

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO
VISOKOŠOLSKI PROGRAM LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Mateja VORŠIČ

DOLOČANJE PROTITELES IgA PRI LYMSKI BORELIOZI

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski študij

MEASURING OF SPECIFIC IgA ANTIBODIES IN LYME BORRELIOSIS

GRADUATION THESIS

Higher education

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroze na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Miroslava Petrovca in somentorstvom prof. dr. Eve Ružić-Sabljić.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Miroslavu Petrovcu in somentorici prof. dr. Evi Ružić-Sabljić, da sta mi omogočila izvajanje diplomskega dela iz področja, ki me zanima. Zahvaljujem se jima tudi za vso strokovno pomoč in nasvete.

Hvala tudi osebju Laboratorija za diagnostiko borelioz in leptospiroze za pomoč pri laboratorijskem delu.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Miroslava Petrovca in somentorstvom prof. dr. Eve Ružić-Sabljić.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:	prof. dr. Jana Lukač Bajalo; spec. med . boikem. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Oddelek za biokemijo
Mentor:	doc. dr. Miroslav Petrovec, dr. med. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo
Somentorica:	prof. dr. Eva Ružić-Sabljić, dr. med. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo
Članica:	doc.dr. Anamarija Zega, mag. farm. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko kemijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mateja Voršič

POVZETEK

Lymsko boreliozo povzroča bakterija *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sensu lato – v širokem pomenu). Borelije so dolge spiralne bakterije, za človeka pa so patogene vsaj tri: *B. burgdorferi* sensu stricto (sensu stricto - v ozkem pomenu), *B. afzelii* ter *B. garinii*. V Sloveniji je to najpogostejša bolezen, ki jo prenašajo klopi.

V Evropi in Sloveniji bolezen povzročajo vse tri prej omenjene vrste, v Severni Ameriki pa le *B. burgdorferi* sensu stricto.

Dokazovanje povzročitelja bolezni je večkrat težavno in ne povsem zanesljivo. Poleg kulture in verižne reakcije s polimerazo (ang. polymerase chain reaction; PCR) se najpogosteje uporabljajo serološki testi. Vzrok težavnosti dokazovanja lymske borelioze izvira iz antigenske heterogenosti borelij, iz različne geografske porazdeljenosti posamezne vrste in sevov znotraj vrste in različnih imunskih odzivov na okužbo, zaradi katerih je standardizacija seroloških testov zelo težka. Poleg tega so možne navzkrižne reakcije protiteles z antigeni drugih sorodnih povzročiteljev. Za dokazovanje protiteles usmerjenih proti antigenom borelij je na tržišču veliko najrazličnejših testov, katerih rezultati se lahko precej razlikujejo. V naši študiji smo uporabili imunofluorescenčni test, s katerim smo želeli dokazati protitelesa IgA proti borelijskim antigenom v serumu bolnikov. Uporabili smo imunofluorescenčni test z in brez absorpcije kar pomeni, da smo pri testu z absorpcijo predhodno odstranili revmatoidni faktor (RF) v serumu in s tem zmanjšali vpliv navzkrižnih reakcij med določanjem protiteles IgM in IgA. Ugotavljali smo pojavnost protiteles IgA skupaj s protitelesi IgG in IgM pri bolnikih, ki jim je bil že predhodno določen titer protiteles IgG in IgM. Zajeli smo 260 vzorcev in ugotovili, da se protitelesa IgA pojavljajo v serumu bolnikov. Sočasno se pojavljajo predvsem s protitelesi IgM, kar kaže na produkcijo protiteles IgA v zgodnjem obdobju bolezni. Dokazali smo, da se med postopkom absorpcije RF »izgubi« nekaj protiteles IgA, saj smo pri tem postopku dokazali manj pozitivnih bolnikov. Zaradi povezanosti protiteles IgA s protitelesi IgG in IgM tudi pri kasnejših zapletih bolezni (nevroborelioza), je smiselno standardizirati tudi določanje protiteles IgA tako v serumu bolnikov kot v intratekalni tekočini.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	I
KAZALO VEBINE	II
KAZALO PREGLEDNIC	IV
KAZALO SLIK	V
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VII

1.	PREGLED OBJAV	1
1.1.	TAKSONOMSKA UVRSTITEV, STRUKTURA, OBLIKA, GOJITEV TER METABOLIZEM <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	1
1. 2.	BORELIJSKI ANTIGENI	2
1. 3.	GENOM BORELIJ	4
1. 4.	IZOLACIJA IN KULTIVACIJA <i>B. burgdorferi</i> sensu lato IN VITRO	4
1. 5.	REZEVOAR IN PRENAŠALCI BORELIJ	5
1. 6.	PATOGENEZA <i>B. burgdorferi</i> sensu lato TER KLINIČNA SLIKA LYMSKE BORELIOZE	7
1. 6. 1.	Epidemiologija lymske borelioze	11
1. 6. 2.	Zgradba in funkcija protiteles, ki sodelujejo pri imunskem odzivu na <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	11
1. 6. 2. a)	Strukturne značilnosti in biološke lastnosti IgG, IgM in IgA protiteles:	13
1. 6. 3.	Imunski odgovor	16
1. 7.	DIAGNOSTIKA BORELIJSKIH OKUŽB	17
1. 7. 1.	Osamitev borelij	18
1. 7. 2.	Dokaz molekule DNA	18
1. 7. 3.	Dokazovanje specifičnih protiteles	18
1. 7. 3. a)	Imunofluorescenčni test – IFT	19
1. 8.	ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE	21
2.	NAMEN NALOGE	22

3.	MATERIALI IN METODE	23
3. 1.	BOLNIKI IN VZORCI	23
3. 2.	METODE TESTIRANJA	23
3. 2. 1.	Posredni imunofluorescenčni test brez absorpcije	23
3. 2. 1. a)	Princip testa	24
3. 2. 1. b)	Material in oprema za IFT brez absorpcije	24
3. 2. 1. c)	Priprava antigena za IFT z in brez absorpcije	25
3. 2. 1. d)	Izvedba IFT testa brez absorpcije	26
3. 2. 1. e)	Vrednotenje IFT brez absorpcije	28
3. 2. 2.	Posredni imunofluorescenčni test z absorpcijo	29
3. 2. 2. a)	Princip testa	29
3. 2. 2. b)	Material in oprema za IFT z absorpcijo	29
3. 2. 2. c)	Izvedba IFT testa z absorpcijo	29
3. 2. 2. d)	Vrednotebje IFT testa z absorpcijo	31
4.	REZULTATI	32
4. 1.	REZULTATI POSAMEZNIH TESTOV	32
4. 1. 1.	Skupina bolnikov brez protiteles proti borelijam (1. skupina)	32
4. 1. 2.	Skupina bolnikov s serumu s prisotnimi protitelesi IgG in brez protiteles IgM (2. skupina)	32
4. 1. 3.	Skupina bolnikov s serumu brez protiteles IgG in s protitelesi IgM (3. skupina)	33
4. 1. 4.	Skupina bolnikov s prisotnimi protitelesi IgM in IgG (4. skupina)	33
4. 1. 4. a)	IFT test brez absorpcije	34
4. 1. 4. b)	IFT test z absorpcijo	36
5.	RAZPRAVA	37
6.	SKLEPI	43
7.	VIRI	45

KAZALO PREGLEDNC

Preglednica 1:	Najpogostejše klinične slike lajske borelioze	10
Preglednica 2 :	Rezultati IFT brez absorpcije z <i>B. afizelii</i> kot antigenom ter primerjava sočasne prisotnosti IgM z IgA protitelesi v 3. skupini bolnikov (IgG negativni in IgM pozitivni serum)	33
Preglednica 3:	Rezultati IFT brez absorpcije z <i>B. afizelii</i> kot antigenom ter primerjava sočasne prisotnosti IgM z IgA protitelesi v 4. skupini bolnikov (IgG in IgM pozitivni serum)	34
Preglednica 4:	Rezultati IFT brez absorpcije z <i>B. afizelii</i> kot antigenom ter primerjava sočasne prisotnosti IgG z IgA protitelesi v 4. skupini bolnikov (IgG in IgM pozitivni serum)	35
Preglednica 5:	Rezultati IFT z absorpcijo z <i>B. afizelii</i> kot antigenom ter primerjava sočasne prisotnosti IgM z IgA protitelesi	36

KAZALO SLIK

Slika 1:	Taksonomska uvrstitev rodu <i>Borelia</i>	1
Slika 2:	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato v temnem polju	1
Slika 3:	Razširjenost lymske borelioze po svetu	5
Slika 4:	Klop <i>Ixodes ricinus</i> na travni bilki	5
Slika 5:	Različne razvojne stopnje klopa	6
Slika 6:	Življenjski cikel klopov, ki povzročajo lymsko boreliozi	7
Slika 7:	Kožna sprememba erythema migrans	8
Slika 8:	Borelijski limfocitom na ušesni mečici	9
Slika 9:	Kasna kožna sprememba acrodermatitis cronica atrophicans (a) na rokah in (b) na nogi	9
Slika 10:	Shematično prikazana zgradba imunoglobulina, prikaz grobe zgradbe podenot in vezi med njimi.	12
Slika 11:	Shematično prikazana kemijska zgradba imunoglobulina.	13
Slika 12:	Shematični prikaz zgradbe IgG protitelesa.	13
Slika 13:	Shematični prikaz zgradbe IgM protitelesa.	14
Slika 14:	Shematično prikazana zgradba IgA protitelesa.	15
Slika 15:	Nastanek sekrecijske oblike IgA.	15
Slika 16:	Neposredni imunofluorescenčni test za dokaz antigenov	20
Slika 17:	Posredni imunofluorescenčni test za dokaz protiteles	21
Slika 18. a:	Nanašanje kontrol ter vzorcev pri presejalnih določitvah titrov protiteles IgM.	27
Slika 18. b - c:	Nanašanje pozitivne in negativne kontrole ter vzorcev pri nadaljnjem določanju titrov protiteles IgM.	27
Slika 19. a - b:	Nanašanje pozitivne in negativne kontrole ter vzorcev pri določanju titrov protiteles IgG.	27
Slika 20. a:	Nanašanje kontrol ter vzorcev pri presejalnih določitvah titrov protiteles IgA.	27

Slika 20. b - c:	Nanašanje pozitivne in negativne kontrole ter vzorcev pri nadaljnjem določanju titrov protiteles IgA.	28
Slika 21. a:	Nanašanje kontrol ter vzorcev pri presejalnih določitvah titrov protiteles IgM.	30
Slika 21. b - c:	Nanašanje pozitivne in negativne kontrole ter vzorcev pri nadaljnjem določanju titrov protiteles IgM.	30
Slika 22. a:	Nanašanje kontrol ter vzorcev pri presejalnih določitvah titrov protiteles IgA.	30
Slika 22. b - c:	Nanašanje pozitivne in negativne kontrole ter vzorcev pri nadaljnjem določanju titrov protiteles IgA.	31

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Bmp	borelijski membranski protein (ang. Borrelia membrane proteine)
BSA	goveji serumski albumin (ang. Bovine serum albumin)
BSK	Barbour-Stonner- Kellyjevo gojišče
DNK	deoksiribonukleinska kislina
ELISA	ecimsko imunski test (ang. Enzyme-linked immunosorbent assay)
EIT	ecimsko imunski test
FITC	florescein izotiocianat
IFT	imunofluorescenčni test
IgG	imunoglulin G, protitelo razreda G
IgM	imunoglulin M, protitelo razreda M
IgA	imunoglulin A, protitelo razreda A
kb	kilobaza
kDa	kilodalton
MKP	modificirano Kelly-Pettenkoferjevo gojišče
Osp	zunANJI površinski protein (ang. Outer surface protein)
PBS	fosfatni pufer (ang. Phosphate buffer saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase chain reaction)
PFGE	elektroforeza v poliakrliamidnem gelu (ang. Pulsed-field gel electrophoresis)
RF	revmatoidni faktor
VlsE	izražena sekvenca podobna poglavitnemu proteinu (ang. Variable major protein-like sequence, expresed)
Wb	prenos western (ang. Western blot)

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJA VORŠIČ

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI PROGRAM
LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO
VISOKOŠOLSKI PROGRAM LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

DOLOČANJE PROTITELES IgA PRI LYMSKI BORELIOZI

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski študij

Mateja Voršič

Lymsko boreliozo povzročajo bakterije rodu *Borrelia*



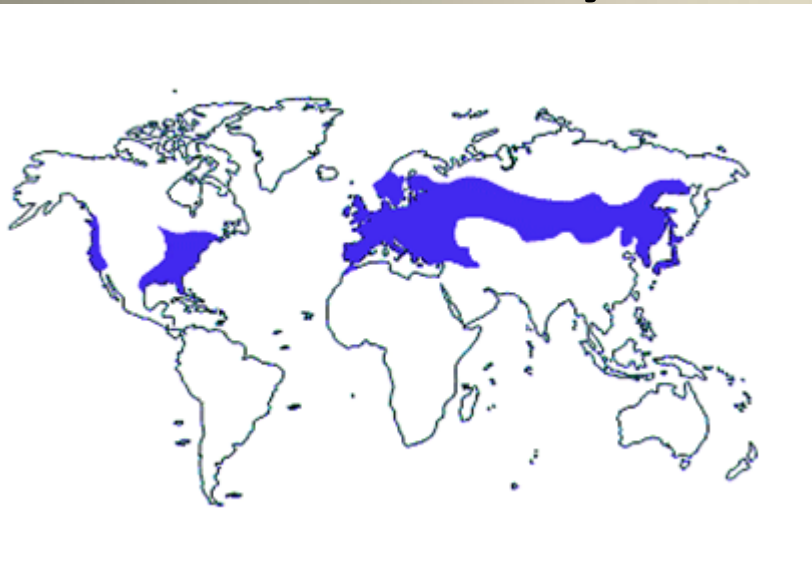
Borrelia burgdorferi
sensu lato (v širokem
pomenu) v temnem
polju

- za človeka so patogene vsaj tri:
 - *B. burgdorferi* sensu stricto (v ozkem pomenu)
 - *B. afzelii*
 - *B. garinii*
 - redko tudi *B. bissettii* in *B. spielmanii*

Borelije lymske borelioze

- so po Gramu negativne bakterije
- razlikujejo se po dolžini (5 – 30 μm) in širini (0,2 – 0,3 μm)
- glede na uporabo virov spadajo med kemoheterotrofe ali kemoorganotrofe
- so anaerobne bakterije ; vse manjkajoče substance (aminokisline, encimske kofaktorje in maščobne kisline) dobijo od gostitelja, v gojišča pa jih umetno dodamo
- genom borelij je sestavljen iz linearnega kromosoma velikosti 1 Mb in več kot 20 linearnih in krožnih plazmidov
- poglavitni antigeni (Osp- zunanje površinske beljakovine bakterije) so flagelin, OspA, OspB in OspC; znani pa so tudi OspD, OspE ter OspF

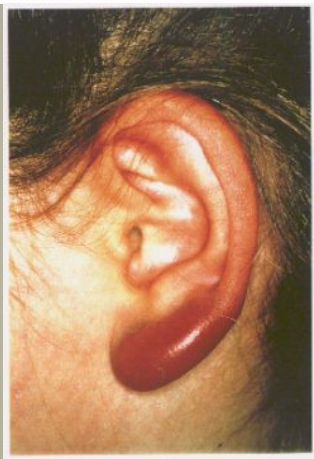
Lymska borelioza



- je zoonoza – prenašajo jo klopi
- pomembne so štiri vrste klopov, ki so kontinentalno razdeljene:
 - v Evropi je značilen *Ixodes ricinus* (prikazan na sliki)
 - v ZDA *Ixodes scapularis* in *Ixodes pacifus*
 - v Aziji pa *Ixodes persulcatus*



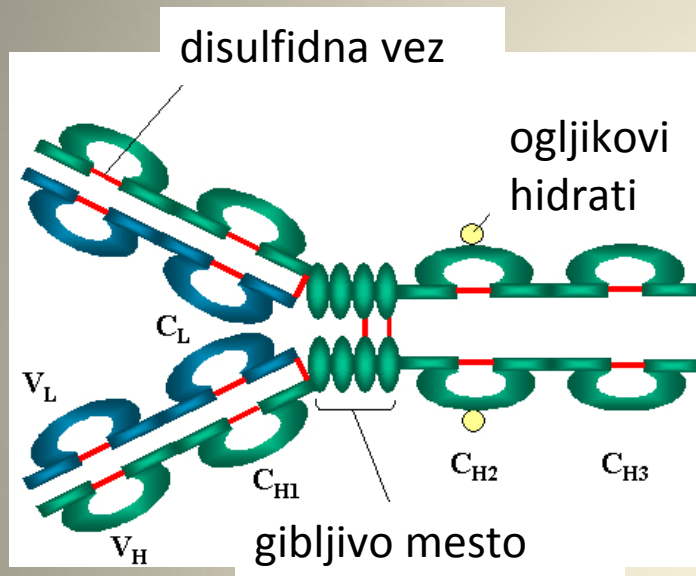
- borelije so zelo mobilne in invazivne bakterije, ki se lahko naselijo v vseh organih človeka ter se uspešno izogibajo njegovemu imunskemu sistemu
- bolezenski znaki so deloma odvisni tudi od povzročitelja bolezni:
 - *B. garinii* največkrat povzroča okužbe živčevja
 - *B. afzelii* okužbe kože
 - *B. burgdorferi* sensu stricto, ki je edini povzročitelj lymske borelioze v Ameriki, pa bolezni sklepov



Courtesy of Prof Gerold Stanek

Prizadeti organ	Zgodnja		Kasna
	Lokalizirana (I. faza)	Razširjena (II. faza)	III. faza
Koža	- solitarni erythema migrans - borelijski limfocitom	- multipli erythema migrans	- acrodermatitis chronica atrophicans
Živčevje		- meningitis - okvara možganskih živcev	- kronični meningitis - kronični encefalitis
Sklepi		- bolečine - vnetje	
Mišice		- prevodne motnje - motnje ritma	
Srce		- prevodne motnje - motnje ritma	
Oči		- konjunktivitis - keratitis - iridociklitis	
Splošni znaki	- brez - blaga utrujenost	- srednje huda utrujenost in glavoboli	- zelo huda utrujenost in glavoboli

