

**VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO  
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS IR  
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA**

**MAGISTRO DARBAS**

**SEROLOGINIŲ SIFILIO IR LAIMO BORELIOZĖS REAKCIJŲ  
KRYŽMINIS REAKTYVUMAS**

Magistrantė TATJANA SUBOČIŪTĖ

\_\_\_\_\_ (parašas)

Mokslinis vadovas

med. m. dr. A. Vagoras

\_\_\_\_\_ (parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos ir

Laboratorinės medicinos katedros vedėja

hab. dr., prof. Z. Kučinskienė

leidžiama ginti

\_\_\_\_\_ (parašas)

Darbo įteikimo data \_\_\_\_\_

Registracijos Nr. \_\_\_\_\_

## TURINYS

IVADAS.....	4
1. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	4
2. LITERATŪROS APŽVALGA.....	5
2.1. Trumpa sifilio kilmės ir plitimo istorija.....	5
2.2. Sifilio epidemiologija .....	6
2.3. Sifilio sukėlėjas.....	6
2.4. Sifilio infekcijos šaltiniai ir užsikrėtimo būdai.....	7
2.5. Sifilio inkubacinis laikotarpis.....	7
2.6. Sifilio patologija.....	8
2.7. Sifilio klasifikacija.....	8
2.8. Sifilio diagnostika.....	9
2.8.1. Laboratorinė serologinė sifilio diagnostika.....	9
2.9. Trumpa Laimo ligos istorija.....	10
2.10. Laimo ligos epidemiologija.....	11
2.11. Laimo ligos sukėlėjas.....	11
2.12. Laimo ligos infekcijos šaltiniai ir užsikrėtimo būdai.....	12
2.13. Laimo ligos inkubacinis laikotarpis.....	12
2.14. Laimo ligos patologija.....	13
2.15. Klinikinė Laimo ligos klasifikacija.....	14
2.16. Laimo ligos diagnostika.....	14
3. EKSPERIMENTINĖ DALIS.....	15
3.1. Tyrimo medžiaga.....	15
3.2. Tyrimo metodai.....	17
3.2.1. Greitoji plazmos reaginių reakcija.....	17
3.2.2. <i>Treponema pallidum</i> hemoaglutinacijos reakcija.....	19
3.2.3. <i>Treponema pallidum</i> imunofluorescencijos reakcija.....	21
3.2.4. <i>Borrelia burgdoferi</i> imunofluorescencijos reakcija.....	22
3.2.5. <i>Treponema pallidum</i> imunofermentinė analizė.....	24
4. TYRIMO REZULTATAI.....	30
4.1. Tyrimo rezultatų aptarimas.....	32
5. IŠVADOS.....	40
SUMMARY.....	41
LITERATŪRA.....	42

## SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS

Ag – antigenas

AIDS - įgyto imunodeficito sindromas (angl. *Acquired Immune Deficiency Syndrome*)

Ak – antikūnas

*Borrelia burgdoferi* IFR - *Borrelia burgdoferi* imunofluorescencijos reakcija

DNR – dezoksiribonukleininė rūgštis

ECM – lėtinė migruojanti eritema (angl. *erythema chronicum migrans*)

IFA - imunofermentinė analizė (angl. *ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)*, *EIA (Enzyme Immuno Assay)*)

IFR - *Treponema pallidum* imunofluorescencijos reakcija (angl. *FTA – ABS (Fluorescent Treponemal Antibody ABSorbition)*)

Ig – imunoglobulinas

Omp - išorinės membranos proteinai (angl. *Outer membrane proteins*)

OT – optinis tankis

PGR – polimerazės grandininė reakcija

RPR – greitoji plazmos reagentų reakcija (angl. *Rapid Plasma Reagin*)

TPHA - *Treponema pallidum* hemoaglutinacijos reakcija (angl. *Treponema Pallidum Haemagglutination Assay*)

