

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA REPŠE

PRIMERJAVA DVEH ANALIZNIH SETOV ZA  
DOKAZOVANJE SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI  
BORELIJSKIM ANTIGENOM V KRVI BOLNIKA

**DIPLOMSKA NALOGA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

EVA REPŠE

PRIMERJAVA DVEH ANALIZNIH SETOV ZA DOKAZOVANJE  
SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI BORELIJSKIM ANTIGENOM V  
KRVI BOLNIKA

COMPARISON OF TWO ANALYSIS SETS FOR DETECTION OF  
SPECIFIC ANTIBODIES AGAINST BORRELIA ANTIGENS IN THE  
PATIENT'S BLOOD

Ljubljana, 2015

Diplomsko nalogo sem opravljala na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Eve Ružič-Sabljić, dr. med.

Praktični del diplomske naloge sem opravljala v Laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroze (BOR), na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani.

## ZAHVALA

*Iskrena hvala mentorici prof. dr. Evi Ružič – Sabljić za strokovno pomoč pri izdelavi moje diplomske naloge.*

*Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim v Laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroze (BOR) za vso pomoč pri izvedbi praktičnega dela diplomske naloge.*

*Posebna zahvala gre mojim ožjim družinskim članom za vzpodbudo, podporo in potrpežljivost v času študija. Brez vas bi bilo veliko težje.*

*Nazadnje pa iskrena hvala mojemu dragemu zaročencu za vso izkazano podporo, pomoč in zaupanje. Hvala, ker verjameš vame.*

## Izjava

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

Ljubljana, november 2015

Predsednica diplomske komisije: Prof. dr. Mirjana Gašperlin

Članica diplomske komisije: asist. dr. Irena Prodan-Žitnik

## KAZALO

ZAHVALA .....	II
KAZALO .....	I
KAZALO SLIK .....	II
KAZALO TABEL .....	III
POVZETEK .....	V
ABSTRACT .....	VI
SEZNAM OKRAJŠAV .....	VIII
1. UVOD .....	- 1 -
1.1. SPLOŠNO .....	- 1 -
1.2. BORELIJE .....	- 1 -
1.2.1. ZNAČILNOSTI BORELIJ .....	- 1 -
1.2.2. BORELIJSKI GENOM .....	- 2 -
1.2.3. ANTIGENI .....	- 2 -
1.2.4. RAZŠIRJENOST BORELIJ V SLOVENIJI .....	- 3 -
1.3. GOSTITELJI PRENAŠALCEV BOLEZNI .....	- 3 -
1.3.1. ŽIVLJENSKI KROG IN ZNAČILNOSTI KLOPOV .....	- 4 -
1.3.2. PRENOS POVZROČITELJA .....	- 5 -
1.4. LYMSKA BORELIOZA .....	- 6 -
1.4.1. DIAGNOSTIKA .....	- 8 -
1.4.2. ZDRAVLJENJE .....	- 11 -
1.4.3. PREPREČEVANJE BOLEZNI .....	- 11 -
2. NAMEN DELA .....	- 13 -
3. MATERIALI IN VZORCI .....	- 14 -
3.1. VZORCI .....	- 14 -
3.2. MATERIAL IN OPREMA .....	- 14 -
3.2.1. Test BAG Borrelia Blot in test <i>recomLine</i> Borrelia: .....	- 14 -
3.2.2. Ostali materiali in oprema .....	- 15 -
4. METODE .....	- 16 -
4.1. OPIS TESTOV BAG Borrelia Blot in <i>recomLine</i> Borrelia .....	- 16 -
4.2. ANTIGENI .....	- 16 -
4.3. VRSTA PREISKOVANIH VZORCEV .....	- 17 -

4.4. IZVEDBA TESTOV BAG Borrelia Blot in <i>recomLine</i> Borrelia.....	- 18 -
4.4.1. PRIPRAVA REAGENTOV PRI TESTU BAG Borrelia Blot .....	- 18 -
4.4.2. PRIPRAVA REAGENTOV PRI TESTU <i>recomLine</i> Borrelia .....	- 19 -
4.4.3. IZVEDBA TESTOV BAG Borrelia Blot in <i>recomLine</i> Borrelia.....	- 21 -
4.5 INTERPRETACIJA REZULTATOV TESTOV BAG BORRELIA BLOT IN RECOMLINE BORRELIA.....	- 28 -
5. REZULTATI.....	- 29 -
5.1 Rezultati testiranja s testoma BAG Borrelia Blot in <i>recomLine</i> Borrelia .....	- 29 -
5.2 Primerjava rezultatov med testoma BAG Borrelia Blot in <i>recomLine</i> Borrelia .....	- 30 -
5.3 Analiza imunskega odziva bolnikov, testiranih s testoma BAG Borrelia Blot in <i>recomLine</i> Borrelia.....	- 31 -
5.4 Reakcija protiteles IgM in IgG na posamezne borelijske antigene .....	- 34 -
5.5 Primerjava reakcij specifičnih protiteles razreda IgM na posamezne borelijske antigene med testoma BAG Borrelia Blot in <i>recomLine</i> Borrelia.....	- 38 -
5.6 Primerjava reakcij specifičnih protiteles razreda IgG na posamezne borelijske antigene med testoma BAG Borrelia Blot in <i>recomLine</i> Borrelia.....	- 38 -
5.7 Primerjava reakcij specifičnih protiteles razreda IgM in IgG na posamezne borelijske antigene glede na borelijsko okužbo .....	- 39 -
5.8 Vzorci, katerih rezultati se ne ujemajo.....	- 39 -
6. RAZPRAVA .....	- 42 -
7. SKLEPI.....	- 47 -
8. LITERATURA.....	- 48 -

## KAZALO SLIK

Slika 1: Erythema migrans (prevzeto po viru 25). .....	- 6 -
Slika 2: Pravilno odstranjevanje klopa (prevzeto po viru 27) .....	- 12 -
Slika 3: Kontrolni trak, priložen testu BAG Borrelia Blot, na katerem so posamezni pasovi za vrednotenje reakcije. ....	- 23 -
Slika 4: Kontrolni trak, priložen testu <i>recomLine</i> Borrelia, na katerem so posamezni pasovi za vrednotenje reakcije. ....	- 25 -

## KAZALO TABEL

Tabela I: Klinična slika lymške borelioze (povzeto po viru 17) .....	- 7 -
Tabela II: Specifični antigeni, uporabljeni pri BAG Borrelia Blot testu (34) .....	- 17 -
Tabela III: Specifični antigeni, uporabljeni pri recomLine Borrelia testu (35) .....	- 17 -
Tabela IV: Količine različnih reagentov za pripravo ustrezne količine pufru za redčenje in spiranje. -	18 -
Tabela V: Količine reagentov za pripravo željene količine IgM ali IgG konjugata .....	- 19 -
Tabela VI: Količine različnih reagentov za pripravo ustrezne količine pufru za spiranje. ....	- 20 -
Tabela VII: Količine reagentov za pripravo željene količine IgM ali IgG konjugata .....	- 20 -
Tabela VIII: Intenzivnost obarvanja posameznega antigenskega pasu smo ocenjevali v primerjavi s kontrolo procesa obarvanja. ....	- 24 -
Tabela IX: Intenzivnost obarvanja posameznih pasov v primerjavi s cut off kontrolo .....	- 25 -
Tabela X: Točkovanje pozitivnega rezultata B. burgdorferi antigenov v testu BAG Borrelia Blot. -	26 -
Tabela XI: Ovrednotenje testa .....	- 27 -
Tabela XII: Točkovanje posameznega antigenskega pasu glede na določanje IgM ali IgG protiteles pri testu recomLine Borrelia. ....	- 27 -
Tabela XIII: Ovrednotenje imunoblot testa za rezred IgM ali IgG protiteles. ....	- 28 -
Tabela XIV: Prisotnost specifičnih protiteles razreda IgM in IgG pri bolnikih s sumom na Lymsko boreliozo, določenih pri izvedbi BAG Borrelia Blot testa. ....	- 29 -
Tabela XV: Prisotnost specifičnih protiteles razreda IgM in IgG pri bolnikih s sumom na Lymsko boreliozo, določenih pri izvedbi recomLine Borrelia testa. ....	- 29 -
Tabela XVI: Primerjava rezultatov testiranja IgM protiteles pri recomLine Borrelia in BAG Borrelia Blot testu. ....	- 30 -
Tabela XVII: Primerjava rezultatov testiranja IgG protiteles pri recomLine Borrelia in BAG Borrelia Blot testu. ....	- 30 -
Tabela XVIII: Imunski odziv pri bolnikih s sumom na borelijsko okužbo (skupaj 50 bolnikov), ki smo ga določali s testoma recomLine in BAG Borrelia Blot. A: Bolniki pri katerih smo ugotovili hkratno prisotnost oziroma odsotnost protiteles IgM in IgG; B: Bolniki z različno kombinacijo prisotnosti oziroma odsotnosti protiteles IgM; C: Bolniki z različno kombinacijo prisotnosti oziroma odsotnosti protiteles IgG. ....	- 31 -
Tabela XIX: Imunski odziv 20 bolnikov, kjer smo ugotovili prisotnost vsaj ene vrste protiteles (IgM ali IgG) .....	- 33 -
Tabela XX: Pozitivne serološke reakcije na borelijske antigene pri pozitivnih, mejnih in negativnih končnih rezultatih pri BAG Borrelia Blot testu in IgM razredu protiteles. Poudarjene so najpogostejše reakcije na antigen. ....	- 35 -

Tabela XXI: Pozitivne serološke reakcije na borelijske antigene pri pozitivnih, mejnih in negativnih končnih rezultatih pri BAG Borrelia Blot testu in IgG razredu protiteles. Poudarjene so najpogostejše reakcije na antigen. ....	- 36 -
Tabela XXII: Pozitivne serološke reakcije na borelijske antigene pri pozitivnih, mejnih in negativnih končnih rezultatih pri recomLine Borrelia testu in IgM razredu protiteles. Poudarjene so najpogostejše reakcije na antigen. ....	- 36 -
Tabela XXIII: Pozitivne serološke reakcije na borelijske antigene pri pozitivnih, mejnih in negativnih končnih rezultatih pri recomLine Borrelia testu in IgG razredu protiteles. Poudarjene so najpogostejše reakcije na antigen. ....	- 37 -
Tabela XXIV: Vzorci, katerih rezultati se pri testiranju na borelijske antigene z BAG Borrelia Blot in recomLine Borrelia ne ujemajo.....	- 40 -

## POVZETEK

Najpogostejša bolezen, ki jo na našem območju prenašajo klopi, je lymska borelioza. Lymsko boreliozo pri človeku povzroča spiroheta *Borrelia burgdorferi* sensu lato, pri nas najpogostejši vrsti pa sta *B. afzelii* (do 80%) in *B. garinii* (do 20%). *B. burgdorferi* sensu stricto in *B. spielmani* sta redkeje prisotni. Lymska borelioza je zoonoza, saj se prenaša z živali na človeka, njeni najpogostejši prenašalci pa so trdi, ščitasti klopi *Ixodes* spp.

Za lymsko boreliozo so značilne kožne spremembe. Najpogostejši klinični znak zgodnje lokalizirane oblike lymske borelioze je erythema migrans, rdeč kolobar, ki se centralno širi. Najpogostejši klinični znak, ki je značilen za pozno lokalizirano obliko lymske borelioze, pa je acrodermatitis chronica atrophicans, kronična oblika kožne spremembe. Simptomi, ki lahko spremljajo bolezen, so: glavobol, splošna utrujenost, zaspanost in bolečine v mišicah. Pri bolnikih, kjer obstaja visoka verjetnost okužbe, izvajamo različna mikrobiološka testiranja za potrjevanje lymske borelioze.

Namen diplomske naloge je primerjava dveh specifičnih potrditvenih testov za dokazovanje in določitev IgM in IgG protiteles proti borelijskim antigenom v krvi bolnikov. Komerčni test BAG *Borrelia* Blot smo primerjali s komercialnim testom *recomLine* *Borrelia*, proizvajalca Mikrogen. Borelijski antigeni, ki so uporabljeni pri enem in drugem testu, se malo razlikujejo, vendar smo predvidevali, da različna antigenska sestava testov ne bo vplivala na rezultat. Za testiranje smo naključno izbrali 50 serumov bolnikov, katerih kri je bila zaradi suma na borelijsko okužbo poslana v laboratorij na mikrobiološko testiranje.

Prisotnost protiteles IgM smo s testom BAG *Borrelia* Blot dokazali pri 16/50 (32 %) bolnikov, s testom *recomLine* *Borrelia* pa pri 12/50 (24 %) bolnikov. Prisotnost protiteles IgG smo s testom BAG *Borrelia* Blot dokazali pri 20/50 (40 %) bolnikov, s testom *recomLine* *Borrelia* pa pri 18/50 (36 %) bolnikov. Pri dokazovanju protiteles IgM in IgG razlika ni bila statistično značilna.

Pri 8/50 (16 %) testiranih vzorcih so se rezultati razlikovali. Več neujemanj je prišlo pri določanju IgG (5 vzorcev, od tega sta 2 imela mejni končni rezultat) kot IgM protiteles (4 vzorci). Do različnih končnih rezultatov oziroma do razlik pri reakcijah enakih antigenov v različnih testih (BAG *Borrelia* Blot in *recomLine* *Borrelia*) je tako za razred protiteles IgM,



kot tudi razred protiteles IgG, lahko prišlo zaradi različnih virov antigenov, različne občutljivosti pozitivnih reakcij, različnega točkovanja pri enem ali drugem testu in subjektivnosti pri optičnem ocenjevanju testa.

## ABSTRACT

The most common disease in our area that is spread by ticks, is Lyme disease. Lyme disease in humans is caused by spirochete *Borrelia burgdorferi* sensu lato. The most common species in our area are *B. afzelii* (up to 80%) and *B. garinii* (up to 20%); *B. burgdorferi* sensu stricto in *B. spielmani* are rarely present. Lyme disease is classified as a zoonosis, as it is transmitted from animals to humans. Its most common vectors are hard-bodied ticks of the genus *Ixodes*.

Skin lesions are highly characteristic for Lyme disease. The most common sign of early localized Lyme disease is expanding area of redness (called erythema migrans) and the most common sign of late disseminated infection is acrodermatitis chronica atrophicans, chronic skin disorder. Symptoms which may accompany the disease are headache, general fatigue, drowsiness and muscle pain. Microbiological testing is highly recommended for the patients with high risk of infection.

The purpose of this thesis is to compare specific confirmatory tests for detection and determination of IgM and IgG antibodies against *Borrelia burgdorferi* antigens in the patients blood. We wanted to compare commercial BAG Borrelia Blot assay with commercial *recomLine* Borrelia Mikrogen assay. Borrelia antigens that are used in the first assay are a little different from the antigens that are used in the second one, but we expected that the difference will not affect the results. We randomly selected 50 serums from patients, whose blood was sent to the laboratory for microbiological testing because of suspicion of infection with *Borrelia burgdorferi*.

The presence of IgM antibodies was detected in 16/50 (32 %) patients tested by BAG Borrelia Blot and in 12/50 (24 %) patients tested by *recomLine* Borrelia assay. The presence of IgG antibodies was detected in 20/50 (40 %) patients tested by BAG Borrelia Blot and 18/50 (36 %) patients tested by *recomLine* Borrelia assay. The difference was not statistically significant for the IgM or IgG antibodies.

In 8/50 (16 %) of the tested samples the results vary. More discrepancies occurred in the determination of IgG (5 samples, of which 2 had marginal end result) than in determination of IgM antibodies (4 samples). The reason for the difference in reactions with the same antigens tested by BAG Borrelia Blot or *recomLine* Borrelia assay and the reason for different final results for both IgM and IgG class antibodies may be in a variety of sources for antigens, different sensitivity of positive reactions different scoring for BAG Borrelia Blot or *recomLine* Borrelia assay or subjectivity of the optical evaluation of the assay.

