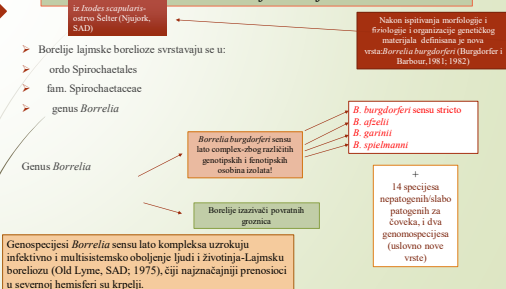


Biologija i ekologija krpelja na našim prostorima-Borrelia sensu lato kompleksa-Primena mikrobioloških metoda u dijagnostici Lajmske borelioze

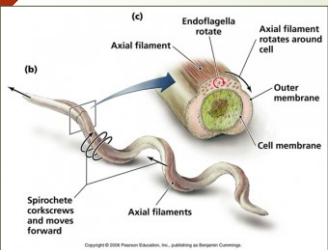
dr Verica Simin, naučni saradnik

Novi Sad, 2023. god.

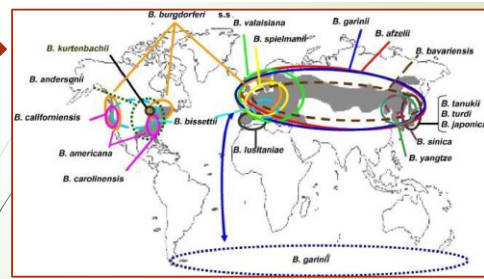
Taksonomija borelija



STRUKTURA BORELIJA




- Tanke, pokretljive, spiralne, Gram negativne bakterije, koje poseduju 7-10 endoflagela smeštenih u periplazmatičkom prostoru koji se nalazi između spoljašnje i citoplazmatičke membrane
- Dužina ćelija se kreće od 5-30 μm, širina od 0,2-0,5 μm, a broj spiralnih navoja varira od 3-10
- Spoljašnja membrana sadrži veću količinu proteina, a manje lipopolisaharida.
- Glikokaliks (sluzavi omotač) nekih sojeva zaštića od nepovoljnih uticaja spolj. sredine.
- Glikolipidni antigeni čine 50% svih membranskih lipida borelija.
- Takav sastav membrane obezbeđuje prilagodavanje i preživljavanje borelija u različitim sredinama i teško bojenje po Gramu.



Globalna distribucija borelija vrzšnika Lajmske borelioze. Sođam vrsta se nalazi u Severnoj Americi, osam vrsta u Evropi i osam vrsta u Aziji. (Margos i sar., 2011).

Glavni vektor?



B. burgdorferi sensu stricto


B. garinii

B. afzelii

B. spielmanii

B. valaisiana

B. lusitaniae



Geografska distribucija vrsta roda *Borrelia*, vektora Lajmske bolesti (Stanek i sar., 2012).

Sve patogene vrste su sposobne da izazovu EM kod čoveka


Diverzitet *B. burgdorferi sensu lato* kompleksa na tlu Evrope (centralne i istočne)

B. burgdorferi sensu stricto

- vektori:
 - *I. scapularis*
 - *I. pacificus*
 - *I. ricinus*
 - *I. trianguliceps*
 - *I. hexagonus*
- Rezervoari:
 - crvene veverice
 - ježevi

U zapadnim delovima Evrope povezana sa lajm artritisom, u Centralnoj Evropi (gde je dominantna *B. garinii*) kl. slika artritis je raznovrsnija

- Treća po učestalosti (iza *B. garinii* i *B. afzelii*)
- Predstavlja podvrstu američke *B. burgdorferi* s.s. sa genom usled lateralnog transfera od strane *B. garinii* i *B. afzelii*
- U Americi takva *B. burgdorferi* s.s. nije detektovana!



B. afzelii

- jako zastupljena u Istočnoj i Severnoj Evropi
- jedini vektor je *I. ricinus*
- rezervoari: miševi, voluharice, veverice, ježevi

Pokazuje tropizam prema koži – izaziva benignu limfadenozu kože kao i Acrodermatitis Chronica Atrophicans (ACA)



Linfadenozna koža

ACA

Američka *B. burgdorferi* s.s. nikad nije izolovana iz ACA.
Evropska se sporadično izoluje – dokaz lateralog transfera *B. afzelii* → *B. burgdorferi* s.s.

B. garinii

jako kompleksan specijes (2 subspecijesa – oba patogena za ljude, 6 serotipova).

u Evropi prisutan samo **subspecijes 20047**, gde je vektor *I. ricinus*, dok su rezervoari ptice.