ŽIV – žmogaus imunodeficito virusas

## ĮVADAS

**Nagrinėjamos problemos aktualumas:** sifilio ir Laimo ligos sukėlėjai *Treponema pallidum* ir *Borrelia burgdoferi* priklauso tai pačiai spirochetų šeimai. Šių infekcijų eiga žmogaus organizme yra lėtinė ir gali sukelti rimtus sveikatos pažeidimus. Abiejų ligų klinikinių simptomų spektras labai įvairus, o aktyvius ligos periodus gali keisti ilgai trunkantys besimptomiai arba labai mažai simptomiški ligos periodai. Serologinė abiejų šių infekcijų diagnostika yra labiausiai prieinama ir dažniausiai atliekama. Neretai klinikinę diagnozę bei gydymo paskyrimą lemia būtent serologinių laboratorinių tyrimų rezultatai.

Mokslinėje literatūroje nurodoma, kad sergančiųjų viena iš dviejų (sifiliu arba Laimo borelioze) ligų kraujo serologiniai žymenys gali sąlygoti klaidingai teigiamus serologinių testų rezultatus ir dėl kitos infekcijos. Kiekvienoje laboratorijoje įdiegtų tyrimo metodų ir pasirinktų reagentų naudojimas gali turėti įtakos klaidingam teigiamų rezultatų dėl kryžminio reaktyvumo dažnumui. Šio fenomeno žinojimas ir įvertinimas atskiroje laboratorijoje gali skatinti egzistuojančių rutininių tyrimų parinkimo korekciją ir padėti išvengti diagnostinių klaidų, pagerinti laboratorijos teikiamų paslaugų kokybę.

### 1. DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

**Darbo tikslas:** nustatyti VULSK diagnostikos centre rutiniškai naudojamų serologinių sifilio ir Laimo boreliozės testų galimai klaidingų teigiamų rezultatų dažnumą dėl kryžminio viena iš šių infekcijų užsikrėtusiųjų pacientų kraujo serumų reaktyvumo.

#### **Darbo uždaviniai:**

1. Ištirti sifiliu sergančiųjų ir/ar teigiamais sifilio serologinių testų rezultatais įvertintų pacientų kraujo serumus Laimo boreliozės serologinių žymenų testais.
2. Ištirti Laimo borelioze sergančių ir/ar teigiamai Laimo ligos įvertintų pacientų kraujo serumus sifilio serologinių žymenų testais.
3. Nustatyti galimų klaidingai teigiamų serologinių tyrimų variantus/kombinacijas ir jų dažnumą.

**Individualus darbo indėlis:** šio darbo metu darbo autorė pati atliko kraujo serumo tyrimą dėl sifilio infekcijos (RPR, TPHA, imunofluorescentinis tyrimo metodas, imunofermentinis testas) ir dėl Laimo ligos (imunofluorescentinis tyrimo metodas); vykdė mokslinės literatūros paiešką ir ją analizavo; sistemino ir kritiškai vertino mokslinėje ir kitoje spaudoje paskelbtą informaciją nagrinėjamu klausimu; analizavo empirinius, praktinius ir eksperimentinius duomenis; interpretavo tyrimo rezultatus ir apibendrino pagrįstomis išvadomis ir pasiūlymais.

## 2. LITERATŪROS APŽVALGA

### 2.1. Trumpa sifilio kilmės ir plitimo istorija

Žmonijos bandymus įvertinti šios kadaise baisios ligos atsiradimą, plitimą, mėginimą apsisaugoti galima suskirstyti į 4 periodus:

- 1) iki 1910 m. buvo bandyta pritaikyti serologinė sifilio diagnostika,
- 2) 1910-1943 m. m. buvo pritaikita sifilio serologinė diagnostika,
- 3) efektyvus gydymas,
- 4) po 1982 m. – AIDS grėsmės eroje.