## SEZNAM OKRAJŠAV

**ACA** - acrodermatitis chronica atrophicans

***B. afzelii*** – *Borrelia afzelii*

***B. burgdorferi sensu lato*** – *Borrelia burgdorferi sensu lato*

***B. burgdorferi sensu stricto*** - *Borrelia burgdorferi sensu stricto*

***B. garinii*** – *Borrelia garinii*

***B. spielmani*** - *Borrelia spielmani*

**BmpA** - *Borrelia* membrane protein A

**CDC** - ang. Center for Disease Control

**DGHM** - nem. Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie; ang. German Society for Hygiene and Microbiology

***E. coli*** - *Escherichia coli*

**ELISA** - ang. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; encimsko imunski test

**EUCALB** - ang. European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis

**IFT** - imunofluorescenčni test

**IgG** - imunoglobulin razreda G

**IgM** - imunoglobulin razreda M

***I. pacificus*** - *Ixodes pacificus*

***I. persulcatus*** - *Ixodes persulcatus*

***I. ricinus*** - *Ixodes ricinus*

***I. scapularis*** - *Ixodes scapularis*

**MIT** - metilizotiazolinon (konzervans)

**Osp** - ang. outer surface protein; zunanja površinska beljakovina

**PCR** - ang. polymerase chain reaction; verižna reakcija s polimerazo

**TMB** - tetrametilbenzidin

**VlsE** - ang. variable major protein-like sequence

## 1. UVOD

### 1.1. SPLOŠNO

Pri nas najpogostejša bolezen, katere povzročitelje prenašajo klopi, je lymska borelioza, ki predstavlja skupno ime za veliko različnih bolezenskih stanj. Pri človeku jo povzročajo spirohete iz rodu borelij. V Sloveniji jo uvrščamo med bolezni, ki jih je potrebno prijaviti (1-3).

Izraz *Borrelia burgdorferi* sensu lato, v nadaljevanju *B. burgdorferi* sensu lato (sensu lato - v širokem pomenu), predstavlja kompleks različnih borelij, ki niso opredeljene do vrste. Njeni najpogostejši prenašalci so trdi, ščitasti klopi *Ixodes* spp. Borelije lahko opredelimo le z zapletenimi molekularnimi metodami, nekatere iz kompleksa pa povzročajo lymsko boreliozo (1-3).

Borelije pripadajo rodu *Borrelia*, družini *Spirochaetaceae* in redu *Spirochaetales* (4-6). Vrsto bakterije, ki povzroča lymsko boreliozo, je leta 1982 odkril Willy Burgdorfer, leta 1984 pa jo je Johnson umestil v rod *Borrelia* in poimenoval *Borrelia burgdorferi*, ki jo danes imenujemo *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (2, 4-5).

Bolezen *lymska borelioza* je poimenovana po ameriški pokrajini Lyme, ki leži v državi Connecticut v ZDA (4).

### 1.2. BORELIJE

#### 1.2.1. ZNAČILNOSTI BORELIJ

Borelije so zelo gibljive spirohete dolge 5 do 30  $\mu\text{m}$  s premerom 0,2 do 0,3  $\mu\text{m}$  (1, 4, 7).

Posamezne borelije imajo 7 do 11 bičkov, ki se nahajajo v periplazemskem prostoru in jim dajejo značilno obliko in gibljivost. Borelije se premikajo s svedrastim zavijanjem, se obračajo ali na mestu upogibajo (1, 7-8).

Borelije uvrščamo med Gram negativne bakterije, vendar jih kljub temu najlažje opazujemo z mikroskopiranjem v temnem polju (1, 4, 7).

Zunanja membrana borelij, za razliko od ostalih Gram negativnih bakterij, vsebuje več zunanjih površinskih beljakovin in manj lipopolisaharidov (1, 7-8).

Beljakovine, ki so prisotne na zunanji membrani borelij, vzdržujejo strukturo membrane, sodelujejo pri encimskih reakcijah in pri transportu skozi membrano (7-8).

### 1.2.2. BORELIJSKI GENOM

Borelijski kromosom je velik le približno 1 Mb in je eden najmanjših kromosomov, redkost pa je tudi linearna oblika. Velik del borelijskega genoma predstavljajo linearni in krožni plazmidi, na katerih najdemo zapise za veliko borelijskih antigenov (8-9).

Genom *B. burgdorferi* sensu lato ima 21 plazmidov. Borelijsko vrsto lahko določimo na osnovi značilnosti genoma (9).

### 1.2.3. ANTIGENI

Na mnogih zunanjih površinskih beljakovinah, ki jih angleško imenujemo outer surface protein (kratica: Osp), se nahajajo antigeni, ki pri okuženih osebah sprožijo nastanek specifičnih protiteles (1,8).

Delimo jih na OspA, OspB, OspC (ti predstavljajo poglavitne borelijske antigene), OspD, OspE in OspF (10, 11). OspA in OspB sta potrebna za vzdrževanje oziroma preživetje spirohet v klopovem okolju. OspC je imunogen v zgodnji fazi okužbe in izzove odziv protiteles, zato je veljal tudi kot potencialni kandidat za izdelavo cepiva. Produkcija OspA in OspB je v nenahranjenem klop visoka, OspC pa skoraj nezaznavna. V 36 h – 48 h po hranjenju pa je ravno obratno. OspC je virulenčni faktor, ki je nujen za infekcijo (10, 12-13).

Nastanka specifičnih protiteles pa ne izzovejo le antigeni na zunanjih površinskih beljakovinah, temveč tudi antigen flagelin, ki je osnovna beljakovina bičkov. Gre za zelo močan antigen, ki ponavadi sproži nastajanje prvih protiteles po okužbi. Borelijski bički imajo podobno strukturo kot bički nekaterih drugih bakterij, ki se tudi gibljejo z bički. Take bakterije so npr. treponeme, enterobakterije in bacili. To moramo upoštevati pri serološkem testiranju, saj je lahko ta značilnost vzrok za navzkrižno reaktivnost (8, 12-15).

Poleg Osp in flagelina so pomembni tudi antigeni beljakovin p83/100, p39, p18, VlsE, antigeni stresnih beljakovin in drugi (1, 11). VlsE spreminja antigene na površini, s čimer se izogne prepoznavanju in uničenju s strani gostiteljevega imunskega sistema. Borelija

lahko na ta način dolgo časa obstane v gostitelju in povzroči kronično okužbo (8, 10, 12-13).

Več kot 60 bakterij izraža podobne antigene stresnih beljakovin kot borelije; to poveča verjetnost navzkrižnih reakcij pri seroloških testih (8, 11-12).

#### 1.2.4. RAZŠIRJENOST BORELIJ V SLOVENIJI

V Sloveniji naj bi bilo z *B. burgdorferi* okuženih do 41% klopov. Okuženi klopi so večinoma že odrasli, redkeje so na nivoju nimfe. Najpogostejši borelijski vrsti, ki sta prisotni v okuženih klopih, sta *B. afzelii* in *B. garinii* (1, 3, 16).

Najpomembnejši gostitelji borelij so mali sesalci, sledijo jim ptice. Izmed prvih jih je v Sloveniji okuženih približno 60 % (pretežno z *B. afzelii*), okuženih pa naj bi bilo tudi do 39 % ptic (pretežno z *B. garinii*) (1, 3, 16).

Glede na raziskave lymsko boreliozo pri nas najpogosteje povzroči *B. afzelii* (do 80 %), sledi *B. garinii* (do 20 %). Redkeje sta prisotni *B. burgdorferi* sensu stricto (manj kot 5 %) in *B. spielmani* (manj kot 1 %) (1).

*B. afzelii* je povezana predvsem s pojavom kožnih sprememb, *B. burgdorferi* sensu stricto je povezana s pojavom erythema migrans in artritisa, *B. garinii* najpogosteje povzroča okužbe osrednjega živčevja, *B. spielmani* pa je prisotna pri kožni spremembi erythema migrans (1-2, 17).

V ZDA iz kliničnih vzorcev izolirajo le *B. burgdorferi* sensu stricto, ki je povezana s pojavom artritisa. V Evropi so bolniki z artritismom redki (1-2, 17).

#### 1.3. GOSTITELJI PRENAŠALCEV BOLEZNI

Lymska boreliozo je zoonoza, saj se z živali prenaša na človeka (1, 16, 18). Gostitelji *B. burgdorferi* sensu lato so različne divje in domače živali ter ptice, niso pa vsi gostitelji ustrezni gostitelji (8, 19). Neustrezni gostitelji boreliji preprečijo razmnoževanje in bakterija zato propade (1, 16, 19).

Virulenca posamezne borelijske vrste je odvisna predvsem od tega, katero površinsko beljakovino izraža. Če izraža beljakovino, ki se veže na inhibitorne proteine gostiteljevega komplementa, potem bo v gostitelju preživela dlje časa (lahko tedne, mesece ali celo leta)

(1, 19). Takšni gostitelji so kompetentni gostitelji: sposobni so vzdrževanja borelij in jim omogočajo ponoven prenos na klope (1, 8, 19).

Najpomembnejši prenašalci *B. burgdorferi* sensu lato so trdi, ščitasti klopi *Ixodes* spp. *I. ricinus* je razširjen po Evropi, Aziji in Severni Afriki, *I. persulcatus* je razširjen po Evropi in Aziji, *I. pacificus* po Severni Ameriki in zahodni obali Amerike, *I. scapularis* pa po Severni Ameriki in vzhodni obali Amerike (1, 16).

### 1.3.1. ŽIVLJENSKI KROG IN ZNAČILNOSTI KLOPOV

Življenski cikel klopa *Ixodes ricinus* traja 2-6 let, v povprečju 3 leta (20).

Larva najpogosteje spleza na miš ali voluharja in vanj zarije svoja "usta". Po približno 3-dnevnem hranjenju se njihova teža poveča za 10-20 krat. Nimfe, ki so velike 1,5-2 mm, imajo za gostitelja najraje ptice ali veverice, odrasli klopi, pa iščejo večje živali, kot so srne in jeleni. Larve in nimfe se zadržujejo bolj pri tleh in zato napadajo manjše gostitelje, odrasli klopi pa splezajo višje po rastlinju (20).

*I. ricinus*, ki ga v Sloveniji imenujemo navadni oziroma gozdni klop, za svoje preživetje potrebuje relativno visoko vlažnost, vsaj 80 % (16). Zadržujejo se na območjih, kjer je veliko padavin in kjer tla zadržijo veliko vlage ter se ne izsušijo čez dan (21). Najraje se nahaja v mešanem gozdu, kjer je veliko podrasti (16). Zadržuje se tudi na travnikih, pašnikih, mestnih parkih in iglastih gozdovih (21). Preživi temperature -10 do 30°C (16).

Gozdni klop ima v svojem življenjskem ciklu 4 različne faze (21). Iz jajčec se izležejo larve, se preobrazijo v nimfe, te pa v odraslo žival. Med vsakim ciklom se klop hrani na gostitelju 3-5 dni in nato odpade. Odrasla samica izleže jajčeca v zemljo. Za larve in nimfe je značilno, da gostujejo na plazilcih, malih sesalcih in ptičih, odrasli klopi pa sesajo kri srnjadi, govedi, psa in prašiča. Človek je le naključni gostitelj (16).

Samice so večje od samcev. Nimfe in odrasli klopi imajo 4 pare nog, larve pa 3 (21).

Klopi sesajo kri pri temperaturah 23-27°C, pri nas torej spomladi, zgodaj poleti in zgodaj jeseni (16). Najaktivnejši so predvsem v maju in juniju, pojav kožnih sprememb (erythema migrans) pa ima vrh v juliju (18).

Dosedanje študije dokazujejo, da okuženost kloпов narašča z njihovo razvitostjo. Najredkeje naj bi bile okužene larve, sledijo nimfe, najpogosteje pa odrasle samice (16).



Na hrbtu imajo ščit iz histina, ki jih varuje pred poškodbami in izsušitvijo (21).

Klopi se ponavadi pariyo na gostitelju, pri iskanju primerne partnerja pa jim pomagajo feromoni. Parjenje traja približno en teden, potem pa samica zapusti gostitelja in začne iskati primerno mesto za izleg jajčec. Tam ostane 4-8 tednov in izleže do 2000 jajčec, nakar pogine, larve pa se iz jajčec izležejo čez približno 8 tednov (21).

*I. ricinus* pleza po grmovjih ter travnatih bilkah in tako na gostitelja čaka iz zasede. Namesto oči ima tako imenovani Hallerjev senzorični organ, s katerim zaznava okoljske spremembe kot so sprememba vlažnosti, temperature, ogljikovega dioksida in vibracij, ki nakazujejo prihod potencialnega gostitelja (21).

Klopi prezimijo na tleh. Snežna odeja preprečuje, da bi se temperatura tal spustila pod 0°C (21).

Spirohete, ki se zadržujejo v črevesju klopa, se med hranjenjem klopa namnožijo in prebijejo črevesno steno. Z vstopom v hemolimfo se razporedijo v različne dele klopa, tudi v slinavke. Klop jih skupaj s presežkom izsesane krvi izloči v rano. To dejstvo delno pojasnjuje, zakaj je potreben določen čas prisesanosti klopa, da se okužba sploh prenese (18, 20-21).

### 1.3.2. PRENOS POVZROČITELJA

Klop *Ixodes* spp. v svojem življenjskem krogu zamenja veliko različnih gostiteljev. S krvjo se hrani trikrat, torej v vsaki razvojni stopnji. Okuženost živali, ki predstavljajo potencialnega gostitelja, je precejšnja, zato je tudi možnost, da se klop okuži, precejšnja (1-2).

Okuženi klopi v sebi nosijo borelije vse svoje življenje. Ob vsakem hranjenju se lahko okužijo z novo vrsto borelije in so jih sposobni prenesti na druge živalske vrste ali človeka. Odrasel klop lahko torej vsebuje mešano populacijo borelij (1-2, 8).

Borelije so se sposobne prilagajati različnim gostiteljem in ravno to je razlog, da lahko preživijo in vzdržujejo kronično okužbo kljub gostiteljevemu imunskemu odzivu (2, 8, 19).

Bakterija *B. burgdorferi* sensu lato se lahko na gostitelja prenese horizontalno ali vertikalno. Za horizontalni prenos je značilno, da klop pri hranjenju s krvjo okužene živali zaužije tudi bakterije in jih prenese na naslednjega gostitelja. Za vertikalni prenos pa je

značilen prenos bakterije iz okužene samice na jajčeca, iz katerih se razvijejo larve, limfe in nato odrasli klop. Okužena jajčeca imajo manjše možnosti za razvoj, zato je horizontalni prenos bolj uspešen (2, 18).

Prenos okužbe ne pomeni nujno tudi razvoja bolezni (2, 22).

#### 1.4. LYMSKA BORELIOZA

Pri lymski boreliozni ločimo 3 stadije bolezni. Po nekaj dnevih oz. tednih od vboda klopa, okuženega z lymsko boreliozo, nastane na istem mestu rdečina, ki se širi centralno. Po približno 10 dneh začne osrednji del bledeti, ostane pa rdeč obroč, ki ga imenujemo erythema migrans (slika 1) in je značilen za 1. stadij bolezni (2, 18).



Slika 1: Erythema migrans (prevzeto po viru 25).

Erythema migrans se lahko pojavi tudi kot homogena rdečina in ne samo kot prstan rdečine (2, 17, 23-24).

Bolniki lahko na mestu kožne spremembe čutijo bolečino ali srbečico, pojavijo pa se lahko tudi splošna utrujenost, zaspanost, glavobol, bolečine v mišicah in sklepih ter povišana telesna temperatura (18).

Bolezen preide v 2. stadij v nekaj dneh oz. tednih. Zanj je značilna prizadetost različnih organov: periferna nevropatija, radikulitis, meningitis, artralgijska in motnja srčnega ritma (2, 18).

Tretji stadij nastopi eno ali več let po začetku bolezni. Pojavijo se okvare živčnega sistema, okvare sklepov ali pa nastopi kožna sprememba acrodermatitis chronica atrophicans (2, 18). Gre za kožno manifestacijo v kronični fazi lymske borelioze. Pojavi se vnetje, ki vodi

v atrofijo oziroma stanjšanje kože. Razvije se lahko do nekaj let po okužbi (26). Okužba lahko poteka tudi asimptomatsko (27).

Klinične slike lymške borelioze glede na zgodnje in kasnejše bolezensko obdobje prikazuje Tabela I.

