

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

HELENA TERS

**PRIMERJAVA DVEH SEROLOŠKIH TESTOV ZA DOKAZOVANJE  
NEVROBORELIOZE**

**COMPARISON OF TWO SEROLOGICAL TESTS FOR  
DIAGNOSING NEUROBORRELIOSIS**

MAGISTRSKI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE  
MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo sem opravljala na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, v Laboratoriju za diagnostiko boreloz in leptospiroze.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se somentorici prof. dr. Evi Ružić-Sabljićevi, dr. med. za ves trud in čas, ki ste mi ga namenili, kajti z Vašo pomočjo in znanjem je nastala ta magistrska naloga.

Zahvala tudi mentorju dr. Matjažu Jerasu, mag. farm. za usmerjanje in spodbudo pri izdelavi naloge.

Zahvala velja tudi osebju Laboratorija za diagnostiko boreloz in leptospiroze pri pomoči izvajanja praktičnega dela naloge.

Zahvala je namenjena tudi mojim sodelavkam, ki so mnogokrat našle spodbudne besede, ustrezno rešitev in topla dejanja, ki so pripomogla k nastanku naloge.

Hvala tudi možu za vso podporo v času študija. V ta namen mu posvečam svojo magistrsko nalogu.

Izjavljam, da sem magistrsko nalogu izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm. in somentorstvom prof. dr. Eve Ružić-Sabljićeve, dr. med.

Helena Ters

Ljubljana, 2015

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Janez Ilaš, mag. farm.

Član komisije: asist. dr. Urša Pečar Fonović, univ. dipl. biol.

## VSEBINA

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. POVZROČITELJICA LYMSKE BORELIOZE .....	1
1.1.1. Taksonomska uvrstitev bakterije <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	1
1.1.2. Lastnosti borelij .....	2
1.1.3. Borelijski genom .....	3
1.1.4. Antigeni in proteini značilni za <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato .....	3
1.2. PRENAŠALCI BORELIJ LYMSKE BORELIOZE.....	6
1.2.1. Geografska razširjenost .....	6
1.2.2. Življenjski krog ščitastega klopa .....	6
1.2.3 Živalski rezervoar bakterije <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	7
1.3. LYMSKA BORELIOZA.....	7
1.4. IMUNSKI ODZIV NA OKUŽBO .....	9
1.5. DIAGNOSTIKA LYMSKE NEVROBORELIOZE .....	11
1.5.1. Mikroskopiranje v temnem polju .....	11
1.5.2. Izolacija borelij .....	11
1.5.3. Verižna reakcija s polimerazo .....	12
1.5.4. Dokaz specifičnih protiteles proti <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	12
1.5.4.1 <i>Encimsko-imunofluorescenčni test</i> .....	12
1.5.4.2. <i>Imuno-kemiluminiscenčni test</i> .....	13
1.5.4.3. <i>Encimsko imunski test</i> .....	14
1.5.4.4. <i>Prenos Western</i> .....	15
1.6. ZDRAVLJENJE LYMSKE BORELIOZE IN LYMSKE NEVROBORELIOZE ...	15
<b>2. NAMEN DELA .....</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>18</b>
3.1. Vzorci .....	18
3.2. Material pri uporabljenih metodah .....	18
3.2.1. Reagenti in oprema za izvedbo encimsko-imunofluorescenčnega testa .....	18
3.2.1.1. <i>Reagenti pri encimsko-imunofluorescenčnem testu</i> .....	19
3.2.1.2. <i>Oprema za izvedbo encimsko-imunofluorescenčnega testa</i> .....	22
3.2.2 Reagenti in oprema za imuno-kemiluminiscenčni test.....	22
3.2.2.1. <i>Reagenti za imuno-kemiluminiscenčni test</i> .....	22

3.2.2.2 Oprema za izvedbo kemiluminiscenčnega testa .....	24
3.3. Postopki izvedbe testov .....	25
3.3.1. Izvedba encimsko-imunofluorescenčnega testa .....	25
3.3.2 Izvedba imuno-kemiluminiscenčnega testa.....	26
3.4. Vrednotenje rezultatov .....	27
3.4.1. Vrednotenje rezultatov encimsko-imunofluorescenčnega testa .....	27
3.4.1.1. <i>Vrednotenje rezultatov encimsko-imunofluorescenčnega testa v serumskih vzorcih</i> .....	28
3.4.1.2. <i>Vrednotenje rezultatov encimsko-imunofluorescenčnega testa v vzorcih likvorja</i> .....	29
3.4.2. Vrednotenje rezultatov imuno-kemiluminiscenčnega testa.....	31
3.4.2.1. <i>Vrednotenje rezultatov imuno-kemiluminiscenčnega testa v serumskih vzorcih</i> .....	31
3.4.2.2. <i>Vrednotenje rezultatov imuno-kemiluminiscenčnega testa v vzorcih likvorja</i> .....	32
3.4.3. Ponovitev testiranja .....	34
3.5. Statistična analiza .....	34
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>35</b>
4.1. Rezultati analiziranih vzorcev pri uporabljenih metodah.....	35
4.1.1. Rezultati določeni z uporabljenima metodama v serumskih vzorcih .....	35
4.1.2. Rezultati določeni z uporabljenima metodama v vzorcih likvorja .....	36
4.2. Primerjava rezultatov med uporabljenima metodama .....	37
4.3. Podrobna analiza rezultatov pri ponovitvah testov .....	39
4.4. Analiza imunskega odziva glede na klinično sliko bolnika .....	41
4.5. Statistična obravnavava rezultatov .....	43
4.5.1. Statistična primerjava rezultatov določanja specifičnih protiteles IgM proti <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato v serumskih vzorcih.....	43
4.5.2. Statistična primerjava rezultatov določanja specifičnih protiteles IgG proti <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato v serumskih vzorcih.....	44
4.5.3. Statistična primerjava rezultatov določanja specifičnih protiteles IgG proti <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato v vzorcih likvorja.....	44
<b>5. RAZPRAVA.....</b>	<b>45</b>
<b>6. ZAKLJUČEK .....</b>	<b>49</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>50</b>

## POVZETEK

Lymska borelioza je bolezen, ki je razširjena po vsem svetu. V Sloveniji je endemična, z visoko stopnjo obolevanja prebivalstva. Gre za bakterijsko okužbo z *B. burgdorferi* sensu lato, katere prenašalci so okuženi ščitasti klopi iz rodu *Ixodes*. Borelije se med gostitelji prenašajo med hranjenjem klopor s krvjo, pri čemer velja človek za naključnega gostitelja. Bolezenski znaki lymske borelioze so zelo raznoliki. Najpogostejši pokazatelj borelijske okužbe je kožna sprememba- potupočni eritem, ob razširitvi povzročitelja pa se lahko pojavi prizadetost sklepov, srca, mišic, oči in živčnega sistema- lymska nevroborelioza. Zaradi nespecifičnih znakov bolezni je diagnostika težka. Prevladujejo serološke metode določanja specifičnih protiteles, pri čemer pa nam lahko težavo povzroči začetni stadij bolezni, ko bolnik še ni razvil imunskega odziva in zato v tem primeru določimo lažno negativen rezultat. Možen je tudi lažno pozitiven rezultat, in sicer v primeru navzkrižnih reakcij protiteles.

V magistrski nalogi smo testirali komercialno dostopna serološka testa dveh proizvajalcev, in sicer encimsko-imunofluorescenčni test Vidas Lyme IgM in IgG (BioMerieux, Francija) ter imuno-kemiluminiscenčni test Liaison Borrelia IgM Quant in Liaison Borrelia IgG (DiaSorin, Italija). Testa uporabljata različne antigene za dokaz specifičnih protiteles. Vidas Lyme IgM uporablja za dokaz protiteles vrste IgM antigena DbpA in OspC, za dokaz protiteles IgG pa antigene DbpA, OspC in VlsE. Liaison Borrelia IgM Quant uporablja za dokaz prisotnosti protiteles IgM antigena OspC in VlsE, za dokaz protiteles IgG pa antigen VlsE.

Testirali smo 50 serumskih in 50 likvorskih vzorcev istih bolnikov s sumom na lymsko nevroboreliozo. S testom Vidas Lyme IgM smo v serumskih vzorcih določili 18 (36%) pozitivnih rezultatov, s testom Liaison Borrelia IgM Quant pa 23 (46%). Ujemanje rezultatov istih bolnikov z obema testoma je bilo 86%. Z uporabo testa Vidas Lyme IgG smo v serumskih vzorcih določili 29 (58%) pozitivnih rezultatov, z uporabo Liaison Borrelia IgG pa 31 (62%). S statistično analizo smo določili 76% ujemanje rezultatov z obema testoma pri istih bolnikih. V vzorcih likvorja smo s testom Vidas Lyme IgG in Liaison Borrelia IgG določili 10 (20%) pozitivnih rezultatov. V tem primeru je bilo ujemanje rezultatov pri istih bolnikih z obema testoma 98%. S testom Liaison Borrelia IgM Quant smo v likvorju določili 7 (14%) pozitivnih rezultatov, medtem ko test Vidas Lyme IgM ne omogoča določanja specifičnih protiteles IgM v tem biološkem vzorcu. Pri vseh

bolnikih s sumom na nevroboreliozo nismo določili pozitivnih rezultatov, kar je verjetno posledica zgodnje faze okužbe.

V raziskavi tudi nismo določili signifikantnih razlik med uporabljenima metodama pri določanju specifičnih protiteles vrste IgM in IgG v serumskih vzorcih in pri določanju protiteles IgG v vzorcih likvorja bolnikov s sumom na lymsko nevroboreliozo. Na osnovi naših rezultatov lahko zaključimo, da sta oba testa primerna za diagnostiko lymske nevroborelioze, pri tem pa naj poudarimo prednost večje avtomatizacije imuno-kemiluminiscenčnega testa, s čimer se lahko izognemo večini predanalitičnih napak.

## ABSTRACT

Lyme disease is spread throughout the world. It is endemic in Slovenia with a high degree of morbidity of the population. Lyme disease is a bacterial infection with *B. burgdorferi* sensu lato, which is transmitted by infected hard tick of the genus *Ixodes*. Borrelia is passing between various hosts during feeding with blood, a man being a random one.

Symptoms of Lyme disease are very different. The most common indicator of infection is a skin rash- erythema migrans, but with the spreading of the infective agent joints, heart, muscles, eyes and nervous system (Lyme neuroborreliosis) can be affected. The non-specific signs of Lyme disease make its diagnosis difficult. In its diagnosis serological methods dominate enabling detection of specific antibodies. However these assays have a problem at the initial stage of disease when patients have not yet developed an immune response, therefore we can get false negative result. On the other hand false positive result can also be obtained in case of cross-reactive antibodies.

In this master thesis we tested two commercially available serological assays from different producers, namely the enzyme-linked immunofluorescent assay - Vidas Lyme IgM and IgG (Biomerieux, France) and the chemiluminescent immunoassay - Liaison Borrelia IgM Quant and Liaison Borrelia IgG (Diasorin, Italy). Both assays are using different *Borrelia*-specific antigens for the detection of specific antibodies. The Vidas Lyme IgM assay is using DbpA and OspC antigens for detecting IgM antibodies and DbpA, OspC and VlsE antigens for IgG. Liaison Borrelia IgM Quant assay uses OspC and VlsE antigens for detecting IgM and VlsE antigen for IgG.

We tested 50 serum and 50 cerebrospinal fluid samples, taken from the same patients with suspected Lyme neuroborreliosis. With the Vidas Lyme IgM assay we obtained 18 (36%) and with the Liaison Borrelia IgM Quant assay 23 (46%) positive results in the serum samples. The results match in 86% samples. With the Vidas Lyme IgG assay antibodies were found in 29 (58%) and with the Liaison Borrelia IgG assay in 31 (62%) serum samples. In this case the results show 76% matching.

The number of positive results detected in cerebrospinal fluid samples was the same - 10 (20%), with both assays. The results show 98% matching.

With the Liaison Borrelia IgM Quant assay we determined 7 (14%) positive results in cerebrospinal fluid samples. As already mentioned, the Vidas Lyme IgM does not allow the determination of specific anti-Borrelia IgM antibodies in cerebrospinal fluid samples.

Antibodies were not detected in all patients' samples probably because of an early stage of the infection.

In our study we did not find statistically significant differences between the two methods used for the determination of specific IgM and IgG antibodies in serum samples and detection of IgG in cerebrospinal fluid samples of patients with suspected Lyme neuroborreliosis. On the basis of our results we can conclude that both test used are appropriate for the diagnosis of Lyme neuroborreliosis. However we can emphasize the advantage of a greater automation potential of the chemiluminescent immunoassay that enables us to avoid the majority of preanalytical errors.

## KLJUČNE BESEDE

Lymska nevroborelioza (*angl.* Lyme neuroborreliosis)

Imunoglobulini razreda M in G (*angl.* immunoglobulins)

Encimsko-imunofluorescenčni test (*angl.* enzyme linked fluorescent assay)

Imuno-kemiluminiscenčni test (*angl.* chemiluminescent immunoassay)

## SEZNAM OKRAJŠAV

AU - arbitrarna enota (*angl.* arbitrary unit)

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

Bgp – protein, ki veže glikozaminoglikan (*angl.* glycosaminoglycan-binding protein)

BSA - goveji serumski albumin (*angl.* bovine serum albumin)

CLIA - imuno-kemiluminesčni test (*angl.* chemiluminescent immunoassay)

CRASP - komplementni proteini (*angl.* complement regulator-acquiring surface proteins)

CSF - likvorska tekočina (*angl.* cerebrospinal fluid)

Dbp - protein, ki veže dekorin (*angl.* decorin-binding protein)

ELFA - encimsko-imunofluorescenčni test (*angl.* enzyme linked fluorescent assay)

IAP - indeks intratekalne sinteze protiteles (*angl.* intrathecal antibody production index)

IgM in IgG - imunoglobulini razredov M in G

IL - interlevkin

IR1 - IR6 - nespremenljiva področja 1 - 6 (*angl.* invariable region)

Lp - lipoprotein

MIT - metil-izotiazolon (*angl.* methylisothiazolone)

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

MUP - 4-metil-umbeliferilfosfat

NF - κB – jedrni faktor κB (*angl.* nuclear factor κB)

Osp - zunanjji površinski proteini (*angl.* outer surface protein)

PBS - fosfatni pufer (*angl.* phosphate buffer saline)

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

RFV - relativna fluorescenčna vrednost (*angl.* relative fluorescence value)

RLU - relativne enote svetlobe (*angl.* relative light units)

SPR - zbirnik trdne faze (*angl.* solid phase receptacle)

SPSS - program za statistično obravnavo podatkov (*angl.* statistical package for the social sciences)

TLR-2 - receptorju Toll podoben receptor-2 (*angl.* Toll-like receptor)

TNF-α - tumorje nekrotizirajoči faktor α (*angl.* tumor necrosis factor alpha)

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

VR1 - VR6 - spremenljiva področja 1 – 6 (*angl.* variable region)

## 1. UVOD

Lymska borelioza je zoonoza, ki je razširjena po vsem svetu. V Sloveniji velja za endemično bolezen z visoko stopnjo obolevanja prebivalstva. V Evropi je vsaj pet vrst borelij *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sensu lato - v širokem pomenu), ki so patogene za človeka; *B. afzelii*, *B. garinii* in *B. burgdorferi* sensu stricto (sensu stricto - v ožjem pomenu), *B. spelmanii* in nedavno opredeljena *B. bavariensis* (1-3).

Njihov epidemiološki rezervoar so gozdne živali, mali glodalci, domače živali in ptice. Med živalskimi vrstami se borelije prenašajo s ščitastimi klopi, prilagojenimi parazitiranju na živalih. Razširjenost lymske borelioze se ujema z razširjenostjo njenih prenašalcev, torej ščitastih klopor iz rodu *Ixodes* (4).

Po prehodu *B. burgdorferi* s. l. iz krvi ali preko perifernih živcev v centralno živčevje, govorimo o lymski nevroboreliozi. Akutni zapleti lymske nevroborelioze se kažejo kot boleči meningoRADikulitis z vnetjem živčnih korenin, Bannwarthov sindrom, limfocitni meningitis ter različni lobanjski in periferni nevritisi (5).

### 1.1. POVZROČITELJICA LYMSKE BORELIOZE

#### 1.1.1. Taksonomska uvrstitev bakterije *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Razvrstitev borelij temelji na njenih bioloških lastnostih, značilnem načinu gibanja in njeni obliki. Povzročiteljico lymske borelioze uvrščamo v red *Spirochaetales*, družino *Spirochaetaceae* in rod *Borrelia* (Razpredelnica I) (2).

