tudi prizadetost ene mišice ali več skupin mišic. Najpogostejše so prizadete mišice ramenskega obroča ter spodnjih in zgornjih okončin (Steere, 2001; Lotrič-Furlan, 2006).

2.7 EPIDEMIOLOGIJA LAJMSKE BORELIOZE

Najbolj endemični predeli za lajmsko boreliozo se nahajajo na severni polobli v zmernotoplem pasu. Lajmska boreliosa je prisotna v državah Azije, Evrope in ZDA. Je najpogostejša bolezen, ki jo prenašajo klopi, saj je letno zabeleženo okrog 85500 primerov, od tega 65500 primerov v Evropi, 16500 primerov v ZDA in 3500 primerov v Aziji. V Evropi je pojavnost največja v Srednji in Vzhodni Evropi, posebno v Avstriji, Sloveniji in na Švedskem (Hubálek, 2009).

V Sloveniji je lajmska boreliosa endemična. Od leta 1986 je v Sloveniji obvezna prijava bolnika z lajmsko boreliozo, od leta 1990 pa tudi ločeno posamezne klinične oblike. Vse od začetka beleženja rezultatov incidenca prijavljenih primerov narašča, kar je rezultat večje ozaveščenosti, aktivnejšega iskanja obolelih in boljše diagnostike. Po podatkih NIJZ je bilo leta 1986 prijavljenih prvih 29 primerov. Leta 1996 je bila zabeležena incidenčna stopnja 141 primerov na 100 000 prebivalcev, leta 2006 222 primerov na 100 000 prebivalcev, leta 2013 pa 337 primerov na 100 000 prebivalcev (NIJZ, 2014).

Lajmska boreliosa se pojavlja čez vse leto, vendar je največ primerov bolezni od maja do novembra, takrat ko je največja aktivnost klosov (Hubálek, 2009).

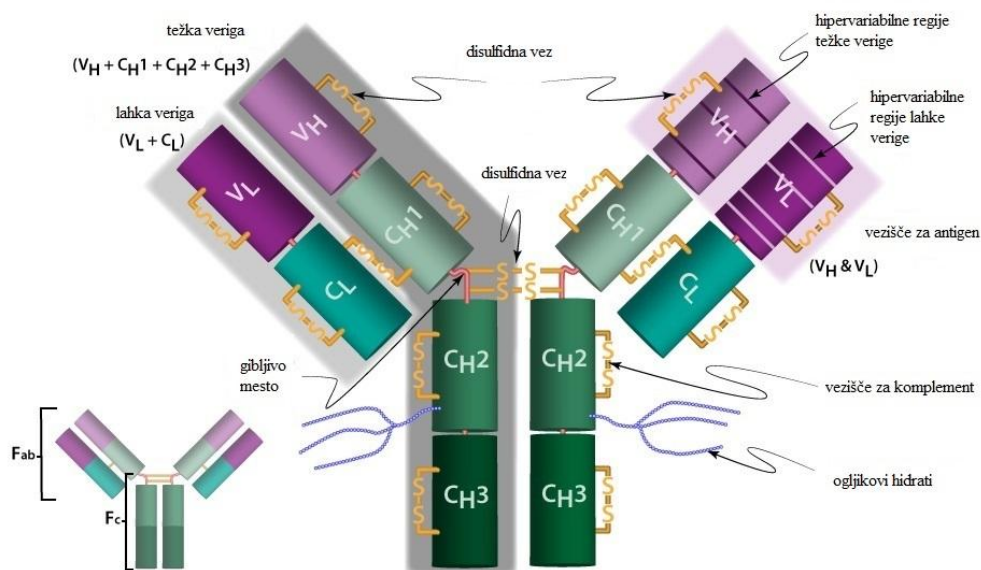
Bolezen opazimo pri obeh spolih in vseh starostnih skupinah, vendar neenakomerno. V Sloveniji je vsako leto prijavljenih več žensk kot moških, največ v starostnih skupinah od 45 do 64 let, pri malčkih pa od 1 do 4 let (Sočan, 2006; NIJZ, 2014).

2.8 IMUNSKI ODZIV

Imunski odziv pri bolnikih z lajmsko boreliozo je pester in raznolik. Za boljše razumevanje imunskega odziva bomo predstavili protitelesa, ki so tudi predmet te naloge.

2.8.1 Oblika in zgradba protiteles

Protitelesa, ki so pomemben sestavni del imunskega sistema, imenujemo tudi imunoglobulini. Imunoglobulini so glikoproteini z oligosaharidi, ki so kovalentno vezani na fragment Fc v težkih verigah. Enota imunoglobulina je sestavljena iz dveh istovetnih lahkih in dveh istovetnih težkih verig. Verige so razporejene v obliki črke Y in so med seboj kovalentno povezane z disulfidnimi (S-S) mostički. Približno v sredini težke verige sta oba fragmenta Fab pritrjena na fragment Fc. To mesto imenujemo gibljivo mesto ali zglob in omogoča, da se kot med fragmentoma Fab lahko spreminja od 0 do 180°. To mesto je sprejemljivo za proteolitično cepjenje s papainom in pepsinom (Vozelj, 2000; Roitt in sod., 2001). Slika 9 prikazuje shematično zgradbo imunoglobulina.



Slika 9: Shematična zgradba imunoglobulina (Structure of immunoglobulin, 2016)

Na vsaki verigi ločimo konstantni (C) in variabilni (V) del. Lahke verige imajo en konstantni segment (C_L) in en variabilni segment (V_L), težke verige pa tri konstantne segmente (C_H) in en variabilni segment (V_H). Te homologne regije ali segmenti ("domain"), ki se ponavljajo so sestavljene iz približno 110 aminokislin in ene zanke, sklenjene z vezjo S-S, s približno 60 aminokislinami. Segmenti, ki sestavljajo vezišče za antigen so označeni z V_L in V_H . Vsaka monomerna molekula protitelesa ima dve taki vezišči.

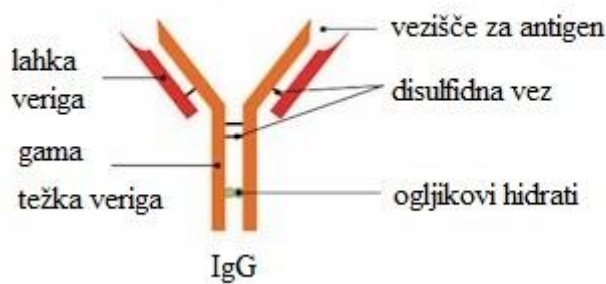
Človeške imunoglobuline lahko razvrstimo na podlagi antigenских lastnosti njihovih težkih verig v pet razredov, in sicer IgG, IgA, IgM, IgD in IgE ter v podrazrede IgG 1-4 in IgA 1-2.

2.8.2 Strukturne značilnosti in biološke lastnosti posameznih razredov protiteles

Primarna funkcija protiteles je vezanje z antigenom. Takrat ko antigen vdre v telo, sproži nastanek številnih protiteles, ki imajo različne biološke lastnosti. V nadaljevanju bomo predstavili protitelesa IgG, IgA in IgM, ki so predmet te naloge.

2.8.2.1 IgG

IgG so najpogostejša protitelesa v normalnem človeškem serumu, kjer predstavljajo okrog 70 % vseh protiteles. Nastajajo pri naravni infekciji z virusi, bakterijami ali njihovimi produkti ali pri imunizaciji. Pomembna so pri nevtralizaciji toksinov, pospeševanju fagocitoze in kot opsonini. So edina protitelesa, ki prehajajo preko placente v plod in ga ščitijo. Življenjska doba teh protiteles je od vseh imunoglobulinov najdaljša, saj v krvi ostanejo do 40 dni (Vozelj, 2000; Roitt in sod., 2001). Slika 10 prikazuje shematično zgradbo protitelesa IgG.



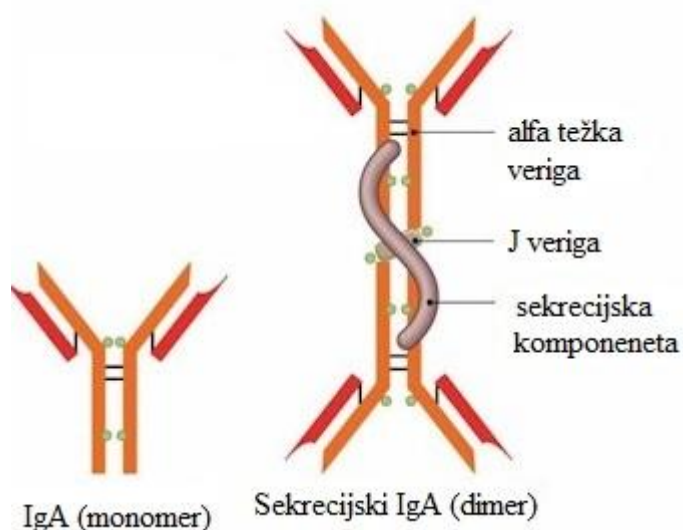
Slika 10: Shematična zgradba protitelesa IgG (The structure of antibody molecules, 2016)

2.8.2.2 IgA

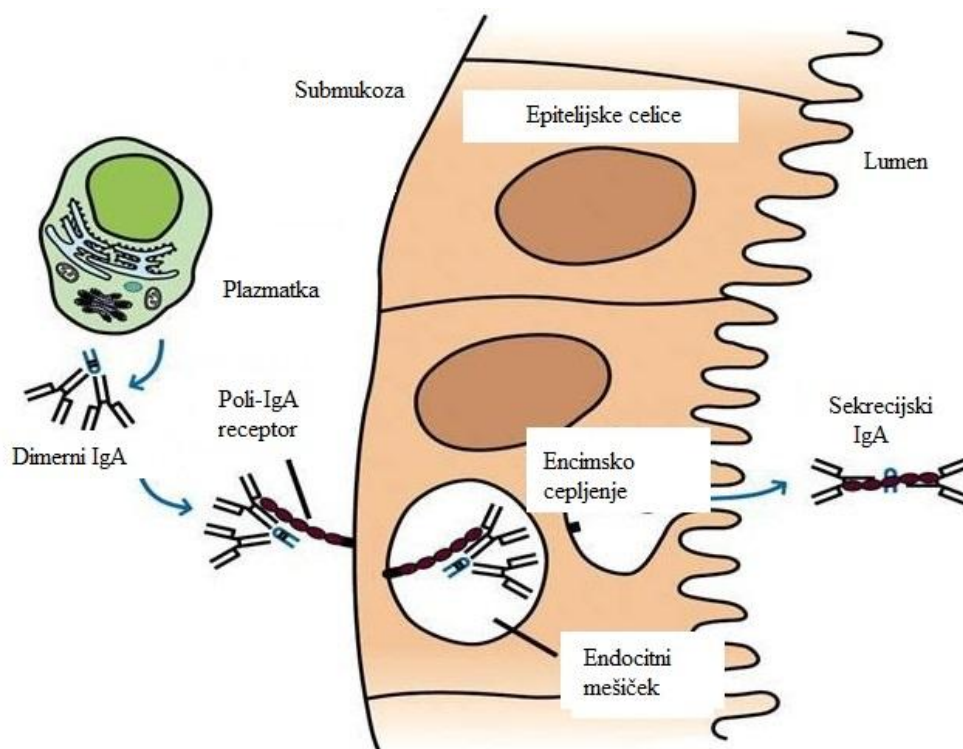
V razredu protiteles IgA sta dva podrazreda IgA1 in IgA2, ki se med seboj razlikujeta po zgradbi. IgA1 je monomerna molekula, zgrajena kot drugi imunoglobulini in se v 90 % nahaja v krvi, IgA2 pa ima posebno zgradbo, za katero je značilno, da lahke verige niso povezane s težkimi verigami z disulfidnimi vezmi, temveč z nekovalentnimi in prevladuje v izločkih. Protitelesa IgA v izločkih so dimerne molekule, ki jih povezujejo dve dodatni verigi. Veriga J je polipeptid, bogat s cisteinom in je strukturno povsem drugačen kot so verige imunoglobulina. Nastaja v plazmatkah v submukozi. Druga, sekrecijska veriga nastaja v epitelijskih celicah in deluje kot receptor za dimerni IgA. Ta receptor imenujemo tudi sekrecijska komponenta na bazalni površini epitelijske celice, ki je obrnjena h krvi. IgA se pritrdi na sekrecijsko verigo in potuje skozi epitelijsko celico v endocitnih mešičkih v izločke na površino sluznice. Sekrecijska veriga v izločkih ščiti dimerni IgA pred

cepljenjem s proteolitičnimi encimi (Kerr, 1990; Vozelj, 2000; Ihan, 2002; Woof in Kerr, 2004).

Funkcija protiteles IgA je, da preprečujejo vezavo patogenih bakterij na površino sluznic in da nevtralizirajo številne bakterijske antigene in viruse. IgA v krvi veže tuje molekule in omogoča njihov prenos skozi jetrne celice v žolč. Na ta način je poskrbljeno, da ne pride do vnetne reakcije na antigene, ki pridejo v telo s hrano ali vdihanim zrakom. IgA ne aktivirajo komplementa in so slabi opsonini. Najdemo jih tudi v solznicah, sečilih in rodilih ter materinem mleku (Vozelj, 2000; Ihan, 2002; Woof in Kerr, 2004). Slika 11 prikazuje shematično zgradbo protitelesa IgA, slika 12 pa nastanek sekrecijske oblike protitelesa IgA.



Slika 11: Shematična zgradba protitelesa IgA (The structure of antibody molecules, 2016)

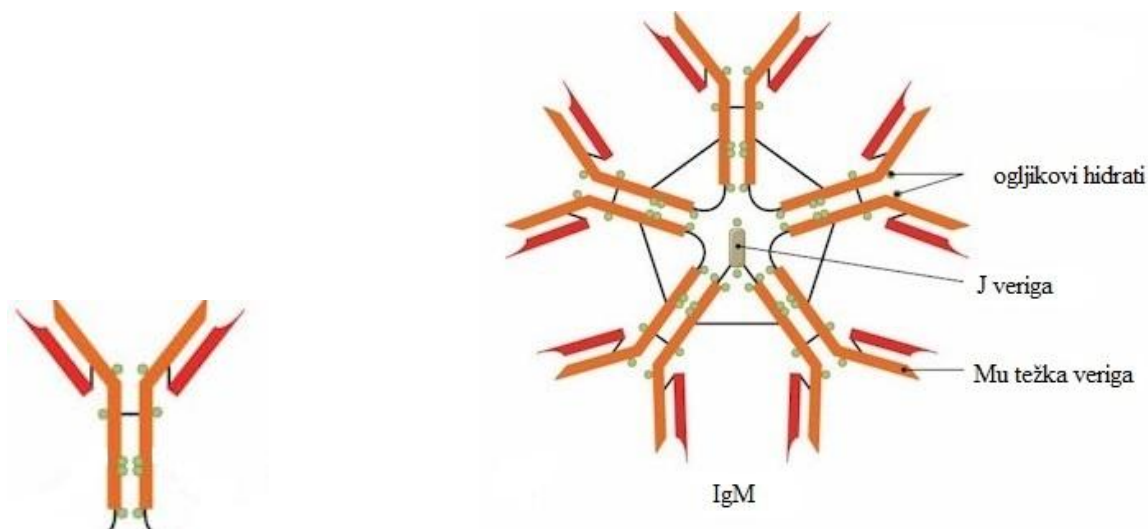


Slika 12: Nastanek sekrecijske oblike protitelesa IgA (Kindt in sod., 2007)

2.8.2.3 IgM

Protitelesa razreda IgM (M-makroglobulini) imajo veliko molekulsko maso, približno 900 kD, ker so sestavljeni iz 5 enakih enot, med seboj povezanih z disulfidnimi vezmi blizu gibljivega mesta v težki verigi. Zaradi svoje velikosti slabo difundirajo v medcelične tkivne tekočine in ga tam najdemo v zelo majhnih količinah. Veriga J jim omogoča prenos v zunanje izločke, ki oblivajo sluznične površine. Tu delujejo kot dopolnilni sekrecijski imunoglobulini v odsotnosti protiteles IgA (Vozelj, 2000; Ihan, 2002).