*Tabela I: Klinična slika lymške borelioze (povzeto po viru 17)*

	<b>Obdobje (stadij bolezn)</b>	<b>Klinični znak</b>	<b>Začetek</b>	<b>Trajanje (brez ustreznega zdravljenja)</b>
<b>Zgodnje bolezensko obdobje</b>	Lokalizirana okužba  (1. stadij)	erythema migrans  borelijski limfocitom	nekaj dni do tednov*  nekaj dni do tednov*	nekaj tednov do mesecev  nekaj tednov do več mesecev
	Diseminirana okužba  (2. stadij)	multipli erythema migrans  nevroborelioza  prizadetost srca  prizadetost sklepov	nekaj dni do tednov*  nekaj tednov do mesecev*  nekaj tednov do mesecev*  običajno več mesecev*	nekaj tednov do mesecev  več mesecev  nekaj tednov  več mesecev
<b>Kasnejše bolezensko obdobje</b>	Kronična prizadetost  (3. stadij)	Kronična prizadetost sklepov	vsaj 6 – 12 mesecev**	neomejeno
		Kronična prizadetost živčevja	vsaj 6 – 12 mesecev**	neomejeno
		Kronična prizadetost kože (acrodermatitis chronica atrophicans, ACA)	več mesecev do let*	neomejeno (trajno)

\* po okužbi

\*\* po začetku prvih bolezenskih znakov

Za lymsko boreliozo so zelo značilne kožne spremembe. Erythema migrans in borelijski limfocitom povezujemo z zgodnjo lokalizirano obliko lymske borelioze, acrodermatitis chronica atrophicans pa s kasnejšo borelijsko spremembo kože. Pri borelijskem limfocitomu gre za benigno, poliklonsko proliferacijo B limfocitov v koži ali podkožju (2, 28).

Za ljudi, ki pogosto hodijo v naravo, so vbodi klopov zelo pogost pojav. Vbod klopa pa ne pomeni nujno tudi okužbe z borelijami, saj vsi klopi niso okuženi. Okužbo z *B. burgdorferi* sensu lato in nadaljnji razvoj bolezni lahko preprečimo, tudi če je klop okužen. Pravočasno ga moramo opaziti in odstraniti iz kože. Poleg patogenih bakterij in virusov so v klopu lahko prisotni mikroorganizmi, ki niso nevarni (2, 18).

Obvezno prijavo bolnikov, ki imajo diagnosticirano lymsko boreliozo, so v Sloveniji uvedli leta 1987 z Zakonom o nalezljivih boleznih. Podatki o bolnikih so zbrani v elektronski podatkovni bazi SURVIVAL, ki jo vodi Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ) (24, 27).

Od leta 1992 do leta 2011 je bilo v Sloveniji prijavljenih 71.105 bolnikov z lymsko boreliozo. Število bolnikov je iz leta v leto naraščalo. Vzrok verjetno med drugim leži v slabšem prepoznavanju bolezni v preteklosti, kar je vodilo v kasnejšo diagnozo in prijavo lymske borelioze (24).

#### 1.4.1. DIAGNOSTIKA

Bolniki, ki imajo na koži izražen erythema migrans, ne potrebujejo dodatnih mikrobioloških preiskav, saj je erythema migrans dovolj zanesljiv znak za postavitev diagnoze. Kadar obstaja visoka verjetnost okužbe, izvajamo mikrobiološke teste, med njimi serološke teste, kjer med drugim uporabljamo tudi dvostopenjski pristop. Testa ELISA (angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) in IFT (imunofluorescenčni test) sta pogosto uporabljena serološka presejalna testa in predstavjata 1. stopnjo testiranja. Pozitivne in mejne rezultate presejalnih testov lahko potrdimo z občutljivim potrditvenim testom immunoblot oz. Westernblot, ki nam pokaže imunski odziv bolnika. Tak princip testiranja imenujemo dvostopenjsko testiranje. Rezultat seroloških testov je odvisen od stopnje bolezni, trajanja simptomov in vpliva možnih predhodnih antibiotičnih terapij (23, 29).

Dvostopenjsko testiranje bolnikov, pri katerih obstaja sum na lymsko boreliozo, priporoča več priznanih organizacij, med njimi DGHM (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie/German Society for Hygiene and Microbiology), CDC (Center for Disease Control (Atlanta, USA)) in EUCALB (European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis).

Izmed več kot 100 borelijskih antigenov se je serološka diagnostika skozi čas osredotočila predvsem na nekatere specifične borelijske antigene, ki so najbolj zanesljivi pokazatelji okužbe gostitelja (14, 30).

Z dobro izbiro rekombinantnih antigenov (kot so OspA, OspC, VlsE, p100,..) so se uspeli izogniti navzkrižnim reakcijam s protitelesi, ki so v prejšnjih testih vplivali na rezultate seroloških testov (lažno pozitiven ali negativen rezultat). Smiselnost dvostopenjskega testiranja, s katerim se pozitivne rezultate presejalnega testa potrdi s testom imuno blot, je torej zaradi smiselne izbire rekombinantnih antigenov v presejalnih testih vse manjša (14, 30).

Borelijsko okužbo najpogosteje potrdimo z dokazovanjem specifičnih protiteles. Protitelesa razreda IgM (imunoglobulini M) se pojavijo 3-6 tednov po okužbi, protitelesa razreda IgG (imunoglobulini G) pa se pojavijo kasneje, 1-3 mesece po okužbi. Specifična protitelesa določamo v krvi, likvorju in sklepni tekočini (30). Pri nekaterih bolnikih je imunski odziv zelo šibek ali pa do izdelovanja protiteles sploh ne pride, kar pa ne pomeni nujno tudi odsotnost borelijske okužbe (22).

Vse bolj se uporabljajo tudi avtomatizirani serološki testi, ki zmanjšajo vpliv človeškega faktorja oz. verjetnost človeške napake (30).

Odziv gostiteljevih protiteles na okužbo z *B. burgdorferi* sensu lato je dokaj počasen, zato ima v zgodnji fazi bolezni pozitivne serološke teste manj kot polovica bolnikov z lymsko boreliozo (23).

Zdravnik mora oceniti pomen rezultatov seroloških testov glede na klinično sliko vsakega posameznega bolnika (14, 23, 30).

## **IFT (IMUNOFLUORESCENČNI TEST)**

Pri imunofluorescenčnem testu se uporablja predhodno opredeljena kultura borelij, ki je pritrjena na objektno steklice (30). Serumske vzorce razredčimo. Po dodatku anti humanega IgM, IgG ali IgA konjugata, ki vsebuje fluorescein, lahko prisotnost protiteles proučujemo s fluorescenčno mikroskopijo. Pri dokazovanju borelijske okužbe se razredčeni vzorci za IgM oziroma IgG protitelesa smatrajo za pozitivne pri titru 256. Pri tem testu je zelo pomembna primerna usposobljenost osebe, ki izvaja mikroskopijo, saj mora subjektivno oceniti in interpretirati rezultate (14).

## **ELISA (ENCIMSKO IMUNSKI TEST)**

Antigenska mešanica, ki je sestavljena iz fragmentiranih celic ali rekombinantnih antigenov *B. burgdorferi* sensu lato, se uporablja za odkrivanje IgG, IgM in IgA protiteles. Pri nekaterih proizvajalcih kiti vsebujejo še prečiščene antigene (npr. komponente flagelina) in rekombinantne antigene (npr. P39). Pri indirektnem testu ELISA, kjer določamo prisotnost protiteles, so v vdolbinicah trdega nosilca pritrjeni znani antigeni. V vdolbinice dodamo razredčen vzorec s preiskovanimi protitelesi. Na antigen vezana primarna protitelesa nato dokazujemo z dodatkom sekundarnih z encimom označenih protiteles. Ob dodatku encimskega substrata se razvije barvna reakcija, ki ji lahko spektrofotometrično določamo intenziteto. Postopek testa je zelo podoben izvedbi imunofluorescenčnega testa. Ena od večjih pomanjkljivosti je nestandardiziranost testa, kar privede do večjih razlik med testi (14).

## **IMUNOBLOT TEST**

Imunoblot test služi predvsem kot potrditveni test presejalnih testov (ELISA, IFT). Je občutljiv in specifičen test, s katerim lahko določimo, na katere borelijske antigene se je bolnik odzval. Protitelesa se vežejo na specifične antigene; največkrat so to rekombinantni antigeni. Z izbiro antigena se lahko izognemo navzkrižnim reakcijam in zmanjšamo možnost lažno pozitivnih ali lažno negativnih rezultatov (14, 23, 29).

## **PCR ANALIZA KLINIČNIH VZORCEV**

Za diagnostiko borelijske okužbe se veliko uporablja tudi verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction, PCR). Borelijsko DNK dokazujemo v koži, krvi, likvorju ali sklepni tekočini bolnika, test pa izvedemo v 1 dnevu. Na rezultate vpliva izbira in

količina kliničnega vzorca (30). Ker je število spirohet, prisotnih v okuženih tkivih in telesnih tekočinah, razmeroma majhno, sta pravilen odvzem testnega vzorca ter natančna nadaljnja izolacija in priprava DNA iz kliničnega vzorca izjemnega pomena za točne in zanesljive PCR rezultate. Rezultati PCR testa so lahko kvalitativni (konvencionalen PCR) ali pa kvantitativni (PCR v realnem času). Kljub vsemu pa zaradi nizke občutljivosti pri testiranju krvi in likvorja PCR ni zelo pogosto uporabljena metoda za laboratorijsko diagnostiko lymške borelioze (14, 30).

## **IZOLACIJA IN KULTIVACIJA**

Najbolj zanesljiva metoda za dokazovanje borelijske okužbe je izolacija in kultivacija spirohet (14, 22, 30). Pomanjkljivost te metode pa je dolgotrajnost postopka (14, 30).

Kultivacija borelij je zahtevna. Gojišča morajo vsebovati zajčji serum, serumske albumine in želatino. Borelije rastejo počasi (podvojijo se v 7 do 20 urah), najbolje rastejo v anaerobnih pogojih pri temperaturi od 30°C do 34°C (7-8). Inkubacija kliničnega materiala je dolgotrajna; traja do 12 tednov (30). Prisotnost in rast borelij se občasno spremlja z mikroskopskim pregledom supernatanta kulture. Uporablja se mikroskopija v temnem polju ali fluorescenčna mikroskopija (14).

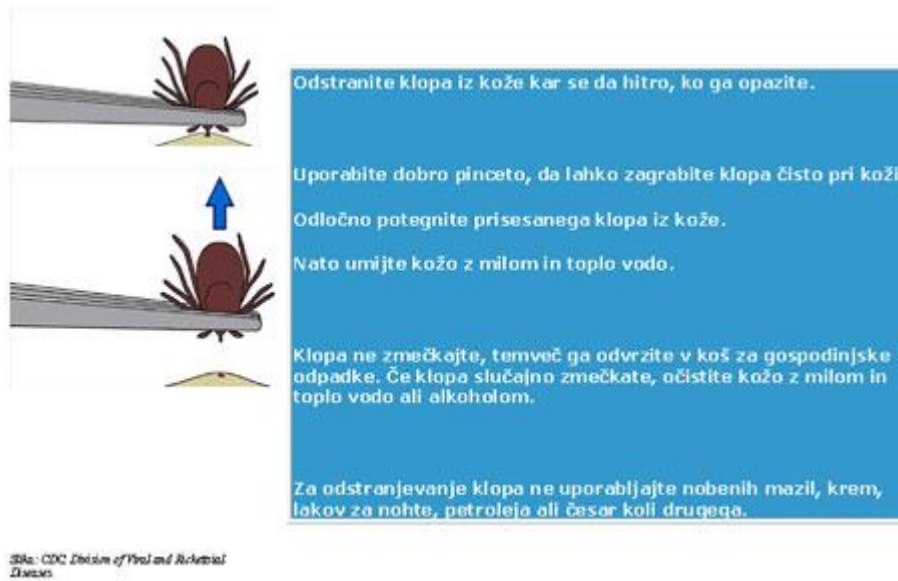
### **1.4.2. ZDRAVLJENJE**

Lymsko borelioza zdravimo z antibiotiki. Antibiotično zdravljenje je smiselno v vseh stadijih bolezni, najbolj uspešno pa je v zgodnjem obdobju (22).

### **1.4.3. PREPREČEVANJE BOLEZNI**

Klopov ugriz lahko preprečimo z uporabo sredstev proti mrčesu in tako da nosimo dolga zaščitna oblačila, ki nam pokrijejo čim več kože (21). Klopa bomo lažje opazili na svetlih oblačilih.

Ko se vrnemo s sprehoda iz gozda ali vrta, vedno pregledamo celo telo. Klopi se najraje zadržujejo na mehkih, vlažnih in poraščenih področjih (21). Vsa nošena oblačila vedno operemo. Klopovega vboda ponavadi ne čutimo, saj ima njegova slina anestezijski učinek (10). Ko klopa opazimo, ga čim prej previdno odstranimo iz kože (21). Pravilno odstranjevanje klopa s kože je prikazano na sliki 2.



Slika 2: Pravilno odstranjevanje klopa (prevzeto po viru 27)



## 2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je ugotoviti imunološki odziv bolnika z dvema različnima imunoblot testoma in med seboj primerjati rezultate teh dveh specifičnih potrditvenih testov za dokazovanje in določitev IgM in IgG protiteles proti borelijskim antigenom v krvi bolnikov. Komercialni test BAG Borrelia Blot smo želeli primerjati s komercialnim testom *recomLine* Borrelia, proizvajalca Mikrogen. Borelijski antigeni, ki so uporabljeni pri enem in drugem testu, se nekoliko razlikujejo. Želeli smo ugotoviti, če ta razlika v antigenski sestavi vpliva na rezultat testiranja.

1. Pričakujemo, da bomo lahko z BAG Borrelia Blot in *recomLine* Borrelia testom določili tako IgM kot tudi IgG protitelesa.
2. Pričakujemo, da bodo rezultati testov BAG Borrelia Blot ter *recomLine* Borrelia med seboj primerljivi.
3. Pričakujemo, da različna antigenska sestava testov ne bo vplivala na rezultat.

### 3. MATERIALI IN VZORCI

#### 3.1. VZORCI

Med shranjenimi vzorci bolnikov, ki so ob rutinskem delu že bili serološko testirani, smo naključno izbrali 50 serumov. Vsi vzorci so bili poslani v Laboratorij za diagnostiko borelioz in leptospiroze (BOR) na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani zaradi suma na borelijsko okužbo. Serume smo pred testiranjem odmrznili in ogreli na sobno temperaturo. Po opravljenem testu smo jih za nekaj dni shranili v hladilnik, če bi se slučajno izkazalo, da je treba test ponoviti. Kasneje smo jih shranili v zamrzovalnik.

#### 3.2. MATERIAL IN OPREMA

Uporabili smo dva komercialna immunoblot testa, BAG Borrelia Blot in *recomLine* Borrelia, proizvajalca Mikrogen.

