

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA SRŠEN

**PRIMERJAVA DVEH METOD ZA DOKAZ BORELIJSKIH
PROTITELES V SERUMU**

**COMPARISON OF TWO MEHODS FOR THE DETECTION
OF BORRELIACIDAL ANTIBODIES IN SERUM**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, v laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroze, pod mentorstvom prof. dr. Eve Ružič-Sabljič, dr. med..

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Evi Ružič-Sabljič za vse strokovne nasvete in navodila ter spodbudo. Hvala tudi vsem zaposlenim v Laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroze, posebna zahvala gre Brigiti Repše za vso pomoč pri opravljanju praktičnega dela diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi svojim domačim, prijateljem in sošolcem za vso spodbudo in pomoč v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno, pod mentorstvom prof. dr. Eve Ružič-Sabljič, dr. med..

Anja Sršen

Ljubljana, maj 2013

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Darko Černe, mag. farm., spec. med. biokem.

Član diplomske komisije: doc. dr. Janez Ilaš, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 1. 1. BORELIJE LYMSKE BORELIOZE | 1 |
| 1.1.1 Taksonomska uvrstitev B. burgdorferi sensu lato in značilnosti bakterije..... | 1 |
| 1.1.2. Borelijski antigeni in genom | 4 |
| 1.1.3. Ekologija in epidemiologija B. burgdorferi sensu lato..... | 7 |
| 1.2. KLINIČNA SLIKA LYMSKE BORELIOZE | 9 |
| 1.3. DIAGNOSTIKA LYMSKE BORELIOZE | 14 |
| 1.3.1. Osamitev B. burgdorferi sensu lato | 14 |
| 1.3.2. Dokaz borelijske DNK | 15 |
| 1.3.3. Dokaz specifičnih protiteles | 15 |
| 1.3.3.1. Encimsko imunski test - EIT | 19 |
| 1.3.3.2. <i>Imunofluorescenčni test - IFT</i> | 20 |
| 1.3.3.3. <i>Imunoluminescenčni test - LIA</i> | 21 |
| 1.3.3.4. <i>Test Western/Imuno blot</i> | 21 |
| 1.3.4. Dokaz stimulacije limfocitov T | 21 |
| 1.4. ZDRAVLJENJE LYMSKE BORELIOZE | 22 |
| 2. NAMEN DELA | 25 |
| 3. MATERIALI IN METODE | 26 |
| 3.1. VZORCI | 26 |
| 3.2. METODE | 26 |
| 3.2.1. VIDAS Lyme test | 26 |
| 3.2.1.1. <i>Reagenti in oprema za izvedbo VIDAS Lyme testa</i> | 27 |
| 3.2.1.2. <i>Princip in postopek izvedbe VIDAS Lyme testa ter interpretacija rezultatov</i> | 30 |
| 3.2.2. LIAISON Borrelia test | 33 |
| 3.2.2.1. <i>Reagenti in oprema za izvedbo LIAISON Borrelia testa</i> | 33 |
| 3.2.2.2. <i>Princip in postopek izvedbe LIAISON Borrelia testa ter interpretacija</i> <i>rezultatov</i> | 34 |
| 3.2.3. Ponovitev testiranja | 36 |
| 3.3. STATISTIČNA ANALIZA..... | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 4. REZULTATI | 38 |
| 4.1. REZULTATI POSAMEZNIH TESTOV | 38 |
| 4.2. PRIMERJAVA REZULTATOV | 39 |
| 4.3. PODROBNA ANALIZA MED TESTOMA ODPOROČNIH REZULTATOV | 40 |
| 4.4. STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV | 44 |
| 5. RAZPRAVA | 45 |
| 6. SKLEP | 50 |
| 7. LITERATURA | 51 |

POVZETEK

Lymfska borelijoza je na severni polobli najpogostejša bolezen, katere povzročitelje prenašajo klopi. Povzročajo jo spirohete iz kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Lymfska borelijoza je multisistemska okužba, ki se kaže z raznolikimi kliničnimi znaki in simptomi ter z nekaterimi spremembami v poteku bolezni. Čeprav je najpogostejša klinična manifestacija kožni izpuščaj, se bolezen lahko razširi na druge organe, vključno z živčnim sistemom, sklepi, srcem, ostalimi mišicami in očmi. Zaradi nespecifičnih kliničnih znakov bolezni je v večini primerov potrebna mikrobiološka potrditev okužbe. Glavno diagnostično orodje predstavljajo metode za detekcijo specifičnih protiteles, čeprav je lahko serološko testiranje težavno, saj lahko vodi do lažno negativnih rezultatov, zlasti v začetnem stadiju bolezni, in prav tako do lažno pozitivnih rezultatov. Kompleksna antigenska sestava spirohet iz kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato prav tako predstavlja izziv za serološko diagnostiko lymfske borelijoze. V diplomski nalogi smo ovrednotili specifičen imunski odziv s sintezo IgM in IgG protiteles pri pacientih s sumom na zgodnjo lymfsko borelijozo. V ta namen smo vzorce pacientov testirali z dvema komercialno dostopnima testoma, VIDAS Lyme IgM in IgG testom (BioMerieux, Francija) ter LIAISON Borrelia Quant IgM in Borrelia IgG (DiaSorin, Italija). Princip testa VIDAS Lyme temelji na encimsko imunskem fluorescentnem testu, LIAISON Borrelia test pa za določitev specifičnih protiteles izkorišča imunoluminescenčno tehnologijo. Naredili smo tudi primerjavo med rezultati obeh testov.

Testirali smo 102 vzorca krvi pacientov s sumom na zgodnjo lymfsko borelijozo. Z VIDAS Lyme IgM testom smo dobili 49 (48,0 %) pozitivnih rezultatov in 51 (50,0 %) pozitivnih rezultatov z LIAISON Borrelia Quant IgM testom; rezultati so se ujemali v 78 (76,5 %) primerih. Z VIDAS Lyme IgG testom smo dobili 56 (54,9 %) pozitivnih rezultatov in 62 (60,8 %) pozitivnih rezultatov z LIAISON Borrelia IgG testom; rezultati so se ujemali v 88 (86,3 %) primerih. Zaključili smo, da med rezultati, pridobljenimi z VIDAS Lyme in LIAISON Borrelia testom za detekcijo specifičnih protiteles razreda IgM ni statistično signifikantne razlike. Na drugi strani pa smo dokazali statistično značilno razliko med VIDAS Lyme in LIAISON Borrelia testom za detekcijo specifičnih protiteles razreda IgG.

ABSTRACT

Lyme borreliosis (Lyme disease) is in northern hemisphere the most common disease, which causative agent is transmitted by ticks. It is caused by spirochaetes of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex. Lyme borreliosis is a multisystem infection, which presents with a variety of clinical signs and symptoms and with several variations in the course of the disease. Although the most common early manifestations are skin lesions, the disease can disseminate to other organs, including nervous system, joints, heart, other muscles, and the eye. Because of nonspecific clinical signs of the disease, in most cases microbiological confirmation of infection is necessary. The main diagnostic tools are specific antibody detection methods, although serological testing can be difficult, because it can yield false-negative results, especially in the early stage of disease, and also false-positive results. The complexity of antigenic composition of spirochaetes belonging to the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex has also posed challenges for the serodiagnosis of Lyme borreliosis. In our research, we evaluated specific IgM and IgG antibody response of patient with suspected early Lyme disease with two commercially available assays, VIDAS Lyme IgM and IgG (BioMerieux, France) and LIAISON Borrelia Quant IgM and Borrelia IgG (DiaSorin, Italy). The principle of detection of the VIDAS Lyme assays is based on the enzyme linked fluorescent assay technique and LIAISON Borrelia assay uses chemiluminescence immunoassay technology for the determination of specific antibodies. We also made comparison between the results of this two test.

We tested 102 blood samples from patients with suspected early Lyme borreliosis. There were 49 (48,0 %) positive results with VIDAS Lyme IgM test and 51 (50,0 %) positive results with LIAISON Borrelia Quant IgM test; the results were matching in 78 (76,5 %) cases. There were 56 (54,9 %) positive results with VIDAS Lyme IgG test and 62 (60,8 %) positive results with LIAISON Borrelia IgG test; the results were matching in 88 (86,3 %) cases. We concluded that there is no statistically significant differences between results obtained with VIDAS Lyme and LIAISON Borrelia test for detecting specific IgM antibodies. On the other hand, we found statistically significant differences between results obtained with VIDAS Lyme and LIAISON Borrelia test for detecting specific IgG antibodies.

SEZNAM OKRAJŠAV

ACA – acrodermatitis chronica atrophicans

BSA – goveji serumski albumin

CLIA – kemiluminiscenčni test (*angl.* chemiluminescence immunoassay)

DNK – deoksiribonukleinska kislina

Dbp – proteini, ki se vežejo na dekorin (*angl.* decorin binding protein)

EIT – encimsko imunski test

ELFA – encimsko imunski fluorescenčni test (*angl.* enzyme-linked fluorescence assay)

ELISA – najširše uporabljan encimsko imunski test (*angl.* Enzyme - linked immunosorbent assay)

IFT – imunofluorescenčni test

IgG – imunoglobulini razreda G

IgM – imunoglobulini razreda M

IR – nespremenljiva regija (*angl.* invariable region)

kDA – kilo Dalton

LIA – imunoluminescenčni test

MKP – modificirano Kelly-Pettenkofer gojišče

MLE – kartica s podatki o umeritvenih krivuljah VIDAS Lyme testa (*angl.* master lot entry)

PCR – verižna reakcija s polimerazo (*angl.* polymerase chain reaction)

pH – merilo za koncentracijo prostih pozitivnih vodikovih ionov v raztopini (*angl.* potential hydrogen)

RFV – relativna fluorescenčna vrednost

SPR – zbirnik trdne faze (*angl.* solid phase receptable)

VlsE – sekvenčno spremenljiva beljakovina (*angl.* variable major protein-like sequence expressed)

1. UVOD

Lymfska borelioza je bolezen, ki jo povzročajo spirohete iz kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sensu lato – v širokem pomenu), ki jih prenašajo klopi (1). Kompleks *B. burgdorferi* sensu lato vsebuje borelije, ki niso identificirane do nivoja vrste (2). Bolezen je dobila ime po ameriški pokrajini Lyme v državi Connecticut v ZDA, kjer se je leta 1975 pojavila v endemični obliki pri otrocih, ki so imeli otekle velike sklepe, kar so sprva diagnosticirali kot juvenilni revmatoidni artritis (3). Kot ločena entiteta je bila bolezen opisana dve leti kasneje, leta 1977 (4). Najpogosteje se pojavlja v severni Ameriki in v predelih Evrazije z zmernim podnebjem (1). Razširjenost lymfske borelioze se ujema z razširjenostjo njenih prenašalcev, ščitastih klopov iz rodu *Ixodes* (5).

1. 1. BORELIJE LYMSKE BORELIOZE

1.1.1. Taksonomska uvrstitev *B. burgdorferi* sensu lato in značilnosti bakterije

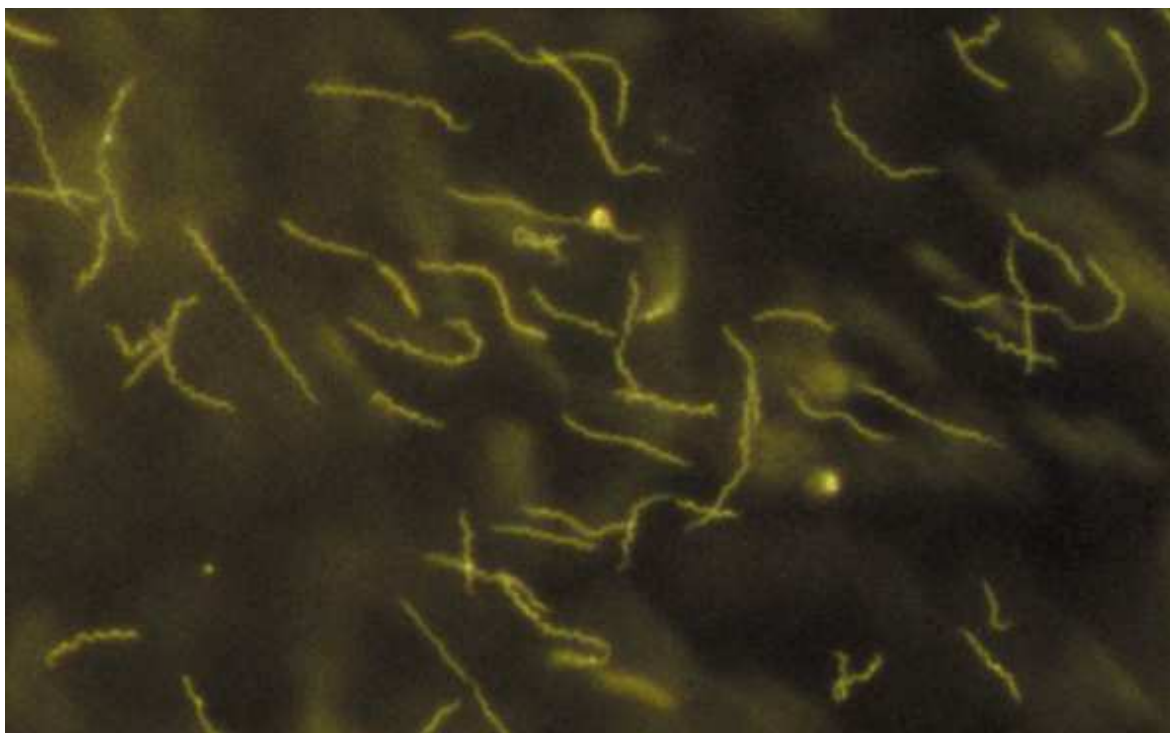
V red *Spirochaetales* sodita družini *Spirochaetaceae* in *Leptospiraceae*. Družina *Spirochaetaceae* vključuje naslednje rodove: *Treponema*, *Spirochaeta*, *Cristispira* in *Borrelia*, v družino *Leptospiraceae* pa sodita rodova *Leptospira* in *Leptonema* (6). Borelijske vrste se delijo v dve glavni kategoriji, na borelije, ki povzročajo povratno mrzlico in na borelije lymfske borelioze (7).

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

→ družina *Leptospiraceae* → rod *Leptospira*
→ rod *Leptonema*

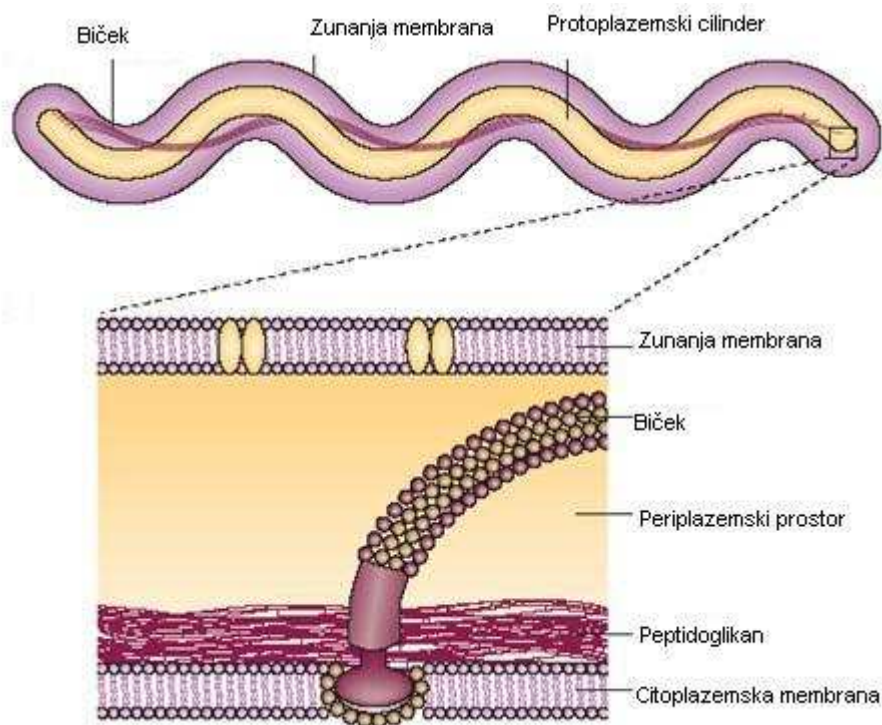
Slika 1: Taksonomska uvrstitev rodu *Borrelia*.

Borelije lymške borelioze so izredno gibljive spiralne bakterije, dolge od 5 do 30 μm (8) in široke od 0,2 do 0,25 μm (9). Imajo 7 do 11 periplazemskih bičkov, ki jim omogočajo gibanje z obračanjem, upogibanjem na mestu ali svedrastim zavijanjem (8). Bički so pripeti na nasprotnih polih bakterije, od koder se širijo proti sredini celic in se tam prekrivajo. Edinstvena struktura bičkov omogoča bakterijam gibanje skozi viskozne medije, kar je domnevno pomembna sposobnost za migracijo borelij iz kože do odajenih tkiv (8, 10). Vidne so v mikroskopskem preparatu pri mikroskopiranju v temnem polju (slika 2).



Slika 2: Borelije v preparatu pri mikroskopiranju v temnem polju (11).

Borelijski protoplazemski cilinder je najprej obdan s celično membrano, nato z bičkom in na koncu še z zunanjo membrano, ki je le ohlapno povezana z globlje ležečimi strukturami (7). Zunanja membrana borelij je podobna membranam po Gramu negativnih bakterij, razlikuje se predvsem po vsebnosti beljakovin. Borelije imajo zelo veliko zunanjih površinskih beljakovin in redke transmembranske beljakovine (7, 10). Strukturo borelij prikazuje slika 3.



Slika 3: Struktura borelij.

Razvidno je, da je posamezen biček pripet na citoplazemsko membrano in se skozi celično steno razširi v periplazemski prostor (12).