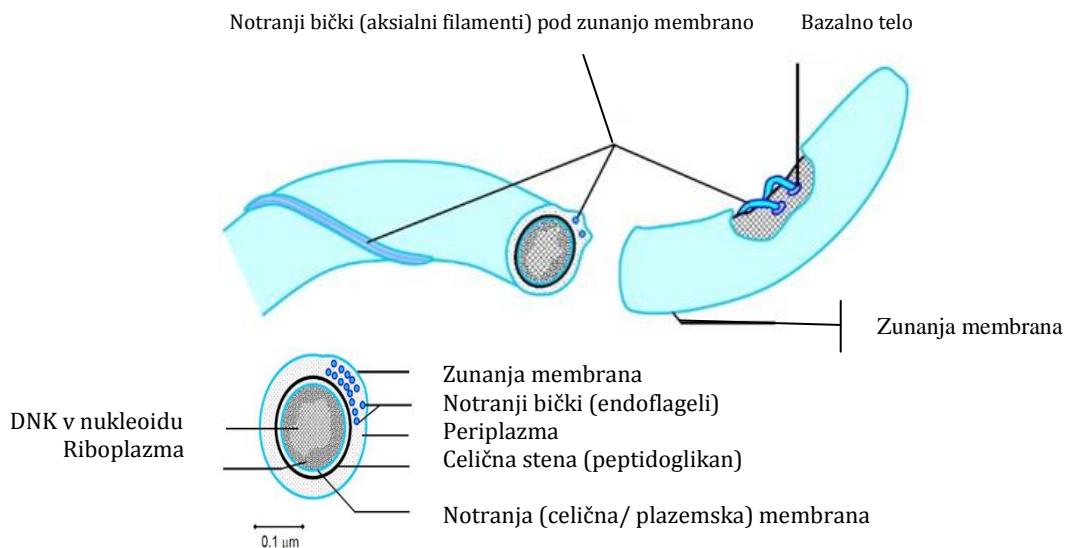
Razpredelnica I: Taksonomska razvrstitev spirohet (povzeto po 6)

Red	<i>Spirochaetales</i>			
Družina	<i>Spirochaetaceae</i>	<i>Leptospiraceae</i>	<i>Brevinemaceae</i>	<i>Brachyspiraceae</i>
Rod	→ <i>Spirochaeta</i>	→ <i>Leptospira</i>	→ <i>Brevinema</i>	→ <i>Brachyspira</i>
	→ <i>Cristispira</i>	→ <i>Leptonema</i>		
	→ <i>Treponema</i>	→ <i>Turneriella</i>		
	→ <i>Borrelia</i>			
	→ <i>B. burgdorferi ss</i>			
		→ <i>B. afzelii</i>		
Vrsta		→ <i>B. garinii</i>		
		→ <i>B. bavariensis</i>		
		→ <i>B. spielmanii</i>		

### 1.1.2. Lastnosti borelij

Borelije so spiralne bakterije s periplazemskimi bički, ki jim omogočajo premikanje, svedrasto zvijanje in obračanje na mestu. Posamezna borelija ima 7-11 endoflagelov, ki so pripeti na njenih nasprotnih koncih in se širijo proti sredini, kjer se prekrivajo. Borelije se razlikujejo tudi glede na število zavojev (3 do 10), dolžino (5 do 30µm) in širino (0,2 do 0,3µm). Glede na sestavo celične stene sodijo med po Gramu negativne bakterije.

Borelijski protoplazemski cilinder je obdan s celično membrano, nato z endoflafeni in na koncu še z zunanjim membranom, ki je le ohlapno povezana z globlje ležečimi strukturami (Slika 1) (7). Borelije so počasi rastoče anaerobne in biokemično neaktivne bakterije. Ker potrebujejo za rast in razmnoževanje obogatena gojišča z dodatkom zajčjega seruma, govejih albuminov in želatine, jih prištevamo med bakterije, ki so zahtevne za gojenje *in vitro* (8).



Slika 1: Shema bakterije *Borrelia burgdorferi* sensu lato, povzeto po (9).

### 1.1.3. Borelijski genom

Borelijski genom je razmeroma majhen z velikostjo 1,5 Mb. Genom borelij lyske borelioze je sestavljen iz linearnega 920 kb velikega kromosoma, ter 12 linearnih in 9 krožnih plazmidov (10-13). Kromosom nosi gene za podvojevanje, prepisovanje in prevajanje DNA, medtem ko borelige nimajo genov za sintezo aminokislin, maščobnih kislin, kofaktorjev encimov in nukleotidov, zato te očitno pridobijo od gostitelja (14). Borelige imajo 2 linearne plazmida, ki sta nujno potrebna za okužbo v sesalskem gostitelju, in sicer lp25 in lp28-1 (15).

### 1.1.4. Antigeni in proteini značilni za *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Analiza borelijskega genoma je pokazala, da je več kot 6% kromosomskih genov namenjenih gibljivosti bakterije in kemotaksi (14). Endoflageli borelij so sestavljeni iz polipeptidnih podenot, to je proteina flagelina, v velikosti 41 kDa. Zunanja membrana prekriva notranje bičke, kar bakteriji omogoča izogibanje imunskemu odzivu gostitelja. Morfologija in gibljivost spirohet omogoča njihovo gibanje v visoko viskoznem okolju, česar druge bakterije niso sposobne (16).

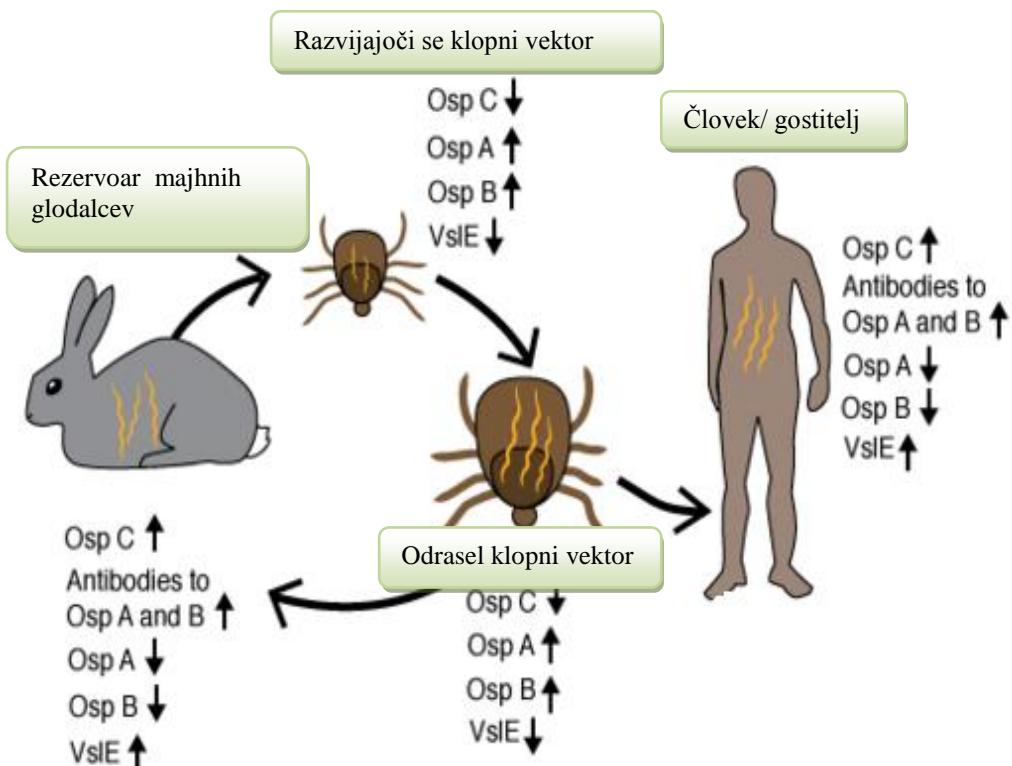
V borelijah prisotni plazmidi nosijo zapis za zunanje površinske proteine (Osp) (17).

Lipoproteina OspA (31 kDa) in OspB (30-32 kDa) sta zapisana na linearinem plazmidu z

velikostjo 49 bp. Oba antigena sta močno izražena na površini spirohete, ki se nahaja v razvijajočem se klopu pred hranjenjem (Slika 2). Med hranjenjem pa spirohete prenehajo izražati OspA in OspB in začnejo izražati antigen OspC (18).

OspA ima glavno vlogo v invaziji ekstracelularnega matriksa, v procesu adhezije borelij na epitelijске celice v črevesju klopa in omogoča prehod do kloponih žlez slinavk (18).

Pomembno vlogo ima pri izogibu borelije imunskemu odzivu, saj deluje kot receptor za plazminogen, na katerega se spiroheta veže in s tem omogoči hitrejše širjenje bakterij po telesu (19).



Slika 2: Izražanje antigenov, glede na okolje, v katerem se borelija nahaja, povzeto po (20).

Lipoprotein OspC je velik 21-25 kDa in je zapisan na krožnem plazmidu cp26. Izražanje OspC se prične s hranjenjem klopa in traja prvih nekaj tednov po okužbi sesalca (21). Zato ima ta antigen pomembno vlogo v zgodnji stopnji okužbe. Spremembo izražanja genov, zavrta tista za OspA in OspB, ter aktiviran tisti za OspC, sprožijo spremembe okolja, na primer temperatura, pH, celična gostota, oksigeniranost tkiva in izpostavljenost gostiteljevemu imunskemu sistemu (22). Borelije pričnejo izražati OspC, kar jim omogoča prehod iz črevesja klopa v njegove žleze slinavke, s tem pa njihovo širitev.

OspD (30 kDa), OspE (19 kDa) in OspF (26 kDa) so borelijski antigeni, ki sodijo med virulenčne dejavnike, a za samo okužbo niso nujno potrebni.

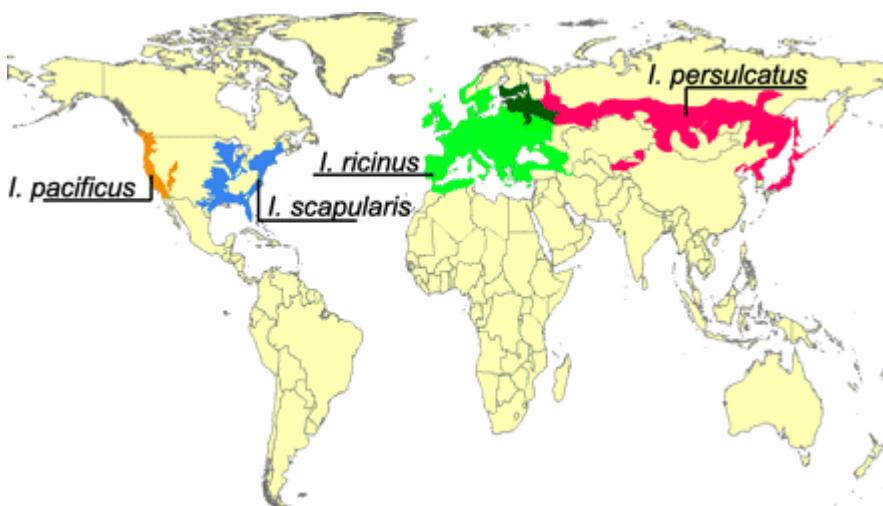
Sekvenčno spremenljiva beljakovina VlsE je zunanji površinski protein *B. burgdorferi* s. l., ki je nujno potreben za vzdrževanje trajne okužbe pri sesalcih. Njegovo izražanje se prične, ko se začne zmanjševati izražanje lipoproteina OspC (23). VlsE je 35 kDa velik lipoprotein, izražen na linearinem plazmidu lp28-1. Velja za zapleten protein, ki lahko obstaja v veliko oblikah. Ima šest spremenljivih regij, poimenovanih od VR1 - VR6, in šest nespremenljivih regij, poimenovanih od IR1 - IR6. Njegova antigenska spremenljivost omogoča borelijam izogibanje imunskemu odzivu gostitelja.

Med borelijske proteine, ki so gradniki zunajceličnega matriksa sodijo: DbpA in DbpB, ki vežeta dekorin, protein, ki veže fibronektin in protein, ki veže glikozaminglikan oziroma proteoglikane- Bgp (24, 25, 26). Ti proteini omogočajo borelijam premikanje in obstoj v tkivih, ter sposobnost, da ostanejo nedostopne za krožeča protitelesa. DbpA in DbpB sta površinska lipoproteina, ki sta zapisana na operonu *dbpB/A*. S študijami so ugotovili, da se izražanje obeh proteinov poveča v primeru spremembe okolja, in sicer znižanja pH in zvišanja temperature s 23 °C, na 37 °C, kar kaže na njihovo prilagoditev novemu gostitelju. Kadar sta izražena površinska lipoproteina DbpA in DbpB se borelije lahko pritrjujejo na epitelijske celice sesalca (27).

## 1.2. PRENAŠALCI BORELIJ LYMSKE BORELIOZE

### 1.2.1. Geografska razširjenost

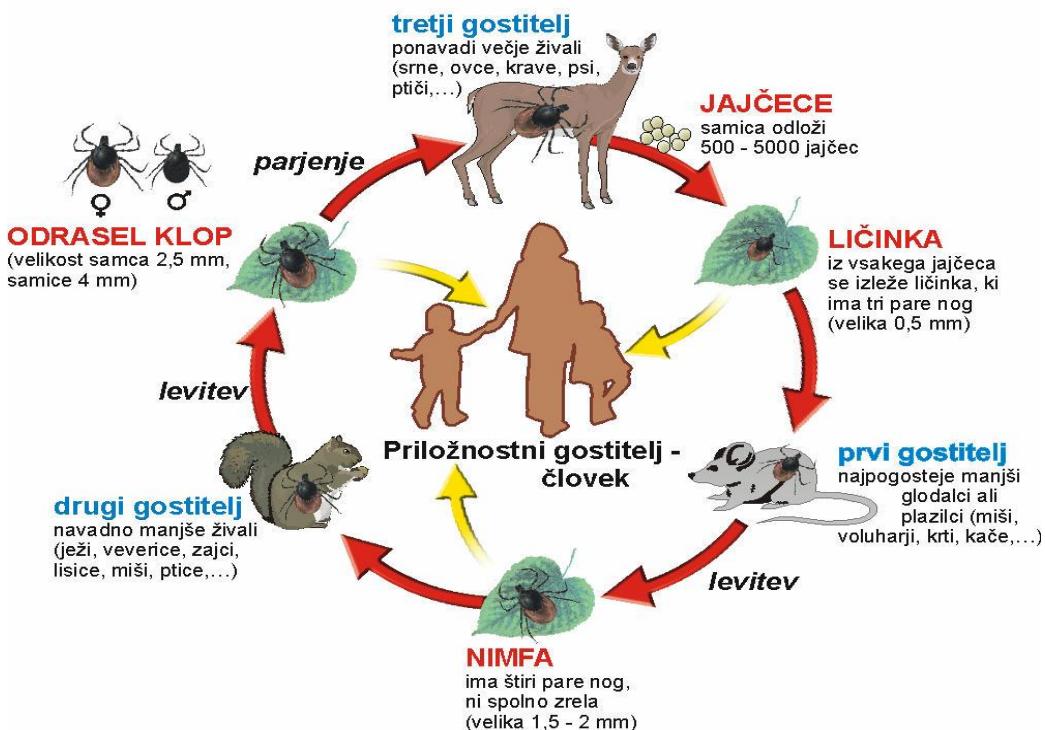
Najbolj razširjen prenašalec borelij je ščitasti klop iz rodu *Ixodes*. V Evropi prevladuje *I. ricinus*, v Aziji *I. persulcatus*, na vzhodni obali Amerike *I. scapularis*, na njeni zahodni obali pa *I. pacificus* (28). Razširjenost ščitastih klosov prikazuje Slika 3.



Slika 3: Razširjenost klosov rodu *Ixodes* po svetu, povzeto po (29).

### 1.2.2. Življenjski krog ščitastega klopa

Življenjski krog ščitastega klopa traja običajno dve leti. Samica v zemljo odloži jajčeca. Temu sledijo tri razvojne stopnje, in sicer ličinka, nimfa in odrasel klop (Slika 4). Vse razvojne stopnje se hranijo s krvjo gostitelja. Po vsakem hranjenju, ki traja tri do pet dni, sledi preobrazba predstopnje v naslednjo razvojno stopnjo. Življenjski krog klopa pa se zaključi z odlaganjem jajčec odrasle samice (30).



Slika 4: Življenjski krog klopa, povzeto po (31).

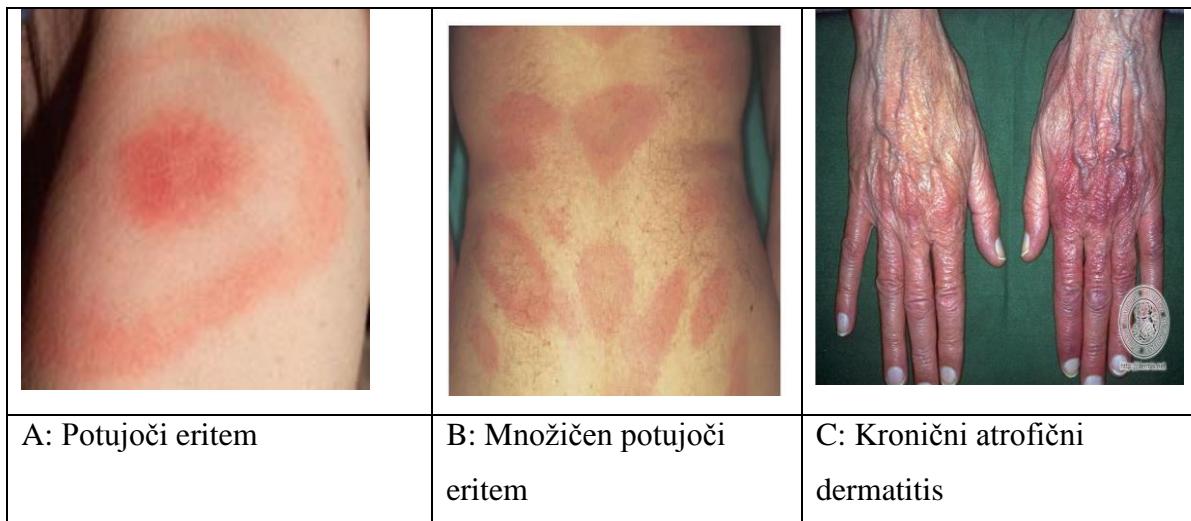
### 1.2.3 Živalski rezervoar bakterije *Borrelia burgdorferi* sensu lato

*B. burgdorferi* s.l. se v naravi giblje med prenašalcji (klopi) in živalskim rezervoarjem (sesalci, ptiči, mali glodalci,...), pri čemer je človek naključni gostitelj (32). Za gostitelje izbira sprva manjše glodalce, plazilce, ptiče, veverice, ježe, kasneje pa tudi večje živali. Klopi prenašajo bakterije z ene živalske vrste na drugo po dveh poteh. Prenos lahko poteka preko okuženega klopa, ki sesa kri gostitelja (transstadialen prenos) ali pa transovarialno, kjer odrasla samica klopa odloži okužena jajčeca, iz katerih se izležejo okužene ličinke (33). Okužena jajčeca velikokrat propadejo, zato se posledično le redko izležejo okužene ličinke.

