

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA RIBNIKAR

MAGISTRSKA NALOGA

Magistrski študij laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA RIBNIKAR

**PRIMERJAVA ENCIMSKOIMUNSKE IN
IMUNOFLUORESCENČNE METODE V POSTOPKU
STOPENJSKE LABORATORIJSKE DIAGNOSTIKE
BORELIJSKIH OKUŽB**

**COMPARISON OF ENZYME-LINKED
IMMUNOSORBENT METHOD AND
IMMUNOFLUORESCENCE METHOD IN TWO-
STEP LABORATORY TESTING PROCESS FOR
BORRELIA INFECTIONS**

MAGISTRSKA NALOGA

Magistrski študij laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala v Nacionalnem laboratoriju za zdravje okolje in hrano Kranj (Oddelek za medicinsko mikrobiologijo) pod mentorstvom izr. prof. dr. Iztoka Grabnarja, mag. farm. in somentorstvom prim. doc. dr. Irene Grmek Košnik, dr. med., spec. klinične mikrobiologije, spec. javnega zdravja

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju izr. prof. dr. Iztoku Grabnarju, ki me je s svojim spodbudnim in sproščenim pristopom vodil skozi izdelavo magistrske naloge in somentorici prim. doc. dr. Ireni Grmek Košnik, dr. med., spec. klinične mikrobiologije, spec. javnega zdravja za pomoč in spodbudne besede.

Posebna zahvala gre mag. Editi Eberl Gregorič, univ. dipl. biol., za njen dragoceni čas, ki mi ga je namenila, me s svojim strokovnim svetovanjem, potrpežljivostjo in koristnimi nasveti vodila v pravo smer med nastajanjem magistrskega dela.

Iskrena hvala moji družini, ki me je v času študija vsestransko podpirala in spodbujala, ter mi vse čas stala ob strani.

Hvala vsem, ki ste verjeli vame v vseh mojih vzponih in padcih, me optimistično spodbujali ter mi nesebično pomagali.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Iztoka Grabnarja, mag. farm. in somentorstvom prim. doc. dr. Irene Grmek Košnik, dr. med., spec. klinične mikrobiologije, spec. javnega zdravja.

Podpis:

Ljubljana, 2015

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Matjaž Jeras, mag.farm.

Mentor: izr. prof. dr. Iztok Grabnar, mag. farm.

Somentorica: prim. doc. dr. Irena Grmek Košnik, dr. med., spec. klinične mikrobiologije, spec. javnega zdravja

Član komisije: doc. dr. Janez Mravljak, mag. farm.

KAZALO

KAZALO SLIK	III
KAZALO PREGLEDNIC	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
POVZETEK	VII
ABSTRACT	IX
1 UVOD	1
1.1 ZNAČILNOSTI IN TAKSONOMSKA UREDITEV BORELIJ	1
1.1.1 Taksonomska ureditev	1
1.1.2 Značilnosti borelij	1
1.1.3 Borelijski antigeni	3
1.2 PRENAŠALCI BORELIJ	7
1.3 EPIDEMIOLOGIJA IN RAZŠIRJENOST BORELIJ	9
1.4 KLINIČNA SLIKA BORELIJSKIH OKUŽB	10
1.5 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE BORELIJSKIH OKUŽB	12
1.6 MIKROBIOLOŠKA (LABORATORIJSKA) DIAGNOSTIKA	13
1.6.1 Osamitev bakterije <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	13
1.6.2 Dokazovanje borelijske DNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)	14
1.6.3 Dokazovanje specifičnih protiteles	14
2 NAMEN DELA	17
3 METODE IN MATERIALI	18
3.1 PRESEJALNO TESTIRANJE PRISOTNOSTI SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI BAKTERIJI <i>B. Burgdorferi</i> V ČLOVEŠKEM SERUMU (1. STOPNJA)	18
3.1.1 Encimskoimunski test (EIT)	18
3.1.1.1 Princip testa	18
3.1.1.2 Priprava vzorcev	19
3.1.1.3 Reagenti in oprema	20
3.1.1.4 Delovni pribor	20
3.1.1.5 Izvedba testa	22
3.1.1.6 Vrednotenje rezultatov	22
3.1.2 Imunofluorescenčni test (IFT)	23
3.1.2.1 Princip testa	23

3.1.2.2	<i>Vzorci</i>	24
3.1.2.3	<i>Reagenti</i>	25
3.1.2.4	<i>Delovni pribor</i>	26
3.1.2.5	<i>Izvedba testa</i>	26
3.1.2.6	<i>Vrednotenje rezultatov</i>	28
3.2	POTRDITVENO TESTIRANJE PRISOTNOSTI SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI BAKTERIJI <i>B. Burgdorferi</i> V ČLOVEŠKEM SERUMU (2. STOPNJA)	29
3.2.1	Imunoblot	29
3.2.1.1	<i>Princip testa</i>	29
3.2.1.2	<i>Vzorci</i>	30
3.2.1.3	<i>Reagenti in oprema</i>	30
3.2.1.4	<i>Delovni pribor</i>	32
3.2.1.5	<i>Izvedba testa</i>	32
3.2.1.6	<i>Vrednotenje rezultatov</i>	33
3.3	STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	37
4	REZULTATI	38
4.1	PREISKOVANCI	38
4.2	REZULTATI ANALIZ	40
4.2.1	Določanje specifičnih protiteles IgM in IgG z encimskoimunskim testom (EIT)	41
4.2.2	Določanje specifičnih protiteles IgM in IgG z imunofluorescenčnim testom (IFT)	41
4.2.3	Dokazovanje specifičnih protiteles IgM in IgG s testom imunoblot	43
4.2.3.1	<i>Rezultati testiranja protiteles IgM s potrditvenim testom imunoblot</i>	43
4.2.3.2	<i>Rezultati testiranja protiteles IgG s potrditvenim testom imunoblot</i>	45
4.2.4	Primerjava pozitivnih in mejnih rezultatov encimskoimunskega in imunofluorescenčnega testa pri določanju protiteles IgM in IgG v serumu bolnikov	48
4.2.4.1	<i>Primerjava pozitivnih in mejnih rezultatov za protitelesa IgM</i>	49
4.2.4.2	<i>Primerjava pozitivnih in mejnih rezultatov za protitelesa IgG</i>	50
4.2.5	Primerjava rezultatov encimskoimunskega in imunofluorescenčnega testa v serumu posameznega bolnika	51
4.2.5.1	<i>Primerjava rezultatov encimskoimunskega in imunofluorescenčnega testa pri določanju protiteles IgM</i>	52
4.2.5.2	<i>Primerjava rezultatov encimskoimunskega in imunofluorescenčnega testa pri določanju protiteles IgG</i>	53
4.2.5.3	<i>Primerjava rezultatov encimskoimunskega in imunofluorescenčnega testa za določanje protiteles IgM in potrjevanje prisotnosti protiteles IgM s testom imunoblot v serumu posameznega bolnika</i> ...54	54
4.2.5.4	<i>Primerjava rezultatov encimskoimunskega in imunofluorescenčnega testa za določanje protiteles IgG in potrjevanje prisotnosti protiteles IgG s testom imunoblot v serumu posameznega bolnika</i> ...56	56
5	RAZPRAVA	58
6	SKLEP	64
7	LITERATURA	65

KAZALO SLIK

Slika 1: <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato v temnem polju.....	2
Slika 2: Borelijska struktura	2
Slika 3: Klop - Življenski krog.....	7
Slika 4: Razvojne stopnje klopa	8
Slika 5: Število prijavljenih primerov borelijskih okužb po mesecih, Slovenija 2011-2013....	10
Slika 6: Kožna sprememba – <i>erythema migrans</i> (EM)	11
Slika 7: Princip encimskoimunskega testa	19
Slika 8: Posredna imunofluorescenca.....	24
Slika 9: Princip testa imunoblot	30
Slika 10: Odčitavanje testnih trakov s prostim očesom.....	34
Slika 11: Primer odčitavanja testnih trakov s programom <i>RecomScan</i>	36
Slika 12: Vzorci serumov poslanih v serološki laboratorij iz zdravstvenih domov in bolnišnic širšega območja gorenjske regije (n=3.256)	38
Slika 13: Slika 13: Starost bolnikov, ki so bili testirani na <i>B. burgdorferi</i> sensu lato v obdobju od oktobra 2011 do oktobra 2014 (n = 3.256).....	39
Slika 14: Diagram Consort za testiranje 3.256 vzorcev serumov bolnikov s sumom na borelijsko okužbo	40
Slika 15: Prikaz odstotka vzorcev serumov bolnikov s sumom na borelijsko okužbo s protitelesi IgM in IgG proti specifičnim borelijskim antigenom (B. b. s. s = <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto, B. a. = <i>B. afzelii</i> , B. b. = <i>B. bavariensis</i> , B. g. = <i>B. garinii</i> , B. s. = <i>B. spielmanii</i>).....	48
Slika 16: Diagram Consort za testiranje 126 vzorcev serumov	51

KAZALO PREGLEDNIC

Tabela I: Seznam uporabljenih reagentov v testu.....	20
Tabela II: Sestava reagenčnega traku	21
Tabela III: Interpretacija rezultatov encimskoimunskega testa.....	23
Tabela IV: Seznam uporabljenih reagentov v testu.....	25
Tabela V: Priprava razredčin seruma v vdolbinicah na mikrotitrski ploščici	26
Tabela VI: Nanašanje kontrol in razredčin seruma na ustrezna mesta na stekelcu za določanje titra protiteles IgM in IgG	27
Tabela VII: Interpretacija rezultatov imunofluorescenčnega testa.....	28
Tabela VIII: Deklarirana specifičnost/občutljivost	28
Tabela IX: Primer redčenja spiralnega pufra.....	31
Tabela X: Primer redčenja konjugata	31
Tabela XI: Inteziteta pasov.....	33
Tabela XII: Točkovanje izraženih pasov rekombinantnih borelijskih antigenov za protitelesa IgM in IgG	35
Tabela XIII: Vrednotenje rezultatov testa za protitelesa IgM in IgG.....	36
Tabela XIV: Rezultati analize encimskoimunskega testa za 2.796 vzorcev serumov	41
Tabela XV: Rezultati 460 vzorcev serumov analiziranih z imunofluorescenčno metodo ..	42
Tabela XVI: Rezultati 737 vzorcev serumov analiziranih z metodo imunoblot.....	43
Tabela XVII: Število/delež analiziranih vzorcev seruma IgM z metodo imunoblot.....	44
Tabela XVIII: Število analiziranih vzorcev serumov v katerih smo dokazali protitelesni odziv na protein OspC	45
Tabela XIX: Število/delež analiziranih vzorcev seruma IgG z metodo imunoblot.....	46
Tabela XX: Število analiziranih vzorcev serumov v katerih smo dokazali protitelesni odziv na protein p18	47
Tabela XXI: Primerjava rezultatov presejalnega testiranja protiteles IgM v serumu bolnikov z encimskoimunskim in imunofluorescenčnim testom	49
Tabela XXII: Primerjava rezultatov presejalnega testiranja protiteles IgG v serumu bolnikov z encimskoimunskim in imunofluorescenčnim testom	50
Tabela XXIII: Primerjava rezultatov encimskoimunskega in imunofluorescenčnega testa pri določanju protiteles IgM v serumu bolnikov	52

Tabela XXIV: Primerjava rezultatov encimskoimunskega in imunofluorescenčnega testa pri določanju protiteles IgG v serumu bolnikov.....	53
Tabela XXV: Primerjava rezultatov protiteles IgM med encimskoimunskim testom in testom imunoblot	54
Tabela XXVI: Primerjava rezultatov protiteles IgM med imunofluorescenčnim testom in testom imunoblot	55
Tabela XXVII: Primerjava rezultatov protiteles IgG med encimskoimunskim testom in testom imunoblot	56
Tabela XXVIII: Primerjava rezultatov protiteles IgG med imunofluorescenčnim testom in testom imunoblot	57

SEZNAM OKRAJŠAV

Ab – protitelo

Ag – antigen

ACA – kronični atrofični akrodermatitis (*angl.* Acrodermatitis Chronica Atrophicans)

BSA – goveji serumski albumin

CDC – Center for Disease Control

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

DNA – deoksiribonukleinska kislina (*angl.* deoxyribonucleic acid)

EM – erythema migrans

EUCALB – European Union Concerted Action On Lyme Borreliosis

EIT – encimskoimunski test

ELFA – encimskoimunski fluorescenčni test (*angl.* Enzyme Linked Fluorescent Assay)

ELISA – encimskoimunski test (*angl.* Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

FITC – fluorescein izotiocianat

HSP – stresne beljakovine (*angl.* heat shock proteins)

IFT – imunofluorescenčni test

IgM – imunoglobulin razreda M

IgG – imunoglobulin razreda G

IVD – In Vitro Diagnostic Medical Device

kDa – kilodalton

LB – bolezen lymska borelioza

MIT – metilizotiazolinon (konzervans)

Osp – zunanja površinska beljakovina (*angl.* outer surface protein)

pH – merilo za koncentracijo protonov v raztopini (*angl.* potential hydrogen)

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

PBS – fosfatni pufer (*angl.* Phosphate buffer saline)

RFV – relativna fluorescenčna vrednost

SPR – nastavek oz. trden nosilec za pipetiranje (*angl.* solid phase receptacle)

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin

UV – ultravijolična svetloba

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

POVZETEK

Okužba z bakterijo *Borrelia burgdorferi* sensu lato je zoonoza in ena od najpogostejših vektorsko prenosljivih bolezní. Vektor je okužen klop, ki z ugrizom prenese okužbo na človeka. Bolezen lymska borelioza (LB), ki jo okužba z borelijo povzroča, je razširjena po severni polobli in sovpada z razširjenostjo njenih prenašalcev, trdoščitastih klopov iz rodu *Ixodes*. Na našem področju predstavlja LB velik javno-zdravstveni problem, saj se glede možnosti okužbe z borelijami in glede obolevnosti za LB Slovenija uvršča v sam evropski vrh.

Lymska borelioza se pri človeku izraža z zelo raznolikim spektrom bolezenskih znakov, med njimi je najpomembnejši kožna sprememba *erythema migrans* (EM). Erythema migrans je tako značilna, da omogoča zanesljivo klinično diagnozo zgodnje borelijske okužbe, brez laboratorijskega dokaza povzročitelja. Velikokrat pa se okužba pokaže z bolezenskimi znaki, ki nakazujejo borelijsko etiologijo ali pa so za borelijsko okužbo celo povsem neznačilni in prav pri teh je mikrobiološka potrditev okužbe nujno potrebna. V vsakdanji praksi predstavlja najbolj enostaven način za laboratorijsko diagnostiko borelijskih okužb serološko dokazovanje prisotnosti specifičnih borelijskih protiteles.

Namen magistrske naloge je bil primerjati dva različna presejalna testa: avtomatiziran encimskoimunski test - VIDAS[®]Lyme in imunofluorescenčni test - IFT *Borrelia*, s katerima smo v serumih bolnikov določali prisotnost specifičnih protiteles IgM in IgG. V raziskavo smo vključili 3.256 vzorcev bolnikov, ki so bili v našem laboratoriju zaradi suma na borelijsko okužbo testirani v obdobju od oktobra 2011 do oktobra 2014. Naredili smo primerjavo med rezultati, ki smo jih dobili s presejalnima testoma in potrditvenim testom ter ovrednotili uporabnost posamezne metode. Rezultati testiranih vzorcev z obema presejalnima testoma so se med seboj razlikovali. Z imunofluorescenčnim testom smo dobili statistično pomembno več serološko pozitivnih in mejnih vzorcev. Pozitivne in mejne rezultate smo nato potrjevali s potrditvenim testom imunoblot in ugotovili, da je bilo ujemanje rezultatov potrditvenega testa imunoblot z encimskoimunskim testom signifikantno boljše kot ujemanje z imunofluorescenčnim testom, tako pri določanju protiteles IgM, kot tudi protiteles IgG. Pri ugotavljanju skladnosti rezultatov pri 126 vzorcih, ki smo jih testirali hkrati z obema presejalnima testoma, smo ugotovili skladen rezultat encimskoimunskega in imunofluorescenčnega testa v 51,60 % za protitelesa IgM in v 59,52 % za protitelesa IgG. Vse neskladne rezultate med encimskoimunskim in

imunofluorescenčnim testom smo testirali še s potrditvenim testom imunoblot, s katerim smo ugotovili signifikantno boljše ujemanje z encimskoimunskim testom (v 85,20 % za protitelesa IgM in v 84,30 % za protitelesa IgG) kot z imunofluorescenčnim testom (v 26,20 % za protitelesa IgM in v 27,50 % za protitelesa IgG).

Razlike med rezultati seroloških testov nastanejo zaradi različne metodologije posameznega testa in predvsem zaradi uporabe različnih kombinacij rekombinantnih borelijskih proteinov kot antigenov. Te razlike nas opozarjajo tudi na to, da je izvajanje testov zahtevno in da je rezultate potrebno vrednotiti skupaj s klinično sliko bolnika.

Ključne besede: bakterija *Borrelia burgdorferi* sensu lato, borelijska okužba, lymška borelioza, encimskoimunski test, imunofluorescenčni test, potrditveni test imunoblot

ABSTRACT

The infection with bacteria *Borrelia burgdorferi* sensu lato is one of the most recurring vector-borne diseases in the Northern Hemisphere. Lyme disease (LD) or borreliosis is an infectious zoonotic disease, transmitted to humans by the bite of an infected carrier (vector), a tick of the genus *Ixodes*. Considering the possibilities of an infection with Lyme disease and its actual incidence, Slovenia is placed highly on the top of European countries.

Lyme disease can affect multiple body systems and produce a broad range of symptoms. The most important sign of an infection with *B. burgdorferi* is a circular, outwardly expanding skin rash called *erythema migrans* (EM). Erythema migrans is so typical for the disease that no proof of agent is needed for diagnose in this early stage. However, not all patients with Lyme disease have all symptoms, and many of the symptoms are not specific for Lyme disease; in such cases the microbiological confirmation of infection with borrelia is essential. Serological testing is performed to detect specific antibodies to borrelia antigens and is currently the easiest way for laboratory detection of LD.

The purpose of this work is to compare two different screening tests: VIDAS® Lyme, an automated enzyme immunoassay, and IFA *Borrelia*, an immunofluorescence assay. The two tests are used to detect specific antibodies (IgM and IgG) in the serum of patients with LD. The research is based on 3.256 samples from the patients that were tested in our laboratory from October 2011 to October 2014, for the suspected infection with *borrelia*. We compared results from both tests and critically evaluated each method. The two methods gave different results; the immunofluorescence assay gave statistically important more serologically positive and borderline results. We then took a second step and tested the positive and the borderline results with the confirmatory immunoblot test. We found out that the results obtained from the immunoblot testing corresponded much better, both in detecting IgM and IgG antibodies, with the results from the enzyme immunoassay than with those from the immunofluorescence testing. We also tested 126 samples simultaneously with both screening tests to evaluate the uniformity of the results. We found out that the results of the enzyme immunoassay and the immunofluorescence assay are concordant in 51,60 % for the IgM antibodies and in 59,52 % for the IgG antibodies. Next we tested samples where the results of the enzyme immunoassay and the results of the immunofluorescence assay didn't match. We used the confirmatory immunoblot test

and found that the results of the immunoblot testing again corresponded much better with the results from the enzyme immunoassay (in 85,20 % for the IgM antibodies and in 84,30 % for the IgG antibodies) than with the results from the immunofluorescence assay (in 26,20 % for the IgM antibodies and in 27,50 % for the IgG antibodies).

In conclusion, serological tests differ: the methodologies of serological tests vary, and more importantly, there are different combinations of recombinant borrelia proteins that are used as antigens. The tests require a skilled laboratory personal, plus, it is essential to interpret the results from the tests according to the clinical diagnosis of the patient.

Key words: bacteria *Borrelia burgdorferi* sensu lato, borrelia infections, Lyme disease, enzyme immunoassay, immunofluorescence assay, confirmatory immunoblot test

1 UVOD

Lymska borelioza (LB) je zoonoza, ki jo povzroča bakterija *Borrelia burgdorferi*. Borelije se na človeka prenašajo z ugrizom okuženega klopa (1). Ime lymska je dobila v poznih 70 – tih letih prejšnjega stoletja, ko se je po okrožju Lyme v ZDA bolezen začela pojavljati v epidemični obliki. Etiologija borelij je znana od leta 1982, ko je W. Burgdorfer prvič odkril spirohete v klopah (1). Leta 1984 so bakterije natančneje identificirali in poimenovali *Borrelia burgdorferi* (2).

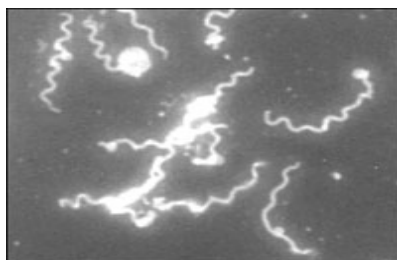
1.1 ZNAČILNOSTI IN TAKSONOMSKA UREDITEV BORELIJ

1.1.1 Taksonomska ureditev

Borelije zaradi njihovih morfoloških, strukturnih in genomskih lastnosti uvrščamo v posebno taksonomsko vejo. Prištevamo jih k redu *Spirochaetales*, družini *Spirochaetaceae* in rodu *Borrelia*. Znotraj rodu ločimo borelije, ki pri človeku lahko povzročajo dve bolezni: povratno mrzlico (prenašajo jo mehki usnjati klopi iz rodu *Ornithodoros* spp.) in lymsko boreliozo (prenašajo jo trdoščitasti klopi iz rodu *Ixodes* spp.). Na osnovi analize borelijske DNA je do sedaj opisanih 19 borelijskih vrst, ki jih skupaj imenujemo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sensu lato – v širšem pomenu) (2, 3, 4, 6). Med njimi je vsaj šest borelijskih vrst, ki so za človeka patogene (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. bavariensis*, *B. spielmanii*, *B. lusitaniae*, *B. bisettii*) in borelijske vrste, ki so jih našli v klopah, za katere pa še ni znano, da bi povzročale okužbe na ljudeh (*B. valaisiana*, *B. americana*, *B. andersonii*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. sinica*, in ostale) (7).

1.1.2 Značilnosti borelij

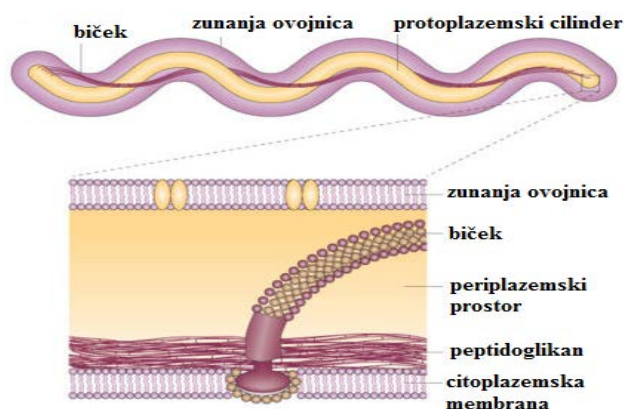
Borelije so spiralno zavite po Gramu negativne bakterije. Najlažje jih opazujemo z mikroskopiranjem v temnem polju (slika 1). Kot izredno gibljive spirohete so široke od 0,2 do 0,3 μm in dolge 5 do 30 μm (4). Njihova dolžina je odvisna od starosti bakterije, količine hranilnega medija ter okolja v katerem se borelije nahajajo (gojišče, gostitelj) (13).



Slika 1: *Borrelia burgdorferi sensu lato* v temnem polju (16)

Celotno bakterijo obdaja zelo elastična struktura imenovana zunanja ovojnica oz. membrana (13). To je triplastna stuktura (Slika 2), ki obdaja periplazemski prostor z bički, peptidoglikanom in protoplazemskim cilindrom (4, 13).