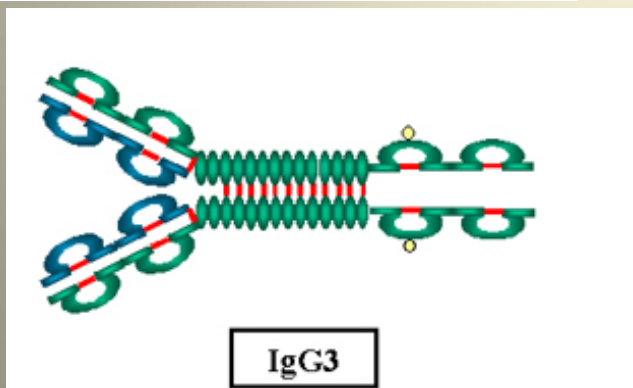
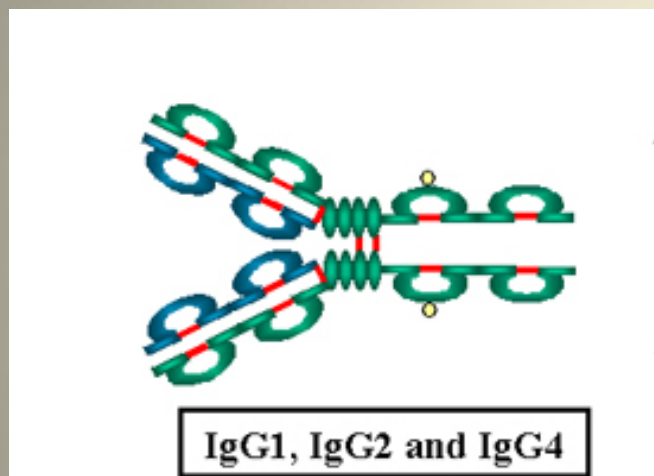
Zgradba in funkcija protiteles, ki sodelujejo pri imunskem odzivu na *B. burgdorferi* sensu lato



- enota imunoglobulina je sestavljena iz dveh istovetnih lahkih in dveh istovetnih težkih verig
- po izotipskih determinantah težkih verig razvrstimo imunoglobuline v pet razredov: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, ter v podrazrede IgG 1 – 4 in IgA 1 – 2

Strukturne značilnosti in biološke lastnosti IgG, IgM in IgA protiteles

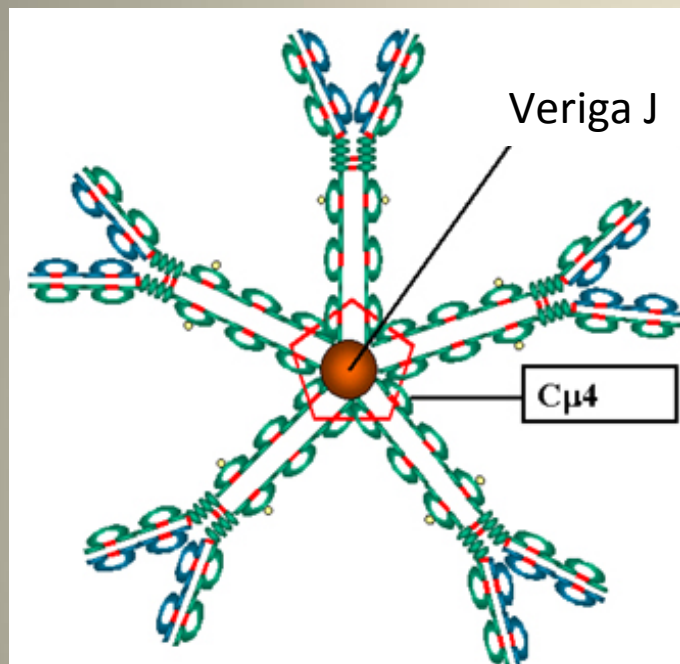
PROTITELESA IgG



- monomerne molekule
- v tem razredu so štirje porazdeli IgG1, IgG2, IgG3, IgG4
- nastajajo pri naravni infekciji ali pri imunizaciji z virusi, bakterijami ali njihovimi produkti
- ta protitelesa so približno enakomerno porazdeljena v krvi in tkivnih tekočinah (v krvi lahko ostanejo 40 dni)
- so opsonini, pospešujejo fagocitozo ter aktivirajo komplement

pri lymski boreliozi jih zaznamo v II. fazi bolezni (diseminirani fazi)

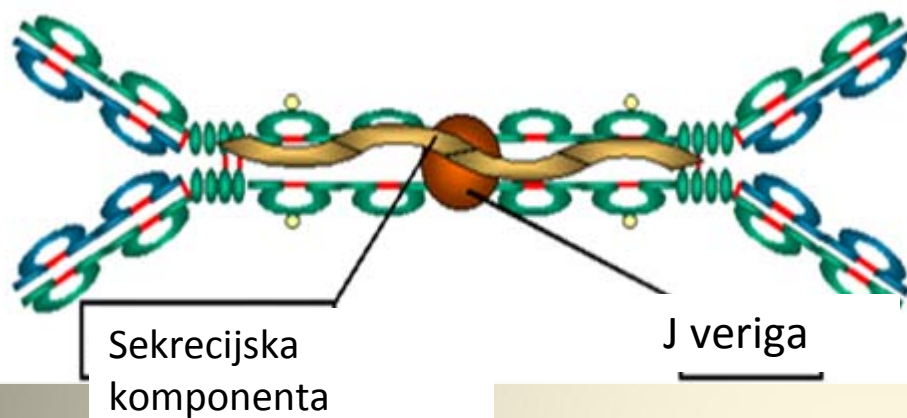
PROTITELESA IgM



**pri lymfski boreliozii jih
zaznamo v I. fazi bolezni**

- sestavljena so iz petih enot, povezanih med seboj z vezmi S – S blizu gibljivega mesta v težki verigi
- v medceličnih tkivih jih najdemo v zelo majhnih količinah (velikost)
- veriga J (ang. join) omogoča, da se IgM veže na receptorje na sekrecijskih celicah in se izloča na sluznično površino. Tako so IgM protitelesa pomembni dopolnilni sekrecijski imunoglobulini.
- nastajajo redno skoraj pri vseh imunskih odzivih in so pri primarnem imunskem odzivu prisotna hitreje in v večji količini kot protitelesa IgG
- močno aktivirajo komplement

PROTITELESA IgA



- PRI LYMSKI BORELIOZI JIH V SERUMU ZAZNAMO V I. FAZI BOLEZNI (SKUPAJ S PROTITELESI IgM)

- V INTRATKALNI TEKOČINI JIH ZAZNAMO V KASNEJŠIH FAZAH SKUPAJ S PROTITELESI IgG

- V telesu lahko ostajajo tudi do 4 leta po diagnosticiranju in zdravljenju bolezni, vendar brez sekrecijske komponente
- ker ostanejo tako dolgo v telesu lahko sprožijo avtoimunski odziv

- dva podrazreda, IgA1 (90 %) in IgA2 (10 %)

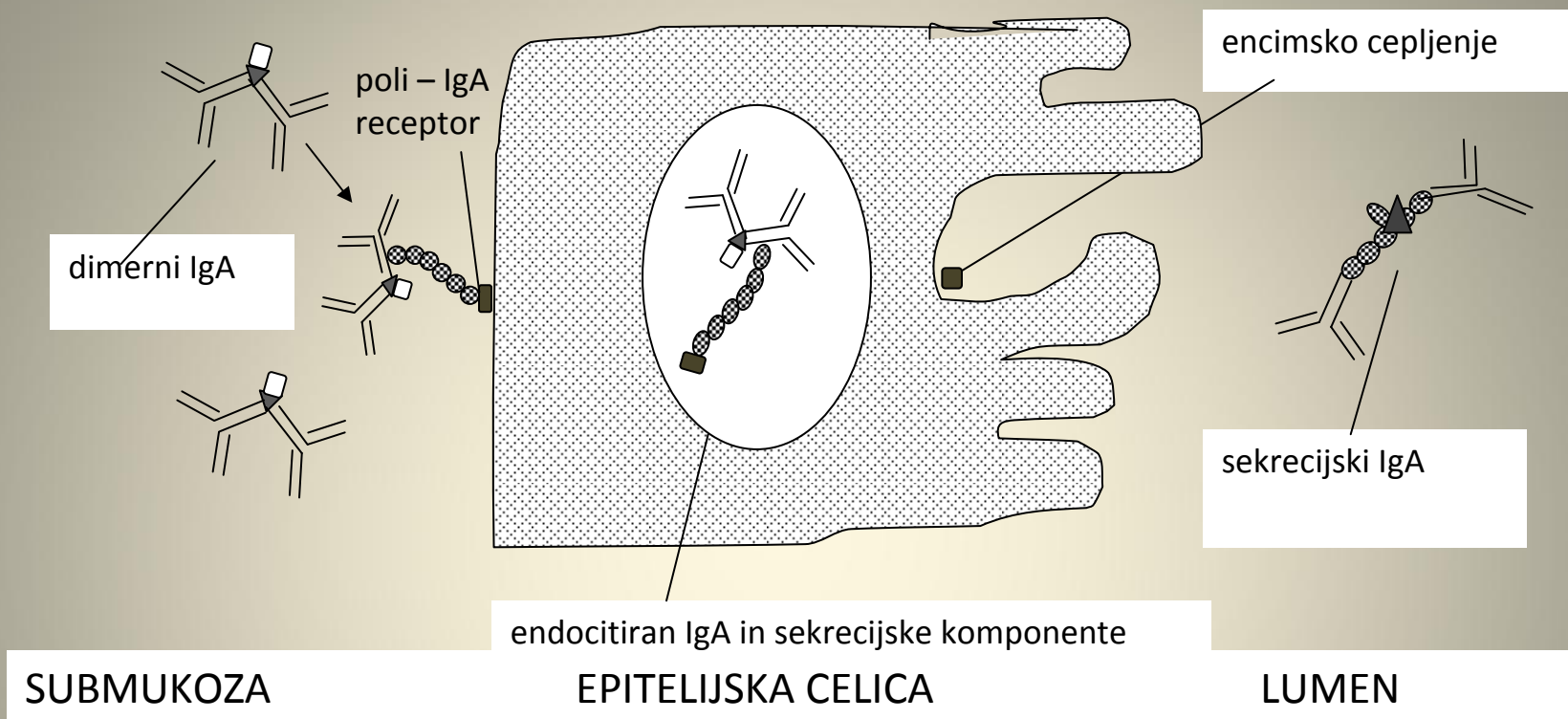
- večinoma nastajajo lokalno predvsem v črevesju. Izdelujejo jih plazmatke v submukози.

- v serumu so v monomerni obliki, po prehodu skozi submukozo pa prevzamejo posebno obliko – dimerno

- IgA protitelesa v črevesju preprečujejo stik patogenih organizmov s celicami črevesja in jih tako ščitijo pred poškodbo. - IgA so slabi opsonini in ne aktivirajo komplementa

- najdemo jih tudi v solznicah, rodilih in urogenitalnem traktu, so pa tudi pomemben del novorojenčkove obrambe, saj dobi ta protitelesa z materinim mlekom

Nastanek sekrecijske oblike protitelesa IgA



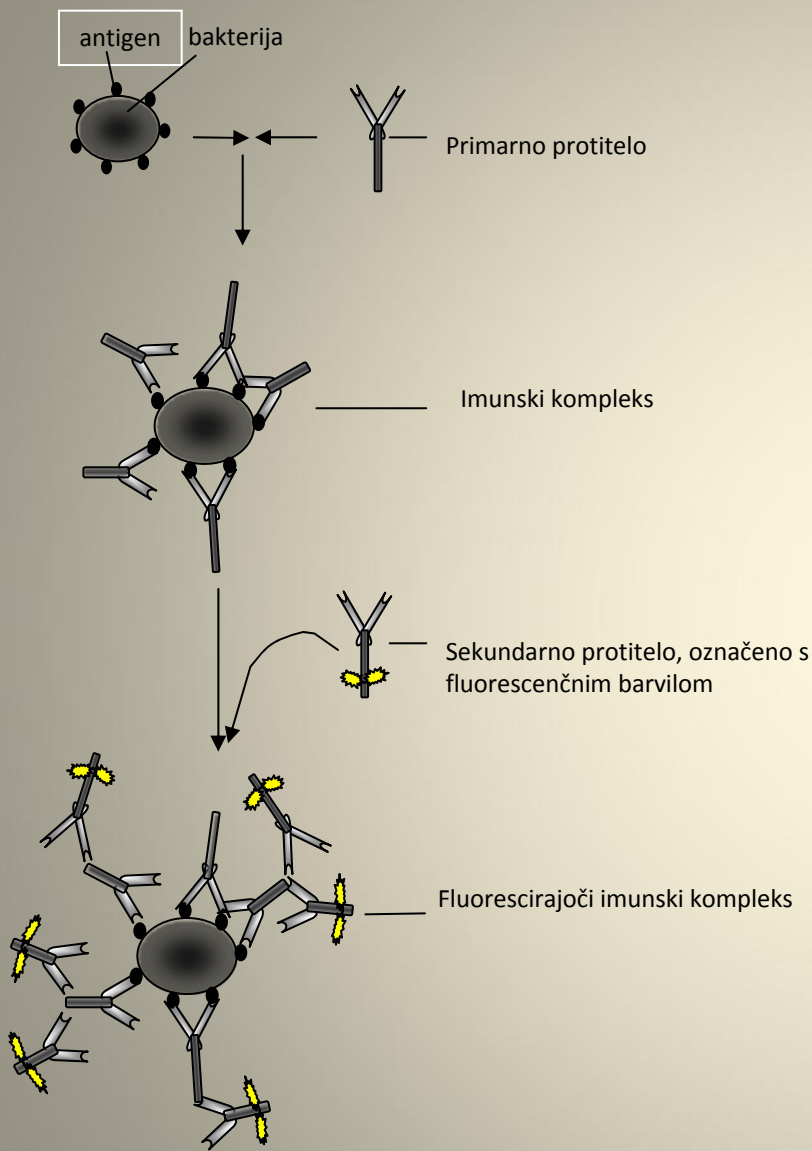
Dimerne molekule, ki jih izdelujejo plazmatke v submukozi, se vežejo na specifičen receptor za Fc dimernih molekul IgA na površini epiteljskih celic. Ta receptor imenujemo tudi sekrecijska komponenta na bazalni površini epiteljske celice, ki je obrnjena h krvi. Po prehodu IgA skozi celico protitelesu ostane nekaj sekrecijske verige

Dokazovanje lymške borelioze

- Borelijsko okužbo najpogosteje dokazujemo z naslednjimi metodami:
 - 1) OSAMITEV *B. BURGDORFERI* SENSU LATO IZ KLINIČNEGA MATERIALA
 - 2) DOKAZOVANJE MOLEKULE DEOKSIRIBONUKLEINSKE KISLINE (DNA) BORELIJ Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO (PCR)
 - 3) DOKAZ SPECIFIČNIH PROTITELES, USMERJENIH PROTI BORELIJSKIM ANTIGENOM (encimsko-immunski (ELISA), imunofluorescentni (IFT) (8, 56) ali immuno-blot (immuno-western blot))

S PRVIMA DVEMA METODAMA NEPOSREDNO DOKAZUJEMO BORELIJSKO OKUŽBO, S TRETJO PA OKUŽBO DOKAŽEMO POSREDNO Z DOKAZOM BOLNIKOVEGA IMUNSKEGA ODZIVA NA BORELIJSKE ANTIGENE

POSREDNI IFT TEST



- Ustrezna koncentracija borelij je pritrjena na objektno steklce in predstavlja antigen. Če so v dodanem serumu navzoča protitelesa IgG, IgM ali IgA proti borelijskim antigenom, se z antigenom vežejo v imunski kompleks.
- Nevezana protitelesa odstranimo s spiranjem.
- Dodamo s fluorokromom označena sekundarna protitelesa, ki se vežejo na primarna protitelesa. Sekundarna protitelesa so označena s FITC (florescein izotiocianat).
- Po inkubaciji speremo nevezane konjugate. Na stekelce damo imerzijsko olje in mikroskopiramo pod UV svetlobo. Pri tem testu določamo celokupna protitelesa iz razreda IgG, IgM in IgA.
- Količino protiteles ovrednotimo s titrom, ki je najnižja še zaznavna razredčina seruma v postopku, ki reagira z antigenom

- Za antigen se uporablja lokalno izoliran sev borelije
- Metoda je sicer specifična, občutljiva ter hitra za izvedbo, ocena rezultatov pa je subjektivna, zato mora test izvajati izkušena in strokovno usposobljena oseba
- zelo pogoste so tudi navzkrižne reakcije.
- Pri dokazovanju protiteles IgM lahko na rezultate vpliva prisotnost revmatoidnega faktorja (RF) v serumu (RF je protitelo razreda IgM proti lastnim IgG)

– reakcija:

antigen + spec. protitelo IgG + RF (IgM) = lažno pozitiven rezultat za protitelesa IgM

- navzkrižnim in lažnim reakcijam se skušamo izogniti s predhodno absorpcijo seruma

NAMEN NALOGE

Med potekom lymske borelioze kot odgovor na okužbo nastajajo različna specifična protitelesa. Namen diplomske naloge je bil:

- ugotoviti ali med okužbo z borelijami nastajajo poleg specifičnih protiteles IgG in IgM, tudi specifična protitelesa proti *B. burgdorferi* sensu lato razreda IgA
- pripraviti in ovrednotiti posredni IFT za dokaz specifičnih protiteles IgA z uporabo *B. afzelii* kot antigen
- preveriti hkratno prisotnost specifičnih protiteles razreda IgA s specifičnimi protitelesi razreda IgG in IgM.

BOLNIKI IN VZORCI

- skupina 1: serumi brez protiteles proti borelijam (100 serumov)
- skupina 2: serumi s prisotnimi protitelesi IgG in brez protiteles IgM (99 serumov)
- skupina 3: serumi brez protiteles IgG in s protitelesi IgM (31 serumov)
- skupina 4: serumi s prisotnimi protitelesi IgG in IgM (30 serumov).

REZULTATI

VREDNOTENJE REZULTATOV:

- IFT brez absorpcije:
 - titer 256 za specifična protitelesa IgG in IgM
 - titer 64 za specifična protitelesa IgA (protitelesa IgA so lokalnega izvora in njihova produkcija ni tako visoka v krvi)
- Pri IFT z absorpcijo:
 - titer 64 pri določanju specifičnih protiteles IgG in IgM
 - titer 16 pri določanju specifičnih protiteles IgA

SKUPINA	ŠTEVILO PREISKANIH SERUMOV	DOLOČANJE IgA Z IFT BREZ ABSORPCIJE	DOLOČANJE IgA Z IFT Z ABSORPCIJO
1.	100 (serumi brez protiteles proti borelijam)	0 (0 %)	/
2.	99 (serumi s prisotnimi protitelesi IgG in brez protiteles IgM)	0 (0 %)	/
3.	31 (serumi brez protiteles IgG in s protitelesi IgM)	10 (32,26 %)	/
4.	30 (serumi s prisotnimi protitelesi IgG in IgM)	19 (63,33 %)	14 (46,47 %)

SKLEPI

- Poleg produkcije specifičnih protiteles IgG in IgM nastajajo tudi specifična protitelesa IgA proti borelijskim antigenom in jih lahko dokažemo v serumu bolnika.
- Protitelesa IgA se v serumu pojavljajo v manjših količinah, zato je prvi pozitiven titer (64 pri testu brez absorpcije in 16 pri testu z absorpcijo) nižji od tistega za rutinsko določanje protiteles IgG in IgM (256 pri testu brez absorpcije in 64 pri testu z absorpcijo).
- Protitelesa IgA nastajajo skupaj s protitelesi IgM, to pomeni, da nastajajo primarnem imunskem odzivu. Dokazali smo jih tako v tretji kot v četrti skupini.