Pokazuje tropizam prema nervnom tkivu – povezana sa simptomima meningitisa i zapaljenskim procesima perifernih nerava.

Retko izolovana iz zglobova, još ređe u slučajevima razvijanja ACA.

B. spielmanni

- najmanje patogena vrsta
- retko izolovana, do sada uočena u Holandiji, Češkoj, Francuskoj, Poljskoj i Rusiji
- vektor: *I. ricinus*
- rezervor: puh (*Elomys quercinus*)
- smatra se da izaziva samo EM

Specijesi slabo patogeni za čoveka

- *B. hiscettii* (smatralo se da je vezana samo za SAD; izolovana kod 9 pacijenata u Sloveniji sa EM, karakterizacija izolata je rađena u SAD i predmet je kontroverzi – smatra se tehničkom greškom)
- *B. valaisiana* (ima puno vektora i rezervoara, neke deli sa *B. garinii* 20047 subspeciesom – zabeleženi su retki primeri mešovityh infekcija, zastupljena: Češka, Nemačka, Francuska)
- *B. lusitanae* (heterogeno raspoređena, retko se uočava i to na Apeninskom poluostrvu, i u Portugaliji)

Nepatogene borelije sensu lato kompleksa su prisutne u Aziji i Severnoj Americi

Biologija vrste *Ixodes ricinus*

- > *I. ricinus* – rasprostranjen u oblastima umerene klime, od Portugalije do Rusije i Skandinavije, između 39° i 65° severne geografske širine.
- > U severnom delu Afrike (Tunis, Maroko i Alžir) nalazi se u oblastima sa hladnijom i vlažnijom mediteranskom klimom.
- > Može preživeti samo gde relativna vlažnost vazduha ne pada ispod 80% (duge suše mogu uticati na populaciju vrste *I. ricinus*).
- > Naseljava šumske ekosisteme, pašnjake, zapušteno obradive površine, travnjake i parkove u urbanim sredinama.
- > Globalne klimatske promene – iskorile posmanjanje areala rasprostranjenosti krpelja (pa i njihovih patogena) u staništa na višim nadmorskim visinama (za oko 500 m) i na nova geografska područja!
- > 90% života ovi ektoparaziti provode kao slobodni, a samo manji deo parazitiraju na domaćinu.

Ixodes spp. ticks



larva nymph male adult female

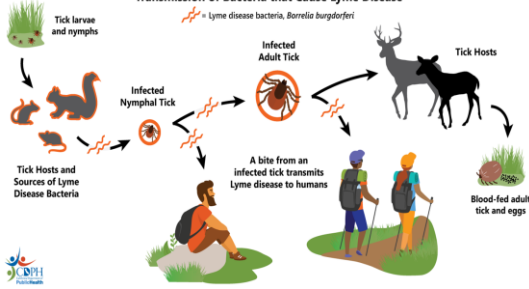
Pik aktivnosti proleće/zima (unimodalna) ili proleće i jesen (bimodalna).

Populacija najčešće opada sa povećanjem nadmorske visine (postoje izuzeci).

Svaki krvni obrok je praćen novim razvojem fazom, osim adultnih ženki koje nakon obroka polože 400 do 20.000 jaja u pukotine zemljišta i ugnu.

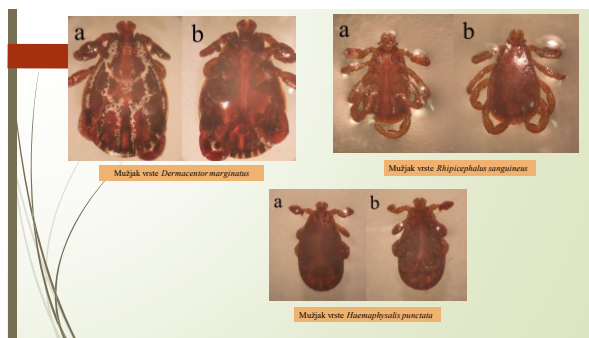
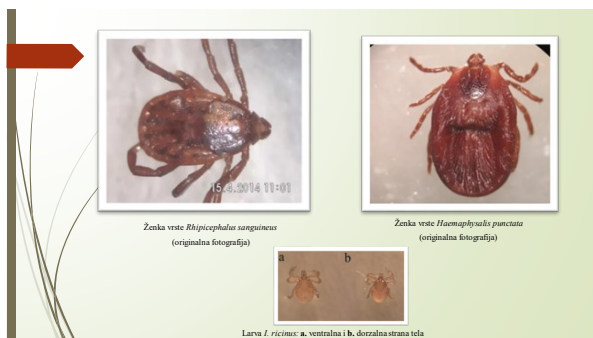
Prosečni period hranjenja:
Larva 2-4 dana -> (razvijanje u narednih nekoliko nedelja).
Nimfa 4-6 dana -> (razvijanje u narednih nekoliko nedelja).
Adultne ženke 6-10 dana -> (kopulacija, polaganje jaja, smrt).
Adultni mužjaci uzimaju jako male obroke krvi.