*Sifilis iki 1910 metų.* Daugelis mano, kad šią infekciją 1493 m. į Europą atvežė Kolumbo jūrininkai iš ką tik atrastos Amerikos. Jūrininkai užsikrėtė nuo vietinių gyventojų, o pastarieji, lytiškai santykiaudami su naminiiais gyvūnais, užsikrėtė nuo lamų. Išsiskirstę šie jūrininkai išplatino infekciją po įvairius Ispanijos miestus. Iš čia liga plito į Prancūziją, Italiją ir kitas Europos šalis. Jau 1493 m. minėta „prancūzų liga“ (*morbus gallicus*) pasirodė jungtinėje Lietuvos ir Lenkijos valstybėje, o 1498 m. kalbama apie sifilio epidemiją Lietuvoje [25, 29].

Kai kurie mokslininkai mano, kad sifilis yra kilęs iš Afrikos ir kad endemiškų treponematozių (pinta, bedžel, frambezija) sukėlėjai esą atsiradę iš vienos treponemos. Ši pirminė treponema dėl skirtingų klimatinių ir buities sąlygų Afrikoje ir Europoje diferencijavosi į endemiškų treponematozių ir sifilio sukėlėjus [23].

Trečiosios teorijos šalininkai mano, kad sifilis nuo gilios senatvės buvęs ir Europoje, ir Azijoje, ir Afrikoje. Pasak jų, senovės mokslininkai ir gydytojai Hipokratas, Susruta, Galenas ir kiti mini opas, kondilomas, gumas, kurios gali būti sifilinės kilmės. Pastarąją teoriją remia ir kai kurie archeologiniai duomenys – būdingi sifiliui žmonių kaulų pakitimai, aptikti Europos kapavietėse, iki Amerikos atradimo [25].

1905 m. kovo 3 d. lietuvių kilmės protozoologas Fritz R. Schaudin (1871 – 1906) ir vokiečių dermatologas Erich Hoffman (1868- 1959) sėkmingai nudažė anilino dažais preparatus, kurie buvo paimti iš žmonių su pirminiu ir antriniu sifilio židiniiais ir pademonstravo Berlyno Charite klinikoje. 1906 m. Karl Landsteiner (1868 – 1943) ir Victor Mucha parodė *T. pallidum* gyvas regėjimo lauke po mikroskopu. Atradus sukėlėją, netrukus pasirodė ir serologinė sifilio diagnostika [12].

*Sifilis po 1910 metų.* Po 1910 m. pritaikyta serologinė diagnostika leido nustatyti daugumą slaptos eigos sifilio formų, apie kurias anksčiau nebuvo žinoma. Literatūros šaltiniai rodo, kad sifilio simptomatika labai pasikeitė, lyginant su pirmaisiais sifilio epidemijos dešimtmečiais lapinskait [23].

*AIDS grėsmės eroje.* Vakarų šalyse sergamumas šiek tiek ėmė kilti 9 – jo dešimtmečio antroje pusėje, tačiau jį sulaukė masiškas AIDS pasirodymas ir ŽIV infekcijos lytinio perdavimo

būdu įrodymas. Homoseksualistai pakeitė savo lytinę elgseną, dėl to mažėjo ir bendras sergamumas [4, 11, 40]. Tačiau sergamumo mažėjimas buvo trumpalaikis. Sumažėjus homoseksualistų epidemiologijai, nauja bėda tapo narkomanai. Dėl to staigiai ėmė daugėti ir igimto sifilio atvejų. Dėl tokios kritiškos padėties Amerikos Ligų kontrolės centras rekomendavo ištirti visas nėščias moteris dėl sifilio, o gimdymo metu imti kraują ne iš virkštelės, o iš motinos, kad būtų išvengta klaidingų laboratorinių atsakymų [3, 7, 13].