Zunanja membrana je močno fluidna, pri nekaterih izolatih prekrita z amorfno sluzasto plastjo in vsebuje posamezne trans-membranske beljakovine in zelo veliko zunanjih površinskih beljakovin od OspA do OspF (Outer surface protein). Proteini Osp so obrnjeni navzven in so nosilci poglavitnih borelijskih antigenov, ki ob stiku s človeškim imunskim sistemom sprožijo nastajanje specifičnih protiteles (2, 12, 14).



Slika 2: Borelijska struktura (15)

Borelije se premikajo s svedrastim zvijanjem, se obračajo in upogibajo na mestu. Takšno gibljivost jim omogočajo notranji bički oz. endoflageli, ki se nahajajo v periplazemskem prostoru (prostor med zunanjo in citoplazemsko membrano) (13). Bički segajo od enega do drugega konca borelij, se raztezajo vzdolž celične osi in se na sredini celice prekrivajo (4). Običajno se njihovo število razlikuje med posameznimi vrstami borelij in se giblje med 7 do 14 bičkov (2, 4, 11). Obliko in trdnost borelijski celici daje tanek sloj peptidoglikana, ki se nahaja nad plazmalemo (9, 11, 13). Plazmalema je celična membrana,

ki obdaja citoplazmo bakterijske celice. Skupaj s peptidoglikanom oblikujeta protoplazemski cilindri v katerem najdemo kromosom, plazmide in ribosome (9, 11). Borelije so edine med spirohetami, ki imajo linearni kromosom. Le – ta je ključnega pomena pri identifikaciji borelijske vrste. Je eden najmanjših opisanih kromosomov, velik približno 1 Mb (4, 12). Na linearnem kromosomu so tudi zapisi genov za flagelin (p41), beljakovino p83/100 ter stresne beljakovine (HSP – Heat shock proteins) (9). Poleg kromosoma pa se v citoplazmi nahaja tudi več krožnih in linearnih plazmidov, ki sestavljajo velik del borelijskega genoma (2, 3, 8, 10). Plazmidi nosijo zapis za razne beljakovine zunanje ovojnice (11). Največji linearni plazmid (lp54) nosi zapis za dva zunanja površinska proteina OspA in OspB, ki se nahajata na istem operonu (10). Na različnih krožnih plazmidih pa se nahajajo genetski zapisi za ostale zunanje površinske beljakovine Osp (C, D, E, F) (10, 11).

Borelije so mikroaerofilne bakterije, ki najbolje rastejo v anaerobnih pogojih pri temperaturi od 30 °C do 34 °C. So počasi rastoče, biokemično neaktivne bakterije, njihov generacijski čas niha od 7 do 20 ur, odvisno od prilagojenosti na umetno gojišče (2, 3). Gojimo jih v posebnem tekočem gojišču (modifikacije osnovnega Kellyjevega gojišča), obogatenu z dodatkom zajčjega seruma, govejih albuminov in želatine (3, 4).

1.1.3 Borelijski antigeni

Borelijski sevi se med seboj razlikujejo po vrsti izraženih beljakovin in po količini posameznih beljakovin na katerih se nahajajo antigenske determinante, ki pri okuženih osebah sprožijo nastajanje specifičnih protiteles (12). Antigenska heterogenost borelij in različna ekspresija površinskih beljakovin sta pomembna dejavnika za preživetje borelij, tako v klopu, ki je vektor, kot v gostitelju. S spreminjanjem površinskih antigenov se borelije izognejo imunskemu odzivu gostitelja, kar omogoča obstoj borelij in razvoj kroničnega poteka bolezni (4, 18).

Borelijski flagelin (p41) je osnovna komponenta bičkov z molekularno maso 41 kDa. Nahaja se v periplazmatskem prostoru (9). Je eden izmed najbolj imunodominantnih antigenov, ki pri okuženih ljudeh sproži zgodnji imunski odziv (nastanek prvih protiteles). Strukturno je flagelin borelij podoben flagelinu drugih bakterij, ki se prav tako gibljejo z bički (treponeme, bacili), kar je poglavitni vzrok navzkrižne reaktivnosti in lažno pozitivnih rezultatov pri serološkem testiranju okužbe z borelijami (9, 12, 13).

Površinski lipoproteini so potrebni za vzdrževanje strukture borelijske membrane, nekateri od njih sodelujejo pri encimskih reakcijah, drugi pa pri prehodu skozi membrano (9, 12). Poglavitni imunodominantni površinski lipoproteini so OspA, OspB in OspC. Proliferacija protiteles proti antigenom OspA in OspB je značilna za bolnike s poznimi okužbami, medtem ko pri bolnikih z zgodnjo obliko bolezni navadno najdemo le protitelesa proti proteinu OspC (11, 21).

Antigeni, ki so na boreliji izraženi med kolonizacijo v klopu

Proteina OspA in OspB se izražata med kolonizacijo borelij v prebavnem traktu nehranjenega klopa in borelijam omogočata obstoj v klopu (18). Njuna molekulska masa variira od 31 do 34 kDa - glede na borelijsko vrsto (19). Delita si visoko stopnjo podobnosti (50 % ujemanje v sekvenci) in tudi podobno zgradbo (18). Genski zapis za proteina OspA in OspB je shranjen na velikem linearnem plazmidu (lp54) (22). Protein OspA ima pomembno vlogo pri pritrditvi borelije v prebavnem traktu klopa (18). Veže se na plazminogen, kar je pomembno za razsoj borelij po gostiteljevem telesu (22). Izražanje genov za protein OspA se med življenjskim ciklom borelij spreminja. Ko se mikrob nahaja v prebavnem traktu nehranjenega klopa, pride do povečane ekspresije gena OspA. Ko se klop hrani in pridejo borelije v stik s gostiteljevo krvjo, pa pride do regulacije gena OspA in izražanja proteinov OspC na površini. Sočasno pride tudi do prehoda borelij iz klopovega prebavnega trakta v slino (19). Identificiranih je bilo 8 različnih serotipov OspA. Analize fenotipskih lastnosti in genetskih markerjev so pokazale korelacijo med serotipi OspA in veljavno klasifikacijo *B. burgdorferi* sensu lato. Serotip OspA 1 predstavlja *B. burgdorferi* sensu stricto, serotip 2 predstavlja *B. afzelii* in *B. japonica*, serotipi od 3 do 8 pa *B. garinii* (19). Protein OspA je zanimiv za razvoj cepiva proti borelijam.

Molekula OspD je lipoprotein z molekulsko maso 28 kDa, gen zanj je kodiran na plazmidu lp38. Ekspresija tega proteina se poveča takoj po hranjenju klopa, zavora ekspresije pa je odvisna od temperature in signalov gostitelja (18). Borelije beljakovino OspD izražajo v zgodnih fazah bolezni in tudi v prvih nekaj in vitro pasajah, zato prevladuje mnenje, da je beljakovina OspD pomemben virulenčni dejavnik borelij. Z večanjem števila pasaž se plazmid, ki kodira protein OspD izgubi, s tem pa se izgubi tudi virulenca seva (9, 12).

Antigeni, ki imajo vlogo pri prehodu spirohet iz klopa v sesalca

Beljakovina OspC je lipoprotein z molekulsko maso 20 – 23 kDa in je pomemben virulenčni dejavnik, ki sproži nastanek specifičnih protiteles v zgodnji fazi okužbe z borelijami. Gen zanj se nahaja na krožnem plazmidu (cp27). Po 24 – 48 urah klopovega aktivnega hranjenja pride do zmanjšane produkcije proteina OspA in OspB, poveča pa se proizvodnja proteina OspC, ki pomaga pri prehodu borelij iz klopovega prebavnega trakta v slino, s katero borelije vstopijo v gostitelja (18, 20). Protein OspC je najpomembnejši, zelo imunogen in zelo specifičen antigen v zgodnji fazi okužbe z borelijami. Lahko izzove močan imunski odziv pri gostitelju, zato se v serologiji borelijskih okužb uporablja kot pomemben marker. Za razliko od OspA je OspC veliko bolj heterogen, saj se pri borelijskih vrstah v Evropi zaporedje aminokislin beljakovine OspC ujema v 70 – 74% (19, 22). Opisanih je 13 različnih serotipov OspC. Patogene za človeka so le borelije z določenim tipom OspC (22), predvsem pri *B. burgdorferi* sensu stricto (6 ustreznih serotipov OspC) in *B. afzelii* (4 serotipi OspC). Serotipizacija OspA in OspC omogoča enostaven pristop k analizi fenotipskih lastnosti med *Borrelia burgdorferi* sensu lato (19).

Vloga beljakovin OspE in OspF ni še povsem znana. Sta lipoproteina z molekulsko maso 19 kDa za OspE in 26 kDa za OspF (12). Gen za njun zapis se nahaja na krožnem (cp32) in linearnem plazmidu (lp56) (23). Tudi OspE in OspF igrata pomembno vlogo pri prehodu borelije iz klopa v gostitelja. Za borelijo predstavljata prilagoditev na zvišanje temperature okolja (v gostitelju) in gostiteljev protitelesni odziv na zgodnjo fazo okužbe (23).

Antigeni, ki so pomembni za adhezijo v celicah gostitelja

Dva borelijska proteina (adhezina) DbpA in DbpB (decorin – binding protein; Dbp), se vežeta na gostiteljev protein decorin, ki je proteoglikanska komponenta vezivnega tkiva, povezana s kolagenskimi vlakni. Proteina DbpA in DbpB posredujeta pri interakciji med borelijami in vezivnim tkivom. Gena zanju sta locirana na linearnem plazmidu lp54. Adhezina se nahajata na površini borelije. Njuna ekspresija se poveča ob znižanju pH in ob zvišanju temperature iz 23 °C na 37 °C, torej med infekcijo gostitelja. Glavno vlogo pa DbpA in DbpB odigrata v pozni fazi bolezni, predvsem med razsojem borelije in kronično infekcijo v tkivih z veliko decorina (18). Protein DbpA je specifični borelijski antigen, ki se uporablja v seroloških testih za dokazovanje pozne faze obolenja. Njegovo prisotnost so ugotovili pri velikem številu bolnikov z lymskim artritisom in nevroboreliozo (24).

Antigeni, ki so pomembni pri imunskem odzivu gostitelja

Borelija je zmožna dolgo preživeti v gostitelju, zato povzroča nastanek kronične okužbe. Da bi se izognila uničenju zaradi aktiviranja gostiteljevega imunskega sistema, je razvila več obrambnih strategij. Ena takih je antigenska variacija površinskih proteinov. Pomemben je protein VlsE (variable major protein-like sequence), velik 35 kDa. Gen zanj je kodiran na lp28-1 plazmidu (18). Protein VlsE je sestavljen iz variabilnih in visoko konzervativnih (ohranjenih) regij. Variabilne regije so nameščene na zunanjem, oddaljenem delu proteina in zakrivajo ohranjene regije pred dostopom gostiteljevega imunskega sistema. Po vstopu borelije v gostitelja VlsE v variabilni regiji stalno, dokler je borelija živa, spreminja na svoji površini izražene epitope in tako poskuša preprečiti, da bi jo imunski sistem gostitelja prepoznal in odstranil (18). Po uničenju borelijske celice imunski sistem gostitelja prepozna proteine VlsE v celoti in to izzove tvorbo protiteles proti ohranjenim oz. nespremenljivim delom (regijam) proteina VlsE (18, 71). Imunski sistem gostitelja se močno odzove na prisotnost proteina VlsE, zato mnogi raziskovalci menijo, da je protein VlsE ravno zaradi svoje ohranjenosti in imunogenosti med najbolj uporabnimi v diagnostiki borelijskih okužb, saj ga imajo vsi patogeni genotipi borelij (24, 71). Protitelesa proti VlsE tako lahko odkrijemo pri bolnikih, okuženih s katerikoli genotipom borelij in je tveganje za lažno pozitivne rezultate 10× manjše, kot pri uporabi drugih antigenov (24).

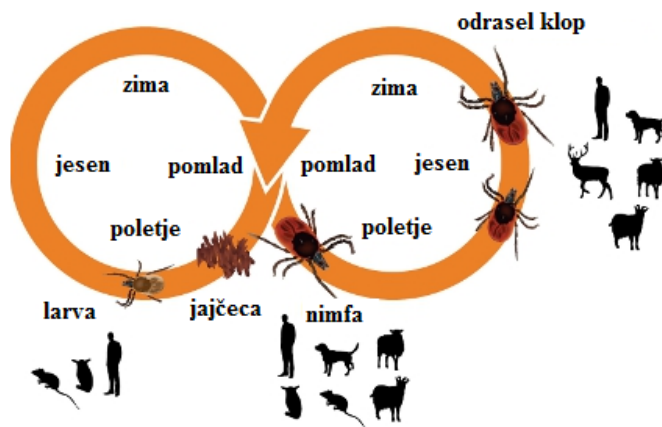
Poleg opisanih antigenov med specifične borelijske antigene uvrščamo tudi kromosomsko kodirani beljakovini p83/100, z molekulsko maso 83 – 100 kDa in p39, z molekulsko maso 39 kDa. Nahajata se v celični citoplazmi in ju borelije izražajo v majhnih količinah. Imata specifične lastnosti, vendar njuna vloga ni še povsem znana. Protitelesa, ki nastajajo proti antigenom p83/100 in p39, pogosteje zaznamo pri bolnikih s kronično borelijsko okužbo (12).

Borelije na svoji površini izražajo antigene, ki pripadajo skupini stresnih proteinov («heat shock» proteini), velikosti od 58 – 60 kDa. Zanje je značilno, da jih bakterije izražajo v velikih količinah pod določenimi pogoji. Ti antigeni sprožijo nastanek protiteles, ki lahko reagirajo s podobnim antigenom različnih bakterijskih vrst, zato je možnost navzkrižnih reakcij velika (4, 17).

1.2 PRENAŠALCI BORELIJ

Najpogostejši prenašalci borelij v Evropi in tudi v Sloveniji so klopi vrste *Ixodes ricinus* (28). Ista vrsta klopa je pomembna tudi pri širjenju infekcije z virusom klopnega meningoencefalitisa. Izjema je le slovenska Istra, kjer poročajo o pojavljanju klopa *Rhipicephalus*, ki najpogosteje prenaša rikecije (22, 35).

Življenjski krog klopa traja približno 2 – 3 leta, v predelih s hladnejšim podnebjem pa lahko 5 – 6 let. Klop se z borelijami okuži ob sesanju krvi okuženega gostitelja. Ob hranjenju pridejo borelijske spirohete v klopovo črevo in tam mirujejo do naslednjega hranjenja, kar je lahko dolgo časa. Ko klop naslednjič sesa kri, se borelije začnejo razmnoževati in iz klopovega črevesja preidejo v žleze slinavke. Na tak način borelije pridejo s klopovo slino v novega gostitelja in ga okužijo. Klopi se lahko okužijo na katerikoli razvojni stopnji (jajčeca, ličinke, nimfe, odrasli klopi) in nato ostanejo okuženi vse življenje (2, 36). Z daljšim sesanjem klopa na gostitelju se večata verjetnost prenosa borelij z gostitelja na klopa in obratno (36).



Slika 3: Klop - Življenjski krog (39)

Ob vsakem naslednjem hranjenju se klopi lahko dodatno okužijo še z drugo vrsto borelije, zato pri odraslem klopju najdemo mešano populacijo borelij, ki jih klop lahko prenaša na drugo žival ali na človeka. Za patologijo pri človeku so pomembni le tisti klopi, ki lahko parazitirajo na njem in ga s tem okužijo (7, 12). Borelije so se sposobne prilagoditi različnim gostiteljem, saj se pri njihovem prenosu iz enega na drugega gostitelja aktivirajo geni, ki borelijam omogočajo preživetje v novem okolju (4, 36, 44). Do prenosa borelij iz

okuženega klopa v gostitelja praviloma pride šele potem, ko je klop prisedan več kot 24 ur. Pri delno hranjenih klopih, ki imajo borelije v žlezah slinavkah, lahko do prenosa borelij pride že v nekaj urah (7 – 12 ur) (6, 36, 38).

V okuženih klopih se borelije lahko ohranijo skozi vse razvojne stopnje od larve, ki se nato preobrazi v nimfo, le – ta pa v odraslega klopa (slika 4).



Slika 4: Razvojne stopnje klopa (40)

Pred vsako preobrazbo klop potrebuje krvni obrok, zato v svojem življenjskem krogu potrebujejo vsaj tri različne gostitelje. Ličinke klopov (larve) in nimfe praviloma sesajo na majhnih sesalcih, plazilcih, glodalcih in pticah. Najpomembnejši med njimi sta gozdna voluharica in rumenogrla miš (27, 36, 41, 43). Ptice pa so pomemben rezervoar za geografsko širjenje borelij na dolge razdalje (42). Odrasli klopi raje gostujejo na večjih toplokrvnih divjih (srnjad) in domačih živalih (govedo, prašiči, psi, mačke). V tem krogu je človek le naključni gostitelj (36).

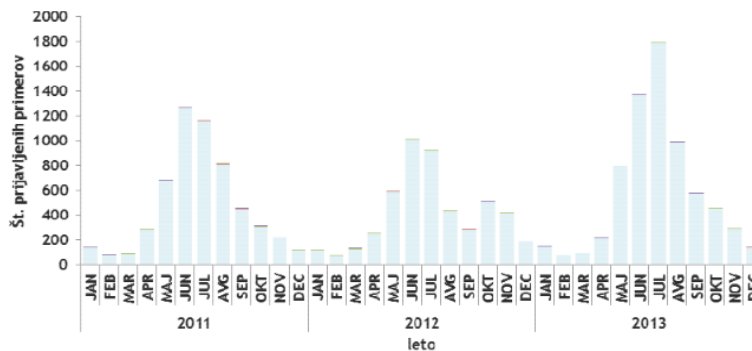
Za klopovo preživetje v naravi je najugodnejše toplo, z vlago nasičeno okolje (vsaj 80 % relativna zračna vlaga): vlažni listnati gozdovi z bogato grmičasto podrastjo, nizko rastlinstvo na obrobju gozdov, pašniki, travniki in žive meje. Klopi so veliki okoli 2 do 3 mm, napiti s krvjo pa dosežejo velikost tudi do 10 ali več mm (35, 43). Klopi sesajo pri temperaturi med 23 °C in 27 °C, zato se njihova aktivnost poveča od pozne pomladi (maj, junij) do zgodnje jeseni (september, oktober) (36). Pri nižjih temperaturah od 5 °C do 7 °C, klopi mirujejo (37).

1.3 EPIDEMIOLOGIJA IN RAZŠIRJENOST BORELIJ

Lymfska borelijoza (LB) je najbolj pogosta infektivna bolezen razširjena skoraj po vsem svetu (27). Geografsko se pokriva s področjem razširjenosti njihovih poglavitnih vektorjev, ščitastih klopov, med 33° in 65° severne širine. Zato v tem pasu najdemo več borelijskih vrst, ki so patogene za človeka in tudi take, za katere patogenost za človeka še ni bila dokazana. Ugotovili so, da na različnih geografskih področjih prevladujejo določene vrste borelij, ki jih prenašajo značilni klopi tega področja (4). To je verjetno poglavitni vzrok, da se okužba pri človeku izraža s širokim spektrom kliničnih slik. V Evropi in Sloveniji najdemo za človeka patogene naslednje borelijske vrste (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. burgdorferi* sensu stricto, redkeje pa *B. spielmannii*, in *B. bissettii*) (6, 33).

V Sloveniji LB velja za endemično bolezen. Spremljamo jo že od leta 1986 na podlagi obvezne prijave. Bolezen LB se pojavlja sezonsko, največ obolenj je od spomladi do jeseni, v povezavi z aktivnostjo klopov. Incidenca v letu 2013 je bila 558 primerov na 100.000 prebivalcev in z leti narašča (26). Slika 5 prikazuje število prijavljenih primerov LB po mesecih v obdobju med leti 2011 in 2013. Najbolj sezonsko pogojeni so zgodnji znaki bolezni, saj je bila večina bolnikov prijavljena z diagnozo *erythema migrans* (EM) (29, 30, 32). Ker se bolezenski znaki oz. posamezni stadiji bolezni lahko pojavijo tudi več mesecev po okužbi, se primeri bolnikov pojavljajo tudi izven sezone aktivnosti klopov (26). Zbolevajo tako moški kot ženske vseh starostnih skupin, zlasti tisti, ki so bolj izpostavljeni klopom (6, 26, 34).

V Sloveniji so okuženi klopi predvsem v gozdovih Gorenjske in Štajerske, nekoliko manj na Notranjskem, Kočevskem in novomeškem območju (33). Podatki kažejo, da je v Sloveniji z borelijami okuženih skoraj polovica vseh klopov. Odrasli klopi so v povprečju pogosteje okuženi kot zgodnejše razvojne oblike klopov (nimfe, larve). V okuženih klopih so najpogosteje našli borelijski vrsti *B. afzelii* in *B. garinii*, precej manj pa *B. burgdorferi* sensu stricto in *B. valaisiana* (4). Najvišja prijavna incidenca LB v letu 2013 je bila v kranjski regiji (528 primerov okužb na 100.000 prebivalcev) sledijo ji novogoriška, dolenska, celjska, koroška in ostale regije (26).



Slika 5: Število prijavljenih primerov borelijskih okužb po mesecih, Slovenija 2011-2013 (26)

1.4 KLINIČNA SLIKA BORELIJSKIH OKUŽB

Patogeneza okužb z borelijami je zapletena in še vedno slabo pojasnjena. Glede na delež okuženih klopov in pogostost vbodov je borelioz razmeroma malo. Vsak vbod okuženega klopa še ne pomeni prenosa okužbe na gostitelja. Do prenosa borelij iz okuženega klopa na gostitelja praviloma pride šele tedaj, ko je klop prisesen vsaj 24 ur (6). Vendar pa so opisani tudi primeri okužbe, ko je bil klop prisesan manj kot 24 ur (32). Za prenos okužbe so bolj nevarne nimfe kot odrasli klopi, čeprav so le – te okužene v manjšem številu. Velike so približno 1 mm, zato jih težje opazimo in lahko ostanejo prisesane dalj časa, medtem ko so odrasli klopi veliki od 2 do 5 mm in so bolj vidni, kar povečuje možnost, da jih po vbodu hitreje opazimo in odstranimo (6, 45).

Okužbe z borelijami prizadenejo številne organske sisteme in imajo zelo raznolik potek. Narava bolezni je delno odvisna od vrste povzročitelja: *B. afzelii* najpogosteje povzroča kožne spremembe (EM, ACA), *B. garinii* največkrat povzroča okvare centralnega živčevja (nevroborelioza) ter *B. burgdorferi* sensu stricto (najbolj razširjena v ZDA) okvare sklepov (arthritis) (5, 6).

Po vbodu okuženega klopa borelije pridejo v kožo. Kožne spremembe, ki se pojavijo po 1 do 3 tednih na mestu vboda so običajno odraz lokalnega širjenja povzročitelja po koži. Takrat govorimo o zgodnji lokalizirani okužbi. Značilna kožna sprememba za to obdobje je *erythema migrans* (EM) (slika 6). Na mestu vboda okuženega klopa se v nekaj dneh do

nekaj tednov pojavi značilen obročast izpuščaj z bledo sredino, rožnatim robom in pogosto vidnim mestom vboda. Obročast izpuščaj se postopoma širi, zato ga imenujemo migrirajoči eritem (46). Kožna sprememba na dotik ni boleča, lahko peče ali srbi, hkrati pa se lahko pojavijo drugi, bolj splošni znaki okužbe: slabo počutje, utrujenost, glavobol, bolečine v sklepih in mišicah. Kožni izpuščaj običajno traja od nekaj dni do nekaj tednov, lahko tudi mesecev, kasneje pa tudi brez zdravljenja izgine (46).