Borelije so počasi rastoče, anaerobne, biokemično neaktivne bakterije. Ker za rast in razmnoževanje potrebujejo obogatena gojišča z dodatkom zajčjega seruma, govejih albuminov in želatine, jih prištevamo med bakterije, ki so zahtevne za kultivacijo (8).

Obstajajo razlike v porazdelitvi borelijskih vrst po svetu (2, 13). Od trenutno opisanih 19 borelijskih vrst, ki sodijo v kompleks *Borrelia burgdorferi* sensu lato, jih v Evropi od vrst, ki so znane kot patogene za človeka, prevladuje najmanj pet: *B. burgdorferi* sensu stricto (sensu stricto – v ozkem pomenu), *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis* in *B. spielmanii* (14, 15). Večino primerov lymške borelioze v Evropi povzročita vrsti *B. afzelii* in *B. garinii*, medtem ko je v severni Ameriki edina vrsta, ki povzroča bolezen pri človeku *B. burgdorferi* sensu stricto. V Aziji prevladuje *B. garinii* (1).

Sevi borelij se med seboj razlikujejo po beljakovinskem profilu oziroma po vrsti, količini in molekularni masi izraženih beljakovin. Na mnogih borelijskih beljakovinah se nahajajo antigenske determinante, ki pri okuženih osebah sprožijo nastajanje specifičnih protiteles

(16). Poleg antigenske raznolikosti imajo borelije tudi zmožnost, da izražanje svojih antigenov spreminjajo glede na okolje, v katerem se nahajajo. Antigenska variacija je učinkovita strategija izogibanja imunskemu odgovoru, kar borelijam omogoča preživetje v tkivih (17, 18).

1.1.2. Borelijski antigeni in genom

Glavna strukturna komponenta bičkov je flagelin – 41 kDa velika beljakovina, ki je zelo močan antigen in običajno sproži nastajanje prvih protiteles (7, 8, 16). Na zunanji membrani izražajo borelije različne beljakovine, ki so potrebne za vzdrževanje njene strukture; nekatere sodelujejo pri encimskih reakcijah, druge pri transportu skozi membrano. Imenujemo jih zunanje površinske beljakovine (*angl.* Outer surface protein; Osp), označujemo jih z OspA, OspB, OspC, OspD, OspE in OspF. Med prenosom borelij se izražajo različni geni, ki kodirajo Osp proteine. Domnevajo, da te zunanje površinske beljakovine pomagajo spirohetam pri prilagoditvi in preživetju v izrazito različnih okoljih (19). OspA (31 kDa), OspB (34 kDa) in OspC (21 do 25 kDa) so poglobitni borelijski antigeni, antigenska heterogenost borelij pa je predvsem odraz raznolikosti zunanjih površinskih beljakovin (8, 16).

Borelije dinamično spreminjajo arhitekturo svojih površinskih antigenov v odgovor na spremembo okolja, ki vključuje tudi razvoj specifičnega imunskega odziva. Namerna regulacija izražanja antigenov je bistvena za preživetje spirohet v različnih okoljih tekom svojega življenjskega cikla (17, 19).

Spirohete lymske borelioze v okuženih klopah obilno izražajo OspA in OspB. Med klopovim sesanjem krvi (ko se nahajajo še v njihovem črevesju) je izražanje OspA in OspB zavrto, izražanje OspC in nekaterih drugih proteinov pa je spodbujeno, ta proces pa pripravi borelije na okužbo sesalcev. Zavrtje izražanje OspA in OspB je namreč ključnega pomena za okužbo sesalcev, saj bi nadaljnje izražanje teh proteinov povzročilo močan humoralni imunski odziv gostitelja, s čimer bi bil učinkovito preprečen prevzem borelij iz vektorja, ne glede na to ali sta OspA in OspB učinkoviti tarči sinteze protiteles v sesalcih. Borelije obilno izražajo OspC samo med zgodnjim stadijem okužbe (20, 21).

OspC je heterogen in se pri posameznih vrstah, kakor tudi znotraj kompleksa *B. burgdorferi* sensu lato, razlikuje v aminokislinski sestavi med zaporedji. Iskanje

imunogenih epitopov, ki so ohranjeni med OspC proteini, je vodilo do razvoja sintetičnih proteinov, ki vsebujejo ohranjeno C – terminalno zaporedje 10 aminokislin (22).

Specifične interakcije med patogenom in gostiteljevim tkivom pogosto predstavljajo kritičen prvi korak za naselitev borelij. Zato ne preseneča dejstvo, da imajo borelije več adhezinov, da si tako zagotovijo razsoj na različne strani. Spirohete se med drugim vežejo na dekorin, proteoglikah, ki se pri ljudeh nahaja v različnih tkivih (23). Borelije kodirajo dva proteina, ki se vežeta na dekorin. To sta proteina DbpA in DbpB (*angl.* decorin-binding protein; Dbp), njuna transkripcija pa je med okužbo sesalskih gostiteljev povečana. Dokazali so tudi, da vezava na dekorin borelijam zagotavlja mesto zaščite, kar jim omogoča tudi izognitev delovanju imunskega sistema, to pa nakazuje na dejstvo, da lahko vezava na gostiteljeve proteine pomaga pri »skrivanju« v določenih tkivih (23).

Tudi protein DbpA, katerega velikost je približno 17 kDa, je imunogen. Podobno kot pri drugih primerih borelijskih antigenov, tudi pri tem proteinu obstajajo razlike v aminokislinskem zaporedju med vrstami borelij (22).

Borelije izražajo na svoji površini tudi lipoprotein VlsE (*angl.* variable major protein-like sequence expressed), velik od 34 do 35 kDa. VlsE protein je sestavljen iz dveh nespremenljivih domen naaminskem in karboksilnem koncu in centralne spremenljive domene. Centralna domena je sestavljena iz šestih nespremenljivih regij, poimenovanih od IR1 do IR6, posejanimi med šestimi spremenljivimi regijami. Študije antigenosti vseh nespremenljivih domen tega proteina so pokazale, da je nespremenljiva genska regija IR6 visoko imunogena. Njeno zaporedje je ohranjeno med različnimi borelijskimi vrstami in sevi, kar pomeni, da je ta regija primeren kandidat za splošen antigen (18, 22, 24). V živi bakteriji so torej nespremenljive regije zakrite s spremenljivimi regijami in na ta način zaščitene pred neposrednim napadom imunskega sistema gostitelja. Regije IR so izpostavljene na površini VlsE proteina, vendar ne na sami površini spirohet in so tako nedostopne specifičnim protitelesom proti IR6. Dominantni epitopi VlsE lahko preusmerijo imunski odgovor na ostale regije tega proteina, ki so sposobne izzvati tvorbo protiteles (24). VlsE je borelijski protein, ki je potreben za vzdrževanje okužbe pri sesalcih in katerega sinteza se začne približno v času, ko se preneha sinteza OspC. Čeprav funkcija VlsE ni povsem znana, ima ta lipoprotein dovršen sistem za svoje spreminjanje (25).

V patogenezi lymške borelioze se v različnih stadijih bolezni pojavljajo in izginjajo številni antigeni (26).

Poleg naštetih antigenov uvrščamo med specifične borelijske antigene tudi beljakovine p83/100, p39 in p18. Večina teh beljakovin se nahaja v celični citoplazmi (10, 13, 14).

Za preživetje borelij tako v svojem biološkem rezervoarju kot tudi v prenašalcu so ključnega pomena adhezini (1). Z adhezini se borelije vežejo na receptorje v klopu, receptorje zunajceličnega matriksa sesalcev, receptorje na celicah sesalcev in na receptorje endotela žil sesalcev (27).

Genom *B. burgdorferi* je razmeroma majhen in sestoji iz linearnega kromosoma ter različnega števila linearnih in krožnih plazmidov (28, 29). Približno 30 do 40 % genoma pripada plazmidom, preostanek pa kromosomu, ki sodi med najmanjše opisane kromosome (8, 30). Majhen genov je povezan s pomanjkanjem genov, ki sodelujejo v sintezi aminokislin, maščobnih kislin, kofaktorjev encimov in nukleotidov. Pomanjkanje biosinteznih poti je razlog, da za *in vitro* kultivacijo borelij potrebujemo gojišča obogatena s serumskimi dodatki iz sesalskih tkiv (7).

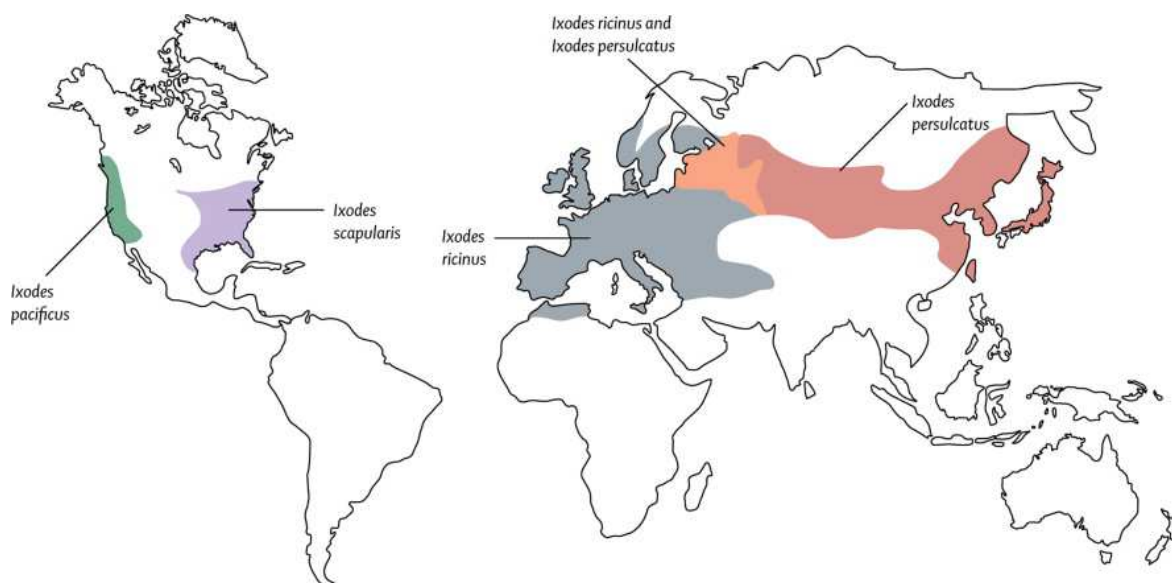
Na krožnem plazmidu cp26 se nahajajo geni, ki kodirajo metabolične encime, prenešalce molekul in encime, ki pomagajo pri vzpostavitvi zvitja telomer pri podvajanju borelijskega linearnega kromosoma. Ostali plazmidi kodirajo zelo malo metaboličnih genov ali genov, ki so pomembni za vzdrževanje funkcij borelij, kodirajo pa številne površinske lipoproteine (30). Imunološko pomembni borelijski antigeni so kodirani tako na plazmidih kot tudi na kromosomu. Identificiranih je bilo več kot 100 različnih lipoproteinov, ki jih kodirajo plazmidi. Analize humoralnega imunskega odziva pri pacientih z lymško boreliozo z ozirom na imunodominantne borelijske antigene razkrivajo specifične, od stadija okužbe odvisne značilnosti, ki so tudi diagnostično pomembne (22, 31).

Molekularne analize borelijskega genoma omogočajo opredelitev vrste borelij, njihove filogenetske sorodnosti in evolucijske spremembe, ugotavljanje različnosti borelij v raznih bioloških rezervoarjih, določanje virulenčnih ali za patogenezo pomembnih genov in njihovih morebitnih sprememb ter mnoge druge značilnosti. (2, 30).

1.1.3. Ekologija in epidemiologija *B. burgdorferi* sensu lato

Lymsko boreliozo uvrščamo med zoonoze, pojavlja se sezonsko in sovpada s časom aktivnosti klopov (1). Življenjski cikel borelij lymške borelioze zajema dinamične interakcije med bakterijo, gostitelji in prenašalci (32). Z borelijami lymške borelioze so okužene mnoge živali in ptice, vendar vsi biološki gostitelji niso kompetenten rezervoar (15). Predpogoj, da borelija preživi v svojem gostitelju dlje časa in da jo lahko ta posreduje prenašalcem je, da je ne uniči sistem komplementa gostitelja. Nekompetentni gostitelji so lahko vir borelij le prehodni čas (33).

Najbolj znani prenašalci *B. burgdorferi* sensu lato so trdi, ščitasti klopi iz rodu *Ixodes* (34), med njimi je v Evropi najbolj pomemben *Ixodes ricinus*, v Aziji *Ixodes persulcatus*, na vzhodni obali severne Amerike *Ixodes scapularis* in na zahodni obali severne Amerike *Ixodes pacificus* (1). Slika 4 prikazuje porazdelitev vektorjev lymške borelioze.



Slika 4: Geografska porazdelitev trdih, ščitastih klopov iz rodu *Ixodes* (1).

Vse vrste klopov imajo podoben življenjski krog (slika 5). Iz jajčec se izležejo larve, ki se hranijo na vretenčarskem gostitelju od 3 do 5 dni. Po hranjenju odpadejo in se preobrazijo v nimfe. Tudi nimfe sesajo na gostitelju od 3 do 5 dni, nato tudi one odpadejo in se preobrazijo v odraslo žival. Preobrazba poteka na rastlinju ali na velikem sesalcu, kjer

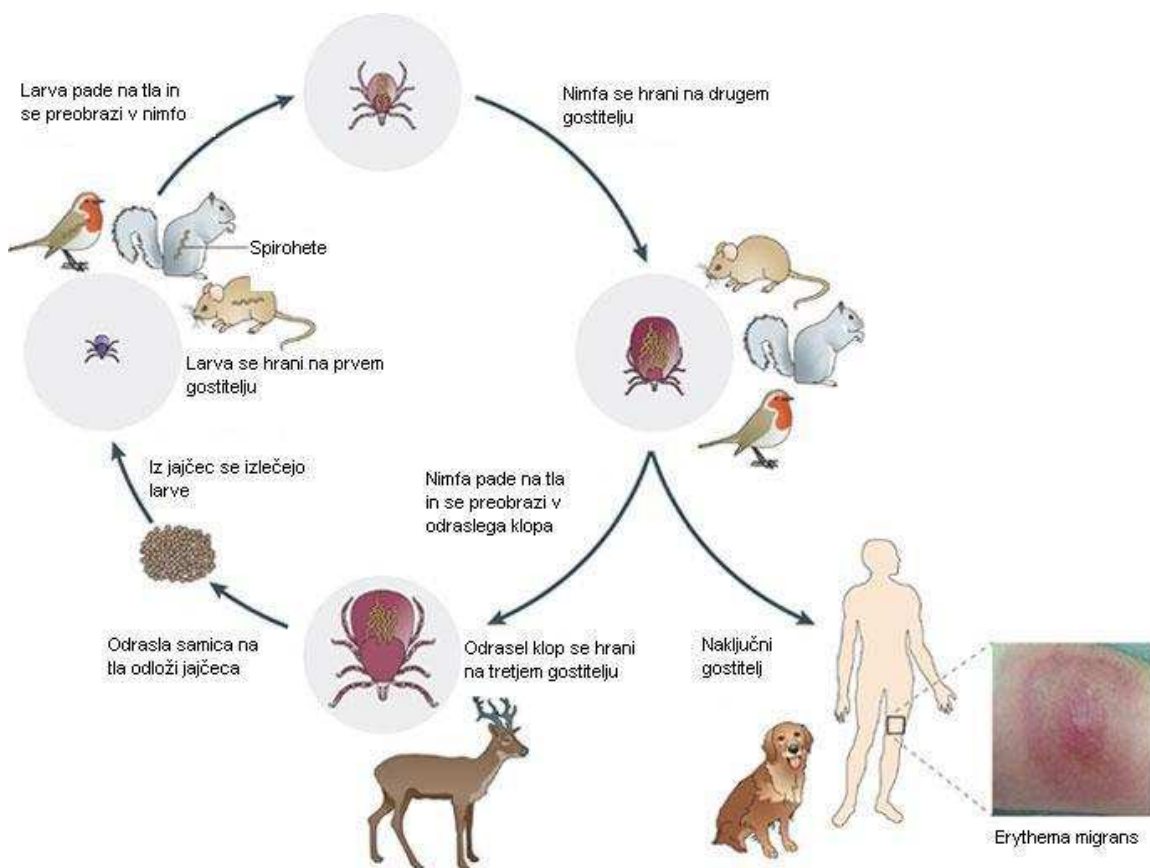
odrasla samica sesa kri od 9 do 11 dni. Samica nato odleže jajčeca v zemljo. Življenjski krog klopa traja običajno 2 leti, lahko pa tudi 5 – 6 let (35).

Klop sesa le pri temperaturah med 23 do 27 °C, torej spomladi, zgodaj poleti in zgodaj jeseni (35). Za njegovo preživetje je pomembna stalna relativna vlažnost ozračja okoli 80 % (5).

Klop se okuži z borelijami ob sesanju krvi v času spirohetemije gostitelja. Če se okuži kot larva lahko borelije ob preobrazbi prenese v nimfe in nato v odraslega klopa. Okužene larve, nimfe in odrasli klopi lahko pri sesanju krvi prenesejo borelije na živali ali na človeka in povzročijo bolezen. Tak prenos borelij imenujemo transstadialen oziroma horizontalen. Borelije se lahko prenesejo tudi transovarialno oziroma vertikalno: okužena samica odloži okužena jajčeca, iz katerih se izležejo okužene larve (36). Ker se transovarialen prenos zgodi le izjemoma, larve ne sodijo med pomembne prenašalce lymške borelioze (1). Glede na visoko pojavnost infekcije pri nimfah v primerjavi z nizko pojavnostjo pri larvah, so nimfe ključnega pomena pri prenosu borelijske okužbe na gostitelje (37).