Imajo po 10 enakih vezišč za antigen in so zaradi multivalentnosti učinkovita zlasti za pritrjevanje na površino celic, ki imajo veliko število podobnih antigenih mest. Pri primarnem imunskem odzivu se pojavijo prej kot protitelesa IgG in v precejšnjem številu. So prva obrambna črta pri vdoru mikroorganizmov. Tvoriti se začnejo že pri plodu in ne prehajajo skozi placento. Posredujejo lizo s kompleментом in pospešujejo opsonizacijo in fagocitozo (Vozelj, 2000). Slika 13 prikazuje shematično zgradbo protitelesa IgM.



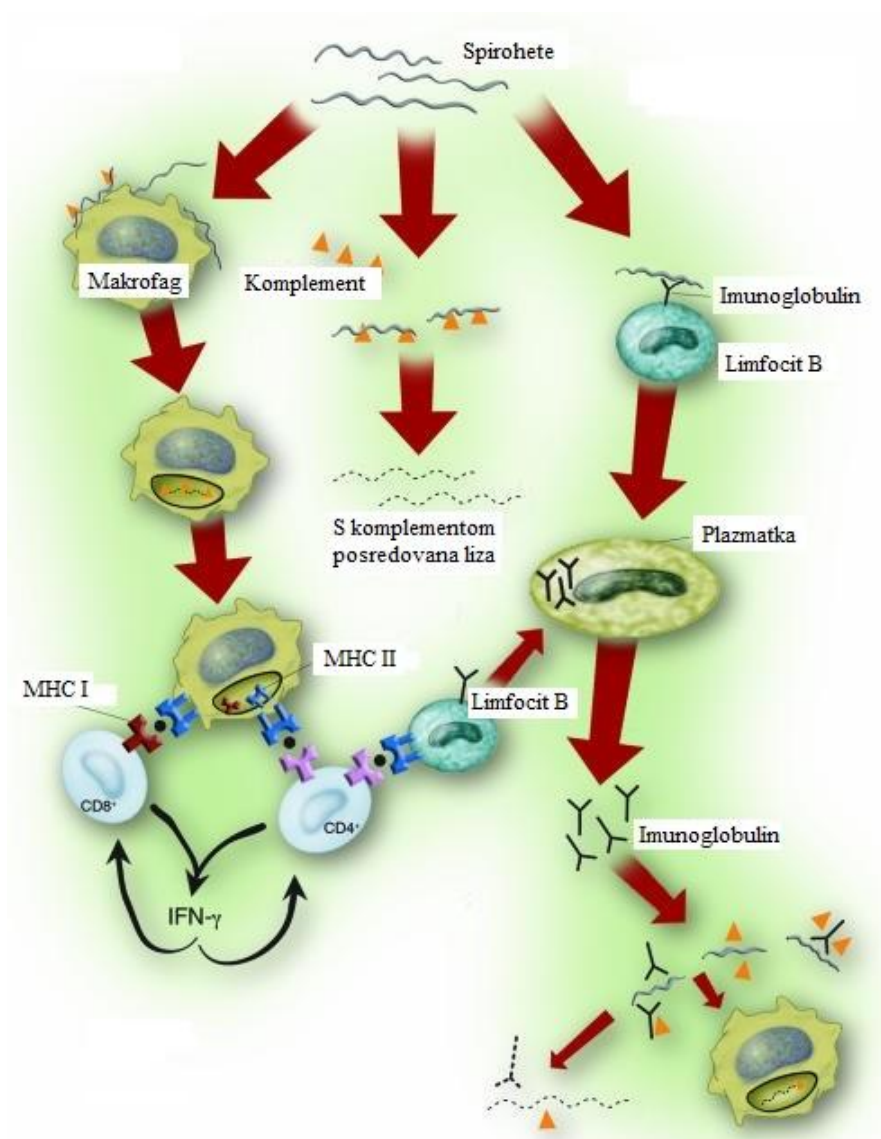
a) monomer IgM

b) pentamer IgM

Slika 13: Shematična zgradba protitelesa IgM, a) monomer in b) pentamer (The structure of antibody molecules, 2016)

2.8.3 Imunski odziv gostitelja na borelijsko okužbo

Imunski odziv gostitelja se začne z vdorom borelij v telo. Kaže se kot celični in/ali protitelesni imunski odziv na antigene borelij, z različno intenziteto v posameznih obdobjih bolezni (Malovrh in Paternoster, 1998). Slika 14 prikazuje imunski odziv po vdoru borelij. Značilnost borelijske okužbe je, da je borelij v gostitelju malo, počasi se razmnožujejo (ali sploh ne) zato se imunski odziv spodbuja počasi, lahko je šibek ali celo odsoten (Dressler in sod., 1993; Wilske, 2003; Agüero-Rosenfeld, 2005).



Slika 14: Imunski odziv gostitelja po vdoru borelij (Steere, 2004)

2.8.3.1 Nespecifični imunski odziv

Mehanizem nespecifične ali prirojene imunske odpornosti vključuje fagocitozo in aktivacijo komplementa. Po vdoru borelij v kožo, se najprej odzovejo polimorfonuklearni levkociti, monociti in makrofagi, ki sproščajo vnetne mediatorje, kot so IL (interlevkin)-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 ter TNF (tumor nekrotizirajoči dejavnik), kot odgovor na lipoproteine borelij (Montgomery in sod., 2002; Skogman in sod., 2012). V zgodnji fazi okužbe so v leziji erythema migrans prisotni makrofagi, po razsoju borelij v druga tkiva in

organe, pa so prisotni polimorfonuklearni levkociti in monociti (Szczepanski in Benach, 1991). Protein OspA in 41 kDa velik protein flagelina delujeta kemotaktično, saj izzoveta migracijo polimorfonuklearnih levkocitov. Borelije povzročijo tudi aktivacijo komplementa, pri katerem komponenta C5a deluje kot kemoatraktant za polimorfonuklearne levkocite. Končni rezultat se kaže z nastankom litičnega kompleksa in lizo celice ali fagocitozo (Szczepanski in Benach, 1991).

2.8.3.2 Specifičen imunski odziv

Specifični imunski odziv se kaže kot celični in protitelesni imunski odgovor. Celični imunski odziv se prične z aktivacijo limfocitov T (celice pomagalke), ki se diferencirajo v Th1 in Th2. Celice Th1 izločajo IFN- γ , celice Th2 pa IL-4. Za odrasle je značilen imunski odziv po tipu Th1 z visokim številom celic, ki izločajo IFN- γ , za otroke pa odziv z uravnoteženim številom celic, ki izločajo IFN- γ in IL-4 (Skogman in sod., 2012).

Celičnemu imunskemu odzivu sledi protitelesni imunski odziv. Primarni imunski odziv se začne s tvorbo protiteles IgM, približno 3 do 6 tednov po okužbi. Usmerjen je direktno proti 41 kDa velikemu polipeptidu flagela in 22 kDa velikemu proteinu OspC, ki sta imunodominantna proteina v zgodnji fazi bolezni (Szczepanski in Benach, 1991; Wilske in sod., 1993). Protitelesa IgM lahko med okužbo vztrajajo ali pa izginejo. Po 6 tednih okužbe se pojavijo protitelesa IgG, ki se tudi vežejo na komponento bička. S časom trajanja okužbe postaja imunski odziv pri bolnikih intenzivnejši, saj se tvorijo protitelesa tudi proti drugim borelijskim antigenom, kot so beljakovine p100, p17, 60 kDa, 83/100 kDa, OspA in OspB (Szczepanski in Benach, 1991, Zöller in sod., 1993).

Poleg protiteles IgM in IgG v poteku lajmske borelioze zasledimo tudi protitelesa IgA. Njihovo prisotnost zasledimo tako v začetku kot v nadaljevanju bolezni (Steere in sod., 1990; Baig in sod., 1991; Hansen in Lebech, 1991; Kaiser, 1995). Protitelesa IgA se močneje proizvajajo predvsem lokalno. Pri nevroboreliozi je prisotnost dimernih IgA v intratekalni tekočini več kot 50 %, v serumu pa le 13 % in vedno ob sočasni prisotnosti

protiteles IgG (Steere in sod., 1990; Baig in sod., 1991; Roberg in sod., 1995).

Kljub antibiotičnemu zdravljenju lahko borelije perzistirajo v tkivih in povzročijo dolgotrajen in škodljiv vnetni odziv, ki vodi v nastanek avtoimunske pogojenih procesov (Singh in Girschick, 2004). Vzrok le-temu naj bi bila t.i. molekularna mimikrija s pomočjo katere se borelije izognejo imunskemu sistemu tako, da posnemajo humane celice (Bolz in Weis, 2004; Ercolini in Miller, 2008). Ugotovili so podobnost med odsekom beljakovine OspA in proteinom LFA-1 na nekaterih humanih celicah. Pri bolnikih s kroničnim lajmskim artritismom, ki so rezistentni na antibiotično zdravljenje, so T-celice stimulirane k izločanju $\text{INF-}\gamma$ s strani OspA in LFA-1. To vodi v poškodbo tkiva (Ercolini in Miller, 2008). Avtoimunska dogajanja, ki jih sprožijo protitelesa IgA se lahko kažejo kot prizadetost ledvic npr. glomerulonefritis. Za IgA glomerulonefritis je značilno, da se v glomerulnih mezangijskih depozitih kopičijo protitelesa IgA, ki jih občasno spremljajo protitelesa IgG, redno pa C3 komponenta komplementa. Možno pa je tudi, da so glomerulni mezangijski depoziti le polimeriziran IgA1 (Ferluga in Vizjak, 2005; Otani in sod., 2012). O pojavnosti lajmskega glomerulonefritisa pri ljudeh je bolj malo znanega, več informacij o tem pa lahko zasledimo v raziskavah, ki so bile opravljene pri psih. Ugotovili so, da so psi z glomerulonefritismom imeli sočasno prisoten visok titer protiteles proti *B. burgdorferi* sensu lato. V nekaterih raziskavah so z IFT dokazali prisotnost spirohet v ledvicah in urinu (Hutton in sod., 2008; Gerber, 2010; Littman, 2013).

2.8.4 Diagnostika lajmske borelioze

Borelijska okužba se kaže z različnimi kliničnimi slikami in pestro paleto simptomov, izmed katerih je kožna sprememba erythema migrans edini klinični znak, ki zadostuje za diagnozo bolezni (Strle in Stanek, 2009). Neznačilne bolezenske spremembe (utrujenost, glavobol, mialgije, artralgie, drugo) pa borelijsko okužbo le nakazujejo. Pri teh bolnikih je mikrobiološka potrditev borelijske okužbe nujno potrebna (Stanek in Strle, 2003).

Borelijsko okužbo lahko dokazujemo neposredno ali posredno.

Neposredno v kliničnih vzorcih jo dokažemo z:

1) osamitvijo *B. burgdorferi* sensu lato (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005; Ružič-Sabljić, 2006).

2) dokazovanjem molekule DNK *B. burgdorferi* sensu lato in

Posredno pa z dokazom bolnikovega imunskega odziva na borelijske antigene. Pri tem lahko uporabimo dve metodi:

1) dokaz specifičnih protiteles in redkeje uporabljena metoda

2) dokaz stimulacije limfocitov T (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005; Ružič-Sabljić, 2006).

Metodo izberemo glede na čas trajanja okužbe in potek klinične slike. Pri tem upoštevamo občutljivost in specifičnost testa. Rezultate ovrednotimo in interpretiramo v povezavi s klinično sliko (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005; Ružič-Sabljić, 2006).

2.8.4.1 Osamitev borelij

Izolacija borelij velja za najzaneslivejšo metodo dokazovanja okužbe. Pravimo ji tudi »zlati standard« (Reed, 2002; Strle in sod., 2013). Za izolacijo in kultivacijo borelij uporabljamo tekoča gojišča kot sta BSK (Barbour- Stoenner-Kellyjevo gojišče) in MPK (modificirano Kelly-Pettenkoferjevo gojišče), ki vsebujejo goveji serumski albumin, osnovne gradnike bakterijske celične stene, N- acetilglukozamin, zajčji serum, citrat, piruvat in druga hranila. Kultiviramo jih pri temperaturi od 30 do 34 °C v mikroaerofilni atmosferi 9 tednov ali več. Pri izbiri vzorca moramo biti pozorni na to, da je le-ta odvzet aseptično preden začnemo z antibiotičnim zdravljenjem in čim prej cepljen v gojišče, po možnosti kar ob bolniku. Vzorec lahko do laboratorija prenesemo pri sobni temperaturi (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005; Ružič-Sabljić in sod., 2002a, 2006).

2.8.4.2 Dokaz molekule DNK

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je reakcija pomnoževanja določenega odseka genoma. Pri borelijah lahko s PCR dokazujemo kromosomsko ali plazmidno DNK, tarča pa so različni borelijski geni. Borelijsko DNK lahko dokazujemo v koži, likvorju,

sinovijski tekočini, krvi in drugih kužninah. Pomembno je, da je vzorec čim večji, ker koncentracija borelij vpliva na rezultat preiskave (Reed, 2002). Z metodo PCR lahko dokažemo molekulo DNK žive ali mrtve borelije. Prednosti metode PCR so v tem, da je metoda hitra, občutljiva in da povzročitelja dokažemo še preden se razvije imunski odziv (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005; Ružić-Sabljić, 2006). Največja pomanjkljivost te metode je, da ni standardizirana, zato so raziskave usmerjene v izboljšanje le-te. Taka je na primer imuno-PCR metoda, ki vključuje občutljivost PCR metode in specifičnost ter vsestranskost imunskih metod (Halpern in sod., 2013).

2.8.4.3 Dokazovanje specifičnih protiteles

Protitelesa, ki nastanejo med borelijsko okužbo dokazujemo v serumu, likvorju in sinovijski tekočini bolnikov. Danes se najpogosteje uporabljajo serološke metode, kot so imunofluorescenčni test (IFT), encimskoimunski test (ELISA) in imuno blot (western blot) (Aguero-Rosenfeld, 2005). Po priporočilih naj bi serološko testiranje sledilo dvostopenjskemu principu. Kot presejalna testa lahko uporabimo IFT ali ELISA, za potrditev pa Western blot ali imuno blot (Wilske in sod., 2007; Lencáková in sod., 2008).