## 1.3. LYMSKA BORELIOZA

Okužba z *B. burgdorferi* s.l., ki jo dobimo preko ugriza okuženega klopa, ima zelo raznolik potek. Simptomi skozi različne stopnje variirajo, predvsem zaradi nepredvidljivega širjenja bakterij v različna področja telesa (34). Prizadene številne organske sisteme. Lymsko boreliozo razdelimo na zgodnje in pozno obdobje. Zgodnja lokalizirana okužba se lahko kaže kot potujoči eritem (Slika 5a), borelijski limfocitom, vnetje bezgavk, vedno pa z bolečinami v mišicah in sklepih (35). Zgodnja razširjena stopnja lymske borelioze se lahko

manifestira kot množičen potujoči eritem (Slika 5b), lymski karditis, konjunktivitis, meningitis ali pareza kranialnega živca. Pozno obdobje lymske borelioze pa se kaže kot prizadetost živčnega sistema, lymski artritis, kronični atrofični dermatitis (Slika 5c) ali kot atrofija optičnega živca (Razpredelnica II).



Slika 5 A-C: Različne klinične slike borelijske okužbe, povzeto po (36).

Razpredelnica II: Stopnje okužbe z *Borrelia burgdorferi* sensu lato z značilnimi kliničnimi slikami bolezni

<b>Stopnja I</b>	Zgodnja lokalizirana lymska borelioza	Potujoči eritem Borelijski limfocitom
<b>Stopnja II</b>	Zgodnja razširjena lymska borelioza	Množičen potujoči eritem Meningitis
<b>Stopnja III</b>	Pozna lymska borelioza	Kronični atrofični dermatitis Bolezni sklepov, srca in živčevja

Invazivnost borelij omogoča razširitev povzročitelja bolezni iz mesta vboda klopa, preko kože do različnih organov in naprej do živčnega sistema. Prizadetost živčevja ali lymsko nevroboreliozo razdelimo na dve obdobji, in sicer zgodnjo in pozno.

Zgodnjo lymsko nevroboreliozo definiramo kot stopnjo pri kateri trajajo simptomi bolezni manj kot 6 mesecev. V to obdobje uvrščamo več kot 95% bolnikov (37). Najpogostejši znak zgodnje lymske nevroborelioze je Garin–Bijadoux–Bannwarthov sindrom, ki se

izraža kot boleč meningoradikulitis, to je vnetje korenin perifernih živcev. Klinične značilnosti Garin–Bijadoux–Bannwarthovega sindroma se kažejo kot radikularna bolečina (86% bolnikov) in pareza (61% bolnikov) (38). Lokacija in moč bolečin variirata do dneva do dneva in se okrepiča tekom noči, medtem ko lahko pareza prizadene lobanjske živce, redkeje pa trebušno steno in ude.

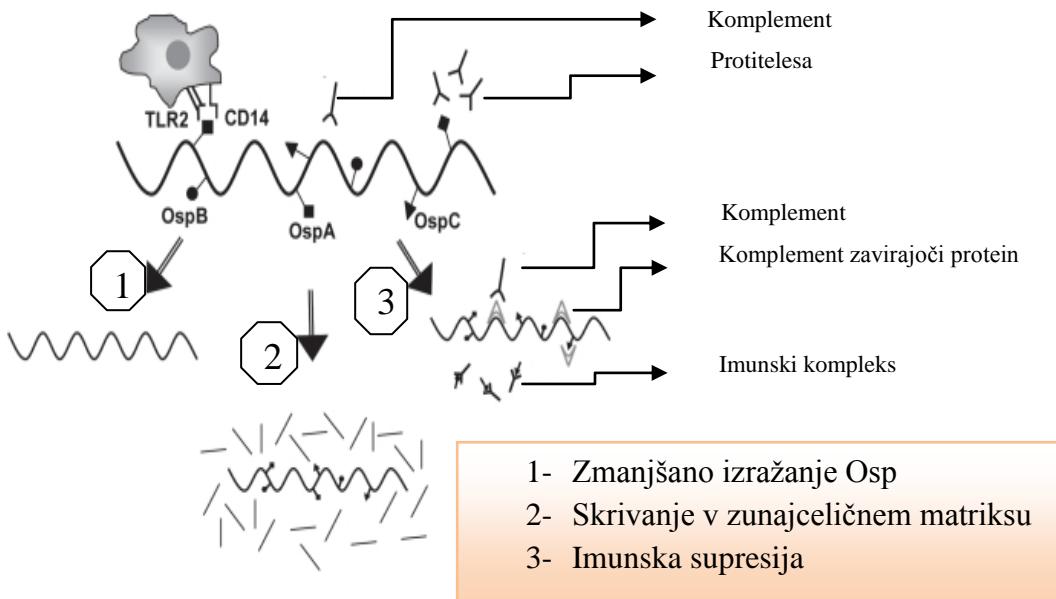
Prizadetost centralnega živčnega sistema se pri zgodnji lymski nevroboreliozi klinično lahko manifestira kot zmedenost, cerebralna ataksija, očesno plapolanje ali pa z atipično bolezensko sliko, ki je podobna drugim nevrološkim boleznim (npr. multipli sklerozi) ali prisotnosti možganskih tumorjev in podobno (39).

Pozno lymsko nevroboreliozo definiramo kot kontinuirano vnetje osrednjega ali perifernega živčevja. Manj kot 5% bolnikov ima to obliko bolezni, ki traja od 6 mesecev do več let (37). Zanjo so lahko značilna mononevropatija, radikulopatija in polinevropatija (40, 41). V Evropi je pozna polinevropatija prisotna le pri bolnikih s kroničnim atrofičnim dermatitisom, ki je tipična kožna sprememba pri bolnikih z borelijsko okužbo (42).

Prizadetost centralnega živčnega sistema se pri pozni lymski nevroboreliozi kaže kot kronično vnetje možganskih open (kronični meningitis), kronično vnetje možganov in hrbtenjače (kronični encefalomielitis), cerebralni vaskulitis ter kronični progresivni lymski encefalitis (41).

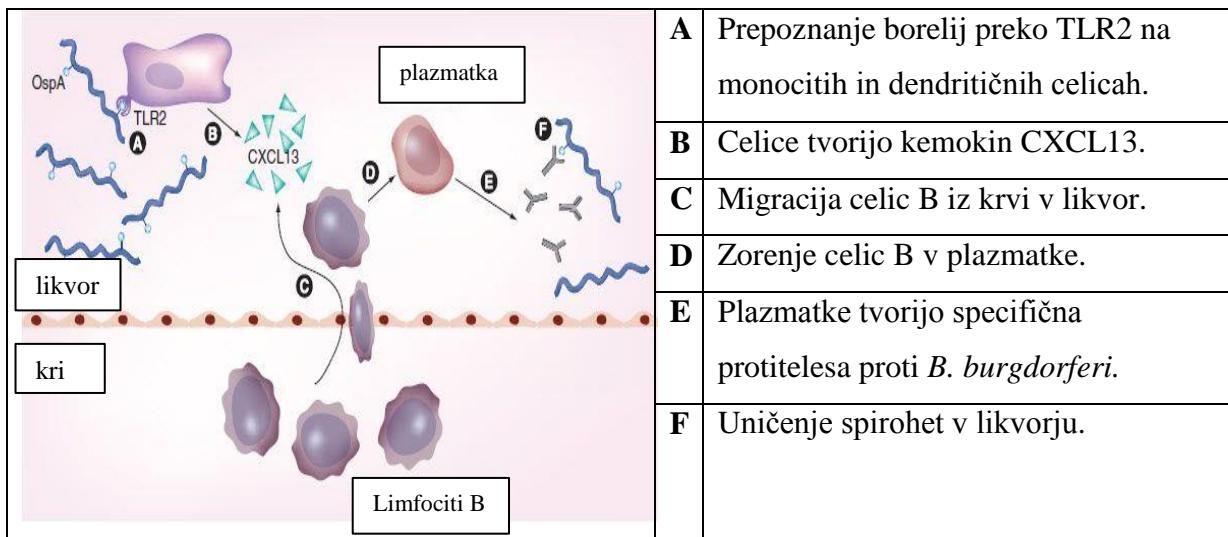
#### **1.4. IMUNSKI ODZIV NA OKUŽBO**

Površinski proteini *B. burgdorferi* s.l. so zelo imunogeni in lahko izzovejo nastajanje vnetnih citokinov, hkrati pa borelije izražajo tudi antigene, ki preprečijo ustrezno delovanje imunskega odziva (slika 6) (43, 44). Borelije so sposobne regulirati izražanje svojih proteinov, in sicer glede na okolje, v katerem se nahajajo. OspC, ki ima pomembno vlogo pri zgodnji stopnji okužbe, lahko veže protein Salp15 v slini klopa, ki zavira aktivacijo CD4+ celic T in s tem zavaruje borelijo pred imunskim odzivom gostitelja (45). Borelije imajo tudi lastne proti komplementne proteine, imenovane CRASP 1-5, ki imajo pomembno vlogo pri odpornosti borelij na uničenje s komplementom, poleg tega pa lahko izzovejo izražanje protivnetnega citokina IL-10 (46, 47).



Slika 6: Mehanizmi, s katerimi se boreliji izogibajo delovanju imunskega sistema gostitelja, povzeto po (48).

Ko boreliji preidejo krvno-možgansko pregrado, povzročijo vnetno reakcijo, ki se kaže kot limfomonocitna pleocitoza. Bakterije oziroma njihove lipoproteine v centralnem živčnem sistemu prepoznajo receptorji TLR-2 (Slika 7) (49). Stik antiga s TLR-2 sproži signalno kaskado in s tem aktivacijo jedrnega transkripcijski dejavnika NF- $\kappa$ B, ki spodbudi tvorbo baktericidnega dušikovega oksida in superoksida, poleg tega pa tudi izražanje in sproščanje citokinov IL-1, IL-6, IL-12 in TNF- $\alpha$  ter kemokinov (50). Slednji vplivajo na imunske celice, kar privede do pleocitoze v likvorju (51). Pri lymski nevroboreliozi so določili kemokine CXCL1-3, CXCL-8, CXCL-10 in CXCL-13 (52). Študije so pokazale, da ima ključno vlogo pri migraciji celic B v likvor CXCL-13 (51). Povišane koncentracije CXCL-13 lahko zaznamo več dni pred intratekalno sintezo specifičnih protiteles proti *Borrelia burgdorferi* s. l. (53).



Slika 7: Odziv celic B na okužbo z borelijami v likvorju, povzeto po (54).

## 1.5. DIAGNOSTIKA LYMSKE NEVROBORELIOZE

Lymsko nevroboreliozo lahko dokazujemo z več diagnostičnimi metodami, s katerimi zaznamo okužbo neposredno ali pa jo dokažemo na posreden način, z določanjem specifičnega odziva proti *B. burgdorferi* s.l..

Med neposredne metode določanja uvrščamo mikroskopiranje v temnem polju, osamitev borelij in dokazovanje borelijske DNA, med posredne pa serološke teste za določanje specifičnih protiteles.

### 1.5.1. Mikroskopiranje v temnem polju

Bakterijo *B. burgdorferi* s. l. lahko z mikroskopiranjem v temnem polju vidimo neposredno v tekočih vzorcih ali v histoloških preparatih, vendar pa sta občutljivost in specifičnost te metode zelo nizki (55- 57).

### 1.5.2. Izolacija borelij

Borelige lahko izoliramo iz likvorja, kože ali krvi in jih gojimo v modifciranim Kelly-Pettenkoferjevem gojišču pri 30-34°C (58- 61). Kultivacija borelij traja do 12 tednov, kar je posledica njihove počasne rasti in zahtevnih pogojev za gojenje. Gojenju sledi identifikacija borelij s pomočjo molekularnih metod. Gre za zamuden postopek z zelo variabilno diagnostično občutljivostjo.

### 1.5.3. Verižna reakcija s polimerazo

Borelijsko DNA dokazujemo s postopkom PCR, s katerim dokažemo prisotnost DNA mrtvih ali živih bakterij. V primerjavi z izolacijo borelij je metoda PCR hitra in občutljiva, vendar pa pomanjkljiva, saj ni standardizirana, zaradi česar lahko dobimo lažno pozitivne ali lažno negativne rezultate (62).

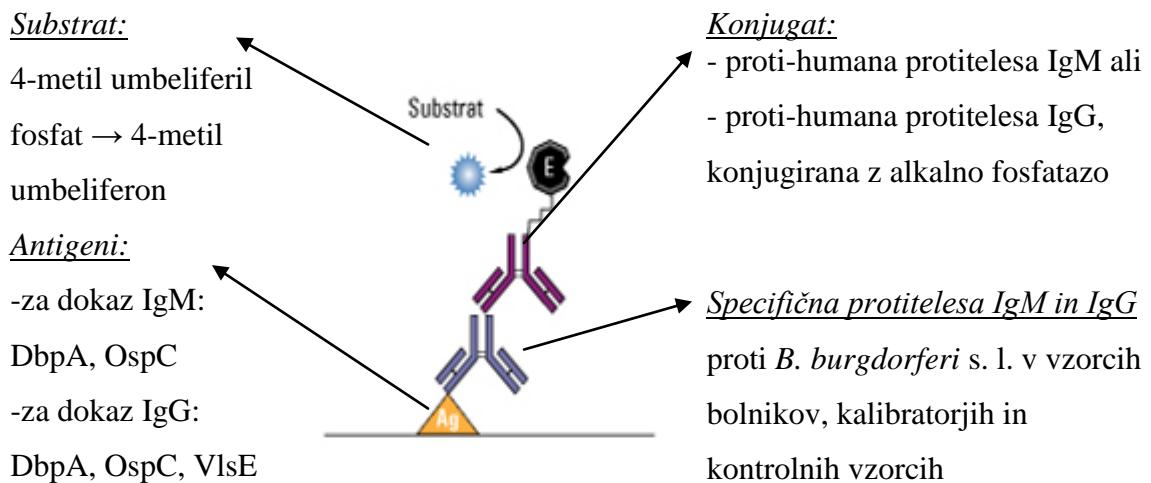
Diagnostična občutljivost metode PCR pri določanju borelij v likvorju je pri zgodnji lymski nevroboreliozi 10-30%, medtem ko je v serumu še nižja (63). Kljub nizki diagnostični občutljivosti pri določanju prisotnosti bakterij v likvorju, pa je ta metoda uporabna pri bolnikih v zelo zgodnjem stadiju lymske nevroborelioze, ter pri tistih bolnikih z negativnimi vrednostmi protiteles ali tistih z imunskimi pomanjkljivostmi (64).

### 1.5.4. Dokaz specifičnih protiteles proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Za dokazovanje specifičnih protiteles razredov IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l. uporabljam metode, s katerimi lahko neposredno določamo protitelesni odziv na okužbo.

#### 1.5.4.1 Encimsko-imunofluorescenčni test

Test Vidas uporablja za določanje specifičnih protiteles IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l. dvostopenjsko imunsko sendvič metodo, s končno detekcijo fluorescenčnega signala. Prva stopnja je reakcija med rekombinantnimi antigeni, vezanimi na nosilec, ki so specifični za *B. burgdorferi* s. l. in specifičnimi protitelesi IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l., prisotnimi v vzorcih bolnikov, kalibratorjev in kontrolnih vzorcih (Slika 8). Antigena za dokaz specifičnih protiteles IgM proti *B. burgdorferi* s. l. sta OspC in DbpA, za dokaz specifičnih protiteles IgG proti *B. burgdorferi* s. l. pa VlsE, DbpA in OspC. V nadaljnji stopnji testa dodamo konjugat, v katerem so proti-humana IgM ali proti-humana IgG protiteesa, konjugirana z alkalno fosfatazo. Nevezani konjugat speremo in dodamo substrat 4-metil-umbeliferil fosfat. Encim, vezan na imunski kompleks, katalizira hidrolizo substrata, pri čemer nastane flourescenčni produkt 4-metil-umbeliferon (Slika 9), ki ga aparat zazna in s pomočjo optičnega čitalca izmeri intenziteto fluorescence pri 450 nm. (65).



Slika 8: Imunska reakcija pri encimsko- imunofluorescenčnem testu, povzeto po (66).