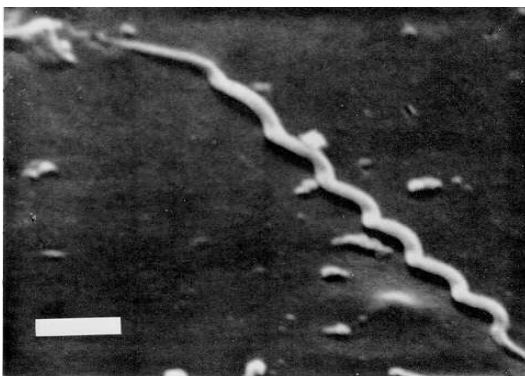
ŽIV infekcija rodo, kad sifilio eiga vėl gali įgyti pirmykštį pobūdį, kaip ir XVI amžiuje. Pradėjo ryškėti centrinės nervų sistemos pažeidimai nebe trečiojoje, o antrojoje ligos stadijoje. Sergant AIDS tretinis neurosifilis išsivysto per 3 ligos mėnesius. Dėl to šiems pacientams nustatytos penicilino dozės tapo neadekvačios [22].

## 2.2. Sifilio epidemiologija

Sifilis paplitęs visame pasaulyje, tačiau jis ypač dažnas besivystančiose šalyse. Daugiausia serga sifiliu 20-39 m. amžiaus žmonės, bet gali sirgti įvairaus amžiaus.

Sifilio sergamumo rodikliai Lietuvoje: 1992 m. – 286 žmonės, 1993 m. – 694, 1994 m. – 2182, 1995 m. – 3379, 1996 m. – 3761, 1997 m. – 3146, 1998 m. – 2326, 1999 m. – 1676, 2000 m. – 1171, 2001 m. – 881 žmogus [54].

## 2.3. Sifilio sukėlėjas



*Treponema pallidum* atrado ir aprašė 1905 m.

Schaudin ir Hoffman'o [45]. Tai spiralės pavidalo mikroorganizmas. Vingio ilgis – apie 1  $\mu\text{m}$ . Ji yra labai judri ir juda gana būdingai: trūkčioja pirmyn ir atgal, švytuoja, susitraukinėja, išsilenkia ir sukasi apie savo išilginę ašį.

Pagal taisyklingus vienodus vingius, plonumą ir sudėtingus taisyklingus judesius, ją galima atskirti nuo kitų spirochetų, kurios yra storesnės, jų vingiai netaisyklingi, nevienodi, o judesiai primityvūs [8, 25]. Ji gali būti aptinkama skystyje tiesiogiai mikroskopuojant natyvinį preparatą tamsiame regėjimo lauke, paimtame iš pirminio – antrinio sifilio metu matomų bėrimų, ypač šlapiuojančių (1 pav.). Blyškioji treponema gali persilenkti. Tiriant elektriniu mikroskopu nustatyta, kad blyškioji treponema padengta apvalkalu. *T. pallidum* dauginasi tik būdama aktyvioje būsenoje. Ji skyla pusiau sykį per 30 val. Ne organizme treponema greitai žūsta nuo karščio, išdžiūvimo, antiseptikų, muilo ir vandens, nors citruotame kraujyje prie  $-4^{\circ}\text{C}$  gali išsilaikyti gyvybinga iki 3 parų. Esant  $55 - 60^{\circ}$  temperatūrai, žūna per 15 min. Atsparesnė žemoms temperatūroms, lavono audiniuose išsilaiko gyva 2 – 3 paras.  $37^{\circ}$  temperatūra yra

optimali blyškiosioms treponemoms daugintis. 5% natrio hidrokarbonate žūna iškart, taip pat akimirksniu žūna 50 - 56° etilo alkoholyje [2, 13, 21, 43, 47].

#### 2.4. Sifilio infekcijos šaltiniai ir užsikrėtimo būdai

Blyškioji treponema į žmogaus organizmą patenka pro pažeistą odą ar gleivinę. Ypač sifilis užkrečiamas pirminio ir antrinio sifilio metu [15].