Imunski odziv na borelijsko okužbo je odvisen od časa trajanja okužbe, ali smo že pričeli z zdravljenjem, ali smo zdravljenje že izvedli in tudi od odzivnosti na okužbo posameznega bolnika. Opaža se namreč, da pri nekaterih bolnikih sploh ne pride do izdelovanja specifičnih protiteles. V začetnem stadiju bolezni, ko je prisoten le klinični znak erythema migrans je imunski odziv navadno šibek. V tem obdobju navadno ugotovimo le četrtino seropozitivnih bolnikov, prisotna so protitelesa IgM. S potekom okužbe prihaja do vse bolj kompleksnega imunskega odgovora na številne borelijske antigene in poleg protiteles IgM, zasledimo tudi protitelesa IgG. Delež seropozitivnih bolnikov se povečuje (Aguero-Rosenfeld, 2005).

Pred izvedbo testa je zelo pomembna pravilna izbira in priprava antigena. Navadno izberemo tisti sev *B. burgdorferi* sensu lato, ki je prisoten v preiskovanem geografskem področju. Kot antigen lahko uporabimo cele borelije ter prečiščene ali rekombinantne

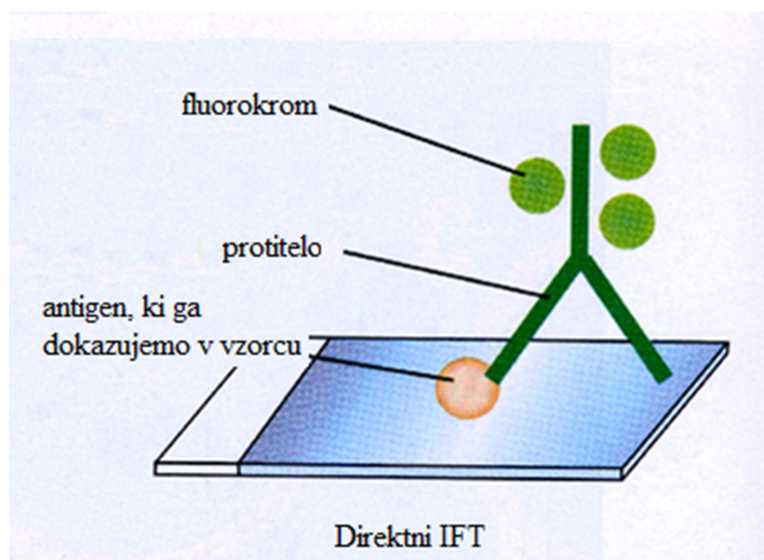
borelijske antigene. Te lahko pripravimo sami, kot to počnejo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani ali pa uporabimo komercialne teste, ki so lahko dostopni in poceni.

Na rezultate testiranja vpliva izbira testa in postopek izvajanja, specifičnost in občutljivost testa, izbira »cut-off« titra, ter možnost navzkrižnih reakcij (Aguero-Rosenfeld, 2005; Ružić-Sabljić, 2006; Wilske in sod., 2007).

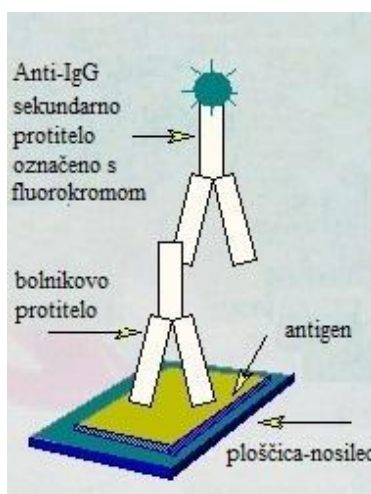
Do navzkrižnih reakcij prihaja pri bolnikih, ki so okuženi z antigensko podobnimi bakterijami (npr. treponeme) in bolnikih z avtoimunskimi boleznimi. Pri dokazovanju protiteles IgM moramo zaradi možnosti lažno pozitivnih rezultatov predhodno iz seruma odstraniti revmatoidni faktor (Ružić-Sabljić in sod., 1995). Rевmatoidni faktor je avtoprotitelo razreda IgM (lahko tudi drugih razredov imunoglobulinov-IgA, IgG), ki reagira z Fc delom lastne molekule IgG (Vozelj, 2000). Če se revmatoidni faktor veže na kompleks specifični IgG-borelijski antigen, pride do lažno pozitivnih rezultatov za protitelesa IgM. Temu se izognemo tako, da iz seruma z absorpcijo predhodno odstranimo protitelesa IgG (Ružić-Sabljić in sod., 1995).

2.8.4.3.1 Imunofluorescenčni test –IFT

Imunofluorescenčni test (IFT) je ena izmed mikrobioloških tehnik, ki se uporablja v znanstveno raziskovalne namene kot tudi v klinični praksi. Je serološka metoda, s katero dokazujemo specifična protitelesa v serumu, likvorju in sinovijski tekočini bolnikov pa tudi antigene. Temelji na reakciji antigen-protitelo, ki je specifična. Da bi reakcijo lahko opazovali, je potrebno predhodno označiti protitelesa. Za to uporabljamo fluorokrome (npr. fluorescein). Postopek je lahko neposreden (običajno dokazujemo antigene) ali posreden (običajno dokazujemo protitelesa) (Odell in Cook, 2013; Petersen in Pedersen, 2013). Slika 15 prikazuje neposredni IFT, slika 16 pa posreden IFT.



Slika 15: Neposredni imunofluorescenčni test (Direct IFT, 2016)



Slika 16: Posredni imunofluorescenčni test (Indirect immunofluorescence assay, 2016)

Pri posredni metodi antigen (v našem primeru *B. afzelii*) najprej pritrdimo na predmetnik, nato pa dodamo preiskovani serum. Pri tem nastane primarni kompleks antigen-protitelo. Nastalemu kompleksu nato dodamo sekundarna protitelesa, ki so označena s fluorokromi in prepoznajo primarna, bolnikova protitelesa, vezana v imunski kompleks z antigenom (Slika 16). Nastali fluorescirajoči sekundarni imunski kompleks opazujemo z mikroskopom. Rezultate testa izrazimo s titrom protiteles. (Odell in Cook, 2013; Petersen in Pedersen, 2013).

Posredni test ima nekatere prednosti, in sicer:

- primarnega protitelesa ni potrebno označiti. S tem se izognemo izgubi primarnih protiteles, ki jih je navadno le omejena količina.
- posredna metoda je veliko bolj občutljiva, ker se na vsako primarno protitelo veže veliko število s fluorokromom označenih sekundarnih protiteles.
- komercialno dostopna sekundarna protitelesa so relativno poceni, dobro kontrolirana in v široki paleti barv fluorokromov (Vozelj, 2000; Petersen in Pedersen, 2013).

2.8.4.3.2 Encimskoimunski test –IEA oz. ELISA

Encimskoimunski test (ELISA) je imunska serološka metoda, ki se uporablja za dokaz specifičnih antigenov ali protiteles v biološkem vzorcu. Lahko je neposredna ali sendvič metoda, ki se uporablja za dokaz antigenov, ali pa posredna metoda, s katero določimo koncentracijo specifičnih protiteles v preiskovanem vzorcu. Za dokaz borelijske okužbe se uporablja posredna metoda, s katero določamo koncentracijo specifičnih protiteles IgM, IgG in IgA. Reakcijo izvedemo tako, da borelijske antigene (sonificirane, prečiščene ali rekombinantne) vežemo na vdolbinice mikrotitrne ploščice. Po dodatku preiskovanega seruma nastanejo kompleksi antigen-protitelo, nevezana protitelesa pa speremo. Nato sledi vezava sekundarnih protiteles, ki so označena z encimom. Nevezana sekundarna protitelesa speremo in dodamo ustrezen substrat, tako da nastane barvna reakcija. Reakcijo opazujemo s spektrofotometrom in določimo koncentracijo preiskovanih protiteles (Aguero-Rosenfeld, 2005; Kindt in sod., 2007).

2.8.4.3.3 Imunska blot metoda –test Westrn blot (WB)

Test imuno (westrn) blot je imunodiagnostična tehnika s katero dokazujemo specifična protitelesa, ki so uperjena proti posameznim virusnim ali bakterijskim beljakovinom. V diagnostiki lajmske borelioze se uporablja kot potrditveni test v dvostopenjskem testiranju vzorcev, ki smo jih predhodno testirali z IFT ali ELISA testom. Kot antigeni se uporabljajo rekombinantne borelijske beljakovine, ki so nanese na nitrocelulozno membrano v obliki jasno omejenih pasov. Membrana se inkubira z bolnikovim serumom, sledi spiranje in nato

dodatek z encimom označenih protiteles, ki se vežejo na bolnikova protitelesa, nato pa dodatek substrata. Pri pozitivni reakciji pride do obarvanja pasov na membrani, iz katerih lahko natančno ugotovimo s katerimi borelijskimi antigeni so reagirala bolnikova protitelesa. Test imuno (westrn) blot ima visoko specifičnost in občutljivost, saj zazna specifična protitelesa v zelo nizkih koncentracijah. Možno je tudi, da s pomočjo testa imuno (westrn) blot ugotovimo specifičen imunski odziv pri osebah, ki so v bile preteklosti v stiku z borelijskimi antigeni, vendar ne kažejo nobenih znakov okužbe (Ružič-Sabljić in sod., 2002b; Aguero-Rosenfeld in sod., 2005; Kindt in sod., 2007).

2.9 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE

Zdravljenje lajmske borelioze začnemo na osnovi značilne klinične slike in/ali laboratorijske potrditve okužbe. Veliko več lahko naredimo za preprečevanje okužbe.

2.9.1 Zdravljenje

Najpogostejša in najbolj značilna klinična slika lajmske borelioze je erythema migrans, ki se praviloma pozdravi spontano, brez antibiotičnega zdravljenja, vendar zdravljenje z antibiotiki pričnemo takoj, saj je zdravljenje v zgodnjem poteku bolezni najbolj uspešno, hkrati pa na ta način preprečimo širjenje borelij iz kože v tkiva in organe in tako z večjo verjetnostjo preprečimo nevrološke, srčne ali sklepne okvare, ki bi se lahko razvile mesece ali celo leta po okužbi, saj vemo, da se borelije ob neugodnih pogojih spremenijo v L ali cistične oblike, ki so nedostopne tako za imunski sistem kot za antibiotike (Nadelman in Wormser, 1998; Strle, 2006b).

Izbira antibiotika v prvi vrsti temelji na osnovi ocene, kateri organi in tkiva so prizadeti ter koliko časa traja njihova prizadetost. Za zdravljenje zgodnjih stadijev bolezni se uporabljajo betalaktami in doksicilini, v nadaljevanju pa makrolidi kot je azitromicin. Za zdravljenje nevroborelioze se uporabljajo še ceftriaksoni (Stanek in sod., 2012).

2.9.2 Preprečevanje

Najboljši način preprečevanja okužbe je izogibanje območjem, ki jih naseljujejo klopi. Ker to vedno ni mogoče, si pred odhodom na taka območja nadenemo primerna oblačila in uporabimo repelente. Po vrnitvi se temeljito pregledamo in odstranimo morebitno prisesane klope. Mesto prisesanosti klopa spremljamo še naslednjih 30 dni (Pleterski Rigler, 2006; Girschick in sod., 2009; Rizzoli in sod., 2011).

2.9.3 Cepljenje

V ZDA so leta 1999 izdelali uspešno in uporabno cepivo, narejeno iz rekombinantnega OspA, ki se je izkazalo za primerno imunogeno, toda z razširjenostjo uporabe so ugotovili, da stranski učinki niso zanemarljivi, zlasti z njim povezan pojav artritisa. Leta 2001 so cepljenje ukinili (Pleterski Rigler, 2006; Nigrovic in Thompson, 2007).

V Evroaziji je razvoj cepiva velik problem, saj je na tem območju epidemiološko pomembnih vsaj 8 serotipov borelij z različnimi OspA antigeni in približno 40 serotipov z različnimi OspC antigeni, ter so prisotne vsaj štiri borelijske vrste, v ZDA pa samo ena vrsta, in sicer *B. burgdorferi* sensu stricto (Stanek, 2000; Pleterski Rigler, 2006). Raziskave za razvoj cepiva temeljijo na pripravi rekombinantnih proteinov zunanje membrane OspA in OspC, v zadnjem času pa tudi na raziskavah proteaze BbHtra, ki povzroči dober imunski odgovor s porastom protiteles, vendar ta ne nudijo ustrezne zaščite pred razvojem bolezni, kar predstavlja izziv za nadaljne raziskave (Tuháčková in sod., 2005; Skotarczak, 2015; Ullmann in sod., 2015).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 BOLNIKI IN VZORCI

V študijo smo vključili 300 serumov bolnikov s sumom na lajmsko boreliozo ali že potrjeno diagnozo le-te. Izbrali smo jih naključno iz zbirke serumov Laboratorija za diagnostiko borelioz in leptospiroze na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete, Ljubljana od septembra 2002 do oktobra 2003.

Vsem vzorcem krvi smo določali specifična protitelesa razreda IgA s posrednim imunofluorescenčnim testom (IFT) brez absorpcije. Ob enem smo jim ponovno določali specifična protitelesa IgM in IgG zaradi morebitnega vpliva odmrzovanja/zamrzovanja na rezultat testiranja. Pri vzorcih, ki so imeli prisotna specifična protitelesa IgG smo izvedli še IFT z absorpcijo z namenom odstranitve protiteles IgG in v izogib vpliva protiteles IgG na določanje protiteles IgA in IgM.

3.2 METODE TESTIRANJA

Vzorci smo testirali z IFT brez in z absorpcijo, njihove titre pa določili z mikroskopiranjem pod UV svetlobo s fluorescenčnim mikroskopom. V izogib večkratnem odmrzovanju / zamrzovanju smo odmrznili po 50 vzorcev, jih testirali z vsemi testi, opravili morebitne ponovitve in jih nato ponovno zamrznili.