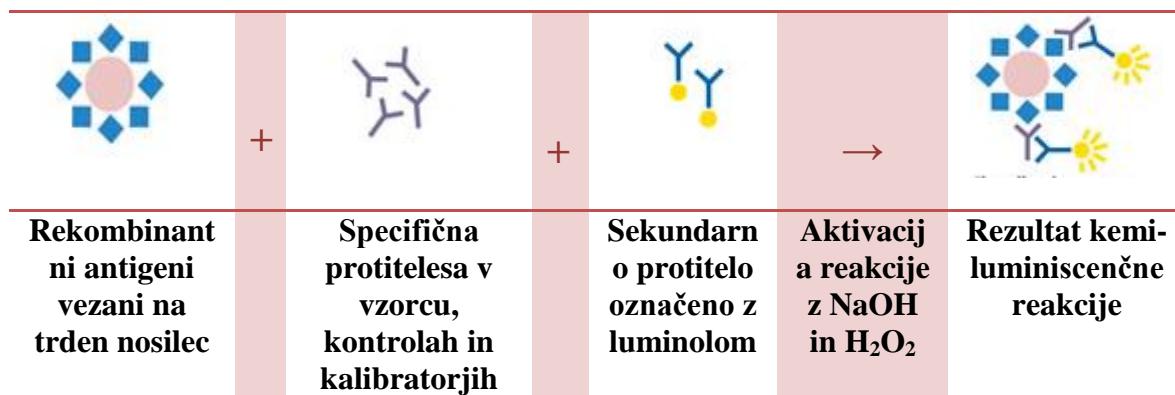


Slika 9: Kemijska reakcija pretvorbe substrata v fluorescenčni produkt.

#### 1.5.4.2. Imuno-kemiluminiscenčni test

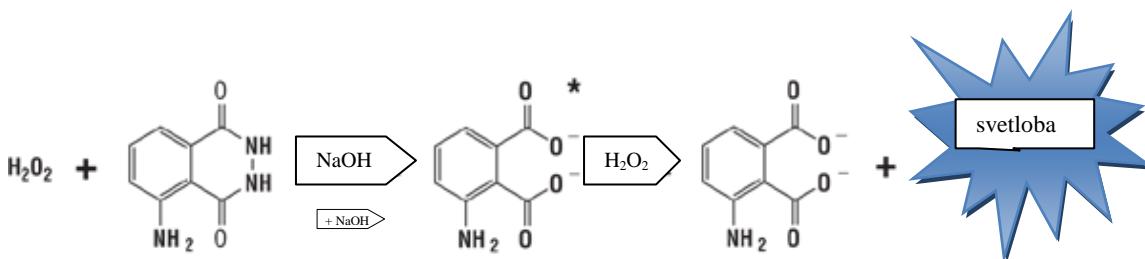
Test Liaison uporablja za določanje specifičnih protiteles IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l. indirektno imuno-kemiluminiscenčno metodo. Ta temelji na reakciji rekombinantnih antigenov, specifičnih za *B. burgdorferi* s. l., s specifičnimi protitelesi IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l., prisotnimi v vzorcih bolnikov, kalibratorjih in kontrolnih vzorcih. V drugi stopnji reakcije se na nastale imunske komplekse vežejo monoklonska mišja protitelesa, označena z izoluminolnim derivatom (Slika 10).

Antigena za dokaz specifičnih protiteles IgM proti *B. burgdorferi* s. l. sta OspC in VlsE, za dokaz specifičnih protiteles IgG proti *B. burgdorferi* s. l. pa se uporablja VlsE.



Slika 10: Imuno-kemiluminiscenčna reakcija, povzeto po (67).

Luminol reagira s hidroksidom, s katerim tvori dianion. Z njim reagira kisik iz vodikovega peroksidu, pri čemer se tvori nestabilen organski peroksid 3-aminoftalat. Stabilnost se doseže z izgubo dušika, pri čemer se sprosti energija v obliki fotona, ki daje modro svetlobo (68). Analizator s pomočjo fotopomnoževalke izmeri kemiluminiscenčni signal, ki ga poda v obliki relativnih enot svetlobe- RLU (Slika 11). Izmerjeni signal je premo sorazmeren s koncentracijo specifičnih protiteles IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l. prisotnih v vzorcih.



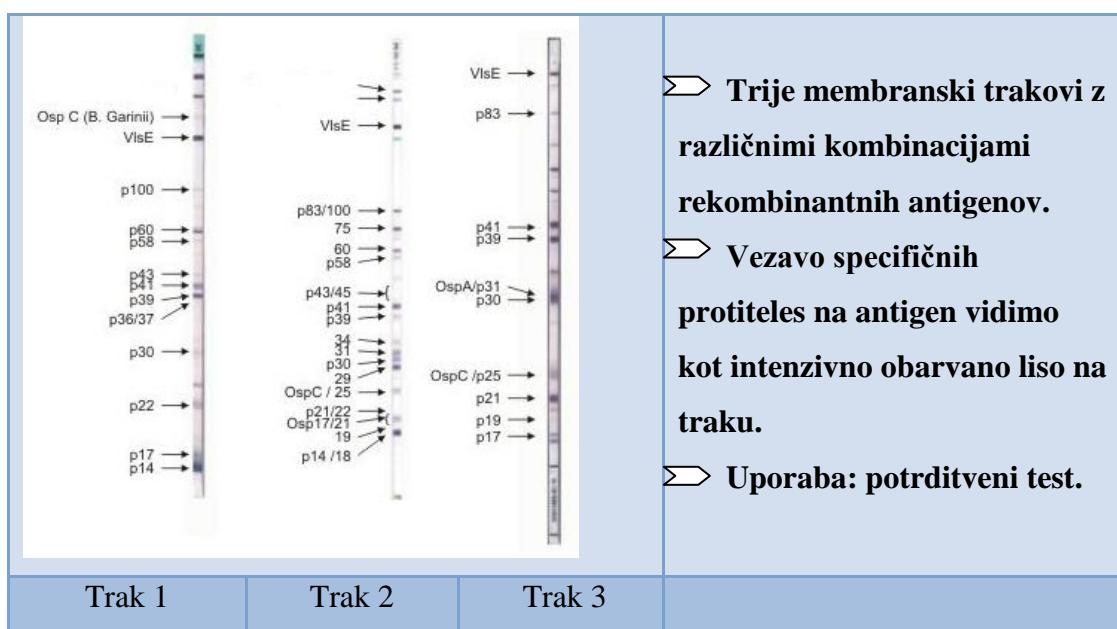
Slika 11: Kemijska reakcija izoluminolnega derivata, povzeto po (68).

#### 1.5.4.3. Encimsko imunski test

Encimsko imunski test je izraz za vrsto testov, s katerimi določamo bodisi specifična protitelesa IgM in IgG (posredna metoda) bodisi antogene (neposredna metoda) v vzorcih. Princip testa temelji na imunski reakciji med antigeni in protitelesi v vzorcih. V drugi stopnji dodamo v reakcijsko zmes sekundarna protitelesa (proti-humana protitelesa IgM ali IgG), ki so označena z encimom. Nato dodamo substrat, ki ga encim, vezan na imunski kompleks pretvori vobarvan produkt (69). Količina nastalega produkta je premo sorazmerna koncentraciji specifičnih protiteles prisotnih v vzorcu.

#### 1.5.4.4. Prenos Western

Metoda temelji na elektroforezni ločbi proteinov povzročitelja okužbe na poliakrilamidnem gelu. Ti se na njem ločijo v pasove in se po končani ločbi prenesejo na nitrocelulozno membrano. Membranske trakove z antigeni inkubiramo posamično s preiskovanim vzorcem. V primeru prisotnosti specifičnih protiteles proti povzročitelju v vzorcu, se le ti vežejo z antigeni na traku (Slika 12). Testne trakove nato inkubiramo s konjugatom in v zadnji stopnji še s substratom. Reakcijo med specifičnim protitelesom in specifičnim antigenom vidimo kot intenzivno črto na testnem traku. Različica testa Western je imuno blot, kjer so na membranskih trakovih nanešeni rekombinantni antigeni. S testom Western lahko določamo protitelesa proti točno določenim borelijskim antigenom, s čimer dobimo imunski odtis bolnika (70). Zaradi njene visoke specifičnosti ( $\geq 95\%$ ) ga lahko uporabimo za potrditveno metodo.



Slika 12: Primeri trakov z antigeni za imuno blot, povzeto po (70).

### 1.6. ZDRAVLJENJE LYMSKE BORELIOZE IN LYMSKE NEVROBORELIOZE

Zdravljenje lymske borelioze je priporočljivo v vseh stadijih bolezni. Izbor antibiotikov je namenjen tako skrajšanju kot preprečitvi širjenja bolezni. Uporabljamo amoksicilin, azitromicin, cefuroksim, doksiciklin, fenoksimetil metil-penicilin, eritromicin, ceftriakson

in penicilin G (71). Brez antibiotičnega zdravljenja lahko ostanejo borelije v tkivih in lahko mesece ali leta po okužbi povzročijo okvare, ki so značilne za pozno obdobje lymske borelioze.

#### Zgodnja lymska nevroborelioza

Bolniki z zgodnjo obliko lymske nevroborelioze morajo dobiti 10-28 dnevno antibiotično zdravljenje. Prejmejo lahko oralno doksicilin (200 mg/dan za 2 dni in 100 mg/dan za 8 dni) ali intravensko ceftriakson (2 ali 4 g/dan), penicilin (20MU/dan) ali cefotaksim (3x2g/dan ali 2x3g/dan) (64).

#### Pozna lymska nevroborelioza

Bolniki s pozno obliko lymsko nevroboreliozo morajo biti zdravljeni z oralnim odmerkom doksiciklina (200 mg/dan) ali z intravensko apliciranim ceftriaksonom (2g/dan) v času 2-4 tednov ali pa z intravenskim odmerkom penicilina (20 MU/dan) v času 10 dni (64). Študije kažejo na izrazito izboljšanje nenormalnih nevroloških sprememb po končani 10-14 dnevni antibiotični terapiji. Po koncu zdravljenja je lahko še nekaj mesecev prisotna blaga pleocitoza.

## 2. NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je:

- ugotoviti prisotnost specifičnih protiteles razredov IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l. v serumskih in likvorskih vzorcih pri bolnikih s sumom na lymsko nevroboreliozo,
- dokazati prisotnost specifičnih protiteles razredov IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l. s serološkima testoma ELFA in CLIA,
- rezultate, dobljene s serološkima testoma primerjati med seboj, in
- z laboratorijskega vidika ovrednotiti uporabljeni serološki testi.

### **3. MATERIAL IN METODE**

#### **3.1. Vzorci**

V raziskavi smo uporabili komercialno dostopna serološka testa za določanje specifičnih protiteles IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l.. Testiranje smo izvajali v Laboratoriju za dokazovanje boreloz in leptospiroze na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

V raziskavo smo vključili 50 vzorcev serumov in 50 vzorcev likvorjev preiskovancev s sumom na nevroboreliozo. Vzorce smo zbrali v obdobju od februarja 2012 do januarja 2014 in jih hranili v mikropruvetah na Inštitutu, v zamrzovalniku, na -20°C.

#### **3.2. Material pri uporabljenih metodah**

V raziskavi smo uporabili serološka testa: kvalitativni dvostopenjski encimsko-imunski test s končno fluorescenčno detekcijo (ELFA) - VIDAS Lyme test, proizvajalca Biomerieux (Francija) ter kvantitativni imuno-kemiluminiscenčni test (CLIA), proizvajalca DiaSorin S.p.A (Saluggia, Italija).

##### **3.2.1. Reagenti in oprema za izvedbo encimsko-imunofluorescenčnega testa**

Za analizo serumskih vzorcev z ELFA smo uporabili kompleta reagentov VIDAS Lyme IgM (LYM) in VIDAS Lyme IgG (LYG), za analizo vzorcev likvorjev pa kompleta VIDAS Lyme IgM (LYM) in VIDAS Lyme IgG (LYGS). Analizator mini VIDAS poda kvalitativne rezultate meritev prisotnosti specifičnih protiteles IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l. v serumskih vzorcih, medtem ko za likvorske vzorce nima opredeljenega kvalitativnega kriterija. Vrednosti indekov, ki jih dobimo pri testiranju likvorjev, lahko v tem primeru preračunamo le s pomočjo Tibblingove ali Rieberove metode.

### **3.2.1.1. Reagenti pri encimsko-imunofluorescenčnem testu**

Komplet reagentov za dokaz protiteles IgM vsebuje:

- Šestdeset reagenčnih trakov LYM
- Šestdeset zbirnikov trdne faze LYM ( $2 \times 30$ ) (SPR); SPR je prekrit z rekombinantnimi himernimi proteini *B. burgdorferi* s. l., DbpA in OspC
- Standard LYM - S1 ( $1 \times 1,4$  ml). Človeška defibrinirana plazma, ki vsebuje protitelesa IgM proti *B. burgdorferi* v fosfatnem pufru s stabilizatorji, BSA in MIT, 1g/L, pH 7,4
- Pozitivna kontrola LYM - C1 ( $1 \times 0,7$  ml). Človeška defibrinirana plazma, ki vsebuje protitelesa IgM proti *B. burgdorferi* v fosfatnem pufru s stabilizatorji, BSA in MIT 1g/L, pH 7,4
- Negativna kontrola LYM - C2 ( $1 \times 0,7$  ml): fosfatni pufer z MIT 1g/L in BSA, brez zaznavnih protiteles IgM proti *B. burgdorferi*, pH 7,4
- Kartica s podatki o umeritvenih krivuljah testa VIDAS Lyme (MLE).

Komplet reagentov za dokaz protiteles IgG vsebuje:

- Šestdeset reagenčnih trakov LYG
- Šestdeset zbirnikov trdne faze LYG- SPR; SPR je prekrit z rekombinantnimi himernimi proteini *B. burgdorferi* s. l., VlsE, DbpA in OspC
- Standard LYG- S1 ( $1 \times 1,4$  ml): vsebuje protitelesa IgG proti *B. burgdorferi* v fosfatnem pufru s stabilizatorji, BSA in MIT 1g/L, pH 7,2
- Pozitivna kontrola LYG- C1 ( $1 \times 0,7$  ml): vsebuje protitelesa IgG proti *B. burgdorferi* v fosfatnem pufru s stabilizatorji, BSA in MIT 1g/L, pH 7,2
- Negativna kontrola LYG ( $1 \times 0,7$  ml): fosfatni pufer z MIT 1g/L in BSA, brez zaznavnih protiteles IgG proti *B. burgdorferi*, pH 7,2
- Kartica MLE

Reagente za dokaz protiteles IgM in IgG hranimo v hladilniku pri 2-8 °C. Reagente, pripravljene za uporabo in vstavljene v aparat, prikazuje Slika 13.



Slika 13: Reagenčni trakovi in zbirnik trdne faze v aparatu mini Vidas pred začetkom izvajanja testa, povzeto po (65).

#### Zbirnik trdne faze

Zbirnik trdne faze SPR je pri izvedbi testov VIDAS Lyme IgM in VIDAS Lyme IgG prekrit s kombinacijo rekombinantnih antigenov *B. burgdorferi* s. l. (Slika 14).

Identifikacija vsakega SPR poteka preko kod LYM oziroma LYG in ustreznega čitalca v aparatu.



Slika 14: Zbirnika trdne faze za specifična protitelesa IgM in IgG.

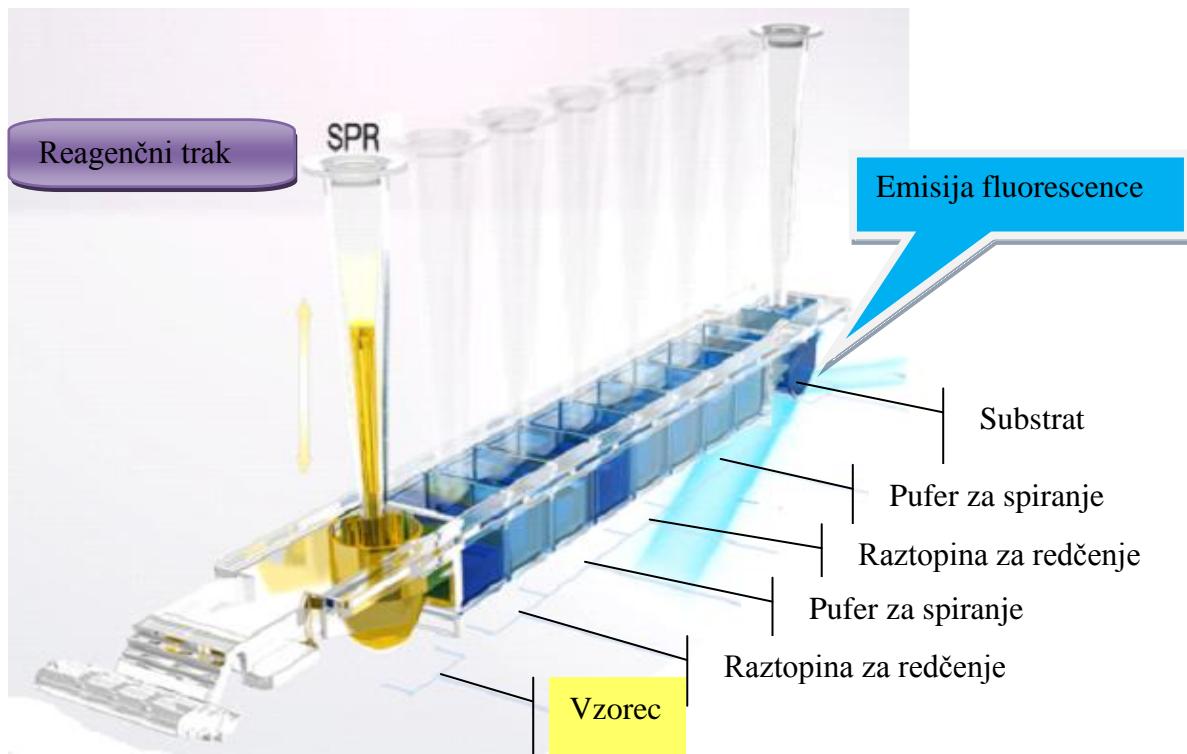
#### Reagenčni trakovi iz kompletov Vidas Lyme IgM in VIDAS Lyme IgG

Vsek reagenčni trak kompleta testa Vidas Lyme je sestavljen iz 10 vsebnikov, ki so označeni z nalepko in prekriti z zaščitno tesnilno folijo. Na nalepki so koda, ki označuje mesto testa, številka serije uporabljenega kompleta in datum poteka veljavnosti.