##### 3.2.1. Test BAG Borrelia Blot in test *recomLine* Borrelia:

**En komplet** (IgG oziroma IgM) vsebuje:

- 2x 10 antigenih trakcev z rekombinantnimi antigeni [(p100, VlsE, p41, BmpA (p39), OspA, OspC, p41/i (iz *B. garinii*), p41/i (iz *B. afzelii*), p18)] [samo pri **testu BAG Borrelia Blot** (34)]
- dve plastični tubi (epruveti), ki vsebujeta 10 oštevilčenih testnih trakov, na katerih so nanešeni rekombinantni antigeni *B. burgdorferi* sensu lato (p100, VlsE, p58, p41, p39, OspA, OspC, p18) [samo pri **testu recomLine Borrelia** (35)]
- pufer za redčenje in spiranje (100 ml); za uporabo je potrebno 5-kratno redčenje (vsebuje detergent in konzervanse) [samo pri **testu BAG Borrelia Blot** (34)]
- pufer za redčenje (100 ml), ki je že pripravljen za uporabo (vsebuje tris pufer, NaCl, detergent, konzervans MIT (0,01%) in Oxyprion (0,1%) ter beljakovine) [samo pri **testu recomLine Borrelia** (35)]
- pufer za spiranje (100 ml); za uporabo je potrebno 10-kratno redčenje, vsebuje fosfatni pufer, NaCl, KCl, detergent ter konzervans MIT (0,1%) in Oxyprion (0,2%) [samo pri **testu recomLine Borrelia** (35)]
- šibko pozitivna humana kontrola IgG (bel pokrovček, 95 µl), vsebuje MIT (0,1 %) in Oxyprion (0,1 %) [samo pri **testu BAG Borrelia Blot** (34)]
- šibko pozitivna humana kontrola IgM (rumen pokrovček, 170 µl), vsebuje MIT (0,1 %)

in Oxypyrrion (0,1 %) [samo pri **testu BAG Borrelia Blot** (34)]

- antihumani konjugat IgG (zelen pokrovček, 500 µl), zajčji konjugat, vsebuje  $NaN_3$  (< 0,1 %) in Chloracetamide (< 0,1 %), potrebno je 100-kratno redčenje (**pri obeh testih**)
- antihumani konjugat IgM (vijoličen pokrovček, 500 µl), zajčji konjugat, vsebuje  $NaN_3$  (< 0,1 %) in Chloracetamide (< 0,1 %), potrebno je 100-kratno redčenje (**pri obeh testih**)
- substrat (raztopina Tetrametilbenzidin – TMB, 40 ml), že pripravljen za uporabo
- kontrolni trakovi (razviti s pozitivnim serumom) [pri **testu BAG Borrelia Blot** (34)]
- posneto mleko v prahu (5 g) [samo pri **testu recomLine Borrelia** (35)]
- dve inkubacijski posodi z 10 vdoblinami (**pri obeh testih**)
- navodila za uporabo (**pri obeh testih**)
- obrazec za vrednotenje testa (**pri obeh testih**)

### 3.2.2. Ostali materiali in oprema

- visoko prečiščena (deionizirana) voda
- mikro pipete (5 mL, 1000 µL, 100 µL, 10 µL)
- plastične zaščitne rokavice
- tehtnica
- stresalnik
- plastična pinceta
- merilni valj

## 4. METODE

V svojem delu sem po navodilih proizvajalca izvedla 2 testa za dokazovanje in določitev IgM in IgG protiteles proti borelijskim antigenom v krvi bolnika.

### 4.1. OPIS TESTOV BAG *Borrelia* Blot in *recomLine Borrelia*

**BAG *Borrelia* Blot** in ***RecomLine Borrelia*** sta kvalitativna immunoblot testa za določitev in identifikacijo IgM in IgG protiteles proti *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* in *B. afzelii* v človeškem serumu, plazmi ali likvorju. Poleg naštetih *recomLine Borrelia* identificira še protitelesa proti *B. spielmanii*.

Testa sta osnovana na rekombinantnih antigenih in se uporabljata za potrjevanje pozitivnih in mejnih rezultatov, ki so bili pridobljeni s presejalnimi testi.

Posamezno nanešeni antigeni na trakovih posameznega testa omogočajo identifikacijo specifičnih protiteles, prisotnih v bolnikovem serumu. Protitelesa se vežejo na specifične antigene *B. burgdorferi* sensu lato in nam kažejo imunsko sliko bolnika.

Specifični rekombinantni antigeni *B. burgdorferi* sensu lato, ki so pridobljeni s pomočjo *Escherichie coli*, so nanešeni na nitrocelulozno membrano, katero razrežejo, da dobijo tanke testne trakove.

Trakove z nanešenimi borelijskimi antigeni inkubiramo v razredčenem serumu ali plazmi, kjer se po določenem času specifična protitelesa, ki so prisotna v serumu ali plazmi, vežejo z antigeni. Protitelesa, ki se niso vezala, speremo v naslednji stopnji, nato pa testne trakove inkubiramo skupaj z anti-humanim IgG oziroma IgM konjugatom. Specifično vezana protitelesa so detektirana s pomočjo barvne reakcije, ki jo katalizira peroksidaza. Če se specifično protitelo poveže z ustreznim antigenom, se pojavi temen pas na ustrezni lokaciji na testnem traku.

### 4.2. ANTIGENI

Specifični antigeni, ki so uporabljeni pri BAG *Borrelia* Blot testu, se malo razlikujejo od specifičnih antigenov, ki so uporabljeni pri *recomLine Borrelia* testu. Antigeni obeh testov so prikazani v Tabeli II in III.

Tabela II: Specifični antigeni, uporabljeni pri BAG *Borrelia* Blot testu (34).

Antigen	Lastnosti	Vir antigena
p100	protein, molekulska masa 100 kDa	<i>B. afzelii</i>
VlsE	zunani površinski lipoprotein, fuzijski protein	različne
p41	flagelinski protein	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto
p39	membranski protein A (BmpA)	<i>B. afzelii</i>
OspA	zunani površinski protein A	<i>B. afzelii</i>
OspC	zunani površinski protein C	<i>B. garinii1</i> , <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto, <i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii2</i>
p41/i Bg	p41 drugačne strukture	<i>B. garinii</i>
p41/i Ba	p41 drugačne strukture	<i>B. afzelii</i>
p18	zunani površinski protein	<i>B. afzelii</i>

Tabela III: Specifični antigeni, uporabljeni pri recomLine *Borrelia* testu (35).

Antigen	Lastnosti	Vir antigena
p100	protein, molekulska masa 100 kDa	<i>B. afzelii</i>
VlsE	zunani površinski lipoprotein, fuzijski protein	različni
p58	ta specifični borelijski antigen ni karakteriziran	<i>B. garinii</i>
p41	flagelinski protein	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto
p39	membranski protein A (BmpA)	<i>B. afzelii</i>
OspA	zunani površinski protein A	<i>B. afzelii</i>
OspC	zunani površinski protein C	<i>B. garinii1</i> , <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto, <i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii2</i>
p18	zunani površinski protein	<i>B. afzelii</i>

#### 4.3. VRSTA PREISKOVANIH VZORCEV

Protitelesa smo določali v serumu ali plazmi bolnika. Odvzet vzorec krvi smo centrifugirali, krvne celice so sedimentirale, na vrhu pa je ostala plazma. Če plazmi odstranimo faktorje strjevanja (fibrin in ostale beljakovine,..), dobimo serum. Zelo pomembno je bilo, da smo se izogibali mikrobiološki kontaminaciji vzorcev. Preiskovane vzorce smo lahko do 14 dni hranili v hladilniku, pri temperaturi 2 – 8°C. Če smo jih želeli shraniti za dalj časa, smo jih zamrznili najmanj do -20°C. Večkratno odtajevanje in ponovno zamrzovanje vzorcev ni priporočljivo.

#### 4.4. IZVEDBA TESTOV BAG Borrelia Blot in *recomLine* Borrelia

BAG Borrelia Blot in *recomLine* Borrelia test smo izvedli na vseh 50 vzorcih. Določili smo tako IgM kot tudi IgG protitelesa. Izvedba obeh testov je podobna, razlike so opisane v nadaljevanju.

##### 4.4.1. PRIPRAVA REAGENTOV PRI TESTU BAG Borrelia Blot

Najprej smo pripravili pufer za redčenje in spiranje, ki smo ga uporabljali za redčenje vzorcev in konjugatov ter spiranje trakov v različnih fazah testa. Količino pripravljenega pufera za redčenje in spiranje smo določili glede na to, koliko testnih trakov smo uporabili.

Koncentrat pufera za redčenje in spiranje smo redčili z deionizirano vodo v razmerju 1:5. Za vsak testni trak smo potrebovali 5 ml koncentrata pufera za redčenje in spiranje ter 20 ml deionizirane vode. Pripravljenega pufera za redčenje in spiranje po uporabi nismo shranjevali, temveč smo pred testiranjem vedno pripravili svežega.

Količine reagentov, ki smo jih potrebovali za pripravo željene količine pufera za redčenje in spiranje, so odvisne od števila vzorcev oziroma testnih trakov, ki smo jih testirali, in so navedene v Tabeli IV.

Nato smo pripravili konjugate. Konjugate smo vedno pripravili tik pred uporabo, po uporabi pa jih nismo shranjevali, temveč smo jih zavrgli. Razmerje je bila 1 enota IgM ali IgG konjugata + 100 enot za uporabo pripravljenega pufera za redčenje in spiranje. Količine reagentov, ki smo jih potrebovali za pripravo željene količine IgM ali IgG konjugatov, so navedene v Tabeli V.

*Tabela IV: Količine različnih reagentov za pripravo ustrezne količine pufera za redčenje in spiranje.*

Število trakov oziroma vzorcev	Koncentrat pufera za redčenje in spiranje	Deionizirana voda	Pufer za redčenje in spiranje – pripravljen za uporabo
1	5 ml	20 ml	25 ml
2	10 ml	40 ml	50 ml

3	15 ml	60 ml	75 ml
5	25 ml	100 ml	125 ml
10	50 ml	200 ml	250 ml
15	75 ml	300 ml	375 ml
20	100 ml	400 ml	500 ml
25	125 ml	500 ml	625 ml
50	250 ml	1000 ml	1250 ml

*Tabela V: Količine reagentov za pripravo željene količine IgM ali IgG konjugata.*

<b>Število trakov oziroma vzorcev</b>	<b>IgG ali IgM koncentrat konjugata</b>	<b>Pufer za redčenje in spiranje – pripravljen za uporabo</b>
1	20 µl	2 ml
2	40 µl	4 ml
3	60 µl	6 ml
5	100 µl	10 ml
10	200 µl	20 ml
15	300 µl	30 ml
20	400 µl	40 ml
25	500 µl	50 ml

#### 4.4.2. PRIPRAVA REAGENTOV PRI TESTU *recomLine Borrelia*

Pufer za redčenje vzorcev in substrat sta bila že pripravljena za uporabo.

Najprej smo pripravili pufer za spiranje. Pufer za spiranje (uporabljali smo ga za redčenje konjugatov in spiranje trakov v različnih fazah testa) smo morali pred uporabo pripraviti. Količino pripravljenega pufera za spiranje smo določili glede na to, koliko testnih trakov smo uporabili.

Posneto mleko v prahu smo raztopili v koncentratu pufera za spiranje in dodali deionizirano vodo (razmerje je 1 enota raztopine + 9 enot deionizirane vode). Pripravljen pufer za

spiranje je bil rahlo moten in brez vonja. V hladilniku (pri temperaturi 2°C - 8°C) smo ga lahko shranjevali do 4 tedne.

Količine reagentov, ki smo jih potrebovali za pripravo željene količine pufru za spiranje, pripravljenega za uporabo, so navedene v Tabeli VI.

*Tabela VI: Količine različnih reagentov za pripravo ustrezne količine pufru za spiranje.*

<b>Število trakov oziroma vzorcev</b>	<b>Posneto mleko v prahu</b>	<b>Koncentrat pufru za spiranje</b>	<b>Deionizirana voda</b>	<b>Pufer za spiranje – pripravljen za uporabo</b>
1	0,1 g	2 ml	18 ml	20 ml
2	0,2 g	4 ml	36 ml	40 ml
3	0,3 g	6 ml	54 ml	60 ml
5	0,5 g	10 ml	90 ml	100 ml
10	1 g	20 ml	180 ml	200 ml
15	1,5 g	30 ml	270 ml	300 ml
20	2 g	40 ml	360 ml	400 ml
25	2,5 g	50 ml	450 ml	500 ml
50	5 g	100 ml	900 ml	1000 ml

Konjugate smo pripravili tik pred uporabo, po uporabi pa jih nismo shranjevali, temveč smo jih zavržli. Razmerje je bila 1 enota IgM ali IgG konjugata + 100 enot za uporabo pripravljenega pufru za spiranje. Količine reagentov, ki smo jih potrebovali za pripravo željene količine IgM ali IgG konjugatov, so navedene v Tabeli VII.

*Tabela VII: Količine reagentov za pripravo željene količine IgM ali IgG konjugata.*

<b>Število trakov oziroma vzorcev</b>	<b>IgG ali IgM koncentrat konjugata</b>	<b>Pufer za spiranje – pripravljen za uporabo</b>
1	20 µl	2 ml
2	40 µl	4 ml
3	60 µl	6 ml



5	100 µl	10 ml
10	200 µl	20 ml
15	300 µl	30 ml
20	400 µl	40 ml
25	500 µl	50 ml

#### 4.4.3. IZVEDBA TESTOV BAG *Borrelia* Blot in *recomLine Borrelia*

Vse reagente in ostale pripomočke za izvajanje testa smo vzeli iz hladilnika in jih pustili na sobni temperaturi (18 – 25°C) za vsaj 30 min pred začetkom izvedbe testa. Celoten postopek testa smo izvajali pri sobni temperaturi.

##### - Inkubacija vzorcev

V inkubacijsko posodo z vdolbinami smo v vsako vdolbino odpipetirali po 2 ml pufru za redčenje in spiranje (pri testu BAG *Borrelia* Blot) oziroma pufru za redčenje (pri testu *recomLine Borrelia*). S plastično pinceto smo položili oštevilčene trakove v vdolbinice in pazili, da so bile številke obrnjene navzgor. Trakovi so morali biti v celoti potopljeni. Vdolbine smo oštevilčili z enako številko, kot jo imajo trakovi. Oštevilčili smo tudi inkubacijsko posodo in vse skupaj zapisali na list za vrednotenje rezultatov. Dodajanje preiskovalnih vzorcev se je za IgG in IgM test razlikovalo.

**Test BAG *Borrelia* Blot:** Pri **IgG** testu smo odpipetirali **10 µl** humanega seruma ali plazme in ga dodali v vdolbino. Pri **IgM** testu pa smo odpipetirali **20 µl** humanega seruma ali plazme in ga dodali v vdolbino.

**Test *recomLine Borrelia*:** Pri **IgG** testu smo odpipetirali **20 µL** humanega seruma ali plazme in ga dodali v vdolbino. Pri **IgM** testu smo odpipetirali **40 µL** humanega seruma ali plazme in ga dodali v vdolbino.

Pri pipetiranju smo pazili, da je bil konec pipete potopljen v pufer za redčenje in da smo vzorec dodajali le na enem koncu. Posodo smo nato previdno stresali, da se je vzorec porazdelil po celotni vdolbini. Na list za vrednotenje rezultatov smo zapisali številko preiskovanih vzorcev in imunoglobulinski razred (IgG ali IgM).

Inkubacijsko posodo smo pokrili s prozornim plastičnim pokrovom in na stresalniku z

rahlím stresanjem inkubirali čez noč oziroma **najmanj 10 ur** (pri testu **BAG Borrelia Blot**) oziroma **1 uro** (pri testu *recomLine Borrelia*).

#### **- Spiranje**

Pokrov smo odstranili s posode in s pipeto previdno posrkali razredčine serumov iz vdolbin. Pri tem smo pazili, da se razredčine med seboj niso prelivale. V vsako vdolbino smo dodali 2 ml pripravljene pufr za redčenje in spiranje (pri testu BAG Borrelia Blot) oziroma 2 ml pripravljene pufr za spiranje (pri testu *recomLine Borrelia*) in 5 min rahlo stresali na stresalniku. Po 5 minutah smo pufer za spiranje posrkali s pipeto in ga zavrgli. Postopek spiranja smo pri testu BAG Borrelia Blot ponovili 4x, pri testu *recomLine Borrelia* pa 3x. Pri tem koraku smo iz vdolbinic odstranili vsa protitelesa, ki se niso vezala na borelijske antigene, nanešene na testne trakove.

#### **- Inkubiranje s konjugatom peroksidazo**

V vsako vdolbino smo dodali 2 ml pripravljene IgM ali IgG konjugata in na stresalniku z rahlím stresanjem inkubirali 1 uro (pri testu BAG Borrelia Blot) oziroma 45 minut (pri testu *recomLine Borrelia*).

#### **- Spiranje**

Spiranje je potekalo enako kot prej.

#### **- Dodajanje substrata**

V vsako vdolbino smo dodali 1,5 ml substrata in na stresalniku z rahlím stresanjem inkubirali **3 – 5 min** (pri testu **BAG Borrelia Blot**) oziroma **8 minut (+/- 2 minuti)** (pri testu *recomLine Borrelia*).