3.2.1. Material in oprema za IFT z in brez absorpcije

- Antigen: sev *B. afzelii*, ki izraža OspA, OspB in OspC beljakovine

Priprava antigena (Ružić-Sabljić in sod., 1995):

- kulturo *B. afzelii* odmrznemo in cepimo 0,5 mL v modificirano Kelly-Pettenkofferjevo gojišče (MKP)
- inkubiramo 3-4 dni pri temperaturi 33 °C, preverimo število in gibljivost bakterij ter morebitno kontaminacijo (z mikroskopiranjem v temnem polju, 400-kratna povečava)

- trikrat speremo in skoncentriramo borelije: centrifugiramo na 10 000 obr/min. 20 min pri 22 °C, supernatant odlijemo, ¼ sedimenta speremo s pufrom za spiranje borelij (PBS+ MgCl₂: 0,01M PBS pH=7,4 in 5mM MgCl₂)
- po tretjem centrifugiranju odlijemo supernatant, sediment pod mikroskopom redčimo s pufrom za spiranje borelij, dokler ne dobimo v enem vidnem polju 8-10 borelij
- nakapljamo v posamezno luknjico objektnega stekelca, posušimo na sobni temperaturi, zavijemo v folijo in shranimo pri – 80 °C.
- Pozitivna (serum, ki ima protitelesa IgM, IgG in IgA) in negativna (pufer PBS + BSA) kontrola
- Konjugat: ovčja antihumana protitelesa IgM (redčena 1:300), IgG (redčena 1:200) (oba INEP, Zemun, R. Srbija) in IgA (redčena 1:16) (SIGMA-ALDRICH, USA)
- pufer za redčenje seruma: PBS (ang. phosphate buffer saline; 98 mL 1:20) + BSA
- (ang. bovine serum albumine; 2 mL 30 %)
- pufer za spiranje vzorca: PBS (pH = 7,4 do 7,5)
- Absorbent RF: RF Absorbant, Behring, Nemčija
- Mikrotitrne plošče za redčenje seruma
- Nastavljive pipete in nastavki za pipete
- Imerzijsko olje
- Objektna in krovna stekelca
- Ependorfke
- Inkubator 33 °C in 37 °C
- Vrtinčnik
- Centrifuga
- Hladilna omara 4 °C
- Fluorescenčni mikroskop

3.2.2 Posredni imunofluorescenčni test brez absorpcije

Kot antigen se pri posrednem IFT testu uporablja sev vrste *B. afzelii*, ki izraža beljakovine OspA, OspB in OspC in je predstavnik najpogostejših povzročiteljev lajmske borelioze v Sloveniji, test sodi med presejalne teste (Ružić-Sabljić in sod., 2002a).

3.2.2.1 Princip testa

Na objektnejem stekelcu je nanešena ustrezna koncentracija *B. afzelii*, kar predstavlja antigen. Prisotnost specifičnih protiteles razredov IgM, IgG in IgA proti borelijskim antigenom v bolnikovem serumu, povzroči nastanek imunskih kompleksov antigen-protitelo. V naslednjem koraku, po odstranitvi nevezanih protiteles (s spiranjem) dodamo konjugat oz. anti-humana sekundarna protitelesa IgM, IgG ali IgA, ki so označena s fluorescein izotiocianatom (FITC). Po inkubaciji nevezan konjugat odstranimo s spiranjem. V vsako luknjico objektneja stekelca damo imerzijsko olje, prekrijemo s krovnim steklom in z mikroskopiranjem pod UV svetlobo opazujemo nastali sekundarni imunski kompleks. Rezultate testa izrazimo s titrom protiteles, ki je najvišja razredčina seruma bolnika, ki da pozitivno reakcijo.

3.2.2.2 Izvedba IFT testa brez absorpcije

- V mikrotitrsko ploščico nakapljamo pufer za redčenje v sledečih količinah: v prvo votlino nakapljamo 150 μ L, v naslednje pa petkrat po 50 μ L.
- V prvo votlino nakapljamo 10 μ L seruma, premešamo s pipeto in prenašamo naprej po 50 μ L. Razredčitve seruma so naslednje: 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512.
- Za določanje protiteles IgM in IgG uporabimo razredčine serumov od 1:64 do 1:1024, za določanje protiteles IgA od 1:16 do 1:256. Na prvo ploščico nanese pozitivno in negativno kontrolo, nato pa za posamezne vzorce po vrstnem redu. V primeru močne fluorescence posameznega seruma, le-tega redčimo dalje in razredčine ustrezno nanese na ploščice.
- Ploščice z nanešenimi vzorci seruma inkubiramo 30 minut v vlažni komori pri

37 °C in nato spiramo 3-krat po 5 minut v PBS pufru ter ploščice posušimo na sobni temperaturi.

- nanesemo konjugat (antihumana IgM, IgG ali IgA, predhodno pripravljeni)
- inkubiramo 30 minut pri 37 °C v vlažni komori nato spiramo 3-krat po 5 minut v PBS pufru in posušimo na sobni temperaturi.
- nanesemo kapljico imerzijskega olja, pokrijemo s krovnim stekelcem in mikroskopiramo pod UV svetlobo s fluorescentnim mikroskopom.
- Protitelesa IgM in IgG smo ovrednotili po protokolu laboratorija: 256 in več pozitiven, 128 mejni titer, manjše od 128 negativno
- Protitelesa IgA smo iskali v razponu razredčin od 1:16 do 1: 256. Na podlagi testiranj in podatkov iz literature smo želeli opredeliti mejni titer (Baig in sod., 1991; Axford in sod., 1993; Ružić-Sabljić, 1995; Axford in sod., 1999).

3.2.3 Posredni imunofluorescenčni test z absorpcijo

IFT z absorpcijo smo uporabili z namenom odstranitve protiteles IgG in v izogib lažno negativnim rezultatom. Test vsebuje enak antigen kot IFT test brez absorpcije.

3.2.3.1 Princip testa

Princip in izvedba testa sta zelo podobna kot princip in izvedba testa brez absorpcije, le da tu v prvem koraku uporabimo absorbent, ki ga dodamo serumu bolnika. Absorbent je snov, ki povzroči precipitacijo protiteles IgG. Na ta način odstranimo protitelesa IgG iz vzorca, ki bi lahko motila vezavo specifičnih protiteles IgM in/ali IgA za antigen ter tako dala lažno negativne rezultate.

3.2.3.2 Izvedba IFT testa z absorpcijo

- V ependorfski razredčimo 10 μ L seruma z 5 μ L Absorbenta RF (dobimo redčitev 1:16) in pustimo čez noč pri + 4 °C v hladilniku.
- dobro premešamo in nato centrifugiramo pri 10 000 obr/min vsaj 15 minut, v nadaljevanju uporabimo le supernatant
- supernatant (razredčen je že 1:16) nakapljamo v prvo votlinico mikrotitrne ploščice; od druge votlinice naprej pa nakapljamo 5x po 50 μ L pufru za redčenje vzorca.
- odvzamemo 50 μ L vzorca (iz prve votlinice) in ga prenesemo v drugo votlinico, premešamo ter redčimo naprej do konca vrstice (razredčitve vzorca so: 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512).
- na ploščice z antigenom nanesemo po 10 μ L vzorca; na prvo ploščico še pozitivno in negativno kontrolo, nato pa razredčine od 1:16 do 1:256 za posamezne vzorce po vrstnem redu. V primeru močne fluorescence posameznega vzorca le-tega redčimo dalje in razredčine nanesemo na ploščico.
- inkubiramo 30 minut v vlažni komori pri 37 °C, nato spiramo 3-krat po 5 minut v pufru za spiranje ter ploščice posušimo na sobni temperaturi.
- nanesemo IgM ali IgA konjugata (predhodno pripravljena), inkubiramo 30 minut pri 37 °C v vlažni komori, nato ploščice ponovno spiramo 3-krat po 5 minut v pufru za spiranje in posušimo.
- nanesemo kapljico imerzijskega olja, pokrijemo s krovnim stekelcem in mikroskopiramo pod UV svetlobo s fluorescentnim mikroskopom.
- Protitelesa IgM ovrednotimo: pozitiven titer 64 ali več, mejni titer 32, negativni titri 16 ali manj
- Vrednotenje protitelesa IgA: vzeli smo razpon razredčin od 1:16 do 1:256. Na podlagi testiranj in podatkov iz literature smo želeli opredeliti mejni titer (Baig in sod., 1991; Axford in sod., 1993; Ružić-Sabljić, 1995; Axford in sod., 1999).

3.3 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Dobljene rezultate testiranih serumov z IFT z in brez absorpcije smo statistično obdelali z McNemar-jevim testom z namenom, da ugotovimo, ali se testa razlikujeta. McNemar-jev test se uporablja za testiranje dveh opisnih spremenljivk pri ponavljajočih se poskusih. Za izračun smo mejne vrednosti uvrstili med pozitivne. Ugotavljali smo statistično vrednost p . Če je $p < 0,05$ predstavlja statistično značilno razliko, če pa je $p > 0,05$ pa statistično značilne razlike med testoma ni. Za izračun smo uporabili prosto dostopen program na spletu: (QuickCals, 2016).

4 REZULTATI

Naključno izbranih 300 vzorcev seruma bolnikov s sumom ali že potrjeno diagnozo lajmske borelioze smo testirali za specifična protitelesa IgM, IgG ter specifična protitelesa IgA s posrednim IFT brez absorpcije. IFT test z absorpcijo smo uporabili le za vzorce, ki so imeli prisotna protitelesa IgG.

4.1 PREGLED REZULTATOV

Protitelesa IgM, IgG in IgA smo dokazovali z IFT brez absorpcije pri vseh 300 bolnikih. Zaradi možnega vpliva protiteles IgG na višino titra protiteles IgM in IgA (tekmovalje za antigen), smo pri vseh IFT brez absorpcije IgG pozitivnih bolnikov izvedli še absorpcijski IFT ter prikazali rezultate prisotnosti / odsotnosti protiteles IgA glede na kombinacije prisotnosti / odsotnosti protiteles IgM in IgG.

4.1.1 Določanje protiteles IgM, IgG in IgA

Pri vseh vzorcih smo dokazovali protitelesa IgM, IgG in IgA s testom IFT brez absorpcije, pri 120 vzorcih, ki so imeli pozitivne titre IgG z ITF brez absorpcije smo izvedli še IFT z absorpcijo.

4.1.1.1 IFT test brez absorpcije

Testirali smo 300 vzorcev. Protitelesa IgG v titru 256 ali več smo dokazali pri 120 (40 %) vzorcih, protitelesa IgM v titru 256 ali več pa pri 50 (16,7 %) vzorcih. Protitelesa IgA v razponu titrov od <16 do > 256 smo prikazali skupaj z rezultati IgM in IgG v preglednici 4.

Preglednica 4 : Rezultati IFT testa brez absorpcije za prisotnost protiteles IgM, IgG in IgA. Sivo so označeni mejni, rumeno pa pozitivni titri za protitelesa IgM in IgG.

TITRI	PROTITELESA		
	IgM	IgG	IgA
<16	235 (78,3 %)	166 (55,3 %)	103 (34,3 %)
16	0 (0 %)	0 (0 %)	85 (28,3 %)
32	0 (0 %)	0 (0 %)	45 (15 %)
64	6 (2 %)	12 (4 %)	8 (2,7 %)
128	9 (3 %)	2 (0,67 %)	28 (9,3 %)
256	40 (13,3 %)	67 (22,3 %)	14 (4,7 %)
>256	10 (3,3 %)	53 (17,7 %)	12 (4 %)
SKUPAJ	300 (100 %)	300 (100 %)	300 (100 %)

4.1.1.2 IFT test z absorpcijo

S testom IFT z absorpcijo smo testirali 120 vzorcev, ki so s testom IFT brez absorpcije imeli titer 256 ali več (Preglednica 4). Protitelesa IgM v titru 64 ali več smo dokazali pri 15 (12,5 %) vzorcih. Protitelesa IgA pa smo dokazali v razponu titrov od <16 do 256. Rezultate kaže preglednica 5.

Preglednica 5: Rezultati IFT testa z absorpcijo za prisotnost protiteles IgM in IgA pri vzorcih, ki so imeli prisotna protitelesa IgG z IFT brez absorpcije. Sivo so označeni mejni, rumeno pa pozitivni titri za protitelesa IgM.

TITRI	PROTITELESA	
	IgM	IgA
<16	99 (82,5 %)	70 (58,3 %)
16	2 (1,7 %)	12 (10 %)
32	4 (3,3 %)	21 (17,5 %)
64	1 (0,8 %)	11 (9,2 %)
128	8 (6,7 %)	4 (3,3 %)
256	3 (2,5 %)	2 (1,7 %)
>256	3 (2,5 %)	0 (0 %)
SKUPAJ	120 (100 %)	120 (120 %)

4.1.1.3 Opredelitev mejnega titra za protitelesa IgA s testom IFT z in brez absorpcije

Glede na vrednotenje protiteles IgM in IgG tako v testu IFT z kakor tudi brez absorpcije ter podatkov iz literature o fizioloških in bioloških lastnosti protiteles IgA (Axford in sod., 1993; Muthana in sod., 2015) smo se odločili, da v testu IFT brez absorpcije opredelimo za mejno vrednost titer 32, za pozitivne vrednosti titre 64 in višje in za negativne vrednosti titre 16 in manjše. V testu IFT z absorpcijo smo opredelili za pozitivne vrednosti titre 16 in višje, dokler smo titre manjše od 16 obravnavali kot negativne.

Glede na opredeljene kriterije za protitelesa IgA smo opredelili 62/300 (20,7 %) vzorcev kot IgA pozitivne s testom IFT brez absorpcije (Preglednica 4). Pri analizi 120 vzorcev, ki smo jim pred testiranjem odstranili protitelesa IgG (test IFT z absorpcijo), smo dobili 50 (41,7 %) IgA pozitivnih vzorcev (Preglednica 5).

4.1.1.4 Primerjava pozitivnih IgM in IgA vzorcev pred in po absorpcijo protiteles IgG

Posebej smo analizirali skupino 120 vzorcev, ki so imeli protitelesa IgG v titru 256 ali več z IFT brez absorpcije. Zanimalo nas je, ali je prišlo do spremembe rezultata za protitelesa IgM in IgA. Rezultate smo prikazali v Preglednici 6.

Preglednica 6: Prikaz rezultatov za protitelesa IgM in IgA pred in po odstranitvi protiteles IgG (IgG pozitivni vzorci). Sivo so označeni mejni titri za protitelesa IgM in IgA, rumeno pa pozitivni titri za IgM in IgA.

	ABSORPCIJA PROTITELES IgG (št. vzorcev 120)			
	IgM		IgA	
TITRI PROTITELES	IFT brez absorpcije	IFT z absorpcijo	IFT brez absorpcije	IFT z absorpcijo
<16	90	99 (82,5 %)	72	70 (58,3 %)
16		2 (1,7 %)		12 (10 %)
32		4 (3,3 %)	18	21 (17,5 %)
64		1 (0,8 %)	30	11 (9,2 %)
128	0	8 (6,7 %)		4 (3,3 %)
256	30	3 (2,5 %)		2 (1,7 %)
>256		3 (2,5 %)		0 (0 %)
SKUPAJ	120	120	120	120

Ob absorpciji protiteles IgG pri 120 IgG pozitivnih vzorcih (pozitivnih s testom IFT brez absorpcije) smo ugotovili, da je prišlo do razlike v številu pozitivnih vzorcev tako za protitelesa IgM kot IgA, in sicer opredelili smo 30 (25 %) IgM pozitivnih vzorcev brez in 15 (12,5 %) z absorpcijo ($p=0,0026$) ter 30 (25 %) IgA pozitivnih vzorcev brez in 50 (41,7 %) z absorpcijo ($p=0,4795$).