**Sifilis** pagal užsikrėtimo būdą skirstomas į:

\*įgytą, *syphilis acquisita* (užsikrečia vaikas arba suaugęs),

\*įgimtą, *syphilis congenita* (užkrečiamas vaisius gimdoje nuo sergančios nėščios motinos).

Dažniausiai sifiliu užsikrečiama lytinių santykių metu (apie 98-99%), kai serga vienas iš partnerių, nes tada užsikrėtusiojo lytinių organų srityje dažnai esti sifilio išbėrimų, kurių paviršiuje yra blyškiųjų treponemų. Treponemos pro neryškius įtrūkimus ir nedideles erozijas, atsiradusias lytinių santykių metu, patenka į sveiko žmogaus organizmą ir jį užkrečia.

Buitinis sifilio perdavimas (per buitinės apyvokos daiktus, cigaretes, lūpų pieštukus), kaip ir perpilant kraujo produktus, yra teoriškai įmanomas, bet praktiškai labai retas [49]. Didžiausia sukėlėjo perdavimo grėsmė yra pirminio, antrinio ir ankstyvojo slapto sifilio metu. Persirgus sifiliu, imunitetas nesusidaro. Retais atvejais imanomas ir kitoks nei lytinis sifilio perdavimas:

- ✓ bučiuojantis, jei ligoniui ant lūpų ir liežuvio yra sifilio išbėrimų;
- ✓ sergančiai sifiliu žindyvei maitinant kūdikį, ypač kai jos krūtų speneliai yra sutrūkinėję;
- ✓ medicinos darbuotojams tiriant arba operuojant sifiliu sergantį ligonį (nežinant, kad pacientas yra užkrėstas ir nesiimant apsaugos priemonių);
- ✓ retai – perpilant infekuoto žmogaus kraują [25, 41].

#### 2.5. Sifilio inkubacinis laikotarpis

Sifilio inkubacinis laikotarpis, t. y. laikas nuo užsikrėtimo momento iki pirmųjų ligos simptomų atsiradimo, dažniausiai trunka 3 savaites (21 dieną). Tačiau kartais jis sutrumpėja iki 10, net 8 dienų, o taip pat gali ir pailgėti iki 2 – 3 ir daugiau mėnesių (100 dienų). Inkubacinis laikotarpis gali pailgėti, jei ligonis tuo metu dėl kokių nors priežasčių (pvz., anginos, gonorėjos, furunkulų) yra vartojęs nedideles medikamentų dozes, kurios sifilio neišgydė, bet pakeitė jo eigą ir pailgino inkubacinį laikotarpį. Tokiems medikamentams priskiriami antibiotikai, pvz. trichomanozei gydyti vartojamas flagilis, trichopolis, metronidazolis, galintys prailginti sifilio inkubacinį laikotarpį. Treponema žmogaus organizme plinta ir dauginasi limfos sistemoje. Viena iš priežasčių, kodėl būtent limfos sistemoje dauginasi ir plinta treponema, yra tai, kad limfoje yra

mažai deguonies. Jau pirmomis dienomis po užsikrėtimo blyškioji treponema patenka ir į kraujo sistemą ir kraujo dėka išnešiojama į organus ir audinius [21, 42, 48].

## 2.6. Sifilio patologija

Įgyto sifilio atveju *T. pallidum* į organizmą patenka per gleivines, paprastai – genitalijų ar per odos smulkius pažeidimus. Vieni mikroorganizmai dauginasi patekimo vietoje, kiti – per keletą valandų išsisėja retikuloendotelinėje sistemoje ir tada pradeda daugintis. Įgimto sifilio atveju infekcija patenka tiesiai į vaisiaus kraują pro placentą. Transfuzinio sifilio atveju – tiesiai į kraują su infekuoto donoro krauju.