Proces obarvanja smo pri testu **BAG Borrelia Blot** lahko zaključili, ko so se na obeh trakovih, ki so bili inkubirani s šibko pozitivno IgG in IgM serumsko kontrolo, obarvali naslednji pasovi:

pri **IgG**: p100, VlsE, p41, p18, p4/i Bg in p41/i Ba

pri **IgM**: p41, OspC in p41/i Bg in p41/i Ba

Proces obarvanja smo pri testu **recomLine Borrelia** lahko zaključili, ko se je rahlo obarval

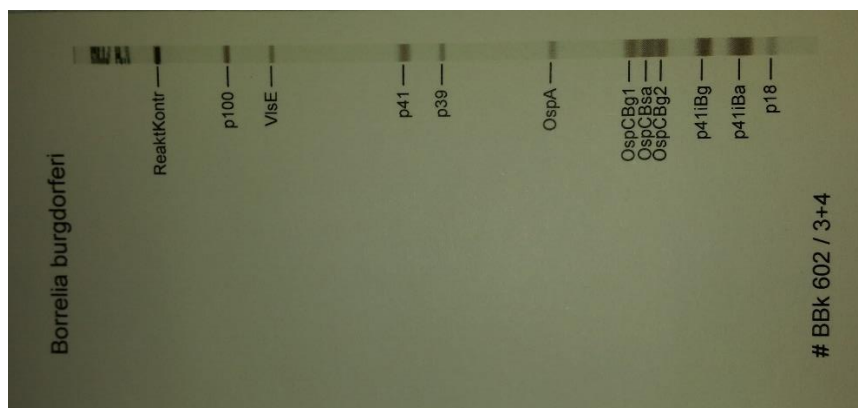
četrti pas, ki je služil kot kontrola procesa obarvanja.

S pipeto smo previdno posrkali substrat in trakove trikrat sprali z deionizirano vodo. S plastično pinceto smo previdno izvlekli trakove in jih položili na papirnate brisače, da so se osušili. Po dveh urah smo lahko analizirali rezultate.

### Vrednotenje rezultatov pri testu BAG *Borrelia* Blot

Na list za vrednotenje rezultatov smo pod zaporedne številke testnih vzorcev in šibko pozitivne kontrole zapisali protokolno in zaporedno številko bolnika. Zapisali smo tudi serijsko številko uporabljenega kompleta, datum veljavnosti, datum izvedbe testa in inkubacijske čase. V polja poleg identifikacijskih številk vzorcev smo prilepili ustrezne trakove.

Mesta na trakovih, kjer so se nahajali antigeni, so se morala skladati s priloženim ocenjevalnim lističem, ki je bil specifičen za določen komplet. Test smo ocenjevali vizualno. Intenziteto pasov smo ovrednotili v primerjavi z intenziteto šibko pozitivne kontrole. Ocenjevalni listič z antigeni prikazuje slika 3.



Slika 3: Kontrolni trak, priložen testu BAG *Borrelia* Blot, na katerem so posamezni pasovi za vrednotenje reakcije.

Pri šibko pozitivni kontroli IgG so morali biti vidni vsi naslednji antigeni pasovi: kontrola reakcije, p100, VlsE, p41, p18, p41/i *Bg* in p41/i *Ba*. Intenziteta teh pasov je služila kot mejna vrednost. Če so se ti antigeni pasovi pri testiranih serumih obarvali močnejše, je bila reakcija pozitivna, če pa so se obarvali šibkeje, je bila reakcija negativna. Vsi ostali antigeni pasovi (p39, OspA in OspC) so se vrednotili glede na pas p100 šibko pozitivne IgG kontrole.

Pri šibko pozitivni kontroli IgM so morali biti vidni vsi naslednji antigenski pasovi: kontrola reakcije, p41, OspC, p41/i *Bg* in p41/i *Ba*. Intenziteta teh pasov je služila kot mejna vrednost. Če so se ti antigenski pasovi pri testiranih serumih obarvali močneje, je bila reakcija pozitivna, če pa so se obarvali šibkeje, je bila reakcija negativna. Vsi ostali antigenski pasovi (p100, VlsE, p39, OspA in p18) so se vrednotili glede na sredinski pas OspC šibko pozitivne IgM kontrole.

Glede na intenzivnost obarvanega antigenkega pasu smo vizualno določili končni rezultat (Tabela VIII). Če je bilo obarvanje pasu močno vidno (obarvanje enako ali močnejše kot pri "cut off" kontroli), smo reakcijo označili kot pozitivno. Pozitiven rezultat pasu smo ne glede na to, ali smo ga ovrednotili z enim ali z dvema plusoma, v nadaljevanju točkovali samo enkrat. Pri OspC antigenu, kjer imamo 3 podvrste, smo pozitiven rezultat točkovali samo enkrat, tudi če so bile vse tri podvrste pozitivne.

Če je bilo obarvanje pasu optično vidno, vendar šibkejše od cut off kontrole, smo reakcijo označili kot negativno. Če se pas ni obarval, smo reakcijo prav tako označili negativno.

*Tabela VIII: Intenzivnost obarvanja posameznega antigenkega pasu smo ocenjevali v primerjavi s kontrolo procesa obarvanja.*

<b>Obarvanje pasu</b>	<b>Intenzivnost / vizualno določen rezultat</b>
Ni reakcije	- / negativno
Intenzivnost obarvanja je šibkejša kot pri kontroli	± / negativno
Intenzivnost obarvanja je enaka kontroli	+ / pozitivno
Intenzivnost obarvanja je močnejša kot pri kontroli	++ / pozitivno

### **Vrednotenje rezultatov pri testu recomLine Borrelia**

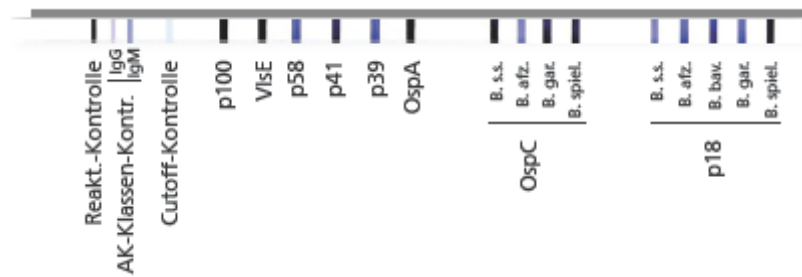
Na list za vrednotenje rezultatov, ki je priložen kompletu, smo zapisali datum in številko epruvete iz katere smo vzeli trakove. V polje poleg identifikacijske številke vzorca smo prilepili ustrezen trak.

Na traku, ki je priložen testu, so na zgornjem koncu štirje kontrolni pasovi (slika 4): Prvi pas, ki je tik pod številko testnega traku, kontrolira, če je reakcija potekla. Drugi in tretji pas sta kontrolna pasova za konjugata IgM in IgG. Četrty pas je "cutoff" kontrola, ki

služi kot kontrola procesa obarvanja. Intenziteta tega pasu predstavlja osnovo za vrednotenje prisotnosti protiteles v bolnikovem vzorcu.

Na trakovih, ki smo jih inkubirali z bolnikovim serumom, sta morala biti obarvana kontrolni pas reakcije ter pas za IgM oziroma IgG kontrolo, odvisno od tega kaj smo dokazovali. Ostale pasove smo ovrednotili glede na cut off kontrolni pas.

Testni trak prikazuje slika 4.



Slika 4: Kontrolni trak, priložen testu recomLine Borrelia, na katerem so posamezni pasovi za vrednotenje reakcije.

Rezultate smo lahko ovrednotili samo, če so bili prvi štirje pasovi pravilno obarvani. Prvi, kontrolni pas, je moral biti močno temno obarvan. Drugi (IgG) ali tretji (IgM) pas sta se jasno obarvala, četrti pas, cut off, pa se je obarval šibko, vendar še vseeno jasno vidno.

Intenzivnost obarvanja antigenских pasov na testnih trakovih smo primerjali s četrtim pasom, cut off kontrolo na posameznem testnem traku, in glede na intenzivnost obarvanja vizualno določili rezultat (Tabela IX).

Tabela IX: Intenzivnost obarvanja posameznih pasov v primerjavi s cut off kontrolo.

Obarvanje pasu	Intenzivnost / vizualno določen rezultat
Ni reakcije	- / negativno
Intenzivnost obarvanja je šibkejša kot pri kontroli	± / negativno
Intenzivnost obarvanja je enaka kontroli	+ / pozitivno
Intenzivnost obarvanja je močnejša kot pri kontroli	++ / pozitivno
Intenzivnost je zelo močna	+++ / pozitivno

Če je bilo obarvanje pasu močno vidno (obarvanje enako ali močnejše kot pri cut off kontroli), smo reakcijo označili kot pozitivno. Pozitiven rezultat pasu smo ne glede na to, ali smo ga ovrednotili z enim, dvema ali tremi plusi, v nadaljevanju točkovali samo enkrat. Če je bilo obarvanje pasu optično vidno, vendar šibkejše od cut off kontrole, smo reakcijo označili kot negativno. Če se pas ni obarval, smo reakcijo prav tako označili kot negativno.

#### Točkovanje testa BAG Borrelia Blot:

Glede na navodila proizvajalca je vsak posamezen antigenski pas opredeljen z določeno točkovno vrednostjo, ki se razlikuje glede na določanje IgM ali IgG protiteles. Točkovali smo le pasove, kjer je bila reakcija pozitivna in ki smo jih označili z enim ali dvema plusoma. Ne glede na število plusov smo pozitiven pas točkovali samo enkrat. Pri OspC antigenu, kjer imamo 3 podvrste, smo pozitiven rezultat točkovali samo enkrat, tudi če so bile vse tri podvrste pozitivne. Pasovi, ki so se obarvali šibkeje od cut off kontrole, in pasovi, ki se niso obarvali, niso dobili nobene točke.

Točkovne vrednosti posameznih antigenov so navedene v Tabeli X.

*Tabela X: Točkovanje pozitivnega rezultata B. burgdorferi antigenov v testu BAG Borrelia Blot.*

Antigen	Točkovanje IgG	Točkovanje IgM
p100	8	4
VlsE	4	3
p41	1	1
p39	8	3
OspA	4	4
OspC	6	8
p41/i Bg	1	3
p41/i Ba	1	1
p18	8	4

Za vsak posamezen vzorec smo glede na število obarvanih pasov sešteli število točk in ovrednotili posamezen razred IgM oziroma IgG protiteles, kot prikazuje Tabela XI.

Tabela XI: Ovrednotenje testa.

Seštevek točk	IgG	IgM
≤ 4	negativno	negativno
5 - 6	mejno	mejno
≥ 7	pozitivno	pozitivno

Reakcija protiteles z OspC antigeni je značilna za zgoden imunski odziv (IgM). Pri bolnikih s poznimi stadiji infekcije pa je značilna reakcija protiteles IgG s p100, VlsE, p58, p39 in p18 antigeni. Protitelesa proti OspA antigenu najdemo zelo redko.

#### Točkovanje testa *recomLine Borrelia*:

Vsak posamezen antigenski pas je opredeljen z določeno točkovno vrednostjo, ki se razlikuje glede na določanje IgM ali IgG protiteles. Točkuje se le pasove, kjer je bila reakcija pozitivna in ki smo jih označili z enim, dvema ali tremi plusi. Ne glede na število plusov se pozitiven pas točkuje samo enkrat. Pasovi, ki se obarvajo šibkeje od'cut off kontrole, in pasovi, ki se ne obarvajo, ne dobijo nobene točke.

Točkovne vrednosti posameznih antigenov so navedene v Tabeli XII.

Tabela XII: Točkovanje posameznega antigenkega pasu glede na določanje IgM ali IgG protiteles pri testu *recomLine Borrelia*.

Antigen	Točkovanje IgG	Točkovanje IgM
p100	5	5
VlsE	5	5
p58	4	4
p41	1	1
p39	5	4
OspA	5	5
OspC	5	8
p18	5	5

Za vsak posamezen vzorec smo glede na število obarvanih pasov in s tem prisotnosti specifičnih protiteles sešteli število točk (Tabela XII) in ovrednotili rezultat razreda IgM oziroma IgG protiteles (Tabela XIII).

Tabela XIII: Ovrednotenje imunoblot testa za rezred IgM ali IgG protiteles.

Števek točk	IgG	IgM
≤ 5	negativno	negativno
6	mejno	mejno
≥ 7	pozitivno	pozitivno

Reakcija protiteles z OspC antigeni je značilna za zgoden imunski odziv (IgM). Pri bolnikih s poznimi stadiji infekcije, pa je značilna reakcija protiteles IgG s p100, VlsE, p58, p39 in p18 antigeni. Protitelesa proti OspA antigenu najdemo zelo redko.

#### 4.5 INTERPRETACIJA REZULTATOV TESTOV BAG BORRELIA BLOT IN RECOMLINE BORRELIA

Interpretacija rezultatov je pri obeh uporabljenih imunoblot testih za določitev in identifikacijo IgM in IgG protiteles proti borelijskim antigenom v krvi bolnika podobna.

Pri negativnem rezultatu **BAG Borrelia Blot** ali **recomLine Borrelia** testa ne smemo popolnoma izključiti možnosti okužbe z *B. burgdorferi* sensu lato. V zgodnjih fazah infekcije je možno, da protitelesa še niso izražena ali pa niso izražena v količini, zadostni za detekcijo. Tudi zdravljenje z antibiotiki v zgodnji fazi lahko zavira nastajanje protiteles, kar vpliva na rezultat. Če glede na klinično sliko obstaja sum na lymsko boreliozo in so testi negativni ali pa pokažejo mejno vrednost, je priporočeno ponovno testiranje čez 3 tedne.

Pozitiven rezultat pri **BAG Borrelia Blot** ali **recomLine Borrelia IgG** testu ne pomeni nujno trenutne bolezni, ampak lahko pomeni detekcijo protiteles, ki so nastala pri pretekli infekciji z *B. burgdorferi* sensu lato, saj IgG protitelesa v telesu ostanejo dolgo časa.

Kjer je pri rezultatih dveh testov prišlo do neujemanja, smo oba testa ponovili. Če je pri ponovnem testiranju pri določenem testu prišlo do drugačnega rezultata kot prvič, smo testiranje opravili še tretjič. Upoštevali smo tisti rezultat, ki se je ponovil 2x, nasproten rezultat pa smatrali kot napako.



## 5. REZULTATI

50 serumov naključno izbranih bolnikov, katerih vzorci so bili zaradi suma na okužbo z borelijo poslani na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, smo testirali z BAG *Borrelia* Blot in *recomLine Borrelia* testom. Pri preiskovanih vzorcih smo z imunoblot metodo dokazovali prisotnost IgM in IgG protiteles ter določali vrsto borelijskih antigenov, proti katerim se je razvil imunski odziv.

### 5.1 Rezultati testiranja s testoma BAG *Borrelia* Blot in *recomLine Borrelia*

Rezultate testiranj s testom **BAG *Borrelia* Blot** prikazuje Tabela XIV, rezultate testiranj s testom ***recomLine Borrelia*** pa Tabela XV.

*Tabela XIV: Prisotnost specifičnih protiteles razreda IgM in IgG pri bolnikih s sumom na Lymsko boreliozo, določenih pri izvedbi BAG *Borrelia* Blot testa.*

	IgM	IgG
<b>pozitivni</b>	<b>16 (32 %)</b>	<b>20 (40 %)</b>
<b>mejni</b>	/	<b>3 (6 %)</b>
<b>negativni</b>	<b>34 (68 %)</b>	<b>27 (54 %)</b>
<b>skupaj</b>	<b>50 (100 %)</b>	<b>50 (100 %)</b>

Preiskava je pokazala, da je imelo 16/50 vzorcev (32 %) pozitivna **IgM** protitelesa, pozitivna **IgG** protitelesa pa smo dokazali pri 20/50 (40 %) vzorcih.

*Tabela XV: Prisotnost specifičnih protiteles razreda IgM in IgG pri bolnikih s sumom na Lymsko boreliozo, določenih pri izvedbi *recomLine Borrelia* testa.*

	IgM	IgG
<b>pozitivni</b>	<b>12 (24 %)</b>	<b>18 (36 %)</b>
<b>mejni</b>	/	<b>2 (4 %)</b>
<b>negativni</b>	<b>38 (76 %)</b>	<b>30 (60 %)</b>
<b>skupaj</b>	<b>50 (100 %)</b>	<b>50 (100 %)</b>

Preiskava je pokazala, da je imelo 12/50 vzorcev (24 %) pozitivna **IgM** protitelesa, pozitivna **IgG** protitelesa pa smo dokazali pri 18/50 (36 %) vzorcih.