Za izračun statistično značilne razlike med testoma IFT brez in z absorpcijo, ločeno za protitelesa IgM in IgA, smo ustvarili spodnje preglednice od 7 do 10.

Za protitelesa IgM smo dokazali statistično značilno razliko med testoma IFT brez absorpcije in IFT z absorpcijo ($p=0,0026$) (Preglednica 7 in 8).

Za protitelesa IgA pa nismo dokazali ststistično značilne razlike med testoma IFT brez absorpcije in IFT z absorpcijo ($p=0,4795$) (Preglednici 9 in 10).

Preglednica 7: Primerjava rezultatov IFT brez absorpcije in IFT z absorpcijo pri določanju protiteles IgM v serumu 120 IgG pozitivnih bolnikov

IgM				
IFT IFT abs	Pozitivno ≥ 256	Mejno 128	Negativno ≤64	SKUPAJ
Pozitivno ≥64	15	0	0	15
Mejno 32	4	0	0	4
Negativno ≤16	11	0	90	101
SKUPAJ	30	0	90	120

Preglednica 8: Kontigenčna tabela rezultatov testiranj IFT brez absorpcije in IFT z absorpcijo pri določanju protiteles IgM v serumu bolnikov za izvedbo McNemerjevega testa

IFT IFT abs	Pozitiven	Negativen	SKUPAJ
Pozitiven	19	0	19
Negativen	11	90	101
SKUPAJ	30	90	120

Preglednica 9: Primerjava rezultatov IFT brez absorpcije in IFT z absorpcijo pri določanju protiteles IgA v serumu 120 IgG pozitivnih bolnikov

IgA				
IFT IFT abs	Pozitivno ≥ 64	Mejno 32	Negativno ≤ 16	SKUPAJ
Pozitivno ≥ 16	30	18	2	50
Mejno	0	0	0	0
Negativno < 16	0	0	70	70
SKUPAJ	30	18	72	120

Preglednica 10: Kontingenčna tabela rezultatov testiranj IFT brez absorpcije in IFT z absorpcijo pri določanju protiteles IgA v serumu bolnikov za izvedbo McNemerjevega testa

IFT IFT abs	Pozitiven	Negativen	SKUPAJ
Pozitiven	48	2	50
Negativen	0	70	70
SKUPAJ	48	72	120

4.1.2 Določanje protiteles IgA v serumu bolnikov glede na sočasno prisotnost ali odsotnost IgM in / ali IgG

Prisotnost protiteles IgA smo želeli primerjati glede na prisotnost ali odsotnost drugih protiteles v serumu bolnika. V ta namen smo vrednotili štiri kategorije imunskega odziva: vzorce, ki so imeli prisotna samo protitelesa IgG (90 vzorcev), vzorce, ki so imeli prisotna protitelesa tako IgM kot IgG (30 vzorcev), vzorce, ki so imeli prisotna samo protitelesa IgM (30 vzorcev) in vzorce, ki niso imeli protiteles ne IgM in ne IgG (150 vzorcev).

4.1.2.1 Določanje protiteles IgA pri bolnikih IgG pozitivni / IgM negativni

S testom IFT brez absorpcije smo določili 90 vzorcev (bolnikov), ki so imeli prisotna protitelesa IgG in odsotna protitelesa IgM. Pri določanju protiteles IgA med temi bolniki, nismo dobili nobenega pozitivnega rezultata (titer ≥ 64) za protitelesa IgA z IFT testom brez absorpcije. Rezultate kaže preglednica 11.

Preglednica 11: Rezultati IFT testa brez absorpcije za prisotnost protiteles IgA ob sočasni prisotnosti protiteles IgG; bolniki niso imeli protiteles IgM.

PROTITELESA IgG	PROTITELESA IgA			SKUPAJ
	Negativni ≤ 16	Mejni 32	Pozitivni ≥ 64	
Pozitivni Titer ≥ 256	72 (80 %)	18 (20 %)	0 (0 %)	90 (100 %)

Vsem 90-im vzorcem smo po absorpciji ponovno določali protitelesa IgM in IgA. Pri vseh 90 vzorcih so bili titri protiteles IgM negativni, titri protiteles IgA pa so postali pozitivni (titer ≥ 16) pri 29 vzorcih. Za protitelesa IgA smo dokazali statistično značilno razliko med testom IFT brez absorpcije in IFT z absorpcijo ($p=0,0026$). Rezultate kaže preglednica 12.

Preglednica 12: Rezultati IFT testa z absorpcijo za prisotnost protiteles IgA in IgM po odstranitvi protiteles IgG.

PROTITELESA IgM	PROTITELESA IgA				SKUPAJ
	Negativni	Pozitivni (skupaj 29)			
	Titer < 16	Titer 16	Titer 32	Titer 64	
Negativni Titer ≤16	61 (67,78 %)	12 (13,33 %)	13 (14,44 %)	4 (4,44 %)	90 (100 %)

4.1.2.2 Določanje protiteles IgA pri bolnikih IgG pozitivni / IgM pozitivni

Med bolniki jih je bilo 30, ki so s testom IFT brez absorpcije imeli pozitivna protitelesa IgM in IgG. Pri določanju protiteles IgA med temi bolniki smo dobili pozitivne rezultate za protitelesa IgA pri vseh 30 vzorcih. Rezultate kaže preglednica 13.

Preglednica 13: Rezultati IFT testa brez absorpcije za prisotnost protiteles IgA pri bolnikih, ki so imeli sočasno prisotnost protiteles IgM in IgG.

PROTITELESA IgM in IgG	PROTITELESA IgA			SKUPAJ
	Negativni ≤16	Mejni 32	Pozitivni ≥64	
Pozitivni Titer ≥ 256	0 (0 %)	0 (0 %)	30 (100 %)	30 (100 %)

Pri vseh bolnikih, ki so s testom IFT brez absorpcije imeli pozitivna protitelesa IgM in IgG sočasno, smo naredili IFT z absorpcijo in tako odstranili protitelesa IgG. Vsem vzorcem smo po absorpciji ponovno določali titer protiteles IgM in IgA. Dobili smo 15 serumov s protitelesi IgM in 21 serumov s protitelesi IgA. Tako za protitelesa IgM kot tudi za protitelesa IgA smo dokazali statistično značilno razliko med testom IFT brez absorpcije in IFT z absorpcijo. Za protitelesa IgM ($p=0,0026$), za protitelesa IgA pa ($p=0,0077$) Rezultate kaže preglednica 14.

Preglednica 14: Rezultati IFT testa z absorpcijo za prisotnost protiteles IgA in IgM po odstranitvi protiteles IgG v skupini 30 bolnikov, ki so s testom IFT brez absorpcije imeli sočasno pozitivna protitelesa IgM in IgG.

Protitelesa IgM	Protitelesa IgA		SKUPAJ
	Negativni <16	Pozitivni >16	
Negativni <16	6 (20 %)	5 (16,7 %)	11 (36,67 %)
Mejni 32	1 (3,33 %)	3 (10 %)	4 (13,33 %)
Pozitivni ≥64	2 (6,67 %)	13 (43,33 %)	15 (50 %)
SKUPAJ	9 (30 %)	21 (70 %)	30 (100 %)

4.1.2.3 Določanje protiteles IgA pri bolnikih IgG negativni / IgM pozitivni

Sočasno prisotnosti protiteles IgM in odsotnost protiteles IgG smo s testom IFT brez absorpcije ugotovili pri 30 bolnikih. Pri določanju prisotnosti protiteles IgA v tej skupini bolnikov, smo dobili pozitivne rezultate za protitelsa IgA v vseh 30 vzorcih. Rezultate kaže preglednica 15.

Preglednica 15: Rezultati IFT testa brez absorpcije za prisotnost protiteles IgA ob sočasni prisotnosti protiteles IgM in odsotnosti protiteles IgG

PROTITELESA IgM	PROTITELESA IgA			SKUPAJ
	Negativni ≤16	Mejni 32	Pozitivni ≥64	
Pozitivni Titer ≥ 256	0 (0 %)	0 (0 %)	30 (100 %)	30 (100 %)

4.1.2.4 Določanje protiteles IgA pri bolnikih IgG negativni / IgM negativni

Odsotnost protiteles tako IgM kot IgG smo s testom IFT brez absorpcije ugotovili pri 150 bolnikih. Pri določanju prisotnosti protiteles IgA v tej skupini bolnikov, smo dobili pozitivne rezultate v 2 ter mejne rezultate v 26 vzorcih. Ostali so bili negativni. Rezultate kaže preglednica 16.

Preglednica 16: Rezultati IFT testa brez absorpcije za prisotnost protiteles IgA v odsotnosti protiteles IgM in IgG

PROTITELESA IgM + IgG	PROTITELESA IgA			SKUPAJ
	Negativni ≤16	Mejni 32	Pozitivni ≥64	
Negativni Titer ≤ 64	120 (81,3 %)	26 (17,33 %)	2 (1,33 %)	150 (100 %)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Lajmsko boreliozo povzroča bakterija iz kompleksa *B. burgdorferi* sensu lato, ki zajema vsaj 5 vrst, in sicer *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. spielmanii* in *B. bavariensis* (Richter in sod., 2004; Richter in sod., 2006; Margos in sod., 2009). Bolezen se kaže s pestro klinično sliko, ki je deloma odvisna tudi od vrste povzročitelja. Tako *B. afzelii* največkrat povzroča okvare kože, *B. garinii* okvare živčevja in *B. burgdorferi* sensu stricto okvare sklepov. Vsem je skupno to, da povzročijo nastanek kožne spremembe erythema migrans, ki se pojavi nekaj dni do nekaj tednov na mestu vboda klopa in zadostuje za klinično potrditev diagnoze (Wang in sod., 1999; Steere, 2001). V primeru neznačilnih kožnih sprememb in simptomov bolezni pa je potrebna mikrobiološka potrditev okužbe. Kljub temu, da je osamitev borelij iz kliničnih vzorcev najbolj zanesljiva metoda dokazovanja borelijske okužbe in velja za »zlati standard« je dolgotrajna, slabo občutljiva in vezana za referenčne laboratorije. Zato se za vsakodnevno rutinsko potrjevanje borelijske okužbe uporabljajo različni serološki testi, ki temeljijo na dokazu specifičnih protiteles, ki nastanejo kot imunski odgovor bolnika na borelijske antigene (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005).

Podatki iz literature kažejo, da je razlog počasnemu imunskemu odzivu majhno število borelij v vzorcih in s tem šibko spodbujanje nastanka imunskega odziva saj se s kroničnostjo okužbe povečuje delež serološko pozitivnih bolnikov (Wilske in sod., 1993; Aguero-Rosenfeld in sod., 2005). Ob enem, velik pomen predstavlja tudi antigenska heterogenost borelij, ki vpliva na izbor seva za antigen (Wilske in sod., 1988; Brisson in sod., 2012). Pri serološki diagnostiki moramo upoštevati tudi to, da imajo serološki testi različno specifičnost in občutljivost, ter da niso standardizirani (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005; Ružić-Sabljić in sod., 2006). Zaradi tega rezultate testov vedno vrednotimo s klinično sliko posameznega preiskovanega bolnika.

Namen naše naloge je bil ugotoviti, ali med okužbo z borelijami nastajajo specifična protitelesa IgA poleg specifičnih protiteles IgM in IgG, ali so ta sočasno prisotna s protitelesi IgM in/ali IgG, ter pripraviti in ovrednotiti posredni IFT za določanje

specifičnih protiteles IgA. V raziskavo smo vključili 300 serumov bolnikov s sumom na lajmsko boreliozo ali že potrjeno okužbo, določali smo jim protitelesa IgM, IgG in IgA. Po podatkih iz literature je znano, da pri lajmski boreliozi prisotnost specifičnih protiteles IgM in IgG spremlja klinično sliko, podatki za protitelesa IgA pa so zelo skopi.

Za testiranje smo uporabili posredni IFT, kateremu je bilo za določanje specifičnih protiteles IgA potrebno določiti mejni titer. Pozitiven titer za rutinsko določanje specifičnih protiteles IgM in IgG je visok, in sicer 256. To daje testu večjo specifičnost. Za določanje mejnega titra, je potrebno opraviti več poizkusov (predvsem na zdravi populaciji) in na podlagi rezultatov določiti mejno vrednost. Pri tem moramo upoštevati geografsko področje preiskovanih bolnikov, saj moramo na endemičnih področjih (Slovenija je endemično območje) izločiti zdravo populacijo, ki ima prisotna specifična protitelesa, ker se je že v preteklosti srečala z borelijsko okužbo (Ružić-Sabljić in sod., 1993; Ružić-Sabljić, 1995).

Na rezultate seroloških testov lahko vpliva tudi antigenska heterogenost borelij (Wilske in sod., 1988; Brisson in sod., 2012). Kot antigen se zato pri nas v Sloveniji uporablja celotna borelijska celica vrste *B. afzelii*, ki jo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani izdelujejo sami. Študije iz preteklosti so na področju Slovenije iz preiskovanih vzorcev ugotovile *B. afzelii* kot najpogostejše izolirano borelijsko vrsto (v 82 %), sledi ji *B. garinii* (v 17 %) in le izjemoma *B. burgdorferi sensu stricto* (1 %) (Ružić-Sabljić in sod., 2002a).

Pri serološki diagnostiki je pomembno tudi, kateri tip protiteles dokazujemo; biološke in fiziološke lastnosti protiteles se namreč razlikujejo. Protitelesa tekmujejo za isti antigen, množična prisotnost enega razreda lahko onemogoči dostop do antigena drugim razredom protiteles (Muthana in sod., 2015). V vzorcih naših bolnikov smo določali tri razrede protiteles, IgM, IgG in IgA, antigen za vezavo (*B. afzelii*) je bil enak. Zanimalo nas je, v kakšnem deležu bomo opredelili posamezen razred protiteles pri bolnikih z borelijsko okužbo ali sumom na njo. Iz Preglednice 4 je razvidno, da smo najpogostejše določili protitelesa IgG (120/300, 40,4 %), sledijo protitelesa IgA (62/300, 20,7 %) in IgM (50/300, 16,7 %). V naslednjem koraku smo bolj natančno obdelali 12 IgG pozitivnih vzorcev.