Slika 6: *Kožna sprememba – erythema migrans (EM) (49)*

Med zgodnjo lokalizirano obliko LB štejemo tudi borelijski limfocitom, ki je bistveno redkejši od EM. Pojavi se kot do nekaj cm velika modrikasto rdečkasta, mehka in neboleča oteklina na ušesni mečici, uhlju, prsni bradavici, mošnji in redkeje drugje na koži. Nastane kot posledica benigne, poliklonske proliferacije limfocitov B v koži kot imunski odziv na okužbo z borelijo (47). Borelijski limfocitom je značilen samo za okužbe v Evropi (6).

Znaki zgodnjega razsoja okužbe (diseminirana okužba) se pojavijo v nekaj tednih ali mesecih po vbodu okuženega klopa, ko se borelije hematogeno in limfogeno raztrosijo po vsem organizmu. Razsoj borelij se kaže s prizadetostjo: **kože** (multipli EM – kožne spremembe podobne primarnemu EM, vendar so manjše in se počasneje širijo), **perifernega in/ali osrednjega živčevja** (lymska nevborelioza – meningitis, redkeje encefalitis, vnetje možganskih živcev, pareza obraznega živca), **skeletno – mišičnega sistema** (artralgije, kratkotrajni artritis, prizadeti predvsem veliki sklepi – zlasti kolenski), **srca** (spreminjajoči atrio – ventrikularni blok, miokarditis), **oči** (spremembe so redke, najpogostejši je konjunktivitis) (6, 48). Pri nezdravljeni okužbi borelije vztrajajo v organih in organskih sistemih in povzročijo kronično oz. pozno okužbo. Kronična okužba se običajno razvije leto dni ali več po začetku bolezni in se kaže s kroničnimi spremembami kože, sklepov (dolgotrajni, kronični artritis) ali živčnega sistema (48). Najznačilnejša med njimi je kožna sprememba acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) (5). Gre za kasno borelijsko spremembo kože, ki ne izgine sama od sebe. Običajno se pojavi rdeče – modrikasto obarvana koža na zunanji strani rok ali nog in nato oteče. Vnetje sčasoma preide v atrofične spremembe na koži (50).

Značilno za borelijsko okužbo je, da je klinična slika redko popolna, saj je lahko potek bolezni različen in spremenljiv. To pomeni, da bolnik lahko zboli z eno samo pojavno obliko bolezni ali pa se lahko simptomi med različnimi stadiji bolezni celo prekrivajo. Včasih bolezen opazimo šele, ko je že v kasni fazi obolenja (51).

1.5 ZDRAVLJENJE IN PREPREČEVANJE BORELIJSKIH OKUŽB

Zdravljenje borelijskih okužb z antibiotiki (penicilin, tertaciklin, nekateri cefalosporini in makrolidi) je smiselno v vseh obdobjih bolezni in za vse njene klinične oblike, najbolj učinkovito pa je v zgodnji fazi (27). Izid antibiotičnega zdravljenja je odvisen od mesta, razširjenosti in trajanja kliničnih simptomov, od izbire in odmerka antibiotika, ter trajanja antibiotičnega zdravljenja in možnosti pojava neželenih učinkov (54). Za antibiotično zdravljenje se odločimo pri vseh bolnikih, ki imajo značilno klinično sliko LB (EM – v zgodnjem stadiju), ne glede na izvide seroloških preiskav ali drugih testov za dokaz borelijske okužbe. Zdravljenje zgodnje lokalizirane oblike bolezni je smiselno, ker z veliko verjetnostjo preprečimo razvoj borelij drugje po telesu in s tem preprečimo pojav poznejših kliničnih znakov LB oz. napredovanja bolezni (2). Pri bolnikih z neznačilnimi bolezenskimi znaki pa se za zdravljenje odločimo le v primeru, da je borelijska okužba serološko potrjena (53). Zdravljenje LB ni vedno uspešno. Neugoden izid zdravljenja je možen pri bolnikih s pozno LB, kjer so učinki antibiotičnega zdravljenja slabši in je verjetno posledica nepopravljivih poškodb tkiva (6). Možno je, da se borelije na uspešen način izmaknejo imunskemu odzivu gostitelja in delovanju antibiotikov tako, da vstopajo v celice in se tako umaknejo v predele, kamor antibiotiki bistveno slabše prodirajo (51, 53). Tekom okužbe lahko pride do spremembe strukture tkiv, ki jih obrambni odziv organizma ne prepozna za sebi lastne in posledično vodi v nadaljnje okvare tkiva zaradi avtoimunskih mehanizmov.

Za preprečevanje okužb z borelijami je najučinkovitejši ukrep osebna zaščita pred vbodom klopa. Pomembno je, da se ljudje, ki živijo v endemičnih predelih zavedajo nevarnosti okužbe in se primerno zaščitijo pred klopi (uporaba svetlih oblačil, kožnih repelentov, izogibanje predelom, kjer je veliko klopov) (2). Nevarnost za razvoj borelijske okužbe je razmeroma majhna, zato je preventivno jemanje antibiotikov po vbodu klopa nesmiselno in ni priporočljivo (2, 27).

Cepiva proti LB v Evropi trenutno še ni (51). Najverjetnejši razlog za težave pri razvoju cepiva predstavljata antigenska heterogenost borelij tako med vrstami kot med sevi znotraj vrste ter različna geografska razširjenost za človeka patogenih borelijskih vrst v Evropi (2). Cepivo, ki je bilo na voljo v ZDA, je bilo narejeno iz rekombinantnega proteina OspA. To beljakovino borelije izražajo le v klopah in ne ko pridejo v gostitelja. Delovanje cepiva z rekombinantnim proteinom OspA temelji na tem, da cepljeni ljudje razvijejo protitelesa proti antigenom OspA, ki jih klop zaužije med hranjenjem. Protitelesa proti OspA se vežejo na borelije v prebavnem traktu klopa in jih v klopu uničujejo. S tem se prepreči prenos borelij v krvni obtok gostitelja (55, 56). Cepivo je vsebovalo le protein OspA borelije *B. burgdorferi* sensu stricto, torej za človeka patogena borelijska vrsta, ki je prisotna v Ameriki, zelo redka pa v Evropi in Aziji (27).

1.6 MIKROBIOLOŠKA (LABORATORIJSKA) DIAGNOSTIKA

Zanesljiva diagnoza okužb z borelijami je osnovana na epidemioloških in kliničnih podatkih, ki jih je mnogokrat potrebno dopolniti z mikrobiološkimi preiskavami (58, 59).

Borelijsko okužbo najpogosteje dokazujemo z naslednjimi metodami:

- osamitev *B. burgdorferi* sensu lato
- dokazovanje borelijske DNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)
- dokazovanje specifičnih protiteles, usmerjenih proti borelijskim antigenom (57).

1.6.1 Osamitev bakterije *B. burgdorferi* sensu lato

Osamitev in identifikacija borelij je kot neposredna tehnika najzanesljivejša diagnostična metoda, ocenjena kot »zlato standard«. Ker so borelije počasi rastoče bakterije in zelo zahtevne za kultivacijo, je osamitev borelij zahtevna in dolgotrajna. Za gojenje borelij so potrebna posebna tekoča gojišča (modificirano Kellyjevo gojišče). Optimalno rastejo pri temperaturi od 33 – 34 °C v mikroaerofilnih pogojih. Njihov generacijski čas je dolg (7 – 20 ur), zato izolacija borelij iz kliničnega vzorca traja več tednov (od 6 do 12) (2, 3, 59). Borelije tako pri zgodnji kot pri kronični okužbi najpogosteje uspešno osamimo iz kože bolnikov, manj pogosto pa iz likvorja, krvi in sklepne tekočine (57). Osamitev borelij je v veliko pomoč pri bolnikih, katerih klinična slika kaže na znake borelijske okužbe,

kljub odsotnosti specifičnih protiteles (npr.: atipični EM, akutna nevroborelioza ali LB pri imunsko oslabljenih osebah) (59). Osamitvi borelij sledi identifikacija izoliranega seva z molekularnimi metodami. Tako lahko spremljamo povezanost posameznih borelijskih vrst s klinično sliko okužbe in potekom bolezni (3, 57, 59).

1.6.2 Dokazovanje borelijske DNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

Dokazovanje borelijske DNA (bodisi kromosomske ali plazmidne) sodi med novejšje molekularne metode, ki jo uporabljamo za potrditev borelijske okužbe (57). Princip metode temelji na pomnoževanju določenih odsekov borelijske DNA v več kot milijon kopijah (60). Tako ojačen signal zanesljivo kaže na prisotnost patogene bakterije v vzorcu (61). Borelijsko DNA lahko neposredno dokažemo v različnih kliničnih vzorcih (koža, kri, likvor, sklepna tekočina) (57), vendar to še ne pomeni prisotnosti živega mikroorganizma, ker se namreč borelijska DNA po propadu bakterije v materialu lahko ohrani dlje časa (19, 57). V primerjavi z osamitvijo borelij je dokazovanje borelijske DNA zelo občutljiva in hitra metoda, vendar ni standardizirana (57). Uporabna je predvsem pri bolnikih, ki so bili že zdravljeni in pri katerih nam drugi testi niso v veliko pomoč (57).

1.6.3 Dokazovanje specifičnih protiteles

Borelijska okužba pri bolniku izzove specifični imunski odziv, ki vodi v nastanek protiteles (3, 59, 62). V primerjavi z večino drugih okužb izdelovanje specifičnih protiteles proti okužbi z borelijami poteka zelo počasi (6). Nastanek prvih specifičnih protiteles IgM zaznamo med 3. in 6. tednom po okužbi. Pogosto jih spremlja poliklonska proliferacija limfocitov B, kar lahko povzroči dvig celotnih serumskih protiteles IgM, tvorbo cirkulirajočih imunskih kompleksov in krioglobulinov (6, 63). Specifična protitelesa IgM so najpogosteje usmerjena proti flagelinu (p41) in površinskemu proteinu OspC. Količina protiteles IgM lahko ostane visoka med okužbo, nato pa po nekaj tednih začne upadati (3, 6, 59, 62, 63). Specifična protitelesa razreda IgG nastajajo v obdobju od nekaj tednov do mesecev po okužbi in obstanejo dlje časa (6). Specifična protitelesa IgG, ki so v prvi fazi prav tako usmerjena proti flagelinu (p41) (63), se kasneje s trajanjem okužbe usmerijo proti vse večjemu številu borelijskih antigenov, kot so OspA, OspB, OspC pa tudi p100, p39 in VlsE (64). Tvorba specifičnih protiteles IgG je pomembna, saj so potrebna za odstranjevanje borelij po klasični poti aktivacije komplementa (6). Borelije v tkivih

(sklepi, živčevje ali koža) lahko preživijo aktivni imunski odziv, saj svojo površino ovijejo s sluzjo in s tem prekrijejo in zaščitijo svoje proteine (6, 62). Imunski odziv na borelijske antigene je lahko odsoten, šibek ali zelo močan, odvisno od gostitelja in poteka borelijske okužbe (57). Odsoten ali šibek imunski odziv ugotavljamo pri bolnikih v zgodnji fazi okužbe in pri tistih, ki so bili pravočasno zdravljeni z antibiotiki. Odsotnost imunskega odziva ne pomeni odsotnosti borelijske okužbe, kakor tudi prisotnost protiteles ne pomeni, da je posameznika potrebno zdraviti (57, 59, 65). Le četrtnina bolnikov z zgodnjo obliko borelijske okužbe (EM) razvije protitelesa, medtem ko s trajanjem okužbe število seropozitivnih bolnikov narašča (57).

Borelije so v naravi fenotipsko in genotipsko različne in pri okuženi osebi izzovejo tvorbo specifičnih protiteles usmerjenih proti različnim borelijskim antigenom, ki jih izraža sev, ki je povzročil okužbo. Tako lahko pričakujemo dokaj različen imunski odziv (57, 62). Po v svetu uveljavljeni doktrini za dokazovanje specifičnih protiteles uporabljamo dvostopenjsko testiranje: imunofluorescenčni test (IFT) ali encimskoimunski test (ELISA, ELFA), kot presejalna testa oz. testa 1. stopnje in test imunoblot kot potrditveni test oz. test 2. stopnje (20). Specifična protitelesa razreda IgM in IgG dokazujemo v serumu in telesnih tekočinah (likvor, sklepna tekočina) bolnikov. Ker so testi že tovarniško pripravljene, enostavni in hitri ter IVD (In Vitro Diagnostic Medical Device) certificirani, klinični vzorci pa so lahko dostopni, je dokazovanje specifičnih protiteles najpogostejši način potrjevanja borelijske okužbe (57). Serološki testi se med seboj razlikujejo glede na izbiro seva borelije za antigen (vrsta borelije, sev znotraj vrste), po načinu priprave antigena (cela - nativna borelijska celica, prečiščeni ali rekombinantni antigeni) in po postopku izvajanja testa (62). Princip serološkega testiranja temelji na nastanku imunskega kompleksa med specifičnimi protitelesi razredov IgM in IgG ter borelijskimi antigeni (20). Na rezultate testov lahko vplivata tudi možnost navzkrižnih reakcij in različen imunski odziv bolnika (62). Vendar pa ima posamezni serološki test svoje prednosti in pomanjkljivosti. Ena od težav je antigenska strukturna podobnost borelij z drugimi bakterijami z bički. Flagelinski antigen (p41) je močan imunogen in povzroči nastanek velikega števila protiteles predvsem v zgodnji fazi okužbe, kar lahko privede do lažno pozitivnih rezultatov (57). Lažnim in navzkrižnim reakcijam se skušamo že pred samo izvedbo testa izogniti s predhodno absorpcijo seruma z absorbentom za spirohete (*T. phagedenis*), ki pa lahko onemogoči detekcijo nizkih titrov borelijskih protiteles (67, 68). Tudi visoka prekuženost v

Sloveniji predstavlja problem, saj sam dokaz specifičnih protiteles, brez spremljajočih znakov in simptomov okužbe še ne pomeni, da lahko postavimo diagnozo LB (62). Pomanjkljivost metod za serološko ugotavljanje borelijske okužbe je predvsem ta, da le-te še vedno niso standardizirane in da se razlikujejo po specifičnosti in občutljivosti (57). Zanesljivost pri dokazovanju borelijskih okužb povečujeta kombinirana raba več seroloških metod (dvostopenjsko testiranje) in uporaba rekombinantnih antigenov (OspA, OspC, VlsE, p100, p39, p18), ki jih v serološke teste vključujejo posamično ali v različnih kombinacijah. Tako je zmanjšano število lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov (3, 9, 57, 69). Zaradi naštetih dejavnikov sta izvajanje in interpretacija testov zahtevna, rezultate pa je potrebno vrednotiti skupaj s klinično sliko bolnika (57).

2 NAMEN DELA

V nalogi se bomo osredotočili na serološko testiranje okužbe z borelijo, ki ga izvajamo v Serološkem laboratoriju Oddelka za medicinsko mikrobiologijo Kranj, enega od oddelkov Centra za medicinsko mikrobiologijo Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano.

Borelijsko okužbo dokazujemo posredno, z dokazom bolnikovega specifičnega imunskega odziva na borelijske antigene. Odziv bolnika na borelijske beljakovine se kaže s tvorbo specifičnih protiteles razredov IgM in IgG, ki jih dokazujemo v serumu.

V serološkem laboratoriju izvajamo standardno dvostopenjsko testiranje, to pomeni da presejalne teste pri mejnem ali pozitivnem rezultatu potrjujemo še s testom imunoblot oziroma potrditvenim testom.

Določali bomo imunski odziv v serumih bolnikov, ki so bili z območja gorenjske regije v laboratorij poslani na testiranje zaradi suma na borelijsko okužbo. Izbrali bomo obdobje od oktobra 2011 do oktobra 2014. Med seboj bomo primerjali rezultate seroloških testov ter občutljivost in uporabnost posamezne metode.

Cilji naše naloge so:

- ugotoviti, kako se dobljeni rezultati vzorcev testiranih z dvema presejalnima testoma med seboj razlikujejo
- ugotoviti, ali je izvedba encimskoimunskega testa (Vidas®Lyme IgM and Vidas®Lyme IgG) enostavnejša in hitrejša v primerjavi z imunofluorescenčnim testom (IFT BORRELIA)
- ugotoviti, s katero presejalno metodo dobimo več rezultatov, ki so nato resnično pozitivni s potrditveno metodo
- ugotoviti, katera vrsta borelij je najpogostejša na območju gorenjske regije glede na vzorce, ki so bili v laboratoriju pregledani v obdobju od oktobra 2011 do oktobra 2014
- ugotoviti, ali smo s testom imunoblot pridobili še dodatne informacije o fazi bolezni in imunskem odzivu bolnika.

3 METODE IN MATERIALI

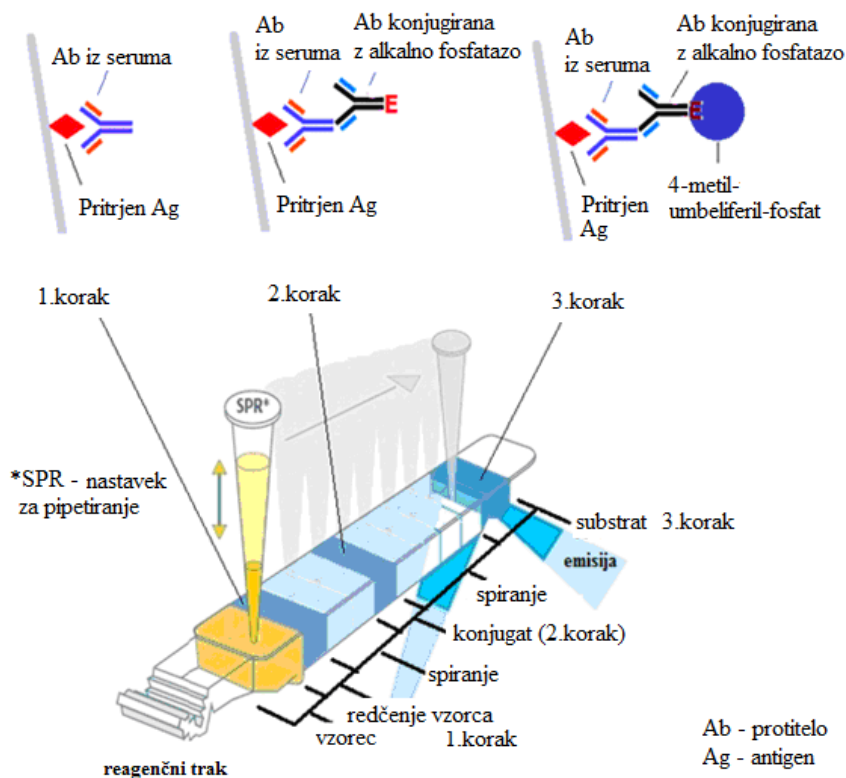
3.1 PRESEJALNO TESTIRANJE PRISOTNOSTI SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI BAKTERIJI *B. burgdorferi* V ČLOVEŠKEM SERUMU (1. Stopnja)

3.1.1 ENCIMSKOIMUNSKI TEST (EIT) – metoda ELFA (ang. *Enzyme Linked Fluorescent Assay*)

3.1.1.1 Princip testa

Vidas®Lyme IgM in Vidas®Lyme IgG (proizvajalca bioMerieux, Francija) je popolnoma avtomatiziran kvalitativen test za dokazovanje specifičnih protiteles razredov IgM in IgG proti bakteriji *B. burgdorferi* sensu lato v človeškem serumu. Princip testa temelji na dvostopenjski encimsko imunski metodi. Detekcija encimske aktivnosti je fluorescenčna (450 nm). Pri testu uporabljamo nastavek oz. SPR® (ang. *solid phase receptacle*), trden nosilec za pipetiranje, na katerega so pritrjeni specifični rekombinantni borelijski proteini, ki v testu delujejo kot antigeni (Ag).

V notranjosti nastavka za detekcijo specifičnih protiteles IgG so pritrjeni borelijski proteini VlsE, DbpA in OspC, v nastavku za detekcijo specifičnih protiteles IgM pa DbpA in OspC. Protitelesa iz bolnikovega seruma se vežejo na rekombinantne antigene znotraj nastavkov za pipetiranje. Po inkubaciji na 37 °C, ki omogoči vezavo antigen – protitelo, nevezane komponente vzorca speremo. Vezanim protitelesom iz vzorca seruma dodamo mišja monoklonska protitelesa, usmerjena proti človeškim IgM in IgG, konjugirana z encimom alkalna fosfataza. Sledi ponovna inkubacija, da bi se konjugat vezal na človeška protitelesa, nato pa ponovno spiranje, ki spere odvečni konjugat. Detekcija nastalih kompleksov poteka z dodatkom substrata (4–metil–umbeliferil–fosfat). Encim katalizira hidrolizo substrata v 4–metil–umbeliferon, katerega fluorescenco merimo pri 450 nm. Intenziteta fluorescence je sorazmerna količini vezanih kompleksov, torej tudi količini specifičnih protiteles IgM in IgG proti bakteriji *B. burgdorferi*, prisotnih v vzorcu seruma. Ko je test končan, aparat avtomatsko analizira izmerjene vrednosti in jih interpretira kot pozitiven, mejni ali negativen rezultat (Slika 7).



Slika 7: Princip encimskoimunskega testa: V notranjosti trdnega nosilca oz. nastavka za pipetiranje se bolnikova protitelesa med 1. inkubacijo vežejo na rekombinantne borelijske Ag (1. korak). Nastane kompleks Ag–Ab, če so v serumu prisotna protitelesa. Nevezane komponente se sperejo. Na kompleks Ag–Ab se med 2. inkubacijo vežejo sekundarna protitelesa, konjugirana z encimom alkalno fosfatazo (2. korak). Po inkubaciji se nevezane komponente sperejo. Detekcija nastalih kompleksov poteka z dodatkom substrata 4–metil–umbeliferil–fosfat. Alkalna fosfataza katalizira hidrolizo substrata 4–metil–umbeliferil–fosfat v 4–metil–umbeliferon. Fluorescenco merimo pri 450 nm (3. korak) (74).

3.1.1.2 Priprava vzorcev

Polno kri po odvzemu pustimo na sobni temperaturi približno 1 uro, da koagulira. Nato jo centrifugiramo 10 min pri 3.200 obratih/min. Dobljeni serum odlijemo ali odpipetiramo s plastično kapalko ter ga shranimo v zaprti in s protokolno številko, imenom in priimkom, datumom rojstva in črtno kodo označeni epruveti. Do uporabe vzorce serumov hranimo v hladilniku na temperaturi od 2 – 8 °C do 6 dni, za dalj časa pa jih lahko zamrzemo na – 20 °C. Izogibati se moramo večkratnemu zamrzovanju in odmrzovanju. Preden vzorce pipetiramo v reagenčni trak jih segrejemo na sobno temperaturo in močno stresamo na stresalniku.

3.1.1.3 Reagenti in oprema



Vsi reagenti, standardi in kontrole (tabela I) so že pripravljene za uporabo, hranimo jih v hladilniku na temperaturi od 2–8 °C do označenega roka uporabe, nikoli jih ne zamrzujemo. Pomembno je, da vrečke z nastavki za pipetiranje vedno dobro in pazljivo zapremo. Vrečka mora biti nepoškodovana in zaprta.