Transmission of Bacteria that Cause Lyme Disease



Originalne fotografije: *Ixodes ricinus*





ŽIVOTNI CIKLUS *B. burgdorferi* sensu lato

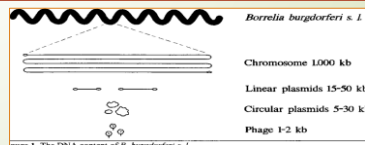
- ❑ Veoma složen i održava se i prenosi između krpelja kao kompetentnih vektora i kćionjaka kao rezervoara.
- ❑ Na različite uslove života (T i pH), koji vladaju u dva veoma različita domaćina (krpelji i kćionjaci rezervoar), borelije su se prilagodile različitim ekspresijom gena koji kodiraju sintezu lipoproteina spolj. odel. zida.
- ❑ U organizmu krpelja – telesna temperatura zavisi od telesne temp. u u spoljašnjoj sredini, pri čemu je pH vrednost srednjeg creva bazna.
- ❑ U organizmu sisara telesna temperatura se kreće od 37 °C do 39 °C, a pH je neutralan.
- ❑ Lipoproteini spoljašnjeg sloja ćeljskog zida (OspA i OspC) imaju važnu ulogu u transniziji i opstanku borelija u organizmu rezervoara i vektora.



- OspA lipoprotein spoljašnjeg zida borelija ostvaren se u srednjem crevu krpelja, nakon krmog obroka na zaraznom domaćinu omogućava bakterijama vezivanje za crevo krpelja, zaštita od digestivnih enzima i odbrambenih mehanizama krpelja.
- Borelije opstaju u crevu tokom prevođenja krpelja, do sledećeg krmog obroka, kojim se aktivira njihova replikacija.
- Umnožene borelije migriraju u pljuvačne žlezde putem hemolinfе, pri čemu se mora smanjiti ekspresija gena za OspA proteina i aktivira ekspresija gena za OspC proteina.
- OspC lipoprotein spoljašnjeg zida borelija obezbeđuje vezivanje bakterija za pljuvačne žlezde krpelja, infekcija i kolonizacija novog lica domaćina.
- Pa otkako ni ljudi, niti stoka, pakretljiviji bakterija se širi kroz dermis, izazivajući karakterističnu kožnu leziju (erythema migrans-EM).
- Najpre lokalizovan* infekcija se širi krvnim sistemom do svih delova tela i organski daje širok spektar nespecifičnih kliničkih manifestacija karakteristično za LB.

Veza genom-vektor-domaćina

- Genom *B. burgdorferi* s.l. koji je relativno mali (oko 1,5 mbp), sastoji se od 15-22 replikoma, odnosno iz jednog linearnog hromozoma i različitog broja cirkularnih (12) i linearnih plazmida (9).
- Plazmidi čine 40% genoma.
- Linearni hromozomi su relativno stabilni i klonski se razvijaju kroz genetski drift (slučajne promene učestalosti alela kroz generacije), dok većina replikoma – podlele duplikacijama i lateralnom transferi što dovodi do razvoja savimnih i pseudogena.
- Hromozomski geni kodiraju proteine odgovorne za strukturu, metaboličke funkcije, rast i razmnožavanje.
- Većina gena uključenih u kompatibilnost sa vektorom i rezervoarom su plazmidski. Smatra se da se tu nalaze i geni vezani za patogenost kod ljudi.

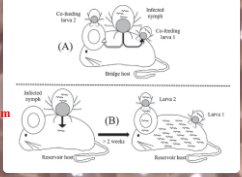


Životni ciklus *B. burgdorferi* sensu lato

Prosečna pozitivnost različitih razvijanih stadijuma *I. ricinus*-a na *B. burgdorferi* s.l. u Evropi:

- Larve 1,9%
- Nimfe 10,8%
- Adulti 17,4%

Transovarijalni prenos borelije od inficirane ženske opasnim potomcima je moguće, ali se smatra retkim fenomenom.