Ko se klop prisesa na gostitelja, spirohete, ki so prisotne v lumnu črevesja, migrirajo skozi črevesno steno in dosežejo žleze slinavke in se tako 2 do 3 dni po pritrditvi klopa preko sline prenesejo v gostitelja. Do uspešnega prenosa spirohet lahko pride pri sistemsko okuženih klopih, ki imajo borelije predvsem v žlezah slinavkah, tudi že po 17 do 29 urah po pritrditvi klopa *Ixodes ricinus* (37, 38). Z daljšim sesanjem klopa na gostitelju se večata verjetnost prenosa borelij iz gostitelja na klopa in s klopa na gostitelja, odvisno, kdo je primarno okužen (39).

Larve sesajo na majhnih sesalcih, nimfe na srednje velikih sesalcih, ptičih in plazilcih, odrasli klopi pa raje izberejo velike sesalce, kot so srnjad, govedo, prašiči ali psi. Človek je klopov naključni gostitelj (5, 8). Glavni rezervoarji borelij med vretenčarji so majhni sesalci, kot so miši in voluharice, ter nekatere vrste ptic (1). Rezervoar *B. afzelii* in *B. bavariensis* predstavljajo glodalci, ptiči pa so kompetenten rezervoar za *B. garinii* (14).



Slika 5: Življenjski krog klopov (povzeto po 40).

Lymfska borelijoza je v Evropi in severni Ameriki najpogostejša infektivna bolezen, katere povzročitelja prenašajo klopi (42). V Sloveniji je lymfska borelijoza endemična (44), bolniki z lymfsko borelijozo se namreč pojavljajo po vsej Sloveniji. Sodimo med države z najvišjo stopnjo pojavnosti te bolezni (76 prijavljenih primerov/100 000 prebivalcev v letu 2011) (42, 43). Prijavljanje bolezni je bilo pri nas predpisano z Zakonom o nalezljivih boleznih v letu 1987. Število registriranih bolnikov narašča iz leta v leto, ni pa povsem pojasnjeno v kolikšni meri je to odraz resničnega porasta števila zbolelih, koliko pa gre na račun boljšega prepoznavanja bolezni in/ali boljše registracije (44).

1.2. KLINIČNA SLIKA LYMSKE BORELIOZE

Klinična slika je odvisna od borelijske vrste, ki bolezen povzroči (46). *B. burgdorferi* sensu stricto je edina patogena vrsta, ki so jo identificirali v severni Ameriki (1, 2, 47). V Evropi pa se pojavlja vseh pet borelijskih vrst, ki so potrjene kot patogene za človeka, poleg tega

pa se pojavljajo še tri borelijske vrste, to so *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* in *B. finlandensis* (48), katerih patogenost je še vprašljiva (15). Vse klinične znake lymške borelioze pri pacientih iz severne Amerike lahko torej pripišemo *B. burgdorferi* sensu stricto, medtem ko v Evropi povzroča različne klinične manifestacije vsaj pet borelijskih vrst (1).

Oprelitev borelij, ki so jih osamili pri bolnikih v Sloveniji kaže, da je najpogostejša povzročiteljica lymške borelioze pri nas *B. afzelii* (do 80%), sledi ji *B. garinii* (do 20%), zelo redko pa so osamili vrsto *B. burgdorferi* sensu stricto (manj kot v 5%) in *B. spielmanii* (manj kot v 1%) (48).

Lymška borelioza prizadene številne organske sisteme in ima zelo raznolik potek. Delimo jo na zgodnje in pozno obdobje, zgodnje obdobje pa še naprej na lokalizirano in diseminirano. Lokalizirani zgodnji fazi sledi po latentnem obdobju, ki traja nekaj dni ali tednov, faza zgodnje diseminirane okužbe. Pozna ali perzistentna faza infekcije pa se običajno začne leto ali več po nastopu okužbe. Le izjemoma je bolezen izražena v celoti, večinoma so pri bolnikih izraženi le posamezni bolezenski znaki. Posameznik je lahko tudi brez simptomov do zgodnjega diseminiranega ali poznega obdobja bolezni (4, 46). Klinični znaki lymške borelioze so povzeti v preglednici I.

Običajne kožne manifestacije lymške borelioze vključujejo erythema migrans, limfocitom in acrodermatitis chronica atrophicans (4, 49). Zadnji dve stanji ponavadi povzročata vrsti *B. garinii* in *B. afzelii*, torej sta posledično bolj pogosti v Evropi (45).

Erythema migrans je najpogostejša manifestacija lymške borelioze in predstavlja zgodnjo lokalizirano obliko bolezni (49). Nekaj dni po vbodu klopa pride do lokalnega širjenja borelij v koži pri 60 do 80 odstotkih bolnikov (4) in okužba se začne kazati s kožno lezijo, imenovano erythema migrans. Ta se kaže kot počasi razširjajoča se rdečina, ki začne v sredini bledeti (1, 50), navadno je okrogle ali ovalne oblike. Kožne spremembe lahko spremljajo srbenje, pekoč občutek, bolečina in toplota ali druge splošne težave (utrujenost, bolečine v mišicah in sklepih, glavobol in vročina). Prisotnost sistemskih težav pa nakazuje, da je prišlo do razsoja povzročitelja preko krvi, prav tako je možen razsoj preko limfe (4, 46). Klinična manifestacija razsoja bakterij je pojav dodatnih, sekundarnih kožnih izpuščajev, ki so podobni primarnemu. Dva ali več kožnih izpuščajev imenujemo multipli erythema migrans. Sekundarne kožne spremembe so praviloma manjše od primarne, v njih

ni sledi vboda klopa (51). Erythema migrans po nekaj tednih sam od sebe izgine (1). V Evropi je najpogostejši povzročitelj erytheme migrans *B. afzelii* (46).

Druga oblika zgodnje lokalizirane lymške borelioze je borelijski limfocitom, pri katerem gre za benigno, poliklonsko proliferacijo limfocitov B v koži in podkožju, ki pa je odraz imunske reakcije na prisotnost borelijskih antigenov v tem predelu. Pojavlja se v obliki mehkega, nebolečega, modro – rdečega vozliča ali lehe, in sicer pri odraslih najpogosteje na prsni bradavici, pri otrocih pa na ušesni mečici. Tudi borelijski limfocitom izgine sam od sebe (52).

Med pozne borelijske kožne manifestacije sodi acrodermatitis chronica atrophicans, ki v nasprotju z erythema migrans in borelijskim limfocitomom ne izgine sama (53). Pogosto je njena povzročiteljica *B. afzelli* (45). Prve spremembe se pokažejo mesece do leta po vnosu borelij v organizem. Začetek bolezni je postopen, komaj zaznaven: pojavi se rdečomodrikasto obarvana koža (največkrat na hrbtišču ene od rok, na hrbtne strani stopala ali v predelu kolena), ki se zelo počasi širi. Najprej opazimo oteklino in rdečino, šele po več mesecih oteklina izgine in pojavijo se atrofične spremembe kože: tanka, nagubana, ranljiva, modrikasto obarvana koža, skozi prosojajo žile (49). Acrodermatitis chronica atrophicans je najpogostejša pojavna oblika pozne lymške borelioze v Evropi (4).

Prizadetost živčevja pri lymški boreliozi imenujemo lymška nevroborelioza. Zajame lahko osrednje in/ali periferno živčevje. Nevrološke manifestacije se pojavijo v zgodnji diseminirani in kronični, pozni fazi lymške borelioze (54). Lymško nevroboreliozo običajno povzroča *B. garinii* (2).

Tipično klinično sliko zgodnje lymške nevroborelioze predstavlja meningoradikulonevritis (Garin – Bijadoux – Bannwarthov sindrom), za katerega so najbolj značilne hude, seleče se bolečine, ki so posledica radikulitisa ali radikulonevritisa (55). V zgodnjem obdobju lymške nevroborelioze se pojavlja tudi borelijski meningitis (54). Prizadet je lahko tudi katerikoli možganski živec, največkrat pride do ohromitve obraznega živca po perifernem tipu (1, 4). O pozni lymški nevroboreliozi govorimo, kadar imajo bolniki stalno prisotno vnetje osrednjega ali perifernega živčevja, ki traja več kot 6 mesecev (55). Pojavlja se zelo redko (51).

V Ameriki je lymški artritis najbolj običajna pojavna oblika klinične slike zgodnje diseminirane in pozne oblike lymške borelioze, v Evropi pa se pojavlja redkeje (56).

Značilni so otekli, boleči sklepi (46). Prizadeti so predvsem veliki sklepi, najpogosteje koleno, redkeje komolec in gleženj, le včasih ramenski sklep ali kolk. Potek lymškega artritisa je močno spremenljiv, praviloma ponavljajoč in lahko traja več let. V začetku so napadi pogostejši in krajši, nato se trajanje vnetja sklepov podaljša na več tednov ali mesecev (56, 57).

Opisani so tudi primeri bolnikov z akutnim vnetjem mišic v zgodnjem in poznem obdobju lymške borelioze. Bolniki imajo hude bolečine in slabšo moč v prizadeti mišici (58).

Čeprav je srce v poteku lymške borelioze prizadeto redko, predstavlja lymški karditis pomembno manifestacijo bolezni, saj lahko ogrozi življenje bolnika (46). Klinična slika je odvisna od oblike prizadetosti srca, lahko gre za motnje prevajanja, motnje ritma ali motnje kontraktilnosti, kaže se lahko tudi kot miokarditis ali perikarditis (51, 60). Največkrat se lymški karditis odraža z atrioventrikularnim blokom kot rezultatom motnje prevajanja električnih dražljajev (46).

Zelo redko se lahko pri lymški boreliozi pojavlja prizadetost oči. Razvoj očesnih manifestacij zasledimo v vseh stadijih bolezni, najpogostejši je v fazi zgodnje razsejane lymške borelioze. Prizadet je lahko katerikoli del očesa, dolgotrajno vnetje pa ima lahko za posledico hudo okvaro ali celo izgubo vida (51).

Okvare živčevja, srca in sklepov ogrozijo življenje le izjemoma, povzročijo pa lahko dokaj hude težave, ki močno otežujejo vsakdanje življenje in pri nekaterih bolnikih povzročijo trajno invalidnost. Poleg tega so bolniki pogosto utrujeni, se slabo počutijo navajajo bolečine, ki se spreminjajo po jakosti in mestu, so nervozni, nepotrpežljivi, slabo spijo, neredko so v napoto sami sebi in okolici. Pogosto tožijo, da nimajo prave volje do dela in življenja, da se ne morejo zbrati in da imajo težave z mišljenjem. Včasih se psihično spremenijo, nekateri potrebujejo psihiatrično pomoč (4).

Okužba z *B. burgdorferi* sensu lato lahko poteka tudi asimptomatsko (1).

Preglednica I: Klinični znaki lymške borelioze v posameznih obdobjih (povzeto po 1, 46, 60).

| STADIJ BOLEZNI | | KLINIČNI ZNAK | ZAČETEK BOLEZNI | TRAJANJE BOLEZNI* |
|---|---------------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| ZGODNJE BOLEZENSKO OBDOBJE | LOKALIZIRANA OKUŽBA (1. stadij) | erythema migrans | nekaj dni do tednov ** | nekaj tednov do mesecev |
| | | borelijski limfocitom | nekaj dni do tednov ** | nekaj tednov do več mesecev |
| | DISEMINIRANA OKUŽBA (2. stadij) | multipli erythema migrans | nekaj dni do tednov ** | nekaj tednov do mesecev |
| | | nevroborelioza | nekaj tednov do mesecev ** | več mesecev |
| | | prizadetost srca | nekaj tednov do mesecev ** | nekaj tednov |
| | | prizadetost sklepov | običajno več mesecev ** | več mesecev |
| POZNO BOLEZENSKO OBDOBJE (3. stadij) | KRONIČNA PRIZADETOST: | sklepov | vsaj 6 (12) mesecev *** | Neomejeno |
| | | živčevja | vsaj 6 (12) mesecev *** | Neomejeno |
| | | kože (ACA) | več mesecev do let ** | Neomejeno (trajno) |

Legenda:

* brez ustreznega zdravljenja

** po okužbi

*** po začetku prvih bolezenskih znakov

Objektivni klinični znaki in subjektivni klinični simptomi lymške borelioze praviloma izginejo med ali po zaključenem ustreznem antibiotičnem zdravljenju. Za simptome, ki vztrajajo vsaj 6 mesecev po ustreznem antibiotičnem zdravljenju lymške borelioze in so tako hudi, da zmanjšajo poklicno, izobrazbeno, socialno ali osebno zmogljivost bolnika, so

strokovnjaki predlagali izraz sindrom po preboleli lymski boreliozi (*angl.* post - Lyme disease syndrome) (41).

1.3. DIAGNOSTIKA LYMSKE BORELIOZE

Diagnostika lymske borelioze naj bi primarno temeljila na klinični sliki in oceni tveganja izpostavljenosti klopom. V večini primerov je zaradi nespecifičnosti mnogih kliničnih znakov potrebna laboratorijska potrditev okužbe (61).

Edini klinični znak, ki omogoča zanesljivo diagnozo lymske borelioze je erythema migrans, pri vseh ostalih bolezenskih znakih je za zanesljivo diagnozo potrebno borelijsko okužbo dokazati z mikrobiološkimi testi (1, 22, 62).

Borelijsko okužbo neposredno dokazujemo z naslednjimi metodami:

- osamitev *B. burgdorferi* sensu lato,
- dokazovanje molekule DNK *B. burgdorferi* sensu lato (22, 62).

Lymsko boreliozo lahko dokažemo posredno z dokazom bolnikovega imunskega odziva na borelijske antigene. Pri tem lahko uporabimo dve metodi:

- dokaz specifičnih protiteles in
- dokaz stimulacije limfocitov T (22, 62).

Mnogokrat uporabimo več metod istočasno, izberemo jih glede na čas trajanja okužbe in potek klinične slike (22, 62).

1.3.1. Osamitev *B. burgdorferi* sensu lato

Osamitev povzročitelja iz kliničnih vzorcev bolnika je najbolj prepričljiva metoda dokazovanja okužbe in ji rečemo »zlati standard«. Borelije rastejo v posebnem gojišču, obogatenem z zajčjim serumom, serumskimi albumini in želatino – gojišče imenujemo modificirano Kelly-Pettenkofer (MKP) gojišče (22, 62). Kultivacija poteka pri temperaturi od 30 do 34 °C pod mikroaerofilnimi pogoji (9, 22). Ker imajo borelije podvojitveni čas od

7 do 20 ur, traja poskus izolacije vsaj šest tednov, največ pa 12 tednov (9). Pri človeku so osamili borelije iz različnih tkiv in telesnih tekočin (22, 62). Osamitvi borelij sledi identifikacija izoliranega seva. Vrsto borelij določamo z analizo borelijskega genoma.

Kultivacija se ne uporablja velikokrat v rutinski laboratorijski diagnostiki lymške borelioze, saj je precej zamudna, občutljivost te metode pa je zelo variabilana. Stopnja uspešnosti pri osamitvi borelij iz kože bolnikov s klinično sliko erythema migrans znaša od najmanj 40 % do 86 % (22, 62, 63). Izolacije iz drugih kužnin so precej manj uspešne, čeprav so včasih edini način, s katerim lahko dokažemo borelijsko okužbo (62).

1.3.2. Dokaz borelijske DNK

Borelijsko DNK dokazujemo z verižno reakcijo s polimerazo (*angl.* polymerase chain reaction; PCR). Z metodo PCR lahko dokažemo molekulo DNK bodisi žive bodisi mrtve borelije, pomembno je le da je ta ohranjena v vzorcih. Borelijsko DNK lahko dokazujemo v kateremkoli kliničnem vzorcu (koži, likvorju, sklepni tekočini, krvi). Zelo pomembna je izbira tarčnega odseka genoma za pomnoževanje, saj določa občutljivost in specifičnost preiskave (64). V primerjavi s kultivacijo je metoda PCR hitra in občutljiva, saj preiskavo naredimo v enem dnevu, dokaže pa se lahko že majhno število borelij. Pomanjkljiva je, ker ni standardizirana, zato lahko dobimo bodisi lažno pozitivne ali lažno negativne rezultate (9). Razlog lažno pozitivnih rezultatov je lahko kontaminacija vzorca z majhno količino tarčnega odseka pomnoževanja DNA, razlog lažno negativnih rezultatov pa izvira iz spremenljive narave borelijske DNA, kar lahko pomeni razlike v zaporedju tarčnega gena (64). Občutljivost testa PCR za detekcijo *B. burgdorferi* sensu lato je visoka pri vzorcih kože (69 % pri erythema migrans in 76 % pri acrodermatitis chronica atrophicans) in pri vzorcih sklepne tekočine (85 %) pri bolnikih z lymskim artritidom (65), redko pa so borelije dokazali v vzorcih krvi in likvorja, kar je tudi razlog neuporabe te metode v rutinski laboratorijski diagnostiki lymške borelioze (22, 62).

1.3.3. Dokaz specifičnih protiteles

Borelijska okužba izzove v bolniku specifičen protitelesni imunski odziv. Kljub temu, da so mnogi borelijski antigeni sposobni spodbuditi imunski sistem, izdelovanje specifičnih

protiteles nastaja zelo počasi (22, 62). Za nastanek imunskega odziva ne zadostuje le navzočnost antigena, ta mora biti prisoten v zadostni količini in tudi dostopen imunsko kompetentnim celicam. Kaže, da je za borelijsko okužbo značilno relativno majhno število borelij v tkivih, te se še skrijejo v predelih, ki niso najbolj dostopni imunsko kompetentnim celicam. Tudi sama borelija prekrije svoje antigene (površino prekrije s sluzjo ali antigene obrne navznoter celice), tako, da so prva protitelesa, ki sploh nastanejo pri bolniku usmerjena le proti enemu ali dvema antigenoma, zato je za nastanek specifičnih protiteles potrebno čakati več tednov (protitelesa IgM) ali več mesecev (protitelesa IgG). Ko je imunski sistem enkrat zadostno spodbujen z borelijskimi antigeni, izdelovanje protiteles postane veliko bolj dinamičen proces, količina protiteles v telesnih tekočinah se povečuje, pojavljajo se tudi protitelesa proti vse večjemu številu različnih borelijskih antigenov (22, 66). Velik pomen pri nastanku specifičnih protiteles ima antigenska heterogenost borelij. Zaradi izražanja različnih antigenov (različni proteinski profili borelij) borelije lahko izzovejo dokaj različen imunski odziv. Poleg raznolikosti borelijskih antigenov, imajo borelije tudi antigene, ki so podobni ali v nekaterih delih celo enaki antigenom drugih bakterij. Zato je možno, da bolnikova protitelesa reagirajo navzkrižno (16, 22, 62).