S postopkom absorpcije seruma pred izvedbo IFT smo odstranili protitelesa IgG, ki lahko motijo vezavo protiteles IgM in/ali IgA, saj lahko zasedejo vezavna mesta na antigenih in s tem dajo lažno negativne rezultate za IgM in IgA razrede protiteles. Po drugi strani, pri bolnikih z avtoimunskimi obolenji bi lahko dobili lažno pozitivne rezultate, največkrat takrat, ko je v preiskovanem serumu RF, ki je avtoprotitelo (največkrat razreda IgM) in se veže na Fc del lastnega IgG (Ružič-Sabljić in sod., 1995; Muthana in sod., 2015), kar še dodatno povdarja potrebo po absorpciji seruma pred testiranjem. Rezultati testiranja za protitelesa IgM in IgA po absorpcijskem postopku so prikazani v preglednicah 5 in 6. Iz preglednice 6 je razvidno, da smo po odstanjevanju protiteles IgG dobili manj IgM pozitivnih vzorcev (30/120 pred in 15/120 po absorpciji, $p = 0,0026$...) in več IgA pozitivnih vzorcev (30/120 pred in 50/120 po absorpciji, $p = 0,4795$...). To pomeni, da smo pri testiranju z IFT brez absorpcije dobili za protitelesa IgM lažno pozitivne rezultate, za protitelesa IgA pa lažno negativne rezultate. Rezultate absorpcijskih testov razlagamo s tem, da smo pred tem testiranjem, s postopkom absorpcije odstranili tudi RF (IgM), ki se je vezal na Fc del lastnega IgG in s tem odstranili protitelesa IgM, ki so bila odgovorna za lažno pozitivne IgM bolnike. Sočasno z odstranitvijo protiteles IgM in IgG so se s tem sprostila vezavna mesta, kar je omogočilo protitelesom IgA vezavo nanje. Protitelesa IgA prav tako kot protitelesa IgG zelo težko konkurirajo za ista vezavna mesta napram protitelesom IgM. To razlagajo s tem, da imajo protitelesa IgM več vezavnih mest in s tem boljšo avidnost. Ugotovili pa so tudi, da so pri vezavi na antigene hitrejša od IgG in IgA (Muthana in sod., 2015). Preglednice 5-10 nam prikazujejo rezultate testiranja obeh testov in primerjavo med njima. Za protitelesa IgM nam kažejo, da so razlike med testoma statistično značilne, saj je p vrednost zelo majhna. V primeru testiranja za protitelesa IgA, pa nismo ugotovili statistično značilne razlike.

Za protitelesa IgA moramo upoštevati njihovo zgradbo, da se izločajo predvsem lokalno, in da so v krvi bolnika prisotna v nižjih koncentracijah. Tako smo za prvi pozitivni titer določili vrednost 64, pri IFT z absorpcijo pa 16. Vrednost pri IFT z absorpcijo za protitelesa IgM in IgG je 64. Pri testiranju vzorcev smo pričakovali prisotnost protiteles IgA in dobili naslednje rezultate.

Rezultati testov dokazujejo, da se protitelesa IgA pojavljajo sočasno s protitelesi IgM. To smo dokazali z vsemi pozitivnimi vzorci serumov v skupini s prisotnimi IgM (Preglednica 15) kot tudi v skupini s prisotnimi IgM in IgG protitelesi (Preglednica 13). To pomeni, da se ob borelijski okužbi protitelesa IgA začnejo tvoriti že v začetni fazi okužbe skupaj s protitelesi IgM in se tvorijo tudi kasneje v poteku okužbe, ko se šele začnejo tvoriti protitelesa IgG. Sočasni prisotnosti protiteles IgA in IgM je lahko vzrok IL-5, ki ga izdelujejo aktivirane celice T. IL-5 deluje na razmnožujoče se celice B tako, da povzroči preklap izotipa med diferencirajo v plazmatke, ki nato izdelujejo protitelesa IgM in IgA, ne pa IgG. Znano je tudi, da v odsotnosti protiteles IgA del njihovih funkcij prevzamejo protitelesa IgM (Vozelj, 2001). S časom trajanja okužbe se pojavijo tudi protitelesa IgG, ki so dolgoživeča in jih je mogoče dokazati v serumu še leta po okužbi, lahko pa so tudi znak kronične okužbe. S testom IFT brez absorpcije smo v vzorcih s prisotnimi protitelesi IgM in IgG, dokazali protitelesa IgA pri vseh 30 vzorcih (Preglednica 13), v vzorcih s prisotnimi protitelesi samo razreda IgG pa pri nobenem vzorcu (Preglednica 11). To pomeni, da se tekom razvoja okužbe sočasno s protitelesi IgM tvorijo tudi protitelesa IgA, ko pa okužba preide v pozni stadij (prisotnost IgG), pa se protitelesa IgA ne tvorijo več, saj jih v serumu ne moremo dokazati. Da bi dokazali, če te trditve držijo in da nismo dobili lažno negativnih rezultatov, smo za omenjene IgG pozitivne vzorce naredili še IFT z absorpcijo. Med vzorci s prisotnimi protitelesi IgM in IgG smo po absorpciji dobili manjše število pozitivnih rezultatov tako za protitelesa IgA kot tudi za protitelesa IgM, in sicer se je število pozitivnih IgA zmanjšalo iz 30 (100 %) na 21 (70 %) ($p=0,0077$), IgM pa iz 30 (100 %) na 15 (50 %) ($p=0,0026$) kot je razvidno iz Preglednice 14. Glede na te rezultate lahko predvidevamo, da s postopkom absorpcije odstranimo tudi del protiteles IgA in IgM. Nasprotno temu, med vzorci s prisotnimi protitelesi samo razreda IgG pa se je delež IgA pozitivnih vzorcev povečal, in sicer iz 0/90 na 29/90 (32,2 %), kar je statistično značilna razlika ($p=0,0026$) (Preglednici 11 in 12), dokler so vsi vzorci po absorpciji ostali IgM negativni (Preglednica 12). S tem smo dokazali, da smo pri IFT brez absorpcije za te vzorce dobili lažno negativne rezultate, in da prisotnost protiteles IgG moti dokazovanje protiteles IgA.

Pred začetkom raziskovalne naloge smo si postavili nekatera vprašanja in nanje poskušali poiskati odgovore. Na vprašanje, ali prihaja do produkcije specifičnih protiteles in kdaj se

ta tekom okužbe pojavljajo, smo prišli do ugotovitev, da se specifična protitelesa IgA tvorijo že pri primarnem imunskem odzivu, saj se pojavljajo sočasno s protitelesi IgM (Preglednica 15). Pojavljajo se tudi v nadaljnjem razvoju borelioze, saj smo jih dokazali ob sočasni prisotnosti protiteles IgM in IgG (Preglednici 13 in 14). Ko razvoj bolezni prehaja v pozno fazo, pa se je delež IgA pozitivnih vzorcev zmanjšal. V literaturi (Steer in sod., 1990; Hansen in sod., 1991; Roberg in sod., 1995) so navedeni podatki, da se protitelesa IgA v večji koncentraciji pojavljajo sočasno s protitelesi IgG v intratekalnem prostoru pri nevroboreliози. Navedeni so tudi podatki o prizadetosti ledvic pri psih in človeku zaradi avtoimunskih dogajanj vezanih na IgA (Kaiser, 1995; Axford in sod., 1999; Gerber, 2010). Vse to kaže na pomembno vlogo protiteles IgA v imunskem odzivu. Naslednje vprašanje je, ali je zanesljivost posrednega IFT testa ustrezna za dokaz specifičnih protiteles IgA in standardiziranje testa. Dokazali smo, da je test IFT ustrezen za določanje specifičnih protiteles IgA, saj smo dobili primerljive rezultate s protitelesi IgM in/ali IgG. Glede na dobljene rezultate bi priporočili standardizacijo testa, saj bi na ta način test pridobil diagnostično vrednost, s katerim bi dobili boljši vpogled v potek in razvoj bolezni. Pri testu IFT je potrebno upoštevati tudi to, da ni avtomatiziran, ampak rezultate vrednoti ustrezno usposobljeno laboratorijsko osebje, zaradi katerih lahko prihaja do nehotenih napak.

Pri diagnosticiranju lajmske borelioze moramo upoštevati, da se ta kaže s pestro in raznoliko klinično sliko, ki je deloma odvisna od vrste povzročitelja in preiskovanega območja. Upoštevati moramo tudi specifičnost in občutljivost testov, zato rezultate vedno vrednotimo v povezavi s klinično sliko.

5.2 SKLEPI

Z našim raziskovalnim delom smo dokazali, da:

- se pri preiskovanih bolnikih s sumom na lajmsko boreliozo ali že potrjeno diagnozo, razvije specifičen imunski odziv.

- se tvorijo specifična protitelesa IgG, IgM in IgA. Najpogosteje smo določili protitelesa IgG (120/300, 40,4 %), sledijo protitelesa IgA (62/300, 20,7 %) in IgM (50/300, 16,7 %).
- se protitelesa IgA pojavljajo sočasno s protitelesi IgM, saj smo jih dokazali v skupini bolnikov IgG pozitivni / IgM pozitivni in v skupini IgG negativni / IgM pozitivni.
- se protitelesa IgA v serumu pojavljajo v manjših količinah, saj smo kot prvi pozitivni titer s posrednim IFT brez absorpcije opredelili 64, pri posrednem IFT z absorpcijo pa 16.
- je IFT test dovolj občutljiv za določanje specifičnih protiteles IgA, saj smo protitelesa IgA dokazali v skupini bolnikov IgG pozitivni / IgM pozitivni in v skupini IgG negativni / IgM pozitivni.
- protitelesa IgG vplivajo na določanje protiteles IgA, tako da dobimo lažno negativne rezultate v skupini bolnikov IgG pozitivni / IgM negativni, saj smo z IFT brez absorpcije dobili negativne rezultate pri vseh 90 vzorcih, po testiranju z IFT z absorpcijo pa smo dobili pozitivne rezultate za 29 (32,2 %) vzorcev od 90.
- z absorpcijo izgubimo del protiteles IgA, saj smo v skupini bolnikov IgG pozitivni / IgM pozitivni po testiranju vzorcev z IFT z absorpcijo dobili 21 (70 %) IgA pozitivnih vzorcev od 30.
- je razlika med posrednim IFT brez absorpcije in IFT z absorpcijo za protitelesa IgM statistično značilna, za protitelesa IgA med posrednim IFT brez absorpcije in IFT z absorpcijo pa ne

6 POVZETEK

Lajmsko boreliozo pri človeku povzročajo bakterije iz kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato, ki jo prenašajo klopi. V Sloveniji je bolezen endemična. Pri ljudeh se kaže s pestro klinično sliko, ki prizadene številne organske sisteme, kot so koža, živčevje, sklepi, srce in oči. Najbolj značilen znak lajmske borelioze, ki zadostuje za potrditev diagnoze je kožna sprememba erythema migrans. V primeru neznačilnih kliničnih znakov in simptomov, pa je potrebna mikrobiološka diagnostika.

V vsakdanji praksi se za rutinsko potrditev diagnoze največ uporabljajo lahko dostopni serološki testi z različno občutljivostjo in specifičnostjo, ki temeljijo na dokazu specifičnih protiteles. Ta nastanejo kot imunski odgovor na borelije po vdoru v telo. Posebnost imunskega odziva na borelije je, da se prične z zakasnitvijo, je šibek ali celo odsoten. Najprej se začnejo tvoriti protitelesa IgM, več tednov do mesecev po okužbi pa še protitelesa IgG.

V raziskavo smo vključili 300 vzorcev serumov, ki smo jih testirali za specifična protitelesa IgM, IgG in IgA. Za testiranje vseh vzorcev smo uporabili posredni IFT brez absorpcije, za vse IgG IFT pozitivne brez absorpcije, pa še posredni IFT z absorpcijo, zaradi možnega vpliva protiteles IgG na višino titra protiteles IgM in IgA.

Namen naloge je bil dokazati, da se kot odgovor na antigen tvorijo protitelesa IgA, poleg protiteles IgM in IgG, prikazati odnose med razredi protiteles ter pripraviti in ovrednotiti posredni IFT test.

Dokazali smo, da se protitelesa IgA tvorijo sočasno s protitelesi IgM (bolniki IgM pozitivni / IgG negativni in bolniki IgG pozitivni / IgM pozitivni), ko pa protitelesa IgM izginijo iz krvnega obtoka, tudi protiteles IgA ne zaznamo več. Potrdili smo tudi, da protitelesa IgG vplivajo na določanje protiteles IgA, tako da dobimo lažno negativne rezultate. V skupini bolnikov IgG pozitivni / IgM negativni smo z IFT brez absorpcije dobili negativne rezultate pri vseh 90 vzorcih, po testiranju z IFT z absorpcijo pa smo dobili pozitivne rezultate za 29 (32,2 %) vzorcev od 90. S testiranjem serumov bolnikov

IgM pozitivni / IgG pozitivni z IFT z absorpcijo smo potrdili, da z absorpcijo odstranimo tudi del protiteles IgA, saj se je število pozitivnih vzorcev iz 30 (100 %) zmanjšalo na 21 (70 %). Dokazali smo statistično značilno razliko med posrednim IFT brez absorpcije in posrednim IFT z absorpcijo za protitelesa IgM ($p=0,0026$), medtem ko statistično značilne razlike med posrednim IFT brez absorpcije in posrednim IFT z absorpcijo za protitelesa IgA nismo dokazali ($p=0,4795$).

Glede na dobljene rezultate smo zaključili, da je IFT test primeren za diagnosticiranje protiteles IgA, vendar bi bilo potrebno standardizirati postopek. Z določanjem protiteles IgA bi tako dobili bolj poglobljen vpogled v imunski odziv bolnikov in povezavo med pojavom specifičnih protiteles in izraženo klinično sliko. Protitelesa IgA so pomembna tudi z vidika avtoimunskih bolezni, saj so jih dokazali v nekaterih primerih bolezni ledvic.

7 VIRI

- Adeolu M., Guota R. S. 2014. A phylogenomic and molecular marker based proposal for the division of the genus *Borrelia* into two genera: the emended genus *Borrelia* containing only the members of the relapsing fever *Borrelia*, and the genus *Borrelia* gen. nov. containing the members of the Lyme disease *Borrelia* (*Borrelia burgdorferi* sensu lato complex). *Antonie van Leeuwenhoek*, 105: 1049-1072.
- Aguero-Rosenfeld M.E., Wang G., Schwartz I., Wormser G.P. 2005. Diagnosis of Lyme boreliosis. *Journal Clinical Microbiology Reviews*, 18, 3: 484-509.
- Anderson J.F. 1989. Epizootiology of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* tick vectors and reservoir hosts. *Review of Infectious Diseases*, 11, 6: S1451-S1459.
- Arnež M., Pletersli-Rigler D., Ahčan J., Ružič-Sabljic E., Strle F. 2000. Prizadetost osrednjega živčevja pri otrocih z multiplimi erythema migrans. V: Lymška borelioz, 2000. 2. slovensko posvetovanje o lymški borelioz, zbornik predavanj, Ljubljana, 17. in 18. november 2000. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za lymško boreliozo: 85-90.
- Asbrink E., Hovmark A. 1991. Comments on the course and classification of Lyme borreliosis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 77: 41-43.
- Axford J.S., Rees D.H.E., Mageed R.A., Wordsworth P., Alavi A., Steere A.C. 1999. Increased IgA rheumatoid factor and VH1 associated cross reactive idiotype expression in patients with Lyme arthritis and neuroborreliosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 58: 757-761.
- Axford J.S., Watts R.A., Long A.A., D A Isenberg D.A., Steere A.C. 1993. Expression of public idiotypes in patients with Lyme arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 52: 199-205.