Originalna Fotografija: Jaja krpelja Ixodes ricinus

22. 5. 2014 12:13


Rezervoarima se trenutno smatraju nekoliko specijesa miševa (*Apodemus flavicollis*, *A. sylvaticus*, *A. agrarius*), voluharica (*Clethrionomys glareolus*), ječeva (*Ermacoccus europaeus*) pacova, veverica, pahova i ročevica, kao i fazani, crni kosovi i ptice selice.

PRIRODNI DOMACINI NE RAZVIJAJU SIMPTOME BOLESTI.

Jednom inficirani rezervoar dugo ostaje infektivan za krpelje. Na malim glodarima se često uočavaju larve i nimfe *I. ricinus*-a koje parazitiraju na njima.

69% ispitivanih veverica u Švajcarskoj je zaraženo borelijama.

Evropski jež, često prisutan u baštama, je takođe registrovan kao rezervoar.



Najznačajniji rezervoari *B. burgdorferi* sensu lato kompleksa:

<i>B. afzelii</i>	<i>Apodemus flavicollis</i> , <i>A. sylvaticus</i> , <i>A. agrarius</i> (miševi) <i>Clethrionomys glareolus</i> (voluharica) <i>Scirpus vulgaris</i> (crvena veverica) <i>Scirpus carolinensis</i> (siva veverica)
<i>B. garinii</i>	ptice selice, <i>Phasianus colchicus</i> (fazan), <i>Turdus merula</i> (crni kos)
<i>B. valaisiana</i>	<i>Phasianus colchicus</i> , <i>Turdus merula</i>
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	<i>Scirpus vulgaris</i> <i>Scirpus carolinensis</i>

Patogenost *B. burgdorferi*

Geni koji verovatno učestvuju u virulenciji

VhE- smatra se odgovornim za izbegavanje imunog odgovora usled antigenih varijacija

CRASP (Complement regulator protein surface factors) – vezuju se za faktor H sistema komplemenata domaćina i time inhibiraju taj segment imunog odgovora

Otkud selektivnost prema izboru rezervoara?

- Zavisí od toga da li borelije pokazuju osetljivost ili rezistenciju prema sistemu komplemenata jedinke!
- Različite borelije pokazuju različite obrasce osetljivosti i rezistencije.


Zoološki pregled krpelja

- Determinacija krpelja do nivoa vrste se vrši osamlu nakon pijenja krpelja u Laboratoriju za entomologiju Pastierovog zavoda Novi Sad, na osnovu morfoloških karakteristika po klijuži Estada Pena i sar. (2004) i Walker i sar. (2007).
- Krpelji se mikroskopski pregledaju u nativnom preparatu, pomoću binokularne lupu (ST-30-2LR, 20x-40x, Bino Stereo, Optika), uveličanja do 40 puta.
- Morfološki pregled podznamen: Pregled dorazbe i ventralne strane krpelja, izgled ventralne površine i položaj genitalne pore, posmatra se oblik krpelja i meri veličina tela, posmatra se izgled i veličina skulptura (značajno za utvrđivanje pola adultnih jedinki), grudi i veličina kapituluma i rostruma, položaj očnih štitova, prisustvo ili odsustvo broj fenestra i timosa.
- UTVRĐIVANJE VRSTE JE ZNAČAJNO ZA DIJAGNOSTIKU** - znamo koje patogene možemo da očekujemo u krpelju!
- Za utvrđivanje razvojnog stadijuma krpelja** (larva, nimfa, adult) značajan morfološki karakter je broj ekzimite.

ODREĐIVANJE PERIODA PARAZITIRANJA KRPELJA I LI PERIODA INFESTACIJE PACIJENTA:

- Period infestacije pacijenta od strane nimfe (drugi razvojni stadij) i adultnih jedinki (osimjak ili ženka) krpelja vrste *I. ricinus* određuje se izračunavanjem sklanog (SI) i lokalnog indeksa (CI).
- Kod larvi *I. ricinus* i ostalih vrsta krpelja iz familije Ixodidae period hranjenja jedinki na domaćinu se procenjuje na osnovu veličine i oblika krpelja.

Period parazitiranja krpelja na pacijentu duži od 24 h – Povećani rizik za transmisiju patogena sa krpelja na čoveka!



Patogeni prenosivi krpeljima

Ixodes ricinus:

Borrelia burgdorferi s.l., borelije povratnih groznica, TBEV-Tick Borne Encephalitis virus, riketsije: anaplasme, babezije, erlirije, *Francisella tularensis*

Haemaphysalis punctata:

Babesia major, *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, *Babesia microti*, *Theileria ovina*, TBEV, Ticks virus, Iliuzija virus, virus Krimsko-Kongo hemoragične groznice, *Babesia bovis*, *Theileria recondita* i *Francisella tularensis*.