Specifična protitelesa razreda IgM, ki jih pogosto ni mogoče zaznati med prvima dvema tednoma okužbe, se ponavadi v krvi začnejo pojavljati 3 do 4 tedne po okužbi, njihova koncentracija pa doseže vrh po 6 do 8 tednih, nato pa začne upadati. Imunski odgovor z IgM protitelesi lahko vztraja še mesece ali leta po začetku okužbe (67). Specifična protitelesa razreda IgG se začnejo pojavljati 6 do 8 tednov po začetku okužbe, njihova koncentracija pa doseže maksimum po 4 do 6 mesecih. Koncentracija specifičnih IgG protiteles lahko po zdravljenju pade, vendar je tudi po klinični ozdravitvi pacienta ta protitelesa še možno zaznati tudi čez več let (68).

Prisotnost *B. burgdorferi* sensu lato v osrednjem živčevju sproži specifičen imunski odgovor v centralnem živčevju, kar pomeni intratekalno tvorbo specifičnih protiteles, ki se v likvorju pojavijo od drugega do šestega tedna po začetku nevroloških simptomov. Dokaz intratekelane tvorbe specifičnih protiteles predstavlja temelj diagnoze lymške nevroborelioze. Intratekalna tvorba borelijskih protiteles IgM običajno izgine v nekaj mesecih po zdravljenju, medtem ko lahko traja tvorba borelijskih protiteles IgG še nekaj mesecev ali let po uspešnem antibiotičnem zdravljenju (1, 55).

Eden izmed najbolj imunodominantnih antigenov pri zgodnjem imunskem odzivu na borelijsko okužbo je protein OspC (22). V zgodnjem poteku lymske borelioze OspC pogosto povzroči dobro viden imunski odgovor s sintezo protiteles razreda IgM, ki ga je moč dobro zaznati s testi, ki vključujejo rekombinanten OspC protein. Tako se OspC, verjetno v kombinaciji z drugimi zgodaj izraženimi antigeni, zdi dober kandidatni antigen za serološko diagnostiko okužbe v zgodnjem stadiju (69). Čeprav se protitelesa proti OspC v krvi bolnikov pojavijo zgodaj v poteku okužbe, se spirohete obdržijo v njihovi prisotnosti. Protitelesa proti OspA in OspB se pojavijo zelo pozno ali pa se sploh ne pojavijo (70).

Izražanje VlsE v klopih, sesalskih gostiteljih in pri in vitro kultivaciji še ni obsežno preučeno pa vendar nekatere študije močno nakazujejo, da se ta lipoprotein dosledno izraža med okužbo ljudi, saj je protitelesa proti nespremenljivi regiji IR6 možno zaznati v teh gostiteljih v akutni in kronični fazi okužbe. To je ena od bistvenih značilnosti, ki bi jih moral imeti antigen za diagnostiko okužbe (71), zato naj bi bila po mnenju mnogih avtorjev protitelesa proti VlsE najbolj zanesljiv serološki marker (72). Opazili so prisotnost specifičnih protiteles razreda IgM proti VlsE tako v zgodnjem kot tudi v kasnejših stadijih lymske borelioze, prav tako so ugotovili, da je prisotnost protiteles razreda IgG proti VlsE neodvisna od stadija okužbe (73). Ker se torej imunski sistem močno odzove na prisotnost VlsE, zlasti na regijo IR6, se rekombinantni proteini in sintetični peptidi, ki temeljijo na strukturi VlsE, uporabljajo v serološki diagnostiki lymske borelioze. Te visoko imunogene regije so zakrite pod površjem antigena VlsE in tako navidezno nedostopne protitelesom (16).

Borelijski adhezin DbpA je uporaben v serološki diagnostiki lymske borelioze, saj prav tako spodbudi nastajanje specifičnih protiteles. V raziskavi so z uporabo rekombinantnega DbpA pokazali, da spodbudi intenziven in specifičen odgovor imunskega sistema s sintezo protiteles razreda IgG zlasti v zgodnji diseminirani in pozni fazi (acrodermatitis chronica atrophicans in lymski artritis) poteka lymske borelioze. DbpA je torej imunodominanten antigen pri odgovoru imunskega sistema s protitelesi razreda IgG (74, 62).

Dokazovanje protiteles danes predstavlja najpogostejši način potrjevanja borelijske okužbe (62).

Specifična protitelesa dokazujemo v serumu, likvorju in sklepni tekočini bolnikov z imunofluorescenčnimi (IFT), encimskoimunskimi (EIT ali ELISA) ali imuno(western)blot testi (1, 22, 62). V splošnem velja pravilo, da mora serološka diagnostika slediti principom dvostopenjskega testiranja. Borelijska protitelesa na primarni ravni dokazujemo z občutljivim presejalnim testom (npr. EIT ali IFT), ki nam podajo titer oziroma koncentracijo bolnikovih specifičnih protiteles, v primeru pozitivnega ali mejnega rezultata pa specifičnost imunskega odziva presejalnega testa potrdimo s testi imuno(western)blot, ki so prav tako zelo občutljivi testi, saj zaznajo specifična protitelesa v zelo nizkih koncentracijah (22, 75).

Rezultate seroloških testiranj je vedno potrebno interpretirati v kontekstu s kliničnimi podatki. V zgodnjem lokaliziranem obdobju bolezni je samo 20 do 50 % bolnikov pozitivnih pri testiranju na prisotnost IgM in/ali IgG protiteles v serumu. Ponavadi v tem obdobju prevladujejo IgM protitelesa. V obdobju zgodnje diseminirane faze bolezni delež seropozitivnih naraste na 70 do 90 %. V primerih pozne faze bolezni se IgG protitelesa detektirajo pri vseh testiranih pacientih. Po drugi strani pa detekcija prisotnosti specifičnih protiteles ne dokazuje prisotnosti bolezni, saj lahko pomeni okužbo v preteklosti (62). Dinamiko nastanka protiteles s časom trajanja okužbe kaže preglednica II.

Preglednica II: Občutljivost serološke diagnostike pri dokazovanju lymške borelioze (62).

| Obdobje lymške borelioze | Občutljivost | Komentar |
|---------------------------------|---------------------|--|
| zgodnje, lokalizirano | 20 – 50 % | prevladujejo IgM protitelesa |
| zgodnje, diseminirano | 70 – 90 % | pri krajšem trajanju okužbe prevladujejo IgM protitelesa; pri daljšem trajanju okužbe prevladujejo IgG protitelesa |
| pozno | Blizu 100 % | običajno so prisotna samo IgG protitelesa |

V principu lahko pri pacientih z zgodnjimi kratkotrajnimi kliničnimi manifestacijami pride pri serološkem testiranju do negativnega rezultata (62). Lažno negativni rezultati se pri serološkem testiranju lahko pojavijo med prvimi tedni okužbe, ko še ne pride do

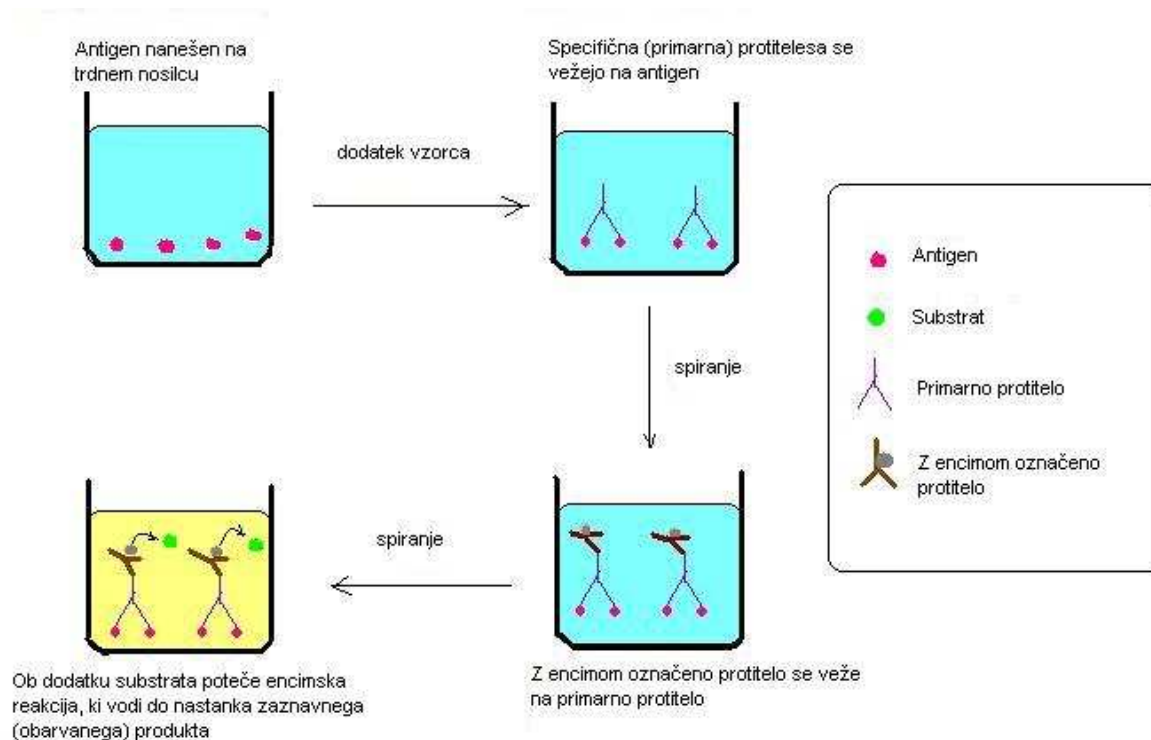
imunskega odgovora ali pa je količina protiteles še pod občutljivostjo testa (76). Do pojava lažno pozitivnih rezultatov serološkega testiranja, lahko pride tako pri zdravih ljudeh kot tudi pri bolnikih z nekaterimi drugimi okužbami (povratna mrzlica, sifilis), avtoimunskimi boleznimi in nevrološkimi motnjami (4, 76). Do pojava lažnih rezultatov vodijo tudi izbrane mejne (»cut – off«) vrednosti posameznega testa (61).

Serološka diagnostika se v zadnjem času usmerja k specifičnim, imunsko potentnim antigenom, ki so izključni pokazatelji okužbe gostitelja. Z racionalno izbiro rekombinantnih antigenov, ki jih v serološke teste vključujejo posamično ali v različnih kombinacijah, so se uspeli izogniti navzkrižnim protitelesom. Tako je danes vse bolj vprašljivo ali je še vedno smiselno standardno dvostopenjsko testiranje. V zadnjem času v ospredje vse bolj prihaja tudi avtomatizacija seroloških testov, s katero se zmanjša verjetnost človeške napake in se metoda bolj standardizira (22, 62).

1.3.3.1. Encimsko imunski test - EIT

Encimsko imunski test je splošen izraz za vrsto testov, s katerimi ločeno dokazujemo prisotnost protiteles razreda IgM in IgG v vzorcih. Osnovo reakcije predstavljajo na trden nosilec (mikrotitrna ploščica) vezani antigeni. Po dodatku bolnikovega seruma in inkubaciji speremo nevezana protitelesa in nato v drugem koraku dodamo sekundarna (anti-humana IgM ali IgG), z encimom označena protitelesa. Po inkubaciji in spiranju dodamo za encim ustrezen substrat, da poteče reakcija, ki vodi do spremembe barve, fluorescence ali svetlobne spremembe, ki jo izmerimo z ustreznimi inštrumenti. Količina nastalega substrata je sorazmerna koncentraciji protiteles v vzorcu. Metoda je zelo občutljiva in specifična, primerna za avtomatizacijo in izvajanje velikega števila preiskav (77, 78).

Najširše uporabljan encimsko imunski test je ELISA (*angl.* Enzyme - linked immunosorbent assay) (78). Princip izvedbe testa ELISA prikazuje slika 6.



Slika 6: Princip izvedbe testa encimsko imunskega testa (povzeto po 79).

1.3.3.2. Imunofluorescenčni test – IFT

Imunofluorescenčni test je občutljiv test, ki nam omogoča dokazovanje zelo majhnih količin protiteles. Z njim določamo protitelesa razreda IgM in IgG (80).

Antigen je imobiliziran na površini objektnega stekelca. Pacientov serum se razredči in nanese na stekelce, tako da pokriva območje, na katerega je pritrjen antigen. Če so v serumu prisotna specifična protitelesa se bodo vezala na antigen. Nevezana protitelesa se nato odstrani s spiranjem. V naslednji stopnji se doda konjugat, ki vsebuje sekundarno protitelo proti humanim imunoglobulinom (ta je lahko usmerjeno specifično proti IgG ali IgM protitelesom) in fluorescentno barvilo. Sekundarno, označeno protitelo se veže na primarno protitelo in pri pregledu objektnih stekelc svetlobni vir fluorescentnega mikroskopa vzbudi fluorescentno oznako na sekundarnem protitelesu in tako služi kot pokazatelj vezave primarnega protitelesa na antigen (80).

1.3.3.3. Imunoluminescenčni test - LIA

Princip tega testa je podoben principu testa EIT ali IFT, le da je sekundarno protitelo, ki se veže na kompleks primarno protitelo - antigen, označeno z molekulami, ki sprožijo kemiluminescenčno reakcijo (78).

1.3.3.4. Test Western/Imuno blot

Metoda temelji na elektroforezni ločbi glavnih proteinov povzročitelja okužbe na dvodimenzionalnem agaroznem gelu. Večinoma bakterij vsebuje nekaj glavnih proteinov, ki jih lahko prepoznamo na podlagi njihovega položaja na gelu po končani elektroforezi. Trakovi proteinov se po končani ločbi prenesejo na nitrocelulozno ali kakšno drugo vrsto tanke membrane po postopku Western – blot (80). Pogosto uporabljena različica testa je test imunoblot, pri katerem so na membranske trakove nanešeni različni rekombinantni antigeni (81). Membranske trakove z antigeni inkubiramo v kadičkah skupaj z bolnikovim serumom. Protitelesa iz bolnikovega seruma se bodo vezala na posamezne antigene, odvisno od tega proti katerim antigenom povzročitelja se je sprožil imunski odziv. Imunske komplekse prikažemo z encimsko reakcijo in test odčitamo optično. V primeru pozitivne reakcije se na testni membrani obarva mesto, na katerem je nanešen antigen (vidimo ga kot trak oz. pas na membranskem traku). Test Western blot, kakor tudi imunoblot, uporabljamo največkrat kot potrditveni test, saj nam test poda natančno informacijo o specifičnosti imunskega odziva. Lahko bi rekli, da nam poda imunski odtis bolnika. S testom Western oziroma imunoblot lahko dokazujemo protitelesa razreda IgM in IgG (82). Kot potrditveni test mora imeti imunoblot visoko specifičnost (vsaj 95 %) (62). Občutljivost in specifičnost imunoblot testov se je z uporabo rekombinantnih antigenov, ki so specifični za borelije lysmske borelioze, znatno izboljšala. Mednje sodijo tudi p83/100, p39, p18, VlsE, OspC in DbpA (22, 66, 83).

1.3.4. Dokaz stimulacije limfocitov T

Razvoj celičnega imunskega odziva pri lysmski boreliozi so opazovali s testi, pri katerih so uporabljali krvne mononuklearne celice ali celice prisotne v prizadetih tkivih. Začetno navdušenje nad uporabo testov limfoproliferacije v diagnostiki lysmske borelioze, je bilo

skaljeno. Testi proliferacije T – limfocitov se zaradi njihove kompleksne narave glede specifičnosti in standardizacije redkokdaj uporabljajo kot diagnostični testi (22, 62).

1.4. ZDRAVLJENJE LYMSKE BORELIOZE

V vsakdanji praksi se za zdravljenje z antibiotiki odločimo pri vseh bolnikih z značilno klinično sliko lymške borelioze, ne glede na izvide seroloških preiskav oziroma testov za dokaz borelijske okužbe, pri tistih z neznačilnimi težavami pa le v primeru laboratorijske potrditve okužbe (84). Namen antibiotičnega zdravljenja je eradikacija bakterije (85).

Pri večini kliničnih manifestacij se poslužujemo peroralnega antibiotičnega zdravljenja, medtem ko je intravensko zdravljenje smiselno pri bolnikih s prizadetostjo osrednjega živčnega sistema in/ali težjo obliko lymškega karditisa ter pri nekaterih posebnih skupinah bolnikov (46, 86).

In vitro študije so pokazale, da so borelije dobro občutljive na tetracikline, večina penicilinov, veliko cefalosporinov druge in tretje generacije in makrolidne antibiotike, rezistentne pa so na nekatere fluorokinolone, aminoglikozide, rifampicin in cefalosporine prve generacije (1).

Erythema migrans in borelijski limfocitom se praviloma pozdravita spontano, brez antibiotičnega zdravljenja, vendar je možno, da ostanejo v koži ali drugje žive borelije, ki lahko mesece ali leta kasneje povzročijo nevrološke, srčne okvare ali okvare sklepov. Z ustreznim zdravljenjem skrajšamo čas trajanja kožnih sprememb, zmanjšamo pogostost pojavov dodatnih simptomov in s precejšnjo verjetnostjo preprečimo pojav drugih kliničnih znakov lymške borelioze (1, 84). Podobni so razlogi za zdravljenje zgodnje diseminirane oblike borelijske okužbe (84).