Reagenti v testnem traku si sledijo v naslednjem zaporedju (Slika 15):

- vsebnik 1: odprtina za vnos vzorca
- vsebnik 2: razredčilo - pufer TRIS, raztopina NaCl, nevtralizator, detergent, BSA, MIT 1g/L, pH 7,4

- vsebniki 3-5: pufer za spiranje (600 µl) - pufer TRIS, raztopina NaCl, detergent, MIT 1g/L, pH 7,8
- vsebnik 6: konjugat (400 µl):
  - IgM: pufer TRIS, raztopina NaCl, BSA, MIT 1g/L, titrirana raztopina mišjih monoklonskih proti-humanih protiteles IgM, konjugiranih z alkalno fosfatazo, pH 7,4
  - IgG: pufer TRIS, raztopina NaCl, BSA, MIT 1g/L, titrirana raztopina mišjih monoklonskih proti-humanih protiteles IgG, konjugiranih z alkalno fosfatazo, pH 6,1
- vsebnika 7-8: pufer za spiranje (600 µl)- pufer TRIS, raztopina NaCl, detergent, MIT 1g/L, pH 7,8
- vsebnik 9: prazen
- vsebnik 10: bralna kiveta s substratom (300 µl)- 4-metil-umbeliferilfosfat (4-MUP) (0,6 mmol/L), dietanolamin- DEA (0,62 mol/L), pH 9,2, natrijev azid 1g/L (65).



Slika 15: Reagenti v testnem traku - aparat mini Vidas, povzeto po (65).

### **3.2.1.2. Oprema za izvedbo encimsko-imunofluorescenčnega testa**

- Kalibrirana pipeta
- Nastavki za pipeto
- Aparat mini VIDAS®
- Komplet reagentov VIDAS Lyme IgM in VIDAS Lyme IgG

### **3.2.2 Reagenti in oprema za imuno-kemiluminiscenčni test**

Za analizo serumskih vzorcev in vzorcev likvorjev smo uporabili komercialno dostopna kompleta reagentov LIAISON Borrelia IgM Quant test in LIAISON Borrelia IgG test. Analizator LIAISON poda kvantitativni rezultat glede količine prisotnih specifičnih protiteles IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l..

#### **3.2.2.1. Reagenti za imuno-kemiluminiscenčni test**

Komplet reagentov za dokaz protiteles IgM vsebuje (Slika 16):

- Magnetni delci (2,3 ml): magnetni delci prevlečeni z rekombinantnima antigenoma OspC in VlsE *B. burgdorferi* (pridobljena iz *E. coli*), BSA, pufer PBS in <0,1% natrijevega azida;
- Kalibrator 1 (3,8 ml): človeška serum/plazma, ki vsebuje nizek nivo protiteles IgM proti *B. burgdorferi*, BSA, fosfatni pufer, 0,2% raztopina ProClin® 300, inertno rumeno barvilo;
- Kalibrator 2 (3,8 ml): človeška serum/plazma, ki vsebuje visok nivo protiteles IgM proti *B. burgdorferi*, BSA, fosfatni pufer, 0,2% raztopina ProClin® 300, inertno modro barvilo;
- Razredčilo za vzorec (28 ml): BSA, fosfatni pufer, 0,2% raztopina ProClin® 300, inertno rumeno barvilo;
- Konjugat (23 ml): mišja monoklonska protitelesa proti človeškim protitelesom IgM, konjugirana z derivatom izoluminola, BSA, pufer PBS, 0,2% raztopina ProClin® 300 in konzervansi (72).



Slika 16: Komplet reagentov Liaison za izvedbo imuno-kemiluminiscenčnega testa, povzeto po (72).

Komplet reagentov za dokaz protiteles IgG vsebuje:

- Magnetne delce (2,3 ml): magnetni delci prevlečeni z rekombinantrnim antigenom VlsE *B. burgdorferi* (pridobljeni iz *E. coli*), BSA, pufer PBS, natrijev azid <0,1%;
- Kalibrator 1 (3,8 ml): človeška serum/plazma, ki vsebuje nizek nivo protiteles IgG proti *B. burgdorferi*, BSA, fosfatni pufer, 0,2% raztopino ProClin® 300, inertno rumeno barvilo;
- Kalibrator 2 (3,8 ml): človeška serum/plazma, ki vsebuje visok nivo protiteles IgG proti *B. burgdorferi*, BSA, fosfatni pufer, 0,2% raztopino ProClin® 300, inertno modro barvilo;
- Razredčilo za vzorec (28 ml): BSA, fosfatni pufer, 0,2% raztopina ProClin® 300, inertno rumeno barvilo;
- Konjugat (23 ml): mišja monoklonska protitelesa proti človeškim protitelesom IgG konjugirana z derivatom izoluminola, BSA, pufer PBS, 0,2% raztopino ProClin® 300, konservansi (72).

Dodaten material- reagenčni sestav (Slika 17):

- Reakcijski vsebnik- Modul Liaison®
- Startni reagent- Starter kit Liaison®
- Reagent za kontrolo svetlobe- Light check Liaison®
- Reagent za spiranje sistema- Wash/ System Liquid Liaison®
- Odlagalniki za odpadke- Waste bags Liaison®
- Komplet reagentov za čiščenje sistema- Cleaning kit Liaison®
- Negativna in pozitivna kontrola Borrelia IgM liquor Liaison®

- Negativna in pozitivna kontrola Borrelia IgM Quant Liaison®
- Negativna in pozitivna kontrola Borrelia IgG
- Negativna in pozitivna kontrola Borrelia IgG liquor.



Slika 17: Priprava reagentov na aparatu Liaison, povzeto po (72).

### **3.2.2.2 Oprema za izvedbo kemiluminiscenčnega testa**

- analizator DiaSorin Liaison (Slika 18)
- ustrezna stojala za vzorce označena s kodami



Slika 18: Aparat Liaison (levo) in stojalo s pripravljenimi vzorci (desno), povzeto po (72).

### **3.3. Postopki izvedbe testov**

Testa ELFA in CLIA smo izvedli natančno po navodilih proizvajalca.

#### **3.3.1. Izvedba encimsko-imunofluorescenčnega testa**

Pred uporabo kompleta Vidas Lyme IgM ali Vidas Lyme IgG morajo biti reagenti ogreti na sobno temperaturo.

Pred prvo uporabo, s pomočjo zunanjega čitalca kod, odčitamo priloženo kodo, kar nam omogoči posodobitev programske opreme aparata (postopek Vidas PTC).

Pred uporabo vsake nove serije kompleta testa Vidas Lyme, s pomočjo čitalca s kartice odčitamo podatke o umeritvenih krivuljah- MLE.

Kalibracijo s priloženim standardom izvajamo v dvojniku pred vsako uporabo nove serije reagenta, ter obvezno po preteku 28. dni od predhodne kalibracije. Rezultati niso veljavni, če kontrolne vrednosti odstopajo od pričakovanih vrednosti.

##### Analiza vzorcev:

- v aparat vstavimo SPR za protitelesa IgM ali IgG;
- v prvi vsebnik nanesemo 100 µl vzorca na reagenčnem traku za protitelesa IgM ali IgG;
- reagenčne trakove vstavimo v aparat in izberemo izvajanje ustreznega testa na aparaturi:
  - Vidas Lyme IgM se identificira s kodo LYM za serum;
  - Vidas Lyme IgG se identificira s kodo LYG za serum;
  - Vidas Lyme IgG se identificira s kodo LYGS za likvor;
- v aparat vnesemo podatke o protokolnih številkah vzorcev;
- pritisnemo tipko start;
- nadaljnje korake postopka izvaja aparat avtomatsko.

### **3.3.2 Izvedba imuno-kemiluminiscenčnega testa**

Pred uporabo kompleta Liaison IgM ali Liaison IgG morajo biti reagenti ogreti na sobno temperaturo.

Kalibracijo izvajamo:

- pri uporabi novega starter reagenta- Starter Liaison®;
- če je minilo od predhodne kalibracije več kot en teden;
- pri uporabi nove številke serije reagenčnega sestava;
- če je bil aparat na popravilu;
- če kontrolne vrednosti ležijo izven predpisanih vrednosti.

Kontrola kvalitete

Kontrolo kvalitete moramo izvajali pri vsakokratni seriji za zagotavljanje uspešnosti testa.

Izvajamo jo:

- vsaj enkrat dnevno glede na uporabo;
- kadar koli uporabimo nov reagenčni sestav;
- kadar izvedemo kalibracijo;
- ko uporabimo novo serijo startnega reagenta- Starter Liaison®.

Analiza vzorcev

Analize na aparatu DiaSorin so popolnoma avtomatizirane. Vsak testni parameter je definiran s kodo na reagenčni nalepki na ustreznom stojalu.

Pred vstavitvijo reagenčnega sestava v analizator moramo najprej resuspendirati magnetne delce. Sestav vstavimo v reagenčno območje in ga pustimo stati 30 minut. Na aparatu izberemo ustrezno analizo za določitev specifičnih protiteles IgM proti *B. burgdorferi* s.l. (Bor-MQ) oziroma za določitev specifičnih protiteles IgG proti *B. burgdorferi* s.l. (Bor-G) v serumskih vzorcih. V primeru vzorcev likvorja izberemo analizo za določitev specifičnih protiteles IgM proti *B. burgdorferi* s.l. (Bor-MQ) oziroma za določitev specifičnih protiteles IgG proti *B. burgdorferi* s.l. (Bor-GCSF). Program zaženemo s pritiskom na tipko start.

Postopki, ki samostojno potekajo v analizatorju:

- prenos kalibratorjev, kontrol in vzorcev v reakcijski vsebnik,
- razdelitev magnetnih delcev, prekritih z antigeni *B. burgdorferi* s. l.,
- prenos vzorcev, razredčenih z delovnim reagentom,
- inkubacija,
- spiranje,
- porazdelitev konjugata v reakcijski vsebnik,
- inkubacija,
- spiranje,
- dodatek startnega reagenta in meritev oddane svetlobe.

### **3.4. Vrednotenje rezultatov**

Rezultate smo vrednotili po navodilih proizvajalca, za vsak test posebej.

#### **3.4.1. Vrednotenje rezultatov encimsko-imunofluorescenčnega testa**

Po končani analizi aparat avtomatično analizira in izračuna rezultate. Inštrument dvakrat izmeri fluorescenco v merilni kiveti posameznega reagenčnega traku. Prva meritev je odčitavanje ozadja substrata v kiveti, pred dodatkom SPR v substrat. Drugo pa aparat izvede po inkubaciji substrata s preostalom encimom znotraj SPR. Relativna fluorescenčna vrednost predstavlja vrednost meritve vzorca z odštetno vrednostjo ozadja. Aparat na koncu analize natisne poročilo z rezultati (65).

Vrednosti vzorcev interpretiramo kot razmerje ali indeks:

$$I = \text{indeks} = \frac{\text{RFV vzorca}}{\text{RFV standarda}}$$

### **3.4.1.1. Vrednotenje rezultatov encimsko-imunofluorescenčnega testa v serumskih vzorcih**

Vrednosti indeksov in njihovih interpretacij, ki jih za specifična protitelesa IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l., določenih v serumskih vzorcih, podaja proizvajalec, prikazujeta Razpredelnici III in IV.

Razpredelnica III: Interpretacija rezultatov, izmerjenih v serumskih vzorcih s testom Vidas Lyme IgM (LYM)

Indeks - IgM	Interpretacija
I < 0,20	Negativno
0,20 ≤ I < 0,32	Mejna vrednost
I ≥ 0,32	Pozitivno

Razpredelnica IV: Interpretacija rezultatov, izmerjenih v serumskih vzorcih s testom Vidas Lyme IgG (LYG)

Indeks - IgG	Interpretacija
I < 0,20	Negativno
I ≥ 0,32	Pozitivno

Rezultate testov moramo interpretirati v povezavi s klinično sliko, zgodovino primera in vseh ostalih izvedenih bioloških testiranj. Možne interpretacije testa, ki jih izvedemo na ta način, prikazuje Razpredelnica V.

Razpredelnica V: Klinična interpretacija rezultatov testa Vidas Lyme (65)

Rezultat testa Vidas Lyme IgM	Rezultat testa Vidas Lyme IgG	Interpretacija rezultatov
Negativen	Negativen	Malo verjetna okužba. V primeru kliničnega suma (ugriz klopa, nevrološki znaki,...) vzorec ponovno odvzamemo kasneje.
Pozitiven	Negativen	Verjetna zgodnja okužba.
Pozitiven	Pozitiven	Verjetna zgodnja ali razširjena okužba.
Negativen	Pozitiven	Verjetna okužba v kateri koli stopnji (zgodnja, razširjena, kronična).
Mejni ali pozitiven pri mejni vrednosti	Pozitiven pri mejni vrednosti	Interpretacija odvisna od konteksta in zgodovine primera; zgodnja okužba oziroma priporočeno serološko sledenje.
Mejni ali pozitiven pri mejni vrednosti	Negativen	Interpretacija odvisna od konteksta in zgodovine primera; zgodnja okužba oziroma prisotna bolezen, ki moti testiranje.

#### **3.4.1.2. Vrednotenje rezultatov encimsko-imunofluorescenčnega testa v vzorcih likvorja**

Proizvajalec v protokolu za analizo vzorcev podaja le vrednotenje protiteles IgG proti *B. burgdorferi* s. l. v likvorju, medtem ko aparat ne omogoča analize in vrednotenja IgM proti *B. burgdorferi* s. l. v tovrstnih bioloških vzorcih.

##### Ovrednotenje protiteles IgG proti *Borrelia burgdorferi* s. l. v likvorskih vzorcih

Specifična detekcija protiteles proti *B. burgdorferi* v vzorcih likvorja je pomemben prednostni argument v diagnostiki nevroborelioze. Test Vidas Lyme IgG (LYGS) omogoča določitev sinteze intratekalnih protiteles IgG s pomočjo IAP, ki ga dobimo s sočasno analizo krvnega vzorca in likvorja (73). Rezultati likvorskih vzorcev za specifična protitelesa IgG proti *B. burgdorferi* s. l., ki jih dobimo z metodo ELFA, služijo izključno za nadaljnji izračun intratekalne sinteze protiteles.

Indeks intratekalne sinteze protiteles IgG proti *B. burgdorferi* s.l. upošteva njihovo detekcijo v preiskovančevem serumu in likvorju takrat, ko odpravimo proteinske razlike med analiziranimi vzorcema. Indeks intratekalne sinteze nato uporabimo za razlikovanje med pasivno difuzijo specifičnih protiteles IgG *B. burgdorferi* s.l. iz serumu v likvor in njihovo tvorbo *in situ* v samem likvorju (74).

Določitev vrednosti IAP temelji na indeksih Vidas Lyme IgG, pridobljenih iz meritev preiskovančevega serumu in likvorja, ter serumskih in likvorskih titrov albuminov (Tibblingova metoda) (Enačba 1) ali pa iz celokupnih titrov IgG (Rieberova metoda) (Enačba 2) v obeh vrstah vzorcev (75).

Enačba 1: Tibblingova metoda (75)

$$IAP = \frac{(\text{Vidas Lyme IgG CSF indeks} / \text{Vidas Lyme IgG serum indeks}) / 9}{\text{CSF albumin titer} / \text{serum albumin titer}}$$

Enačba 2: Rieberova metoda (75)

$$IAP = \frac{(\text{Vidas Lyme IgG CSF indeks} / \text{Vidas Lyme IgG serum indeks}) / 9}{\text{CSF total IgG titer} / \text{serum total IgG titer}}$$

Podatkov o vrednostih celokupnih titrov protiteles IgG in albuminskih titrov, ki smo jih potrebovali za preračun vrednosti ustreznega IAP, ki ga navaja proizvajalec v navodilih postopka, nismo mogli pridobiti. Posledično nismo mogli ovrednotiti intratekalne sinteze protiteles. Zato smo dobljene rezultate za specifična protitelesa IgG proti *B. burgdorferi* s.l. v likvorskih vzorcih ovrednotili po shemi za serumski vzorce (Razpredelnica III). Vrednosti, ki smo jih dobili pri njihovi detekciji, pa smo upoštevali kot absolutne pri vrednotenju rezultatov določitev specifičnih protiteles IgG proti *B. burgdorferi* s.l. v likvorskih vzorcih.

#### Ovrednotenje protiteles IgM proti *Borrelia burgdorferi* s.l. v vzorcih likvorja

Proizvajalec ne navaja možnosti ugotavljanja protiteles IgM proti *B. burgdorferi* s.l. v likvorskih vzorcih. Zato smo analizo tovrstnih vzorcev izvedli skladno s postopkom za serumski vzorce. Vrednosti, ki smo jih pri tem izmerili, pa smo upoštevali za absolutne pri-

vrednotenju rezultatov merjenja protiteles IgM proti *B. burgdorferi* s. l. v likvorskih vzorcih.