Tabela I: Seznam uporabljenih reagentov v testu

Lyme IgM/IgG trak	STR	Pripravljene za uporabo
Lyme IgM SPRs	SPR [®]	Specifični rekombinantni borelijski proteini (DbpA in OspC), pritrjeni na del za pipetiranje
Lyme IgG SPRs	SPR [®]	Specifični rekombinantni borelijski proteini (VlsE, DbpA in OspC), pritrjeni na del za pipetiranje
Standard IgM 1 × 1,4 mL	S1	Pripravljene za uporabo, človeška plazma, ki vsebuje anti – <i>B. burgdorferi</i> IgM in fosfatni pufer, goveji albumin (BSA), stabilizatorji in konzervans: metilizotiazolinon (MIT) 1 g/L pH 7,4
Standard IgG 1 × 1,4 mL	S1	Pripravljene za uporabo, človeška plazma, ki vsebuje anti – <i>B. burgdorferi</i> IgG in fosfatni pufer, goveji albumin (BSA) in konzervans: MIT 1 g/L pH 7,2
Pozitivna kontrola IgM 1 × 0,7 mL	C1	Pripravljene za uporabo, človeška plazma, ki vsebuje anti – <i>B. burgdorferi</i> IgM in fosfatni pufer, goveji albumin (BSA), stabilizatorji in konzervans: MIT 1 g/L pH 7,4
Pozitivna kontrola IgG 1 × 0,7 mL	C1	Pripravljene za uporabo, človeška plazma, ki vsebuje anti – <i>B. burgdorferi</i> IgG in fosfatni pufer, goveji albumin (BSA) in konzervans: MIT 1 g/L pH 7,2
Negativna kontrola IgM 1 × 0,7 mL	C2	Pripravljene za uporabo, fosfatni pufer in goveji albumin (BSA) z nezaznavnimi anti – <i>B. burgdorferi</i> IgM ter konzervans: MIT 1 g/L pH 7,4
Negativna kontrola IgG 1 × 0,7 mL	C2	Pripravljene za uporabo, fosfatni pufer in goveji albumin (BSA) z nezaznavnimi protitelesi IgG proti <i>B. burgdorferi</i> ter konzervans: MIT 1 g/L pH 7,2

Reagenčni trak v diagnostičnem kompletu nosi kodo z identifikacijo testa, serijsko številko in datumom veljavnosti reagentov. V vsakem diagnostičnem kompletu so vključene informacije o identifikaciji testa, serijski številki ter kalibracijskih parametrih in titrih. Reagenčni trak je sestavljen iz 10 luknjic prekritih s tesnilno folijo. Reagenčni trakovi in nastavki za pipetiranje so barvno označeni tako, da ni mogoča zamenjava med protitelesi IgM in IgG. V tabeli II je opisana sestava reagenčnega traku.

Tabela II: Sestava reagenčnega traku

luknjica	Vsebina v posamezni luknjici	
	VIDAS Lyme IgM 	VIDAS Lyme IgG 
1	Pipetiramo vzorec seruma	Pipetiramo vzorec seruma
2	Pufer za redčenje vzorca (400µL): Tris pufer, NaCl, nevtralizator, detergent, goveji albumin (BSA) in konzervans: MIT 1 g/L pH 7,4	Pufer za redčenje vzorca (600µL): fosfatni pufer, NaCl, nevtralizator, detergent, goveji albumin (BSA) in konzervans: MIT 1 g/L pH 7,4
3-4-5	Spiralni pufer (600µL): Tris pufer, NaCl, detergent in konzervans: MIT 1 g/L pH 7,8	Spiralni pufer (600µL): Tris pufer, NaCl, detergent in konzervans: MIT 1 g/L pH 7,8
6	Konjugat (400µL): Tris pufer, NaCl, BSA, titrirana raztopina mišjih monoklonskih protiteles proti človeškim IgM konjugiranih z alkalno fosfatazo pH 7,4, konzervans: MIT 1 g/L	Konjugat (400µL): Tris pufer, NaCl, BSA, titrirana raztopina mišjih monoklonskih protiteles proti človeškim IgG konjugiranih z alkalno fosfatazo pH 6,1, konzervans: MIT 1 g/L
7-8	Spiralni pufer (600µL): Tris pufer, NaCl, detergent in konzervans: MIT 1 g/L pH 7,8	Spiralni pufer (600µL): Tris pufer, NaCl, detergent in konzervans: MIT 1 g/L pH 7,8
9	Prazna luknjica	Prazna luknjica
10	Kiveta s substratom (300 µL): 4-metil-umbeliferil-fosfat (0,6 mmol/L), dietanolamin (0,62 mol/L 6,6%) pH 9,2, natrijev azid 1 g/L	Kiveta s substratom (300 µL): 4-metil-umbeliferil-fosfat (0,6 mmol/L), dietanolamin (0,62 mol/L 6,6%) pH 9,2, natrijev azid 1 g/L

3.1.1.4 Delovni pribor

Pri delu smo uporabili:

- Pipeto znamke Eppendorf, volumen 100 μ L
- Nastavke za pipeto
- Stresalnik
- Aparat mini VIDAS
- Reagenčni trak Lyme IgM in Lyme IgG
- SPR[®] oz. nastavki za pipetiranje za Lyme IgM in Lyme IgG
- Staničevina

3.1.1.5 Izvedba testa

Pred uporabo morajo biti vsi reagenti in vzorci segreti na sobni temperaturi, reagenčne trakove je potrebno horizontalno dobro pretresti. V vdolbinice na traku pipetiramo 100 μ L standardov, kontrol in vzorcev serumov, ki smo jih predhodno močno premešali na stresalniku. V aparat mini VIDAS vnesemo podatke o testu in vzorcu, nato v aparat vstavimo reagenčne trakove in pripadajoče nastavke za pipetiranje. Začnemo test, ki traja približno 27 minut.

3.1.1.6 Vrednotenje rezultatov

Ko je test zaključen, aparat avtomatsko analizira rezultate in jih interpretira. Aparat dvakrat izmeri fluorescenčni signal oz. relativno fluorescenčno vrednost vzorca (RFV) in jo primerja z relativno fluorescenčno vrednostjo shranjenega standarda. Prvo merjenje fluorescence je merjenje ozadja v kiveti s substratom pred uvedbo nastavka z encimom. Drugo meritev fluorescence se izvede po vstavitvi nastavka z encimom v kiveto s substratom oz. merjenje končnega produkta, ki fluorescira. Aparat RFV izračuna tako, da odšteje izmerjeno vrednost fluorescence ozadja od izmerjene vrednosti fluorescence substrata z encimom (končnega produkta). Ko je testiranje opravljeno, računalnik izračuna testno vrednost (TV) tako, da RFV vzorca deli z RFV standarda (Enačba 1).

Testna vrednost (TV) oz. Indeks (I) = RFV vzorca / RFV standarda (Enačba 1)

Interpretacija rezultatov:

Po končanem testu, aparat izračuna indekse in rezultate interpretira kot negativne, mejne in pozitivne (tabela III). Nejasne in pozitivne vzorce je po priporočilih EUCALB (European Union Concerted Action On Lyme Borreliosis) in CDC (Center for Disease Control) potrebno testirati še s testom imunoblot.

Tabela III: Interpretacija rezultatov encimskoimunskega testa

Za Lyme IgM:	
Indeks	Interpretacija rezultata
$I < 0,20$	NEGATIVNO
$0,20 \leq 0,32$	MEJNO
$I \geq 0,32$	POZITIVNO
Deklarirana specifičnost: 97,7 %	

Za Lyme IgG:	
Indeks	Interpretacija rezultata
$I < 0,20$	NEGATIVNO
$I \geq 0,20$	POZITIVNO
Deklarirana specifičnost: 99,7 %	

Deklarirana občutljivost za test IgM in IgG:

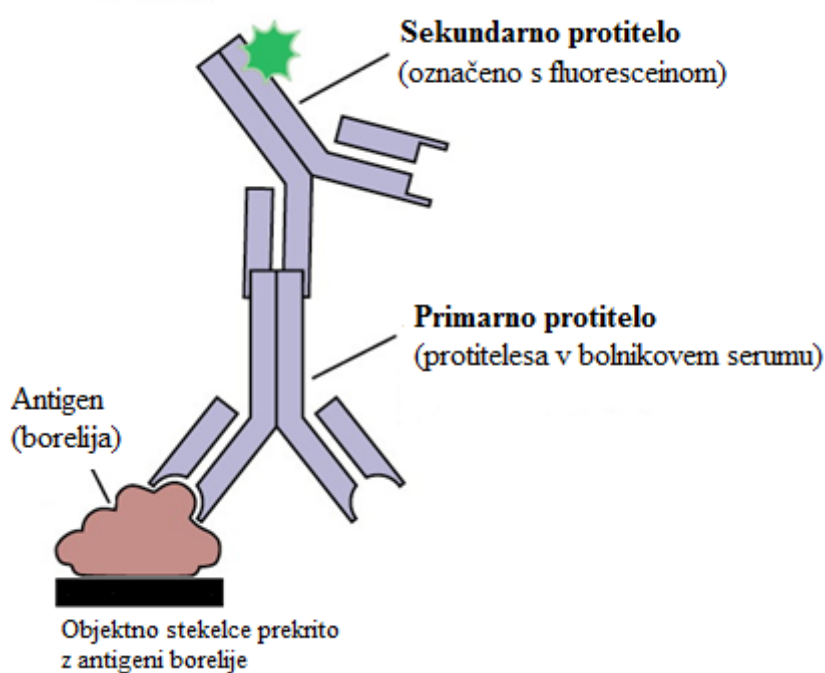
- za EM 63,0 – 92,7 %
- za nevroborreliozo 79,5 – 97,6 %
- za artritis/ACA 86,5 – 100 %

3.1.2 IMUNOFLUORESCENČNI TEST (IFT)

3.1.2.1 Princip testa

Imunofluorescenčni test se uporablja za semikvantitativno določitev protiteles proti boreliji v človeškem serumu. To pomeni, da testiramo serijske razredčine vzorca seruma: 1: 32, 1: 64, 1: 128, 1: 256, 1: 512, 1: 1024. Test je osnovan na principu reakcije med specifičnim protitelesom iz seruma in borelijskim antigenom (neaktiven sev *B. afzelii*), ki je pritrjen na objektno stekelce. Če so v serumu prisotna specifična protitelesa IgM in IgG proti borelijskim antigenom, nastane imunski kompleks. Protitelesa, ki se niso vezala v kompleks se odstranijo s spiranjem. Nastalemu kompleksu dodamo konjugat (kozja protitelesa proti človeškim IgM in IgG označena s FITC (fluorescein izotiocianat)), ki se

veže na primarna bolnikova protitelesa, če so v vzorcu prisotna. Po inkubaciji ponovno sledi spiranje nevezanega konjugata. Nastale komplekse, sestavljene iz fluorescirajočega protitelesa vezanega na kompleks protitelo – antigen, opazujemo pod UV svetlobo fluorescenčnega mikroskopa. Rezultat testiranja ovrednotimo s titrom zadnje razredčine protiteles, ki je še dala pozitivno reakcijo, torej fluorescenco (slika 8).



Slika 8: Posredna imunofluorescenca: Antigen in primarno protitelo tvorita imunski kompleks. Kompleksu dodamo s fluoresceinom označena sekundarna protitelesa. Novonastali fluorescirajoč kompleks nato opazujemo pod UV svetlobo fluorescenčnega mikroskopa (75).

3.1.2.2 Vzorci

Za izvedbo testa uporabljamo serum, ki ga pridobimo z naravnim strjevanjem krvi. Da se izognemo hemolizi, serum takoj oddelimo ali ga centrifugiramo pri 3.200 obratih 10 min. Serume do uporabe hranimo v hladilniku pri temperaturi 2 – 8 °C. Pred izvedbo testa serume segrejemo na sobni temperaturi.

3.1.2.3 Reagenti

Reagente, ki ji jih uporabljamo v testu, hranimo v hladilniku pri temperaturi 2 – 8 °C do označenega roka uporabe. Reagenti ne smejo biti izpostavljeni močni svetlobi in jih ne zamrzujemo. Pred uporabo morajo biti segreti na sobni temperaturi. Reagenti uporabljeni v testu so opisani v tabeli IV.

Tabela IV: Seznam uporabljenih reagentov v testu

Reagenti	Proizvajalec
Objektna stekelca prekrita z borelijskim antigenom (neaktiven sev <i>B. afzelli</i>)	IFA BORRELIA, Viro – immun
FITC konjugat (kozja protitelesa, usmerjena proti človeškim IgM, konjugirana s fluorescein izotiocianatom). V mikroepreveto odpipetiramo 7 µL konjugata in mu dodamo 1050 µL PBS in 7 µL barvilo Evans Blue. Pripravljeno delovno razredčino konjugata (1:152) premešamo in uporabimo v testu.	SIGMA ALDRICH, USA
FITC konjugat (kozja protitelesa, usmerjena proti človeškim IgG, konjugirana s fluorescein izotiocianatom). V mikroepreveto odpipetiramo 7 µL konjugata in mu dodamo 1050 µL PBS in 7 µL barvilo Evans Blue. Pripravljeno delovno razredčino konjugata (1:152) premešamo in uporabimo v testu.	SIGMA ALDRICH, USA
Negativna kontrola (Človeška plazma, stabilizator: < 0,1 % natrijev azid)	IFA BORRELIA, Viro – immun
Pozitivna kontrola (Človeška plazma, stabilizator: < 0,1 % natrijev azid)	IFA BORRELIA, Viro – immun
Barvilo Evans Blue (kontrast ozadja)	BioMerieux
Fosfatni PBS puffer (<i>ang. Phosphate buffered saline</i>) za redčenje serumov in spiranje Sestava pufra PBS (pH 7,5): Dinatrijev hidrogen fosfat (Na ₂ HPO ₄) 13,8 g Natrijev dihidrogen fosfat (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O) 1,8 g Natrijev klorid (NaCl) 85 g Deionizirana voda 1000 mL	
Imerzizsko olje – glicerol	

3.1.2.4 Delovni pribor

Za izvedbo testa smo uporabili:

- Mikrotitrna ploščica (8×10 vdolbinic)
- Objektna stekelca prekrita z borelijskim antigenom
- Večkanalna pipeta znamke Eppendorf za volumen 50 µL, za redčenje vzorca
- Pipete znamke Eppendorf, za volumne 150 µL, 50 µL, 10 µL
- Fluorescenčni mikroskop NIKON (400× povečava)
- Staničevina
- Vlažilna komora
- Stresalnik
- Nastavke za pipete
- Kadičke za spiranje
- Stojalo za stekelca
- Termostat 37 °C
- Krovna stekelca

3.1.2.5 Izvedba testa

Pred izvedbo testa si pripravimo protokolni list. Označen mora biti s protokolno številko bolnikovega seruma, razred protiteles in razredčinami serumov. Pred uporabo reagentne in vzorce serumov segrejemo na sobni temperaturi. Pozitivna in negativna kontrola sta pripravljena za uporabo in jih pipetiramo direktno na ustrezno mesto na stekelcu. Pripravimo si delovno razredčino konjugata, ki jo pred uporabo dobro premešamo na stresalniku. V vdolbinicah na mikrotitrski ploščici, označeni z ustreznimi razredčinami seruma in s protokolnimi številkami posameznega vzorca seruma si iz serumov pripravimo razredčine. V prvo vdolbinico pipetiramo 150 µL, v ostale vdolbinice pa po 50 µL pufru za redčenje seruma (PBS). Nato v prvo vdolbinico vsake vrstice pipetiramo po 10 µL vzorca seruma posameznega bolnika in premešamo. Iz prve vdolbinice prenašamo naprej po 50 µL do zadnje vdolbinice s pufrom. Dobimo razredčine seruma 1: 16, 1: 32, 1: 64, 1: 128, 1: 256, 1: 512, 1: 1024, 1: 2048 (tabela V).

Tabela V: Priprava razredčin seruma v vdolbinicah na mikrotitrski ploščici

Luknjica	1	2	3	4	5	6	7	8
Razredčina	1: 16	1: 32	1: 64	1: 128	1: 256	1:512	1:1024	1:2048
PBS (µL)	150	50	50	50	50	50	50	50
Vzorec (µL)	10							
Prenašamo po (µL)	50	50	50	50	50	50	50	50

Pripravimo in ustrezno označimo potrebno število stekelc z borelijskimi antigeni. Na ustrezno mesto na stekelcu pipetiramo po 20 μ L ustrezne kontrole in razredčine seruma (tabela VI).

Tabela VI: Nanašanje kontrol in razredčin seruma na ustrezna mesta na stekelcu za določanje titra protiteles IgM in IgG.

1:128	1:32	1:64	1:128	1:256	IgM protokolna št.
PK	VZ1	VZ1	VZ1	VZ1	
1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	protokolna št.
NK	VZ2	VZ2	VZ2	VZ2	

1:512	1:128	1:256	1:512	1:1024	IgG protokolna št.
PK	VZ1	VZ1	VZ1	VZ1	
1:16	1:128	1:256	1:512	1:1024	protokolna št.
NK	VZ2	VZ2	VZ2	VZ2	

PK - pozitivna kontrola; NK - negativna kontrola; VZ - vzorec

Stekelca inkubiramo 30 minut v vlažni komori pri približno 37 °C (\pm 1 °C). Po inkubaciji jih splaknemo s PBS, nato jih v njem namakamo 2 \times po 5 minut in ponovno splaknemo. Stekelc nikoli ne posušimo, odstranimo samo odvečno tekočino (vertikalno jih stresemo po staničevini). Na vsako mesto z antigenom dodamo kapljico (\cong 20 μ L) konjugata (s fluoresceinom označena kozja protitelesa, usmerjena proti človeškim IgM in IgG). Stekelca ponovno inkubiramo 30 minut v vlažni komori pri približno 37 °C (\pm 1 °C). Po inkubaciji stekelca splaknemo s PBS. Stekelca prenesemo v kadičko in jih v PBS namakamo 2 \times po 5 minut in nato ponovno splaknemo. Stekelca prekrijemo z glicerinom in krovnim stekelcem ter opazujemo pod mikroskopom z UV svetlobo pri 400 \times povečavi. Vidno rumeno – zeleno fluorescenco opredelimo kot pozitiven rezultat. Dobljeno intenziteto fluorescence ovrednotimo glede na pozitivno in negativno kontrolo ter na osnovi tega določimo najvišjo še pozitivno razredčino (titer) testiranega vzorca.

3.1.2.6 Vrednotenje rezultatov

Poleg interpretacije rezultatov seroloških testov, je za postavitev končne diagnoze potrebno upoštevati bolnikovo anamnezo in klinične simptome ter vključiti možnost navzkrižne reaktivnosti. Test vrednotimo kot pozitiven, če pod fluorescenčnim mikroskopom borelijske spirohete jabolčno zeleno fluorescirajo. Test vrednotimo kot negativen, če so borelije vidne, vendar so sivo – zelene in ne fluorescirajo. Vzorce z dvomljivimi rezultati je potrebno ponovno testirati. Prav tako je v primeru dvomljivega rezultata priporočljivo nadaljnje spremljanje dinamike titra bolnikovih protiteles. V ta namen imamo v laboratoriju sistem za shranjevanje oz. arhiviranje vzorcev za več let. Negativen rezultat ne more izključiti okužbe z borelijo. Če obstaja sum kljub negativnemu testu, je priporočljivo testiranje drugega vzorca seruma po 2 tednih. Tabela VII prikazuje interpretacijo rezultatov dobljenih v testu.

Tabela VII: Interpretacija rezultatov imunofluorescenčnega testa

	Pozitiven rezultat	Mejni rezultat	Negativni rezultat
Titer IgM protiteles	≥ 64	32	< 32
Titer IgG protiteles	≥ 256	128	< 128

Tabela VIII prikazuje deklarirano specifičnost in občutljivost imunofluorescenčnega testa.

Tabela VIII: Deklarirana specifičnost/občutljivost

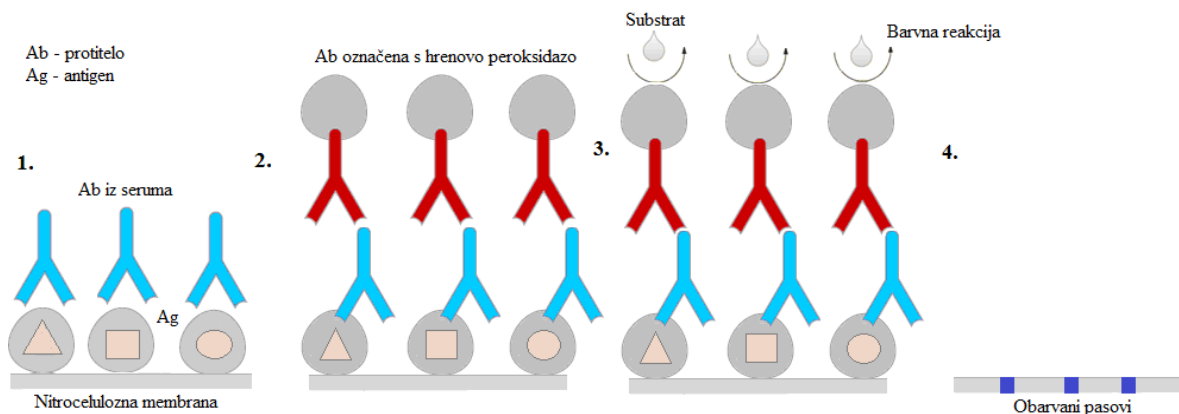
	Občutljivost	Specifičnost
IgM	95,2 %	98,7 %
IgG	96,2 %	94,4 %

3.2 POTRDIIVENO TESTIRANJE PRISOTNOSTI SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI BAKTERIJI *B. burgdorferi* V ČLOVEŠKEM SERUMU (2. Stopnja)

3.2.1 IMUNOBLOT

3.2.1.1 Princip testa

Imunoblot *RecomLine* IgM/IgG (proizvajalec Mikrogen diagnostik, Nemčija) je kvalitativen test za detekcijo protiteles IgM in/ali IgG v človeškem serumu, specifičnih za imunodominantne proteine *B. burgdorferi* sensu lato (vse štiri v Evropi prisotne patogene vrste: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii* in *B. spielmanii*) pridobljene z rekombinantno tehniko (genski inženiring). Visoko prečiščene rekombinantne borelijske proteine (p100, p41, VlsE, p39, p58, OspA, OspC, p18) posamezno nanesejo na nitrocelulozno membrano, ki jo narežejo na testne trakove. Za zaznavanje specifičnih protiteles proti boreliji testne trakove inkubiramo v vzorčnem serumu, redčenem v dilucijskem pufru. V tem času se protitelesa iz seruma vežejo na antigene (proteine) na trakovih. Sledi spiranje protiteles, ki se niso vezala v kompleks antigen – protitelo. Trakove nato inkubiramo s hrenovo peroksidazo konjugiranimi sekundarnimi protitelesi (konjugat). Sledi spiranje nevezanih konjugiranih protiteles. Ob dodatku substrata za encim hrenovo peroksidazo specifično vezana protitelesa postanejo vidna kot obarvan pas na ustreznem delu testnega traku. Test se uporablja za potrjevanje pozitivnih in mejnih rezultatov prve stopnje testiranja. S tem dobimo podatek o specifičnosti prisotnih protiteles in o stadiju (fazi) okužbe (Slika 9).



Slika 9: Princip testa imunoblot: **1.** V prvi fazi se testni trakovi z nanešenimi boreljiskimi Ag inkubirajo s protitelesi iz seruma. Sledi spiranje (3×). **2.** Dodamo s hrenovo peroksidazo konjugirana sekundarna Ab. Sledi spiranje (3×). **3.** Ob dodatku substrata pride do encimsko katalizirane barvne reakcije. **4.** Tam kjer poteče reakcija Ag–Ab, se na testnem traku razvije temno obarvan pas (76).