Dermacentor marginatus i *D. reticulatus*:

Borrelia burgdorferi s.l., *Babesia canis* (babezija), *Anaplasma ovis*, *Theileria ovis*, *Rickettsia slovaca*, *R. conorii*, *R. sibirica* (severoistočni krpeljski tifus), TBEV (krpeljski meningoencefalitis), itd.

Rhipicephalus sanguineus:

Rickettsia conorii (Molteranska pegava groznica), *R. helvetica*, *R. felis*, babezija, itd.

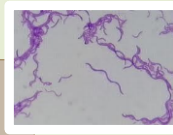


MIKROBIOLOŠKA DIJAGNOSTIKA LAJMSKE BORELIOZE

- ❖ Dijagnoza lajmske bolesti postavlja se na osnovu kliničke slike, epidemiološko-anamnestičkih podataka i rezultata laboratorijskih dijagnostičkih testova.
- ❖ Dakle, potrebna je za sve kliničke manifestacije bolesti, osim za kožnu leziju-erythema migrans (EM), koja je najčešća klinička manifestacija rane lajmske boreliozе.
- ❖ Postoje **direkne** i **indirekne** metode za dokazivanje lajma.

Direktno dokazivanje *Borrelia sensu lato*

- ❑ *Borrelia burgdorferi* se mogu posmatrati mikroskopski, bilo kao živi i neobojeni organizmi ili **nakon primene boje**.
- ❑ Zbog malog broja bakterija u uzorcima humanog porekla, posebno u krvi i cerebrospinalnoj tečnosti (CSF), **teško je primeniti direktnu mikroskopiju**.
- ❑ Centrifugiranjem uzoraka poboljšava se otkrivanje u mnogim slučajevima.



Borelije bojenje po Gramu

MIKROBIOLOŠKA DIJAGNOZA LAJMSKE BORELIOZE

➤ Mikroskopija u tamnom polju:

- Mikroskop u tamnom polju-poletna metoda u bakteriološkoj dijagnostici, pri velikoj koncentraciji *B. burgdorferi* u uzorku (npr. u suspenziji jetre ili bubrega zaražene životinje, ili u kulturi borelije).
- Kod krpelja-mikroskopija u tamnom polju crevnog sadržaja je **manje specifična** (veliki broj artefakata i fibroznih vlakana) i **osetljiva** (posebno ukoliko je manji broj spiroheta ili ako nisu žive).

➤ Za direktno dokazivanje uzročnika lajmske boreliozе, primenjuju se dva različita pristupa:

- Izolacija borelija i
- Dokazivanje DNK borelija

IZOLACIJA BORELIJA

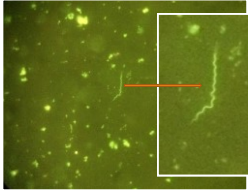
- Borelije se mogu izolovati iz različitog kliničkog materijala (koža, krv, CSF, sinovijalna tečnost) u toku rane kao i hronične faze lajmske boreliozе i kultivisati.
- Kultivacija *B. burgdorferi* na specifičnim – MKP (Modifikovana Kelly-Pettenkoferi), BSK (Barbour-Stonner-Kelly-jeva) - i BSK-H (kompletan medijum) podlogama je dugotrajna, traje 6-8 nedelja i veoma je zahtevna metoda (borelije su biološki neaktivne, sporotrajne bakterije, zahtevaju mikroaerofilne uslove, pH 7,6, i temperaturu od 30-34°C), a njena osetljivost iznosi 40-70% iz biopтата kođe, oko 10% iz likvora, a samo 1% iz krvi.
- Zahteva dobro opremljenu laboratoriju i dobro obučan kadar.
- Stoga ovaj postupak ima značaj pre svega za karakterizaciju izolata *B. burgdorferi* i određivanje njihove genotipske i fenotipske varijabilnosti što je izuzetno značajno sa epidemiološkog i ekološkog stanovišta, ali i za utvrđivanje puteva prenosa, razumevanje imunopatogeneze i unapređenje dijagnostike.