Za zdravljenje zgodnje lokalizirane borelijske okužbe pridejo v poštev preparati penicilinske in tetraciklinske skupine ter nekateri cefalosporini in makrolidi (84). Paciente s solitarnim erythema migrans in borelijskim limfocitomom zdravimo z amoksicilinom, azitromicinom, doksiciklinom ali cefuroksim aksetilom. Z izjemo azitromicina zdravljenje

običajno traja 14 dni (85). Priporočila za zdravljenje zgodnje diseminirane in pozne lymške borelioze v Sloveniji so prikazana v preglednici III.

Preglednica III: Priporočila za zdravljenje napredovane lymške borelioze z antibiotiki v Sloveniji (85).

| Klinični znak | Antibiotik | Način aplikacije | Trajanje (dni) |
|--|--------------|------------------|----------------|
| Prizadetost živčevja (zgodnja ali pozna) | ceftriakson | intravensko | 14 |
| | penicilin G | intravensko | 14 |
| Prizadetost srca | doksiciklin | peroralno | 28 |
| | amoksicilin | peroralno | 28 |
| Artritis (intermitentni ali kronični) | doksiciklin* | peroralno | 14 |
| | amoksicilin | peroralno | 14 |
| Acrodermatitis chronica atrophicans** | ceftriakson | intravensko | 14 |
| | penicilin G | intravensko | 14 |

Legenda:

* morebitna izjema.

** acrodermatitis chronica atrophicans se praviloma zdravi več kot 14 dni.

Pri vseh oblikah borelijske okužbe je treba upoštevati možnost, da je poleg osnovne prizadetosti (npr. sklepov) lahko prizadeto tudi osrednje živčevje, kar ima velik praktičen pomen: kadar sumimo, da gre za prizadetost osrednjega živčevja, moramo uporabiti antibiotik, ki prehaja hematoencefalno bariero. To je razlog, da se tudi pri bolnikih s prizadetostjo sklepov ali z acrodermatitis chronica atrophicans pogosto odločimo za parenteralno antibiotično zdravljenje, največkrat s ceftriaksonom (84).

Pomemben vzrok neuspešnega zdravljenja predvsem poznih oblik lymške borelioze so verjetno nepovratne okvare tkiva, ki nastanejo v času borelijske okužbe. Od antibiotičnega zdravljenja ne moremo pričakovati zacelitve poškodb, ki nastanejo kot posledica bakterijske okužbe oziroma vnetja. Možno je da borelijska okužba povzroči razgaljenje

nekaterih antigenov, ki jih imunski sistem ne prepozna kot telesu lastne in da do nadaljnje okvare tkiva pride posledično zaradi avtoimunskih mehanizmov. Zelo redek vzrok neuspeha zdravljenja je lahko tudi vztrajanje borelij v tkivih po končanem antibiotičnem zdravljenju (84).

V študiji, ki je bila izvedena v Ameriki, je profilaktična antibiotična terapija z doksiciklinom v 72 urah po vbodu klopa je preprečila lymsko boreliozo v 87 % primerov (46). Evropske oblasti tega ne priporočajo kot rutinsko metodo, vendar se lahko uporabi pri posameznikih, ki imajo oslabljen imunski sistem (87).

Dobro je, da se ljudje v endemičnih predelih zavedajo nevarnosti okužbe in se primerno zaščitijo pred klopi (primerna obleka in obutev, kožni repelenti, čimprejšnje odkritje in odstranitev klopa, prepoznavanje in zdravljenje zgodnje oblike okužbe) (9).

Drugačen pristop k preprečevanju bolezni, bi bilo cepljenje (60). V ZDA sta bili med letoma 1990 in 1995 razviti in registrirani dve cepivi, LYMERix in ImuLyme, ki sta bili zasnovani na antigenu OspA. Cepivo LYMERix je bilo marca 2002 umaknjeno s tržišča (22), proizvajalec drugega cepiva pa po opravljeni klinični raziskavi tretje faze, sploh ni zaprosil za dovoljenje za uporabo (88). V Evropi je cepivo v pripravi. Težave pri pripravi cepiva izhajajo iz različne geografske razširjenosti posameznih vrst in antigenske heterogenosti borelij tako med vrstami kot med sevi znotraj vrste (89).

2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je bil:

- pri pacientih s sumom na zgodnjo okužbo z lymsko borelioza v serumu ali plazmi dokazati specifična protitelesa razreda IgM in IgG proti borelijam iz kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato,
- primerjati rezultate testa VIDAS Lyme proizvajalca BioMerieux z rezultati testa LIAISON Borrelia proizvajalca DiaSorin, ki se uporablja v rutinski diagnostiki borelijskih okužb,
- z laboratorijskega vidika opredeliti bolj primerno metodo.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. VZORCI

V preiskavo smo vključili 102 vzorca krvi, ki so vsakodnevno prihajali na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani in vzorce serumov, ki so bili na Inštitutu shranjeni v zamrzovalniku pri temperaturi – 20°C. Iz vzorcev krvi smo s postopkom centrifugiranja naredili serum ali plazmo. Za študijo smo izbrali vzorce takšnih pacientov, pri katerih je bila ugotovljena kožna sprememba, zaradi katere je obstajal sum na zgodnjo lymsko boreliozo. V preiskavi smo vzorce plazme ali seruma testirali z dvema serološkima testoma, izvedenima na dveh različnih aparatih. Na obeh aparatih smo vzorce testirali na prisotnost specifičnih protiteles razreda IgM in IgG.

3.2. METODE

V preiskavo smo vključili dva serološka testa, in sicer VIDAS Lyme test (proizvajalec BioMerieux, Francija) in LIAISON Borrelia test (proizvajalec DiaSorin, Italija).

VIDAS Lyme test je avtomatiziran kvalitativen test za detekcijo protiteles proti *B. burgdorferi* sensu lato v človeškem serumu ali plazmi. Test deluje po principu kombinacije dvostopenjske encimsko – imunske sendvič metode s končno fluorescentno detekcijo (*angl.* enzyme - linked fluorescence assay; ELFA).

LIAISON Borrelia test deluje na principu imunoluminescenčne tehnologije (*angl.* chemiluminescence immunoassay; CLIA) in omogoča kvantitativno določitev specifičnih protiteles proti *B. burgdorferi* sensu lato v človeškem serumu ali plazmi.

3.2.1. VIDAS Lyme test

VIDAS Lyme test je test za detekcijo prisotnosti specifičnih protiteles razreda IgM in IgG v serumu ali plazmi. Slika 7 kaže aparaturo za izvajanje testa.



Slika 7: Aparat miniVIDAS®, na katerem se izvaja VIDAS Lyme teste.

3.2.1.1. Reagenti in oprema za izvedbo VIDAS Lyme testa

Vsa potrebna oprema in reagenti za izvedbo VIDAS Lyme IgM in IgG testa se nahajajo v VIDAS Lyme IgM in IgG kompletih.

Komplet VIDAS Lyme IgM in VIDAS Lyme IgG mora biti shranjen na temperaturi od 2 do 8 °C. Tudi vse neuporabljene reagente moramo shraniti na temperaturi od 2 do 8 °C in jih ne smemo zamrzovati. Po odprtju kompleta je potrebno preveriti ali je vrečka, v kateri so zbirniki trdne faze (*angl.* Solid Phase Receptable; SPR), pravilno zaprta in nepoškodovana. V nasprotnem primeru se ti ne smejo uporabiti. Po uporabi je potrebno previdno nazaj zapreti vrečko s sušilnim sredstvom in komplet vrniti nazaj na temperaturo 2 do 8 °C. Če je komplet shranjen pri priporočenih pogojih, so vse njegove komponente stabilne do označenega datuma poteka veljavnosti. Reagenti za izvedbo testa so pripravljene za uporabo in predhodno razdeljeni v zaprte reagenčne trakove. Slika 8 prikazuje komplet za izvedbo VIDAS Lyme testov (90, 91).



Slika 8: Komplet za izvedbo VIDAS Lyme testov.

Vsak posamezen komplet za izvedbo VIDAS Lyme IgM testa vsebuje:

- 60 reagenčnih trakov,
- 60 VIDAS Lyme IgM zbirnikov trdne faze (SPR),
- Standard, ki vsebuje specifična protitelesa razreda IgM,
- Pozitivno kontrolo, ki vsebuje specifična protitelesa razreda IgM,
- Negativno kontrolo brez zaznavnih specifičnih protiteles razreda IgM,
- Kartico s podatki o umeritvenih krivuljah VIDAS Lyme IgM testa (*angl.* master lot entry; MLE), ki jo je pred izvedbo samega testa potrebno vstaviti v aparat miniVIDAS®, da le ta z nje odčita protokolne podatke (90).

Vsak posamezen komplet za izvedbo VIDAS Lyme IgG testa vsebuje:

- 60 reagenčnih trakov,
- 60 VIDAS Lyme IgG zbirnikov trdne faze (SPR),
- Standard, ki vsebuje specifična protitelesa razreda IgG,
- Pozitivno kontrolo, ki vsebuje specifična protitelesa razreda IgG,
- Negativno kontrolo brez zaznavnih specifičnih protiteles razreda IgG,

- Kartico s podatki o umeritvenih krivuljah VIDAS Lyme IgG testa (*angl.* master lot entry; MLE), ki jo je pred izvedbo samega testa potrebno vstaviti v aparat miniVIDAS®, da le ta z nje odčita protokolne podatke (91).

Vsak reagenčni trak iz kompleta VIDAS Lyme IgM in VIDAS Lyme IgG testa je sestavljen iz 10 vsebnikov pokritih z označenim tesnilom iz folije. Oznaka je sestavljena iz bar kode, ki navaja kodo testa, številko sklopa kompleta in datuma poteka veljavnosti. Folija na prvem vsebniku je preluknjana, da je olajšan vnos vzorca. V drugem vsebniku se nahaja topilo za vzorec, v tretjem, četrtem in petem pa se nahaja pufer za spiranje. V šestem vsebniku se nahaja konjugat, ki se med trakovi za izvedbo VIDAS Lyme IgM in VIDAS Lyme IgG testa razlikuje (preglednica IV). Deveti vsebnik je prazen. Zadnji vsebnik vsakega reagenčnega traku je kiveta, v kateri je izvedeno fluorometrično branje.

Preglednica IV: Primerjava konjugata, ki se nahaja v VIDAS Lyme IgM in VIDAS Lyme IgG reagenčnih trakovih (90, 91).

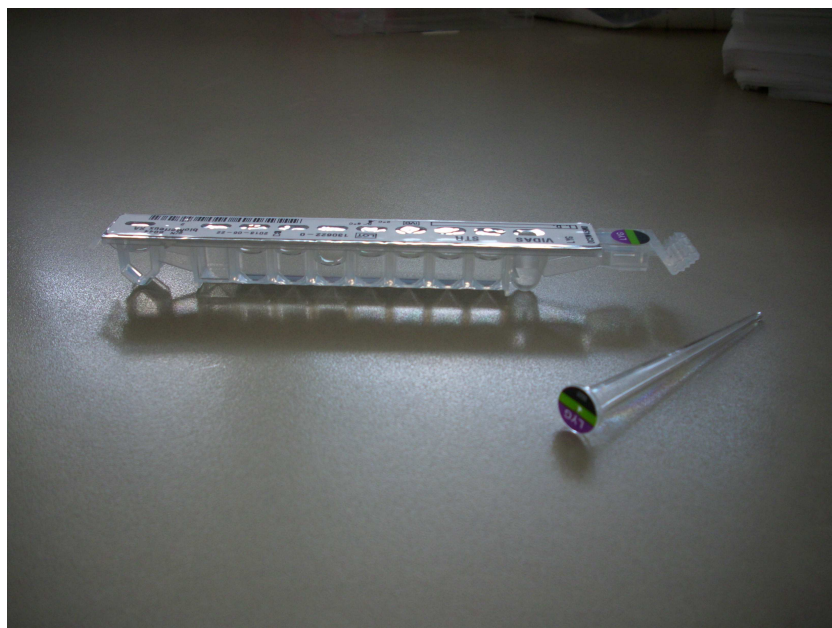
| Reagenti VIDAS Lyme IgM traku | Reagenti VIDAS Lyme IgG traku |
|---|---|
| Konjugat: TRIS pufer, NaCl + BSA + MIT + titrirana raztopina mišjih monoklonskih anti-humanih IgM protiteles, konjugiranih z alkalno fosfatazo pH 7.4 (400 µL) | Konjugat: TRIS pufer, NaCl + goveji proteini + titrirana raztopina mišjih monoklonskih anti-humanih IgG protiteles, konjugiranih z alkalno fosfatazo pH 6.1 (400 µL) |

Zbirniki trdne faze (SPR)

Zbirniki trdne faze (SPR) za izvedbo VIDAS Lyme IgM in VIDAS Lyme IgG testa se med proizvodnjo prevlečejo s kombinacijo rekombinantnih antigenov *B. burgdorferi* sensu lato. Vsak zbirnik trdne faze (SPR) se identificira z VIDAS Lyme IgM oziroma VIDAS Lyme IgG kodo. Antigene, ki so vključeni v trdno faze kaže preglednica V. Slika 9 prikazuje reagenčni trak in zbirnik trdne faze (SPR) iz kompleta VIDAS Lyme.

*Preglednica V: Primerjava antigenov bakterij iz kompleksa *Borrelia burgdorferi sensu lato*, s katerim so prevlečeni zbirniki trdne faze (SPR) za izvedbo VIDAS Lyme IgM in VIDAS Lyme IgG testa (90, 91).*

| VIDAS Lyme IgM zbirniki trdne faze (SPR) | VIDAS Lyme IgG zbirniki trdne faze (SPR) |
|--|---|
| Rekombinantna proteina DbpA in OspC | Rekombinantni proteini VlsE, DbpA in OspC |



Slika 9: Reagenčni trak in zbirnik trdne faze (SPR) iz kompleta VIDAS Lyme.

3.2.1.2. Princip in postopek izvedbe VIDAS Lyme testa ter interpretacija rezultatov

Vse posamezne korake testa instrument izvede avtomatično. Reakcijski medij med potekom testa nekajkrat zakroži v in ven iz zbirnikov trdne faze (SPR).

Po predhodnem spiranju in redčenju vzorca se protitelesa proti *B. burgdorferi*, ki so prisotna v vzorcu, vežejo na specifičen rekombinanten protein *B. burgdorferi sensu lato*, s katerim je prevlečena notranjost zbirnikov trdne faze (SPR).

Nevezane komponente vzorca se nato sperejo. Anti-humana IgM oziroma IgG protitelesa konjugirana z alkalno fosfatazo se pripojijo na imunski kompleks, ki je vezan na steni zbirnikov trdne faze (SPR).

Sledi končno spiranje, s katerim se odstranijo nevezani konjugati. Med zadnjim korakom, korakom detekcije, substrat (4-metil-umbeliferilfosfat) kroži v in iz zbirnikov trdne faze (SPR). Konjugiran encim hidrolizira reakcijo pretvorbe substrata v fluorescenten produkt (4-metil-umbeliferon), katerega fluorescenca se meri pri valovni dolžini 450 nm. Intenziteta fluorescence je sorazmerna količini specifičnih protiteles razreda IgM oziroma IgG.

Na koncu instrument avtomatsko preračuna rezultat in natisne poročilo (90, 91).

Postopek izvedbe VIDAS Lyme IgM in VIDAS Lyme IgG testa:

- Iz hladilnika vzamemo potrebne reagente. V navodilih je navedeno, da jih lahko uporabimo takoj.
- Za vsak vzorec uporabimo eden reagenčni trak.
- Za izvedbo testa potrebujemo 100 µL vzorca, ki ga s pipeto naneseemo v prvi vsebnik posameznega reagenčnega traku. Naenkrat lahko izvedemo testiranje na 6 vzorcih za vsak posamezen test.
- V aparat vstavimo ustrezne zbirnike trdne faze (SPR) in ustrezne reagenčne trakove.
- Na aparatu izberemo ustrezen test. Test VIDAS Lyme IgM se identificira s kodo LYM, test VIDAS Lyme IgG pa se identificira s kodo LYG.
- Pritisnemo tipko start.
- Vse korake testa izvaja aparat avtomatsko (90, 91).

Rezultati in interpretacija

Rezultate aparat analizira in izračuna avtomatično. Inštrument dvakrat izmeri fluorescenco v bralni kiveti vsakega reagenčnega traka. Prvo branje predstavlja branje ozadja substratov v kiveti, drugo branje aparat izvrši po inkubaciji substrata z encimom. Z odštevanjem ozadja od končnega rezultata se izračuna RFV (relativna fluorescenčna vrednost). Aparat ob koncu testa natisne poročilo z rezultati in jih interpretira kot negativne, mejne ali

Anja Sršen: Primerjava dveh metod za dokaz borelijskih protiteles v serumu

pozitivne glede na vrednosti, ki jih določi proizvajalec (90, 91). Vrednosti in njihova interpretacija so navedeni v preglednici VI.

Tabela VI: Interpretacija rezultatov VIDAS Lyme IgM in VIDAS Lyme IgG testa po navodilih proizvajalca (90, 91).

| VIDAS Lyme IgM test | Interpretacija | VIDAS Lyme IgG test |
|----------------------|--------------------|---------------------|
| Indeks | | Indeks |
| $i < 0.20$ | Negativen rezultat | $i < 0.20$ |
| $0.20 \leq i < 0.32$ | Mejna vrednost | / |
| $i \geq 0.32$ | Pozitiven rezultat | $i \geq 0.20$ |

Legenda:

i = indeks = pacientova RFV vrednost / RFV standarda

Rezultate testov moramo interpretirati v povezavi s klinično sliko, zgodovino kliničnega primera in vseh ostalih izvedenih bioloških testiranj (92). Za skupno interpretacijo rezultatov VIDAS Lyme IgM in VIDAS Lyme IgG testa nam je v pomoč preglednica VII.