## 5.2 Primerjava rezultatov med testoma BAG Borrelia Blot in recomLine Borrelia

Rezultate, ki kažejo prisotnost posameznega razreda imunoglobulinov, smo primerjali med obema testoma. Rezultate prikazujeta Tabeli XVI in Tabela XVII.

*Tabela XVI: Primerjava rezultatov testiranja IgM protiteles pri recomLine Borrelia in BAG Borrelia Blot testu.*

recomLine Borrelia IgM, št. ( % )						
BAG Borrelia Blot IgM		Pozitivni	Mejni	Negativni	Skupaj	p
	Pozitivni	12 (24 %)	/	4 (8 %)	16 (32 %)	
	Mejni	/	/	/	/	
	Negativni	/	/	34 (68 %)	34 (68 %)	
	Skupaj	12 (24 %)	/	38 (76 %)	50 (100 %)	p > 0,05

Pri določanju IgM protiteles, med testoma nismo ugotovili statistično značilne razlike, saj je  $p > 0,05$ .

Iz Tabele XVI je razvidno, da je ujemanje rezultatov dveh testov 92 % (12 pozitivnih oziroma 24 % in 34 negativnih oziroma 68 %).

*Tabela XVII: Primerjava rezultatov testiranj IgG protiteles pri recomLine Borrelia in BAG Borrelia Blot testu.*

recomLine Borrelia IgG, št. ( % )						
BAG Borrelia Blot IgG		Pozitivni	Mejni	Negativni	Skupaj	p
	Pozitivni	17 (34 %)	1 (2 %)	2 (4 %)	20 (40 %)	
	Mejni	1 (2 %)	1 (2 %)	1 (2 %)	3 (6 %)	
	Negativni	/	/	27 (54 %)	27 (54 %)	
	Skupaj	18 (36 %)	2 (4 %)	30 (60 %)	50 (100 %)	p > 0,05

Tudi pri določanju IgG protiteles med testoma nismo ugotovili statistično značilne razlike, saj je  $p > 0,05$ .

Iz Tabele XVII je razvidno, da je ujemanje rezultatov dveh testov 90 % [17 pozitivnih (34 %), 1 mejni (2 %) in 27 negativnih (54 %)].

### 5.3 Analiza imunskega odziva bolnikov, testiranih s testoma BAG Borrelia Blot in recomLine Borrelia

Analizirali smo rezultate serološkega testiranja skupine 50 bolnikov s sumom na borelijsko okužbo. Pri omenjenih bolnikih smo ugotavljali hkratno prisotnost oziroma odsotnost protiteles razreda IgM in IgG z enim in drugim testom. Bolnikov, pri katerih smo z enim in drugim testom ugotovili hkratno prisotnost oziroma odsotnost protiteles razreda IgM in IgG, je bilo 30, medtem ko je 20 bolnikov imelo različno kombinacijo prisotnosti ali odsotnosti protiteles IgM in/ali IgG. Zaradi lažje analize smo rezultate serološkega testiranja prikazali posebej.

V Tabeli XVIII A so navedeni bolniki, ki so bili IgM in IgG bodisi pozitivni ali negativni z obema testoma, medtem ko so v tabeli XVIII B in XVIII C vključeni bolniki, ki so bili vsaj z enim testom bodisi IgM ali IgG pozitivni.

Skupno 27/50 (54 %) bolnikov s sumom na borelijsko okužbo je imelo potrjen imunski odziv z vsaj enim od dveh testov pri vsaj enem od dveh imunoglobulinskih razredov (IgM ali IgG).

*Tabela XVIII: Imunski odziv pri bolnikih s sumom na borelijsko okužbo (skupaj 50 bolnikov), ki smo ga določali s testoma recomLine in BAG Borrelia Blot. A: Bolniki pri katerih smo ugotovili hkratno prisotnost oziroma odsotnost protiteles IgM in IgG; B: Bolniki z različno kombinacijo prisotnosti oziroma odsotnosti protiteles IgM; C: Bolniki z različno kombinacijo prisotnosti oziroma odsotnosti protiteles IgG.*

**A**

recomLine Borrelia					
BAG Borrelia Blot	IgM in IgG		IgM in IgG		
			poz	neg	skupaj
		poz	7	-	7
		neg	-	23	23
skupaj	7	23	30		

**B**

	<b>Bolniki</b>		<i>recomLine Borrelia</i>		
			<b>IgM</b>		
			<b>poz</b>	<b>neg</b>	<b>skupaj</b>
<b>BAG Borrelia Blot</b>	<b>IgM</b>	<b>Poz</b>	5	4	9
		<b>Neg</b>		11	11
		<b>skupaj</b>	5	15	20

**C**

			<i>recomLine Borrelia</i>		
			<b>IgG</b>		
			<b>poz</b>	<b>neg</b>	<b>skupaj</b>
<b>BAG Borrelia Blot</b>	<b>IgG</b>	<b>Poz</b>	10	3	13
		<b>Neg</b>	1	6	7
	<b>skupaj</b>		11	9	20

Iz Tabel XVIII-A-C je razvidno, da pri 23/50 (46 %) bolnikov z nobenim od navedenih testov nismo ugotovili prisotnosti protiteles IgM niti protiteles IgG, medtem ko smo hkratio prisotnost protiteles IgM in IgG z obema testoma ugotovili pri 7/50 (14%) bolnikov. Prisotnost vsaj ene vrste protiteles (IgM ali IgG) pri vsaj enem od testov smo ugotovili pri 20/50 (40%) bolnikov in sicer s testom BAG Borrelia Blot (prisotnost protiteles IgM, kot tudi IgG) nekoliko pogosteje.

Imunski odziv 20 bolnikov, kjer smo ugotovili prisotnost vsaj ene vrste protiteles (IgM ali IgG) z vsaj enim od testov, prikazuje Tabela XIX. Navedeni so tudi borelijski antigeni, ki so zaslužni za prisotnost oziroma vezavo protiteles IgM in IgG. Močno reakcijo smo ovrednotili kot pozitivno, šibko reakcijo pa kot negativno in je tako nismo točkovali.

Tabela XIX: Imunski odziv 20 bolnikov, kjer smo ugotovili prisotnost vsaj ene vrste protiteles (IgM ali IgG).

Št.	Vzorec	BAG Borrelia Blot		recomLine	
		IgM	IgG	IgM	IgG
1.	št. 2	<b>Pozitivno</b> močno: p39, OspC	<b>Pozitivno</b> močno: VlsE, p41, p41i	<b>Pozitivno</b> močno: p39, OspC	<b>Mejno</b> močno: Vlse, p41
2.	št. 3	<b>Negativno</b> močno: VlsE, šibko: p41	<b>Pozitivno</b> močno: p100, VlsE, p41, p39, p18	<b>Negativno</b> šibko: p41, p39	<b>Pozitivno</b> močno: p100, VlsE, p58, p39, p18
3.	št. 4	<b>Negativno</b> močno: VlsE, šibko: p41, OspC	<b>Pozitivno</b> močno: VlsE, p41, p41i, p18	<b>Negativno</b> šibko: p41	<b>Pozitivno</b> močno: VlsE, p58, p41, p18
4.	št. 7	<b>Negativno</b> močno: p41, p41i	<b>Pozitivno</b> močno: p100, VlsE, p41, p41i	<b>Negativno</b> močno: p41	<b>Negativno</b> šibko: VlsE, p41, p39
5.	št. 8	<b>Pozitivno</b> močno: OspC	<b>Negativno</b> močno: p41	<b>Pozitivno</b> močno: OspC	<b>Negativno</b> močno: p41
6.	št. 11	<b>Pozitivno</b> močno: OspC, šibko: p41	<b>Mejno</b> močno: VlsE, p41	<b>Negativno</b> šibko: p41, OspC	<b>Pozitivno</b> močno: VlsE, p41, p18
7.	št. 12	<b>Negativno</b> šibko: OspC	<b>Pozitivno</b> močno: VlsE, p41, p18 šibko: p100, p39	<b>Negativno</b> šibko: OspC	<b>Pozitivno</b> močno: VlsE, p41, p18, šibko: p100, p39
8.	št. 16	<b>Negativno</b> šibko: p100, OspC, p41i	<b>Pozitivno</b> močno: p100, p41	<b>Negativno</b> /	<b>Negativno</b> močno: p41, šibko: p100
9.	št. 19	<b>Pozitivno</b> močno: p41, OspC, p41i	<b>Pozitivno</b> močno: p100, VlsE, p41, p41i	<b>Negativno</b> močno: p41 šibko: OspC	<b>Pozitivno</b> močno: p100, VlsE, p41, p39
10.	št. 20	<b>Negativno</b> močno: p41 šibko: OspC	<b>Pozitivno</b> močno: p100, VlsE, p41, p18	<b>Negativno</b> močno: p41 šibko: p39	<b>Pozitivno</b> močno: p100, VlsE, p41, p18 šibko: p58, p39
11.	št. 24	<b>Negativno</b> šibko: p100, VlsE, OspC, p41	<b>Pozitivno</b> močno: p100, VlsE, p41, p39 šibko: OspA, OspC, p41i, p18	<b>Negativno</b> /	<b>Pozitivno</b> močno: p100, VlsE, p58, p41, p39

12.	št. 28	<b>Pozitivno</b> močno: OspC	Negativno močno: p41	<b>Pozitivno</b> močno: OspC šibko: p41	Negativno močno: p41
13.	št. 36	<b>Pozitivno</b> močno: VlsE, p41, p41i	Negativno šibko: p41	Negativno močno: p41 šibko: p39	Negativno močno: VlsE šibko: p41
14.	št. 37	<b>Pozitivno</b> močno: p100, p41, OspA	Negativno močno: p41	Negativno močno: p41 šibko: p100	Negativno močno: p41
15.	št. 38	Negativno močno: p100 šibko: VlsE, p41, OspA, OspC, p41/i	<b>Pozitivno</b> močno: VlsE, p41, p41i, p18	Negativno šibko: p41	<b>Pozitivno</b> močno: VlsE, p18 šibko: p41
16.	št. 39	Negativno močno: p41, p41i	<b>Pozitivno</b> močno: p100, VlsE, OspC šibko: p41, p39	Negativno šibko: p41	<b>Pozitivno</b> močno: p100, VlsE, p58, p18 šibko: p41, p39, OspC
17.	št. 40	<b>Pozitivno</b> močno: p100, p41, p41i	Negativno močno: p41	<b>Pozitivno</b> močno: p100, OspC šibko: p41	Negativno močno: p41
18.	št. 44	<b>Pozitivno</b> močno: p41, OspC, p41i	Negativno /	<b>Pozitivno</b> močno: p41, OspC	Negativno šibko: OspA
19.	št. 48	Negativno močno: p41 šibko: p41i	<b>Pozitivno</b> močno: p100, VlsE, p41, p41i, p18 šibko: p39, OspC	Negativno močno: p41	<b>Pozitivno</b> močno: p100, VlsE, p58, p18 šibko: p41, p39
20.	št. 49	Negativno šibko: VlsE, p41, p41i	<b>Pozitivno</b> močno: p100, VlsE, p41, p39, p41i, p18	Negativno šibko: p41	<b>Pozitivno</b> močno: p100, VlsE, p41, p18 šibko: p58, p39
	Skupaj	št. pozitivnih: 9	št. pozitivnih: 13	št. pozitivnih: 5	št. pozitivnih: 11

#### 5.4 Reakcija protiteles IgM in IgG na posamezne borelijske antigene

Ugotavljali smo tudi, koliko posameznih specifičnih antigenov je bilo pozitivnih (vizualna ocena intenzitete obarvanosti pasu na traku) pri pozitivnih, mejnih in negativnih končnih rezultatih bolnika. Končni rezultat bolnika je bil določen s točkovanjem po navodilih proizvajalca.

Ugotovitve, v kolikšni meri so bili posamezni pozitivni specifični antigeni prisotni pri pozitivnih, mejnih in negativnih končnih rezultatih, nam za IgM razred protiteles pri **BAG Borrelia Blot** testu prikazuje Tabela XX, za IgG razred protiteles pri **BAG Borrelia Blot** testu Tabela XXI, za IgM razred protiteles pri **recomLine Borrelia** testu Tabela XXII in za IgG razred protiteles pri **recomLine Borrelia** testu Tabela XXIII.

*Tabela XX: Pozitivne serološke reakcije na borelijske antigene pri pozitivnih, mejnih in negativnih končnih rezultatih pri BAG Borrelia Blot testu in IgM razredu protiteles. Poudarjene so najpogostejše reakcije na antigen.*

<b>BAG Borrelia Blot IgM (antigeni)</b>	<b>Pozitivni končni rezultat število (%)</b>	<b>Mejni končni rezultat število (%)</b>	<b>Negativni končni rezultat število (%)</b>
<b>p100</b>	4 (25 %)	/	1 (2,94 %)
<b>VlsE</b>	3 (18,75 %)	/	5 (14,7 %)
<b>p41</b>	10 ( <b>62,5 %</b> )	/	10 ( <b>29,41 %</b> )
<b>p39</b>	1 (6,25 %)	/	/
<b>OspA</b>	1 (6,25 %)	/	/
<b>OspC</b>	12 ( <b>75 %</b> )	/	/
<b>p41/i</b>	7 (43,75 %)	/	6 (17,65 %)
<b>p18</b>	/	/	/
<b>brez reakcije na antigen</b>	/	/	15 (44,12 %)
<b>skupaj</b>	16 (100 %)	/	34 (100 %)

S testom **BAG Borrelia Blot** smo pri vzorcih bolnikov, ki so točkovno dosegli pozitiven končni rezultat testa, ugotovili, da je pri protitelesih razreda IgM največ reakcij z antigenoma OspC (75 %) in p41 (62,5 %), pri protitelesih razreda IgG pa z antigenoma VlsE (95 %) in p41 (85 %). Pri bolnikih z negativnim končnim rezultatom je bilo največ reakcij na borelijski antigen p41, pri protitelesih IgM v 29,41 % in IgG v 67 %.

*Tabela XXI: Pozitivne serološke reakcije na borelijske antigene pri pozitivnih, mejnih in negativnih končnih rezultatih pri BAG Borrelia Blot testu in IgG razredu protiteles.*

*Poudarjene so najpogostejše reakcije na antigen.*

<b>BAG Borrelia Blot IgG (antigeni)</b>	<b>Pozitivni končni rezultat število (%)</b>	<b>Mejni končni rezultat število (%)</b>	<b>Negativni končni rezultat število (%)</b>
<b>p100</b>	12 (60 %)	/	/
<b>VlsE</b>	19 ( <b>95 %</b> )	3 (100 %)	/
<b>p41</b>	17 ( <b>85 %</b> )	3 (100 %)	18 ( <b>67 %</b> )
<b>p39</b>	5 (25 %)	/	/
<b>OspA</b>	/	/	/
<b>OspC</b>	4 (20 %)	/	/
<b>p41/i</b>	11 (55 %)	/	/
<b>p18</b>	10 (50 %)	/	/
<b>brez reakcije na antigen</b>	/	/	9 (33,33 %)
<b>skupaj</b>	20 (100 %)	3 (100 %)	27 (100 %)

S testom **recomLine Borrelia** smo pri vseh vzorcih, ki so točkovno dosegli pozitiven končni rezultat, ugotovili reakcijo protiteles razreda IgM na antigen OspC, na antigen p41 v 50,0 %, pri protitelesih razreda IgG pa smo pri vseh ugotovili reakcijo na antigen VlsE, ki mu sledita antigena p18 v 72,22 % in p41 v 66,67 %.