DOKAZIVANJE DNK BORELIJA

- ❖ DNK borelija se dokazuje pomoću reakcije lančane polimerizacije (engl. polymerase chain reaction, PCR).
- ❖ Metode molekularne genetike poput PCR se sve više koriste u dijagnostici **itako i tu postoje određene specifičnosti!**
- ❖ **Nemožnost potpune standardizacije** - vezano za **izolaciju DNK**, izbor odgovarajućih primera i izbora reakcije (otkilke u čistim aktivnimama- pfoe, gen 16S rDNA, gen za flagelin, gen za 23S rDNA, itd.; razlike u dizajnu same reakcije, veličina uzorka, nepostojanje interlaboratorijske harmonizabilnosti).
- ❖ **Niska osetljivost**, posebno sklonost se kao izvor: kosti; krv, serum ili plazma - u Evropi 1% kod odraslih i 9% kod dece, zbog kratkotrajne bakteriemije, svega oko 24-48 sati, - cerebrospinalna tečnost-likvor-23%.
- ❖ **70-80%** (bioplat kože-sa mesta uboda krpelja; zbog velikog broja spiroheta na granici obolnog i zdravog tkiva kod EM, kao i kod uzorka sinovijalne tečnosti obollog od lajmskog artritisa).
- ❖ **PCR se koristi i za detekciju *B. burgdorferi* u uzorcima krpelja**, mada prema preporuci ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) - Mora se oprezno klinički tumačiti, zbog opasnosti od lažne pozitivnosti!
- ❖ **PCR nije našao mesta u rutinskoj dijagnostici LB!**

DFA-direktna metoda fluorescencije: detekcija antigena *B. burgdorferi* pomoću poliklonskih antitela klase IgG



Originalna fotografija: *Borrelia* sp. iz krpelja skinutog sa kožne pacijenta (Simin, i sur., 2018.)

UPUTSTVO ZA DOKAZIVANJE *Borrelia burgdorferi* sensu lato U KRPELJIMA METODOM DIREKTNE IMUNOFLUORESCENCIJE

- Nakon mikroskopije u tamnom polju za preparate se obično potvrđuje stalo da li se u vidljivi srednji dio osuše, ili se odmah (bez mikroskopiranja u tamnom polju) uperi razmaz sadržaja srednjeg crieva iz jedne krpelja **Immunofluorescence**.
- Sadržaj srednjeg crieva krpelja se osuši na 37°C tokom 2 dana (Magagnoli, et al, 1991).
- Preparat se zatim fiksira u metanol acetona (na -20 °C) tokom 10 min, a zatim ponovo osuši.
- Nakon osušenja na preparat se nanosi konjugat (poliklonska antitela klase IgG) na *B. burgdorferi* sa koje je vezan FITC). Preparat se inkubira 30 min. na 37°C u vlažnoj kamori. Razmaz namočenja fotografira 1:50 do 1:500. Razblaženje 1:10 (0,1 ml conc. konjugata + 0,9 ml pufova PBS-puffer za TFA).
- Nakon inkubacije preparat se 2 puta ispira u snovu PBS-a pH vrednosti 7,2 u trajanju od po 10 minuta i jednom u destilovanoj vodi u trajanju od 10 sekundi.
- Nakon osušenja preparat je pripremljen za fluorescentnu mikroskopiju, namoženjem staklom za mikroskopiranje (mounting medium) i pokrivenom poklovcem.
- Mikroskopiranje se obavlja upotrebom fluorescentnog mikroskopa pri uveličanju 400x.

INDIREKTNE METODE ZA DOKAZIVANJE *Borrelia* sensu lato kompleksa

- Indirektna metoda za dokazivanje borelijske infekcije obuhvataju serološke testove pomoću kojih se dokazuju antitela specifična za borelije (IgM/IgG) u **serumu, likvoru ili sinovijalnoj tečnosti**.
- IgM antitela se javljaju nakon 2-3 nedelje, a nestaju nakon 4-6 meseci
- IgG antitela se javljaju nakon 6-8 nedelja, i dugo opstaju
- IgM i IgG antitela se određuju pomoću testova:
 - Indirektna imunofluorescencija (IFA)
 - Enzimski imunotestovi (ELISA)
 - Imunoblot testom (Western blot)
 - Testovima hemaglutinacije
- Nedostaci seroloških testova: 1) Nestandardizacija i 2) Razlike u specifičnosti i osetljivosti pojedinih testova.

→ Stvaranje specifičnih antitela zavisi od:

- od sposobnosti bolesnika da reaguje na infekciju,
- fenotipskih karakteristika borelije,
- njihove različite antigenske strukture (uslovljene genetičkom heterogenošću izolata),
- različite geografske rasprostranjenosti izolata.