Preglednica VII: Klinična interpretacija rezultatov VIDAS Lyme testa (90, 91).

| Rezultat VIDAS Lyme IgM testa | Rezultat VIDAS Lyme IgG testa | Interpretacija |
|---|-----------------------------------|--|
| Negativen | Negativen | Malo verjetna infekcija. |
| Pozitiven | Negativen | Verjetna zgodnja infekcija. |
| Pozitiven | Pozitiven | Verjetna zgodnja ali diseminirana infekcija. |
| Negativen | Pozitiven | Verjetna infekcija v kateremkoli stadiju. |
| Mejni ali pozitiven pri »cut-off« vrednosti | Pozitiven pri »cut-off« vrednosti | Odvisno od konteksta in zgodovine kliničnega primera se lahko šteje kot zgodnja infekcija oziroma se |

| | | |
|---|-----------|--|
| | | priporoča serološko sledenje. |
| Mejni ali pozitiven pri »cut-off« vrednosti | Negativen | Odvisno od konteksta in zgodovine kliničnega se lahko šteje kot zgodnja infekcija ali pa lahko gre za drugo bolezen, ki moti testiranje. |

3.2.2. LIAISON Borrelia test

LIAISON Borrelia IgM Quant test in LIAISON Borrelia IgG test je test, ki omogoča kvantitativno določitev specifičnih protiteles razreda IgM in IgG v serumu ali plazmi. Slika 10 kaže aparaturo za izvajanje testa.



Slika 10: Aparat LIAISON®, na katerem se izvajajo LIAISON Borrelia testi.

3.2.2.1. Reagenti in oprema za izvedbo LIAISON Borrelia testa

Vsi potrebni reagenti in oprema za izvedbo LIAISON Borrelia IgM Quant in LIAISON Borrelia IgG test se nahajajo v reagenčnem sestavu.

Zaprto reagenčni sestav je stabilen pri temperaturi od 2 do 8 °C do datuma poteka uporabnosti. Odprtega shranjujemo pri temperaturi od 2 do 8 °C. Minimalna doba stabilnosti je štiri tedne. Uporabljamo shranjevalno polico, ki jo zagotavlja LIAISON® analizator za pokončno shranjevanje sestava, s čimer se olajša kasnejša resuspenzija magnetnih delčkov. Sestava ne smemo zamrzovati in ga hranimo zaščitene pred neposredno svetlobo (93, 94).

Reagenčni sestav za izvedbo LIAISON Borrelia IgM Quant testa vsebuje:

- Magnetni delčki predstavljajo trdno fazo in so prekrti z rekombinantnimi borelijskimi antigeni OspC in VlsE,
- Standard 1 z nizko vsebnostjo specifičnih protiteles razreda IgM,
- Standard 2 z visoko vsebnostjo specifičnih protiteles razreda IgM,
- Topilo za vzorce,
- Konjugat, ki ga predstavljajo mišja monoklonska protitelesa proti humanim IgM protitelesom, ki so konjugirana z derivatom izoluminola (93).

Reagenčni sestav za izvedbo LIAISON Borrelia IgG testa vsebuje:

- Magnetne delčki predstavljajo trdno fazo in so prekrti z rekombinantnim borelijskimi antigenom VlsE,
- Standard 1 z nizko vsebnostjo specifičnih protiteles razreda IgG,
- Standard 2 z visoko vsebnostjo specifičnih protiteles razreda IgG,
- Topilo za vzorce,
- Konjugat, ki ga predstavljajo mišja monoklonska protitelesa proti humanim IgG protitelesom, ki so konjugirana z derivatom izoluminola (94).

3.2.2.2. Princip in postopek izvedbe LIAISON Borrelia testa ter interpretacija rezultatov

Med prvo inkubacijo se protitelesa proti boreliji, ki se nahajajo v vzorcih ali kontrolah, vežejo na trdno fazo, ki jo predstavljajo magnetni delčki. Med drugo inkubacijo, konjugirano protitelo reagira s protitelesi razreda IgM in IgG, ki so se med prvo inkubacijo vezali na trdno fazo. Po vsaki inkubaciji se nevezan material odstrani s ciklom spiranja. Nato se dodajo reagenti, ki spodbudijo kemiluminescenčno reakcijo. Svetlobni signal in s

tem količino konjugatov med sekundarnim protitelesom in derivatom izoluminola nato izmeri fotopomnoževalec kot relativne svetlobne enote (*angl.* relative light units; RLU) in odražajo koncentracijo IgM oziroma IgG protiteles v vzorcu (93, 94).

Postopek izvedbe LIAISON Borrelia IgM Quant in LIAISON Borrelia IgG testa:

- Pred vstavitvijo reagenčnega sestava v aparat moramo resuspendirati magnetne delčke.
- Sestav nato vstavimo v reagenčno območje in pustimo stati 30 minut.
- Vzorec vstavimo v stojalo in tega vstavimo v aparat.
- Na aparatu izberemo ustrezen test. Vrsta testa za določitev specifičnih protiteles razreda IgM se imenuje Bor-MQ, vrsta testa za določitev specifičnih protiteles razreda IgG pa se imenuje Bor-G.
- Pritisnemo tipko start (93, 94).

Rezultati in interpretacija

Aparat avtomatsko izračuna koncentracijo borelijskih IgM in IgG protiteles, izraženih kot arbitrarne enote (AU/mL) in razvrsti rezultate. Način, kako aparat interpretira izmerjeno koncentracijo protiteles proti boreliji, je podan v preglednici VIII.

Preglednica VIII: Interpretacija rezultatov LIAISON Borrelia IgM Quant in LIAISON Borrelia IgG testa (93, 94).

| LIAISON Borrelia IgM Quant test | Interpretacija | LIAISON Borrelia IgG test |
|---|-----------------------|---|
| Koncentracija borelijskih IgM protiteles | | Koncentracija borelijskih IgG protiteles |
| < 18 AU/mL | Negativen rezultat | < 10 AU/mL |
| 18 – 22 AU/mL | Mejna vrednost | 10 – 15 AU/mL |
| > 22 AU/mL | Pozitiven rezultat | > 15 AU/mL |

Različne imunološke slike in klinično interpretacijo rezultatov, pridobljenih z izvedbo LIAISON Borrelia testa povzema preglednica IX.

Preglednica IX: Klinična interpretacija rezultatov LIAISON Borrelia testa (93, 94).

| Rezultat testa na prisotnost specifičnih IgM protiteles | Rezultat testa na prisotnost specifičnih IgG protiteles | Interpretacija |
|--|--|---|
| Negativen | Negativen | Ni dokazov okužbe. V primeru klinične negotovosti, moramo bolnika spremljati skozi čas. |
| Pozitiven | Negativen | Verjetna okužba v začetnem stadiju. |
| Negativen | Pozitiven | Verjetna okužba v kateremkoli stadiju. |
| Pozitiven | Pozitiven | Verjetna akutna okužba. |

3.2.3. Ponovitev testiranja

Vzorci, pri katerih se rezultati med testoma VIDAS Lyme in LIAISON Borrelia medsebojno niso ujeli glede detekcije specifičnih protiteles razreda IgM ali IgG, smo ponovno testirali na prisotnost teh protiteles z obema testoma. Če pri posameznem testu rezultat ponovnega testiranja ni bil enak rezultatu prvotnega testiranja, smo testiranje ponavljali tolikokrat, da smo pri vsakem posameznem testu dobili dva enaka rezultata.

3.3. STATISTIČNA ANALIZA

Za statistično primerjavo razlik med dvema testoma smo ustvarili 2 X 2 kontingenčni tabeli. Za dokazovanje statistične razlike med testoma smo uporabili McNemar – jev test, ki predstavlja različico hi kvadratnega testa za kontingenčne tabele in se uporablja za

Anja Sršen: Primerjava dveh metod za dokaz borelijskih protiteles v serumu

testiranje povezanosti dveh opisnih spremenljivk pri ponavljajočih se poskusih. V ta namen smo mejne vrednosti uvrstili med pozitivne rezultate.

Rezultate smo statistično ovrednotili s programom SPSS 20.0. Vrednosti $p < 0,05$ smo obravnavali kot statistično značilno razliko med testoma.

4. REZULTATI

4.1. REZULTATI POSAMEZNIH TESTOV

V serumu ali plazmi bolnikov smo z dvema testoma ločeno dokazovali prisotnost specifičnih protiteles razreda IgM in IgG proti *B. burgdorferi* sensu lato. Z obema testoma smo ugotovili približno enak delež pozitivnih vzorcev in sicer tako pri dokazovanju protiteles razreda IgM kot IgG; nekoliko večji je bil delež vzorcev s pozitivnimi IgG. Rezultati seroloških testiranj posameznega testa so prikazani v preglednici X in XI.

Preglednica X: Število ter delež pozitivnih, mejnih in negativnih rezultatov pridobljenih s testom VIDAS Lyme.

| Rezultati testiranja | Specifična protitelesa razreda | | | |
|----------------------|--------------------------------|------|---------|------|
| | IgM | | IgG | |
| | število | % | število | % |
| Pozitivni | 49 | 48,0 | 56 | 54,9 |
| Mejni | 5 | 4,9 | 0 | 0,0 |
| Negativni | 48 | 47,1 | 46 | 45,1 |
| Skupaj | 102 | 100 | 102 | 100 |

Preglednica XI: Število ter delež pozitivnih, mejnih in negativnih rezultatov pridobljenih s testom LIAISON Borrelia.

| Rezultati testiranja | Specifična protitelesa razreda | | | |
|----------------------|--------------------------------|------|---------|------|
| | IgM | | IgG | |
| | število | % | število | % |
| Pozitivni | 51 | 50,0 | 62 | 60,8 |
| Mejni | 4 | 3,9 | 6 | 5,9 |
| Negativni | 47 | 46,1 | 34 | 33,3 |
| Skupaj | 102 | 100 | 102 | 100 |

4.2. PRIMERJAVA REZULTATOV

Primerjavo rezultatov pridobljenih s testoma VIDAS Lyme in LIAISON Borrelia glede na specifična protitelesa razreda IgM in IgG smo prikazali v preglednicah XII in XIII.

Preglednica XII: Primerjava rezultatov testiranja na prisotnost specifičnih protiteles razreda IgM.

| Rezultat testa VIDAS \ Rezultat testa LIAISON | Pozitiven | Mejni | Negativen | Skupaj |
|---|-----------|-------|-----------|--------|
| Pozitiven | 42 | 0 | 9 | 51 |
| Mejni | 1 | 0 | 3 | 4 |
| Negativen | 6 | 5 | 36 | 47 |
| Skupaj | 49 | 5 | 48 | 102 |

Iz preglednice XII je razvidno, da sta si deleža pozitivnih vzorcev posameznega testa na prisotnost protiteles IgM, podobna; dobili smo 49 (48,04 %) pozitivnih rezultatov pri testu VIDAS Lyme in 51 (50,00 %) pozitivnih rezultatov pri testu LIAISON Borrelia.

Pri 42 testiranih vzorcih je bil rezultat obeh testov pozitiven, pri 36 pa negativen, kar kaže na 76,5 % ujemanje rezultatov obeh testov.

Preglednica XIII: Primerjava rezultatov testiranja na prisotnost specifičnih protiteles razreda IgG.

| Rezultat testa VIDAS \ Rezultat testa LIAISON | Pozitiven | Mejni | Negativen | Skupaj |
|---|-----------|-------|-----------|--------|
| Pozitiven | 55 | 0 | 7 | 62 |
| Mejni | 0 | 0 | 6 | 6 |
| Negativen | 1 | 0 | 33 | 34 |
| Skupaj | 56 | 0 | 46 | 102 |

Iz preglednice XIII je razvidno, da sta si deleža pozitivnih vzorcev posameznega testa na prisotnost IgG protiteles, podobna; dobili 56 (54,90 %) pozitivnih rezultatov pri testu VIDAS Lyme in 62 (60,78 %) pozitivnih rezultatov pri testu LIAISON Borrelia.

Pri 55 testiranih bolnikih je bil rezultat obeh testov pozitiven, pri 33 pa negativen, kar kaže na 86,3 % ujemanje rezultatov obeh testov.

4.3. PODROBNA ANALIZA MED TESTOMA Odstopajočih Rezultatov

V preglednici XIV so prikazane posamezne vrednosti ponovljenih testiranj vzorcev na prisotnost protiteles razreda IgM, v preglednici XV pa posamezne vrednosti ponovljenih testiranj na prisotnost specifičnih protiteles razreda IgG.

Preglednica XIV: Vrednosti posameznih testiranj na prisotnost specifičnih protiteles razreda IgM s testom VIDAS Lyme IgM in LIAISON Borrelia IgM Quant. Pri neujemajočih se rezultatih znotraj posameznega testa, je rumeno obarvan tisti rezultat, ki smo ga izbrali za končnega.

| Pacient | Test VIDAS | | Test LIAISON | |
|---------|------------|--------------------------|--------------|--------------------------|
| | Rezultat | Interpretacija rezultata | Rezultat | Interpretacija rezultata |
| 1. | 0,78 | Pozitiven | 17,20 | Negativen |
| | 0,68 | Pozitiven | 18,6 | Mejni |
| | / | / | 19,1 | Mejni |
| 2. | 0,53 | Pozitiven | 16,2 | Negativen |
| | 0,55 | Pozitiven | 4,6 | Negativen |
| 3. | 0,53 | Pozitiven | 6,4 | Negativen |
| | 0,64 | Pozitiven | << 2, 0 | Negativen |
| 4. | 1,18 | Pozitiven | 18,5 | Mejni |
| | 1,91 | Pozitiven | 7,4 | Negativen |
| | / | / | 15,9 | Negativen |
| 5. | 0,57 | Pozitiven | 11,3 | Negativen |
| | 0,58 | Pozitiven | 8,4 | Negativen |
| 6. | 0,36 | Pozitiven | 9,5 | Negativen |
| | 0,53 | Pozitiven | << 2, 0 | Negativen |
| 7. | 0,52 | Pozitiven | 14,9 | Negativen |
| | 1,18 | Pozitiven | 5,0 | Negativen |
| 8. | 0,07 | Negativen | 34,4 | Pozitiven |
| | 0,07 | Negativen | 16,8 | Negativen |
| | / | / | 44,5 | Pozitiven |
| 9. | 0,13 | Negativen | 43,2 | Pozitiven |
| | 0,14 | Negativen | 5,4 | Negativen |
| | / | / | 39,6 | Pozitiven |
| 10. | 0,13 | Negativen | 106,6 | Pozitiven |
| | 0,13 | Negativen | 57,7 | Pozitiven |
| 11. | 0,15 | Negativen | 169,6 | Pozitiven |
| | 0,18 | Negativen | 194 | Pozitiven |
| 12. | 0,15 | Negativen | 21,2 | Mejni |
| | 0,28 | Mejni | 11,4 | Negativen |
| | 0,18 | Negativen | 23,8 | Pozitiven |
| | / | / | 26,3 | Pozitiven |
| 13. | 0,01 | Negativen | 27,2 | Pozitiven |
| | 0,01 | Negativen | 59,9 | Pozitiven |

Anja Sršen: Primerjava dveh metod za dokaz borelijskih protiteles v serumu

| | | | | |
|-----|------|-----------|------|-----------|
| 14. | 0,00 | Negativen | 24,1 | Pozitiven |
| | 0,00 | Negativen | 11,2 | Negativen |
| | / | / | 23,0 | Pozitiven |
| 15. | 0,05 | Negativen | 33,7 | Pozitiven |
| | 0,09 | Negativen | 3,4 | Negativen |
| | / | / | 35,2 | Pozitiven |
| 16. | 0,01 | Negativen | 54,3 | Pozitiven |
| | 0,01 | Negativen | 16,4 | Negativen |
| | / | / | 28,0 | Pozitiven |

Iz preglednice XIV je razvidno, da je ponovljivost testa VIDAS Lyme IgM dobra, samo v enem (6,25 %) primeru smo dobili različen rezultat (vzorec 12). Pri ponovitvi LIAISON Borrelia IgM Quant testa opazimo veliko širši razpon rezultatov med posameznimi testiranjmi, kar pomeni slabšo ponovljivost testa. Glede velikega razpona med pozitivno in negativno vrednostjo, dobljeno pri ponovnem testiranju posameznega vzorca, najbolj izstopa vzorec 9 (od 5,4 do 43,2).

Preglednica XV: Vrednosti posameznih testiranj na prisotnost specifičnih protiteles razreda IgG s testom VIDAS Lyme IgG in LIAISON Borrelia IgG. Pri neujemajočih se rezultatih znotraj posameznega testa, je rumeno obarvan tisti rezultat, ki smo ga izbrali za končnega.

| Pacient | Test VIDAS | | Test LIAISON | |
|---------|------------|--------------------------|--------------|--------------------------|
| | Vrednost | Interpretacija rezultata | Vrednost | Interpretacija rezultata |
| 17. | 0,27 | Pozitiven | 7,5 | Negativen |
| | 0,35 | Pozitiven | << 5,0 | Negativen |
| 18. | 0,09 | Negativen | 22,1 | Pozitiven |
| | 0,08 | Negativen | 12,0 | Mejni |
| | / | / | 19,6 | Pozitiven |
| 19. | 0,19 | Negativen | 30,8 | Pozitiven |
| | 0,18 | Negativen | 17,6 | Pozitiven |
| 20. | 0,07 | Negativen | 23,8 | Pozitiven |
| | 0,08 | Negativen | 12,2 | Mejni |
| | / | / | 21,6 | Pozitiven |
| 21. | 0,14 | Negativen | 15,3 | Pozitiven |
| | 0,22 | Pozitiven | << 5,0 | Negativen |
| | 0,16 | Negativen | 16,1 | Pozitiven |
| 22. | 0,19 | Negativen | 22,5 | Pozitiven |
| | 0,28 | Pozitiven | 6,6 | Negativen |
| | 0,14 | Negativen | 16,7 | Pozitiven |
| 23. | 0,14 | Negativen | 29,8 | Pozitiven |
| | 0,19 | Negativen | 19,1 | Pozitiven |
| 24. | 0,18 | Negativen | 37,7 | Pozitiven |
| | 0,15 | Negativen | 19,8 | Pozitiven |

Ponovljivost testa VIDAS Lyme IgG zadovoljiva; samo v dveh primerih (7,84 %) je pri ponovitvi testiranja prišlo do različnega rezultata (vzorec 21 in 22). Ponovljivost testa LIAISON Borrelia IgG testa je slabša, opazimo višji razpon med pozitivnimi in negativnimi rezultati pri posameznem vzorcu (največji razpon je od << 5,0 do 16,1 pri vzorcu 21), vendar se kljub temu vse pozitivne vrednosti gibljejo le okrog izbrane mejne (»cut-off«) vrednosti.