- Pri IFT testu brez absorpcije smo v 3. skupini dobili 10 (32,3 %) vzorcev s pozitivnim titrom protiteles IgA, v 4. skupini pa jih je bilo 19 (63,3 %). Pri tem lahko predpostavimo, da je imunski odziv višji pri bolnikih, ki imajo dalj časa trajajočo okužbo in že proizvajajo protitelesa IgG.
- Ko smo v 4. skupini test ponovili, vendar z absorpcijo smo dobili 14 (46,5 %) vzorcev s pozitivnim titrom protiteles IgA. To nam pokaže, da se s postopkom absorpcije odstrani tudi del protiteles IgA.
- Posredni IFT test bi priporočili za dokazovanje specifičnih protiteles IgA, vendar bi bilo potrebno standardizirati postopek in statistično ovrednotiti test.
- Priporočili bi tudi intervalno testiranje bolnikov z lymsko boreliozo pri določanju vseh treh razredov protiteles. S dobljenimi rezultati bi dobili boljši vpogled v proizvajanje protiteles in imunski odziv posameznika ter bi lahko določili kdaj v poteku bolezni so koncentracije posameznih protiteles najvišje.

HVALA ZA POZORNOST

1. PREGLED OBJAV

1.1. TAKSONOMSKA UVRSTITEV, STRUKTURA, OBLIKA, GOJITEV TER METABOLIZEM *B. burgdorferi* sensu lato

Spirohete delimo na dve družini: *Leptospiraceae* in *Spirochetaceae*, ki povzročajo lymsko boreliozo (slika 1). Rod *Borrelia* predstavljajo bakterije, ki so si filogenetsko zelo sorodne. V ta rod uvrščamo več različnih genomskih vrst, od teh so za človeka patogene vsaj tri: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* ter *B. garinii*; redko tudi *B. bissettii* in *B. spielmanii* (10, 11, 12).

red *Spirochaetales* → družina *Spirochaetaceae* → rod *Spirochaeta*
→ rod *Christispira*
→ rod *Treponema*
→ rod *Borrelia*

→ družina *Leptospiraceae* → rod *Leptospira*

Slika 1: Taksonomska uvrstitev rodu *Borelia*.



Slika 2: *Borrelia burgdorferi* sensu lato v temnem polju.

Borelije lymfske borelioze so živahno gibljive po Gramu negativne spirohete (slika 2). Značilno obliko jim dajejo zavoji katerih število varira med 3 do 10 zavoji. Zavoji so lahko levo ali desno sučni. Borelije se razlikujejo po dolžini (5 – 30 μm) in širini (0,2 – 0,3 μm) (13). Obliko jim dajejo bički, ki se nahajajo v periplazemskem prostoru (med zunanjo in notranjo membrano). Bički oziroma endoflageli ne segajo popolnoma od enega pritrdišča, ki so na obeh polih bakterij, do drugega, vendar pa se na sredini celice prekrivajo (14). Pogosto se število bičkov giblje med 7 do 11. Zunanja membrana leži pod površinskim slojem, ki je debel 2 – 10 nm, sestavljen je predvsem iz ogljikovih hidratov (amorfne sluzi). Na njej se izražajo različne zunanje površinske beljakovine (Osp – iz ang. Outer surface protein), ki so poglavitni borelijski antigeni in nekaj transmembranskih beljakovin. Membrana je sestavljena predvsem iz proteinov (45 -62 %), lipidov (23 – 50 %) in ogljikovih hidratov (do 4 %), kar ji daje značilno fluidnost. Vsebuje tudi lipoprotein, ki je podoben lipoproteinu Gram negativnih bakterij. Pod njo je protoplazemski prostor, v katerem so bički, ti pa obdajajo protoplazemski cilinder. V njem je ves bakterijski genom, ribosomi in mezosomske komponente. Obdaja ga celična stena s tanko plastjo peptidoglikana, pod katero je še citoplazemska membrana iz fosfolipidnega dvosloja (4, 10, 13).

Borelije se lahko gibljejo na tri različne načine. Najpogosteje se gibljejo s svedrastim zvijanjem vzdolž svoje osi, ki je običajno zelo hitro. Lahko se samo upogibajo na mestu ali pa se gibljejo tako, da se citoplazemski cilinder giblje v eno smer, zunanji ovoj pa v drugo. To jim pomaga predvsem pri prebijanju skozi goste, viskozne medije, v katerih se druge gibljive bakterije ne morejo gibati (13, 14, 15).

Če bakteriji spremenimo hranilni medij ali pogoje v gojišču, se spremeni njena morfologija. V starejših gojiščih bakterije postanejo nenavadno podolgovate in izgubijo svojo spiralno strukturo. Prav tako sprememba pH-ja povzroči cepitev zunanje membrane od notranjega cilindra tako, da na mestu cepitve nastane mehurček (16).

Borelije imajo preprost metabolizem. Glede na uporabo virov spadajo med kemoheterotrofe ali kemoorganotrofe. So anaerobne bakterije, ki dobijo energijo s fermentativnim metabolizmom. Vse manjkajoče substance (aminokisline, encimske kofaktorje in maščobne kisline) dobijo od gostitelja, v gojišča pa jih umetno dodamo (13). Vse našte lastnosti bakterije, njeno izražanje antigenov ter prilagoditveni sistemi omogočajo bakteriji preživetje v tako različnih gostiteljih kot so členonožci, vretenčarji ter sesalci (4, 17).

1. 2. BORELIJSKI ANTIGENI

Bakterija *B. burgdorferi* sensu lato ima na zunanji membrani izražene številne proteinske strukture, ki jih imunski sistem prepozna kot antigenske determinante (Steere, 1989). Beljakovinski profil sevov se pri borelijah razlikuje po molekularni masi, količini in vrsti izraženih beljakovin (18). Beljakovine se izražajo tudi v odvisnosti od temperature, pH in elektrolitov okolja. Eden najpomembnejših mehanizmov je preklon iz OspA v OspC. Pri sesalcih je izražanje OspA prvo, OspC pa vzpodbujeno, kar je močno povezano s patogenostjo. Z Osp označujemo zunanje površinske beljakovine bakterije, poglobitni pa so OspA (30 – 32 kDa), OspB (34 – 36 kDa) in OspC (21 – 25 kDa); znani pa so tudi OspD (28 kDa), OspE (19 kDa) ter OspF (27 kDa).

Velik in pomemben antigen je tudi flagelin (41 kDa), ki se nahaja v bičkih in je za rod specifičen antigen. Podoben je flagelinu ostalih bakterij, ki se gibljejo z bički, zato je navzkrižna reaktivnost pri seroloških testih zelo pogosta (4, 20).

Tudi antigeni 58 – 60 kDa lahko sprožijo nastanek protitelesa, ki navzkrižno reagirajo s podobnim antigenom številnih bakterij (21).

Borelije imajo na svoji površini tudi stresne (»heat shock«) proteine. Močno imunogen je 60 kDa velik polipeptid, ki je soroden proteinom ostalih bakterij (19, 22).

Kromosomsko kodirana beljakovina p83/100 je specifičen antigen za *B. burgdorferi* sensu lato. Borelije jo izražajo v majhnih količinah, nahaja pa se v citoplazmi bakterije (23).

Zaradi različnega izražanja antigenov je serološka diagnostika zapletena, učinkovito cepivo pa je zelo težko razviti (18).

1. 3. GENOM BORELIJ

Genom borelij je sestavljen iz linearnega kromosoma velikosti 1 Mb in več kot 20 linearnih in krožnih plazmidov, katerih velikost je približno od 13,3 do 57 kb. Večina plazmidov se pojavlja pri vseh borelijah. Skoraj vsi sevi vsebujejo en velik linearni plazmid. Pri primerjavi velikosti tega plazmida med *B. burgdorferi* sensu stricto, je plazmid manjši (51,8 do 52,7 kb) kot pri bakterijah *B. garinii* ter *B. afzelii* (54,0 do 54,9). Plazmidi so pomembni pri patogenezi okužbe z borelijami (24). Kodirajo genski zapis za večino zunanjih površinskih proteinov in s tem virulenco bakterije. Zunanja proteina OspA in OspB kodira linearni plazmid velikosti 57 kb. OspC kodira krožni plazmid velikosti 27 kb (25, 26, 27).

Identifikacija borelijske vrste temelji na analizi kromosomske ali plazmidne DNA z različnimi metodami restrikcije, sekveniranja, hibridizacije ali pomnoževanja (1).

1. 4. IZOLACIJA IN KULTIVACIJA *B. burgdorferi* sensu lato IN VITRO

Borelije so za gojitev zahtevne bakterije. Izoliramo jih lahko iz kliničnih vzorcev (koža, kri, likvor, sinovijska tekočina) in jih gojimo v tekočih gojiščih, ki so različne modifikacije Kellyjevega gojišča. Najpogosteje se uporablja Barbour-Stonener-Kellyjevo gojišče (BSK) in modificirano Kelly-Petterkoferjevo gojišče (MKP) (28).

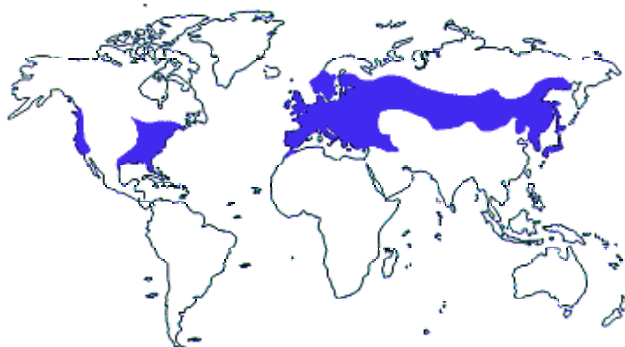
Optimalni pogoji za razmnoževanje so temperatura od 30 – 34 °C, pH 7,6 in anaerobni pogoji.

Vzorci za izolacijo borelij inkubiramo vsaj 6 tednov, saj je generacijski čas kar 7 – 20 ur.

B. burgdorferi sensu lato pri gojitvi in vitro lahko hitro izgubi patogenost, ponavadi že po 10 – 15 presaditvah (4). Spremeni se lahko potek podvojevanja, struktura bakterije in antigenske lastnosti (23, 29).

1. 5. REZEVOAR IN PRENAŠALCI BORELIJ

Lymfska borelioza je zoonoza, razširjena v zmernih podnebnih območjih severne poloble, predvsem v pasu 30 in 60 stopinj zemljepisne širine (slika 3).



Slika 3: Razširjenost lymfske borelioze po svetu.

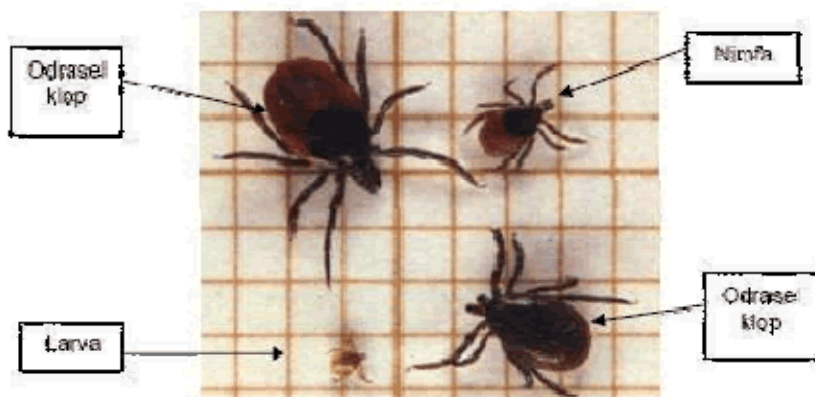
Pojavlja se povsod, kjer so razširjeni klopi, ki prenašajo povzročitelja bolezni, spiroheto *B. burgdorferi* sensu lato. Pomembne so štiri vrste klopov, ki so kontinentalno razdeljene: v Evropi je značilen *Ixodes ricinus* (prikazan na sliki 4), v ZDA *Ixodes scapularis* in *Ixodes pacifus*, v Aziji pa *Ixodes persulcatus* (3, 30).



Slika 4: Klop *Ixodes ricinus* na travni bilki.

Vse vrste klopov imajo podoben življenjski cikel, ki traja približno 2 leti ali manj, lahko pa tudi 5-6 let. Samica izleže jajčeca zgodaj spomladi iz katerih se izležejo larve (slika 5). Te se hranijo na manjših glodalcih, plazilcih ter pticah, ki so glavni epidemiološki rezervoar borelij. Po hranjenju odpadejo in se preobrazijo v nimfe. Tudi te zajedajo podobne živali,

lahko pa tudi že večje (srnjad, človek). Nimfe se nato preobrazijo v odrasle klope, ki pa so najpogostejši vzrok za okužbo človeka (31).



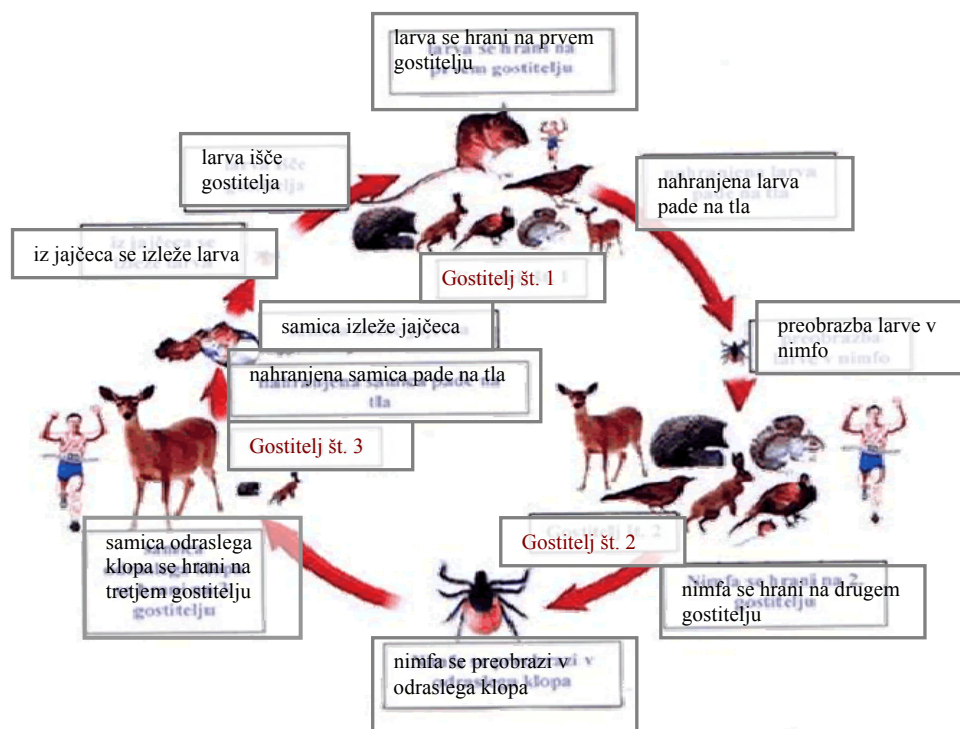
Slika 5: Različne razvojne stopnje klopa.

Človek je vedno le naključni gostitelj. Klopom ustreza grmičasto okolje z najmanj 80 % relativno vlažnostjo, zato imajo najraje listnate gozdove z bogato podrastjo. Ker klop sesa le pri temperaturah med 23-27°C, se pravi spomladi, zgodaj poleti in zgodaj jeseni, je največji porast števila okuženih ljudi v tem obdobju, primeri obolelih pa se sicer pojavljajo skozi celo leto (32).

Borelije lahko prenašajo tudi druge žuželke, ki pijejo kri (komarji, muhe), vendar je njihov pomen pri okužbah s spirohetami v primerjavi z okužbami preko klopa zanemarljiv (3).

Klopi se lahko okužijo na katerikoli stopnji razvoja (slika 6); pogoj za okužbo je prisotnost bakterij v krvi okužene živali. Čeprav je možen tudi vertikalni prenos od samice klopa na jajčeca in iz njih na larve, nimfe ter končno ne odraslega klopa, je v naravi dosti pomembnejši horizontalni prenos. Okužene larva, nimfe in odrasli klopi lahko prenesejo borelije na živali oziroma na človeka in povzročijo bolezen (30).

Tudi, če je klop okužen z borelijami, se borelije ne prenesejo na gostitelja pri vsakem vbodu. Če je čas prisesanja krajši od 24 ur, le redko pride do prenosa in okužbe gostitelja. Redko pride do okužbe že po 12 urah. Te okužbe pojasnjujejo z delno hranjenimi klopi, ki zapustijo prvega gostitelja in imajo borelije v žlezah slinavkah že takoj ob naslednjem hranjenju (33).



Slika 6: Življenjski cikel klopov, ki povzročajo lymfsko boreliozo.

1. 6. PATOGENEZA *B. burgdorferi* sensu lato TER KLINIČNA SLIKA LYMSKE BORELIOZE

Patogeneza lymfske borelioze je še vedno slabo pojasnjena. Vzrok je slabo poznavanje razvoja bolezni, vrst, ki povzročajo bolezen ter zaradi poskusov na živalih, ki niso popoln odraz razvoja bolezni pri človeku (4, 10).

Borelije so zelo mobilne in invazivne bakterije, ki se lahko naselijo v vseh organih človeka ter se uspešno izogibajo njegovemu imunskemu sistemu. Znano je, da so bolezenski znaki deloma odvisni tudi od povzročitelja bolezni: *B. garinii* največkrat povzroča okužbe živčevja, *B. afzelii* okužbe kože, *B. burgdorferi* sensu stricto, ki je edini povzročitelj lymfske borelioze v Ameriki, pa bolezni sklepov (2, 34). Protitelesa proti OspA in OspB lahko povzročajo križno reaktivnost proti pacientovim lastnim celicam. Predvsem se avtoprotitelesa pojavljajo pri kroničnem artritisu in nevroboreliozi. Borelije so tudi učinkoviti stimulatorji citokinov, ki sodelujejo pri lokalnem vnetju (35).

Bolezen se lahko izraža v celoti ali pa prizadene le določene organe (Preglednica 1). Če je izražena v celoti se najprej pojavi kožna sprememba *erythema migrans*, nato prizadetost srca in živčevja, kasneje pa lahko pride tudi do prizadetosti sklepov. Znane so tudi okvare oči, kasne nevrološke spremembe in kasna prizadetost kože.

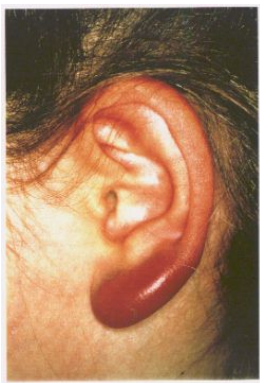
Bolezen obsega zgodnjo fazo, ki jo delimo na lokalizirano (I faza, ki je lokaliziran eriyhema migrans) in diseminirano (II faza, ki je desiminirana infekcija), ter pozno fazo, ki se pojavi šele leto ali več po okužbi (III faza, označuje kronično obolenje) (5).