→ U dijagnostici lajma kao **TREKUTNI STANDARD** se primenjuje **dvostepeni protokol**, koji podrazumeva izvođenje:

★ Prvostepeni-**Inicijalnog-skrining testa** (testi indirektna imunofluorescencija antigena-IFA ili imunoenzimski-ELISA test), i

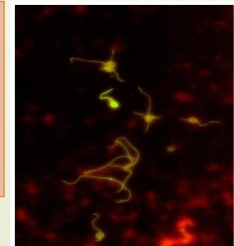
★ Drugostepeni-**Povrdnog Western blot (WB) testa** kojim se utvrđuje prisustvo antitela na pojedinačne antigenske frakcije *Borrelia burgdorferi* i koji se sprovodi ukoliko je rezultat skrining testa **graničan ili pozitivan**.

UPUTSTVO ZA DOKAZIVANJE ANTITELA (IgM i IgG) NA *Borrelia burgdorferi* sensu lato METODOM INDIREKTNE IMUNOFLUORESCENTNOG TESTA-IFT

- **IFT test** - kao antigen upotrebljava laboratorijski uzgojene borelije (kultura borelija) fiksirane na staklene pločice.
- Antitela iz uzorka (serum, likvor ili CST)-razređenog u odnosu 1:100 (IgM) i 1:100 i 1:320 (IgG), se vežu sa antigenom i formiraju primarni kompleks na koji se posle ispiranja vežu sekundarna antitela (antihumana IgM ili IgG antitela) koja su obeležena sa fluorescentnom bojom (FITC-om - Fluorescein-Isotiocyanate).
- FITC apsorbaje svetlost određene talasne dužine i emituje svetlost druge talasne dužine i na taj način su kompleks vidljivi pod fluorescentnim mikroskopom.
- Nedostatak testa je subjektivnost pri tumačenju rezultata.



Antigen *B. burgdorferi* (DFA), originalna fotografija



Originalna fotografija: Indirektni imunofluorescentni test na lajmsku bolest

ELISA TEST-Imunoenzimski test

- ❖ Najčešće korišćeni test za detekciju specifičnih IgM/IgG antitela.
- ❖ At na borelije se razvijaju u istom trendu kao i kod ostalih bakterijskih infekcija.
- ❖ Kao antigen mogu da se koriste:
 - ❑ **Cele lizirane ćelije borelija** (najčešće iz kulture);
 - ❑ **Veoma specifičan C6 peptid test - prečišćeni protein** - sastoji se od 26 A.K nevarijabilnog regiona VLsE proteina-(C6 Lyme ELISA), uveden 2001. god. za komercijalnu upotrebu (Immunicities);
 - ❑ **Rekombinantni antigeni (flagelin, p39, VLsE i drugi);**
 - VLsE - uveden 2007. god. u prvostepeni test kao antigen (Diasorin)



SENZITIVNOST ELISA TESTA

- Najčešće, **pacijenti kod kojih se tek pojavio migratorni eritem (EM) su SERONEGATIVNI**, jer nivo At još uvek nije detektabilan!
- **Nakon 1. nedelje bolesti - SENZITIVNOST prvostepene serologije je ODLICNA!**
- **Nakon 3m EM - 80-90%** pacijenata je **POZITIVNO** u ELISA testu!
- **Nakon stadijuma bolesti EM - Senzitivnost ELISA testa sa ćelijskim lizatom je 100%!**

PREDNOSTI I MANE ELISA TESTOVA NA B. burgdorferi s.l. KOMPLEKSA

Prednosti:

- ❑ Testovi zasnovani na C6 peptidu ili rekombinantnom VLsE proteinu eksprimisanom iz *B. garinii*, *B. afzelii* i *B. burgdorferi* s.l. imaju dodatnu vrednost, jer detekcija i evropske i azijske sojeve.
 - ❑ Testovi zasnovani na celim Ag lizati (liziati ćelija) uključuju više epitopa za dobijanje imunskog odgovora.
- MANE:**
- ➔ Unakrsno reagovanje sa homolognim epitopima drugih M.O. (*Helicobacter* sp.).
 - ➔ Unakrsno reagovanje i kod:
 - ANA (antimiskarna AT)
 - RF (reumatoidni faktor)
 - RA (ključni reumatoidni artritis)
 - MS (multiple skleroza)
 - ❑ ELISA test daje podatak o intenzitetu imunskog odgovora IgM/IgG
 - ❑ ELISA test je KVANTITATIVAN test i korelira sa titrom AT.