### **3.4.2. Vrednotenje rezultatov imuno-kemiluminiscenčnega testa**

Analizator avtomatično izračuna koncentracijo protiteles IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s.l. in jih izrazi v obliki arbitrarnih enot (AU/ml).

#### **3.4.2.1. Vrednotenje rezultatov imuno-kemiluminiscenčnega testa v serumskih vzorcih**

Vrednosti koncentracij protiteles v serumskih vzorcih in njihovo interpretacijo, ki jih podaja proizvajalec, za specifična protitelesa IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l., prikazujeta Razpredelnici VI in VII.

Območje merljivosti specifičnih protiteles IgM proti *B. burgdorferi* s.l. v serumskih vzorcih z metodo CLIA na aparatu Liaison je med 2 in 190 AU/ml, za specifična protitelesa IgG proti *B. burgdorferi* s.l. pa med 5 in 240 AU/ml.

Razpredelnica VI: Interpretacija rezultatov za specifična protitelesa IgM proti *B. burgdorferi* sensu lato, izmerjenih v serumskih vzorcih

Koncentracija IgM	Interpretacija
< 18 AU/ml	Negativen
18-22 AU/ml	Mejna vrednost
≥ 22 AU/ml	Pozitiven

Razpredelnica VII: Interpretacija rezultatov za specifična protitelesa IgG proti *B. burgdorferi* sensu lato v serumskih vzorcih

Koncentracija IgG	Interpretacija
<10 AU/ml	Negativen
10-15 AU/ml	Mejna vrednost
≥ 15 AU/ml	Pozitiven

### **Klinična interpretacija rezultatov**

Negativen rezultat določanja protiteles IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s.l. v splošnem nakazuje, da preiskovanec ni okužen, vendar pa to ne izključuje akutne borelioze, pri kateri je lahko okužba še v zelo zgodnji fazи, ko preiskovanec še ne proizvaja specifičnih protiteles proti *B. burgdorferi* s.l. (Razpredelnica VIII) (76, 77).

Pozitiven rezultat določanja protiteles IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s.l. v splošnem kaže na razširitev patogena (akutna ali pretekla okužba).

Razpredelnica VIII: Prikaz interpretacije rezultatov seroloških testov glede na klinično sliko. Rezultati so bili določeni s testi Liaison Borrelia.

Rezultat IgM- Liaison	Rezultat IgG- Liaison	Interpretacija rezultatov
Negativen	Negativen	Ni dokazov okužbe, v primeru kliničnega dvoma (ugriz klopa, nevrološki simptomi,...) spremljamo bolnika skozi daljši čas.
Pozitiven	Negativen	Verjetna okužba v začetnem stadiju.
Negativen	Pozitiven	Verjetna okužba v katerem koli stadiju.
Pozitiven	Pozitiven	Verjetna akutna okužba.

#### ***3.4.2.2. Vrednotenje rezultatov imuno-kemiluminiscenčnega testa v vzorcih likvorja***

Vrednosti koncentracij protiteles in njihovo interpretacijo, ki jih podaja proizvajalec, za specifična protitelesa IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l. v likvorskih vzorcih prikazujeta Razpredelnici IX in X.

Območje merljivosti metode CLIA na aparatu Liaison za določanje specifičnih protiteles IgM proti *B. burgdorferi* s.l. v likvorskih vzorcih je med 0 in 190 AU/ml, za specifična protitelesa IgG proti *B. burgdorferi* s.l. pa med 0,2 in 240 AU/ml.

Razpredelnica IX: Interpretacija rezultatov določanja specifičnih protiteles IgM proti *B. burgdorferi* sensu lato likvorskih vzorcih

Koncentracija IgM	Interpretacija
< 2,5 AU/ml	Negativen
2,5-3,5 AU/ml	Mejna vrednost
≥ 3,5 AU/ml	Pozitiven

Razpredelnica X: Interpretacija rezultatov določanja specifičnih protiteles IgG proti *B. burgdorferi* sensu lato likvorskih vzorcih

Koncentracija IgG	Interpretacija
< 4,5 AU/ml	Negativen
4,5-5,5 AU/ml	Mejna vrednost
≥ 5,5 AU/ml	Pozitiven

### **Klinična interpretacija rezultatov, izmerjenih v vzorcih likvorja**

Negativen rezultat ugotavljanja protiteles IgM proti *B. burgdorferi* s.l. izključuje intratekalno sintezo le-teh. Kadar obstaja sum na nevroboreliozo, se kljub negativnemu rezultatu priporočajo še nadaljnje preiskave (76).

Pozitiven rezultat prisotnosti protiteles IgM proti *B. burgdorferi* s.l. kaže na njihovo intratekalno sintezo in potrjuje sum na nevroboreliozo. Pozitiven rezultat v likvorju lahko dobimo pri bolnikih z zelo visokimi serumskimi koncentracijami protiteles proti *B. burgdorferi* s.l., kot tudi pri tistih bolnikih s pozitivnim serumskim razultatom za protitelesa IgM , v povezavi z visokimi koncentracijami albuminov v likvorju. Kasnejša odkritja so nakazala tudi obstoj poškodobe krvno-možganske pregrade (76).

Negativen rezultat prisotnosti protiteles IgG proti *B. burgdorferi* s.l. izključuje njihovo intratekalno sintezo. V primeru suma na nevroboreliozo, se kljub temu priporočajo nadaljnje preiskave (77).

Pozitiven rezultat določanja protiteles IgG proti *B. burgdorferi* s.l. kaže na njihovo intratekalno sintezo in potrjuje sum na nevroboreliozo. Pozitiven rezultat v likvorju lahko dobimo pri bolnikih z zelo visokimi serumskimi koncentracijami protiteles proti *B. burgdorferi* s.l., kot tudi pri tistih bolnikih s pozitivnim serumskim razultatom za

protitelesa IgG, v povezavi z visokimi koncentracijami albuminov v likvorju. Tudi v tem primeru kasnejša odkritja nakazujejo na poškodovano krvno-možgansko pregrado (77).

### **3.4.3. Ponovitev testiranja**

Ponovitve analiz smo izvedli pri tistih vzorcih bolnikov, pri katerih smo ob uporabi obeh metod dobili različne vrednosti za specifična protitelesa IgM ali IgG proti *B. burgdorferi* s. l.. Analize smo ponavljali toliko časa, dokler se nismo prepričali v dejanski rezultat, določen z vsako od uporabljenih metod.

## **3.5. Statistična analiza**

Rezultate, pridobljene z uporabljenima metodama ELFA in CLIA, smo statistično vrednotili za primerjavo razlik med testoma. V ta namen smo uporabili test Hi-kvadrat, ki je namenjen ugotavljanju povezanosti (odvisnosti) dveh statističnih opisnih spremenljivk v populaciji. Pri tem smo rezultate z mejnimi vrednostmi uvrstili med pozitivne. Rezultate smo statistično ovrednotili s pomočjo programa SPSS (IBM SPSS Statistics 22.0). Kot statistično značilno smo upoštevali vrednosti pri  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

Določali smo prisotnost specifičnih protiteles IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l. v serumskih in likvorskih vzorcih bolnikov. Testiranje smo izvajali z dvema serološkima testoma, in sicer z encimsko-imunofluorescenčnim in imuno-kemiluminiscenčnim testom. Analizirali smo 50 serumskih in 50 likvorskih vzorcev istih preiskovancev, s sumom na lymsko nevroboreliozo.

Pri analizi specifičnih protiteles IgG proti *B. burgdorferi* s. l. v likvorskih vzorcih z encimsko-imunofluorescenčno metodo, na aparatu mini Vidas, proizvajalec za vrednotenje dobljenih rezultatov navaja preračun vrednosti s pomočjo Tibblingove metode. Ker vrednosti albuminskih titrov za preiskovanje likvorskih vzorcev nismo uspeli pridobiti, smo jih ovrednotili skladno s proizvajalčevimi vrednostmi, navedenimi za specifična protitelesa IgG proti *B. burgdorferi* s. l. v serumskih vzorcih.

Določanja prisotnosti specifičnih protiteles IgM proti *B. burgdorferi* s. l. v likvorskih vzorcih z encimsko-imunofluorescenčno metodo, na aparatu miniVidas, proizvajalec ne navaja kot uporabno možnost. Kljub temu smo se odločili analizirati vseh 50 likvorskih vzorcev po protokolu, ki velja za določanje specifičnih protiteles IgM proti *B. burgdorferi* s. l. v serumskih vzorcih. Rezultati, ki smo jih na ta način dobili, so bili v vseh 50 likvorskih vzorcih negativni.

### 4.1. Rezultati analiziranih vzorcev pri uporabljenih metodah

Z metodama ELFA in CLIA smo določali protitelesa v vzorcih krvi in likvorja 50 bolnikov.

#### 4.1.1. Rezultati določeni z uporabljenima metodama v serumskih vzorcih

V serumskih vzorcih smo določali specifična protitelesa IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l.. Pri določanju protiteles IgM z metodo ELFA smo dobili pozitiven rezultat pri 18/50 (36%), z metodo CLIA pa pri 23/50 (46%) vzorcev. Pri določanju protiteles IgG z metodo ELFA smo zaznali pozitiven rezultat pri 29/50 (58%), z metodo CLIA pa 31/50 (62%) vzorcev. Rezultati, ki smo jih za preiskovane analite v serumskih vzorcih izmerili s posamezno metodo, prikazujeta Razpredelnici XI in XII.

Razpredelnica XI: Rezultati serološkega testiranja bolnikov na prisotnost protiteles IgM in IgG proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato z encimsko-imunofluorescenčnim testom

Spec. pt Rezultat	IgM		IgG	
	Število	Delež (%)	Število	Delež (%)
Pozitiven	18	36	29	58
Mejni	4	8	0	0,0
Negativen	28	56	21	42
Skupaj	50	100	50	100

Razpredelnica XII: Rezultati serološkega testiranja bolnikov na protitelesa IgM in IgG proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato pri imuno-kemiluminiscenčnem testu

Spec. pt Rezultat	IgM		IgG	
	Število	Delež (%)	Število	Delež (%)
Pozitiven	23	46	31	62
Mejni	1	2	6	12
Negativen	26	52	13	26
Skupaj	50	100	50	100

#### 4.1.2. Rezultati določeni z uporabljenima metodama v vzorcih likvorja

V likvorskih vzorcih bolnikov smo določali specifična protitelesa IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l.. Pri določanju protiteles IgM z metodo CLIA smo dobili pozitiven rezultat pri 7/50 (14%) vzorcev, z metodo ELFA pa prisotnosti protiteles IgM ne moremo ugotavljati. Pri določanju protiteles IgG z metodama ELFA in CLIA smo v obeh primerih dobili pozitivne rezultate pri 10/50 (20%) vzorcev. Rezultate testiranj izbranih analitov v likvorskih vzorcih s posamezno metodo, prikazujeta Razpredelnici XIII in XIV.

Razpredelnica XIII: Rezultati testiranja likvorskih vzorcev bolnikov na prisotnost protiteles IgG proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato z encimsko-imunofluorescenčnim testom

Spec. pt Rezultat	IgG	
	Število	Delež (%)
Pozitiven	10	20
Mejni	0	0,0
Negativen	40	80
Skupaj	50	100

Razpredelnica XIV: Rezultati testiranja likvorskih vzorcev bolnikov na prisotnost protiteles IgM in IgG proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato z imuno-kemiluminiscenčnim testom

Spec. pt Rezultat	IgM		IgG	
	Število	Delež (%)	Število	Delež (%)
Pozitiven	7	14	10	20
Mejni	1	2	1	2
Negativen	42	84	39	78
Skupaj	50	100	50	100

#### **4.2. Primerjava rezultatov med uporabljenima metodama**

Razpredelnice XV - XVII prikazujejo rezultate, ki smo jih dobili pri določanju specifičnih protiteles IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l. z obema uporabljenima metodama.

Pri določanju protiteles IgM v serumskih vzorcih, smo z obema metodama določili 18/50 (36%) pozitivnih, 24/50 (48%) negativnih in 1/50 (2%) mejnih rezultatov (Razpredelnica XV). Podatki kažejo na 86% ujemanje rezultatov pri istih vzorcih med uporabljenima metodama.

Razpredelnica XV: Primerjava rezultatov določanja specifičnih protiteles IgM proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato, dobljenih z encimsko-imunofluorescenčnim in imuno-kemiluminiscenčnim testom v serumskih vzorcih

IgM v serumu		Rezultati testa ELFA			Skupaj
		Pozitiven	Mejni	Negativen	
Rezultati testa CLIA	Pozitiven	18	1	4	23
	Mejni	0	1	0	1
	Negativen	0	2	24	26
	Skupaj	18	4	28	50

Pri določanju protiteles IgG v serumskih vzorcih, smo z obema metodama določili 26/50 (52%) pozitivnih in 12/50 (24%) negativnih rezultatov (Razpredelnica XVI).

Podatki kažejo na 76% ujemanje rezultatov pri istih vzorcih med uporabljenima metodama.

Razpredelnica XVI: Primerjava rezultatov določanja specifičnih protiteles IgG proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato, dobljenih z encimsko-imunofluorescenčnim in imuno-kemiluminiscenčnim testom v serumskih vzorcih

IgG v serumu		Rezultati testa ELFA			Skupaj
		Pozitiven	Mejni	Negativen	
Rezultati testa CLIA	Pozitiven	26	0	5	31
	Mejni	2	0	4	6
	Negativen	1	0	12	13
	Skupaj	29	0	21	50

Pri določanju specifičnih protiteles IgM v likvorskih vzorcih smo z metodo CLIA določili 7 (14%) pozitivnih rezultatov, z metodo ELFA pa testiranje ni možno, zato primerjave metod ne moremo izvesti.

Pri določanju protiteles IgG v likvorskih vzorcih, smo z obema metodama določili 10 (20%) pozitivnih in 39/50 (78%) negativnih rezultatov (Razpredelnica XVII). Rezultate, ki smo jih dobili z metodo ELFA, smo ovrednotili skladno s shemo proizvajalca za serumske

vzorce, pri čemer smo detektirane vrednosti upoštevali kot absolutne. Podatki kažejo na 98 % ujemanje rezultatov pri istih vzorcih med uporabljenima metodama.

Razpredelnica XVII: Primerjava rezultatov specifičnih protiteles IgG proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato, dobljenih z encimsko-imunofluorescenčnim in imuno-kemiluminiscenčnim testom v likvorskih vzorcih

IgG v likvorju		Rezultati testa ELFA			Skupaj
		Pozitiven	Mejni	Negativen	
Rezultati testa CLIA	Pozitiven	10	0	0	10
	Mejni	0	0	1	1
	Negativen	0	0	39	39
	Skupaj	10	0	40	50

#### **4.3. Podrobna analiza rezultatov pri ponovitvah testov**

V naši raziskavi smo testiranje ponavljali tako s serumskimi kot likvorskimi vzorci, pri katerih se rezultata primerjalnih testov nista popolnoma ujemala. Preglednici XVIII in XIX prikazujeta rezultate ponovnega določanja specifičnih protiteles IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l. v serumskih in likvorskih vzorcih. Pri tistih vzorcih, pri katerih smo dobili različne rezultate z uporabljenima metodama, smo v Razpredelnicah XVIII in XIX z rdečo barvo poudarili končno izbrano interpretacijo rezultata. Iz Razpredelnic XVIII in XIX je razvidno, da se vrednosti pri ponovljenih testiranjih zelo malo razlikujejo, z izjemo likvorskega vzorca številka 4.

Razpredelnica XVIII: Rezultati ponovljenih testiranj 23 serumskih vzorcev s primerjalnima metodama, zaradi neujemanja po prvem testiranju.