Prvi znak okužbe *erythema migrans* se pojavi 2 dni do nekaj tednov po vbodu klopa. Pojavi se kožna sprememba, katere zunanji rdeči rob se širi navzven, notranjost pa blede (slika 7). Tako nastane rdeč obroč, ki ga diagnosticiramo klinično. Zgodnja faza lahko poteka brez drugih nespecifičnih simptomov, kot so glavobol, utrujenost, zaspanost, bolečine v mišicah in sklepih ter mrazenjem (4, 10). Dokazali so tudi, da so ti bolezenski znaki pri bolnikih v Evropi blažji kot pri bolnikih v Ameriki, kar je lahko posledica bolj virulentne *B. burgdorfei* sensu stricto, ki jo najdemo v Ameriki (2).



Slika 7: Kožna sprememba *erythema migrans*.

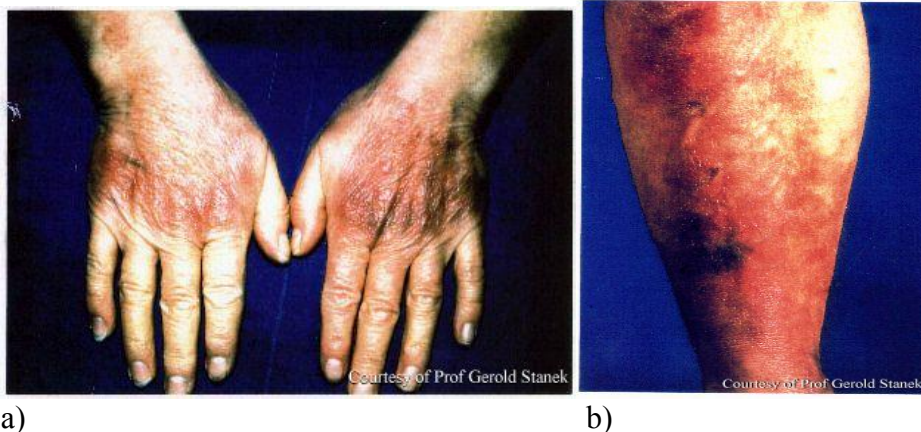
Precej bolj redek zgodnji lokaliziran znak lymške borelioze je borelijski limfocitom, modrikastordečkasta zatrdlina kože in podkožja (slika 8). Pri otrocih jo opazijo na ušesni mečici, pri odraslih pa običajno na prsni bradavici. Lahko izgine spontano, vendar šele približno po enem letu (5).



Slika 8: Borelijski limfocitom na ušesni mečici.

Drugi stadij lahko nastopi nekaj dni do tednov za prvim in obsega bolezenska stanja živčnega sistema (37) in srčne mišic. Klinična slika zgodnje nevroborelioze poteka kot meningoradikulonevritis (Garin-Bijadoux-Bannwarthov sindrom), zanj pa so značilne bolečine, ki se selijo po telesu (38). Pojavi se lahko tudi prizadetost kateregakoli možganskega živca, najpogosteje pa je prizadet obrazni (5). Lahko pride tudi do pojava multiplih erythema migrans, ki kažejo na razsoj borelij (39).

Tretji stadij se običajno začne eno leto ali več po okužbi s kroničnimi okvarami živčnega sistema, sklepov ali s kožno spremembo acrodermatitis chronica atrophicans (slika 9) (40).



a)

b)

Slika 9: Kasna kožna sprememba acrodermatitis cronica atrophicans (a) na rokah in (b) na nogi.

Pozna nevroborelioza je konitnuirano vnetje osrednjega živčnega sistema ali perifernega živčevja, ki traja več kot 6 mesecev (38).

Pojavlja se tudi lymski artritis, ki pa ga lahko zasledimo že v diseminirani fazi okužbe. Pogosteje se pojavlja v ZDA, poznamo pa ga tudi v Sloveniji. Prizadeti so predvsem večji sklepi, najpogosteje koleno (41).

Acrodermatitis chronica atrophicans je kasna kožna sprememba, ki se pojavi na zunanji strani rok in nog (akralni deli telesa) (slika 9. a in b). Pogostejša je pri ženskah, starejših od 40 let. Koža je obarvana rdeče-modro, postaja pa tudi tanjša, gubasta in je vse bolj ranljiva (atrofija) (42).

Prizadetost srca se lahko pojavi v zgodnji ali diseminirani fazi bolezni. Kaže se kot prevodne motnje, motnje ritma srca, perikarditis ali kot miokarditis.

Vnetje oči navadno ugotavljamo sočasno z drugimi manifestacijami, lahko pa so edini znak okužbe. Pojavlja se redkeje, najpogosteje v diseminirani fazi. Če je vnetje dolgotrajno, lahko pomeni izgubo vida. Borelije so histološko dokazali tudi v šarenici in očesni mrežnici (39).

Prizadeti organ	Zgodnja		Kasna
	Lokalizirana (I. faza)	Razširjena (II. faza)	III. faza
Koža	- solitarni erythema migrans - borelijski limfocitom	- multipli erythema migrans	- acrodermatitis chronica atrophicans
Živčevje		- meningitis - okvara možganskih živcev	- kronični meningitis - kronični encefalitis
Sklepi		- bolečine - vnetje	
Mišice		- prevodne motnje - motnje ritma	
Srce		- prevodne motnje - motnje ritma	
Oči		- konjunktivitis - keratitis - iridociklitis	
Splošni znaki	- brez - blaga utrujenost	- srednje huda utrujenost in glavoboli	- zelo huda utrujenost in glavoboli

Preglednica 1: Najpogostejše klinične slike lajske borelioze.

1. 6. 1. Epidemiologija lymfske borelioze

V Sloveniji je borelioza endemična bolezen. Z epidemiološkega stališča je najvažnejša zgodnja kožna sprememba, *erythema migrans*. Pojavnost bolezni je zelo visoka, verjetno med najvišjimi v Evropi. Že več let je večja od 100 na 100 000 prebivalcev, na nekaterih območjih pa je dosegla že 200 na 100 000 prebivalcev (6).

Pogostejše zbolijo osebe, ki so bolj izpostavljene klopotom ali pa jih imajo prisesane dalj časa. Največja zboleznost pri ljudeh je med 30. in 50. letom, sledi skupina otrok med 6. in 15. letom. Poročajo, da se kožne spremembe pogostejše pojavljajo pri ženskah kot pri moških, nevrološka prizadetost pa je nekoliko pogostejša pri moških. Število obolelih se poveča hkrati z aktivnostjo klopotov. Najbolj so aktivni spomladi, aktivnost pa traja do jeseni. Manj izrazito je pojavljanje bolnikov, pri katerih je od okužbe preteklo dalj časa (3). V Sloveniji število prijavljenih primerov z okužbo z *B. burgdorferi* sensu lato iz leta v leto narašča. Okužbo so začeli prijavljati že leta 1987 (43).

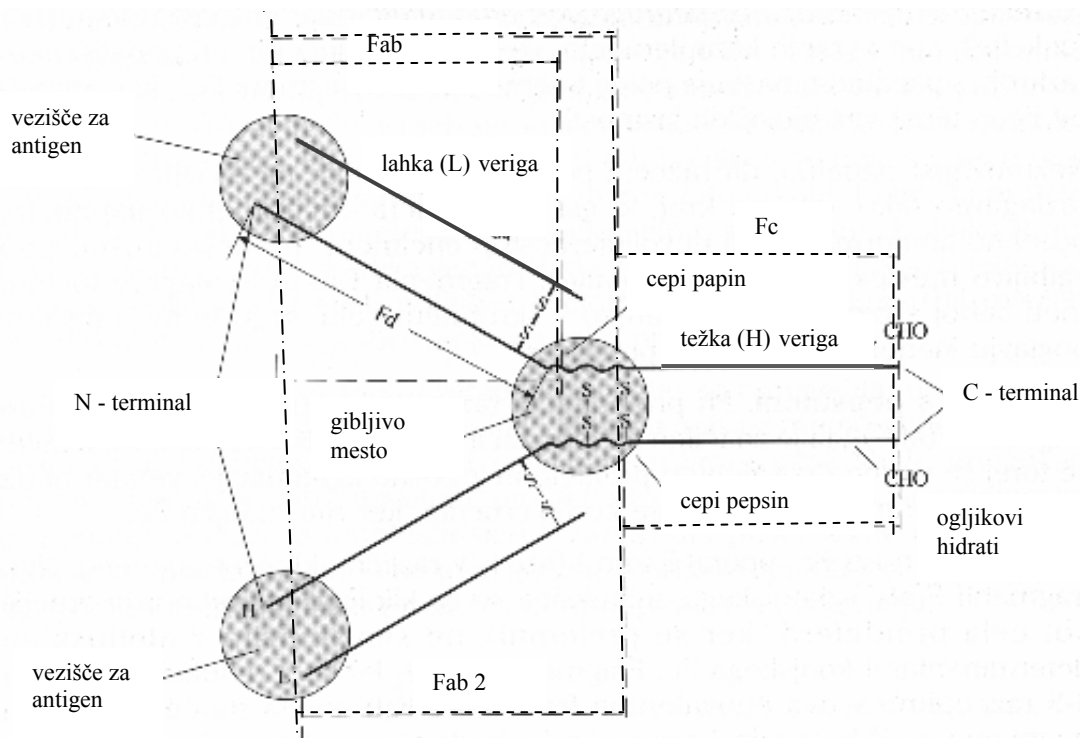
Pogostost pojavljanja okužb po Evropi je nedavno opisal S. O'Connell (32).

Iz bolnikovih materialov v Sloveniji najpogostejše dokažejo borelije vrste *B. afzelii* (82 %), manj *B. garinii* (17 %), pojavlja se tudi *B. burgdorferi* sensu stricto (1 %) (12).

1. 6. 2. Zgradba in funkcija protiteles, ki sodelujejo pri imunskem odzivu na *B. burgdorferi* sensu lato

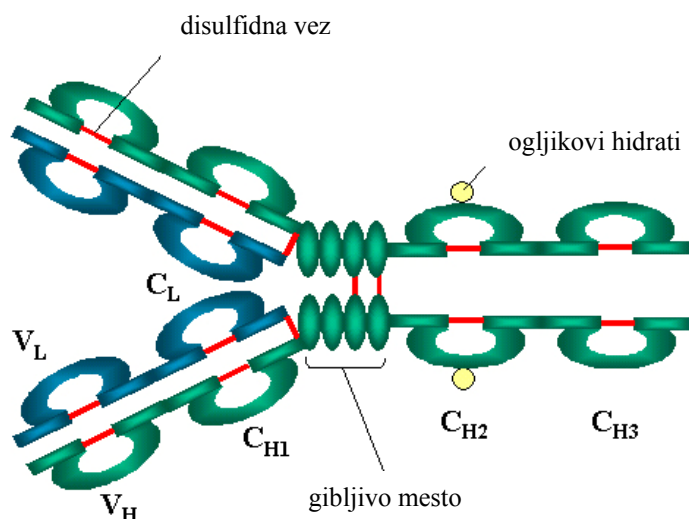
Vsem imunoglobulinom je skupna zgradba, kar so ugotovili na podlagi rezultatov cepljenja molekule imunoglobulinov s tremi pristopi: z reduktivnim cepljenjem, cepljenjem s papinom in cepljenjem s pepsinom (slika 10).

Molekula imunoglobulina ima obliko črke Y, ki so jo preučili z različnimi metodami (z merjenjem hidrodinamičnih in fluorescentnih lastnosti, z elektronsko mikroskopijo in difrakcijo žarkov X). Giblivo mesto omogoča, da se kot med fragmentoma Fab lahko spreminja od 0° do 180° (slika 10) (44).



Slika 10: Shematično prikazana zgradba imunoglobulina, prikaz grobe zgradbe podenot in vezi med njimi.

Imunoglobulini so glikoproteini z oligosaharidi, ki so kovalentno vezani na fragment Fc v težkih verigah. Enota imunoglobulina je sestavljena iz dveh istovetnih lahkkih in dveh istovetnih težkih verig. Na sliki 10 so nakazane vezi S – S med verigami in gibljivo območje (zglob) ter vezišče za antigen. Vsako protitelo ima dve vezišči za antigen (označeno na sliki 11) - (F_{AB}), sestavljata pa ju segmenta označena z V_H in V_L (slika 12). Velika črka V se uporablja za označevanje variabilne regije, C pa za označevanje konstantne. Lahke verige imajo en variabilni segment (V_L) in en konstantni segment (C_L), težke verige pa imajo en variabilni segment (V_H) in tri konstantne segmente (C_H). Te homologne regije ali segmenti, ki se ponavljajo, tvorijo zanke (»domain«), v kateri je približno 110 aminokislin in so sklenjene z vezjo S – S, sestavljeno iz približno 60 aminokislin (44).

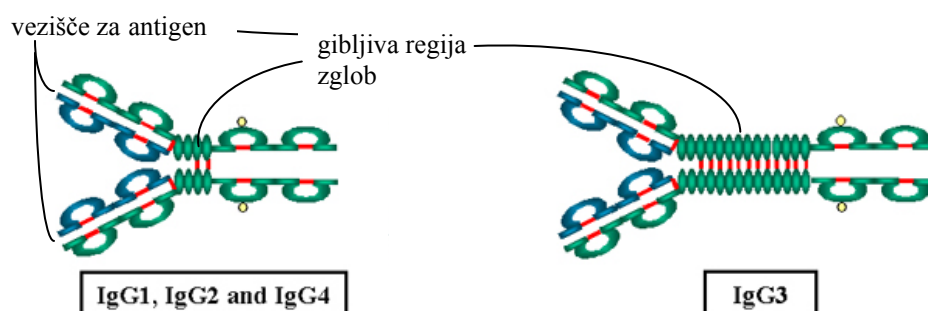


Slika 11: Shematično prikazana zgradba imunoglobulina.

Po izotipskih determinantah težkih verig razvrstimo imunoglobuline v pet razredov: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, ter v podrazrede IgG 1 – 4 in IgA 1 – 2.

1. 6. 2. a) Strukturne značilnosti in biološke lastnosti IgG, IgM in IgA protiteles:

IgG

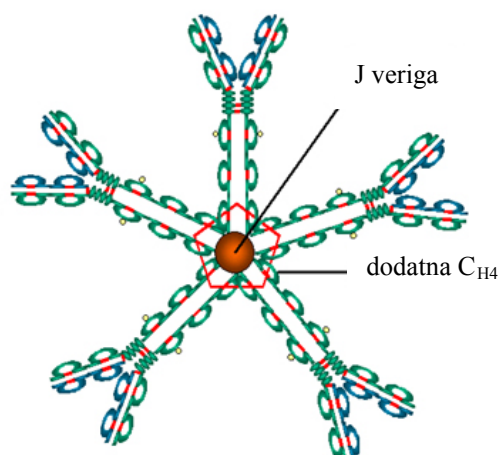


Slika 12: Shematični prikaz zgradbe protitelesa IgG.

IgG (slika 12) - protitelesa so monomerne molekule, sestavljene iz dveh težkih in dveh lahkih γ verig. V tem razredu so štiri porazdeli IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, ki se med seboj razlikujejo po številu vezi S – S v gibljivem delu molekule. Nastajajo pri naravni infekciji

ali pri imunizaciji z virusi, bakterijami ali njihovimi produkti. Ta protitelesa so približno enakomerno porazdeljena v krvi in tkivnih tekočinah. So zelo dolgo živeča protitelesa, saj v krvi ostanejo kar 40 dni, so opsonini, pospešujejo fagocitozo ter aktivirajo komplement (44).

IgM

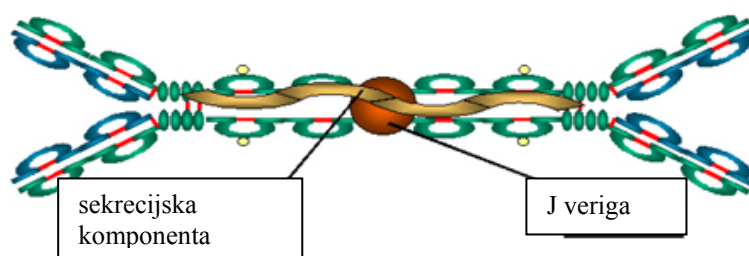


Slika 13: Shematični prikaz zgradbe protitelesa IgM.

IgM (slika 13) - protitelesa so sestavljena iz petih enot, povezanih med seboj z vezmi S – S blizu gibljivega mesta v težki verigi. Zaradi svoje velike molekulske mase ne more dobro difundirati, zato ga najdemo v medceličnih tkivih v zelo majhnih količinah. Veriga J (ang. join) omogoča, da se IgM veže na receptorje na sekrecijskih celicah in se izloča na sluznično površino. Tako so IgM protitelesa pomembni dopolnilni sekrecijski imunoglobulini.

Nastajajo redno skoraj pri vseh imunskih odzivih in so pri primarnem imunskem odzivu prisotna hitreje in v večji količini kot protitelesa IgG . Močno aktivirajo komplement (44).

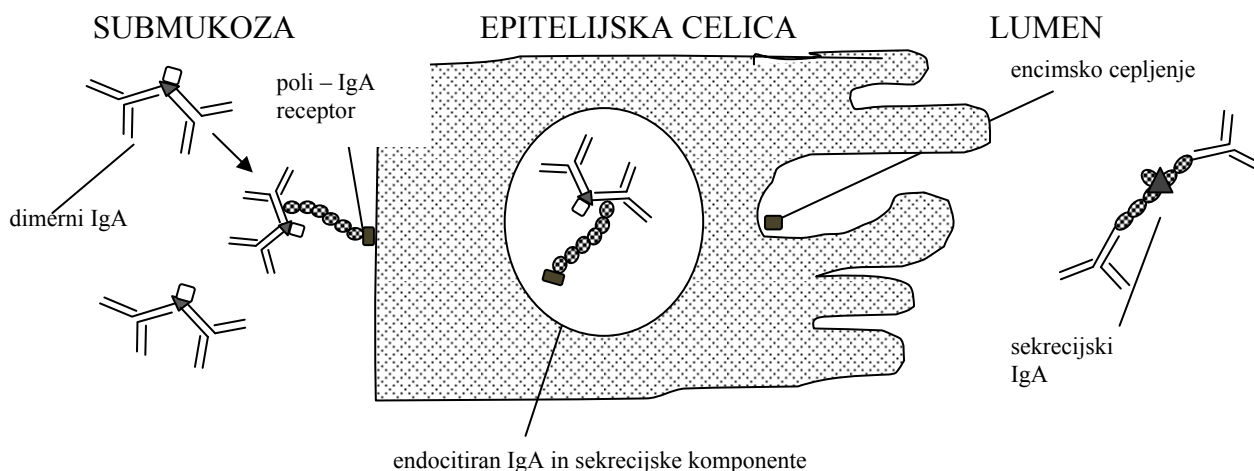
IgA



Slika 14: Shematično prikazana zgradba protitelesa IgA.