3.2.1.2 Vzorci

Za izvedbo testa uporabljamo serum, ki ga do uporabe hranimo v hladilniku pri temperaturi 2 – 8 °C do 14 dni, dlje časa pa v zamrzovalni omari pri temperaturi – 20 °C. Pred izvedbo testa serume segrejemo na sobni temperaturi. V testu uporabimo le serume s pozitivnimi in mejnimi rezultati prve stopnje testiranja. V test ne vključimo vse opazno kontaminirane, rumenkaste in lipemične serume, ker lahko dajo temno ozadje in s tem napačne rezultate. Izogibamo se večkratnemu zamrzovanju in tajanju serumov.

3.2.1.3 Reagenti in oprema

Reagente hranimo v hladilniku na temperaturi od 2 – 8 °C do označenega roka uporabe, nikoli jih ne zamrzujemo. Pred uporabo jih segrejemo na sobni temperaturi, ker celoten test poteka pri sobni temperaturi. Reagente moramo zaščititi pred direktno sončno svetlobo. Testni set vsebuje:

- Dilucijski pufer (pufer za redčenje serumov, pripravljen za uporabo)
Tris pufer, NaCl, detergent, konzervansa: metilizotiazolinon (0,01 %) in Oxypyron (0,1 %)
- Za redčenje konjugatov in spiranje testnih trakov je potreben spiralni pufer, ki ga redčimo neposredno pred uporabo v razmerju 1 : 10 (1 + 9). Redčen spiralni pufer je rahlo moten in brez vonja, stabilen je 4 tedne pri 2 – 8 °C. Redčimo po naslednjem

vrstnem redu (tabela IX), najprej raztopimo mleko v prahu v koncentratu spiralnega pufru, nato pa dodamo še destilirano vodo. Količino spiralnega pufru pripravimo glede na število v testu uporabljenih testnih trakov. Koncentrirani spiralni pufer vsebuje fosfatni pufer, NaCl, KCl, detergent, konzervansa: metilizotiazolinon (0,1 %) in Oxypyron (0,2 %)

Tabela IX: Primer redčenja spiralnega pufru

trak	Mleko v prahu (g)	Koncentriran Pufer A (mL)	Destilirana H ₂ O (mL)	Končni volumen (mL)
5	0,5	10	90	100
10	1	20	180	200
15	1,5	30	270	300
20	2	40	360	400

- Testni trakovi za dokazovanje protiteles IgM in protiteles IgG iz seruma: na testne trakove (nitrocelulozno membrano) so nanešeni borelijski imunodominantni proteini pridobljeni z rekombinantno tehniko.
- Mleko v prahu
- Koncentriran konjugat: kunčja protitelesa, usmerjena proti človeškim IgG, konjugirana s hrenovo peroksidazo
NaN₃ (< 0,1 %), kloracetamid (< 0,1 %), konzervans: metilizotiazolinon (< 0,1 %)
- Koncentriran konjugat: kunčja protitelesa, usmerjena proti človeškim IgM, konjugirana s hrenovo peroksidazo
NaN₃ (< 0,1 %), kloracetamid (< 0,1 %), konzervans: metilizotiazolinon (< 0,1 %)
Za redčenje konjugata uporabimo primerno količino razredčenega spiralnega pufru (tabela X). Za pripravo raztopine konjugata moramo prišteti še »dodatni volumen« za 2 testna trakova. IgG in IgM konjugat pripravimo tik pred uporabo, redčimo ju 1:100.

Tabela X: Primer redčenja konjugata

Število testirnih trakov	Konjugat (μL)	Redčen spiralni pufer (mL)
5	100	10
10	200	20
15	300	30
20	400	40

- Substrat je 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB), ki je priložen testnemu kompletu in že pripravljen za uporabo. Preverimo, da je brezbarven in zaščiten pred svetlobo.

3.2.1.4 Delovni pribor

Pri izvajanju testa uporabljamo:

- | | |
|--|---------------------------|
| ▪ Aparat Blotrix – program <i>RecomScan</i> za odčitavanje testnih trakov | ▪ Plastična pinceta |
| ▪ Pipete znamke Eppendorf za volumne 40 μ L, 20 μ L | ▪ Koničaste centrifugirke |
| ▪ Mehanska nastavljiva pipeta Biotek za volumne 50 – 250 μ L in 500 - 5000 μ L | ▪ Stresalnik |
| ▪ Pladenj za inkubacijo testnih trakov | ▪ Aparat Tecan |
| | ▪ Staničevina |
| | ▪ Nastavki za pipete |

3.2.1.5 Izvedba testa

Pred začetkom analize reagente in vzorce prenesemo na sobno temperaturo. Pripravimo raztopino spiralnega pufra glede na število testnih trakov uporabljenih v testu. V koničaste centrifugirke za pripravo konjugata odpipetiramo toliko razredčenega spiralnega pufra, kolikor testnih trakov imamo in dodamo primerno količino koncentriranega konjugata. Pri tem upoštevamo število testnih trakov + 2 (dodatni volumen). Vzorce in konjugate pred uporabo dobro premešamo. Epruveto s testnimi trakovi odpremo šele po pol ure na sobni temperaturi, tik pred uporabo in jo takoj nato zapremo. V vsako banjico damo 2 mL dilucijskega pufra in testni trak s številko, obrnjeno navzgor. Pomagamo si s plastično pinceto. Testni trak moramo v pufri čisto namočiti. V banjice dodamo 40 μ L vzorca za test IgM (razredčina 1:50) in 20 μ L vzorca za test IgG (razredčina 1 : 100). Inkubacijski pladenj nato inkubiramo 1 uro na sobni temperaturi ob rahlem stresanju. Po inkubaciji razredčene vzorce odpipetiramo iz banjice in dodamo v vsako po 2 mL spiralnega pufra. Rahlo stresamo 5 minut, nato pa odpipetiramo spiralni pufer. Postopek spiranja ponovimo 3 \times . Dodamo 2 mL redčenega konjugata in inkubiramo 45 minut ob rahlem stresanju na sobni temperaturi. Po inkubaciji ponovno spiramo s spiralnim pufrom 3 \times po 5 minut. Dodamo 1,5 mL pripravljenega substrata in inkubiramo ob rahlem stresanju 8 ± 2 minuti ter ves čas opazujemo obarvanje. V tej fazi nikoli ne zapustimo aparata. Takoj, ko se

pojavi razločno vidni mejni (cutoff) kontrolni pas, ustavimo reakcijo v banjici. Pri visoko pozitivnih serumih je lahko obarvanje premočno in reakcijo lahko ustavimo že prej. Odpipetiramo substrat in testne trakove 3× speremo z destilirano vodo. Sprane testne trakove odstranimo iz vode s plastično pinceto in jih 2 uri sušimo v staničevini in v temi. Rezultate najprej odčitamo s prostim očesom in nato še z aparatom BLOTRIX. Po odčitavanju jih prilepimo v ustrezno razpredelnico, ki je opremljena s potrebnimi podatki (serijska številka, datum izvedbe, protokolna številka, oznaka tipa protiteles). Trakove hranimo zaščitene pred svetlobo.

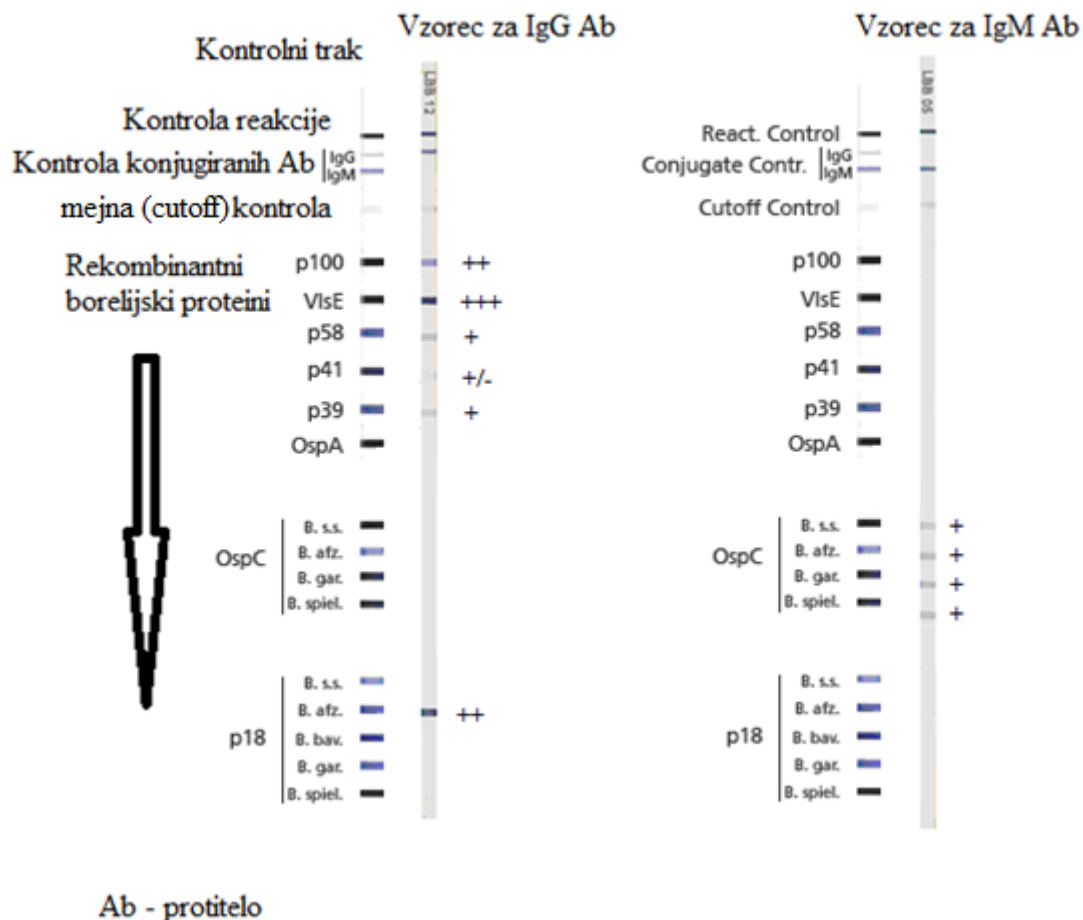
3.2.1.6 Vrednotenje rezultatov

V vsak testni trak je vključena kontrola reakcije, ki mora biti vedno pozitivna za vsak serum, kontrola razreda protiteles, ki mora biti vedno pozitivna ali na pasu IgG ali IgM in nizko pozitivna oz. mejna (cutoff) kontrola, ki jo potrebujemo za ovrednotenje obarvanja testnih trakov. Intenziteta obarvanosti tega pasu pomeni osnovo za vrednotenje reaktivnosti protiteles kot pozitivno, mejno ali negativno.

Posušene testne trakove najprej odčitamo s prostim očesom (slika 10) in nato še z aparatom BLOTRIX (program *RecomScan*). Pri odčitavanju rezultatov si pomagamo s priloženim kontrolnim trakom, kjer so označeni pasovi diagnostično pomembnih proteinov in njihove pripadajoče molekulske mase. Intenziteto razvitih pasov na testnih trakovih vedno primerjamo z intenziteto ustreznega pasu pri nizko pozitivni kontroli (tabela XI).

Tabela XI: Intenziteta pasov

pasovi	intenziteta
Ni reakcije	-
Intenziteta pasu šibkejša kot pri mejni kontroli	+/-
Intenziteta pasu enaka kot pri mejni kontroli	+
Intenziteta pasu močnejša kot pri mejni kontroli	++



Slika 10: Odčitavanje testnih trakov s prostim očesom

Testni trakovi lahko imajo različno intenziteto obarvanosti pasov. Pogosto so pri IgG pasovi močnejši in temnejši kot pri IgM. Intenziteta pasov je do neke mere odvisna od koncentracije specifičnih borelijskih protiteles.

Vsem rekombinantnim borelijskim antigenom (pasovi v testu) v primeru pozitivne reakcije dodelimo ustrezno število točk. S točkami ovrednotimo tiste pasove, ki so obarvani vsaj toliko kot nizko pozitivna kontrola (intenziteta +) ali intenzivneje (intenziteta ++ ali +++). Točkovanje ostaja enako ne glede na to, ali je pas ovrednoten z intenziteto + ali ++. Pri antigenih OspC in p18 točkujemo samo enkrat, četudi so razviti vsi štirje razčlenjeni pasovi za OspC in pet razčlenjenih pasov za p18 (tabela XII).

Tabela XII: Točkovanje izraženih pasov rekombinantnih borelijskih antigenov za protitelesa IgM in IgG

oznaka pasu, antigen	Značilnosti proteinov	Izvor (nanos na trak)	Točke pri IgM	Točke pri IgG
p100	protein celične stene v povezavi z bičkom (navadno sproži poznejši imunski odziv)	<i>B. afzelii</i>	5	5
VlsE	fuzijski protein, široko reaktiven imunodominantni antigen, ki sproži zgodnji odziv; izrazi se samo <i>in situ</i> , zato je postal uporaben v lab. diagnostiki šele z rekombinantnimi tehnikami	vse genospecies	5	5
p58	protein HSP (stresni protein), ki ga imajo borelije na svoji površini, soroden je proteinom ostalih bakterij, ni specifičen borelijski antigen	<i>B. garinii</i>	4	4
p41	flagelarni protein, imunodominantni antigen, ki sproži močan, zgodnji IgG in IgM odziv	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	1	1
BmpA (p39)	membranski protein, ki sproži visoko specifičen odziv (IgG)	<i>B. afzelii</i>	4	5
OspA	površinski protein A, sproži nastanek protiteles pri bolnikih s kasnimi oblikami borelioze	<i>B. afzelii</i>	5	5
OspC	površinski protein C, pomemben virulenčni dejavnik, ki sproži zgodnji imunski odziv (IgM)	<i>B. b.</i> sensu stricto <i>B. afzelii</i> <i>B. garinii</i> <i>B. spielmanii</i>	8	5
p18 (DbpA)	površinski protein, navadno sproži pozni imunski odziv	<i>B. b.</i> sensu stricto <i>B. afzelii</i> <i>B. bavariensis</i> <i>B. garinii</i> <i>B. spielmanii</i>	5	5

Nato točke seštejemo in na podlagi vrednosti točk ovrednotimo rezultat kot mejni, pozitiven ali negativen (tabela XIII).

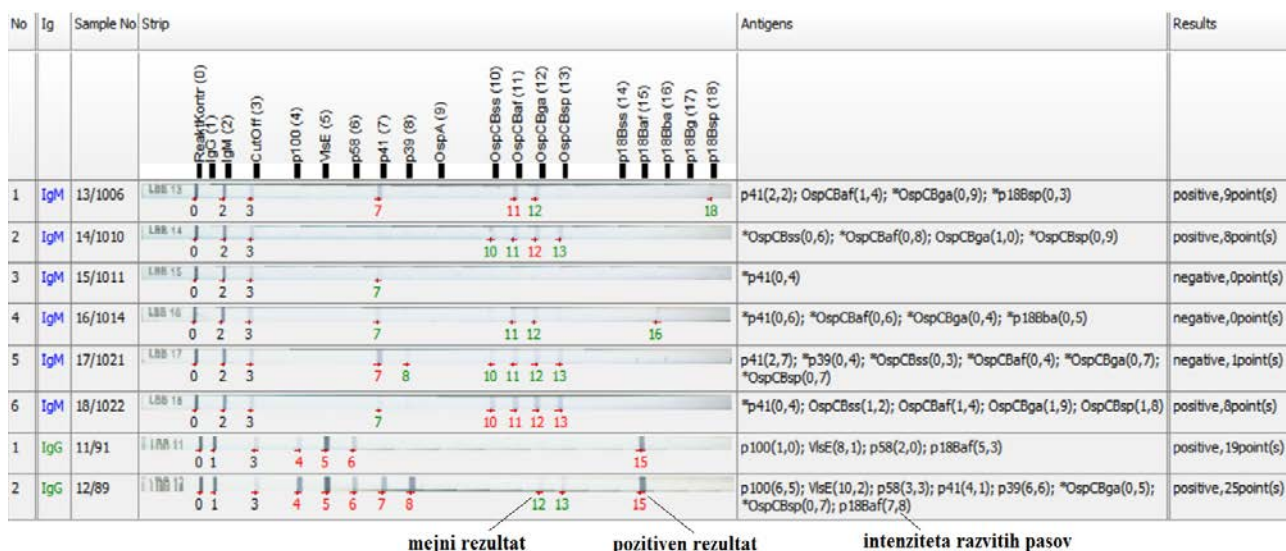
Tabela XIII: Vrednotenje rezultatov testa za protitelesa IgM in IgG

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

Aparat BLOTRIX s programom *RecomScan* uporabljamo kot podporo pri odčitavanju testnih trakov. Pri mejno obarvanih pasovih nam podaja bolj ponovljive, objektivne rezultate saj razlikuje 768 tonov sive barve, medtem ko jih človeško oko razlikuje samo 70. Na razlikovanje obarvanih pasov s prostim očesom vplivajo:

- ozadje pasov, saj je cel testni trak lahko včasih obarvan zaradi nespecifične reakcije s snovmi v serumu
- bližina sosednjih pasov
- širina pasu.

Aparat testne trakove preslika proti temnem ozadju, s priloženim programom pa izmeri obarvanost mejne (cutoff) kontrole ter jo primerja z obarvanostjo testnih pasov in avtomatično odšteje nespecifično obarvanost celotnega traku. Omogoča tudi arhiviranje odčitanih rezultatov, ker testni trakovi sčasoma zbledijo (slika 11).



Slika 11: Primer odčitavanja testnih trakov s programom *RecomScan*

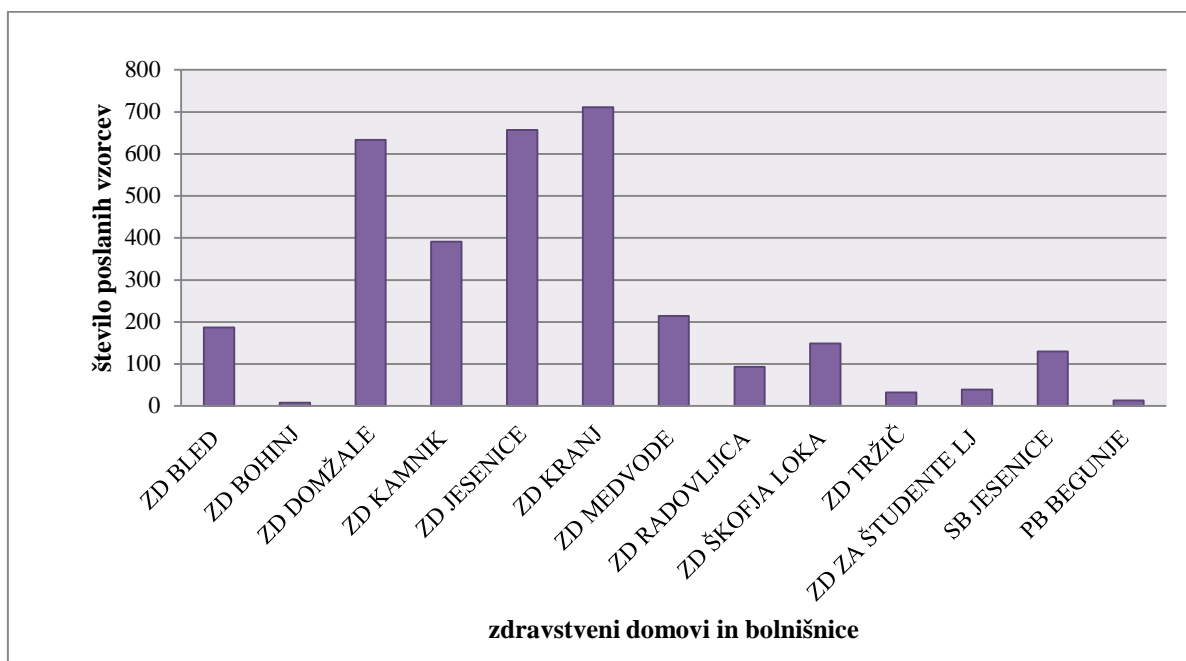
3.3 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Podatke testiranih vzorcev serumov smo zbrali s pomočjo informacijskega sistema mikrobiološkega laboratorija (verzija 2014.1.17, SRC Infonet) in jih analitično obdelali s pomočjo programa K21 (verzija 4.25.0, SRC Infonet). Za statistično primerjavo razlik med dvema presejalnima testoma smo uporabili McNemar – jev test. Za preverjanja statistične povezave dveh presejalnih testov s potrditvenim testom smo uporabili test Hi – kvadrat. Za ugotavljanje skladnosti rezultatov med testi smo uporabili Cohensov koeficient Kappa. Mejne vrednosti rezultatov smo ovrednotili kot pozitivne. Rezultate smo opredelili kot statistično značilne, kadar je bila vrednost $p < 0,05$.

4 REZULTATI

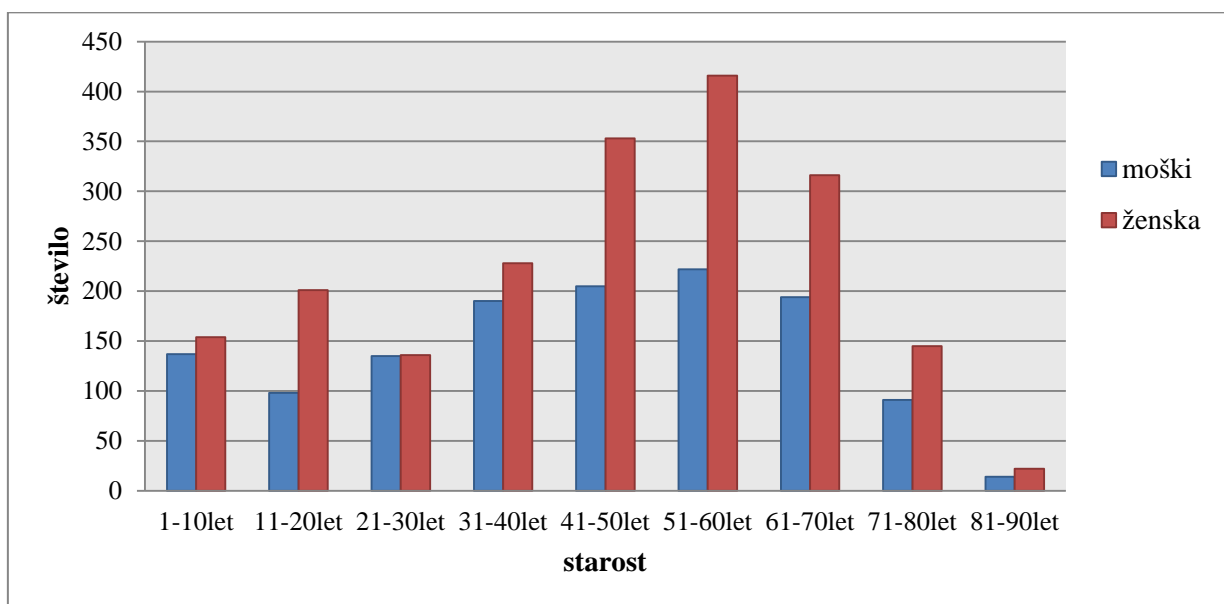
4.1 PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 3.256 vzorcev serumov bolnikov, ki so jih zaradi suma na borelijsko okužbo v serološki laboratorij Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano Kranj poslali iz zdravstvenih domov širšega območja gorenjske regije. Slika 12 prikazuje porazdelitev vzorcev serumov bolnikov po zdravstvenih domovih in bolnišnicah.