4.4. STATISTIČNA OBRAVNAVA REZULTATOV

Za namen statistične obravnave smo ustvarili preglednici XVI in XVII.

Preglednica XVI: Kontingenčna tabela rezultatov testiranja na prisotnost specifičnih protiteles razreda IgM za namen izvedbe McNemarjevega testa.

| Rezultat testa VIDAS \ Rezultat testa LIAISON | Pozitiven | Negativen | Skupaj |
|---|-----------|-----------|--------|
| Pozitiven ali mejni | 43 | 12 | 55 |
| Negativen | 11 | 36 | 47 |
| Skupaj | 54 | 48 | 102 |

Statistično significantne razlike med testoma VIDAS Lyme IgM in LIAISON Borrelia Quant IgM nismo dokazali ($p=1,000$).

Preglednica XVII: Kontingenčna tabela rezultatov testiranja na prisotnost specifičnih protiteles razreda IgG za namen izvedbe McNemarjevega testa.

| Rezultat testa VIDAS \ Rezultat testa LIAISON | Pozitiven | Negativen | Skupaj |
|---|-----------|-----------|--------|
| Pozitiven ali mejni | 55 | 13 | 68 |
| Negativen | 1 | 33 | 34 |
| Skupaj | 56 | 46 | 102 |

Dokazali smo statistično significantno razliko med testoma VIDAS Lyme IgG in LIAISON Borrelia IgG ($p=0,002$).

5. RAZPRAVA

Lymska borelioza predstavlja najpogostejšo zoonozo na severni polobli, katere povzročitelja prenašajo klopi: okuženih je približno ena tretjina nimf in odraslih klopov (42, 46). Njena povzročiteljica, spiralna bakterija iz kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato (1), se v naravi ohranja skozi cikel kroženja, ki poleg kompetentnih prenašalcev vključuje tudi različne prostoživeče vretenčarje in ptice, ki predstavljajo njihov rezervoar (37). Borelije se na človeka prenesejo z vbodom okuženega klopa (1). Kompleks *B. burgdorferi* sensu lato obsega več različnih borelijski vrst, od katerih je v Evropi trenutno prisotnih vsaj 5 vrst, ki so znane kot patogene za človeka (15). Slovenija je endemsko področje za lymsko boreliozo, stopnja pojavnosti te okužbe pri nas sodi med najvišje v Evropi. Zbolevalo tako moški kot ženske, odrasli in otroci (42).

Lymska borelioza se običajno pojavlja v stadijih, za katere so značilni različni klinični znaki. Zgodnjemu stadiju lokalizirane okužbe kože po nekaj dneh ali tednih sledi diseminirana faza okužbe, ki lahko mesece do leta kasneje preide v pozno ali kronično okužbo. Po vbodu klopa pride najprej do širjenja borelij v koži, kar v večini primerov rezultira v pojav značilne kožne spremembe erythema migrans, v napredovanih stadijih pa lahko okužba prizadene živčni sistem, srce in sklepe. Na koži se lahko v pozni fazi infekcije pojavi acrodermatitis chronica atrophicans (4). Sicer se bolezen pri posamezniku le izjemoma izrazi v celoti (46). Različni klinični znaki so povezani z različno vrsto borelij, ki povzroči bolezen (45). V Evropi je izmed raznovrstnih kliničnih manifestacij najpogostejša erythema migrans (1), acrodermatitis chronica atrophicans pa je najpogostejša pojavna oblika pozne lymske borelioze (4). Tudi v Sloveniji sodijo kožne manifestacije med najpogostejše pojavne oblike lymske borelioze (95).

Diagnostika lymske borelioze primarno temelji na kliničnih znakih, običajno pa je potrebna potrditev okužbe z laboratorijskimi testi (60). Samo v primeru prisotnosti značilne kožne spremembe erythema migrans ni potrebna laboratorijska potrditev okužbe. Borelijsko okužbo neposredno dokazujemo z osamitvijo *B. burgdorferi* sensu lato v posebnih medijih ali pa z molekularnimi metodami, ki se v glavnem osredotočajo na metode, ki temeljijo na verižni reakciji s polimerazo; s pomočjo le te dokažemo prisotnost borelijske DNK v vzorcu. Zaradi pomanjkljivosti metod za neposredno dokazovanje borelijske okužbe v kliničnih vzorcih, so metode posrednega dokazovanja okužbe z dokazom bolnikovega imunskega odziva najpogosteje uporabljane metode v diagnostiki

lymske borelioze (22). Tako smo tudi v diplomski nalogi namenili pozornost dveh serološkim metodam, s katerima smo testirali vzorce 102 pacientov s sumom na zgodnjo borelijsko okužbo.

Tudi pri serološki diagnostiki naletimo na nekatere težave, saj v primeru prisotnosti protiteles, ki reagirajo navzkrižno, pride do lažno pozitivnega rezultata (96), na drugi strani pa lahko pri pacientih z okužbo v zgodnjem stadiju bolezni, ko je raven sintetiziranih protiteles še tako nizka, da je pod analitično občutljivostjo testa, dobimo lažno negativen rezultat (76). Da bi se izognili navzkrižnim reakcijam smo izbrali dva testa, ki vsebujeta rekombinantne borelijske antigene, ki izovejo tvorbo za lymsko boreliozo specifičnih protiteles (90, 91, 93, 94).

V Evropi se priporoča, da serološka diagnostika večinoma sledi dvostopenjskemu algoritmu: na prvi stopnji izvedemo občutljiv presejalni test, pozitiven ali mejni rezultat pa nato potrdimo s specifičnim testom (61, 76). Ker novejši testi vključujejo za lymsko boreliozo značilne antigene, ki so vključeni v potrditvene teste, se vse pogosteje sprašujemo ali je potrditev specifičnosti imunskega odziva sploh potrebna, saj je precej draga (22, 62). Prav zaradi tega naša dva testa vsebujeta prav za *B. burgdorferi* sensu lato značilne rekombinantne antigene, kot jih vsebujejo potrditveni testi, to so OspC, Vlse in DbpA.

Serološki testi tudi niso standardizirani, kar pomeni, da se med seboj razlikujejo glede na občutljivost in specifičnost. Dodaten dejavnik, ki otežuje primerljivost in standardizacijo seroloških testov je antigenska heterogenost med vrstami borelij, ki sodijo v kompleks *B. burgdorferi* sensu lato (66). Da bi čimbolj standardizirali serološko diagnostiko so začeli izdelovati teste, ki vsebujejo enega ali le nekaj za *B. burgdorferi* sensu lato značilnih antigenov, ki naj bi bili enotni med vrstami in sevi borelij. Tako smo tudi mi izbrali dva testa, ki vsebujeta tovrstne antigene.

Borelije intenzivno spodbudijo gostiteljev imunski sistem, zlasti se ta odzove s sintezo specifičnih protiteles (97). Specifična protitelesa razreda IgM se v krvi začnejo pojavljati 3 do 4 tedne (67), specifična protitelesa razreda IgG pa med 6. in 8. tednom okužbe (68). V zgodnjem poteku okužbe borelijski antigen OspC pogosto močno spodbudi imunski odgovor s sintezo protiteles razreda IgM, ki ga je mogoče zaznati s testi, ki vključujejo rekombinanten OspC protein (69). Imunski sistem se prav tako močno odzove na nespremenljivo regijo IR6 antigena VlsE, opazili so protitelesa razreda IgM ali IgG tako v zgodnjem kot v napredovanih stadijih okužbe (73). V serološki diagnostiki lymske

borelioze je kot antigen uporaben tudi borelijski adhezin DbpA, saj le ta spodbudi intenziven specifičen imunski odgovor s protitelesi IgG, predvsem v zgodnjem diseminiranem in poznem stadiju okužbe (74). V eni od raziskav so dokazali, da je antigen VlsE najbolj občutljiv antigen za detekcijo IgG protiteles, saj je z njim reagiralo 92 % vseh vzorcev bolnikov z lymsko borelioza, sledil mu je antigen DbpA (73 %), medtem ko antigen OspC igra manjšo vlogo pri detekciji specifičnih IgG protiteles. OspC pa predstavlja glavni antigen pri zaznavi odziva specifičnih protiteles razreda IgM (reakcija pri 60 % bolnikov), prav tako se je izkazalo da je VlsE občutljiv antigen za ugotavljanje imunskega odgovora s sintezo IgM protiteles (98). Le pri 38 % bolnikov so zaznali specifična protitelesa razreda IgM proti antigenu DbpA (74).

V diplomski nalogi smo primerjali dva serološka testa: VIDAS Lyme in LIAISON Borrelia. Oba testa omogočata ločeno dokazovanje specifičnih protiteles razreda IgM in IgG v serumu ali plazmi, razlikujeta pa se v principu testiranja in v naboru antigenov, ki jih vsebuje posamezen test. Z obema testoma smo testirali 102 vzorca pacientov s sumom na borelijsko okužbo. Z VIDAS Lyme IgM testom smo dobili 49 (48,0 %) pozitivnih rezultatov in 51 (50,0 %) pozitivnih rezultatov z LIAISON Borrelia Quant IgM testom; rezultati so se ujemali v 78 (76,5 %) primerih. Z VIDAS Lyme IgG testom smo dobili 56 (54,9 %) pozitivnih rezultatov in 62 (60,8 %) pozitivnih rezultatov z LIAISON Borrelia IgG testom; rezultati so se ujemali v 88 (86,3 %) primerih. Z izračunom testne statistike nismo dokazali signifikantne razlike med VIDAS in LIAISON testom za detekcijo specifičnih IgM protiteles ($p = 1,000$), medtem ko smo ugotovili, da obstaja med testoma za detekcijo specifičnih IgG protiteles signifikantna razlika ($p = 0,002$). Iz preglednic X in XI je razvidno tudi, da sta oba testa detektirala višji delež IgG pozitivnih rezultatov v primerjavi z deležem IgM pozitivnih rezultatov glede na posamezen test.

Vzorcev, pri katerih smo testiranje ponovili, je bilo 24 (23,35 %) od skupno 102 testiranih. V preglednici XIV in XV so podani rezultati vseh ponovljenih testiranj teh vzorcev. Glede detektiranja prisotnosti protiteles razreda IgM se je ponovljivost testa VIDAS Lyme pokazala boljša v primerjavi s ponovljivostjo testa LIAISON Borrelia, saj je pri prvem testu prišlo do odstopanja rezultata samo pri enem vzorcu (vzorec 12, tabela XIV), pri testu LIAISON Borrelia IgM Quant pa opazimo veliko širši razpon med rezultati posameznega ponovljenega testiranja. Kljub temu pa lahko rečemo, da so vse pozitivne vrednosti

relativno nizke in se gibljejo okrog mejne («cut off») vrednosti testa, ki je arbitrarno določena zgornja normalna meja (določi jo proizvajalec sam), zato lahko majhne razlike v vrednosti rezultatov pomenijo drugačno interpretacijo.

Ponovljivost testa VIDAS Lyme IgG je zadovoljiva; samo v dveh primerih je pri ponovitvi testiranja prišlo do različnega rezultata (vzorec 21 in 22; preglednica XV). Ponovljivost LIAISON Borrelia IgG testa je slabša, opazimo višji razpon med pozitivnimi in negativnimi rezultati pri posameznem vzorcu, vendar se kljub temu vse pozitivne vrednosti gibljejo le okrog mejne («cut off») vrednosti.

Pri VIDAS Lyme testu bi lahko različne rezultate posameznih ponovljenih testiranj pripisali napaki pri pipetiranju vzorca v odprtino na reagenčnem traku, pipetiranju napačnega vzorca ali skeniranju napačne črtne kode. S tega vidika ima prednost testiranje na aparatu LIAISON®, saj v tem primeru zgolj vstavimo fiolo z vzorcem pacienta, na kateri se nahaja nalepka s črtno kodo, v stojalo in le tega vstavimo v aparat. Pri testih, ki se izvajajo na aparatu miniVIDAS® moramo vzorce pipetirati sami.

Pri testih LIAISON Borrelia pa bi lahko različne rezultate posameznih ponovljenih testiranj pripisali dejstvu, da smo pred vstavitvijo fiole s pacientovim vzorcem v aparat le to morda pozabili pretresti ali pa nismo preverili če se na površini pacientovega vzorca morda nahajajo zračni mehurčki, ki jih je aparat nato vsrkal. Pomembno je tudi, da so vsi parametri testa v mejah normale.

Trdna faza VIDAS Lyme IgM testa je prekrita z antigenoma DbpA in OspC, trdna faza LIAISON Borrelia IgM Quant testa pa je prekrita z antigenoma OspC in VlsE (90, 93). Pri vzorcih, pri katerih smo dobili pozitiven rezultat s testom VIDAS Lyme IgM in hkrati negativen rezultat s testom LIAISON Borrelia IgM Quant (vzorci 2 – 7; preglednica XIV), bi vzrok temu lahko pripisali prisotnosti protiteles proti antigenu DbpA v krvi ali serumu pacienta, ki jih s testom LIAISON Borrelia IgM Quant ne moremo detektirati, ker test tega antigena ne vsebuje. Podobno lahko sklepamo za vzorce, ki so bili negativni pri testu VIDAS Lyme IgM in pozitivni pri testu LIAISON Borrelia IgM Quant (vzorci 8 – 16; preglednica XIV), da je glede na vrsto antigenov, ki so vključeni v trdno fazo teh dveh testov, pozitiven rezultat na račun protiteles proti VlsE.

Trdna faza VIDAS Lyme IgG testa vsebuje antigene VlsE, DbpA in OspC, trdna faza LIAISON Borrelia IgG testa pa je prekrita z antigenom VlsE (91, 94). Za vzorce, pri katerih smo s testov VIDAS Lyme IgG dobili negativen rezultat in hkrati pozitiven rezultat

pri testu LIAISON Borrelia IgG (vzorci 18 – 24; preglednica XV), lahko rečemo da je negativen rezultat VIDAS Lyme IgG testa na račun zaznave manjšega deleža protiteles proti VlsE antigenu, ki ga ima ta test glede na test LIAISON Borrelia IgG. Ker je trdna faza VIDAS Lyme IgG testa prekrita s tremi borelijskimi antigeni, lahko sklepamo, da vsebuje manjšo količino antigena VlsE; proizvajalec testa ne navaja v kakšnem količinskem razmerju so vključeni antigeni Vlse, DbpA in OspC.

Glede občutljivosti testov VIDAS Lyme in LIAISON Borrelia lahko rečemo, da pri vseh pacientih ni bilo mogoče dokazati prisotnosti specifičnih protiteles. Vprašanje je ali gre v teh primerih res za borelijsko okužbo, morda je potek okužbe še v zgodnji fazi in imunski sistem še ni sintetiziral zadostnega števila protiteles proti borelijskim antigenom.

Za ovrednotenje specifičnosti uporabljenih testov, bi bilo potrebno pridobiti natančnejše informacije o klinični sliki pacientov, zlasti o kožni spremembi erythema migrans.

Za praktično izvedbo je v primerjavi s testom VIDAS Lyme enostavnejši LIAISON Borrelia test, saj ni potrebno pipetirati vzorca, ampak v aparat le vstavimo fiolo s pacientovim vzorcem, na kateri je nalepka s črtno kodo, ki jo aparat nato sam odčita, pri testiranju z aparatom miniVIDAS® pa moramo s čitalnikom skenirati kodo z vsake fiole posebej, kar pa spet pomeni možnost napake zaradi medsebojne zamenjave fiol z vzorci pacientov. Testiranje na aparatu LIAISON® ima tudi to prednost, da je hkrati možno testiranje večjega števila vzorcev naenkrat.

6. SKLEP

V diplomski nalogi smo:

- Pri pacientih s sumom na zgodnjo okužbo z lymsko borelioza dokazali specifična protitelesa razreda IgM in IgG proti borelijam iz kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato s testoma VIDAS Lyme proizvajalca BioMerieux in LIAISON Borrelia proizvajalca DiaSorin,
- Pri primerjavi rezultatov med testom VIDAS Lyme in LIAISON Borrelia testom za detekcijo specifičnih protiteles razreda IgM nismo dokazali statistično signifikantne razlike, dokazali pa smo statistično značilno razliko med VIDAS Lyme in LIAISON Borrelia testom za detekcijo specifičnih protiteles razreda IgG v vzorcih,
- Pri testiranju bolnikov s sumom na zgodnjo klinično sliko lymške borelioze smo ugotovili nekoliko večji delež bolnikov s pozitivnimi IgG kakor IgM tako s testom VIDAS Lyme kot s testom LIAISON Borrelia.