IgA (slika 14) – v razredu protitelesa IgA sta dva podrazreda, IgA1 in IgA2. Prvega je v krvi 90 %, drugega pa 10 %. Večina teh protiteles nastaja lokalno predvsem v črevesju. Izdelujejo jih plazmatke v submukozi. V serumu so v monomerni obliki, po prehodu skozi submukozo pa prevzamejo posebno obliko – dimerno, oba dela pa povezujeta dve dodatni verigi, J ter sekretijska veriga (slika 14). Dimerne molekule, ki jih izdelujejo plazmatke v submukozi, se vežejo na specifičen receptor za Fc dimernih molekul IgA na površini epiteljskih celic. Ta receptor imenujemo tudi sekretijska komponenta na bazalni površini epiteljske celice, ki je obrnjena h krvi. Po prehodu IgA skozi celico protitelesu ostane nekaj sekretijske verige (slika 15).

IgA protitelesa v črevesju preprečujejo stik patogenih organizmov s celicami črevesja in jih tako ščitijo pred poškodbo. IgA so slabi opsonini in ne aktivirajo komplementa. Najdemo jih tudi v solznicah, rodilih in urogenitalnem traktu, so pa tudi pomemben del novorojenčkove obrambe, saj dobi ta protitelesa z materinim mlekom (44).



Slika 15: Nastanek sekretijske oblike protitelesa IgA.

1. 6. 3. Imunski odgovor

Borelije pridejo v telo preko klopa, ki se hrani s krvjo gostitelja in med hranjenjem izloča slino, v kateri so borelije. Po prehodu bakterije v drugo okolje, se borelija lahko spremeni. Različne vrste borelij lahko povzročajo različne klinične slike bolezni prav tako pa tudi različne imunske odzive (32). Rezultati eksperimentov so pokazali, da se bakterija lahko v koži razmnožuje kar dolgo, ne da bi povzročila imunski odgovor. Antigeni nato sprožijo v telesu nastanek celičnega in protitelesnega imunskega odziva (10, 45).

Pri primarnem imunskem odzivu, se najprej začnejo proizvajati protitelesa IgM. Ta so najpogostejše usmerjena proti flagelinu – 41 kDa velikemu antigenu in OspC. Pojavijo se tudi fagociti, ki so pomembni del nespecifičnega obrambnega mehanizma. Pri *erythema migrans*, v zgodnjem stadiju, se pojavijo tudi makrofagi. Kasneje, v diseminirani fazi bolezni, pa se pojavijo polimorfonuklearni levkociti in monociti (Szczepanski in Benach, 1991). V desiminirani fazi se poveča delovanje celic ubijalk ter plazmatk, ki povečano izdelujejo antigen specifična protitelesa. Pojavi se povečan odziv specifičnih limfocitov T (46). Protitelesa IgM zasledimo 3 – 6 tednov po okužbi, protitelesa IgG pa po približno 2 – 3 mesecih. Tako lahko okvirno določimo ali gre za zgodnjo, akutno okužbo (povišana koncentracija protiteles IgM) ali gre za preteklo oziroma dalj časa trajajočo okužbo (povišana koncentracija protiteles IgG). Količina protiteles IgM lahko ostane visoka med okužbo, lahko pa njihova koncentracija pade že po 8 tednih. V tem obdobju lahko zaznamo imunske komplekse, ki krožijo po telesu, celotni serumski IgM in včasih revmatoidni faktor (47).

Med drugo in v tretji fazi porastejo specifična protitelesa IgG. Čeprav je tudi v prvi fazi lahko zaznan odziv protiteles IgG, je ta predvsem usmerjen proti flagelinu. Kasneje se izoblikuje odziv tudi na antigene OspA in OspB ter močnejši imunski odziv na OspC. Značilni antigeni pozne faze so tudi antigeni p100 in p17, p39, VlsE, postopno pa narašča tudi imunski odziv bolnikov na druge antigene (22). Težave lahko povzročijo tudi imunski kompleksi, ki jih telo ne odstrani oziroma jih ni zmožno odstraniti iz telesa. To se pogosto zgodi pri nezdravljenih bolnikih (bolezni opisane v preglednici 1).

Protitelesa so specializirana za ubijanje celic (antigenov) po klasični komplementarni poti. Pri bolnikih z zgodnjo in kronično obliko bolezni so celice ubijalke inhibirane, fagocitoza pa je redek potek odstranjevanja borelij iz telesa (4, 47).

Čeprav je imunski odziv precejšen, se lahko nekatere bakterije ovijejo s sluzjo in prekrijejo antigene ter perzistirajo v organizmu. Različni imunski odzivi pa se pojavljajo tudi zaradi fenotipske heterogenosti bakterij, ki se kaže z različnim izražanjem antigenov in s sposobnostjo spreminjanja le teh (23).

Protitelesa IgA na splošno zasledimo tako že v prvih stadijih bolezni kot v poznih. Z razliko od protiteles IgG in IgM se protitelesa IgA močnejše proizvajajo lokalno. Tako so na primer pri nevroboreliozi koncentracije v intratekalni tekočini lahko od 2 do 5 krat višja kot v serumu. Proizvajajo se tako monomerna kot polimerna protitelesa. V telesu lahko ostajajo tudi do 4 leta po diagnosticiranju in zdravljenju bolezni, vendar brez sekrecijske komponente (48, 49). Ker ostanejo tako dolgo v telesu lahko sprožijo avtoimunski odziv, ki pa je domnevno rezultat mitogeneze avtoreaktivnih B- celičnih klonov, ne pa specifična aktivacija le teh zaradi *B. burgdorferi* sensu lato (50).

Določanju specifičnih protiteles IgA pri lymski boreliozi nikoli niso posvečali velike pozornosti. Ker pa se pri ljudeh okuženih z *B. burgdorferi* sensu lato občasno pojavlja tudi prizadetost ledvic zaradi avtoimunskih dogajanj, ki jih sprožijo protitelesa IgA, nas je zanimala vloga le teh pri diagnosticiranju. Zanimivo je tudi, da so se nekatere bolezenske okužbe pri psih končale smrtno prav zaradi odpovedi ledvic, kjer bi lahko bila vpletena protitelesa IgA (51).

1. 7. DIAGNOSTIKA BORELIJSKIH OKUŽB

Zanesljivo lahko potrdimo lymsko boreliozo z značilnim kliničnim znakom *erythema migrans*, ki se pojavi v zgodnjem obdobju bolezni. Pri ostalih bolezenskih spremembah, ki se pojavljajo brez značilnega izpuščaja ali v kasnejših fazah bolezni, pa je potrebno bolniku diagnozo potrditi z mikrobiološkimi preiskavami.

Glede na potek okužbe uporabljamo različne mikrobiološke metode. Pogosto jih kombiniramo. Vsaka metoda ima svojo občutljivost in specifičnost, merila za njihovo vrednotenje pa temeljijo na kliničnih izkušnjah (52, 53).

Borelijsko okužbo najpogosteje dokazujemo z naslednjimi metodami:

- 1) osamitev *B. burgdorferi* sensu lato iz kliničnega materiala
- 2) dokazovanje molekule deoksiribonukleinske kisline (DNA) borelij z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)
- 3) dokaz specifičnih protiteles, usmerjenih proti borelijskim antigenom

S prvima dvema metodama neposredno dokazujemo borelijsko okužbo, s tretjo pa okužbo dokažemo posredno z dokazom bolnikovega imunskega odziva na borelijske antigene (9).

1. 7. 1. Osamitev borelij

Borelije osamimo iz kože, likvorja, krvi, sinovijske tekočine bolnikov tako pri zgodnji kot pri pozni okužbi. Osamitev je najzanesljivejša metoda dokazovanja lymfske borelioze. Vzorce čimprej cepimo v gojišče, odvzeti pa morajo biti pred antibiotično terapijo. Ker so ugotovili, da je borelij v vzorcih malo je priporočljivo odvzeti čim večji vzorec in ga kar najhitreje cepiti v gojišče. Najbolje jih je cepiti takoj ob bolniku, saj tako preprečimo propadanje bakterij med transportom (54). Poskus izolacije borelij iz kliničnega vzorca traja najmanj 9 tednov, ker borelije rastejo počasi. Metode ne uporabljamo rutinsko zaradi časovnih omejitev in agresivnosti posega.

1. 7. 2. Dokaz molekule DNA

Dokazovanje borelijske DNA sodi med novejšje metode molekularne biologije, ki jo uporabljamo za potrditev borelijske okužbe. Borelijsko DNA lahko dokažemo v različnih organih in telesnih tekočinah (koža, kri, likvor, sinovijska tekočina) ter v živalih, ki so rezervoar borelij. Metoda PCR temelji na tem, da izberemo določen odsek borelijske DNA in ga pomnožimo s termostabilno polimerazo. Prednost metode je, da je zelo občutljiva in hitra, da lahko dokažemo borelije pri ljudeh z netipičnim potekom bolezni ali pri ljudeh, ki ne razvijejo zadostnega imunskega odgovora. Metoda še ni popolnoma standardizirana in z njo ne moremo ločiti živih borelij od odtenkov njihove DNA, zato se rutinsko še ne uporablja v diagnostiki (55).

1. 7. 3. Dokazovanje specifičnih protiteles

V serumu, likvorju in sinovijski tekočini bolnikov je dokazovanje specifičnih protiteles rutinska metoda dokazovanja borelijske okužbe. Specifična protitelesa razreda IgM in IgG

dokazujemo z različnimi serološkimi testi: encimsko-imunski (ELISA), imunofluorescentni (IFT) (8, 56) ali imuno-blot (imuno-western blot) (22, 57). Testi so že tovarniško pripravljeni in zato dostopni mnogim mikrobiološkim laboratorijem po svetu, metode so hitre in poceni. Pri zgodnji lokalizirani okužbi, kot je *erythema migrans*, ugotovimo približno četrtno bolnikov, ki so razvili protitelesa, pri kronični obliki bolezni pa v skoraj pri vseh bolnikih lahko dokažemo protitelesa. Kaže, da s kroničnostjo okužbe narašča število serološko pozitivnih bolnikov.

Serološki testi se razlikujejo po metodi testiranja in pripravi antigena, občutljivosti in specifičnosti. Za antigen lahko uporabimo cele borelije, prečiščene beljakovine ali rekombinantne beljakovine. Pomanjkljivost seroloških testov je predvsem v tem, da še niso standardizirani, občutljivost in specifičnost se lahko med testi zelo razlikujeta (9).

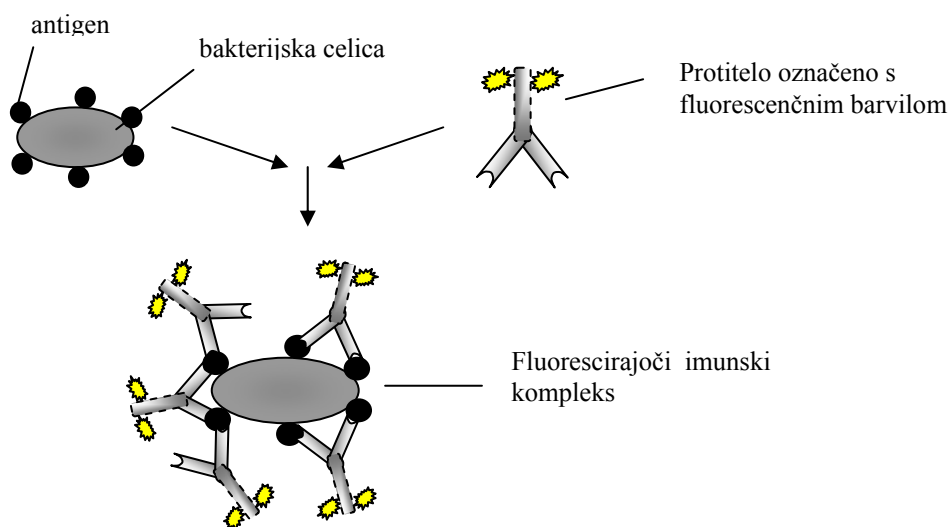
Pri diagnosticiranju borelijske okužbe so zelo pogoste tudi navzkrižne reakcije. Opažamo jih pri določanju IgM in tudi IgG specifičnih protiteles. Najpogostejše so pri bolnikih, ki so okuženi z drugimi borelijami ali sorodnimi bakterijami (predvsem s *Treponema pallidum* pri bolnikih s sifilisom in s treponemami, ki so v ustni votlini). Pri dokazovanju protiteles IgM lahko na rezultate vpliva prisotnost revmatoidnega faktorja (RF) v serumu. RF je protitelo razreda IgM (lahko tudi drugega razreda imunoglobulinov) proti lastnim IgG. RF se lahko veže na kompleks predhodno vezanega IgG protitelesa na antigen, zato dobimo lažno pozitiven rezultat za protitelesa IgM. Navzkrižnim in lažnim reakcijam se skušamo izogniti s predhodno absorpcijo seruma z nepatogenimi treponemami (*T. phagedenis*) in/ali z absorpcijo potencialno prisotnega RF oziroma z njegovo odstranitvijo (8).

1. 7. 3. a) Imunofluorescenčni test – IFT

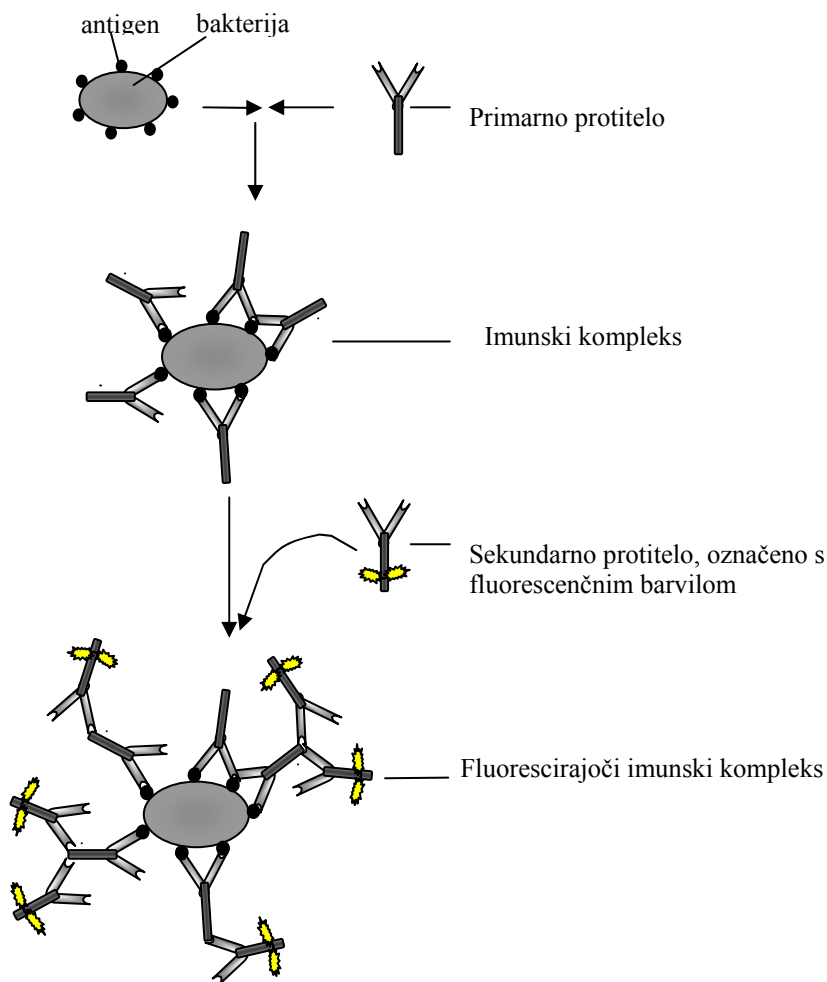
Tehnika imunofluorescence je lahko zelo občutljiva metoda za opredeljevanje s protitelesi vezanih molekul v celicah in tkivih. Pri tej tehniki vežemo fluorescentno barvilo na protitelesa. Najbolj uporabljen je fluorescein izotiocianat (FITC), ki oddaja močno rumenozeleno svetlobo. Barvilo se veže na Fc del protitelesa, ne da bi se pri tem spremenila specifičnost protitelesa. Emitirano svetlobo opazujemo s fluorescenčnim mikroskopom, ki ima svetilko z UV svetlobo in vzbujevalne in zaporne filtre. Ocena testa temelji na jakosti sevanja kromogena, kar pod mikroskopom vidimo kot fluorescirajoče bakterijske celice borelij (44).

Posredni imunofluorescentni test uporabimo, kadar želimo dokazati navzočnost protiteles ali antigenov. Za dokazovanje antigenov uporabimo neposredni IFT (slika 16), za dokazovanje protiteles pa uporabljamo posredni test (slika 17). Pri prvem so označena že primarna protitelesa, pri drugem pa sekundarna. Sekundarna protitelesa se vežejo na primarna bolnikova protitelesa in prikazujejo prisotnost bolnikovih protiteles za borelije. Posredna metoda je veliko bolj občutljiva, saj se na vsako primarno protitelo lahko veže več sekundarnih označenih protiteles (44).

IFT se v serološki diagnostiki lymske borelioze pogosto uporablja. Kot antigen se priporoča uporaba lokalno izoliranega seva borelije, ki izraža poglavitne borelijske antigene (flagelin, OspA, OspC, p100 in druge). Metoda je sicer specifična, občutljiva ter hitra za izvedbo, ocena rezultatov pa je subjektivna, zato mora test izvajati izkušena in strokovno usposobljena oseba (9).



Slika 16: Neposredni imunofluorescenčni test za dokaz antigenov.



Slika 17: Posredni imunofluorescenčni test za dokaz protiteles.

1. 8. ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE

Zaradi neznačilnih ali neizrazitih znakov bolezni pri lymski boreliozi, je zanesljivo diagnozo včasih težko oziroma nemogoče postaviti. Vsekakor pa je prav pravilna diagnoza ključnega pomena pri uspešnem zdravljenju. Antibiotike zdravnik predpiše vsem bolnikom z značilnim *erythema migrans*, bolnikom z neznačilno klinično sliko pa je potrebno mikrobiološko dokazati okužbo.

Zdravljenje je smiselno v vseh stadijih bolezni, najuspešnejše pa je v zgodnjih (58, 59).

Izbira antibiotika je odvisna od več dejavnikov, predvsem pa od tega kateri organi so prizadeti in koliko časa ta prizadetost traja. Z intravenoznim zdravljenjem s ceftriaksonom zdravijo pozne oblike lymfske borelioze s prizadetostjo osrednjega živčnega sistema, za zdravljenje z *erythema migrans* pa se uporabljajo antibiotiki doksiciklin, amoksicilin ali azitromicin v oralnih odmerkih (58).