Protokol	CLIA-IgM (AU/ml)	ELFA-IgM (indeks)	CLIA-IgG (AU/ml)	ELFA-IgG (indeks)	Protokol	CLIA-IgM (AU/ml)	ELFA-IgM (indeks)	CLIA-IgG (AU/ml)	ELFA-IgG (indeks)
1	25 poz 24,3 poz	0,29 ekv 0,22 ekv	29,6 poz	0,28 poz	16	9,9 neg 10,0 neg	0,22 ekv 0,22 ekv	207,4 poz	3,93 poz
2	95,8 poz 123,7 poz 98,6 poz	0,08 neg 0,08 neg 0,09 neg	198,5 poz	2,43 poz	17	370 poz	5,0 pos	11,6 ekv 10,4 ekv	0,04 neg 0,03 neg
3	14,7 neg	0,15 neg	22,7 poz 28,2 poz 19,6 poz	0,16 neg 0,16 neg 0,17 neg	19	37,1 poz 36 poz 24,8 poz	0,19 neg 0,17 neg 0,26 ekv	5417 poz	6,40 poz
4	17,7 neg <b>22,5 poz</b> <b>22,3 poz</b>	0,53 poz 0,47 poz	236,7 poz	3,16 poz	21	5,5 neg	0,12 neg	17,5 poz 21,9 poz 17,8 poz	0,11 neg 0,09 neg 0,09 neg
5	18,6 ekv <b>24,5 poz</b> <b>24,4 poz</b>	0,15 neg 0,16 neg	354,1 poz	2,69 poz	22	55,4 poz	0,70 poz	10,9 ekv 10,9 ekv	0,08 neg 0,08 neg
6	13,3 neg 15 neg	0,41 poz <b>0,30 ekv</b> <b>0,29 ekv</b>	236,7 poz	2,56 poz	23	3,8 neg	0,01 neg	24,5 poz 28,6 poz 21 poz	0,12 neg 0,10 neg 0,09 neg
8	17,8 neg	0,03 neg	30,9 poz 34,0 poz 29,2 poz	0,08 neg 0,07 neg 0,09 neg	25	14,1 neg	0,10 neg	<b>12,7 ekv</b> 15,5 poz <b>11,8 ekv</b>	0,44 poz 0,41 poz
9	4,7 neg	0,04 neg	10,6 ekv 11,8 ekv	0,03 neg 0,02 neg	26	42,7 poz	0,95 poz	18,6 poz 25 poz 20,7 poz	0,03 neg 0,03 neg 0,04 neg
10	2,0 neg	0,04 neg	11,8 ekv 13,5 ekv	1,46 poz 1,40 poz	27	13,7 neg	0,11 neg	<b>9,8 neg</b> 10,5 ekv <b>8,6 neg</b>	0,68 poz 0,59 poz
12	6,3 neg	0,23 ekv <b>0,18 neg</b> <b>0,17 neg</b>	184,9 poz	2,86 poz	28	34,4 poz	0,48 poz	<b>13,4 ekv</b> 17,9 poz <b>13,5 ekv</b>	0,08 neg 0,09 neg
13	11,4 neg <b>23,3 poz</b> <b>22 poz</b>	1,32 poz 1,35 poz	1197 poz	4,48 poz	29	236 poz 210 poz 181,2 poz 147,7 poz	0,05 neg 0,04 neg 0,03 neg	<5 neg	0,02 neg
14	20,4 ekv	0,34 poz <b>0,28 ekv</b> <b>0,28 ekv</b>	7,6 neg	0,03 neg					

Razpredelnica XIX: Rezultati ponovitev testiranj 2 likvorskih vzorcev s primerjanima metodama, zaradi neujemanja po prvem testiranju.

Protokol	CLIA-IgG (AU/ml)	ELFA-IgG (indeks)	Naša ocena indeksa (IgG)-ELFA	Protokol	CLIA-IgG (AU/ml)	ELFA-IgG (indeks)	Naša ocena indeksa (IgG)-ELFA
4	6,3 poz <b>0,2 neg</b> <b>0,2 neg</b>	0,02	neg	15	4,7 ekv 5,1 ekv	0,07 0,06	neg

Pri ponovitvah določanja specifičnih protiteles IgM proti *B. burgdorferi* s. l. v serumskih vzorcih smo z metodo CLIA dobili različen rezultat kot z metodo ELFA v 3/9 (33,33%) primerih.

Največjo razliko med meritvami protiteles IgM smo dobili z metodo CLIA pri vzorcih št. 5 (razpon 18,6-24,5 AU/ml) in št. 13 (razpon 11- 23,3 AU/ml), vendar pa se v obeh primerih vrednosti gibljejo okoli mejnih (18-22 AU/ml) (Razpredelnica XVIII).

Pri ponovitvah določanja specifičnih protiteles IgM proti *B. burgdorferi* s. l. v serumskih vzorcih smo z metodo ELFA dobili različne rezultate kot z metodo CLIA v 4/11 (36,36%) primerih. Tudi v tem primeru se vrednosti indeksa gibljejo okoli mejnih vrednosti (0,20-0,32) (Razpredelnica XVIII).

Pri ponovitvah določanja specifičnih protiteles IgG proti *B. burgdorferi* s. l. v serumskih vzorcih smo z metodo CLIA dobili različen rezultat kot z metodo ELFA v 3/12 (25%) primerih.

Pri ponovitvah določanja specifičnih protiteles IgG proti *B. burgdorferi* s. l. v serumskih vzorcih z metodo ELFA pa nismo dobili različnih rezultatov (Razpredelnica XVIII).

Pri ponovitvah določanja specifičnih protiteles IgG proti *B. burgdorferi* s. l. v likvorskih vzorcih smo le z metodo CLIA, pri določanju IgG določili različen rezultat v vzorcu št.4, razpon meritev pa je bila med 0,2-6,3 AU/ml (mejne vrednosti: 4,5-5,5 AU/ml) (Razpredelnica XIX).

#### **4.4. Analiza imunskega odziva glede na klinično sliko bolnika**

Pri analizi imunskega odziva bolnikov s sumom na nevroboreliozo, smo v njihovih serumskih vzorcih pogosteje dokazali specifična protitelesa razreda IgG kakor IgM, slaba polovica bolnikov pa je imela prisotna protitelesa obeh razredov. Rezultati so prikazani v Razpredelnica XX. Vidimo, da pri vseh bolnikih s sumom na nevroboreliozo nismo uspeli dokazati prisotnosti specifičnih protiteles proti *B. burgdorferi* s. l..

Razpredelnica XX: Rezultati testiranja 50 serumskih vzorcev bolnikov s sumom na nevroboreliozo, glede na vrsto specifičnih protiteles proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato in uporabljeno metodo testiranja.

SERUM	Pozitiven le IgM	Pozitiven le IgG	Pozitiven IgM in IgG	Skupaj pozitivih Št. (%)
ELFA	8	15	14	37 (74%)
CLIA	5	19	18	42 (84%)

Pri analizi imunskega odziva bolnikov s sumom na nevroboreliozo smo v likvorskih vzorcih dokazali specifična protitelesa IgM ali IgG, vendar v manj kot 30% vzorcev, odvisno od uporabljeni metode testiranja. Rezultati so zbrani v Razpredelnici XXI.

Razpredelnica XXI: Rezultati testiranja 50 likvorskih vzorcev bolnikov s sumom na nevroboreliozo, glede na vrsto specifičnih protiteles proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato in uporabljeno metodo testiranja.

LIKVOR	Pozitiven le IgM	Pozitiven le IgG	Pozitiven IgM in IgG	Skupaj pozitivih Št. (%)
ELFA	/	10	/	10 (20%)
CLIA	4	7	4	15 (30%)

Vsem bolnikom s sumom na nevroboreliozo nismo uspeli določiti specifičnih protiteles proti *B. burgdorferi* s. l.. Serološko negativnih po testiranju z obema uporabljenima metodama je bilo 7/50 (14%).

Pozitivne rezultate na specifična protitelesa proti *B. burgdorferi* s. l. v serumskih in likvorskih vzorcih smo z metodo ELFA zaznali pri 10/50 (20%), z metodo CLIA pa pri 14/50 (28%) bolnikih s sumom na nevroboreliozo (Razpredelnica XXII).

Bolniki s sumom na nevroboreliozo so imeli v 55% določena specifična protitelesa proti *B. burgdorferi* s. l. le v serumskih vzorcih, medtem ko v vzorcih likvorja preiskovancev nismo zaznali pozitivnega rezultata brez sočasnega pozitivnega rezultata serumskih vzorcev (Razpredelnica XXII).

Razpredelnica XXII: Rezultati testiranja 50 serumskih in 50 likvorskih vzorcev bolnikov s sumom na nevroboreliozo, glede na pozitiven rezultat analize in uporabljeno metodo testiranja.

	Pozitiven le serum (IgM ali/in IgG)	Pozitiven le likvor (IgM ali/in IgG)	Pozitivna serum in likvor (IgM ali/in IgG)
ELFA	27/50 (54%)	0/50 (0%)*	10/50 (20%)*
CLIA	28/50 (56%)	0/50 (0%)	14/50 (28%)

\* rezultati le za specifična protitelesa IgG

#### 4.5. Statistična obravnavava rezultatov

Statistično primerjavo rezultatov med uporabljenima testoma smo izvedli s pomočjo kontingenčne tabele 2X2. Za stopnjo tveganja smo izbrali vrednost  $\alpha = 0,05$ . Kot statistično značilno razliko smo upoštevali vrednosti pri  $p < 0,05$  ( $p < \alpha$ ).

##### 4.5.1. Statistična primerjava rezultatov določanja specifičnih protiteles IgM proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato v serumskih vzorcih

Pri določanju specifičnih protiteles IgM proti *B. burgdorferi* s. l. v serumskih vzorcih nismo dokazali statistično značilne razlike med uporabljenima testnima metodama ( $p = 0,6882$ ) (Razpredelnica XXIII).

Razpredelnica XXIII: Kontingenčna tabela za izračun statistične razlike med uporabljenima testnima metodama za določanje protiteles IgM v serumskih vzorcih.

IgM- serum	REZULTAT			$p=0,6882$
	Pozitiven	Negativen	Skupaj	
ELFA	22	28	50	
CLIA	24	26	50	
Skupaj	46	54	100	

#### **4.5.2. Statistična primerjava rezultatov določanja specifičnih protiteles IgG proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato v serumskih vzorcih**

Pri določanju specifičnih protiteles IgG proti *B. burgdorferi* s. l. v serumskih vzorcih nismo dokazali statistično značilne razlike med uporabljenima testnima metodama ( $p=0,0913$ ) (Razpredelnica XXIV).

Razpredelnica XXIV: Kontingenčna tabela za izračun statistične razlike med uporabljenima testnima metodama za določanje protiteles IgG v serumskih vzorcih.

IgG-serum	REZULTAT			
	Pozitiven	Negativen	Skupaj	
ELFA	29	21	50	
CLIA	37	13	50	
Skupaj	66	34	100	<b>p=0,0913</b>

#### **4.5.3. Statistična primerjava rezultatov določanja specifičnih protiteles IgG proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato v vzorcih likvorja**

Pri določanju specifičnih protiteles IgG proti *B. burgdorferi* s. l. v likvorskih vzorcih nismo dokazali statistično značilne razlike med uporabljenima testnima metodama ( $p=0,8065$ ) (Razpredelnica XXV).

Razpredelnica XXV: Kontingenčna tabela za izračun statistične razlike med uporabljenima testnima metodama za določanje protiteles IgG v likvorskih vzorcih.

IgG-likvor	REZULTAT			
	Pozitiven	Negativen	Skupaj	
ELFA	10	40	50	
CLIA	11	39	50	
Skupaj	21	79	100	<b>p=0,8065</b>

## 5. RAZPRAVA

Lymska borelioza je najpogosteša okužba na severni polobli, ki se prenese preko okuženega klopa na človeka. Slovenija je zanjo endemična, kar pomeni, da je bolezen stalno prisotna in značilna za to področje (33).

Lymska borelioza je okužba z bakterijo *B. burgdorferi* s. l. z značilno klinično sliko, to je potupoči eritem. Druge klinične slike niso značilne za to bolezen, kar daje še večji poudarek hitri, ustrezni in pravočasni mikrobiološki diagnostiki okužbe.

Diagnostika lymske borelioze poteka na osnovi različnih metod bodisi neposrednega določanja prisotnosti povzročitelja, kot sta osamitev borelij bodisi dokaz borelijske DNA z molekularnimi metodami ali pa s posrednimi metodami, med katerimi je tudi določanje specifičnih protiteles razreda IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l.. Serološke teste uvrščamo med najpogosteje uporabljane metode v diagnostiki te bolezni. V tem primeru je vzorec za diagnostiko serum oziroma kri preiskovanca, medtem ko za diagnosticiranje lymske nevroborelioze potrebujemo poleg krvi tudi vzorec likvorja. V naši raziskavi smo namenili pozornost dvema imunskima testoma, in sicer encimsko-imunofluorescenčnemu (ELFA) in imuno-kemiluminiscenčnemu (CLIA), ki omogočata rutinsko potrjevanje lymske nevroborelioze.

Proizvajalci seroloških testov izkoriščajo antigensko raznolikost *B. burgdorferi* s. l. tako, da uporabljajo različne kombinacije njihovih antigenov. Borelijski antigeni izzovejo močan imunski odziv po okužbi, ki se kaže v obliki tvorbe specifičnih protiteles razreda IgM v zgodnji in specifičnih protiteles razreda IgG v poznejši fazi okužbe. Izražanje borelijskih antigenov je odvisno od okolja, v katerem se spiroheta nahaja. Tako se pred hranjenjem klopa močno izražata antigena OspA in OspB, medtem ko se začne izražanje OspC ob hranjenju in se nadaljuje še po prehodu v sesalskega gostitelja (21). Antigen OspC velja za znak zgodnje okužbe z borelijami. Ko se začne njegovo izražanje zmanjševati, se začne izražati sekvenčno spremenljiva beljakovina VlsE, ki je nujna za vzdrževanje trajne okužbe sesalcev (23). V diagnostiki lymske borelize je uporaben tudi borelijski adhezin DbpA, ki sproži intenziven imunski odziv s protitelesi IgG v zgodnjem razširjenem in pozrem stadiju okužbe (75). Za dokaz specifičnih prititeles razreda IgM uporablja matoda ELFA antigena DbpA in OspC, ter metoda CLIA OspC in VlsE. Za dokaz specifičnih prititeles

razreda IgG pa uporablja metoda ELFA antigene VlsE, DbpA in OspC, ter CLIA antigen OspC (65, 77).

Heterogenost bakterije *B. burgdorferi* s. l. otežuje standardizacijo določanja specifičnih protiteles razredov IgM in IgG, kar se kaže v pogostenem neskladju rezultatov, dobljenih s posameznimi komercialnimi testi. Lažno pozitivne rezultate lahko dobimo v primeru navzkrižnih reakcij, ki so lahko posledica nenormalnih serumskih proteinov, povišanih globulinov gama, revmatoidnega faktorja, pozitivnih protijedrnih protiteles, sifilisa in drugih okužb s spirohetami ter pri okužbi z virusom Epstein- Barr (78). Proizvajalec testa ELFA, Biomerieux navaja, da so izvedli študijo, v kateri so testirali komplet reagentov za določanje protiteles IgM in IgG na prisotnost navzkrižno reagirajočih protiteles (65).

Deleži navzkrižno reagirajočih protiteles so se pri določanju protiteles IgM gibali med 0,0% in 5,88%, največjo navzkrižno reaktivnost pa so opazili v prisotnosti protiteles proti citomegalovirusu. Pri določanju protiteles IgG je bila navzkrižna reaktivnost med 0,0% in 8,33%, največjo pa so določili v prisotnosti protijedrnih protiteles (65). S tem proizvajalec Biomerieux zagotavlja specifičnost testa ELFA. Proizvajalec testa CLIA, Diasorin navaja, da prisotnost navzkrižno reagirajočih protiteles ne vpliva na potek testiranja protiteles IgM in IgG. Trdijo, da so obe različici testa vrednotili v prisotnosti imunoglobulinov, značilnih za različne okužbe, kot na primer z virusom Epstein-Barr, bakterijo *Treponema pallidum*, zajedavcem *Toxoplasma gondii*, ter skupaj s protijedrnimi protitelesi in revmatoidnim faktorjem (76,77). Zaradi vsega navedenega smo rezultate testiranj bolnikov smatrali kot specifične imunske odzive na borelijsko okužbo.

Z omenjenima serološkima testoma, ELFA in CLIA smo določali specifična protitelesa razredov IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l. v serumskih in likvorskih vzorcih bolnikov in rezultate primerjali med seboj. V ta namen smo testirali 50 serumskih in 50 likvorskih vzorcev istih preiskovancev s sumom na lymsko nevroboreliozo. Test ELFA zahteva za vrednotenje rezultatov preračun dobljenih vrednosti v ustrezeni indeks intratekalne sinteze specifičnih protiteles. Ker zahtevanih podatkov za izračun indeksa intratekalne tvorbe nismo mogli pridobiti, smo likvorske vrednosti testa Vidas IgG opredelili skladno s shemo za serumski vzorce. Metoda ELFA ni namenjena določanju protiteles IgM v likvorskih vzorcih.

Pri določanju specifičnih protiteles razreda IgM in IgG v serumskih, kakor tudi IgG v likvorskih vzorcih nismo ugotovili statistično značilnih razlik med testoma (Razpredelnice

XXIII, XXIV in XXV). Rezultati obeh testov so se ujemali pri istih serumskih vzorcih v 86% pri določanju IgM (Razpredelnica XV), v 76% pri določanju IgG v serumu (Razpredelnica XVI) in v 98% pri določanju IgG v istih likvorskih vzorcih (Razpredelnica XVII). Rezultatov določanja specifičnih protiteles razreda IgM proti *B. burgdorferi* s. l. v likvorskih vzorcih nismo mogli primerjati, saj metoda ELFA ne omogoča tovrstne analize.

Analize serumskih in likvorskih vzorcev, pri katerih se rezultati, določeni z uporabljenima metodama med seboj niso popolnoma ujemali, smo večkrat ponovili (Razpredelnici XVIII, XIX). Pri ponovitvah analiz v serumu smo dobili različne rezultate v 10 primerih, bodisi pri določanju protiteles IgM ali IgG bodisi pri metodi ELFA ali CLIA (Razpredelnica XVIII, poudarjeno z rdečo barvo). Vsi dobljeni rezultati so si bili zelo blizu in so se gibali okoli mejnih vrednosti za uporabljeni teste, kar bi lahko pomenilo, da je razlika znotraj standardnega odklona testa. Izstopa le ponovna analiza likvorja (Razpredelnica XIX, poudarjeno z rdečo barvo) pri določanju protiteles IgG z metodo CLIA, s katero smo dobili različen rezultat. Predpostavljamo, da je v tem primeru prišlo do človeške napake.