- Baig S., Olsson T., Hansen K., Link H. 1991. Anti-*Borrelia burgdorferi* antibody responsover the course of Lyme Neuroborreliosis. *Infection and Imunity*, 59, 3: 1050-1056.
- Barbour A.G. 1988. Plasmid analysis of *Borrelia burgdorfer*, the Lyme disease agent. *Journal of Clinical Microbiology*, 26: 475-478.
- Barbour A.G., Hayes S.F. 1986. Biology of *Borrelia* species. *Microbial Reviews*, 50, 4: 381-400.
- Belfaiza J., Postic D., Bellenger E., Baranton G., Saint Girons I. 1993. Genomic fingerprinting of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 11: 2873-2877.
- Bestor A., Stewart P. E., Jewett M. W., Sarkar A., Tilly K., Rosa P. A. 2010. Use of the Cre-lox recombination system to investigate the lp54 gene requirement in the infectious cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity*, 78, 6: 2397-2407.
- Biškup U. G., Strle F., Ružić-Sabljić E. 2011. Loss of plasmids of *Borrelia burgdorferi* sensu lato during prolonged *in vitro* cultivation. *Plasmid*, 66, 1:1-6.
- Bolz D. D., Weis J. J. 2004. Molecular Mimicry to *Borrelia burgdorferi*: pathway to autoimmunity?. *Autoimmunity*, 37, 5: 387-392.
- Brandt E.M., Riley S.B., Radolf D.J., Norgard V.M. 1990. Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins. *Infection and Immunity*, 58: 983-991.
- Brisson D., Drecktrah D., Eggers C.H., Samuels D.S. 2012. Genetics of *Borrelia burgdorferi*. *Annual Review of Genetics*, 46: 515-536.

- Brisson D., Zhou W., Jutras B. L., Casjens S., Stevenson B. 2013. Distribution of cp32 prophages among Lyme Disease-causing spirochetes and natural diversity of their lipoprotein-encoding *erp* loci. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 13: 4115–4128.
- Burgdorfer W., Babour A.G., Hayes S.F., Benach J.L., Grundwald E., Davis J.P. 1982. Lyme disease: a tick borne spirochetosis? *Science*, 216: 1317-1319.
- Burgdorfer W. 1995. Lyme disease (borreliosis): a global perspective. *Alpe Adria Microbiology Journal*, 4: 227-233.
- Casjens S., Delange M., Ley III H.L., Rosa P., Huang W.M. 1995. Linear chromosomes of Lyme disease agent spirochetes: genetic diversity and conservation of gene order. *Journal of Bacteriology*, 177, 10: 2769-2780.
- Casjens S. R., Mongodin E. F., Qiu W. G., Luft B. J., Schutzer S. E., Gilcrease E. B., Huang W. M., Vujadinovic M., Aron J. K., Vargas L. C., Freeman S., Radune D., Weidman J. F., Dimitrov G. I., Khouri H. M., Sosa J.E., Halpin R.A., Dunn J. J., Fraser C.M. 2012. Genome stability of Lyme disease spirochetes: comparative genomics of *Borrelia burgdorferi* plasmids. *PLoS ONE*, 7, 3: e33280, doi: 10.1371/journal.pone.0033280: 24 str.
- Chan K., Casjens S., Parveen N. 2012. Detection of established virulence genes and plasmids to differentiate *Borrelia burgdorferi* strains. *Infection and Immunity*, 80, 4: 1519–1529.
- Charon N. W., Goldstein S. F., Marko M., Hsieh C., Gebhardt L. L., Motaleb M. A., Wolgemuth C. W., Limberger R. J., Rowe N. 2008. The flat-ribbon configuration of the periplasmic flagella of *Borrelia burgdorferi* and its relationship to motility and morphology. *Journal of Bacteriology*, 191, 2: 600-607.

- Charon N. W., Cockburn A., Li C., Liu J., Miller K. A., Miller M. R., Motaleb M., Wolgemuth C. W. 2012. The unique paradigm of spirochete motility and chemotaxis. *Annual Review of Microbiology*, 66: 349-370.
- Cimperman J. 2000. Prizadetost živčevja pri lymski boreliozi. V: *Lymska borelioza 2000. 2. slovensko posvetovanje o lymski boreliozi*, Ljubljana, 17. in 18. november 2000. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za lymsko boreliozi, Žirovnica, Medium: 71-75.
- Collares-Pereira M., Couceiro S., Franca I., Kurtenbach K., Schäfer SM., Vitorino L., Gonçalves L., Baptista S., Vieira LM., Cunha C. 2004. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3: 1316-1318.
- Comstedt P., Jakobsson T., Bergström S. 2011. Global ecology and epidemiology of *Borrelia garinii* spirochetes. *Infection Ecology and Epidemiology*, 1: doi: 10.3402/iee.v1i0.95459545: 10 str.
- Diza E., Papa A., Vezyri E., Tsounis S., Milonas I., Antoniadis A. 2004. *Borrelia valaisiana* in cerebrospinal fluid. *Emerging Infectious Diseases*, 10, 9: 1692-1693.
- Direct IFT. 2016. Direct immunofluorescence StudyBlue, La Crosse, Wincosin Midwestern University: L 17: 1 str.
<https://www.studyblue.com/notes/n/pathogenic-bacteriology-test-one/deck/2296661> (maj 2016)
- Dressler F., Whalen J.A., Reinhardt B.N., Steere A.C. 1993. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *Journal of Infectious Diseases*, 167: 392-400.
- Earnhart C. G., LeBlanc D. L., Alix K. E., Desrosiers D. C., Radolf J. D., Marconi T.D. 2010. Identification of residues within ligand binding domain 1 (LBD1) of the *B. burgdorferi* OspC protein required for function in the mammalian environment. *Molecular Microbiology*, 76, 2: 393-408.

- 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., Stanek G. (eds.), Dublin, Centre for Agriculture and Bioscience International: 91-115.
- Ercolini A. M., Miller S. D. 2008. The role of infections in autoimmune disease. Clinical and Experimental Immunology, 155: 1-15.
- Feng J., Shi W., Zhang S., Zhang Y. 2015. Persister mechanisms in *Borrelia burgdorferi*: implications for improved intervention. Emerging Microbes and Infections, 4, 8: e51, doi: 10.1038/emi.2015.51: 3 str.
- Ferluga D., Vizjak A. 2005. Histopatologija in patogeneza glomerulonefritisa. Medicinski razgledi, 44: 265-290.
- Fraenkel C.J., Garpmo U., Berglund J. 2002. Determination of novel *Borrelia* genospecies in Swedish *Ixodes ricinus* ticks. Journal of Clinical Microbiology, 40, 9: 3308-3312.
- Funa A., Šavs T., Škrbat S. 1996. Kako dolgo imajo bolniki z erythema migrans prisesane klope. Medicinski razgledi, 35: 297-307.
- Gassner F. 2016. Ticks. Wageningen, Wageningen University and Research: 1 str
<http://www.wur.nl/nl/Dossiers/dossier/Teken-in-Nederland.htm> (januar 2016)
- Gathany J. 2007. Lyme Disease, Atlanta, Centers for Disease Control and Prevention: 1 str.
<http://phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=9875> (april 2016)
- Gerber B. 2010. Investigations of the relationship between infections with *Borrelia burgdorferi* and glomerulonephritis in Bernese Mountain dogs. Zurich, University of Zurich: 67 str.
<http://dx.doi.org/10.5167/uzh-40511>: (maj 2016)

- Girschick H. J., Morbach H., Tappe D. 2009. Treatment of Lyme borreliosis. *Arthritis Research & Therapy*, 11, 258: 1-10.
- Goldstein S.F., Buttler K.F., Charon N.W. 1996. Structural analysis of the *Leptospiraceae* and *Borrelia burgdorferi* by high-voltage electron microscopy. *Journal of Bacteriology*, 178, 22: 6539-6545.
- Gray J.S. 2002. Biology of *Ixodes* species ticks in relation to tick-borne zoonoses. *Wien Klinische Wochenschrift*, 114, 13-14: 473-478.
- Habicht G.S., Beck G., Benach J.L. 1987. Lyme disease. *Scientific American* 257, 1: 60-83.
- Halpern MD., Jain S., Jewett MV. 2013. Enhanced detection of host response antibodies to *Borrelia burgdorferi* using immuno-PCR. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20, 3: 350-357.
- Hansen K., Lebech A.M. 1991. Lyme neuroborreliosis: a new sensitive diagnostic assay for intrathecal synthesis of *Borrelia burgdorferi*-specific immunoglobulin G, A, and M. *Annals of Neurology*, 30: 197-205.
- Hansen K., Crone C., Kristoferitsch W. 2013. Lyme neuroborreliosis. *Handbook of Clinical Neurology*, 115: 559-575.
- Hinnebusch J., Barbour A.G. 1992. Linear – and – circular plasmid copy numbers in *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Bacteriology*, 174, 16: 5251-5257.
- Hubálek Z. 2009. Epidemiology of Lyme Borreliosis. *Current Problems in Dermatology*, 37, doi: 10.1159/000213069: 20 str.

- Hutton T.A., Goldstein R.E., Njaa B.L., Atwater D.Z., Chang Y.F., Simpson K.W. 2008. Search for *Borrelia burgdorferi* in kidney of dogs with suspected "Lyme nephritis". Journal of Veterinary Internal Medicine, 22, 4: 860-865.
- Ihan A. 2002. Pridobljena (specifična) imunost. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Marija G., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 17 str.
- Indirect immunofluorescence assay. 2016. Lyme Disease test accuracy. A practical guide to Lyme Disease. New York, LymeDiseaseGuide: 1 str.
<http://lymediseaseguide.org/test-accuracy-ifa> (maj 2016).
- Iyer R., Kalu O., Purser J., Norris S., Stevenson B., Schwartz I. 2003. Linear and circular plasmid content in *Borrelia burgdorferi* clinical isolates. Infection and Immunity, 71, 7: 3699-3706.
- Jansweijer J. A., Oort R. J. 2015. Tricky ticks: the importance of Lyme carditis recognition. Netherlands Heart Journal, 23: 531-532.
- Kaiser R. 1995. Intrathecal immune response in patients with neuroborreliosis: specificity of antibodies for neuronal proteins. Journal of the Neurological Sciences, 242: 319-325.
- Kenedy M. R., Lenhart T. R., Akins D. R. 2012. The role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins. Immunology and Medical Microbiology, 66, 1: 1-19.
- Kerr M. A. 1990. The structure and function of human IgA. Biochemical Journal. 271: 285-296.
- Kindt T.I., Osborne B.A., Goldsby R.A. 2007. Kuby immunology. 6th ed. New York, Freeman W.H.: 148-151.

- Kung F., Anguita J., Pall U. 2013. *Borrelia burgdorferi* and tick proteins supporting pathogen persistence in the vector. *Future Microbiology*, 8, 1: 41–56.
- Lencáková D., Fingerle V., Stefancíková A., Schulte-Spechtel U., Petko B., Schréter I., Wilske B. 2008. Evaluation of recombinant line immunoblot for detection Lyme disease in Slovakia: comparison of two other immunoassays. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 8, 3: 381-390.
- Li X., Neelakanta G., Liu X., Beck D.S., Kantor F.S., Fish D., Anderson J.F., Fikrig E. 2007. Role of outer surface protein D in the *Borrelia burgdorferi* life cycle. *Infection and Immunity*, 75, 9: 4237–4244.
- Littman MP. 2013. Lyme nephritis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 23, 2: 163-173.
- Lotrič-Furlan S. 2006. Prizadetost sklepov in mišic pri lymski boreliozii. V: *Lymska borelioza 2006*. Strle F. (ur.). Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični Center, Društvo za boj proti lymski boreliozii, Združenje za infektologijo Žirovnica, Medium : 87-94.
- Malovrh T., Paternoster A. 1998. Merjenje celičnega imunskega odziva pri okužbi z *Borrelia burgdorferi*. *Medicinski razgledi*, 37: 5-15.
- Margos G., Vollmer A.S., Cornet M., Garnier M., Fingerle V., Wilske B., Bormane A., Vitorino L., Collares-Pereira M., Drancourt M., Kurtenbach K. 2009. A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Applied And Environmental Microbiology*, 75, 16: 5410-5416.
- Montgomery R.R., Lusitani D., Boisfleury Chevance A., Malawista S.E. 2002. Human phagocytic cells in the early innate immune response to *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Infectious Disease*, 185:1773-1779.

- Murray T.S., Shapiro E.D. 2010. Lyme disease. Clinics in Laboratory Medicine, 30, 1: 311-328.
- Muthana S.M., Xia L., Campbell C.T., Zhang Y., Gildersleeve J.C. 2015. Competition between serum IgG, IgM, and IgA anti-glycan antibodies. PLoSONE, 10, 3: e0119298, doi:10.1371/journal.pone.0119298: 16 str.
- Müllegger R.R. 2004. Dermatological manifestations of Lyme borreliosis. European Journal of Dermatology, 14: 296-309.
- Nadelman R.B., Wormser G.P. 1998. Lyme borreliosis. Lancet, 352: 557-565.
- Nelson J. 2016. Pictures of ticks, Suffolk County, Stony Brook School of Medicine: 1 str.
<https://medicine.stonybrookmedicine.edu/pathology/tickpics> (januar 2016)
- NIJZ. 2014. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2014. Ljubljana, Nacionalni inštitut za javno zdravje: 3 str.
http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/publikacije-datoteke/epidemiolosko_spremljanje_nalezljivih_bolezni_2014_2.pdf (maj 2016)
- Nigrovic L. E., Thompson K. M. 2007. The Lyme vaccine: a cautionary tale. Epidemiology and Infection, 135, 1: 1-8.
- Odell I. D., Cook D. 2013. Immunofluorescence techniques. Journal of Investigative Dermatology, 133, 1: 1-4.
- Okuženost klopov. 2016. Delež okuženosti z *Borrelia burgdorferi*, Trieste, Università degli studi di Trieste: 1 str.
sv.unit.it/spirochete/ris_prev_bor_sl.htm (julij 2016)

- Otani M., Nakata J., Kihara M., Leroy V., Moll S., Wada Y., Izui S. 2012. O-glycosylated IgA rheumatoid factor induces IgA deposits and glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23, 3: 438-446.
- Petersen K., Pedersen H.C. 2013. Immunofluorescence. V: *Immunohistochemical staining methods* 6th ed. Taylor C. R., Rudbeck L. (eds.). Glostrup, Dako: 87-91.
- Picken R.N., Cheng Y., Strle F. 1996. Molecular characterisation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from Slovenia revealing significant differences between tick and human isolates. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*, 15: 313-323.
- Pleterski Rigler D. 2006. Preprečevanje lymske borelioze. V: *Lymska borelioza 2006*. Strle F. (ur.). Ljubljana, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center, Društvo za boj proti lymski boreliozi, Združenje za infektologijo, Žirovnica, Medium: 183-189.
- Preac-Mursič V., Wilske B., Schierz G. 1986. European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks: culture conditions and antibiotics susceptibility. *Zentralblatt für bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene*, 236, 1-2: 112-118.
- QuickCalcs. 2016. Scientific software. La Jolla, GraphPadSoftware <http://graphpad.com/quickcalcs/McNemar1.cfm> : 1 str. (julij 2016)
- Radolf J. D., Caimano M. J., Stevenson B., Hu L. T. 2012. Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaete. *Nature Reviews, Microbiology*, 10, 2: 87-99.
- Rahman S., Shering M., Ogden N. H., Lindsay R., Badawi A. 2016. Toll-like receptor cascade and gene polymorphism in host-pathogen interaction in Lyme disease. *Journal of Inflammation Research*, 9: 91-102.