Sifilis yra smulkiųjų kraujagyslių liga. Pažeidimo vietoje išsiplečia kapiliarai, endotelis patinsta ir proliferuoja [32]. Kai jų spindis užsidaro, įvyksta nekrozė, kuri matoma kaip audinio vientisumo pažeidimas. Apie kapiliarus susirenka limfocitai, plazminės ląstelės net gigantinės ląstelės, o vėliau – fibroblastai ir formuojasi nauji kapiliarai. Visa tai vadinama induracijos klinika. Gilūs pažeidimai gydomi palieka randus. Pažeidimų gilumas ir ryškumas priklauso nuo imuniteto. Tretinio sifilio sukelti pažeidimai yra hipererginės kilmės, nes pačių treponemų būna mažai, o audinių destrukcija didelė: gumos, infiltratai, kurie gali išopėti. Vėlyvajam sifiliui labai būdingi ir degeneraciniai pakitimai, kurie vyrauja sergant neurosifiliu ir kardiovaskuliniu sifiliu [28, 32, 43, 47].

## 2.7. Sifilio klasifikacija

Epidemiologiškai sifilis yra ne viena, bet dvi ligos. Viena iš jų yra ankstyvasis sifilis (pirmuosius 2-4 metus). Jis priskiriamas ūmiai infekcijai. Didžiausias užkrečiamumas yra pirmaisiais dvejais metais, ypač pirmaisiais, toliau stipriai mažėja ir į ketvirtųjų metų pabaigą pasiekia nulį. Kitas sifilis yra vėlyvasis (daugiau kaip 4 metų trukmės), kuris gali sukelti kitas sveikatos problemas, priklauso nuo infekcijos vystymosi ypatybių bei pažeisto organo pakitimų [9, 13, 25, 30].

### A. Įgytas sifilis:

1. Ankstyvasis sifilis (iki 2 metų):

pirminis;

antrinis;

latentinis ankstyvas

2. Vėlyvasis sifilis (daugiau nei 2 metai):

latentinis vėlyvas;

tretinis sifilis (įskaitant gumozinius pažeidimus, kardiovaskulinį sifilį ir neurosifilį).

### B. Įgimtas sifilis:

1. Ankstyvasis įgimtas sifilis (pasireiškia < 2 m. amžiaus):



ankstyvas simptominis;  
ankstyvas latentinis.

2. Vėlyvasis įgimtas sifilis (pasireiškia > 2 m. amžiaus):  
vėlyvas simptominis,  
vėlyvas latentinis [23, 28].

## **2.8. Sifilio diagnostika**

Sifilio diagnostika remiasi anamneze, epidemiologija, klinika ir laboratoriniais tyrimais.

Laboratoriniai tyrimai. Blyškiosios treponemos identifikavimas. Sukėlėjas gali būti randamas žiūrint mikroskopu tamsiame regėjimo lauke medžiagą, paimtą iš kietojo šankerio, pirminio ir antrinio sifilio odos bėrimų bei plokščiųjų kondiliomų, šlapiuojančių ir vegetuojančių papulių. Medžiaga iš kietojo šankerio gali būti tiriama ir tiesioginės imunofluorescencijos reakcija, naudojant monokloninius antikūnius. Pastaraisiais metais sifilio diagnostikai pradėta naudoti ir polimerazės grandininė reakcija.

### **2.8.1. Laboratorinė serologinė sifilio diagnostika**

Netiesioginis, serologinis sifilio diagnozavimas

#### **REAGININIAI TESTAI**

1. Komplemento sujungimo reakcija – KSR

Vasermano reakcija – RW su kardiolipininiu antigenu

2. Pasyvios agliutinacijos testas:

- Mikroprecipitacijos reakcija  
Agliutinacija su kardiolipidiniu antigenu
- VDRL testas (Venereal Disease Research Laboratory)
  - VDRL  
Agliutinacija su kardiolipidiniu antigenu
  - VDRL Carbon
  - RPR (Rapid plasma Reagin)