V Evropi zaradi različnosti borelijskih vrst in njihovih morfoloških lastnosti še nimamo cepiva. V ZDA je bilo med leti 1999 in 2001 na voljo cepivo, ki je bilo narejeno iz rekombinantnega proteina OspA. Cepivo je pri poskusnih osebah sprožilo zadovoljiv imunski odziv, ki je obranil ljudi pred okužbo z *B. burgdorferi* sensu stricto, vendar stanski učinki niso bili zanemarljivi, zato so cepljenje ukinili (60). Učinkovitost cepiva je temeljila na prisotnosti le ene vrste borelije (*B. burgdorferi* sensu stricto), ki je tudi sicer prisotna na področju ZDA (61).

V Evropi je zato potrebno širjenje osveščenosti ljudi pri preprečevanju okužbe z borelijami. Pri gibanju v endemičnih področjih je priporočljiva primerna obutev in ustrezna oblačila (najprimernejša so svetla in dolga oblačila). Ob vrnitvi domov se je potrebno pregledati ter klope odstraniti. Mesto vboda moramo opazovati še nadaljnjih 30 dni ter ob pojavu prvih kliničnih znakov poiskati zdravniško pomoč (60).

2. NAMEN NALOGE

Med potekom lymfske borelioze kot odgovor na okužbo nastajajo različna specifična protitelesa. Namen diplomske naloge je bil:

- ugotoviti ali med okužbo z borelijami nastajajo poleg specifičnih protiteles IgG in IgM, tudi specifična protitelesa proti *B. burgdorferi* sensu lato razreda IgA
- pripraviti in ovrednotiti posredni IFT za dokaz specifičnih protiteles IgA z uporabo *B. afzelii* kot antigen
- preveriti hkratno prisotnost specifičnih protiteles razreda IgA s specifičnimi protitelesi razreda IgG in IgM.

3. MATERIALI IN METODE

3. 1. BOLNIKI IN VZORCI

V raziskavo smo vključili 260 serumov bolnikov s sumom na lymsko boreliozo ali z že potrjeno boleznijo iz zbirke Laboratorija za diagnostiko borelioz in leptospiroze na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, ki so bili poslani na rutinsko testiranje in smo jim že določili titre protiteles IgM in IgG. Izbrali smo točno določene vzorce serumov ter jih razvrstili v skupine:

- skupina 1: serumi brez protiteles proti borelijam (100 serumov)
- skupina 2: serumi s prisotnimi protitelesi IgG in brez protiteles IgM (99 serumov)
- skupina 3: serumi brez protiteles IgG in s protitelesi IgM (31 serumov)
- skupina 4: serumi s prisotnimi protitelesi IgG in IgM (30 serumov).

Ponovno smo jim določili specifična protitelesa IgM in IgG ter dodatno še specifična protitelesa IgA. Kontrolna skupina so bili serumi 100 bolnikov, ki niso imeli pozitivnih rezultatov pri določanju protiteles IgG in IgM proti borelijskim antigenom. Dodatno smo še testirali z imunofluorescentnim testom z absorpcijo in določili titra protiteles IgM in IgA. S postopkom absorpcije odstranimo protitelesa IgG, ki lahko vplivajo na rezultat pri določanju protiteles IgM in IgA, saj vsa protitelesa tekmujejo za antigen.

3. 2. METODE TESTIRANJA

Vzorce smo testirali z IFT in z IFT z absorpcijo. Pri prvem določanju smo določili titre protiteles IgG, IgM in IgA, pri drugem določanju pa smo odstranili protitelesa IgG in določili titre protiteles IgM in IgA.

3. 2. 1. Posredni imunofluorescenčni test brez absorpcije

Uporabili smo posredni IFT, pri katerem se uporablja *B. afzelii* kot antigen, ki izraža beljakovine OspA, OspB in OspC. Vrsto bakterije se določi z elektroforezo v utripajočem polju (PFGE), beljakovine OspA, OspB in OspC pa s proteinskim profilom (12, 23).

3. 2. 1. a) Princip testa

Ustrezna koncentracija borelij je pritrjena na objektno steklice in predstavlja antigen. Če so v dodanem serumu navzoča protitelesa IgG, IgM ali IgA proti borelijskim antigenom, se z antigenom vežejo v imunski kompleks. Nevezana protitelesa odstranimo s spiranjem. Dodamo s fluorokromom označena sekundarna protitelesa, ki se vežejo na primarna protitelesa. Sekundarna protitelesa so označena s FITC (florescein izotiocianat). Po inkubaciji speremo nevezane konjugate. Na steklice damo imerzijsko olje in mikroskopiramo pod UV svetlobo. Pri tem testu določamo celokupna protitelesa iz razreda IgG, IgM in IgA. Količino protiteles ovrednotimo s titrom, ki je najnižja še zaznavna razredčina seruma v postopku, ki reagira z antigenom.

3. 2. 1. b) Material in oprema za IFT brez absorpcije

- Pufer PBS+BSA – pufer za redčenje vzorca

98 ml PBS (ang. Phosphate buffer saline) + 2 ml 30 % BSA (ang. bovine serum albumin, Sigma)

- Pufer PBS (pH = 7,4) – pufer za spiranje

NaCl	78,85 g
K ₂ HPO ₄	26,1055 g
KH ₂ PO ₄	3,9 g
Voda	10 l
pH	7,4

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

- Pozitivna kontrola: serum, ki ima titer protiteles 256

- Negativna kontrola: pufer PBS+BSA, v katerem redčimo vzorec

- Ovčja antihumana protitelesa IgM, IgG označen s FITC - konjugat

INEP, Zemun, R.Srbija, ki ga redčimo v pufru PBS od 1:100 do 1:400 za IgM in IgG

- Ovčja antihumana protitelesa IgA označen s FITC – konjugat

SIGMA – ALDRICH, USA, ki ga redčimo v pufru PBS od 1:16 za IgA

- Pufer PBS + MgCl₂ - za spiranje borelij pri pripravi antigena

0,01 M PBS (pH = 7,4)

5 mM MgCl₂

- Imerzijsko olje: 9 ml glicerina + 1 ml PBS pH 7,4
- Objektna stekelca
- Krovna stekelca
- Mikrotitrne ploščice
- Nastavljive pipete
- Nastavki za pipete
- Termostat 33 °C
- Termostat 37 °C
- Hladilna omara – 80 °C
- Centrifuga
- Aluminijasta folija
- UV mikroskop
- Mikroskop s temnim poljem
- Modificirano Kelly-Pettenkofferjevo (MKP) gojišče:

Osnovno gojišče:	CMRL – 1066 (10 X) z glutaminom	100,0 mL
(pH = 7,6)	destilirana voda	900,0 mL
	neopeton	3,0 g
	hepes	6,0 g
	citronska kislina	0,7 g
	glukoza	3,0 g
	piruvična kislina	0,8 g
	N-acetilglukozamini	0,4 g
	natrijev bikarbonat	2,0 g
Kompletno gojišče:	osnovni medij	50,00 mL
	7 % želatina	10,00 mL
	zajčji serum	3,60 mL
	goveji serumski albumin	1,75 mL

3. 2. 1. c) Priprava antigena za IFT z in brez absorpcije

- v epruvete s 6,5 mL gojišča MKP cepimo 0,5 mL odmrznjene kulture bakterij in jih pri temperaturi 33 °C inkubiramo 3-4 dni. Nacepili smo sev *B. afzelii*, ki izraža beljakovine OspA, OspB in OspC, izolirana je iz kože slovenskega bolnika
- pri 400 kratni povečavi v temnem polju kontroliramo število in gibljivost bakterij

- centrifugiramo 20 minut pri 22 °C pri 10 000 obratih/min. supernatant odlijemo, pustimo $\frac{1}{4}$ sedimenta in ga izpiramo s pufrom PBS + $MgCl_2$ in zopet centrifugiramo. Postopek ponovimo še trikrat
- odlijemo supernatant, sediment pa mikroskopiramo v temnem polju
- sediment redčimo s pufrom PBS + $MgCl_2$, dokler ne dobimo v enem vidnem polju 8-10 borelij
- antigen nakapljamo na objektna stekelca, jih posušimo na sobni temperaturi (12 ur), zavijemo v folije in hranimo pri -80 °C do treh mesecev

3. 2. 1. d) Izvedba IFT testa brez absorpcije

Določili smo protitelesa IgM, IgG in IgA v serumu, najprej s presejalnim testom, nato pa smo vse pozitivne vzorce v presejalnem testu redčili in opredelili titer protiteles.

1. v luknjice na mikrotitrski ploščici nakapljamo pufer za redčenje vzorca, v prvo luknjico 150 μ L, nato pa 5-krat 50 μ L.
Mikrotitrške ploščice (8x12) označimo tako, da vsaka vrstica (8 luknjic) pripada drugemu vzorcu. Pozitivno kontrolo damo v prvo luknjico prve vrstice, negativno kontrolo oziroma pufer pa nakapljamo direktno na objektno steklece.
2. v prvo luknjico druge vrstice (v kateri je 150 μ l pufru) dodamo 10 μ l vzorca (serum) in premešamo
3. iz prve luknjice vzamemo 50 μ l in prenašamo naprej do zadnje luknjice s pufrom.
Tako dobimo razredčine:
1:16 1:32 1:64 1:128 1:256 1:512
4. na objektna stekelca z antigenom nanesemo 10 μ l razredčine (postopek nanašanja za dokazovanje določenih protiteles je prikazan na slikah 18. a - c).

▪ za določanje IgM protiteles

+ kontrola						128 titer
- kontrola						256 titer
	VZ 1	VZ 2	VZ 3	VZ 4		

Slika 18. a: Nanašanje kontrol ter vzorcev pri presejalnih določitvah titrov protiteles IgM.

+K	-K					
						
					VZ 1	
64	128	256	512	1024		

					VZ 2
					VZ 3
64	128	256	512	1024	

Slika 18. b - c: Nanašanje pozitivne in negativne kontrole ter vzorcev pri nadaljnjem določanju titrov protiteles IgM.

▪ za določanje IgG protiteles (slika 19. a - b)

					1:128
					1:256
KO	VZ1	VZ2	VZ3	VZ4	

					1:128
					1:256
VZ 5	VZ 6	VZ 7	VZ 8	VZ 9	

Slika 19. a - b: Nanašanje pozitivne in negativne kontrole ter vzorcev pri določanju titrov protiteles IgG.

▪ za določanje IgA protiteles (slika 20. a - c)

					32
					64
KO	VZ 1	VZ 2	VZ 3	VZ 4	

Slika 20. a: Nanašanje kontrol ter vzorcev pri presejalnih določitvah titrov protiteles IgA.

					KO
					VZ 1
1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	

					VZ 2
					VZ3
1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	

Slika 20. b - c: Nanašanje pozitivne in negativne kontrole ter vzorcev pri nadaljnjem določanju titrov protiteles IgA.

- stekelca nato inkubiramo 30 min v vlažni komori pri 37 °C, sledi spiranje 3-krat po 5 minut s PBS pufrom (pH = 7,4) in sušenje na sobni temperaturi
- pripravimo antihumani IgM, IgG ali IgA konjugat, ga nanesemo na stekelca in ponovno inkubiramo 30 minut pri 37 °C v vlažni komori
- sledi spiranje 3-krat po 5 minut s pufrom PBS
- na posušena stekelca nanesemo kapljico imerzijskega olja, jo prekrijemo s krovnim stekelcem in mikroskopiramo pod mikroskopom z UV svetlobo pri 400-kratni povečavi
- jakost fluorescence primerjamo s pozitivno in negativno kontrolo

3. 2. 1. e) Vrednotenje IFT brez absorpcije

Test IFT smo obravnavali kot pozitiven, če je bil titer protiteles IgM in IgG 256 ali več. Titer 128 smo obravnavali kot mejni, nižje titre (64 ali manj) pa kot negativne.

Če je bil titer protiteles IgA 64 ali več, smo rezultat vrednotili kot pozitiven, titer 32 pa je predstavljal mejno vrednost, nižji titri pa so bili negativni.

Vse vzorce, ki so kazali močno fluorescenco pri titru 256 pri določanju protiteles IgM in IgG smo redčili naprej do titra 1024 in opredelili titer za posamezni vzorec in posamezni razred protiteles.

Pri protitelesih IgA smo presejalno najprej določili jakost fluorescence do ttra 32 in nato pozitivne redčili naprej do titra 256 in opredelili titer za posamezni vzorec.

3. 2. 2. Posredni imunofluorescenčni test z absorpcijo

Uporabili smo posredni IFT, pri katerem se uporablja enak antigen kot za IFT brez absorpcije.

3. 2. 2. a) Princip testa

Serumu bolnika dodamo predpisano količino absorbenta, dobro premešamo in pustimo v hladilniku čez noč. Absorbent veže nase prisotna protitelesa IgG, ki bi lahko motila določanje protiteles IgM ali protiteles IgA. Nato sledi postopek za določanje protiteles podoben testu brez absorpcije.

Pri tem testu določamo celokupna protitelesa IgM in IgA proti borelijskim antigenom s predhodno odstranitvijo protiteles IgG.

3. 2. 2. b) Material in oprema za IFT z absorpcijo

Poleg materiala in opreme za IFT brez absorpcije potrebujemo še:

- Hladilnik (temperatura +4 °C)
- Vrtinčnik
- Epruvete
- Absorbent RF: RF Absorbent, liofiliziran, Dade Behring, Nemčija

3. 2. 2. c) Izvedba IFT testa z absorpcijo

S tem testom smo določili protitelesa IgA in IgM najprej s presejalnim testom in nato smo vse pozitivne vzorce titrirali do konca in opredelili zadnji pozitivni titer.

- v epruveti razredčimo serum v absorbentu v naslednjem razmerju:

10 µl seruma + 150 µl Abs (1:16)

- inkubiramo čez noč pri +4 °C (v hladilniku)
- naslednji dan premešamo ependorfke in jih centrifugiramo 15 minut pri 10 000 obratih/min. za nadaljnje določanje uporabljamo samo supernatant.

- v luknjice vsake posamezne vrstice mikrotitrne ploščice nakapljamo pufer PBS+BSA v sledečih količinah (μ l) od druge luknjice naprej:

/ 50 50 50 50 50

- 100 μ l supernatanta nakapljamo v prvo luknjico mikrotitrne ploščice

- iz prve luknjice vzamemo 50 μ l in prenašamo naprej do zadnje luknjice s pufrom. Tako dobimo razredčine:

1:16 1:32 1:64 1:128 1:256 1:512

- 10 μ l razredčine nanesemo na stekelca z antigenom

- za določanje IgM protiteles (slika 21. a - c)

					32 titer
					64 titer
KO	VZ 1	VZ 2	VZ 3	VZ 4	

Slika 21. a: Nanašanje kontrol ter vzorcev pri presejalnih določitvah titrov protiteles IgM.

+K	-K					
					VZ 1	
64	128	256	512	1024		

					VZ 2
					VZ 3
64	128	256	512	1024	

Slika 21. b - c: Nanašanje pozitivne in negativne kontrole ter vzorcev pri nadaljnjem določanju titrov protiteles IgM.

- za določanje IgA protiteles (slika 22. a - c)

					16
					32
KO	VZ 1	VZ 2	VZ 3	VZ 4	

Slika 22. a: Nanašanje kontrol ter vzorcev pri presejalnih določitvah titrov protiteles IgA.

					KO
					VZ 1

1:16 1:32 1:64 1:128 1:256

					VZ 2
					VZ3

1:16 1:32 1:64 1:128 1:256

Slika 22. b - c: Nanašanje pozitivne in negativne kontrole ter vzorcev pri nadaljnjem določanju titrov protiteles IgA.

- ploščice nato inkubiramo 30 min v vlažni komori pri 37 °C, sledi spiranje 3-krat po 5 minut s PBS pufrom (pH = 7,4) in sušenje na sobni temperaturi
- pripravimo antihumani IgM ali IgA konjugat, ga nanesemo na stekelca in ponovno inkubiramo 30 minut pri 37 °C v vlažni komori
- sledi spiranje 3-krat po 5 minut s pufrom PBS
- na posušena stekelca nanesemo kapljico imerzijskega olja, jo prekrijemo s krovnim stekelcem in mikroskopiramo pod mikroskopom z UV svetlobo pri 400-kratni povečavi
- jakost fluorescence primerjamo s pozitivno in negativno kontrolo, ki ju nakapljamo na prvi dve mesti na ploščici vsake nove serije testa

3. 2. 2. d) Vrednotenje IFT testa z absorpcijo

Test IFT z absorpcijo smo obravnavali kot pozitiven, če je bil titer protiteles IgM 64 ali več. Titer 32 smo obravnavali kot mejni rezultat, nižje titre (16 ali manj) pa kot negativen rezultat.

Če je bil titer protiteles IgA 16 ali več, smo rezultat vrednotili kot pozitiven. Titer 8 je predstavljal mejno vrednost, nižje titre pa smo obravnavali kot negativen rezultat.

4. REZULTATI

Za dokaz specifičnih protiteles proti borelijskim antigenom in sočasno prisotnost protiteles IgA z IgM ter protiteles IgA z IgG smo testirali vzorce serumov z IFT brez absorpcije in IFT z absorpcijo. Vzorce smo razvrstili v 4 skupine:

- skupina 1: serumi brez protiteles proti borelijam (100 serumov)
- skupina 2: serumi s prisotnimi protitelesi IgG in brez protiteles IgM (99 serumov)
- skupina 3: serumi brez protiteles IgG in s protitelesi IgM (31 serumov)
- skupina 4: serumi s prisotnimi protitelesi IgG in IgM (30 serumov).

4. 1. REZULTATI POSAMEZNIH TESTIOV

Z IFT testom smo dokazovali celokupna protitelesa razredov IgM, IgG in IgA proti borelijskim antigenom ter njihovo sočasno prisotnost. Pri tem smo kot antigen uporabili *B. afzelii*, ki izraža beljakovine OspA, OspB in OspC. Za kontrolno skupino smo uporabili serume, ki so bili pri predhodni rutinski preiskavi negativni (1. skupina).

4. 1. 1. SKUPINA BOLNIKOV BREZ PROTITELES PROTI BORELIJAM (1. skupina)

Pri 1. skupini bolnikov, ki ni imela prisotnih protiteles IgG in IgM (100 serumov) nismo pri nobenem vzorcu dokazali specifičnih protiteles IgA.

4. 1. 2. SKUPINA BOLNIKOV S SERUMI S PRISOTNIMI PROTITELESI IgG IN BREZ PROTITELES IgM (2. skupina)

V tej skupini 99 bolnikov nismo pri nobenem vzorcu dokazali sočasne prisotnosti protiteles IgA. Dokazali smo le protitelesa IgG pri tem pa ostali dve skupini protiteles nista bili pozitivni tako pri IFT testu brez absorpcije kot pri IFT testu z absorpcijo.

4. 1. 3. SKUPINA BOLNIKOV S SERUMI BREZ PROTITELES IgG IN S PROTITELESIGM (3. skupina)

Pri določanju sočasne prisotnosti protiteles IgM in IgA v vzorcih, ki nimajo prisotnih protiteles IgG, smo dobili pozitivne reakcije prisotnosti protiteles IgA v 10 od 31 vzorcev. Rezultati so prikazani v preglednici 2.