- Reed K.D. 2002. Laboratory testing for Lyme disease: possibilities and practicalities. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 2: 319-325.
- Richter D., Schlee B. D., Algöwer R., Matuschka F.R. 2004. Relationships of a novel Lyme Disease spirochete, *Borrelia spielmanii* sp. nov., with its hosts in central Europe. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 11: 6414-6419.
- Richter D., Postic D., Sertour N., Lively I., Matuschka FR., Baranton G. 2006. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and conformation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, Pt 4: 873-881.
- Rizzoli A., Hauffe H., Carpi G., Vourc H. G., Neteler M., Rosa R. 2011. Lyme borreliosis in Europe. *Eurosurveillance*, 16, 27: 1-8.
- Rizzoli A., Silaghi C., Obiegala A., Rudolf I., Hubálek Z., Földvári G., Plantard O., Vayssier-Taussat M., Bonnet S., Špitalská E., Kazimírová M. 2014. *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. *Frontiers in Public Health*, 2, 251: 1-26.
- Roberg M., Fosberg P., Tegnell A., Ekerfeldt K. 1995. Intrathecal production of specific IgA antibodies in CNS infections. *Journal of Neurology*, 242, 6: 390-397.
- Roitt I., Brostoff J., Male D. 2001. *Immunology*. 6th ed. Edinburgh, Mosby: 65-85.
- Rosa P.A., Tilly K., Stewart P.E. 2005. The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. *Nature Reviews, Microbiology*, 3, 2: 129-143.

- Ružić-Sabljić E. 2006. Mikrobiološka diagnostika borelijskih okužb. V: Lymška borelioza 2006. Strle F. (ur.). Ljubljana, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center, Društvo za boj proti lymški boreliozi, Združenje za infektologijo, Žirovnica, Medium: 139-145.
- Ružić-Sabljić E., Strle F., Cimperman J. 1993. The *Ixodes ricinus* tick as a vector of *Borrelia burgdorferi* in Slovenia. European Journal of Epidemiology, 9, 4: 396-400.
- Ružić-Sabljić E., Strle F., Cimperman J., Kotnik V. 1995. Vrednotenje imunofluorescenčnega testa za dokazovanje lymške borelioze. Zdravstveni vestnik, 64, 63-67.
- Ružić-Sabljić E., Strle F., Cimperman J., Maraspin V., Lotrič-Furlan S., Pleterski-Rigler D. 2000. Characterisation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from patients with skin manifestations of Lyme borreliosis residing in Slovenia. Journal of Medical Microbiology, 49: 47-53.
- Ružić-Sabljić E., Maraspin V., Lotrič-Furlan S., Jurca T., Logar M., Pikelj-Pečnik A., Strle F. 2002a. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from human material in Slovenia. Wiener Klinische Wochenschrift, 114, 13-14: 544-550.
- Ružić-Sabljić E., Maraspin V., Cimperman J., Lotrič-Furlan S., Strle F. 2002b. Evaluation of immunofluorescence test (IFT) and immuno (westrn) blot test in patients with erythema migrans. Wiener klinische Wochenschrift 114: 473-478.
- Salo J., Loimaranta V., Lahdenne P., Viljanen M. K., Hytönen J. 2011. Decorin binding by DbpA and B of *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Journal of Infectious Diseases, 204, 1: 65–73
- Scheffold N., Herkommer B., Kandolf R., May A. E. 2015. Lyme Carditis- diagnosis, treatment and prognosis. Deutsches Ärzteblatt International, 112, 12: 202-208.

- Schüler W., Bunikis I., Weber-Lehman J., Comstedt P., Kutschan-Bunikis S., Stanek G., Huber J., Meinke A., Bergström S., Lundberg U. 2015. Complete genome sequence of *Borrelia afzelii* K78 and comparative genome analysis. PloS ONE, 10, 3: e0120548. doi: 10.1371/journal.pone.0120548: 27 str.
- Schwan T.G., Burgdorfer W., Garon C.F. 1988. Changes in infectivity and plasmid profile of Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, as a result of *in vitro* cultivation. Infection and Immunity, 56: 1831-1836.
- Scott J. D., Anderson J. F., Durden L. A., Smith M. L., Manord J. M., Clark K. L. 2016. Prevalence of the Lyme Disease Spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in Blacklegged Ticks, *Ixodes scapularis* at Hamilton-Wentworth, Ontario. International Journal of Medical Sciences, 13, 5: 316–324.
- Seshu J., Skare T.J. 2000. The many faces of *Borrelia burgdorferi*. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2, 4: 463-472.
- Singh S. K., Girschick H. J. 2004. Lyme boreliosis: from infection to autoimmunity. Clinical Microbiology and Infection, 10, 7: 598-614.
- Skogman B.H., Hellberg S., Ekerfelt C., Jenmalm M.C., Forsberg P., Ludvigsson J., Bergström S., Ernerudh J. 2012. Adaptive and innate immune responsiveness to *Borrelia burgdorferi* sensulato in exposed asymptomatic children and children with previous clinical Lyme Borreliosis. Clinical and Developmental Immunology, 294587, doi: 1155/2012/294587: 11 str.
- Skotarczak B. 2015. Why is there still no human vaccine against Lyme Borreliosis? Folia Biologica (Krakow), 63, 3: 159-165.

Sočan M. 2006. Epidemiološke značilnosti prijavljenih primerov lymske borelioze v Sloveniji. V: Lymska borelioza 2006. Strle F. (ur.). Ljubljana, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center, Društvo za boj proti lymski boreliozi, Združenje za infektologijo, Žirovnica, Medium: 31-38.

Stanek G. Outer surface proteins of *Borrelia* and candidates for Lyme borreliosis vaccines. V: Lymska borelioza 2000. 2. slovensko posvetovanje o lymski boreliozi, Ljubljana, 17. in 18. november 2000. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za lymsko boreliozo, Žirovnica, Medium: 219-225.

Stanek G., Strle F. 2003. Lyme borreliosis. Lancet, 362, 9396: 1639-1647.

Stanek G., Fingerle V., Hunfeld K.-P., Jaulhac B., Kaiser R., Krause A., Kristoferitsch W., O'Connell S., Ornstein K., Strle F., Gray J. 2011. Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. Clinical Microbiology and Infection; 17, 1: 69-79.

Stanek G., Wormser G.P., Gray J., Strle F. 2012. Lyme borreliosis. Lancet; 379, 9814: 461-473.

Steere A.C. 2001. Lyme disease. New England Journal of Medicine, 345, 2: 115-25.

Steere A.C., Beradi V.P., Weeks K.E., Logigian E.L., Ackermann R. 1990. Evaluation of the intrathecal antibody response to *Borrelia burgdorferi* as a diagnostic test for Lyme Neuroborreliosis. Journal of Infectious Diseases, 161: 1203-1209.

Steere A.C., Coburn J., Glickstein L. 2004. The emergence of Lyme disease. Journal of Clinical Investigation; 113, 8: 1093-1101.

Stewart P.E., Bestor A., Cullen J.N., Rosa P.A. 2008. A tightly regulated surface protein of *Borrelia burgdorferi* is not essential to the mouse-tick infectious cycle. Infection and Immunity, 76, 5: 1970-1978.

Strle F. 1998. Lymfska borelijoza. Farmaceutski vestnik, 49: 49-56.

Strle F. 1999. Lyme borreliosis in Slovenia. Zentralblatt für Bakteriologie 289, 5-7: 643-652.

Strle F. 2006a. Patogeneza lymfske borelioze V: Lymfska borelijoza 2006. Strle F. (ur.) Ljubljana, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center, Društvo za boj proti lymfski borelijozi, Združenje za infektologijo, Žirovnica, Medium: 39-44.

Strle F. 2006b. Pristop k zdravljenju lymfske borelioze z antibiotiki. V: Lymfska borelijoza 2006. Strle F. (ur.) Ljubljana, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center, Društvo za boj proti lymfski borelijozi, Združenje za infektologijo, Žirovnica, Medium: 163-169.

Strle F., Stanek G. 2009. Clinical manifestations and diagnosis of Lyme borreliosis. Current Problems in Dermatology, 37: 51-110.

Strle F., Lusa L., Ružič-Sabljic E., Maraspin V., Lotrič Furlan S., Cimperman J., Ogrinc K., Rojko T., Videčnik Zorman J., Stupica D. 2013. Clinical characteristics associated with *Borrelia burgdorferi* sensu lato skin culture results in patients with Erythema Migrans. PLoS One, 8, 12: e82132. doi: 10.1371/journal.pone.0082132: 9 str.

Structure of immunoglobulin. 2016. Immunosome, Brentwood, Encapsula NanoSciences: 1 str.
www.immunosome.com/antibodies/structure-of-antibody/ (april 2016)

Sultan S. Z., Manne A., Stewart P. E., Bestor A., Rosa P.A., Charon N. W., Motaleba M. A. 2013. Motility is crucial for the infectious life cycle of *Borrelia burgdorferi*. Infection and Immunity, 81, 6: 2012–2021.

Szczepanski A., Benach J. L. 1991. Lyme borreliosis: host responses to *Borrelia burgdorferi*. Microbiological Reviews, 55, 1: 21-34.

Sze C. W., Morado D. R., Jun L., Charon N. W., Hongbin X., Chunhao L. 2011. Carbon storage regulator A (CsrA_{Bb}) is a repressor of *Borrelia burgdorferi* flagellin protein FlaB. *Molecular Microbiology*, 82, 4: 851–864.

The structure of antibody molecules. 2016. Host defenses, Oregon, Portland Community College: 1 str.

http://spot.pcc.edu/~jvolpe/b/bi234/lec/8_9defenses/defensesII/fig16.7_Ab_Class.jpg

(april 2016)

Toledo A., Crowley J. T., Coleman J. L., LaRocca T. J., Chiantia S., London E., Benacha J. L. 2014. Selective association of outer surface lipoproteins with the lipid rafts of *Borrelia Burgdorferi*. *mBio*, 5, 2: e00899-14. doi: 10.1128/mBio.00899-14: 9 str.

Tuháčková J., Běláková J., Křupka M., Nepeřený J., Chumela J., Weigl E., Vrzal V. 2005. Testing of the BIOCAN® b inj. ad us. vet. vaccine and development of the new recombinant vaccine against canine borreliosis. *Biomedical Papers*, 149, 2: 297–302.

Ullmann A. J., Russell T. M., Dolan M.C., Williams M., Hojgaard A., Weiner Z., Johnson B. J. B. 2015. Evaluation of *Borrelia burgdorferi* BbHtrA protease as a vaccine candidate for Lyme Borreliosis in mice. *PLoS ONE*, 10, 6: e0128868. doi:10.1371/journal.pone.0128868: 8 str.

Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. 1. izdaja. Ljubljana, DZS: 47-104.

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, 4: 633-653.

Wang G., Schwartz I. 2011. Genus II. *Borrelia Swellengrebel* 1907, 582AL. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 3. 2nd ed. Brenner D.J., Krieg N.R., Garrity G.M., Staley J.T. (eds.). Springer, New York: 484–498.

- Wasiluk A., Zalewska S.B., Waszkiewicz N., Kępka A., Szajda D.S., Wojewódzka Żeleźniakowicz M., Ładny J.R., Pancewicz S., Zwierz Z.W., Zwierz K. 2011. Lyme disease: etiology, pathogenesis, clinical courses, diagnostic and treatment. *Progress in Health Sciences*, 1, 2: 179-186.
- Wilske B. 2003. Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. *Vector-borne Zoonotic Diseases*, 3, 4: 215-227.
- Wilske B., Preac-Mursic V., Schierz G., Kühbeck R., Barbour A.G., Kramer M. 1988. Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 539: 126-143.
- Wilske B., Preac-Mursic V. 1993. Microbiological diagnosis of Lyme borreliosis. V: *Aspect of Lyme borreliosis*. Weber K., Burgdorfer W., Shierz G. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 268-299.
- Wilske B., Preac-Mursic V., Jauris S., Hofmann A., Pradel I., Soutschek E., Schwab E., Will G., Wanner G. 1993. Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity*, 61, 5: 2128-2191.
- Wilske B., Fingerle V., Schulte-Spechtel U. 2007. Microbiological and serological diagnosis for Lyme borreliosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 49, 1: 13-21.
- Wilske B., Schriefer M.E. 2003. *Borrelia*. V: *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. Murray P. R., Baron E.J., Jorgsen J.H., Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover K.C. (eds.). Washington, American Society for Microbiology: 937-954.
- Woof J. M., Kerr M. A. 2004. IgA function – variations on a theme. *Immunology*, 113, 2: 175–177.

- Xu Y., Johnson R.C. 1995. Analysis and comparison of plasmid profiles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 10: 2679-2685.
- Zhao X., Zhang K., Boquoi T., Hu B., Motaleb M.A., Miller K. A., James M.E., Charon N.W., Manson M.D., Norris S.J., Li C., Liu J. 2013. Cryoelectron tomography reveals the sequential assembly of bacterial flagella in *Borrelia burgdorferi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 35: 14390-14395.
- Zhao X., Norris S. J., Liu J. 2014. Molecular architecture of the bacterial flagellar motor in cells. *Biochemistry*, 53: 4323–4333.
- Zöller L., Cremer J., Faulde M. 1993. Western blot as a tool in the diagnosis of Lyme borreliosis. *Electrophoresis*, 14, 9: 937-944.
- Zore A., Trilar T., Ružić-Sabljić E., Avšič-Županc T. 2006. Okuženost klopov in gostiteljev z bakterijami *Borrelia burgdorferi* sensu lato v Sloveniji V: Lymška boreliosa 2006. Strle F. (ur.). *Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center Ljubljana: Društvo za boj proti lymški boreliosi: Združenje za infektologijo, Žirovnica, Medium: 23-30.*

ZAHVALA

Najprej bi se iskreno zahvalila mentorici prof. dr. Evi Ružić-Sabljić, ker ste z mano delili izkušnje in znanje, me vodili in mi pomagali pri nastajanju diplomske naloge. Hvala za neizmerno potrpežljivost in prijaznost.

Zahvaljujem se tudi osebju Laboratorija za dokazovanje borelioz in leptospiroze, posebno pa Brigiti Repše za nasvete in pomoč pri praktični izvedbi diplomske naloge.

Zahvaljujem se recenzentki doc. dr. Darji Keše za hiter in strokoven pregled diplome.

Hvala staršem, da sta mi omogočila študij in vedno želela le najboljše.

Hvala mojim trem fantom, možu Bojanu in sinovoma Juriju in Teodorju, ker ste vztrajali z mano.

Hvala Tini, Mojci in cimri Mateji za vso pomoč.