*Tabela XXII: Pozitivne serološke reakcije na borelijske antigene pri pozitivnih, mejnih in negativnih končnih rezultatih pri recomLine Borrelia testu in IgM razredu protiteles.*

*Poudarjene so najpogostejše reakcije na antigen.*

<b>recomLine Borrelia IgM (antigeni)</b>	<b>Pozitivni končni rezultat število (%)</b>	<b>Mejni končni rezultat število (%)</b>	<b>Negativni končni rezultat število (%)</b>
--	--	--	--



<b>p100</b>	1 (8,3 %)	/	/
<b>VlsE</b>	/	/	1 (2,63 %)
<b>p58</b>	/	/	/
<b>p41</b>	6 ( <b>50 %</b> )	/	11 ( <b>28,95 %</b> )
<b>p39</b>	1 (8,3 %)	/	1 (2,63 %)
<b>OspA</b>	/	/	/
<b>OspC</b>	12 ( <b>100 %</b> )	/	/
<b>p18</b>	/	/	/
<b>brez reakcije na antigen</b>	/	/	25 (65,79 %)
<b>skupaj</b>	12 (100 %)	/	38 (100 %)

*Tabela XXIII: Pozitivne serološke reakcije na borelijske antigene pri pozitivnih, mejnih in negativnih končnih rezultatih pri recomLine Borrelia testu in IgG razredu protiteles.*

*Poudarjene so najpogostejše reakcije na antigen.*

<b>recomLine Borrelia IgG (antigeni)</b>	<b>Pozitivni končni rezultat število (%)</b>	<b>Mejni končni rezultat število (%)</b>	<b>Negativni končni rezultat število (%)</b>
<b>p100</b>	8 (44,4 %)	/	/
<b>VlsE</b>	18 ( <b>100 %</b> )	2 (100 %)	1 (3,3 %)
<b>p58</b>	6 (33,33 %)	/	/
<b>p41</b>	12 ( <b>66,67 %</b> )	2 (100 %)	15 ( <b>50 %</b> )
<b>p39</b>	4 (22,22 %)	/	/
<b>OspA</b>	/	/	/
<b>OspC</b>	2 (11,11 %)	/	/
<b>p18</b>	13 ( <b>72,22 %</b> )	/	/
<b>brez reakcije na antigen</b>	/	/	14 (46,67 %)
<b>skupaj</b>	18 (100 %)	2 (100 %)	30 (100 %)

## 5.5 Primerjava reakcij specifičnih protiteles razreda IgM na posamezne borelijske antigene med testoma BAG Borrelia Blot in recomLine Borrelia

**Pri pozitivnih končnih rezultatih** smo z antigeni p100, VlsE, p41, p39 in OspA, pozitiven imunski odziv protiteles IgM pogosteje ugotovili pri BAG Borrelia Blot testu kakor pri *recomLine* Borrelia, z antigenom OspC pa obratno (Tabeli XX in XXII). Največ reakcij protiteles IgM smo pri obeh testih ugotovili na antigena OspC in p41.

Reakcijo IgM na antigen p41/i, ki ga vsebuje samo test BAG Borrelia Blot, smo ugotovili pri 43,75 % vzorcih (Tabela XX), medtem ko reakcije na antigen p58, ki ga vsebuje samo test *recomLine* Borrelia, ni bilo (Tabela XXII).

**Pri negativnih končnih rezultatih** je bilo največ vzorcev brez reakcij protiteles IgM na katerikoli borelijski antigen pri BAG Borrelia Blot testu 44,12 %, pri *recomLine* Borrelia testu pa 65,79 % (Tabeli XX in XXII). Največ pozitivnih imunskih reakcij protiteles IgM v tej skupini bolnikov je bilo na borelijski antigen p41, pri obeh testih v enakem odstotku (BAG Borrelia Blot 29,41 %, *recomLine* Borrelia 28,95 %; Tabeli XX in XXII).

## 5.6 Primerjava reakcij specifičnih protiteles razreda IgG na posamezne borelijske antigene med testoma BAG Borrelia Blot in recomLine Borrelia

**Pri pozitivnih končnih rezultatih** smo z antigeni p100, p41 in OspC pozitiven imunski odziv protiteles IgG pogosteje ugotovili pri BAG Borrelia Blot testu kot pri *recomLine* Borrelia testu, z antigenoma VlsE in p18 pa obratno (Tabeli XXI in XXIII). Največ reakcij protiteles IgG pri obeh testih smo ugotovili na antigena VlsE in p41, pri testu *recomLine* Borrelia še na antigen p18.

Pri antigenu p41/i, ki ga vsebuje samo test BAG Borrelia Blot, smo ugotovili pozitiven imunski odziv protiteles IgG pri 55 % vzorcih (Tabela XXI), pri antigenu p58, ki ga vsebuje samo test *recomLine* Borrelia, pa pri 31,58 % vzorcih (Tabela XXIII).

**Pri negativnih končnih rezultatih** smo z antigenom p41 ugotovili najpogostejši pozitiven imunski odziv protiteles IgG in sicer pri pri BAG Borrelia Blot testu pogosteje kot pri *recomLine* Borrelia testu (Tabeli XXI in XXIII).

Brez imunskih odzivov protiteles IgG na katerikoli antigen je bilo pri *recomLine* Borrelia testu nekoliko več vzorcev kakor pri BAG Borrelia Blot testu (46,67 % in 33,33 %; Tabeli XXI in XXIII).

## 5.7 Primerjava reakcij specifičnih protiteles razreda IgM in IgG na posamezne borelijske antigene glede na borelijsko okužbo

Iz Tabele **XVIII A** je razvidno, da je 7/50 (14 %) bolnikov imelo pozitiven imunski odziv protiteles IgM in IgG pri obeh testih. Reakcijo protiteles **IgM** smo z obema testoma ugotovili na antigene p41 in OspC pri vseh bolnikih, pri nekaterih s testom BAG Borrelia še reakcijo na antigene VlsE, p41/i in p100. Reakcijo protiteles **IgG** smo z obema testoma ugotovili na antigene VlsE, p41, OspC, p39 in p18. Pri vzorcih nekaterih bolnikov so pri testu BAG Borrelia Blot protitelesa IgG reagirala še na antigena p100 in p41/i, s testom *recomLine* Borrelia pa na antigen p58.

Iz Tabel **XVIII B in XIX** je razvidno, da je dodatno 5 bolnikov imelo pozitiven imunski odziv samo s protitelesi IgM z obema testoma; pri vseh smo ugotovili reakcijo na antigene p100, OspC in p41. 4 bolniki so zadovoljili kriterij **pozitivnega končnega rezultata** protiteles IgM le s testom BAG Borrelia Blot (reakcija na p100, OspA, p41, VlsE, OspC in p 41/i), pri testu *recomLine* Borrelia so kazali reakcijo samo na antigen p41, kar ni zadostovalo za pozitivnost končnega rezultata.

Iz Tabel **XVIII C in XIX** je razvidno, da je 10 bolnikov imelo pozitiven imunski odziv le s protitelesi IgG z obema testoma; pri vseh smo ugotovili reakcijo protiteles na antigene p100, VlsE, p41, p18 in p39. Pri testu BAG Borrelia Blot še na antigene OspC in p 41/i, pri testu *recomLine* Borrelia pa še na antigen p58. Še 3 bolniki iz Tabele XVIII C so zadovoljili kriterij **pozitivnega končnega rezultata** le z BAG Borrelia Blot testom; ugotovili smo reakcijo protiteles IgG na antigene p100, p41, VlsE in p41/i (Tabela XIX). Ti bolniki so pri testu *recomLine* Borrelia kazali reakcijo le na antigene p41 in VlsE, kar ni zadostovalo za pozitivnost končnega rezultata. 1 bolnik iz Tabele XVIII C je zadovoljil kriterij **pozitivnega končnega rezultata** protiteles IgG samo s testom *recomLine* Borrelia; reakcije so bile na antigene VlsE, p41 in p18. Pri testu BAG Borrelia Blot so ti bolniki kazali reakcijo na antigene p41 in VlsE, kar ni zadostovalo za pozitivnost končnega rezultata (Tabela XIX).

## 5.8 Vzorci, katerih rezultati se ne ujemajo

Pri nekaterih vzorcih se rezultati dveh testov kljub ponavljanju niso ujemali. Čeprav so ti vzorci navedeni že v Tabeli XIX, smo jih zaradi jasnejšega prikaza zbrali in prikazali še v Tabeli XXIV. Prikazani so imunski odziv omenjenih bolnikov in borelijski antigeni, ki so

zaslužni za prisotnost oziroma vezavo protiteles IgM in IgG. Močno reakcijo smo ovrednotili kot pozitivno, šibko reakcijo pa kot negativno in je tako nismo točkovali.

Pri določanju **protiteles IgM** je do razlik med testoma prišlo pri 4 bolnikih (Tabela XXIV). Pri vseh smo s testom BAG Borrelia Blot IgM dobili pozitiven končni rezultat, s testom *recomLine* Borrelia IgM pa negativnega.

Pri **vzorcu št. 11 in 19** je do razlike v končnem rezultatu IgM prišlo zaradi antigena OspC. Pri testu BAG Borrelia Blot IgM je antigen OspC pokazal močno reakcijo, kar se smatra za pozitivno, pri testu *recomLine* Borrelia IgM pa šibko, kar se smatra za negativno.

Pri **vzorcu št. 36** sta se testa ujemala v pozitivni reakciji antigena p41. Do razlike pri končnem rezultatu IgM bolnika je prišlo zaradi antigena VlsE, pri katerem smo s testom BAG Borrelia Blot IgM dokazali pozitivno reakcijo, s testom *recomLine* Borrelia IgM pa negativno, in zaradi antigena p41i, ki je pri testu BAG Borrelia Blot IgG pokazal pozitivno reakcijo, pri testu *recomLine* Borrelia IgG pa tega antigena sploh ni.

*Tabela XXIV: Vzorci, katerih rezultati se pri testiranju na borelijske antigene z BAG Borrelia Blot in recomLine Borrelia ne ujemajo.*

št. vzorca	BAG Borrelia Blot IgM	<i>recomLine</i> Borrelia IgM	BAG Borrelia Blot IgG	<i>recomLine</i> Borrelia IgG
2.			Pozitivno (močno: VlsE, p41, p41i)	Mejno (močno: VlsE, p41)
7.			Pozitivno (močno: p100, VlsE, p41, p41i)	Negativno (šibko: VlsE, p41, p39)
11.	Pozitivno (močno: OspC šibko: p41)	Negativno (šibko: OspC šibko: p41)	Mejno (močno: VlsE in p41)	Pozitivno (močno: VlsE, p41 in p18)
13.			Mejno (močno: VlsE in p41)	Negativno (šibko: VlsE, močno: p41)
16.			Pozitivno (močno: p100 in p41)	Negativno (šibko: p100, močno: p41)
19.	Pozitivno (močno: p41, OspC, p41i)	Negativno (močno: p41 šibko: OspC)		

<b>36.</b>	<b>Pozitivno</b> (močno: VlsE, p41, p41i)	<b>Negativno</b> (močno: p41 šibko: p39)		
<b>37.</b>	<b>Pozitivno</b> (močno: p100, p41, OspA)	<b>Negativno</b> (šibko: p100, močno: p41)		

Pri vzorcu št. 37 je do razlik v končnem rezultatu IgM prišlo zaradi antigenov p100 in OspA. S testom BAG Borrelia Blot IgM smo pri teh antigenih dokazali močno, pozitivno reakcijo (kar prinese 8 dodatnih točk), s testom *recomLine* Borrelia pa šibko oziroma negativno, kar da negativen končni rezultat.

Pri določanju **protiteles IgG** je do razlik med testoma prišlo pri 5 bolnikih (Tabela XXIV). Vsi razen enega so pri testiranju s testom BAG Borrelia Blot IgG dosegli pozitiven ali mejni končni rezultat, pri testiranju s testom *recomLine* Borrelia IgG pa negativnega (eden mejni).

Pri vzorcu št. 2 je do razlike v končnem rezultatu IgG prišlo zaradi antigena p41i, ki je pri testu BAG Borrelia Blot IgG pokazal pozitivno reakcijo, pri testu *recomLine* Borrelia IgG pa tega antigena sploh ni.

Pri vzorcih št. 7, 13, 16 je do razlik v končnem rezultatu IgG prišlo zaradi antigenov p100, p41 in VlsE, ki so pri testu BAG Borrelia Blot IgG pokazali močno, pozitivno reakcijo, pri testu *recomLine* Borrelia IgG pa šibko reakcijo, kar se smatra za negativno. Pri vzorcu št. 7 je pri testu BAG Borrelia Blot reagiral tudi antigen p41i, ki ga pri testu *recomLine* Borrelia ni.

Pri vzorcu št. 11 je do razlik v končnem rezultatu IgG prišlo zaradi antigena p18, ki je pri testu *recomLine* Borrelia pokazal pozitivno, pri testu BAG Borrelia Blot pa negativno reakcijo.

## 6. RAZPRAVA

Lymska borelioza je sistemska bolezen, ki prizadene kožo, živčevje in sklepe, njene povročitelje pa prenašajo klopi. V Evropi se najpogosteje pojavlja v Skandinaviji in Srednji Evropi, najpogostejši povročitelji pa so *B. afzelii*, *B. garinii* in *B. burgdorferi sensu stricto* (20-21).

Najbolj prepoznaven znak lymske borelioze je pojav značilne rdečine erythema migrans (22).

Če obstaja sum na lymsko boreliozo, na koži pa ni prisotna značilna rdečina (erythema migrans), je zelo priporočljivo mikrobiološko testiranje (21). Najpogosteje uporabljena metoda za odkrivanje prisotnosti borelijskih protiteles so serološke preiskave (20).

V prvi fazi oziroma prvem stadiju lymske borelioze je verjetnost, da bomo v serumu odkrili borelijska protitelesa, 20 – 50 %, v drugem stadiju 70 – 90 % in v tretjem stadiju skoraj 100 % (20). Tudi če potrdimo prisotnost specifičnih protiteles, še ne pomeni, da ima bolnik aktivno okužbo. Možno je, da smo odkrili protitelesa, ki so rezultat pretekle infekcije. Velja pa seveda tudi obratno. Odsotnost specifičnih protiteles ne pomeni nujno tudi odsotnosti borelijske okužbe. V večini primerov je razlog razmeroma počasen razvoj protiteles v zgodnji fazi okužbe (21). Rezultate seroloških testiranj moramo torej vedno obravnavati skupaj s klinično sliko bolnika.

Mnogi strokovnjaki priporočajo, da mejne ali pozitivne rezultate, pridobljene s presejalnimi testi, kot sta na primer ELISA ali IFT, ki predstavljajo prvo stopnjo testiranja, potrdimo z občutljivejšim potrditvenim immunoblot testom, ki predstavlja drugo stopnjo testiranja (15, 19).

Pri novejših immunoblot testih se uporabljajo rekombinantni antigeni, ki imajo veliko prednosti in s tem boljše rezultate preiskav. Med drugim je možno tudi kombiniranje homolognih antigenov iz različnih sevov kot sta npr. antigena OspC, p18 (sliki 3 in 4) (21).

Med antigeni izstopata VlsE, ki je zelo občutljiv za odkrivanje in določanje IgG protiteles, in OspC antigen, ki je občutljiv za odkrivanje IgM protiteles (20). Oba antigena sta vključena v naša testa.

Cilj diplomske naloge je bil oceniti in med seboj primerjati dva immunoblot testa, BAG Borrelia Blot in *recomLine* Borrelia, za določanje specifičnih protiteles. Naključno smo izbrali 50 serumov bolnikov, katerih kri je bila, zaradi suma na borelijsko okužbo, poslana v laboratorij na serološko testiranje in ugotavljanje prisotnosti borelijskih protiteles razreda IgM in IgG. Vzorce smo testirali z BAG Borrelia Blot in *recomLine* Borrelia testom. Ker je pri rezultatih prišlo do neujemanja, smo oba testa ponovili.

Z obema testoma smo potrdili, da je skupina OspC antigenov res značilna za odkrivanje IgM protiteles [pri BAG Borrelia Blot 75 % (Tabela XX), pri *recomLine* Borrelia pa 100 % (Tabela XXII)], antigen VlsE pa za odkrivanje IgG protiteles [pri BAG Borrelia Blot 95 % (Tabela XXI), pri *recomLine* Borrelia pa 100 % (Tabela XXIII)].

S testom BAG Borrelia Blot smo prisotnost protiteles IgM dokazali le v 16/50 (32 %) vzorcev, prisotnost protiteles IgG pa v 20/50 (40 %) vzorcev (Tabela XIV), medtem ko smo s testom *recomLine* Borrelia prisotnost protiteles IgM dokazali v 12/50 (24 %) in prisotnost protiteles IgG v 18/50 (36 %) vzorcev (Tabela XV).