Agliutinacija su kardiolipidiniu antigenu, absorbuotu ant anglies grūdelių

#### **TREPONEMINIAI TESTAI**

1. Komplemento sujungimo reakcija – KSR

Vasermano reakcija – RW su treponeminiu antigenu

2. Pasyvios agliutinacijos reakcija

TPHA (Treponema Pallidum Haemagglutination Assay)

TPPA (Treponema Pallidum Particle Agglutination)

- Antigenas absorbuotas ant nešėjo (viščiuko arba avino eritrocitų, želatinos grūdelių)
- Testas atliekamas U formos 96 šulinėlių plokštelėse
- Rezultatai vertinami vizualiai

### 3. Imunofermentinis testas - IFA

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

EIA (Enzyme Immuno Assay)

- Testas atliekamas 96 šulinėlių plokštelėse, padengtose antigenu
- Rezultatai vertinami su spektrofotometru

### 4. Netiesioginis Imunofluorescencijos testas

FTA – ABS (Fluorescent Treponemal Antibody ABSorbition)

- Objektinis stiklelis, padengtas antigenu
- Bandiniai tiriami fluorescenciniu mikroskopu

### 5. Treponemų imobilizacijos reakcija - TIR

TPI (Treponema Pallidum Immobilization testas) arba Nelsono testas [25, 47, 51].

## 2.9. Trumpa Laimo ligos istorija

Atskiri Laimo boreliozės sindromai Europoje buvo žinomi nuo 19- ojo amžiaus pabaigos, tačiau ligos sukėlėjas – *Borrelia burgdorferi* - atrastas tik 1982 metais (nuo tada pradėtas ir ligos etiotropinis gydymas) [47].

Tai yra infekcinė sisteminė *Borrelia* rūšies spirochetų sukelta liga, kurios sukėlėjus žmonėms perduoda erkės. Šios ligos atradimo istorija - tai medicinos progreso, įvairių simptomų bei sindromų sintezės pavyzdys. Jau 1863 m. A. Buchwald aprašė odos pakitimus, pavadinęs juos lėtiniu atrofiniu akrodermatitu. Vėliau 1910 – 1913 metais A. Afzelius ir B. Lipschütz aprašė migruojančią eritemą ir tik 1921 m. Afzelius įtarė, kad tam tikrą vaidmenį šios ligos etiologijoje turi erkės. C. Garin ir D. Bujadoux 1922 m. aprašė neurologinę simptomatiką esant migruojančiam eritemai, o 1941 m. A. Bannwarth aprašė limfocitinio meningoradikulito atvejus.

Tik 1975 m. JAV A. Steere ir kiti aprašė vaikų artrito epidemiją Konektikuto valstijoje, Laimo miestelyje, įrodydami ryšį tarp sąnarių pakenkimo bei erkės įkandimo ir po jo atsiradusio odos paraudimo. Tai pavadino „Laimo artritu“, o vėliau šią ligą imta vadinti tiesiog „Laimo liga“. 1982 m. W. Burgdorfer, A. Barbour ir kiti įrodė, kad šios ligos priežastys yra spirochetos, kurias žmogui perduoda erkės. Taigi, praėjo 100 metų, kol buvo surastos šios mįšlingos ligos priežastys ir visi pavieniai klinikiniai simptomai. Stebėjimai buvo apibendrinti ir sintezuoti į vieną nozologinį vienetą, pavadintą Laimo boreliozės vardu. Lietuvoje ši liga pirmą kartą buvo atrasta ir aprašyta 1987 m. vasarą Vilniaus universiteto Gamtinių židinių infekcijų mokslinio tyrimo laboratorijos ir Sveikatos apsaugos ministerijos surengtos mokslinės ekspedicijos metu [14, 15, 31].