V raziskavo smo vključili bolnike s sumom na lymsko nevroboreliozo, pri katerih smo pričakovali imunski odziv na okužbo. Pri določanju specifičnih protiteles proti *B. burgdorferi* s. l. v serumskih vzorcih bolnikov smo določili 74% ELFA in 84% CLIA pozitivnih oseb (Razpredelnica XX), pri čemer so bila pogosteje prisotna protitelesa razreda IgG. V likvorskih vzorcih bolnikov s sumom na lymsko nevroboreliozo smo določili protitelesa v 20% z metodo ELFA in v 30% z metodo CLIA (Razpredelnica XXI). Tudi v tem primeru so prevladovala protitelesa razreda IgG. V tej skupini bolnikov je metoda CLIA pokazala večjo občutljivost.

Vsem bolnikom s sumom na nevroboreliozo pa nismo dokazali specifičnih protiteles proti *B. burgdorferi* s. l.. Ugotovili smo, da je imelo 14% bolnikov negativnen serološki rezultat. Dobrim 55% bolnikom s sumom na nevroboreliozo smo določili specifična protitelesa proti *B. burgdorferi* s. l. le v serumskih vzorcih (Razpredelnica XXII). Pozitiven serumski in likvorski vzorec istega bolnika smo dobili z metodo ELFA pri 10/50 (20%), z metodo CLIA pa pri 14/50 (28%) analiziranih preiskovancev (Razpredelnica XXII). Pri bolnikih s sumom na nevroboreliozo smo torej dokazovali imunski odziv na okužbo z borelijo, vendar ga v vseh primerih nismo uspeli dokazati. Razlog za negativne rezultate je

lahko tudi, da so bili likvorski vzorci odvzeti v zelo zgodnjem obdobju okužbe, ko še ni prišlo do imunskega odziva.

Pri praktični izvedbi testov se je kot hitrejši in s tem tudi primernejši za uporabo v rutinski diagnostiki izkazala metoda CLIA. Poleg tega ima ta test možnost sočasnega analiziranja večjega števila vzorcev, medtem ko lahko z metodo ELFA sočasno obravnavamo le 6 vzorcev. Prednost metode CLIA je tudi način vstavitve vzorca v aparat. V tem primeru ga vstavimo s pomočjo stojala, v katerem so zložene mikropruvete opremljene s kodiranimi podatki o bolnikih, medtem ko moramo pri metodi ELFA vsak vzorec posebej odpipetirati v ustrezni reagenčni vsebnik, to ločeno za analizo protiteles IgM in IgG, kar precej poveča možnost napake.

Pri metodi CLIA aparat s pomočjo čitalca odčita kodirane podatke o bolnikovem vzorcu z vstavljenimi mikropruvetami, pri metodi ELFA pa vnašamo kodirane podatke ročno, kar je seveda lahko vzrok za večji obseg predanalitičnih napak.

## 6. ZAKLJUČEK

V magistrski nalogi smo prišli do naslednjih zaključkov:

- Pri bolnikih s sumom na lymsko nevroboreliozo lahko v serumskih in likvorskih vzorcih dokažemo prisotnost specifičnih protiteles razredov IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l..
- Specifična protitelesa razredov IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l. lahko dokažemo s serološkima testoma ELFA, proizvajalca BioMerieux in CLIA, proizvajalca Diasorin.
- Pri primerjavi rezultatov, dobljenih s testoma ELFA in CLIA, nismo ugotovili statistično značilnih razlik določanja specifičnih protiteles razredov IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l. v serumskih vzorcih bolnikov.
- Pri primerjavi rezultatov, dobljenih s testoma ELFA in CLIA, nismo ugotovili statistično značilnih razlik določanja specifičnih protiteles razreda IgG proti *B. burgdorferi* s. l. v likvorskih vzorcih bolnikov.
- Pri testiranju bolnikov s sumom na lymsko nevroboreliozo smo pri določanju specifičnih protiteles razredov IgM in IgG proti *B. burgdorferi* s. l. v serumskih vzorcih bolnikov ugotovili večji delež pozitivnih rezultatov s testom CLIA.
- Vsi bolniki z nevroboreliozo niso bili serološko pozitivni.

## 7. LITERATURA

1. Baranton G, de Martino SJ: *Borrelia burgdorferi* sensu lato diversity and its influence on pathogenicity in humans. Curr. Probl. Dermatol. 2009; 37, 1–17.
2. Margos G, Vollmer SA, Cornet M et al.: A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. Appl. Environ. Microbiol. 2009; 75, 5410–5416.
3. Fingerle V, Schulte-Spechtel UC, Ruzic-Sabljic E et al.: Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. Int. J. Med. Microbiol. 2008; 298, 279–290.
4. Burgdorfer W: Lyme disease (borreliosis): A global perspective. AAMJ 1995; 4:227-33
5. Pfister HW, Rupprecht TA. Clinical aspects of neuroborreliosis and post-Lyme disease syndrome in adult patients. Int J Med Microbiol. 2006; 9:11–6.
6. <http://www.bergeys.org/>
7. Barbour A G, Hayes F S: Biology of *Borrelia* species. Microbiol Rev 1986; 50(4): 381-400.
8. Bergstroem S, Noppa L, Gylfe A, Oesterg Y: Molecular and cellular biology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, v Gray J, Kahl O, Lane R S, Stanek G: Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control, CAB International, Washington DC, 2002; 47-90.
9. [http://cronodon.com/BioTech/Bacteria\\_motility3/](http://cronodon.com/BioTech/Bacteria_motility3/)
10. Barbour AG. Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. J. Clin. Microbiol. 1988; 26:475–478.
11. Casjens S, DeLange M, Ley HL III, Rosa P, Huang WM. Linear chromosomes of Lyme disease agent spirochetes: genetic diversity and conservation of gene order. J. Bacteriol. 1995; 177:2769–2780.
12. Casjens S, Palmer N, vanVugt R, Huang WM, Stevenson B, Rosa P, Lathigra R, Suttn G, Peterson J, Dodson RJ, Haft D, Hickey E, Gwinn M, White O, Fraser C. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. Mol. Microbiol. 2000; 35:490–516.

13. Barbour AG, Carter CJ, Bundoc V, Hinnebusch J. The nucleotide sequence of a linear plasmid of *Borrelia burgdorferi* reveals similarities to those of circular plasmids of other prokaryotes. *J. Bacteriol.* 1996; 178:6635–6639.
14. Fraser CM, Casjens S, Huang WM, et al. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*. 1997; 390:580–586.
15. Labandeira-Rey, M., and J. T. Skare. Decreased infectivity in *Borrelia burgdorferi* strain B31 is associated with loss of linear plasmid 25 or 28-1. *Infect. Immun.* 2001; 69:446-455.
16. Greenberg EP, Canale-Parola E. Motility of flagellated bacteria in viscous environments. *J Bacteriol.* 1977;132(1):356–358.
17. Xu Y, Johnson R.C. Analisis and comparyson of plasmid profiles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995; 33,10:2679-2685.
18. Kurtenbach K, Schlafer S.M., de Michelins S, Etti S, Sewell H-S. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the vertebrate host V: Lyme borreliosis: Biology, epidemiology and control. Gray J, Kahl O, Lane R.S., Stanek G. (eds.). Willingford, CABI Pub. 2002; 117- 148.
19. Fuchs H, Wallich R, Simon M.M, Kramer M.D. The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994; 91: 12594-12598.
20. <http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/>
21. Schwan TG, Piesman J, Golde WT, et al. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92:2909–2913.
22. Fingerle V, Rauser S, Hammer B, Kahl O, Heimerl C, Schulte- Spechtel U, Gern L, Wilske B. Dynamics of dissemination and outer surface protein expression of different European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains in artificially infected *Ixodes ricinus* nymphs. *Jurnal of Clinical Microbiology*. 2002; 40, 4: 1456- 1463.
23. Crother TR, Champion CI, Whitelegge JP, et al. Temporal analysis of the antigenic composition of *Borrelia burgdorferi* during infection in rabbit skin. *Infect Immun.* 2004; 72(9):5063–5072.
24. Guo BP, Brown EL, Dorward DW, et al. Decorin-binding adhesins from *Borrelia burgderferi*. *Mol Microbiol*. 1998; 30(4):711–723.

25. Probert WS, Johnson BJ. Identification of a 47 kDa fibronectin-binding protein expressed by *Borrelia burgdorferi* isolate B31. Mol Microbiol. 1998; 30(5):1003–1015.
26. Parveen N, Cornell K, Bono J, et al. Bgp, a secreted GAG-binding protein of *Borrelia burgdorferi* strain N40, displays nucleosidase activity and is not essential for infection of immunodeficient mice. Infect Immun. 2006; 74(5):3016–3020.
27. Fraser, CM et al . Genomic Sequence of a Lyme Disease Spirochaete, *Borrelia Burgdorferi*. Nature. 1997; 580-86.
28. Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F:Lyme borreliosis. The Lancet. 2012; 379(9814): 461-73.
29. Swanson SJ, Neitzel D, Reed KD, Belongia EA. Coinfections Acquired from *Ixodes* Ticks. Clin. Microbiol. Rev. October 2006; vol. 19 no. 4 708-727
30. <http://www.mainelyticks.com/familysafety-lifecycle.html>
31. <http://www.bioteh.si/catalog/datoteke/klopi>
32. Barbour AG. 1998. Fall and rise of Lyme disease and other *Ixodes* tick- borne infections in North America and Europe. British Medical Bulletin; 54:647- 658.
33. Marolt-Gomišček, Radšel-Medvešček; Infekcijske bolezni, 2002. Ljubljana: Tangram, str. 313-317.
34. Radolf JD, Caimanol MJ, Stevenson B, Hu LT. Of ticks, mice and men: understanding the dual-host life cycle of lyme disease spirochetes. *Nature*. 2012; 10, 87-99.
35. Auwaerter PG, Aucott J, Dumler JS. "Lyme borreliosis (Lyme disease): molecular and cellular pathobiology and prospects for prevention, diagnosis and treatment". *Expert Rev Mol Med* 2004; 6(2): 1–22.
36. 1.[http://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/mpb/modules/ph/ph709\\_lymedisease/PH709\\_LymeDisease](http://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/mpb/modules/ph/ph709_lymedisease/PH709_LymeDisease)  
2. [http://what-when-how.com/wp-content/uploads/2012/04/tmpE80\\_thumb22.jpg](http://what-when-how.com/wp-content/uploads/2012/04/tmpE80_thumb22.jpg)  
3. <http://www.dermis.net/dermisroot/en/35143/image.html>
37. Oschmann P, Dorndorf W, Hornig C, Schafer C, Wellensiek HJ, Pflughaupt KW. Stages and syndromes of neuroborreliosis. J Neurol 1998; 245: 262–272.
38. Hansen K, Lebech AM. The clinical and epidemiological profile of Lyme neuroborreliosis in Denmark 1985–1990. A prospective study of 187 patients with *Borrelia burgdorferi* specific intrathecal antibody production. Brain 1992; 115(Pt 2): 399–423.

39. Kohlhepp W, Oschmann P, Mertens HG. Treatment of Lyme borreliosis. Randomized comparison of doxycycline and penicillin G. *J Neurol* 1989; 236: 464- 469.
40. Logigian EL, Kaplan RF, Steere AC. Chronic neurologic manifestations of Lyme disease. *N Engl J Med* 1990; 323:1438–1444.
41. Pfister HW, Rupprecht TA. Clinical aspects of neuroborreliosis and post-Lyme disease syndrome in adult patients. *Int J Med Microbiol* 2006; 296(Suppl 40): 11–16.
42. Kindstrand E, Nilsson BY, Hovmark A, Pirskanen R, Asbrink E. Peripheral neuropathy in acrodermatitis chronica atrophicans – a late Borrelia manifestation. *Acta Neurol Scand* 1997; 95: 338–345.
43. Morrison TB, Weis JH, Weis JJ: *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A (OspA) activates and primes human neutrophils. *J. Immunol.* 1997; 158, 4838–4845.
44. Häupl T, Landgraf S, Netusil P et al.: Activation of monocytes by three OspA vaccine candidates: lipoprotein OspA is a potent stimulator of monokines. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1997; 19, 15–23.
45. Anguita J, Ramamoorthi N, Hovius JW et al.: Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4+ T cell activation. *Immunity*. 2002; 16, 849–859.
46. Singh SK, Girschick HJ: Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Lancet Infect. Dis.* 2004; 4, 575–583.
47. Giambartolomei GH, Dennis VA, Philipp MT: *Borrelia burgdorferi* stimulates the production of interleukin-10 in peripheral blood mononuclear cells from uninfected humans and rhesus monkeys. *Infect. Immun.* 1998; 66, 2691–2697.
48. Rupprecht TA, Koedel U, Fingerle V, Pfister HW: The Pathogenesis of Lyme Neuroborreliosis: From Infection to Inflammation. *Mol Med.* 2008 Mar-Apr; 14(3-4): 205–212.
49. Hirschfeld M, Kirschning CJ, Schwandner R et al.: Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by Toll-like receptor 2. *J. Immunol.* 1999; 163, 2382–2386.
50. Guerau-de-Arellano M, Huber BT: Chemokines and Toll-like receptors in Lyme disease pathogenesis. *Trends Mol. Med.* 2005; 11, 114–120.
51. Rupprecht TA, Plate A, Adam M et al.: The chemokine CXCL13 is a key regulator of B cell recruitment to the cerebrospinal fluid in acute Lyme neuroborreliosis. *J. Neuroinflammation*. 2009; 6, 42.

52. Rupprecht TA, Pfister HW, Angele B, Kastenbauer S, Wilske B, Koedel U: The chemokine CXCL13 (BLC): a putative diagnostic marker for neuroborreliosis. *Neurology*. 2005; 65, 448–450.
53. Ramesh G, Borda JT, Gill A et al.: Possible role of glial cells in the onset and progression of Lyme neuroborreliosis. *J. Neuroinflammation*. 2009; 6, 23.
54. Rupprecht TA, Fingerle V. Neuroborreliosis: pathogenesis, symptoms, diagnosis and treatment. Vol. 6, No. 2, Pages 273-289.
55. Marcus LC, Steere AC, Duray PH, Anderson AE, Mahoney EB. Fatal pancarditis in a patient with coexistent Lyme disease and babesiosis. Demonstration of spirochetes in the myocardium. *Ann Intern Med* 1985; 103:374–376.
56. Reimers CD, de KJ, Neubert U, et al. *Borrelia burgdorferi* myositis: report of eight patients. *J Neurol* 1993; 240:278–283.
57. Aberer E, Duray PH. Morphology of *Borrelia burgdorferi*: structural patterns of cultured borreliae in relation to staining methods. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 764–772.
58. Arnez M, Ruzic-Sabljic E, Ahcan J, Radsel-Medvescek A, Pleterski-Rigler D, Strle F. Isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from blood of children with solitary erythema migrans. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20: 251–255.
59. Barbour AG. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med* 1984; 57: 521–525.
60. Preac MV, Wilske B, Schierz G, Pfister HW, Einhaupl K. Repeated isolation of spirochetes from the cerebrospinal fluid of a patient with meningoradiculitis Bannwarth. *Eur J Clin Microbiol* 1984; 3: 564–565.
61. Zore A, Ruzic-Sabljic E, Maraspin V, et al. Sensitivity of culture and polymerase chain reaction for the etiologic diagnosis of erythema migrans. *Wien Klin Wochenschr* 2002; 114: 606–609.
62. Ruzic-Sabljic E: Borelije, Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Medicinski razgledi, Ljubljana, 2002:293-302.
63. Cerar T, Ogrinc K, Cimperman J, Lotric-Furlan S, Strle F, Ruzic-Sabljic E. Validation of cultivation and PCR methods for diagnosis of Lyme neuroborreliosis. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 3375–3379.
64. Mygland A, Ljøstad U, Fingerle V, Rupprecht T, Schmutzhard E, Steiner I: EFNS guidelines on the diagnosis and management of European Lyme neuroborreliosis. *European Journal of Neurology* 2010, 17: 8–16.
65. [https://www.mybiomerieux.com/en\\_AF/group/id-metera/techlib/-/technical\\_library/](https://www.mybiomerieux.com/en_AF/group/id-metera/techlib/-/technical_library/)

66. <http://www.piercenet.com/method/overview-elisa>
67. [http://www.ilmar.org.il/diasorin/LSN\\_XL\\_blood\\_donor\\_screening.pdf](http://www.ilmar.org.il/diasorin/LSN_XL_blood_donor_screening.pdf)
68. <http://medicalab.blogspot.com/2012/08/trilogy-of-luminescence-part-iii.html>
69. Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A. & Kuby, J. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: Immunology, Freeman WH, New York 5th ed. 2003; 148-150.
70. <http://www.labor-enders.de/423.html>
71. Strle F. Zdravljenje Lymske borelioze z antibiotiki. Med Razgl. 1995; 34: 501–509
72. <http://www.diasorin.com/>
73. 16éme conférence de Consensus en Thérapeutique Anti-Infectieuse – Borréliose de Lyme : démarches diagnostiques, thérapeutiques et préventives – Décembre 2006.
74. EUCALB. <http://meduni09.edis.at/eucalb/>: DIAGNOSIS: Serology: Diagnostic Guidelines.
75. CDC Recommendations Standardizations and Interpretation, CDC Conference 10/28/94.
76. Liaison® Borrelia IgM Quant (310020) EN- 200/007- 917, F – 07/ 2011.
77. Liaison® Borrelia IgG (310880) EN- 200/007- 881, J – 01/ 2012.
78. Tugwell P, Dennis DT, Weinstein A, Wells G, Shea B, Nichol G, Hayward R, Lightfoot R, Baker P, Steere AC. Guidelines for Laboratory Evaluation in the Diagnosis of Lyme Disease. *Ann Intern Med.* 1997; 127(12):1109-1123.