MANE:

- ➔ ELISA test može da da lažno pozitivan nalaz (i do 55% slučajeva) kod pacijenata sa drugim spirochetnim oboljenjima:
 - sifilis
 - leptospiroza
 - krpeljska povratna groznica
- ➔ Usled poliklonalne B-ćelijske aktivacije daje lažnu pozitivnost kod:
 - Epstein-Barr virusa
 - Malarije
 - *Treponema denticola*



Da li se onda sme izostaviti ELISA test kao prvostepena analiza?

Naravno da NE!

Samostalno korišćenje samo drugostepenog testa - Western Blota - SMANJUJE SPECIFIČNOST SEROLOŠKOG TESTIRANJA!

INTERPRETACIJA REZULTATA WB

- Interpretacija imunodijagnostičkih testova se sprovodi na osnovu odgovarajućih definisanih kriterijuma-**UPUTSTVA PROIZVOĐAČA!**
- Prilikom interpretacije imunodijagnostičkih testova treba uzeti u obzir:
 - fazu i dužinu trajanja bolesti,
 - osobine individualnog imunskog odgovora,
 - eventualno prisustvo drugih oboljenja,
 - kao i primenjeni antibiotski tretman.
- ➔ **VAŽNO:** Pogrešno očitavanje blede trake-čest razlog **LAŽNO POZITIVNOG REZULTATA!**
- ➔ **Cutoff kontrolna traka je marker očitavanja!**
- ➔ Rezultati IgM blotova su više podložni greškama (IgM At zbog pentamerne strukture su više "više lepljiva" od IgG At), u odnosu na IgG blotove!
- ➔ **VAŽNO:** Ako su tračice specifičnih proteina značajnih za interpretaciju kod IgM blota blede-rezultat nema značaja za Dg!
- ➔ Da bi se **IgM blot definisao kao pozitivan-dovoljne su samo 2 od 3 specifične tračice proteina**, a za **IgG je neophodno 5 od 10!**

- U ranoj fazi klinička slika lajm borelioze ne mora biti specifična za ovo oboljenje.
- Kod manjeg broja pacijenata i u kasnoj fazi borelioze humoralni imunski odgovor može izostati, a može biti i prekinut usled neodgovarajućeg antibiotičkog tretmana.
- Ako se imunski odgovor razvija relativno kasno, rezultati testova za određivanje antitela mogu biti negativni.
- Postoje bolesnici koji su slabiji reaktori i kod kojih se antitela ne mogu detektovati.
- Zato se uzorci serumu na titar antitela uzimaju parno-dvoji: parni uzorak treba uzeti u razmaku od 4-6 nedelja nakon prvog.
- Dve do četiri nedelje nakon infekcije koncentracija imunoglobulina IgM klase raste, dostižući najveću koncentraciju u šestoj nedelji, a njihov titar opada nakon 4-6 meseci.
- IgG antitela se javljaju 6 do 8 nedelja nakon infekcije i perzistiraju mnogo godina posle infekcije, pokazujući nizaak pad u titru koji se detektuje uz pomoć ELISA testa.
- Kod nekih bolesnika može se sresti postojanje samo IgM antitela u dužem periodu, pa ih je zato potrebno klinički pratiti.
- Za potvrdu dijagnoze trebalo bi dokazati prisustvo IgG antitela, jer samo prisustvo IgM antitela nije siguran pokazatelj reaktivne infekcije!

- ❑ Lažno pozitivni rezultati su povezani sa: skriningom bez potvrđnog testa; ukretnom reakcijom sa izazivačem sifilisa *Treponema pallidum*, *Ehrlichia* spp., *Helicobacter pylori*, EBV antigenima;
- ❑ Ukretna reakcija daje negativan IgM antitela i pozitiviranost na nekim antigenima borelije, koji se javljaju u velikom broju i kod drugih bolesti: hipergamaglobulinemijom, prisustvom autoimunskih i reumatskih oboljenja, hipotireozom.

- ✓ Za sada ne postoji efikasna vakcina protiv lajm borelioze!
- ✓ Radi se na razvijanju anti-biotičke vakcine koja bi praktično delovala prilikom samog uboda krpelja-*spr. VLI5-antigena determinanta proteina OspA!*



Zaključak

- ✓ Rad na unapređenju mikrobiološke dijagnostike lajm borelioze i utvrđivanju epidemioloških i ekoloških karakteristika, puteva prenosa, imunopatogeneze, prevencije i profilakse lajmske-borelioze, kao i ostalih krpeljima prenosivih bolesti predstavlja jedan **kompleksan i permanentan zadatak koji se mora sprovoditi multidisciplinarno i timski!**

HVALA NA PAŽNJI!