Slika 12: Vzorci serumov bolnikov poslanih v serološki laboratorij iz zdravstvenih domov in bolnišnic širšega območja gorenjske regije ($n = 3.256$).

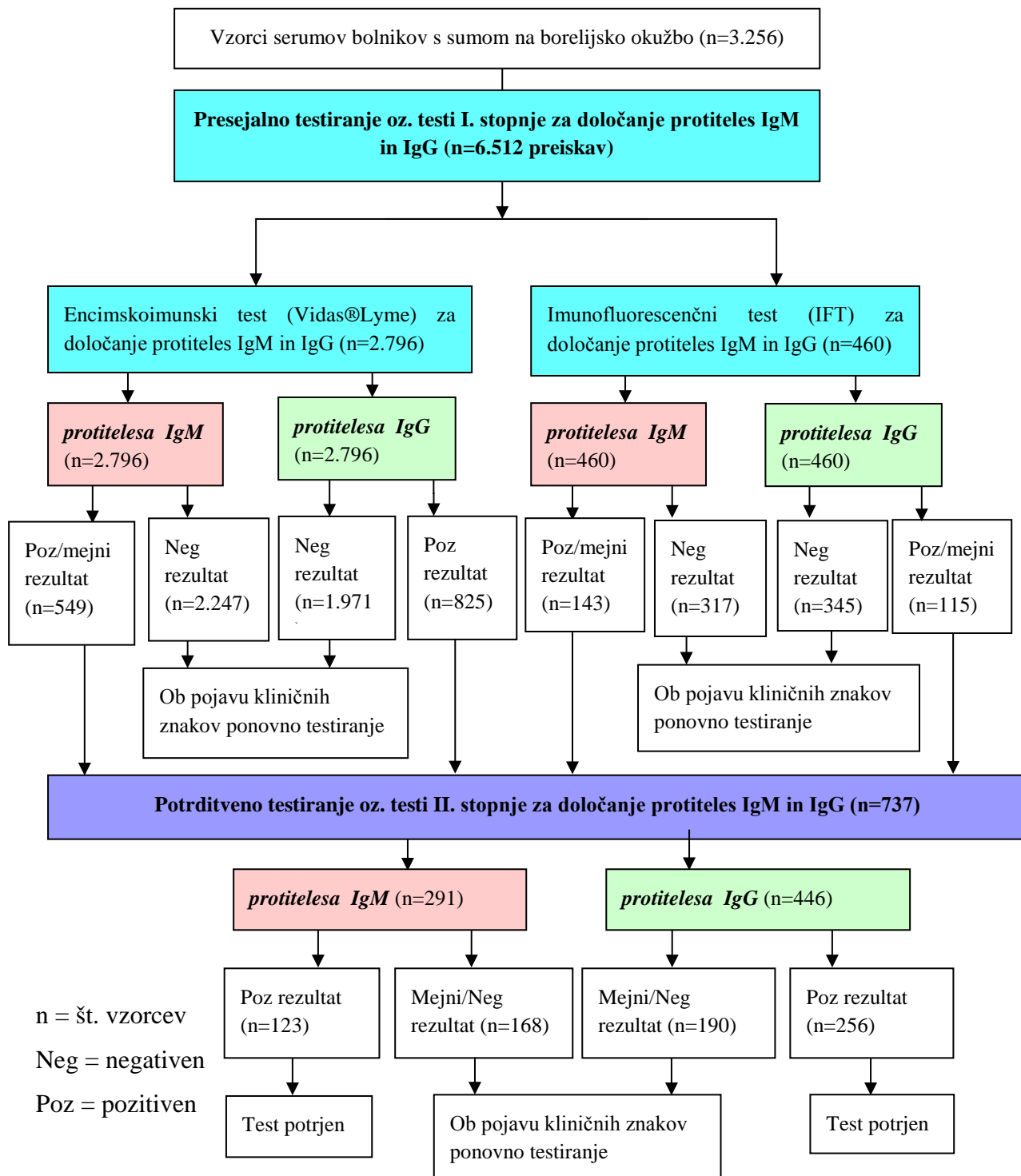
Vzorci serumov so bili testirani na *B. burgdorferi* sensu lato v obdobju od oktobra 2011 do oktobra 2014. Klinične diagnoze preiskovanih pacientov so bile zelo splošno opisane (npr. EM, bolečine v mišicah, glavoboli in motnje zavesti, vnetje in/ali bolečine v sklepih...) ali pa niso bile podane. V analizo je bilo vključenih 1.970 (60,50 %) žensk in 1.286 (39,48 %) moških. Preiskovanci so bili stari od 1 leta do 90 let. Povprečna starost žensk je bila 45 let, povprečna starost moških je bila 42 let. Slika 13 prikazuje starost in spol 3.256 bolnikov, ki so bili v serološkem laboratoriju testirani na *B. burgdorferi* sensu lato v obdobju od oktobra 2011 do oktobra 2014.



Slika 13: Porazdelitev števila vzorcev serumov bolnikov ($n = 3.256$), testiranih na *B. burgdorferi sensu lato* v obdobju od oktobra 2011 do oktobra 2014 glede na starost in spol. Starostna skupina od 51 – 60 let je predstavljal največje število testiranih vzorcev serumov bolnikov.

4.2 REZULTATI ANALIZ

Proces dvostopenjskega testiranja vzorcev serumov 3.256 bolnikov s sumom na borelijsko okužbo prikazuje diagram consort na sliki 14.



Slika 14: Diagram Consort za testiranje 3.256 vzorcev serumov bolnikov s sumom na borelijsko okužbo

4.2.1 Določanje specifičnih protiteles IgM in IgG z encimskoimunskim testom (EIT)

Skupno smo testirali 2.796 vzorcev serumov in izvedli 5.592 preiskav za določanje protiteles razredov IgM in IgG, specifičnih za bakterijo *B. burgdorferi*. Vzorce smo vrednotili kvalitativno, saj smo jih po končani analizi opredelili kot pozitivne, mejne in negativne rezultate. Z encimskoimunskim testom smo pogosteje dokazali specifična protitelesa IgG 825/2.796 (29,51 %) kot specifična protitelesa IgM 400/2.796 (14,30 %) (tabela XIV).

Tabela XIV: Rezultati analize encimskoimunskega testa za 2.796 vzorcev serumov

Encimskoimunski test (EIT)			
Specifična protitelesa IgM (število/delež analiziranih vzorcev)		Specifična protitelesa IgG (število/delež analiziranih vzorcev)	
Pozitivno $I \geq 0,32$	400 (14,30 %)	Pozitivno $I \geq 0,20$	825 (29,51 %)
Mejno $0,20 \leq 0,32$	149 (5,33 %)	/	
Negativno $I < 0,20$	2.247 (80,36 %)	Negativno $I < 0,20$	1.971 (70,49 %)
Skupaj	2.796	2.796	

I - indeks

4.2.2 Določanje specifičnih protiteles IgM in IgG z imunofluorescenčnim testom (IFT)

Z imunofluorescenčnim testom smo specifična protitelesa razredov IgM in IgG določali na 460 vzorcih serumov bolnikov. Pri določanju protiteles IgM smo dobili pozitiven rezultat pri 74/460 (16,09 %), pri določanju protiteles IgG pa pri 60/460 (13,04 %). Več pozitivnih rezultatov smo ugotovili pri dokazovanju protiteles IgM (tabela XV).

Tabela XV: Rezultati 460 vzorcev serumov analiziranih z imunofluorescenčno metodo

Imunofluorescenčni test (IFT)			
Specifična protitelesa IgM (število/delež analiziranih vzorcev)		Specifična protitelesa IgG (število/delež analiziranih vzorcev)	
Pozitivno ≥ 1:64	74 (16,09 %)	Pozitivno ≥ 1:256	60 (13,04 %)
Mejno 1:32	69 (15,00 %)	Mejno 1:128	55 (11,96 %)
Negativno < 1:32	317 (68,91 %)	Negativno < 1:128	345 (75,00 %)
Skupaj	460		460

Med presejalnima testoma smo tudi preverili, ali je delež pozitivnih rezultatov dobljenih z encimskoimunskim testom značilno večji od pozitivnih rezultatov dobljenih z imunofluorescenčnim testom. Mejne rezultate smo prišteli k pozitivnim rezultatom.

Med rezultati za določanje protiteles IgM, je bilo z imunofluorescenčnim testom testiranih 460 vzorcev, med njimi je bilo 143 vzorcev pozitivnih, z encimskoimunskim testom je bilo testiranih 2.796 vzorcev, med njimi pa je bilo 549 vzorcev pozitivnih. Delež pozitivnih rezultatov pri določanju protiteles IgM z imunofluorescenčnim testom ($SD = 0,0216$; $p \pm 0,311$) je značilno večji od pozitivnih rezultatov ($SD = 0,0075$; $p \pm 0,196$) z encimskoimunskim testom ($Z = 11,18$; $p < 0,001$).

Med rezultati za določanje protiteles IgG, smo z imunofluorescenčnim testom testirali 460 vzorcev, med njimi je bilo 115 vzorcev pozitivnih. Z encimskoimunskim testom smo testiranih 2.796 vzorcev, med njimi pa je bilo 825 vzorcev pozitivnih. Delež pozitivnih rezultatov z encimskoimunskim testom ($SD = 0,0086$; $p \pm 0,295$) ni statistično značilno večji od pozitivnih rezultatov ($SD = 0,0202$; $p \pm 0,250$) dobljenih z imunofluorescenčnim testom ($Z = 1,75$; $p = 0,96$).

4.2.3 Dokazovanje specifičnih protiteles IgM in IgG s testom imunoblot

S testom imunoblot smo potrjevali 737/1.631 (45,19%) pozitivnih in mejnih vzorcev serumov. S potrditvenim testom smo potrdili 123/291 (42,27%) pozitivnih in mejnih vzorcev serumov presejalnega testiranja protiteles razreda IgM in 256/446 (57,40 %) pozitivnih vzorcev serumov presejalnega testiranja protiteles razreda IgG. Več pozitivnih rezultatov smo ugotovili pri potrjevanju protiteles IgG (tabela XVI).

Tabela XVI: Rezultati 737 vzorcev serumov analiziranih z metodo imunoblot

IMUNOBLOT			
Specifična protitelesa IgM (število/delež analiziranih vzorcev)		Specifična protitelesa IgG (število/delež analiziranih vzorcev)	
Pozitivno ≥ 7 točk	123 (42,27 %)	Pozitivno ≥ 7 točk	256 (57,4 %)
Mejno 6 točk	5 (1,72 %)	Mejno 6 točk	34 (7,62 %)
Negativno ≤ 5 točk	163 (56,01 %)	Negativno < 5 točk	156 (34,98 %)
Skupaj	291		446

4.2.3.1 Rezultati testiranja pozitivnih protiteles IgM s potrditvenim testom imunoblot

Protein OspC sproži nastanek specifičnih protiteles v zgodnji fazi infekcije in ga najdemo pri vseh za človeka patogenih borelijskih vrstah. Je poglobitni specifični zgodnji protein za potrditev zgodnje borelijske okužbe. S testom imunoblot smo protein OspC dokazali pri 120/123 (97,56 %) pozitivnih vzorcih IgM. Samo v treh primerih so nastopali drugi proteini, ki so potrdili pozitiven presejalni test za protitelesa IgM. Flagelarni protein (p41)

je imunodominantni antigen, ki sproži močan zgodnji protitelesni odziv IgM. Dokazali smo ga pri 50/123 (40,56 %) pozitivnih vzorcih IgM (tabela XVII).

Tabela XVII: Število/delež analiziranih vzorcev seruma IgM z metodo imunoblot

Borelijski proteini	Število/delež analiziranih vzorcev
p100	8 (2,80 %)
VlsE	7 (2,40 %)
p58	2 (0,70 %)
p41	50 (40,60 %)
p39	7 (2,40 %)
OspA	0
OspC	120 (97,60 %)
p18	8 (6,50 %)

Pri 80/120 (66,67 %) vzorcih serumov smo protitelesni odziv na protein OspC istočasno dokazali pri vseh štirih patogenih vrstah. V 10/120 (8,33 %) vzorcih serumov smo protitelesni odziv na protein OspC dokazali samo pri *B. afzelii*. V 9/120 (7,50 %) vzorcih serumov smo protitelesni odziv na protein OspC istočasno dokazali pri *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii*. V ostalih vzorcih serumov je bil protitelesni odziv na protein OspC dokazan v različnih kombinacijah proti vsem štirim patogenim vrstam (tabela XVIII).

Tabela XVIII: Število analiziranih vzorcev serumov v katerih smo dokazali protitelesni odziv na protein OspC

Protein OspC				
Borelijska vrsta	<i>B. burgdorferi</i>	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i>	<i>B. spielmanii</i>
Število/delež vrst pri pozitivnih vzorcih	85 (70,83 %)	111 (92,50 %)	98 (81,67 %)	101 (84,17 %)
Število/delež vzorcev				
80/120 (66,67 %)	+	+	+	+
10/120 (8,33 %)		+		
9/120 (7,5 %)		+	+	+
6/120 (5,0 %)		+		+
3/120 (2,5 %)			+	
3/120 (2,5 %)		+	+	
3/120 (2,5 %)				+
2/120 (1,67 %)	+	+		
2/120 (1,67 %)			+	+
1/120 (0,83 %)	+	+	+	
1/120 (0,83 %)	+		+	+

4.2.3.2 Rezultati testiranja pozitivnih protiteles IgG s potrditvenim testom imunoblot

Proteina p100 in p18 sta specifična pozna proteina, značilna za pozno borelijsko okužbo, zato jih večinoma dokažemo pri potrjevanju protiteles IgG. V naših primerih smo protein p100 dokazali v 149/256 (58,20 %) in protein p18 v 201/256 (78,52 %) vzorcih serumov. Protein VlsE je široko reaktiven (imajo ga vse borelijske vrste) imunodominantni antigen, ki sproži zgodnji odziv, dokazali smo ga pri 246/256 (96,10 %) vzorcih serumov.

Protein p41 smo dokazali v 142/256 (55,47 %), ker pa ima podobno strukturo kot flagelin bičkov drugih bakterij, ki se gibljejo z bički (npr. treponeme) lahko predstavlja razlog za lažno reaktivnost v testu (tabela XIX).

Tabela XIX: Število analiziranih vzorcev seruma IgG z metodo imunoblot

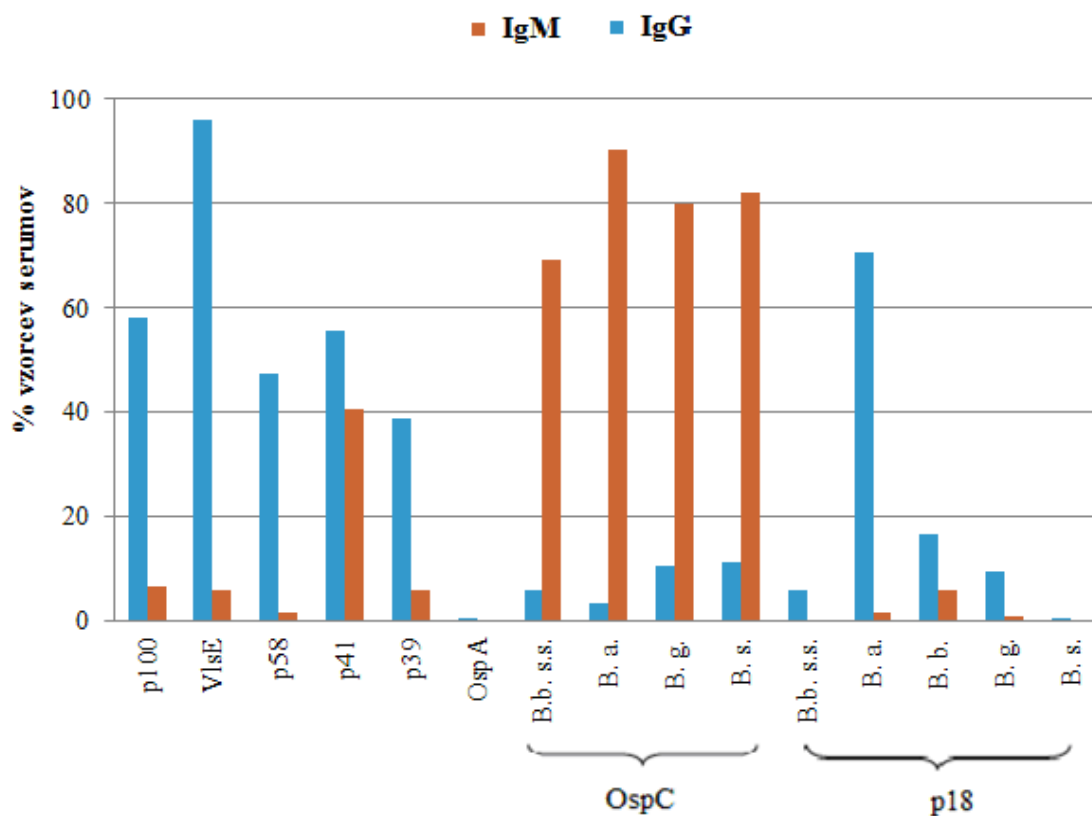
Borelijski proteini	Število/delež analiziranih vzorcev
p100	149 (58,20 %)
VlsE	246 (96,10 %)
p58	121 (47,30 %)
p41	142 (55,50 %)
p39	99 (38,70 %)
OspA	1 (0,40 %)
OspC	41 (16,0 %)
p18	203 (79,30 %)

Najpogosteje smo dokazali protitelesni odziv proti proteinu p18, ki je izražen pri *B. afzelii* pri 139/203 (68,50 %) vzorcih serumov. V 27/203 (13,30 %) vzorcih serumov smo dokazali protitelesni odziv proti p18 istočasno izražen pri *B. afzelii* in *B. bavariensis*. V ostalih primerih pa smo dokazali protitelesni odziv proti p18 izražen v različnih kombinacijah vseh petih borelijskih vrst (tabela XX).

Tabela XX: Število analiziranih vzorcev serumov v katerih smo dokazali protitelesni odziv na protein p18

Protein p18					
Borelijska vrsta	<i>B. burgdorferi</i>	<i>B. afzelii</i>	<i>B. bavariensis</i>	<i>B. garinii</i>	<i>B. spielmanii</i>
Število/delež vrst pri pozitivnih vzorcih	15 (5,90 %)	181 (71,10 %)	42 (16,41 %)	24 (9,40 %)	1 (0,40 %)
Število/delež vzorcev					
139/203 (68,5 %)		+			
27/203 (13,3 %)		+	+		
7/203 (3,45 %)			+		
6/203 (3 %)		+		+	
6/203 (3 %)	+			+	
5/203 (2,5 %)				+	
3/203 (1,5 %)	+	+			
2/203 (1 %)	+		+	+	
2/203 (1 %)		+	+	+	
1/203 (0,50 %)	+	+		+	
1/203 (0,50 %)			+	+	
1/203 (0,50 %)		+	+		+
1/203 (0,50 %)	+				
1/203 (0,50 %)	+	+	+		
1/203 (0,50 %)	+	+	+	+	

Slika 15 prikazuje na katere proteine v naših vzorcih so se vezala protitelesa IgM in na katere protitelesa IgG. Pri bolnikih z zgodnjo borelijsko okužbo najpogosteje zaznamo protitelesa IgM proti flagelinu p41 in proteinu OspC. Protitelesni odziv IgG na antigene p100, VlsE, p58, p39 in p18 pa je značilen za pozno borelijsko okužbo.



Slika 15: Prikaz odstotka vzorcev serumov bolnikov s sumom na borelijsko okužbo s protitelesi IgM in IgG proti specifičnim borelijskim antigenom (B.b. s.s = *B. burgdorferi sensu stricto*, B. a. = *B. afzelii*, B. b. = *B. bavariensis*, B. g. = *B. garinii*, B. s. = *B. spielmanii*)

4.2.4 Primerjava pozitivnih in mejnih rezultatov encimskoimunskega in imunofluorescenčnega testa pri določanju protiteles IgM in IgG v serumu bolnikov

Primerjali smo pozitivne in mejne rezultate protiteles IgM in IgG dveh presejalnih testov, ki smo jih nato potrjevali s potrditvenim testom imunoblot.

4.2.4.1 Primerjava pozitivnih in mejnih rezultatov za protitelesa IgM

Z encimskoimunskim testom smo v 239/291 (82,13 %) vzorcih serumov zaznali prisotnost specifičnih protiteles IgM in jih potrjevali s testom imunoblot. S testom imunoblot smo v 112/239 (46,86 %) vzorcih serumov dokazali prisotnost protiteles IgM proti bakteriji *B. burgdorferi*. Z imunofluorescenčnim testom smo v 52/291 (17,87 %) vzorcih serumov zaznali prisotnost specifičnih protiteles IgM in v 11/52 (21,15 %) vzorcih serumov dokazali prisotnost protiteles IgM s testom imunoblot (tabela XXI).

Tabela XXI: Primerjava rezultatov presejalnega testiranja protiteles IgM v serumu bolnikov z encimskoimunskim in imunofluorescenčnim testom

	število analiziranih vzorcev in nato potrjevanih s testom imunoblot				
	pozitiven rezultat	mejni rezultat	negativen rezultat	skupaj	
Encimskoimunski test	112	5	122	127	239
Imunofluorescenčni test	11	0	41	41	52
skupaj	123	5	163	168	291
test Hi-kvadrat; $\chi^2 = 10,54$; $p < 0,01$					

Pri določanju protitelesih IgM je število pozitivnih rezultatov dobljenih z encimskoimunskim testom značilno večje od pozitivnih rezultatov dobljenih z imunofluorescenčnim testom (test Hi-kvadrat; $\chi^2 = 10,54$; $p < 0,01$).

4.2.4.2 Primerjava pozitivnih in mejnih rezultatov za protitelesa IgG

Z encimskoimunskim testom smo v 400/446 (89,69 %) vzorcih serumov zaznali prisotnost specifičnih protiteles IgG in jih potrjevali s testom imunoblot. S testom imunoblot smo v 249/400 (62,25 %) vzorcih serumov dokazali prisotnost protiteles IgG.

Z imunofluorescenčnim testom smo v 46/446 (10,31 %) vzorcih serumov zaznali prisotnost specifičnih protiteles IgG in jih s testom imunoblot dokazali v 7/46 (15,20 %) vzorcih serumov (tabela XXII).