Preglednica 2 : Rezultati IFT brez absorpcije z *B. afzelii* kot antigenom ter primerjava sočasne prisotnosti protiteles IgM z protitelesi IgA v 3. skupini bolnikov (serumi brez protiteles IgG in s protitelesi IgM).

Protitelesa IgM	Protitelesa IgA			SKUPAJ
	Pozitivni rezultati	Mejni rezultati	Negativni rezultati	
	Titer 64 ali več	Titer 32	Titer 16 ali manj	
Pozitivni rezultati Titer 256 ali več	10 (32,26 %)	12 (38,71 %)	8 (25,8 %)	30 (96,8 %)
Mejno pozitivni rezultati Titer 128	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (3,2 %)	1 (3,2 %)
Negativni rezultati Titer 64 ali manj	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
SKUPAJ	10 (32,26 %)	12 (38,71 %)	9 (29,0 %)	31 (100 %)

4. 1. 4. SKUPINA BOLNIKOV S PRISOTNIMI PROTITELESIGM in IgG (4. skupina)

Pri primerjavi sočasne prisotnosti protiteles IgA z protitelesi IgM ter IgG smo dobili pozitivne reakcije tako pri IFT testu brez absorpcije kot pri IFT testu z absorpcijo.

4. 1. 4. a) IFT test brez absorpcije

Pri IgG in IgM pozitivnih serumih smo dobili sočasno prisotna protitelesa IgA v 19 od 30 vzorcev (63,33 %).

Rezultate smo primerjali posebej s protitelesi IgM ter s protitelesi IgG (Preglednica 3 in 4).

Preglednica 3: Rezultati IFT brez absorpcije z *B. afzelii* kot antigenom ter primerjava sočasne prisotnosti protiteles IgM s protitelesi IgA v 4. skupini bolnikov (IgG in IgM pozitivni serum).

Protitelesa IgM		Protitelesa IgA					
		Pozitivni rezultati			Mejno pozitivni rezultati	Negativni rezultati	SKUPAJ
		Titer ≥ 256	Titer 128	Titer 64	Titer 32	Titer ≤ 16	
Pozitivni rezultati	Titer več kot 256	5 (16,67 %)	2 (6,7 %)	2 (6,7 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	9 (30,0 %)
	Titer 256	0 (0 %)	4 (13,3 %)	3 (10,0 %)	2 (6,7 %)	1 (3,3 %)	10 (33,3 %)
Mejno pozitivni rezultati	Titer 128	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (10,0 %)	5 (16,67 %)	3 (10,0 %)	11 (36,67 %)
Negativni rezultati	Titer ≤ 64	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
SKUPAJ		5 (16,7 %)	6 (20,0 %)	8 (26,7 %)	7 (23,3 %)	4 (13,3 %)	30 (100 %)

Preglednica 4: Rezultati IFT brez absorpcije z *B. afzelii* kot antigenom ter primerjava sočasne prisotnosti protiteles IgG protitelesi IgA v 4. skupini bolnikov (IgG in IgM pozitivni serumi).

Protitelesa IgG		Protitelesa IgA					
		Pozitivni rezultati			Mejno pozitivni rezultati	Negativni rezultati	SKUPAJ
		Titer ≥ 256	Titer 128	Titer 64	Titer 32	Titer ≤ 16	
Pozitivni rezultati	Titer več kot 256	5 (16,7 %)	4 (13,3 %)	7 (23,3 %)	3 (10,0 %)	1 (3,3 %)	20 (66,7 %)
	Titer 256	0 (0 %)	2 (6,7 %)	1 (3,3 %)	4 (13,3 %)	3 (10,0 %)	10 (33,3 %)
Mejno pozitivni rezultati	Titer 128	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Negativni rezultati	Titer ≤ 64	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
SKUPAJ		5 (16,7 %)	6 (20,0 %)	8 (52,7 %)	7 (23,3 %)	4 (13,3 %)	30 (100 %)

4. 1. 4. b) IFT test z absorpcijo

Z absorpcijo smo odstranili prisotna protitelesa IgG ter v preglednici 5 prikazali rezultate.

Po absorpciji smo ugotovili 14 pozitivnih in 4 mejne vrednosti protiteles IgA v 4. skupini bolnikov (IgG in IgM pozitivni serumi).

Preglednica 5: Rezultati IFT z absorpcijo z *B. afzelii* kot antigenom ter primerjava sočasne prisotnosti protiteles IgM s protitelesi IgA.

Protitelesa IgM		Protitelesa IgA					
		Pozitivni rezultati			Mejno pozitivni rezultati	Negativni rezultati	SKUPAJ
		Titer 256 ali več	Titer 128 - 32	Titer 16	Titer 8	Titer manj kot 8	
Pozitivni rezultati	Titer 256	0 (0 %)	1 (3,3 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (3,3 %)
	Titer 128	0 (0 %)	1 (3,3 %)	1 (3,3 %)	1 (3,3 %)	1 (3,3 %)	4 (13,3 %)
	Titer 64	1 (3,3 %)	1 (3,3 %)	2 (6,7 %)	2 (6,7 %)	0 (0 %)	6 (20%)
Mejno pozitivni rezultati	Titer 32	0 (0 %)	2 (6,7 %)	0 (0 %)	1 (3,3 %)	6 (20,0 %)	9 (30 %)
Negativni rezultati	Titer 16 ali manj	0 (0 %)	4 (13,3 %)	1 (3,3 %)	0 (0 %)	5 (16,7 %)	10 (33,3 %)
SKUPAJ		14 (46,47 %)			4 (13,3 %)	12 (40,0 %)	30 (100 %)

5. RAZPRAVA

Lymfska borelijoza je bolezen, ki lahko prizadene več organskih sistemov ter se izraža z več kliničnimi slikami (36). Aktivna okužba sproži imunski odziv, ki pa ni dovolj učinkovit, da bi odstranil bakterije iz telesa, oziroma preprečil njihovo razmnoževanje v telesu. Zaradi invazivnosti bakterije so pri nezdravljenih ljudeh možne ponavljajoče se okužbe, ki jih spremljajo vse hujši bolezenski znaki (5). Imunski odziv telesa je skoraj pri vseh okužbah enak in poteka v določenem zaporedju, ki omogoča odstranitev patogenih organizmov iz telesa.

Humoralni efektorski mehanizmi olajšajo odstranitev patogenih mikrobov na različne načine. Aktivacija humoralnega imunskega odziva sproži izdelovanje in izločanje protiteles različnih razredov, ki se razlikujejo po efektorskih funkcijah.

Prvi stik posameznika z antigenom sproži primarni imunski odziv, za katerega je značilno nastajanje protiteles izdelujočih plazmatk in spominskih celic. Potek imunskega odziva je odvisen od antigena, mesta njegovega vstopa in količine vnesenega antigena.

V vseh primerih je za primarni odziv značilno latentno obdobje, med katerim poteka selekcija klonov naivnih celic B v odgovor na antigen, celice B pa se tudi diferencirajo v plazmatke in spominske celice. Latentnemu obdobju sledi logaritmni porast protiteles, ki doseže vrh, nakar količina protiteles pojema. Navadno dokažemo protitelesa 2 do 9 dan po okužbi. Pri borelijski okužbi je ta čas veliko daljši in traja lahko 6 tednov ali več. Med primarnim odzivom nastajajo najprej protitelesa IgM in nato protitelesa IgG. Primarni odziv lahko traja nekaj dni do nekaj tednov, včasih pa celo leto ali več, odvisno od antigena. Spominske celice, ki nastanejo med primarnim odzivom lahko ostanejo v telesu celo življenje.

Razvoj sekundarnega imunskega odziva je odvisen od navzočnosti spominskih celic B in spominskih celic T. Ko se telo ponovno sreča z antigenom, to povzroči sekundarni imunski odziv, ki ima krajšo latentno fazo, hitreje doseže višek in traja dalj časa. V primeru borelijske okužbe se lahko borelije »skrijejo« v telesu v za imunski sistem nedostopne predele in kasneje lahko povzročijo okužbe drugih organskih sistemov, ki so hujše od primarne okužbe (5, 44, 45). Pri kronični okužbi se proizvajajo predvsem protitelesa IgG, nekaj je tudi produkcije protiteles IgM ter ostalih protiteles (22).

Okužba z *B. burgdorferi* sensu lato se lahko kaže v različnih kliničnih slikah, ki so včasih ljudem slabo poznane, zdravnikom pa prikrite. Znano pa je, da med klinično sliko in vrsto

borelij obstaja povezava. Bolezenski znaki so deloma odvisni tudi od povzročitelja bolezni: *B. garinii* največkrat povzroča okužbe živčevja, *B. afzelii* okužbe kože, *B. burgdorferi* sensu stricto, ki je edini povzročitelj lymske borelioze v Ameriki, pa bolezni sklepov (2). Vse tri vrste pa povzročajo klinično sliko *erythema migrans*, ki jo lahko zasledimo kjerkoli na telesu. Pri okužbi z *B. burgdorferi* sensu stricto in *B. garinii* kožno spremembo *erythema migrans* pogosteje spremljajo lokalne in sistemske težave kot pri okužbi z *B. afzelii*. Pri prvih dveh vrstah je bil opažen tudi krajši čas med vbodom klopa in nastankom *erythema migrans*, kar kaže na večjo virulenco obeh bakterij. Posledično sprožita tudi večji in burnejši imunski odziv (34).

Erythema migrans je prvi in tudi najbolj pogost kliničen znak lymske borelioze, pri katerem lahko začnemo z zdravljenjem brez laboratorijske potrditve. V vseh ostalih stadijih je praviloma potrebna laboratorijska potrditev okužbe (43, 62).

Ker je znano, da zgodnja okužba izzove predvsem tvorbo specifičnih protiteles IgM, v kasnejšem poteku okužbe pa so prisotna predvsem specifična protitelesa IgG, smo v naši raziskavi uporabili skupine okuženih bolnikov, ki so imele že predhodno določen titer posameznih razredov specifičnih protiteles. Želeli smo dokazati specifična protitelesa IgA proti *B. burgdorferi* sensu lato ter jih primerjati s prisotnostjo protiteles razreda IgG in IgM. Zanimalo nas je ali borelijska okužba izzove porast protiteles IgA ter njihovih kompleksov, ki bi se lahko nalagala v telesu (npr. v ledvicah). V raziskavo smo vključili 260 serumov bolnikov s sumom na lymsko boreliozo ali z že potrjeno diagnozo lymske borelioze, ki so imeli že predhodno določen titer protiteles IgM in IgG. Od teh je bilo 100 serumov, ki niso imeli prisotnih specifičnih protiteles proti *B. burgdorferi* sensu lato (1. skupina); 99 serumov je imelo prisotna protitelesa razreda IgG, protiteles IgM pa nismo zasledili (2. skupina); 31 serumov ni imelo prisotnih specifičnih protiteles IgG, prisotna pa so bila protitelesa razreda IgM (3. skupina); 30 serumov je imelo prisotna protitelesa obeh omenjenih razredov (4. skupina). Vzorcem smo ponovno določili titer specifičnih protiteles IgG in IgM ter dodatno protitelesa IgA. Prav tako smo pri serumih, ki so imeli protitelesa IgM naredili še imunofluorescenčni test z absorpcijo. S tem postopkom smo odstranili protitelesa IgG, ki lahko vplivajo na rezultat pri določanju protiteles IgM in IgA (8). Podatkov o določanju protiteles IgA v serumu pri lymski boreliozi je v literaturi zelo malo, več omemb zasledimo le pri določanju IgA protiteles v intratekalni tekočini pri nevroboreliozi (49).

Zaradi antigenske heterogenosti in geografske dominantnosti posameznega seva in vrste na določenem območju je pomembno, da kot antigen za serološke preiskave izberemo optimalen sev *B. burgdorferi* sensu lato in sicer tistega ki prevladuje na območju preiskovanih bolnikov (8). V Sloveniji iz bolnikovih materialov najpogosteje izolirajo borelijsko vrsto *B. afzelii* (82 %), redkeje *B. garinii* (17%) in le izjemoma *B. burgdorferi* sensu stricto (1 %) (12). Zato se pri IFT testu pri nas (v Sloveniji) uporablja kot antigen celotna borelijska celica vrste *B. afzelii*. Antigen za diagnosticiranje lymske borelioze na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani izdelujejo sami.

Različni sevi borelij napovedujejo različno klinično sliko in ker se srečujemo z različnimi kliničnimi slikami pri posameznih povzročiteljih bolezni, lahko predvidevamo, da ima posameznik lahko različen imunski odziv na različne seve bakterij. Od tega ter še od nekaterih drugih dejavnikov, npr. od pretečenega časa od pojava *erythema migrans*, odvzema krvi od okužbe, ter učinek antibiotikov, pa je odvisno pravilno vrednotenje testa, ki poteka subjektivno (test se vrednoti vizualno z mikroskopiranjem). Imunski odziv se lahko razlikuje tudi zaradi okuženosti bolnikov z več sevi borelij. Pri nas naj bi bila kar tretjina klopov okužena z več vrstami borelij. Z dvema vrstama je okuženih 21 % vseh klopov, od tega 54 % z *B. afzelii* in *B. garinii* (63).

Test IFT ima visok mejni titer (256) pri rutinskem določanju specifičnih protiteles tako IgG in IgM, kar daje testu večjo specifičnost. Pri določanju protiteles IgA smo na podlagi poizkusov določili nižji pozitivni titer, saj so protitelesa IgA lokalnega izvora in njihova produkcija ni tako visoka v krvi bolnika. Prvi pozitivni titer je bil titer 64. Pri IFT z absorpcijo pri določanju specifičnih protiteles IgG in IgM je pozitiven rezultat že titer 64, pri določanju specifičnih protiteles IgA pa je bil pozitiven titer že titer 16 (8).

Slovenija je endemično področje za lymsko boreliozo in je zahteva po visokih titrih ključnega pomena, da izločimo zdrave ljudi, ki so se v preteklosti že srečali z borelijskimi antigeni in imajo določeno koncentracijo specifičnih protiteles. Edina pomanjkljivost takega testa nastane le takrat, ko spustimo nekaj pozitivnih primerov; vendar glede na to, da je *erythema migrans* značilna klinična slika borelijske okužbe, ki jo razvije več kot 90 % bolnikov, so serološki testi lahko le potrditev borelijske okužbe. Zdravljenje bolnikov se lahko začne tudi, če je test negativen oziroma še ne vemo rezultatov (62). Pri razširjeni in kronični okužbi bolnik izdeluje protitelesa v večjih količinah in ta presegajo »cut off« vrednost tako zastavljenih testov.

V vsakdanji klinični praksi običajno uporabljamo za dokaz borelijske okužbe posredne metode. Kljub nenehnim izboljšavam pa imajo serološki testi še vedno premajhno občutljivost in specifičnost in niso standardizirani. Rezultate je tako težko vrednotiti brez napak, zato za povečanje specifičnosti predvsem v ZDA priporočajo dvostopenjsko serološko testiranje (2). Sestavljeno je iz presejalnega testa z visoko občutljivostjo (EIT ali IFT) in potrditvenega testa z visoko specifičnostjo, kot je test WB oz. imunoblot. S potrditvenim testom se testira le pozitivne ali mejne primere. Kljub temu, da so testi (imunoblot) zelo specifični in občutljivi, pa je popolnoma enotni sev borelij za antigen v seroloških testih zelo težko določiti. To nam otežuje heterogenost borelijskih antigenov in tudi različna geografska porazdeljenost borelij. Razlike se pojavijo tudi v izbiri in načinu priprave antigena (cela borelija, prečiščeni ali rekombinantni borelijski antigeni). Rezultate testov je zato potrebno vrednotiti skupaj s klinično sliko bolnika (9, 57).

Seveda stremimo k izboljšavam seroloških testov in težimo k tem, da bi bili 100 % specifični in občutljivi. Vendar v praksi takih idealnih vrednosti ne moremo doseči. Kljub temu lahko specifičnost in občutljivost izboljšamo s številnimi postopki, ki vplivajo na dejavnike v serumu s katerimi reagirajo protitelesa, npr. z absorpcijo navzkrižno reaktivnih protiteles, protiteles razreda IgG in drugih dejavnikov (7, 8).

V našem testu smo uporabili absorbent, ki veže prisotna protitelesa IgG, ki bi lahko motila določanje protiteles IgM in/ali IgA. S tem da odstranimo protitelesa IgG predpostavljamo, da se lahko protitelesa IgM ali IgA nemoteno vežejo na antigen, saj vezavnih mest ne zasedejo protitelesa IgG (12).

Pričakovali smo prisotnost protiteles IgA v vzorcih, izkazalo pa se je, da se protitelesa IgA pojavljajo le v prisotnosti protiteles IgM v serumu. Najprej smo vrednotili test brez absorpcije. V 1. in 2. testirani skupini bolnikov ni bilo vzorcev s prisotnimi protitelesi IgA, v 3. skupini smo dobili 10 vzorcev (32,3 %) s prisotnimi protitelesi IgA ter 12 mejnih vzorcev, v 4. skupini pa je bilo 19 vzorcev (63,3 %) s prisotnimi protitelesi IgA ter 7 mejnih vzorcev. Z rezultati lahko dokažemo, da je bilo pri serumih, ki so imeli prisotna tako protitelesa IgG kot IgM, več pozitivnih rezultatov (63,3 %) pri dokazovanju protiteles IgA, kot v skupini, kjer so imeli serumi prisotna samo protitelesa IgM (32,3 %). Predpostavimo lahko, da je imunski odziv proti borelijam močnejši pri bolnikih, ki se jim že začnejo proizvajati specifična protitelesa IgG (bolniki s dalj časa trajajočo okužbo). Kasneje, tekom okužbe specifičnih protiteles IgA v serumu ne zaznamo več, torej se v poznih stadijih bolezni ne sproščajo več v krvni obtok. To trditev smo dokazali s

testiranjem bolnikov, ki so imeli prisotna samo protitelesa IgG, kjer nismo dokazali nobenega pozitivnega vzorca pri določanju protiteles IgA.

Število pozitivnih serumov je bilo pri testu z absorpcijo manjše. Pozitivnih je bilo 14 (46,5 %) vzorcev pri določanju protiteles IgA (preglednice od 2 - 5). Pri teh rezultatih lahko predpostavimo, da se pri postopku z absorpcijo odstrani tudi del protiteles IgA. Pri določanju protiteles IgA moramo poznati tudi zgradbo, funkcijo in sintezo le teh, kar kasneje upoštevamo pri vrednotenju testov in določitvi pozitivnega rezultata. Zaradi manjše sinteze protiteles v serumu smo kot pozitiven rezultat določili nižji titer protiteles kot pri določanju protiteles IgG in IgM.