7. LITERATURA

1. Stanek G, Wormser G P, Gray J, Strle F: Lyme borreliosis. *The Lancet* 2012; 379 (9814): 461–73.
2. Wang G, van Dam A P, Schwartz I, Dankert J: Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12 (4): 633-53.
3. Sterne A C, Schoen R T, Taylor E: The clinical evolution of Lyme arthritis. *Ann Intern Med* 1987; 107(5): 725-31.
4. Steere A C: Lyme disease. *N Engl J Med* 1989; 321 (9): 586-96.
5. Burgdorfer W: Lyme disease (borreliosis): a global perspective. *AAMJ* 1995; 4: 227-33.
6. Paster B J, Dewhirst F E, Weisburg W G, Tordoff L A, Fraser G J, Hespell R B, Stanton T B, Zablen L, Mandelco L, Woese C R: Phylogenetic analysis of the spirochetes. *J Bacteriol* 1991; 173(19): 6101-9.
7. Barbour A G, Hayes F S: Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev* 1986; 50(4): 381–400.
8. Bergstroem S, Noppa L, Gylfe A, Oesterg Y: Molecular and cellular biology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, v Gray J, Kahl O, Lane R S, Stanek G: Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control, CAB International, Washington DC, 2002: 47-90.
9. Ruzic-Sabljić E: Borelije, v *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*, Medicinski razgledi, Ljubljana, 2002: 293-302.
10. Sadziene A, Rosa P A, Thompson P A, Hogan D M, Barbour A G: Antibody-resistant mutants of *Borrelia burgdorferi*: *in vitro* selection and characterization. *J Exp Med* 1992; 176(3): 799–809.
11. European Concerted Action on Lyme borreliosis. Biology: The Spirochaete: *Borrelia* Strains. <http://www.eucalb.com/>, html, dostopno: december, 2012.
12. Rosa P A, Tilly K, Stewart P E: The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. *Nature Reviews Microbiology* 2005; 3(2): 129-43.
13. Baranton G, Postic D, Saint Girons I, et al. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol* 1992; 42(3): 378–83.

14. Margos G, Vollmer S A, Ogden N H, Fish D: Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Inf Gen Evol* 2011; 11(7): 1545-63.
15. Manelli A, Bertolotti L, Gern L, Gray J: Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe: transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change. *FEMA Microbiol Rew* 2012; 36(4): 837-61.
16. Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Kuhbeck R, Barbour A G, Kramer M: Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 539: 126-43.
17. Norris S J: Antigenic variation with a twist – the *Borrelia* story. *Mol Microbiol* 2006; 60(6): 1319-22.
18. Liang F T, Philipp M T: Analysis of Antibody Response to Invariable Regions of VlsE, the Variable Surface Antigen of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 1999; 67(12): 6702-6.
19. Liang F T, Nelson F K, Fikrig E: Molecular adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the murine host. *J Exp Med* 2002; 196 (2): 275–80.
20. Strother K O, Hodzic E, Barthold S W, de Silva A M: Infection of Mice with Lyme Disease Spirochetes Constitutively Producing Outer Surface Proteins A and B. *Infect Immun* 2007; 75(6): 2786-94.
21. Xu Q, McShan K, Liang F T: Modification of *Borrelia burgdorferi* to overproduce OspA or VlsE alters its infectious behaviour. *Soc General Microbiol* 2008; 154(11): 3420-9.
22. Aguero-Rosenfeld, M E, Wang G, Schwartz I, Wormser G P: Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(3): 484-509.
23. Fikrig E, Narasimhan S: *Borrelia burgdorferi* - Traveling incognito?. *Microbes and Infection* 2006; 8(5); 1390-9.
24. Liang F T, Alvarez A L, Gu Y, Nowling J M, Ramamoorthy R Philipp M T: An immunodominant conserved region within the variable domain of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of Immunology* 1999; 163(10): 5566-73.
25. Tilly K, Rosa P A, Stewart P E: Biology of Infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Dis Clin N Am* 2008; 22(2): 217-34.
26. Zajkowska J, Grygorczuk S, Kondrusik M, Pancewicz S, Hermanowska-Szpakowicz T: New aspects of pathogenesis of Lyme borreliosis. *Przegl Epidemiol* 2006; 60(1): 167–70.

27. Antonara S, Ristow L, Coburn J: Adhesion mechanism of *Borrelia burgdorferi*, v Linke D, Goldman A: Bacterial adhesion – Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer Science Business Media B V, Dordrecht, 2011: 35-49.
28. Saint Girons I, Norris S J, Goebel U B, Meyer J, Walker E M, Zuerner R: Genome structure of spirochetes. Res Microbiol 1992; 143(6), 615-21.
29. Fraser C M, Casjens S, Huang W M in sod.: Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. Nature 1997; 390(6660): 580–6.
30. Casjens S R, Mongodin E F, Qiu W G in sod.: Genome stability of Lyme disease spirochetes: Comparative genomics of *Borrelia burgdorferi* plasmids. PLoSOne 2012; 7(3): e33280.
31. Wilske B, Schriefer M E: *Borrelia*; v Murray P R, Baron E J, Jorgensen J H, Pfaller M A, Tenover F C, Tenover K C: Manual of Clinical Microbiology, Society for Microbiology Press, Washington, 2003: 937-54.
32. Kurtenbach K, Hanincova K, Tsao J I, Margos G, Fish D, Ogden N H: Fundamental processes in the evolutionary ecology of Lyme borreliosis. Nat Rev Microbiol 2006; 4(9): 660–9.
33. Kurtenbach K: *Borrelia burgdorferi* sensu lato in vertebrate host, v Gray J, Kahl O, Lane R S, Stanek G: Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control, CAB International, Washington DC, 2002: 117-48.
34. Gern L: Life cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and transmission to humans, v Lipsker D, Jaulhac B: Lyme borreliosis, Biological and clinical aspects, Current problems in dermatology, Karger, Basel 2009; 37: 18-30.
35. Stanek G, Burger I, Hirschl A, Wewalka G, Radda A: *Borrelia* transfer by ticks during their life cycle. Zbl Bakt Hyg 1986; 263(1-2): 29-33.
36. Gern L, Burgdorfer W, Aeschlimann A, Krampitz H E: The ecology of Lyme borreliosis in Europe, v Weber K, Burgdorfer W: Aspects of Lyme borreliosis, Springer – Verlag, Berlin, 1993; 59-69.
37. Humair P-F, Gern L: The wild hidden face of Lyme borreliosis in Europe. Microbes and Infection 2000; 2(8): 915-22.
38. Piesman J, Maupin G O, Campos E G, Happ C M: Duration of adult female *Ixodes dammini* attachment and transmission of *Borrelia burgdorferi*, with description of a needle aspiration. J Infect Dis 1991; 163(4): 895-7.
39. de Silva A M, Fikrig E: Arthropod – and Host – specific Gen Expression by *Borrelia burgdorferi*. J Clin Invest 1997; 99(3): 377-9.

40. Radolf J D, Caimano M J, Stevenson B, Hu L T: Of tick, mice and men: understanding the dual – host lifestyle of spirochaetes. *Nature Reviews Microbiology* 2012; 10(2): 87-99.
41. Wormser G P, Dattwyler R J, Shapiro E D, Halperin J J, Steere A C, Klemperer M S in sod.: The clinical assessment, treatment, and prevention of Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2006; 43(9): 1089–134.
42. Strle F: Lyme borreliosis in Slovenia. *Zent bl Bakterial* 1999; 289(5-7): 643-52.
43. Sočan M: Epidemiologija prijavljenih primerov Lymške borelioze v Sloveniji; v Maraspin Čarman V, Strle F: Lymška borelioza 2012, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Združenje za infektologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu, Ljubljana, 2012: 15-23.
44. Strle F, Maraspin-Carman V, Furlan-Lotric S, Ruzic-Sabljić E, Pleerski-Rigler D, Cimperman J: Epidemiološke značilnosti lymške borelioze v Sloveniji. *Zdravniški vestnik* 1995; 64: 145-50.
45. van Dam A P, Kuiper H, Vos K, Widjojokusumo A, de Jongh B M, Spanjaard L, Ramselaar A C P, Kramer M D, Dankert J: Different Genospecies of *Borrelia burgdorferi* Are Associated with Distinct Clinical Manifestations of Lyme Borreliosis. *Clin Infect Dis* 1993; 17(4): 708-17.
46. Stanek G, Strle F: Lyme borreliosis. *Lancet* 2003; 362(9396): 1639-47.
47. Casjens S, Fraser - Liggett C M, Mongodin E F, Qui W G, Dunn J J, Luft B J, Schutzer S E: Whole Genome Sequence of an Unusual *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Isolate. *J Bacteriol* 2011; 193(6): 1489-90.
48. Ruzić-Sabljić E, Zore A, Strle F: Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates by pulsed-field gel electrophoresis after *MluI* restriction of genomic DNA. *Res Microbiol* 2008; 159(6): 441-8.
49. Mullegger R R: Dermatological manifestations of Lyme borreliosis. *Eur J Dermatol* 2004; 14(5): 296-309.
50. Strle F, Nelson J A, Ruzic-Sabljić E, Cimperman J, Maraspin V, Lotric-Furlan S, Cheng Y, Picken M M, Gordon M, Trenholme G M, Roger N, Picken R N: European Lyme Borreliosis: 231 Culture-Confirmed Cases Involving Patients with Erythema Migrans. *Clin Infect Dis* 1996; 23(1):61 -5.
51. Strle F, Stanek G: Clinical manifestations and diagnosis of Lyme borreliosis. *Curr Probl Dermatol* 2009; 37: 51-110.
52. Åsbrink E, Hovmark A: Early and late cutaneous manifestations in *Ixodes*-borne borreliosis (erythema migrans borreliosis, Lyme borreliosis). *Ann N Y Acad Sci* 1988; 539: 4-15.

53. Strle F: Acrodermatitis chronica atrophicans. *Med Razgl* 1999; 38(S1): 85-91.
54. Cimperman J, Maraspin V, Lotric-Furlan S, Ruzić-Sabljić E, Strle F: Lyme meningitis: A one-year follow up controlled study. *Wien Klin Wochenschr* 1999; 111(22-23): 961-63.
55. Kristoferitsch W: Neurological manifestations of Lyme borreliosis: Clinical definition and differential diagnosis. *Scand J Infect Dis* 1991; 77: 64-73.
56. Steere A C: Lyme disease. *N Eng J Med* 2001; 345: 115-25.
57. Hu L: Lyme arthritis. *Infect Dis Clin North Am* 2005; 19(4): 947-61.
58. Holmgren A R, Matteson E L: Lyme myositis. *Arthritis Rheum* 2006; 54(8): 2697-700.
59. Fish A E, Pride Y B, Pinto D S: Lyme carditis. *Infect Dis Clin N Am* 2008; 22(2): 275-88.
60. Nadelman R B, Wormser G P: Lyme borreliosis; *The Lancet* 1998; 352(9127): 557-65.
61. Stanek G, Fingerle V, Hunfeld K P, Jaulach B, Kaiser R, Krause A in sod.: Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(1): 69–79.
62. Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U: Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 49(1): 13-21.
63. Berger B W, Johnson R C, Kodner C, Coleman L.: Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from erythema migrans lesions and perilesional skin. *J Clin Microbiol* 1992; 30(2): 359–61.
64. Schmid B L: PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10(1): 185-201.
65. Nocton J J, Dressler F, Rutledge B J, Rys P N, Persing D H, Steere A C: Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. *N Engl J Med* 1994; 330(4): 229-34.
66. Hauser U, Lehnert G, Wilske B: Validity of interpretation criteria for standardized western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme borreliosis based on sera collected throughout Europe. *J Clin Microbiol* 1999; 37(7): 2241-7.
67. Hilton E, Tramontano A, DeVoti J, Sood S K: Temporal study of immunoglobulin M seroreactivity to *Borrelia burgdorferi* in patients treated for Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35(3): 774–6.

68. Feder H M Jr, Gerber M A, Luger S W, Ryan R W: Persistence of serum antibodies to *Borrelia burgdorferi* in patients treated for Lyme disease. Clin Infect Dis 1992; 15 (5): 788–93.
69. Fung B P, McHugh G L, Leong J M, Steere A C: Humoral Immune Response to Outer Surface Protein C of *Borrelia burgdorferi* in Lyme Disease: Role of the Immunoglobulin M Response in the Serodiagnosis of Early Infection. Infect Immun 1994; 62(8): 3213-21.
70. Seiler K P, Weis J J: Immunity to Lyme disease: protection, pathology and persistence. Curr Opin Immunol 1996; 8(4): 503-9.
71. Liang F T, Aberer E, Cinco M, Gern L, Hu C M, Lobet Y N in sod.: Antigenic Conservation of an Immunodominant Invariable Region of the VlsE Lipoprotein among European Pathogenic Genospecies of *Borrelia burgdorferi* SL. J Infect Dis 2000; 182(5): 1455-62.
72. Zajkowska J, Kondrusik M, Grygorzug S, Pancewicz S, Izycka A: The usefulness of 'in vivo' antigens in the diagnosis of human Lyme borreliosis. Int J Med Microbiol 2008; 298(S1): 361-4.
73. Hofmann H, Wallich R, Lorenz I, Bechtel M: Comparison of a new line assay using purified and recombinant antigens with a European lysate blot for serodiagnosis of Lyme borreliosis. Int J Med Microbiol 2006; 296(40): 288-90.
74. Schulte-Spechtel U, Fingerle V, Gereon G, Rogge S, Wilske B: Molecular analysis of decorin-binding protein A (DbpA) reveals five major groups among European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains with impact for the development of serological assay and indicates lateral gene transfer of the *dbpA* gene. Int J Med Microbiol 2006; 296(1): 250-66.
75. Ruzić-Sabljić E, Maraspin V, Cimperman J, Lotric-Furlan S, Strle F: Evaluation of immunofluorescence test (IFT) and immuno (western) blot test in patients with erythema migrans. Wien Klin Wochenschr 2002; 114(13-14): 586-90.
76. Lori Brown S, Hansen S L, Langone J J: Role of Serology in the Diagnosis of Lyme Disease. JAMA 1999; 282(1): 62-6.
77. Petrovec M: Virologija; v Kotnik V: Praktikum iz mikrobiologije in imunologije za študente medicine, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 2011: 241-80.
78. Ashihara Y, Kasahara Y, Nakamura R M: Immunoassay and Immunochemistry; v Henry J B: Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, W B Saunders, Philadelphia, 2001: 821-50.
79. [http://www.thefullwiki.org/Structural_Biochemistry/Proteins/Enzyme-Linked_Immunoabsorbent_Assay_\(ELISA\)](http://www.thefullwiki.org/Structural_Biochemistry/Proteins/Enzyme-Linked_Immunoabsorbent_Assay_(ELISA)), html, dostopno: januar, 2013.

80. Garcia L S, Thomson R B, Procop G W, Robers G D: Immunochemical Methods Used for Organism Detection; v Forbes B A: Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, Mosby, Saint Louis, 1998: 208-219.
81. Constanine N T, Lana D P: Immunoassay for the Diagnosis of Infectious Disease; v Murray P R, Baron E J, Jorgensen J H, Pfaller M A, Tenover F C, Tenover F C: Manual of Clinical Microbiology, Society for Microbiology Press, Washington, 2003: 218-33.
82. Garcia L S, Thomson R B, Procop G W, Robers G D: Serologic Diagnosis of Infectious Disease; v Forbes B A: Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, Mosby, Saint Louis, 1998: 220-233.
83. Wilske B: Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis. *Ann Med* 2005; 37(8): 568-79.
84. Strle F: Zdravljenje Lymške borelioze z antibiotiki. *Med Razgl* 1995; 34: 501-9.
85. Strle F: Antibiotic treatment of Lyme borreliosis: our experiences. *Acta Dermatoven APA* 2001; 10(4): 162-6.
86. European Concerted Action on Lyme borreliosis. Treatment of Lyme borreliosis in Europe. <http://www.eucalb.com/>, html, dostopno: december, 2012.
87. British Infection Association: The epidemiology, prevention, investigation and treatment of Lyme borreliosis in United Kingdom patients: a position statement by the British Infection Association. *J Infect* 2011; 62(5): 329-38.
88. Poland G A: Vaccines against Lyme disease: What happened and what lessons can we learn? *Clin Infect Dis* 2011; 52(S3): s253-8.
89. Wilske B, Busch V, Fingerle V, Jauris-Heipke S, Preac Mursic V, Rossler D, Will G: Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for *Borrelia* vaccine development. *Infection* 1996, 24(2), 208-12.
90. bioMérieux VIDAS®, VIDAS® Lyme IgM (LYM) - VIDAS® Lyme IgG (LYG), 2010/2011. VIDAS® Lyme IgM (LYM). REF 30 319
91. bioMérieux VIDAS®, VIDAS® Lyme IgG (LYG) - VIDAS® Lyme IgG (LYG), 2010/2011. VIDAS® Lyme IgG (LYG). REF 30 320
92. European Concerted Action on Lyme boreliosis. Diagnosis: Serology: Diagnostic Guidelines. CDC Recommendations Standardizations and Interpretation, CDC Conference 10/28/94. <http://www.eucalb.com/>, html, dostopno: december, 2012.
93. DiaSorin LIAISON®. 2011. DiaSorin LIAISON® *Borrelia* IgM Quant. 2011. (310020) EN – 200/007-917.
94. DiaSorin LIAISON®. 2011. DiaSorin LIAISON® *Borrelia* IgG. 2011. (310880) EN – 200/007-881.

95. Ruzić Sabljic E, Strle F, Cimperman J, Maraspin V, Lotric S, Lotric-Furlan, Pleterki-Rigler D: Characterisation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from patients with skin manifestations of Lyme borreliosis residing in Slovenia. J Med Microbiol 2000; 49(1): 47–53.
96. Bruckbauer H, Preac-Mursic V, Fuchs R Wilske B: Cross-reactive proteins of *Borrelia burgdorferi*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992; 11(3): 224-32.
97. Embers M E, Ramamoorthy R, Philipp M T: Survival strategies of *Borrelia burgdorferi*, the etiologic agent of Lyme disease. Microbes Infect 2004; 6(3): 312-8.
98. Goettner G, Schulte-Spechtel U, Hillermann R, Liegl G, Wilske B, Fingerle V: Improvement of Lyme borreliosis serodiagnosis by a new recombinant immunoglobulin G (IgG) and IgM line immunoblot assay and addition of VlsE and DbpA homologues. J Clin Microbiol 2005; 43(8), 3602-9.