Tabela XXII: Primerjava rezultatov presejalnega testiranja protiteles IgG v serumu bolnikov z encimskoimunskim in imunofluorescenčnim testom

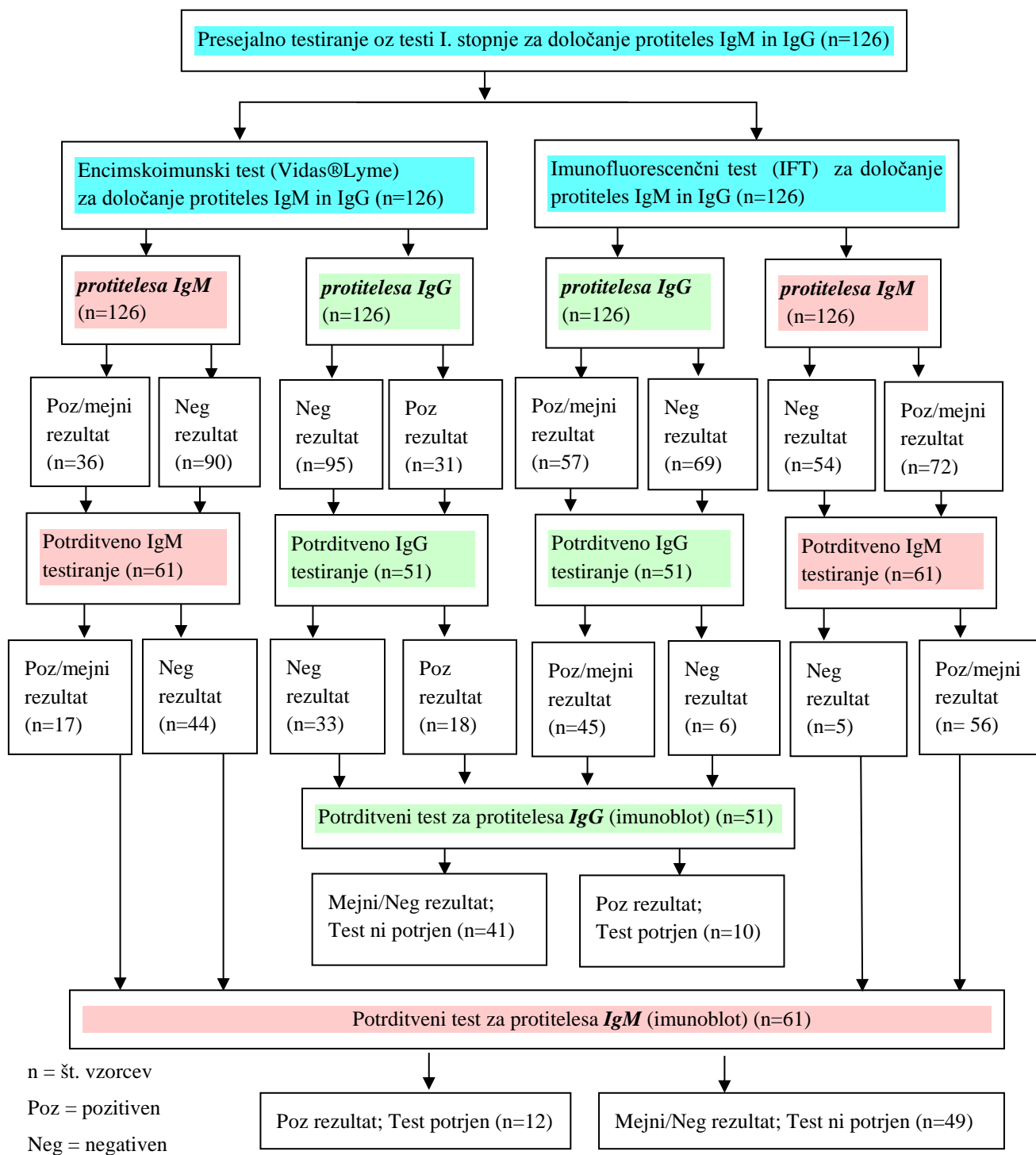
	<i>število analiziranih pozitivnih vzorcev in nato potrjevanih s testom imunoblot</i>				
	pozitiven rezultat	mejni rezultat	negativen rezultat	skupaj	
Encimskoimunski test	249	31	120	151	400
Imunofluorescenčni test	7	3	36	39	46
skupaj	256	34	156	190	446
test Hi-kvadrat; $\chi^2 = 35,42$; $p < 0,01$					

Pri določanju protiteles IgG je statistično pomembna razlika glede na pozitivne rezultate pri encimskoimunskem testu v primerjavi s pozitivnimi rezultati dobljenimi z imunofluorescenčnim testom (test Hi-kvadrat; $\chi^2 = 35,42$; $p < 0,01$).

Statistično potrjeno je boljše ujemanje rezultatov potrditvenega testa z encimskoimunskim testom, kot z imunofluorescenčnim testom.

4.2.5 Primerjava rezultatov encimskoimunskega in imunofluorescenčnega testa v serumu posameznega bolnika

Na sliki 16 je z diagramom consort prikazan proces testiranja 126 serumov z obema presejalnima testoma hkrati in nato potrjevanje neskladnih rezultatov s potrditvenim testom imunoblot.



Slika 16: Diagram Consort za testiranje 126 vzorcev serumov

4.2.5.1 Primerjava rezultatov encimskoimunskega in imunofluorescenčnega testa pri določanju protiteles IgM

Naredili smo primerjavo rezultatov dveh presejalnih testov (Vidas®Lyme, IFT) za določanje protiteles IgM v serumu. Za primerjavo rezultatov smo vzeli 126 serumov bolnikov, katerim smo istočasno določali protitelesa v serumu. Rezultati obeh presejalnih metod so se ujemali pri 65 (51,60 %) vzorcih serumov. Skladne rezultate smo dobili pri 16 (12,70 %) pozitivnih, pri 3 (2,38 %) mejnih in pri 46 (36,50 %) negativnih vzorcih. Pri 61 (48,40 %) vzorcih se rezultati sočasnega testiranja protiteles IgM niso ujemali. Skladnost med testoma je slaba ($\kappa = 21\%$) (tabela XXIII).

Tabela XXIII: Primerjava rezultatov encimskoimunskega in imunofluorescenčnega testa pri določanju protiteles IgM v serumu bolnikov

IgM		Encimskoimunski test						
		POZ ($I \geq 0,32$)	MEJNO ($0,20 \leq I < 0,32$)	NEG ($I < 0,20$)	skupaj			
		Število analiziranih vzorcev						
Imunofluorescenčni test	POZ ($\geq 1:64$)	Število analiziranih vzorcev	16	1	28	22	44	39
	MEJNO (1:32)		8	3		22		33
	NEG ($< 1:32$)		6	2	8	46	46	54
	skupaj		30	6	36	90		126
test McNemar; $\chi^2 = 24,9$; $p = 6,038 \times 10^{-7}$								

I = indeks

V primerjavi dveh presejalnih seroloških testov za določanje protiteles IgM v serumu smo ugotovili, da so razlike med rezultati obeh testov statistično značilne (test McNemar; $\chi^2 = 24,9$; $p < 0,05$). Pri tem smo mejne rezultate obeh testov upoštevali kot pozitiven rezultat.

4.2.5.2 Primerjava rezultatov encimskoimunskega in imunofluorescenčnega testa pri določanju protiteles IgG

Primerjali smo rezultate dveh presejalnih testov (Vidas®Lyme, IFT) za določanje IgG protiteles v serumu. Za primerjavo rezultatov smo vzeli 126 serumov bolnikov, katerim smo istočasno določali protitelesa v serumu. Rezultati obeh presejalnih metod so se ujemali pri 75 (59,52 %) vzorcih serumov. Skladne rezultate smo dobili pri 13 (10,32 %) pozitivnih in pri 62 (49,21 %) negativnih vzorcih. Pri 51 (40,48 %) vzorcih se rezultati sočasnega testiranja IgG protiteles niso ujemali. Skladnost med testoma je slaba ($\kappa = 33 \%$) (tabela XXIV).

Tabela XXIV: Primerjava rezultatov encimskoimunskega in imunofluorescenčnega testa pri določanju protiteles IgG v serumu bolnikov

IgG			Encimskoimunski test					
			POZ ($I \geq 0,32$)	MEJNO ($0,20 \leq I < 0,32$)	NEG ($I < 0,20$)	skupaj		
			Število analiziranih vzorcev					
Imunofluorescenčni test	POZ ($\geq 1:256$)	Število analiziranih vzorcev	13	0	24	16	33	29
	MEJNO (1:128)		11	0		17		28
	NEG ($< 1:128$)		7	0	7	62	62	69
	skupaj		31	0	31	95		126
test McNemar; $\chi^2 = 16,9$; $p = 3,94 \times 10^{-5}$								

Pri določanju protiteles IgG v serumu z dvema presejalnima testoma smo ugotovili, da so razlike med rezultati obeh testov statistično značilno (test McNemar; $\chi^2 = 16,9$; $p < 0,05$). Pri tem smo mejne rezultate imunofluorescenčnega testa upoštevali kot pozitivne.

4.2.5.3 Primerjava rezultatov encimskoimunskega in imunofluorescenčnega testa za določanje protiteles IgM in potrjevanje prisotnosti protiteles IgM s testom imunoblot v serumu posameznega bolnika

S presejalnima encimskoimunskim in z imunofluorescenčnim testom smo protitelesa IgM določali pri 61 vzorcih serumov, ter jih istočasno potrjevali s potrditvenim testom imunoblot. Z imunofluorescenčnim testom smo dobili pozitiven rezultat pri 25/61 (41,0 %) vzorcih serumov. Z encimskoimunskim testom pa smo pozitiven rezultat dobili pri 14/61 (23,0 %) vzorcih serumov. S potrditvenim testom imunoblot smo med testiranimi vzorci določili 12 (34,40 %) pozitivnih in 49 (80,30 %) negativnih rezultatov. Glede na dobljene rezultate smo zaznali ujemanje rezultatov encimskoimunskega testa s potrditvenim testom imunoblot v 52 primerih (tabela XXV), ujemanje z imunofluorescenčnim testom pa v 16 primerih (tabela XXVI). Izračunana skladnost med potrditvenim testom imunoblot in encimskoimunskim testom je zelo dobra ($\kappa = 56\%$). Skladnost med potrditvenim testom imunoblot in imunofluorescenčnim testom pa je slaba ($\kappa = 2\%$).

Tabela XXV: Primerjava rezultatov protiteles IgM med encimskoimunskim testom in testom imunoblot

IgM		Imunoblot						
		POZ (≥ 7 točk)		MEJNO (6 točk)	NEG (≤ 5 točk)		skupaj	
		Število analiziranih vzorcev						
Encimskoimunski test	POZ ($I \geq 0,32$)	Število analiziranih vzorcev	10	10	0	4	7	14
	MEJNO ($0,20 \leq I < 0,32$)		0		0	3		3
	NEG ($I < 0,20$)	2	2	0	42	42	44	
	skupaj	12	12	0	49	49	61	
test McNemar; $\chi^2 = 2,78$; $p = 0,096$								

Tabela XXVI: Primerjava rezultatov protiteles IgM med imunofluorescenčni testom in testom imunoblot

IgM			Imunoblot					
			POZ (≥ 7 točk)		MEJNO (6 točk)	NEG (≤ 5 točk)		skupaj
			Število analiziranih vzorcev					
Imunofluorescenčni test	POZ (≥ 1:64)	Število analiziranih vzorcev	6	11	0	19	44	25
	MEJNO (1:32)		5		0	25		30
	NEG (< 1:32)		1	1	0	5	5	6
	skupaj		12	12	0	49	49	61
test McNemar; $\chi^2 = 41,1$; $p = 1,5 \times 10^{-10}$								

Pri dokazovanju protiteles IgM med presejalnim encimskoimunskim testom in potrditvenim testom imunoblot nismo ugotovili statistično značilne razlike med dobljenimi rezultati (test McNemar; $\chi^2 = 2,78$; $p < 0,05$). Statistično značilno razliko smo ugotovili med imunofluorescenčnim testom in potrditvenim testom imunoblot (test McNemar; $\chi^2 = 41,1$; $p < 0,05$). Rezultati presejalnega encimskoimunskega testa se boljše ujemajo z rezultati potrditvenega testa imunoblot. Pri tem smo mejne rezultate presejalnih testov upoštevali kot pozitivne, mejni rezultat testa imunoblot pa kot negativen.

4.2.5.4 Primerjava rezultatov encimskoimunskega in imunofluorescenčnega testa za določanje protiteles IgG in potrjevanje prisotnosti protiteles IgG s testom imunoblot v serumu posameznega bolnika

Protitelesa IgG smo s presejalnima encimskoimunskim in z imunofluorescenčnim testom določali pri 51 vzorcih serumov, ter jih istočasno potrjevali s potrditvenim testom imunoblot. Z imunofluorescenčnim testom smo dobili pozitiven rezultat pri 20/51 (39,20 %) vzorcih serumov, pri encimskoimunskem testu pa smo pozitiven rezultat dobili pri 18/51 (35,30 %) vzorcih serumov. S potrditvenim testom imunoblot smo med testiranimi vzorci določili 10 (19,60 %) pozitivnih, 1 (2,0 %) mejnih in 40 (78,40 %) negativnih rezultatov. Rezultati encimskoimunskega testa so se s potrditvenim testom imunoblot ujemali pri 43 vzorcih (tabela XXVII), medtem ko so se rezultati imunofluorescenčnega testa ujemali pri 14 vzorcih (tabela XXVIII). Skladnost med potrditvenim testom imunoblot in encimskoimunskim testom je dobra ($\kappa = 61\%$), medtem ko je skladnost potrditvenega testa imunoblot z imunofluorescenčnim testom slaba ($\kappa = 2\%$).

Tabela XXVII: Primerjava rezultatov protiteles IgG med encimskoimunskim testom in testom imunoblot

IgG		Imunoblot						
		POZ (≥ 7 točk)		MEJNO (6 točk)	NEG (≤ 5 točk)		skupaj	
		Število analiziranih vzorcev						
Encimskoimunski test	POZ ($I \geq 0,20$)	Število analiziranih vzorcev	10	10	1	7	8	18
	/		0		0	0		0
	NEG ($I < 0,20$)		0	0	0	33	33	33
	skupaj		10	10	1	40	41	51
test McNemar; $\chi^2 = 8$; $p = 0,005$								

Tabela XXVIII: Primerjava rezultatov protiteles IgG med imunofluorescenčnim testom in testom imunoblot

IgG			Imunoblot					
			POZ (≥ 7 točk)		MEJNO (6 točk)	NEG (≤ 5 točk)		skupaj
			Število analiziranih vzorcev					
Imunofluorescenčni test	POZ (≥ 1:256)	Število analiziranih vzorcev	4	9	0	16	36	20
	MEJNO (1:128)		5		0	20		25
	NEG (< 1:128)		1	1	1	4	5	6
	skupaj		10	10	1	40	41	51
test McNemar; $\chi^2 = 33,1$; $p = 8,75 \times 10^{-9}$								

Pri dokazovanju protiteles IgG smo ugotovili statistično značilno razliko med imunofluorescenčnim testom in potrditvenim testom imunoblot (test McNemar; $\chi^2 = 33,1$; $p < 0,05$). Med encimskoimunskim in testom imunoblot nismo ugotovili statistično značilne razlike (test McNemar; $\chi^2 = 8$; $p < 0,05$). Rezultati presejalnega encimskoimunskega testa se boljše ujemajo z rezultati potrditvenega testa imunoblot. Pri tem smo mejne rezultate presejalnih testov upoštevali kot pozitivne, mejni rezultat testa imunoblot pa kot negativen.

5 RAZPRAVA

Diagnostika okužb z borelijami je osnovana na epidemioloških in kliničnih podatkih, ki jih je velikokrat potrebno dopolniti z mikrobiološkimi preiskavami. Kožna sprememba *erythema migrans* (EM) je tako značilen bolezenski znak, da omogoča zanesljivo klinično diagnozo borelijske okužbe, brez dodatnega dokazovanja povzročitelja. Velikokrat pa se okužba pokaže s klinično sliko, ki s precejšno verjetnostjo nakazuje borelijsko etiologijo ali pa je za borelijsko okužbo celo povsem neznačilna in pri teh je mikrobiološka potrditev okužbe nujna. Laboratorijska potrditev borelijske okužbe temelji na neposrednih metodah (osamitev borelij in dokaz borelijske DNA z metodo verižne reakcije s polimerazo) in posrednih metodah (dokaz specifičnih protiteles). Teste izbiramo glede na potek bolezni in trajanje težav, rezultate pa je vedno potrebno vrednotiti skupaj s klinično sliko bolnika (57, 58, 59).

V vsakdanji praksi kliniki vedno bolj naročajo serološke preiskave, s katerimi v serumu dokazujemo prisotnost specifičnih protiteles proti bakteriji *B. burgdorferi*. Prednost seroloških testov je v tem, da so hitri in enostavni ter že tovarniško pripravljene in dostopni mnogim diagnostičnim laboratorijem. Njihova pomanjkljivost pa se kaže v tem, da še vedno niso standardizirani. Različni testi so različno občutljivi in specifični (57).

Z magistrsko nalogo smo želeli ovrednotiti dva različna presejalna testa, encimskoimunski test (VIDAS®Lyme, BioMerieux) in imunofluorescenčni test (IFT *Borrelia*, Viro-immun), s katerima smo v serumih bolnikov določali prisotnost specifičnih protiteles razredov IgM in IgG. V raziskavo smo vključili 3.256 vzorcev serumov bolnikov, ki so jih na testiranje zaradi suma na borelijsko okužbo v naš laboratorij poslali iz zdravstvenih domov in bolnišnic širšega območja gorenjske regije v obdobju od oktobra 2011 do oktobra 2014. Klinične diagnoze preiskovanih bolnikov so bile le delno opredeljene ali pa niso bile podane, zato občutljivosti in specifičnosti obeh testov nismo določali. Med seboj smo primerjali le rezultate seroloških testov, njihovo ujemanje s potrditvenim testom imunoblot in uporabnost posamezne metode.

Pri serološkem dokazovanju specifičnih borelijskih protiteles sledimo smernicam dvostopenjskega algoritma (73). V prvi stopnji naredimo občutljivi imunofluorescenčni ali encimskoimunski test, ki ju uporabimo kot presejalni test. Nato pa v drugi stopnji mejne in pozitivne rezultate presejalnega testiranja potrjujemo še s specifičnim testom imunoblot oziroma potrditvenim testom (20).

V procesu presejalnega testiranja smo z encimskoimunskim testom ločeno določali specifična protitelesa IgM in IgG v 2.796 vzorcih in z imunofluorescenčnim testom v 460 vzorcih. Z encimskoimunskim testom smo v 549 vzorcih (19,63 %) dobili pozitiven ali mejni rezultat na prisotnost protiteles IgM in v 825 vzorcih (29,51 %) na prisotnost protiteles IgG. Z imunofluorescenčnim testom smo pri določanju protiteles IgM dobili pozitiven ali mejni rezultat v 143 vzorcih (31,09 %) in v 115 vzorcih (25,00 %) pri določanju protiteles IgG.

Delež pozitivnih ali mejnih protiteles IgM je bil z imunofluorescenčnim testom signifikantno višji od deleža pozitivnih ali mejnih protiteles IgM pri encimskoimunskem testu, medtem ko pri določanju protiteles IgG te razlike med testoma ni bilo opaziti. Menimo, da je to posledica navzkrižne reaktivnosti protiteles zaradi drugih okužb. Poleg tega so razlike med testoma odvisne tudi od vrednotenja testa, saj rezultate imunofluorescenčnega testa vrednotimo vizualno z mikroskopiranjem, torej so podvrženi subjektivni presoji in izkušnosti laboratorijskega osebja.

Med mejnimi in pozitivnimi rezultati presejalnega testiranja smo izvedli 737 potrditvenih testov z metodo imunoblot, od tega 291 (39,50 %) za protitelesa IgM in 446 (60,50 %) za protitelesa IgG. Specifična protitelesa IgM smo potrdili v 123 (42,27 %) vzorcih, specifična protitelesa IgG pa v 256 (57,40 %) vzorcih serumov.

Odziv bolnika na borelijsko okužbo se kaže s tvorbo specifičnih protiteles razredov IgM in IgG, usmerjenih proti antigenom *B. burgdorferi* sensu lato (62). Za borelijsko okužbo je značilno, da se imunski odziv gostitelja razvija počasi, saj porast prvih specifičnih protiteles IgM v krvi zaznamo šele med 3. in 6. tednom po okužbi (6, 63). V zgodnji fazi borelijske okužbe so protitelesa usmerjena predvsem proti borelijskemu flagelinu (p41) in proteinu OspC. Oba lahko izzoveta močan IgM protitelesni odziv gostitelja (74).

V našem laboratoriju smo s testom imunoblot dokazali protitelesni odziv na protein OspC v 97,56 % pozitivnih vzorcev IgM (120/123). Protitelesni odziv na flagelarni protein (p41) pa smo dokazali v 40,56 % (50/123) pozitivnih vzorcev IgM.

Pri razčlenitvi proteina OspC na posamezno borelijsko vrsto smo ugotovili, da je bil v 66,67 % (80/120) vzorcev serumov istočasno dokazan protitelesni odziv na vse štiri patogene borelijske vrste (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii* in *B. burgdorferi* sensu stricto). V 8,33 % (10/120) smo protitelesni odziv na protein OspC dokazali samo za *B. afzelii*, v 7,50 % (9/120) za *B. afzelii*, *B. garinii* in *B. spielmanii*, v ostalih vzorcih pa je bil protitelesni odziv na protein OspC dokazan v različnih kombinacijah proti vsem štirim borelijskim vrstam.

Razlog bi lahko bil, da je bil bolnik okužen z dvema ali več vrstami borelij, možna pa bi bila tudi navzkrižna reaktivnost človeških protiteles z rekombinantnimi antigeni različnih vrst.

S trajanjem borelijske okužbe se v obdobju od nekaj tednov do mesecev postopoma razvijejo specifična protitelesa IgG, ki se usmerijo proti vse večjemu številu borelijskih antigenov. Med njimi v našem testu določamo VlsE, DbpA (p18), p100, p41, OspA, OspC in p39 (64, 74). Protein VlsE je široko reaktiven imunodominanten antigen, ki sproži nastanek specifičnih borelijskih protiteles v zgodnjih in v poznih stadijih okužbe. Raziskovalci verjamejo, da je protein VlsE med najbolj uporabnimi v diagnostiki borelijskih okužb, saj serološkemu testu daje dobro občutljivost in specifičnost. Protitelesa proti VlsE lahko zaznamo pri bolnikih, okuženih s katerim koli patogenim genotipom borelij, tveganje za lažno pozitivne rezultate pa je 10× manjše (24). Zelo pomembno vlogo ima tudi borelijski adhezin DbpA, ki je v našem testu označen kot p18. Sodeluje pri razsoju borelij po gostiteljevem organizmu (diseminirana okužba) in pri kroničnem oz. poznem stadiju bolezni (18). Je močan imunogen in spodbudi sintezo specifičnih protiteles IgG. Tudi protein p100 je specifičen pozni protein, značilen za pozno borelijsko okužbo, zato ga večinoma dokažemo pri potrjevanju protiteles IgG.

V naših vzorcih smo protein VlsE dokazali v 96,10 % (246/256), protein p18 v 78,52 % (201/256) in protein p100 v 58,20 % (149/256) primerih. V relativno visokem odstotku (55,47 %) smo dokazali tudi flagelarni protein (p41), ki je pomemben predvsem pri zgodnjem imunskem odzivu. Njegova strukturna podobnost z bički drugih bakterij povzroča navzkrižno reaktivnost in s tem nizko specifičnost.

Pri razčlenjevanju proteina p18 na posamezno borelijsko vrsto smo ugotovili, da so bila v največjem deležu (68,50 %) dokazana protitelesa proti p18 *B. afzelii*, redkeje pa smo dokazali protitelesni odziv proti p18 ostalih borelijskih vrst.

Znano je, da na območju Slovenije prevladuje borelija *B. afzelii*, za katero je potrjeno, da je najpogostejši povzročitelj kožnih sprememb in zajema do 80 % vseh izolatov, sledi ji *B. garii*, ki zajema do 20 % izolatov in je najpogostejša povzročiteljica nevroborelioz, zelo redko pa izolirajo *B. burgdorferi sensu stricto* (manj kot 5 %) in *B. spielmani* (manj kot 1 %) (7). Tudi v naši raziskavi smo ugotovili, da na področju gorenjske regije prevladuje borelijska vrsta *B. afzelii*, sledi ji *B. bavariensis* in nato *B. garinii*, redkeje pa smo dokazali še druge borelijske vrste.