Specifična protitelesa IgA smo želeli dokazati, da bi videli, kdaj se pojavijo v poteku bolezni. Ugotovili smo, da se v serumu pojavljajo že v primarnem imunskem odzivu, kar pa se kasneje izgubi, oziroma postane za nas nedoločljivo. Ker protitelesa IgA nastajajo predvsem lokalno, lahko predstavlja še eno oviro pri standardiziranju postopka in rutinskega določanju.

V preteklosti so Steere in sodelavci naredili več raziskav, ki opisujejo večji porast protiteles IgA v intratekalnem prostoru pri nevroboreliozi. Pri tej obliki bolezni se specifična protitelesa IgA proizvajajo skupaj s protitelesi IgG (Steere in sod., 1990). Nivo protiteles IgG in IgA je dva do petkrat višji v CSF kot v serumu, kar kaže na pomembno vlogo protiteles IgA pri imunskem odzivu. Zato je smiselno standardizirati določanje protiteles IgA tako v serumu kot v intratekalni tekočini (51).

Naš cilj je bil, da dokažemo specifična protitelesa IgA v serumu bolnikov in ovrednotimo zanesljivost določanja le teh s posrednim IFT testom. Dokazali smo, da je test IFT ustrezen za določanje specifičnih protiteles IgA, kakor je tudi že standardiziran za določanje protiteles IgM in IgG. Odstotek bolnikov pri katerih zasledimo protitelesa IgA je veliko nižji od tistih, ki jim dokažemo protitelesa IgM in/ali IgG, je pa lahko pomemben podatek pri proučevanju imunskega odziva in poteka napredovanja bolezni. Prav tako smo želeli povezati sočasno prisotnost specifičnih protiteles IgA z ostalima dvema razredoma protiteles, da bi ugotovili, kdaj je produkcija specifičnih protiteles IgA najvišja in najpomembnejša. To vprašanje smo si zastavili, ker se občasno pri ljudeh okuženih z *B. burgdorferi* sensu lato pojavlja prizadetost ledvic zaradi avtoimunskih dogajanj, ki jih sprožijo protitelesa IgA (50). Tega vprašanja nismo mogli rešiti z našo študijo, zato predlagamo, da se na tem področju opravi še nekaj poskusov in študij, ki bi zajele tudi paciente z avtoimunskimi boleznimi, ki so jim v preteklosti dokazali lymsko boreliozo.

Razjasniti ne znamo tudi razloga, zakaj se protitelesa IgA v serumu pojavljajo le hkrati s protitelesi IgM. Pojavljajo se sicer tudi s protitelesi IgG, vendar le če so prisotna tudi protitelesa IgM. Ko jih ne zasledimo več v serumu, ne zasledimo tudi protiteles IgA. Tudi tu bi predlagali testiranje več bolnikov, ki bi imeli boljše opredeljeno klinično sliko in bi jim lahko intervalno določevali titre vseh treh razredov specifičnih protiteles. To bi nam dalo boljši vpogled v samo sintezo protiteles in kdaj je tekom bolezni njihova koncentracija najvišja.

Priporočili bi tudi standardizacijo testa, saj s standardiziranimi postopki seroloških testov in klinično sliko dobimo boljši vpogled v razvoj in potek bolezni. Diagnostiko olajšajo tudi testi s kombinacijo čim višjih vrednosti specifičnosti in občutljivosti, to pa bi omogočilo tudi večjo primerljivost rezultatov iz različnih laboratorijev in posledično več primerljivih informacij o lymski boreliozi in posledicah le te.

6. SKLEPI

Dokazovali smo prisotnost specifičnih protiteles IgA proti *B. burgdorferi* sensu lato v serumu bolnikov, katerim so bil že predhodno določene vrednosti specifičnih protiteles IgM in IgG. Ponovno smo jim določili tudi titre protiteles IgG in IgM ter dodatno nauredili še IFT test z absorpcijo pri določanju titra protiteles IgM in IgA. Naša študija je zajela 260 serumov, ki smo jih razvrstili v 4 skupine. V prvi skupini so bili serumi brez protiteles proti borelijam (100 serumov); v drugi skupini serumi s prisotnimi protitelesi IgG in brez protiteles IgM (99 serumov); v tretji skupini serumi brez protiteles IgG in s protitelesi IgM (31 serumov) ter v četrti skupini serumi s prisotnimi protitelesi IgG in IgM (30 serumov). Dokazali smo:

- Poleg produkcije specifičnih protiteles IgG in IgM nastajajo tudi specifična protitelesa IgA proti borelijskim antigenom in jih lahko dokažemo v serumu bolnika.
- Protitelesa IgA se v serumu pojavljajo v manjših količinah, zato je prvi pozitivni titer (64 pri testu brez absorpcije in 16 pri testu z absorpcijo) nižji od tistega za rutinsko določanje protiteles IgG in IgM (256 pri testu brez absorpcije in 64 pri testu z absorpcijo).
- Protitelesa IgA nastajajo skupaj s protitelesi IgM, to pomeni, da nastajajo primarnem imunskem odzivu. Dokazali smo jih tako v tretji kot v četrti skupini.
- Pri IFT testu brez absorpcije smo v 3. skupini dobili 10 (32,3 %) vzorcev s pozitivnim titrom protiteles IgA, v 4. skupini pa jih je bilo 19 (63,3 %). Pri tem lahko predpostavimo, da je imunski odziv višji pri bolnikih, ki imajo dalj časa trajajočo okužbo in že proizvajajo protitelesa IgG.
- Ko smo v 4. skupini test ponovili, vendar z absorpcijo smo dobili 14 (46,5 %) vzorcev s pozitivnim titrom protiteles IgA. To nam pokaže, da se s postopkom absorpcije odstrani tudi del protiteles IgA.

- Posredni IFT test bi priporočili za dokazovanje specifičnih protiteles IgA, vendar bi bilo potrebno standardizirati postopek in statistično ovrednotiti test.
- Priporočili bi tudi intervalno testiranje bolnikov z lymsko boreliozo pri določanju vseh treh razredov protiteles. S dobljenimi rezultati bi dobili boljši vpogled v proizvajanje protiteles in imunski odziv posameznika ter bi lahko določili kdaj v poteku bolezni so koncentracije posameznih protiteles najvišje.

7. VIRI

1. 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.
2. Nadelman R. B., Wormser G.P. 1998. Lyme borreliosis. *Lancet*, 382, 8: 557 – 565.
3. Strle F., Maraspin-Čarman V., Furlan-Lotrič S., Ružič-Sabljić E. Pletarski-Rigler D., Cimperman J. 1995. Epidemiološke značilnosti lymske borelioze v Sloveniji. *Zdravstveni vestnik*, 64: 145 – 150.
4. Steere A. C. 1989. Lyme disease. *The New England Journal of Medicine*, 321: 586 – 595.
5. Strle F. 2006. Patogeneza lymske borelioze. V: *Lymska borelioza 2006*: Ljubljana, 2006. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za lymsko boreliozo, Tangram: 39 – 44.
6. Strle F. 1999. Lyme borreliosis in Slovenia. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 289: 643 – 652.
7. Bruckbauer H. R., Preac-Musič V., Fuchs R., Wilske B. 1992. Cross- reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*, 11, 3: 224 – 132.
8. Ružič-Sabljić E., Strle F., Cimperman J., Kotnik V. 1995. Vrednotenje imunofluorescenčnega testa za dokazovanje lymske borelioze. *Zdravstveni vestnik*, 64: 63 – 67.

9. Ružič-Sabljić E. 2006. Mikrobiološka diagnostika borelijskih okužb. V: Lymfska borelioza 2006: Ljubljana, 2006. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za lymfsko boreliozo, Tangram: 139 – 145.
10. Stanek G., Strle F. 2003. Lyme borreliosis. Lancet, 362, 15: 1639 – 1647.
11. Lagal V., Postic D., Ružič-Sabljić E., Brandon G. 2003. Genetic diversity among *Borrelia* strains determined by single-strand conformation polymorphism analysis of the *ospC* gene and its association with invasiveness. Journal of Clinical Microbiology, 41: 5059 – 5065.
12. Ružič-Sabljić E., Maraspin V., Lotrič-Furlan., Jurca T., Logar M., Pikelj-Pečnik A., Strle F. 2002. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from human material in Slovenia. Wiener Klinische Wochenschrift, 114, 13-14: 544 – 550.
13. Barbour A. G., Hayes S. F. 1986. Biology of *Borrelia* Species. Microbiological Reviews, 50: 381 – 400.
14. Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A., Staley J. T., Williams S. T. 1994. The Spirochetes. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th edition, 27 – 37.
15. Paster B. J., Dewhirst F. E., Weisburg W. G., Tordoff L. A., Fraser G. J., Hespel R. B., Stanton T. B., Zablen L., Mandelco L., Woese C. R. 1991. Phylogenetic analysis of the spirochetes. Journal of Bacteriology, 173: 6101 – 6109.
16. Aberer E., Duray P. H. 1991. Morphology of *Borrelia burgdorferi*: structural patterns of cultured borreliæ in relation to staining methods. Journal of Clinical Microbiology, 29: 764 – 772.

17. Bledose H. A., Carroll J. A., Whelchel T. R., Farmer M. A., Dorward D. W., Gherardini F. C. 1994. Isolation and partial characterization of *Borrelia burgdorferi* inner and outer membranes by using isopycnic centrifugation. *Journal of Bacteriology*, 176: 7447 – 7455.
18. Wilske B., Preac-Mursic. 1993. Microbiological diagnosis of Lyme borreliosis. V: *Aspects of Lyme borreliosis*. Weber K., Burgdorfer W., Shierz G. (eds.). Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag: 267 – 299.
19. Seshu J., Skare T. J. 2002. The many faces of *Borrelia burgdorferi*. V: *The Spirochetes: Molecular and Cellular Biology*, 147 – 158.
20. Coleman L. J., Benach L. J. 1987. Isolation of antigenic components from the Lyme disease spirochete: Their role in early diagnosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 155: 756 – 765.
21. 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.
22. Zöller L., Cremer J., Faulde M. 1993. Western blot as a tool in the diagnosis of Lyme borreliosis. *Electrophoresis*, 14: 937 – 944.
23. Ružič-Sabljic E. 2000. Značilnosti bakterij, ki povzročajo lymfsko borelizo pri ljudeh. V: *Lymfska borelioza 2000: Zbornik predavanj. 2. slovensko posvetovanje o lymfski boreliozi*. Ljubljana, 17. in 18. november 2000. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za lymfsko boreliozo, Tangram: 15 – 20.
24. Ružič-Sabljic E., Strle F., Lotrič-Furlan S., Cimperman S., Maraspin V. 1999. Linear plasmid profile analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato stains. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 289: 740 – 741.

25. Xu Y., Johnson C. R. 1995. Analysis and comparison of plasmid profiles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 2679 – 2685.
26. Purser J. E., Norris S. J. 2000. Correlation between plasmid content and infectivity in *Borrelia burgdorferi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 97, 25: 13865 – 13870.
27. 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: 3699 – 3705.
28. Preac-Mursič V., Wilske B., Schierz G. 1986. European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks: Culture conditions and antibiotic susceptibility. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene*, 236, 1-2: 112 – 118.
29. Pollack J. R., Telford III R. S., Spielman A. 1993. Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 1251 – 1255.
30. Burgdorfer W. 1995. Lyme disease (borreliosis): a global perspective. *Alpe Adria Microbiology Journal*, 1995, 4: 227 – 233.
31. Eisen L., Lane R. S. 2002. Vectors of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. V: *Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control*. Gray J., Kahl Om, Lane R. S., Stanek G. (eds.). Wallingford, CAB International: 91 – 115.
32. O'Connell S., Granström M., Gray J. S., Stanek G. 1998. Epidemiology of European Lyme borreliosis. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 187: 229 – 240.
33. Funa A., Šavs T., Škrgat S. 1996. Kako dolgo imajo bolniki z erythema migrans prisesane klope. *Medicinski razgledi*, 35: 297 – 307.

34. Logar M., Ružič-Sabljić E., Maraspin V., Lotrič-Furlan S., Cimperman J., Jurca T., Strle F. 2004. Comparison of erythema migrans caused by *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*. *Infection*, 32, 1: 15 – 19.
35. Seiler P. K., Weis J. J. 1996. Immunity to Lyme disease: protection, pathology and persistence. *Current Opinion in Immunology*, 8: 503 – 509.
36. Strle F. 2000. Klinična slika lymske borelioze - Uvod. V: *Lymska borelioza 2000: Zbornik predavanj. 2. slovensko posvetovanje o lymski boreliozi*. Ljubljana, 17. in 18. november 2000. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za lymsko boreliozo, Tangram: 53 - 55.
37. Kristoferitsch W. 1991. Neurological manifestations of Lyme borreliosis. *Infection*, 19: 268 – 272.
38. Cimperman J. 2006. Prizadetost živčevja pri lymski boreliozi. V: *Lymska borelioza 2006: Ljubljana, 2006*. Strle F. (ur.). Ljubljana, društvo za lymsko boreliozo, Tangram: 71 – 75.
39. Maraspin-Čarman V. 2000. Prizadetost drugih organskih sistemov pri lymski boreliozi. V: *Lymska borelioza 2000: Zbornik predavanj. 2. slovensko posvetovanje o lymski boreliozi*. Ljubljana, 17. in 18. november 2000. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za lymsko boreliozo, Tangram: 105 - 111.
40. Picken N. R., Strle F., Picken M. M., Ružič-Sabljić E., Maraspin V., Lotrič-Furlan S., Cimperman J. 1998. Identification of three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, and *B. afzelii*) among isolates from acrodermatitis chronica atrophicans lesions. *Journal of Investigative Dermatology*, 110: 211 – 214.
41. Lotrič-Furlan S. 2006. Prizadeost sklepov in mišic. V: *Lymska borelioza 2006: Ljubljana, 2006*. Strle F. (ur.). Ljubljana, društvo za lymsko boreliozo, Tangram: 87 - 94.

42. Ogrinc K. 2006. Acrodermatitis cronica atrophicans. V: Lymska borelioza 2006: Ljubljana, 2006. Strle F. (ur.). Ljubljana, društvo za lymsko boreliozo, Tangram: 71 – 72.
43. Sočan M. 2006. Epidemiologija prijavljenih primerov lymske borelioze v Sloveniji. V: Lymska borelioza 2006: Ljubljana, 2006. Strle F. (ur.). Ljubljana, društvo za lymsko boreliozo, Tangram: 31 - 38.
44. Vozelj M., 2000. Temelji imunologije, 1. izdaja, 1. natis, Ljubljana, DZS.
45. Kotnik V., Malovrh T., Škoberne M., Cimperman J. 2000. Celični imunski odziv pri lymski boreliozi. V: Lymska borelioza 2000: Zbornik predavanj. 2. slovensko posvetovanje o lymski boreliozi. Ljubljana, 17. in 18. november 2000. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za lymsko boreliozo, Tangram: 169 – 175.
46. Malovrh T., Paternoster A. 1998. Merjenje celičnega imunskega odziva pri okužbi z *Borrelia burgdorferi*. Med Razgl, 37. 5 – 15.
47. Szczepanski A., Benach J. L. 1991. Lyme borreliosis: host response to *Borrelia burgdorferi*. Microbiological Reviews, 55, 1: 21 – 34.
48. Roberg M., Forsberg P., Tegnell A., Ekerfeldt K. 1995. Intrathecal production of specific IgA antibodies in CNS infectios. S Neurol, 242: 390 – 397.
49. 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. The Journal of Infectious Diseases, 161: 1203 – 1209.
50. Kaiser R. 1995. Intrathecal immune response in patiens with neuroborreliosis: specificity of antibodies for neuronal proteins. S Neurol, 242: 319 – 325.

51. Hutton T.A., Goldstein R.E., Njaa B.L., Atwater D.Z., Chang Y.F., Simpson K.W. 2008. Search for *Borrelia burgdorferi* in kidneys of dogs with suspected "Lyme nephritis". J Vet Intern Med., 22(4): 860 - 865.

52. Brown S. L., Hansen S. L., Langore j. J. 1999. Role of serology in the diagnosis of Lyme disease. The Journal of the American Medical Association (JAMA), 282, 1: 62 – 66.

53. Guy E. C., Robertson J. N., Cimmino M., Gern L., Moosmann Y., Rijpkema S. G. T., Sambri V., Stanek G. 1998. European interlaboratory comparison of Lyme borreliosis serology. Zentralblatt für Bakteriologie, 287: 241 – 247.

54. Aguero-Rosenfeld M. E., Wang G., Schwartz I., Wormser G. P. 2005. Diagnosis of Lyme borreliosis. Clinical Microbiology Reviews, 18: 484 – 509.

55. Mourtisen C. L., Wittwer C. T., Litwin C. M., Yang L., Weis J. J., Martins T. B., Jaskovski T. D., Hill H. R. 1996. Polymerase chain reaction detection of Lyme disease. American Journal of Clinical Pathology, 105: 647 – 201.

56. Wilske B. 2003. Diagnosis of Lyme borreliosis in Europe. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 3: 251 – 227.

57. Robertson J., Guy E., Andrews N., Wilske B., Anda P., Grandström M., Hauser U., Moosmann Y., Sambri V., Schellekens J., Stanek G., Gray J. 2000. A European multicenter study of immunoblotting in serodiagnosis of Lyme borreliosis. Journal of Clinical Microbiology, 38, 6: 2097 – 2102.

58. Strle F. 2006. Pristopi k zdravljenju lymfske borelioze. V: Lymfska borelioza 2006: Ljubljana, 2006. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za lymfsko borelioza, Tangram: 163 - 174.

59. Maraspin V., Ružič-Sabljić E., Strle F., Cimperman J., Jereb M., Preac-Mursi V. 1995. Persistence of *Borrelia burgdorferi* after treatment with antibiotic. *Alpe Adria Microbiology Journal*, 3: 211 – 216.
60. Rigler P. D. 2006. Preprečevanje lymske borelioze. V: *Lymska borelioza 2006*: Ljubljana, 2006. Strle F. (ur.). Ljubljana, društvo za lymsko boreliozo, Tangram: 183 – 189.
61. Stanek G. 2000. Outer surface proteins of *Borrelia* and candidates for lyme borreliosis vaccines. V: *Lymska borelioza 2000: Zbornik predavanj. 2. slovensko posvetovanje o lymski boreliozi*. Ljubljana, 17. in 18. november 2000. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za lymsko boreliozo, Tangram: 219 – 225.
62. Strle F. 2006. Klinična diagnoza. V: *Lymska borelioza 2006*: Ljubljana, 2006. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za lymsko boreliozo, Tangram: 147 - 151.
63. Zore A., Trilar T., Prosenc K., Ružič-Sabljić E. 2000. Okuženost klopov in malih sesalcev z bakterijami *Borrelia burgdorferi* sensu lato v Sloveniji. V: *Lymska borelioza 2000: Zbornik predavanj. 2. slovensko posvetovanje o lymski boreliozi*. Ljubljana, 17. in 18. november 2000. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za lymsko boreliozo, Tangram: 27 – 33.