Ob primerjavi rezultatov med testoma BAG Borrelia Blot in *recomLine* Borrelia pri dokazovanju protiteles IgM (Tabela XVI) smo ugotovili, da je test BAG Borrelia Blot bolj občutljiv kot *recomLine* Borrelia, saj je bilo pri dokazovanju protiteles IgM pri BAG Borrelia Blot več pozitivnih končnih rezultatov (32 %), kot pri *recomLine* Borrelia (24 %). Razlika ni bila statistično značilna, saj je bil  $p > 0,05$ . Pri primerjavi rezultatov med testoma BAG Borrelia Blot in *recomLine* Borrelia pri dokazovanju protiteles IgG (Tabela XVII) smo prišli do podobnega zaključka. Pri BAG Borrelia Blot testu je bilo več pozitivnih končnih rezultatov (40 %), kot pri *recomLine* Borrelia (36 %), kar potrjuje, da je test BAG Borrelia Blot bolj občutljiv kot *recomLine* Borrelia. Tudi tukaj razlika statistično ni bila značilna, saj je bil  $p > 0,05$ .

Kljub temu da je pri vseh bolnikih obstajal sum na lymsko boreliozo, vsi bolniki niso bili serološko pozitivni oziroma je bilo serološko pozitivnih 27/50 (54 %) bolnikov. Za negativen serološki rezultat obstaja več razlogov. Prvi razlog je, da je bila klinična slika bolnika zelo podobna klinični sliki pri borelijski okužbi, vendar ni šlo za lymsko boreliozo. Drugi razlog je, da je prišlo do borelijske okužbe, vendar je bilo testiranje izvedeno prezgodaj, da bi zaznali prisotnost protiteles. Tretji razlog je, da so bolniki to okužbo morda že preboleli in se je koncentracija prisotnih protiteles zelo znižala.

Pri pozitivnih vzorcih bolnikov smo tako s testom BAG Borrelia Blot kot tudi z *recomLine* Borrelia ugotovili pogostejšo prisotnost protiteles IgG kot IgM. Protitelesa IgM se razvijejo v 3-6 tednih po okužbi, protitelesa IgG pa v 1-3 mesecih po okužbi in v krvi ostanejo dlje časa. Razlog za pogostejšo prisotnost protiteles IgG pri testiranih bolnikih je morda ta, da protitelesa IgG v krvi ostanejo veliko dlje časa kot protitelesa IgM.

V BAG Borrelia Blot test so vključeni antigeni p100, VlsE, p41, p39, OspA, OspC, p41/i Bg, p41/i Ba in p18; tabeli XX in XXI prikazujeta pri katerih borelijskih antigenih je imunski odziv najpogostejši. Iz tabel je razvidno, da je najpogostejši imunski odziv protiteles IgM na antigene vrste OspC (75 %) in p41 (62 %) (Tabela XX), protiteles IgG na antigena VlsE (95 %) in p41 (85 %) (Tabela XXI). Iz tabele je razvidno, da noben od antigenov ni sprožil imunskega odziva v 100 %.

V *recomLine* Borrelia test so vključeni antigeni p100, VlsE, p58, p41, p39, OspA, OspC in p18; tabeli XXII in XXIII prikazujeta pri katerih borelijskih antigenih je imunski odziv najpogostejši. Iz tabel je razvidno, da je najpogostejši imunski odziv protiteles IgM na antigene vrste OspC (100 %) in antigen p41 (50 %) (Tabela XXII), protiteles IgG na antigene VlsE (100 %), p41 (66,67 %) in p18 (72,22 %) (Tabela XXIII). Pri testu *recomLine* Borrelia smo ugotovili 100 % imunski odziv protiteles IgM (na OspC) in protiteles IgG (na VlsE), kar je prednost pred testom BAG Borrelia Blot.

Med seboj smo primerjali rezultate reakcij enakih antigenov, ki so bili uporabljeni pri testu BAG Borrelia Blot in *recomLine* Borrelia. Za razred protiteles IgM (Tabeli XX in XXII) smo tako pri enem kot pri drugem testu ugotovili najpogostejšo reakcijo z antigenom OspC, sledi pa mu p41, kar potrjuje, da sta to dva najbolj imunogena borelijska antigena za dokazovanje specifičnih protiteles razreda IgM, predvsem pri testu *recomLine* Borrelia. Za razred protiteles IgG (Tabeli XXI in XXIII) smo ugotovili najpogostejšo reakcijo z antigenom VlsE, sledi pa mu antigen p41, kar potrjuje, da sta to dva najbolj imunogena borelijska antigena za dokazovanje specifičnih protiteles razreda IgG.

Kljub dejstvu, da oba testa vsebujeta veliko enakih antigenov (p100, VlsE, p41, p39, OspA, OspC, p18), je do razlik pri reakcijah prišlo tako pri razredu protiteles IgM kot IgG (Tabele XX-XXIII). Razlike lahko pripišemo različnemu viru antigenov, različno postavljeni meji občutljivosti pozitivnih reakcij, različnemu točkovanju pri enem ali



drugem testu in tudi subjektivnosti pri optičnem ocenjevanju testa. Zaradi vseh naštetih razlogov je potrebno vsak rezultat interpretirati v sklopu klinične slike bolnika.

Kot je razvidno iz Tabele XXIV, so se pri 8/50 (16 %) testiranih vzorcih rezultati kljub večkratnim ponovitvam testiranja razlikovali. Nekoliko več neujemanj je prišlo pri določanju IgG (5 vzorcev, od tega sta 2 imela mejni končni rezultat), kot IgM protiteles (4 vzorci). Razlog za neujemanje končnega rezultata je lahko subjektivnost pri optičnem ocenjevanju testov, kar se je pri našem delu pogosto pokazalo (Tabela XXIV, vzorci št. 39, 11, 13, 16, 19 in 36), delno pa tudi zaradi različno postavljene meje občutljivosti pozitivnih reakcij (Tabela XXIV, vzorec št. 7, 11, 13, 16). Do različnega končnega rezultata lahko privede kombinacija različnih borelijskih antigenov na testnih trakovih posameznega proizvajalca. Tako je prisotnost antigena p41/i v testu BAG Borrelia Blot opredelila pozitiven vzorec št. 2 iz Tabele XXIV.

K različnosti končnega rezultata je očitno doprinesel tudi različen vir antigenov, ki jih proizvajalca nanašata na svojih testnih trakovih. Tako ugotovimo reakcijo na določen antigen pri enem proizvajalcu, medtem ko na enak antigen drugega proizvajalca ni reakcije (Tabela XXIV vzorci št. 7, 36 in 37).

Količina seruma, ki smo jo uporabili pri testiranju, se je za BAG Borrelia Blot in *recomLine* Borrelia test razlikovala. Za določanje protiteles IgM smo pri testu BAG Borrelia Blot vzorec redčili 1:100, pri *recomLine* Borrelia testu pa 1:50. Za določanje protiteles IgG smo pri testu BAG Borrelia Blot vzorec redčili 1:200, pri *recomLine* Borrelia testu pa 1:100. Kljub manjši razredčitvi seruma pri testu *recomLine* Borrelia kot pri testu BAG Borrelia Blot, smo s testom BAG Borrelia Blot dokazali več pozitivnih reakcij protiteles IgM in IgG in s tem več pozitivnih bolnikov (Tabela XVI in XVII).

Imunoblot testa BAG Borrelia Blot in *recomLine* Borrelia sta v sami izvedbi zelo podobna. Nekoliko se razlikujeta glede na vrsto rekombinantnih antigenov, ki so nanešeni na testnih trakovih (Sliki 3 in 4), različno pa je tudi točkovanje enakega antigena pri enem in drugem testu (Tabeli VII in XII). Pri testu BAG Borrelia Blot je tako IgG reakcija na antigene p100, p39 in p18 točkovana po 8 točk, pri *recomLine* Borrelia IgG testu pa po 5 točk, kar lahko privede do dveh različnih končnih rezultatov. Pri ostalih antigenih so reakcije na antigene vrednotene tako, da se razlikujejo le za točko ali dve.

Kljub dejstvu, da so bili vsi vzorci bolnikov, ki smo jih testirali, poslani v laboratorij na serološko testiranje zaradi suma na lymsko boreliozo, jih je bilo pozitivnih razmeroma malo. Kot prikazuje Tabela XIX, smo hkratio prisotnost tako IgM kot IgG razreda protiteles z enim in drugim testom dokazali le pri 7 bolnikih (14 %).

Samo pozitivna protitelesa IgM je z enim in drugim testom imelo 5 % testiranih vzorcev, le s testom BAG Borrelia Blot pa še dodatnih 4 % testiranih vzorcev (Tabela XVIII). Samo pozitivna protitelesa IgG je z enim in drugim testom imelo 10 % testiranih vzorcev, le s testom BAG Borrelia Blot še dodatni 3 %, le s testom *recomLine* Borrelia, pa še dodaten 1 % vseh testiranih vzorcev (Tabela XVIII).

Na podlagi rezultatov smo ugotovili, da je test *recomLine* Borrelia nekoliko manj občutljiv kot BAG Borrelia Blot. Ker smo testne serume izbrali naključno, ne poznamo ozadja in klinične slike bolnikov. Lahko zaključimo, da sta oba testa enakovredna za potrditev specifičnih protiteles, rezultate pa je vedno potrebno interpretirati skupaj s klinično sliko bolnika.

## 7. SKLEPI

Specifična protitelesa razreda IgM in IgG lahko dokažemo z metodo imunoblot v serumu bolnikov z lymsko boreliozo.

Protitelesa IgM smo s testom BAG Borrelia Blot dokazali v 32 %, s testom *recomLine* Borrelia pa v 24 %.

Protitelesa IgG smo s testom BAG Borrelia Blot dokazali v 40 %, s testom *recomLine* Borrelia pa v 36 %.

Med testi nismo dokazali statistično značilne razlike; *RecomLine* Borrelia test je nekoliko manj občutljiv od BAG Borrelia Blot testa.

Hkratno prisotnost protiteles IgM in IgG smo z obema testoma, BAG Borrelia Blot in *recomLine* Borrelia, dokazali pri 14 % testiranih bolnikov.

Uporabnost tako enega kot drugega testa je enakovredna.

## 8. LITERATURA

1. Ružić-Sabljić E.: *Borrelia burgdorferi* sensu lato – značilnosti bakterije, rezervoar in prenašalci; v Maraspin-Čarman V., Strle F.: Lymska borelioza 2012, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center Ljubljana, Združenje za infektologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu, Ljubljana, **2012**: 15-23
2. Stanek G, Wormser G P, Gray J, Strle F: Lyme borreliosis, Published online (www.thelancet.com), 2011
3. Mannelli 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, FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2012, 837-861
4. Ružić-Sabljić E.: Patogene bakterije, Borelije; v Gubina M, Ihan A: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Medicinski razgledi, Ljubljana, 2002: 293-302
5. Baranton G., Postic D., Saint-Girons I., Boerlin P., Piffaretti J.C., Asous M., Grimont P.D.: Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis, International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 42, 1992, 378-383
6. Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver J H Jr: Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health (Mini review); v Ticks and Tick-borne Diseases, Elsevier, 2011, 123-128
7. Barbour G A, Hayes F S: Biology of *Borrelia* species, Microbiological Reviews, 1986, 381-400
8. Ružić-Sabljić E.: Značilnosti bakterij, ki povzročajo Lymsko boreliozo pri ljudeh; v Strle F.: Lymska borelioza 2006, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center Ljubljana, Društvo za boj proti lymski boreliozi, Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana, **2006**: 15-21

9. Fraser M C in sod.: Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*, Nature, vol. 390, 1997, 580-586
10. Kenedy M R, Lenhart T R, Akins D R: The role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins, FEMS Immunology and Medical Microbiology, vol. 66, 2012, 1-19
11. Aberer E, Brunner C, Suchanek G, Klade H, Barbour A, Stanek G, Lassmann H: Molecular mimicry and Lyme borreliosis: A shared antigenic determinant between *Borrelia burgdorferi* and human tissue, Ann Neurol, 1989, vol. 26, 732-737
12. Kenedy R M, Lenhart R T, Akins R D: The role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins, FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2012, 1-19
13. Ohnishi J, Piesman J, Silva A M: Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi*, populations transmitted by ticks, Department of Microbiology and Immunology, vol. 98, no. 2, 2001, 670-675
14. Aguero-Rosenfeld M E, Wang G, Schwartz I, Wormser P G: Diagnosis of Lyme borreliosis, Clinical Microbiology Reviews, vol. 18, no. 3, 2005, 484-509
15. Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U: Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis, FEMS Immunology and medical microbiology, 49, 2007, 13-21
16. Zore A., Trilar T., Ružić-Sabljić E., Avšič-Županc T.: Okuženost klopov in gostiteljev z bakterijami *Borrelia burgdorferi* sensu lato; v Strle F.: Lymska borelioza 2006, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center Ljubljana, Društvo za boj proti lymski boreliozi, Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana, **2006**: 23-30
17. Strle F: Klinična slika lymske borelioze: Uvod; v Strle F.: Lymska borelioza 2006, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center Ljubljana, Društvo za boj proti lymski boreliozi, Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana, **2006**: 47-49
18. Funa A., Šavs T., Škrgat S.: Kako dolgo imajo bolniki z *erythema migrans* prisesane klope, Medicinski razgledi, 35, 1996, 297-307

19. Bhide R M, Travnicek M, Levkutova M, Curlik J, Revajova V, Levkut M: Sensitivity of *Borrelia* genospecies to serum complement from different animals and human: a host-pathogen relationship, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 43, 2005, 165-172
20. [http://meduni09.edis.at/eucalb/cms\\_15/index.php?option=com\\_content&view=article&id=53&Itemid=87#lymgrf2.gif](http://meduni09.edis.at/eucalb/cms_15/index.php?option=com_content&view=article&id=53&Itemid=87#lymgrf2.gif) (1.7.2014)
21. <http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/ticks/Pages/ixodes-ricinus.aspx> (1.7.2014)
22. Videčnik J, Zorman P: Klinične in epidemiološke značilnosti bolnikov z erythema migrans, *Medicinski razgledi*, vol. 40, 2001, 383-400
23. Depietro Paolo D L, Powers J H, James Gill J M: Diagnosis of Lyme disease, *American Family Physician*, vol. 72, št. 2, 2005, 297-304
24. 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, Klinični center Ljubljana, Združenje za infektologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu, Ljubljana, 2012*: 25-32
25. [http://en.wikipedia.org/wiki/Erythema#mediaviewer/File:Erythema\\_migrans\\_-\\_erythematous\\_rash\\_in\\_Lyme\\_disease\\_-\\_PHIL\\_9875.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/Erythema#mediaviewer/File:Erythema_migrans_-_erythematous_rash_in_Lyme_disease_-_PHIL_9875.jpg) 17.7.2014
26. Moter S E, Hofmann H, Wallich R, Simon M M, Kramer M D: Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lesional skin of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans by ospA-specific PCR, *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 32, št. 12, 1994, 2980-2988
27. <http://www.zzv-ms.si/si/epidemiologija/Klopni-meningoencefalitis.htm>, 17.7.2014
28. Logar M: Prizadetost kože; v Strle F.: Lymška borelioza 2006, *Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center Ljubljana, Društvo za boj proti lymški boreliozi, Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana, 2006*: 51-59
29. Wildermann B, Oschmann P, Reiber H: *Neurologische labordiagnostik*, 2006, Thieme-Verlag

30. Ružič-Sabljić E, Cerar T: Mikrobiološka diagnostika borelijskih okužb; v Maraspin-Čarman V., Strle F.: Lymška borelioza 2012, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center Ljubljana, Združenje za infektologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu, Ljubljana, **2012**: 151-155
31. Wilske B: Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis, *Annals of Medicine*, 37, 2005, 568-579
32. Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U: Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis, *FEMS Immunology and medical microbiology*, 49, 2007, 13-21
33. Vasudevan B, Chatterjee M: Lyme borreliosis and skin, *Indian Journal of Dermatology*, vol. 58, 2013, 167-174
34. [www.bag-healthcare.com](http://www.bag-healthcare.com) (29.5.2015)
35. <http://www.mikrogen.de/deutsch/deutschland/start.html> (29.5.2015)