Z magistrsko nalogo smo želeli ugotoviti, s katero presejalno metodo dobimo več rezultatov, ki so nato resnično pozitivni s potrditvenim testom. Tako smo primerjali pozitivne in mejne rezultate obeh presejalnih testov, ki smo jih potrdili s testom imunoblot. S testom imunoblot smo prisotnost protiteles IgM v serumu dokazali v 46,86 % (112/239) vzorcev testiranih z encimskoimunskim testom in v 21,15 % (11/52) vzorcev testiranih z imunofluorescenčnim testom. Prisotnost protiteles IgG v serumu smo potrdili v 62,25 % (249/400) vzorcev testiranih z encimskoimunskim testom in v 15,20 % (7/46) vzorcev testiranih z imunofluorescenčnim testom. Z izračunom χ^2 – testa smo dokazali statistično pomembno razliko med presejalnima testoma tako pri detekciji protiteles IgM kot tudi pri detekciji protiteles IgG ($p < 0,01$). Statistično potrjeno je boljše ujemanje rezultatov potrditvenega testa z encimskoimunskim testom, kot z imunofluorescenčnim testom.

Hkrati smo naredili tudi primerjavo med obema presejalnima testoma (encimskoimunski in imunofluorescenčni test) tako, da smo v 126 serumih bolnikov istočasno določali protitelesa IgM in IgG z obema testoma. Pri določanju protiteles IgM so se rezultati obeh presejalnih metod ujemali v 51,60 % (65/126) vzorcev. Skladne rezultate smo dobili pri 12,70 % pozitivnih (16 vzorcev), pri 2,38 % mejnih (3 vzorci) in pri 36,50 % negativnih (46 vzorcev). Pri 48,40 % (61 vzorcev) se rezultati sočasnega testiranja protiteles IgM niso ujemali. Tudi izračuna skladnost med testoma je slaba ($\kappa = 21$ %). Pri določanju protiteles IgG pa so se rezultati obeh presejalnih metod ujemali v 59,52 % (75/126 vzorcev). Skladne rezultate smo dobili pri 10,32 % pozitivnih (13 vzorcev) in pri 49,21 % negativnih (62 vzorcev). V 40,48 % (51 vzorcev) se rezultati sočasnega testiranja protiteles IgG niso

ujemali. Izračunana skladnost med testoma je bila prav tako slaba ($\kappa = 33 \%$). Za statistično primerjavo razlik med testoma smo uporabili McNemarjev test in ugotovili, da so razlike med rezultati obeh testov tako pri določanju protiteles IgM ($p = 6,038 \times 10^{-7}$) kot pri določanju protiteles IgG ($p = 3,94 \times 10^{-5}$) statistično značilne. Z imunofluorescenčnim testom smo dokazali več serološko pozitivnih rezultatov tako pri določanju protiteles IgM kot tudi protiteles IgG. Neskladne rezultate hkratnega presejalnega testiranja z obema presejalnima testoma smo testirali še s potrditvenim testom.

Pri dokazovanju protiteles IgM je bilo neskladnih 61 rezultatov. Rezultati encimskoimunskega testa so se ujemali s potrditvenim testom imunoblot v 85,20 % (52/61) primerih, medtem ko je bilo ujemanje z imunofluorescenčnim testom pa le 26,20 % (16/61). Pri dokazovanju protiteles IgG pa je bilo neskladnih 51 rezultatov. Rezultati dokazovanja protiteles IgG z encimskoimunskim testom so se s potrditvenim testom imunoblot ujemali pri 84,30 % (43/51) vzorcih, medtem ko so se rezultati imunofluorescenčnega testa ujemali le v 27,50 % (14/51). Izračunana skladnost med potrditvenim testom imunoblot in encimskoimunskim testom je bila zelo dobra ($\kappa = 56 \%$ za protitelesa IgM, $\kappa = 61 \%$ za protitelesa IgG), medtem ko je bila skladnost imunofluorescenčnega testa s potrditvenim testom imunoblot slaba ($\kappa = 2 \%$ za protitelesa IgM, $\kappa = 2 \%$ za protitelesa IgG).

Rezultati primerjave encimskoimunskega testa s potrditvenim testom za dokazovanje specifičnih protiteles IgM in IgG kažejo, da med testoma nismo dokazali statistično pomembne razlike ($p = 0,096$ za protitelesa IgM, $p = 0,005$ za protitelesa IgG) in da se testa med seboj dobro ujemata. Nasprotno pa smo pri primerjanju imunofluorescenčnega testa s potrditvenim testom ugotovili statistično pomembno razliko pri obeh protitelesih ($p = 1,5 \times 10^{-10}$ za protitelesa IgM, $p = 8,75 \times 10^{-9}$ za protitelesa IgG).

Naši rezultati torej pokažejo razlike med presejalnimi testi. Lahko bi rekli, da je imunofluorescenčni test sicer analitično bolj občutljiv, vendar gre to na račun slabše specifičnosti. Klinično to pomeni, da zahteva več potrditvenega testiranja in posledično poveča stroške laboratorijskih testov.

Tudi druge študije so pokazale, da obstajajo razlike v kakovosti presejalnih testov. To bi lahko pripisali razlikam v sami metodologiji posameznega testa, na primer uporabi

različnega antigena, razliki v občutljivosti in specifičnosti testov, ter tudi v interpretaciji rezultatov (72).

Encimskoimunski in imunofluorescenčni test se med seboj razlikujeta glede izbire seva borelije za antigen in naboru antigenov, ki jih posamezni test vsebuje. Pri imunofluorescenčnem testu kot borelijski antigen uporabljamo neaktiven sev borelijske vrste *B. afzelii*, ki je pritrjen na objektno stekelce (cela – nativna borelijska celica), medtem ko encimskoimunski test vsebuje rekombinantne borelijske antigene iz sklopa *B. burgdorferi* sensu lato (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto). V encimskoimunski test je vključen rekombinantni protein OspC kot pomemben antigen v zgodnji fazi borelijske okužbe, saj lahko izzove močan protitelesni IgM odziv gostitelja. Prav tako sta v test vključena tudi rekombinantna proteina VlsE in DbpA (p18), ker imata pomembno vlogo pri odkrivanju specifičnih protiteles IgG predvsem v zgodnjem diseminiranem in kroničnem poteku okužb z borelijami. Uporaba rekombinantnih proteinov poveča občutljivost in specifičnost seroloških testov, ker zmanjša vpliv navzkrižnih in lažnih reakcij (57, 69).

Testa sta različna tudi v izvajanju postopka testiranja. Izvedba encimskoimunske metode (VIDAS®Lyme) je cenejša, enostavna za uporabo in hitrejša, saj gre za popolnoma avtomatiziran kvalitativen test. V aparat vstavimo s črtno kodo označen reagenčni trak z vzorcem seruma in po približno 27 minutah se test zaključi in aparat sam ovrednoti rezultat. V nasprotju z encimskoimunskim testom pa imunofluorescenčni test izvajamo ročno, kar dopušča večjo možnost človeških napak v različnih fazah izvedbe testa, kot so redčenje vzorca, nanašanje razredčine vzorca na objektno stekelce, spiranje, možnost kontaminacije, mikroskopiranje in subjektivna interpretacija rezultatov. Zato je nujno, da imunofluorescenčni test izvaja izkušeno laboratorijsko osebje.

Pomemben dejavnik, ki zmanjšuje zanesljivost in primerljivost rezultatov in hkrati standardizacijo seroloških metod, je tudi heterogenost borelijskih antigenov med vrstami borelij, ki sodijo v sklop *B. burgdorferi* sensu lato ter različna geografska porazdeljenost borelij (9, 57). Trenutno v Sloveniji še ni povsem enotne doktrine na področju testiranja borelijskih okužb, zato je potrebno, da dobljene rezultate seroloških preiskav vrednotimo v luči klinične slike bolnika. V Sloveniji imamo visoko stopnjo prekuženosti zdrave populacije. To je še dodaten faktor, ki otežuje rutinsko diagnostiko borelijskih okužb. Nujno bi bilo izbirati serološke teste z visoko občutljivostjo in specifičnostjo.

6 SKLEP

V magistrski nalogi smo primerjali dve presejalni metodi (encimskoimunsko in imunofluorescenčno metodo) za določanje specifičnih protiteles razreda IgM in IgG proti bakteriji *B. burgdorferi* sensu lato v človeškem serumu.

- Ugotovili smo, da so se dobljeni rezultati med seboj razlikovali. Z imunofluorescenčnim testom smo dobili statistično značilno več serološko pozitivnih ali mejnih rezultatov.
- Izvajanje encimskoimunskega testa je v primerjavi z imunofluorescenčnim testom enostavnejše, cenejše in hitrejše, saj gre za popolnoma avtomatiziran kvalitativen test dokazovanja specifičnih protiteles IgM in IgG v serumu.
- Prednost encimskoimunskega testa je tudi ta, da uporablja kombinacijo specifičnih rekombinantnih borelijskih proteinov, predvsem OspC, za dokazovanje protiteles IgM v zgodnji fazi okužbe in proteina VlsE in DbpA za dokazovanje protiteles IgG v kasni fazi okužbe, medtem ko imunofluorescenčni test uporablja nativni antigen – celo borelijsko celico za obe vrsti protiteles.
- Ugotovili smo, da so se rezultati dokazovanja protiteles razredov IgM in IgG v serumu bolnikov z encimskoimunskim testom signifikantno bolje ujemali z rezultati potrditvenega testa imunoblot od rezultatov dobljenih z imunofluorescenčnim testom.
- V vzorcih, ki smo jih v laboratoriju pregledali v obdobju od oktobra 2011 do oktobra 2014 smo ugotovili, da na področju gorenjske regije prevladuje borelijska vrsta *B. afzelii*, sledi ji *B. bavariensis*, nato *B. garinii*, veliko redkeje pa smo dokazali še druge borelijske vrste.
- Imunoblot nam, tako kot encimskoimunski ali imunofluorescenčni test, dokazuje prisotnost specifičnih protiteles proti borelijam. Test uporabljamo za potrjevanje pozitivnih in mejnih rezultatov prve stopnje testiranja, ker je visoko specifičen. S tem testom dobimo podatek **a)** o specifičnosti prisotnih borelijskih protiteles, **b)** o borelijski vrsti in **c)** o stadiju (fazi) okužbe.

7 LITERATURA

1. Strle F: Klinična slika Lymske borelioze (LYME BORRELIOSIS) Zdrav Obzor 1989; 23: 163-170
2. Ružič-Sabljić E: Borelije, V: Gubina M, Ihan A: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Medicinski razgledi, Ljubljana 2002,,: 293-302
3. Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP: Diagnosis of Lyme Borreliosis, Clinical Microbiology Reviews, 2005, Vol. 18, No. 3: 484–509
4. Ružič-Sabljić E: Značilnosti bakterij, ki povzročajo lymsko boreliozo pri ljudeh, V: Strle F: Lymska borelioza 2000, 2. slovensko posvetovanje o lymski boreliozi, zbornik predavanj, Društvo za lymsko boreliozo, Infektološka sekcija SDZ, 2000:15-20
5. Ružič-Sabljić E: Borelije in lymska borelioza, 2005, http://www.revija-vita.com/index.php?page=6&iskanje=2&naslovvita=Lymska_borelioza
6. Tomažič J, Strle F s sodelavci, Infekcijske bolezni, Združenje za infektologijo, Slovensko zdravniško društvo Ljubljana 2014/2015; prva izdaja: 505-512
7. Ružič-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; UKC Ljubljana: Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana, 2012: 15-23
8. Mravljak M, Velnar T: Elektrokardiografske spremembe pri otrocih z erythema migrans, med razgl 2006; 45:21-34
9. Malovrh T: Proučevanje imunskega odziva pri eksperimentalni okužbi miši z bakterijami *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzeli* in *Borrelia garinii*. Doktorsko delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 2000: str. 8,14,28
10. Wilske B, Johnson JBB, Schriefer ME: *Borrelia*; Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA: Manual of clinical microbiology 9th ed.; American Society for Microbiology,2007: 971-984
11. Kuret J: Morfologija in ultrastruktura bakterije, *Borrelia burgdorferi* S. L. in njene spremembe po delovanju nekaterih antibiotikov, Doktorska naloga, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 1999: str.12-15
12. Ružič-Sabljić E: Pomen fenotipske in genotipske analize bakterije *Borrelia burgdorferi* za patogenezo lymske borelioze, Doktorska naloga Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 1997: str.14,18,23-25
13. Barbour AG, Hayer SF: Biology of *Borrelia* species, Microbiological Reviews, 1986; 50(4): 381-400
14. Ružič-Sabljić E: Značilnosti bakterije, ki povzročajo lymsko boreliozo pri ljudeh V: Strle F: Lymska borelioza 2006, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja; UKC Ljubljana: Društvo za boj proti lymski boreliozi: Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana,2006: 15-23

15. Karami A: Molecular Biology of *Borrelia burgdorferi*, Lyme Disease, Dr. Ali Karami (Ed.), InTech, 2012, Available from: <http://www.intechopen.com/books/lyme-disease/-molecular-biology-of-lyme-disease-agent->
16. <http://www.lymeneteurope.org/info/borrelia-burgdorferi>
17. Brandt ME, Riley BS, Radolf JD, Norgardi MV: Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins; *Infection and Immunity*, 1990; 58(4): 983-991
18. Kenedy MR, Lenhart TR, Akins DR: The role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins, *FEMS Immunol Med Microbiol* 66, 2012: 1–19
19. Wang G, van Dam AP, Achwartz I, Dankert J: Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications, *Clinical Microbiology Reviews*, 1999;12(4): 633-653
20. Zajkowska JM: Antibody-based techniques for detection of Lyme disease: a challenging issue; *Antibody Technology Journal* 2014;4;33–44
21. Singh SK, Girschick HJ: Lyme borreliosis: from infection to autoimmunity, *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 598–614
22. Zore A: Vloga malih sesalcev in ptic pri kroženju borelij v naravi, Doktorska naloga Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 2002: str.15-19
23. Seshu J, Skare JT: The Many Faces of *Borrelia burgdorferi*, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2000, 2(4): 463-472
24. Tokarska-Rodak M, Koziol-Montewka M: The Serology Diagnostic Schemes in *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Infections –Significance in Clinical Practice; Karami A: Lyme Disease, 2012 <http://www.intechopen.com/books/lyme-disease/the-serologydiagnostic-schemes-in-borrelia-burgdorferi-sensu-lato-infections-significance-in-clinic>
25. Šimenc J: Vrednotenje elektroforeze s spreminjajočo temperaturo za identifikacijo in tipizacijo borelij lajmske borelioze, Magistrska naloga, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta 2004:str.18
26. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezní v Sloveniji v letu 2013; vir NIJZ
27. Stanek G, Strle F: Lyme borreliosis, *Lancet*, 2003; 362:1639-47
28. Smith RP: Ticks: the Vectors of Lyme disease; John J. Halperin, MD; Lyme disease: An Evidence-based Approach/Advances in molecular and cellular microbiology, 20; 2011 <http://books.google.si/books?id=ajh4a8kjoeAC&printsec=frontcover&hl=sl#v=onepage&q&f=false>
29. Sočan M: Epidemiologija prijavljenih primerov lymске borelioze v sloveniji V: Maraspin Čarman V, Strle F: Lymška borelioza 2012, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja; UKC Ljubljana: Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana: 2012; 25-32
30. Strle F: Lyme borreliosis in Slovenia. *Zentbl Bakteriologie* 1999; 289: 643-652

31. Strle F, Ružič-Sabljić E, Cimperman J, Lotrič-Furlan S, Maraspin V: Comparison of findings for patients with *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* isolated from cerebrospinal fluid, *Clinical Infectious Diseases*, 2006; 43(6): 704-10
32. Videčnik J, Zorman P: Klinične in epidemiološke značilnosti bolnikov z erythema migrans; *Clinical and Epidemiological Characteristics of Patients with Erythema Migrans MED RAZGL* 2001; 40:383 – 400 raziskovalni članek
33. Strle F, Maraspin-Čarman V, Furlan-Lotrič S, Ružič-Sabljić E, Pleterski-Rigler D, Cimperman J: Epidemiološke značilnosti lymške borelioze v Sloveniji, *Zdravstveni vestnik*, 1995; 64: 145-50
34. Lotrič Furlan S, Maraspin Čarman V: Bolezni, ki jih prenašajo klop; *MED RAZGL* 1996; 35: 363–382
35. Logar J: Klopi in pršice (*Acarina*), V: *Parazitologija človeka*, Radovljica: Didakta, 2010: 167-170
36. Zore A, Trilar T, Ružič-Sabljić E, Avšič-Županc T: Okuženost klopov in malih sesalcev z bakterijami *Borrelia burgdorferi* sensu lato v Sloveniji. V: Strle F: *Lymska borelioza 2006*, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, UKC Ljubljana, Društvo za boj proti lymski boreliozi: Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana, 2006:23- 30
37. Lešničar J, Strle F: Klopni meningoencefalitis, *Lymska borelioza*, Celje, 1992: 72
38. Funa A, Šavs T, Škrgat S: Kako dolgo imajo bolniki z Erythema migrans prisesane klope, *Medicinski razgledi*, 1996, 35: 297-307
39. <http://www.tbe-europe.com/?iContentID=65&sTitle=Life-cycle-of-ticks>
40. Humair PF, Gern L: The wild hidden face of Lyme borreliosis in Europe, *Microbes and Infection*, 2000; 2: 915-922
41. Granström M: Tick-borne zoonoses in Europe, *Clinical Microbiology and Infection*, 1997, 3:156-169
42. Brouqui P et al: Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe in *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10:1108-32
43. Pikelj A: Prekuženost klopov *Ixodes ricinus* z *borrelia burgdorferi* na področju Slovenije, Odbor za Prešernove nagrade, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 1991:2-4
44. Skotarczak B: Adaptation factors of *Borrelia* for host and vector. *Ann Agric Environ Med* 2009, 16, 1–8
45. Ogrinc K: Patogeneza lymške borelioze, Etiologija, epidemiologija in patogeneza lymške borelioze, V: Maraspin Čarman V, Strle F: *Lymska borelioza 2012*, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja; UKC Ljubljana: Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana: 2012;
46. Pleterski-Rigler D: *Lymska borelioza pri otrocih*; *Zdrav Obzor* 1991; 25:297-303
47. Ogrinc K: Prizadetost kože, Klinična slika lymške borelioze, V: Maraspin Čarman V, Strle F: *Lymska borelioza 2012*, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja; UKC Ljubljana: Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana: 2012;

48. Lotrič Furlan S., Maraspin Čarman V.; Bolezni, ki jih prenašajo klopi; Tick-borne diseases; medicinski razgledi 1996; 35: 363-382
49. <http://www.hemensaglik.com/makale/eritema-migran/nedir>
50. Strle F: Prizadetost kože pri lymski boreliozi V: Lymska borelioza 2000, 2. slovensko posvetovanje o lymski boreliozi, Društvo za lymsko boreliozo, Infektološka sekcija SDZ, 2000: 57-61
51. Steere AC: Lyme disease, N Engl J Med 2001; 345:115-125
52. Trop Skaza A. Klopi in bolezni-epidemiologija, klinika, preventiva; Glasilo Zdravniške Zbornice Slovenije; strokovna revija ISIS; št. 4; april 2012: 57-59
53. Strle F: Zdravljenje lymske borelioze z antibiotiki. V: Strle F: Lymska borelioza 2000, 2. slovensko posvetovanje o lymski boreliozi, Društvo za lymsko boreliozo, Infektološka sekcija SDZ, 2000:199-203
54. Rojko T.: Pristopi k zdravljenju lymske borelioze. V: Maraspin Čarman V, Strle F: Lymska borelioza 2012, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja; UKC Ljubljana: Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana, 2012; 193-203
55. Poland GA: Vaccines against Lyme disease: What happened and what lessons can we learn? Clin Infect Dis 2011; 52 (suppl3): S253-258
56. Stanek G: Outer surface proteins of borrelia and candidates for lyme borreliosis vaccines, V: Strle F: Lymska borelioza 2000, 2. slovensko posvetovanje o lymski boreliozi, Društvo za lymsko boreliozo, Infektološka sekcija SDZ, 2000:219-225
57. Ružič-Sabljić E: Mikrobiološka diagnostika boreljskih okužb, V: Strle F: Lymska borelioza 2000, 2. slovensko posvetovanje o lymski boreliozi, Društvo za lymsko boreliozo, Infektološka sekcija SDZ, 2000:155-160
58. Stanek G: Considerations on the diagnosis and treatment of Lyme borreliosis. AAMJ 1995;3:189-196
59. Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U: Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis; FEMS Immunol Med Microbiol 2007; 49 (1): 13–21
60. Pahl A, Kuhlbrandt U, Brune K, Rollinghoff M, Gessner A: Quantitative detection of Borrelia burgdorferi by real-time PCR, Journal of Clinical Microbiology, 1999: 37(6): 1958-1963
61. Arko B: Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji, Farmaceutski vestnik, 2004, 55: 215-220
62. Ružič-Sabljić E: Mikrobiološka diagnostika boreljskih okužb, V: Strle F. Lymska borelioza 2006, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, UKC Ljubljana, Društvo za boj proti lymski boreliozi: Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana, 2006: 139-146
63. Szczepanski A, Benach JL: Lyme Borreliosis: Host Responses to Borrelia burgdorferi; Microbiological Reviews 1991: V:55(1): 21-34
64. Zöller L, Cremer J, Faulde M: Western blot as a tool in the diagnosis of Lyme borreliosis; Electrophoresis 1993; V:14 (1): 937–944
65. Strle F, Nelson JA, Ružič-Sabljić E, et.al: European Lyme borreliosis: 231 culture-confirmed cases involving patients with erythema migrans. Clin Inf Dis 1996:23:61-5

66. Hauser U, Lehnert G, Wilske B: Validity of Interpretation Criteria for Standardized Western Blots (Immunoblots) for Serodiagnosis of Lyme Borreliosis Based on Sera Collected throughout Europe; *J Clin Microbiol* 1999, V: 37 (7): 2241–2247
67. Ružić-Sabljić E, Strle F, Cimperman J, Kotnik V: Vrednotenje imunofluorescenčnega testa za dokazovanje lymške borelioze; *Zdravstveni vestnik* 1995: 64:63-67
68. Biomerieux, ABS/IFA, Navodilo za test, 03212 F - 2006/04
69. Branda JA, Linskey K, Kim AY, Steere AC, Ferraro MJ: Two-Tiered Antibody Testing for Lyme Disease With Use of 2 Enzyme Immunoassays, a Whole-Cell Sonicate Enzyme Immunoassay Followed by a VlsE C6 Peptide Enzyme Immunoassay; *Clinical Infectious Diseases* 2011;53(6):541–547
70. Kubiak K, Dzika E, Równiak J, Dziedzic M, Dzisko J: Seroprevalence of Lyme disease and genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in patients diagnosed with borreliosis in the Province of Warmia-Masuria in north-eastern Poland; *Ann Agric Environ Med.* 2012;19(2):203-7
71. Marangoni A, Sparacino M, Cavrini F, Storni E, Mondardini V, Sambri V, Cevenini R: Comparative evaluation of three different ELISA methods for the diagnosis of early culture-confirmed Lyme disease in Italy; *J Med Microbiol.* 2005 54:361-7
72. Cerar T, Ogrinc K, Strle F, Ružić-Sabljić E: Primerjava dveh metod za dokaz intratekalne tvorbe boreljskih protiteles; *MED RAZGL* 2009; 48:S5:105-109
73. Brouqui P. et al.: Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe, *Clinical Microbiology and Infectious Diseases (CMI)* 2004; 10: 1108-1132
74. http://www.procalcitonin.com/default.aspx?tree=_4_4_0&key=vidas2
75. <http://www.virology.ws/2010/09/30/detecting-viral-proteins-in-infected-cells-or-tissues-by-immunostaining/>
76. <http://www.wieslab.se/index.php?langId=1&headId=72&pageId=126&subId=92>