## 2.10. Laimo ligos epidemiologija

Žmonių susirgimai Laimo liga yra registruojami daugelyje pasaulio šalių. Lietuvoje jie pradėti registruoti 1987 m. Lietuvoje Laimo ligos rodikliai kasmet didėja: 1991 metais – 60 žmonių, 1992 m. - 130 žmonių, 1993 m. – 676, 1994 m. – 656, 1995 – 941, 1996 m. – 785, 1997 m. – 1661, 1998 m. – 1498, 1999 m. – 766 žmonės, o 2000 m. sergamumo skaičius išaugo iki 1713, 2001 m. sumažėjo iki 1153, 2002 m. – iki 894, 2003 m. išaugo net 3688 žmonės. Laimo liga Lietuvoje turi aiškią sezoninę dinamiką: dažniausiai sergama liepos ir rugpjūčio mėnesiais [15, 54].

## 2.11. Laimo ligos sukėlėjas



2 pav. Laimo ligos sukėlėjas

*Borrelia burgdorferi* [53]

Savo rūšies pavadinimą šie sukėlėjai gavo prancūzų mikrobiologo A. Borrel, kuris XX a. nagrinėjo spirochetų įvairovę, dėka [26]. Tai Gram (-), judrios, spiralės išvaizdos spirochetos, turinčios nuo 7 iki 11 žiuželių (judamųjų organėlių) (2 pav.) [15]. Šių mikroorganizmų genetinė medžiaga (dezoksiribonukleinė rūgštis, DNR) yra dvejopa: chromosominė ir ekstrachromosominė, esanti plazmidėse. Genetinė borelijų sudėtis (DNR) yra nevienoda. Pagal tai jos skirstomos į rūšis. Iš 11 esamų borelijų rūšių žmogui patogeniškos tik 3: *B. burgdorferi*, *B. garinii* ir *B. afzelii*. Kadangi skirtingų rūšių borelijų DNR yra nevienoda, skiriasi ir jas sudarantys baltymai. Į borelijos sudėtį įeina apie 30 baltymų. Vieni baltymai yra nespecifiški borelijoms, panašūs į kitų spirochetų ar gramneigiamų mikroorganizmų baltymus (pvz., 60 kDa molekulinio svorio membranos baltymas). Kiti baltymai yra specifiški borelijoms ir vienodi visoms trims patogeninėms borelijų rūšims (pvz., 41 kDa molekulinio svorio žiuželinis antigenas). Rūšiai specifiški baltymai – t.y. skirtingi *B. burgdorferi*, *B. garinii* ir *B. afzelii* – yra išorinės membranos proteinais (Outer membrane proteins Omp: A, B, C, D, E, F). Šie baltymai turi keletą svarbių ypatybių: juos koduoja plazmidės, jų stiprios imunogeninės ir imunoapsauginės savybės, nuo jų priklauso borelijų organotropizmas, lemiantis ligos kliniką. Be to, OmpA ir OmpC baltymų sintezė priklauso nuo erkės fiziologinės būklės. Nepasimaitinusios erkės kūne esančios borelijos turi OmpA. Erkei pradėjus siurbti gyvūno ar žmogaus kraują ir dėl to pakilus temperatūrai erkės kūnelyje, borelijų OmpA baltymo sintezė nutrūksta ir pradedamas sintezuoti proteinas OmpC. Borelijoms migruojant iš erkės žarnyno į seilių liaukas ir perduodant jas gyvūnui ar žmogui, OmpC kiekis būna labai didelis. Šis baltymas yra labai imunogeniškas, tuo tarpu antikūniai prieš OmpA atsiranda labai vėlai po užsikrėtimo borelijomis ir labai

nedideliais kiekiais. Šio fenomeno išaiškinimas tapo labai svarbiu žingsniu gaminant Laimo ligos vakciną. [14, 15, 19, 26].

### **2.12. Laimo ligos infekcijos šaltiniai ir užsikrėtimo būdai**

Borelijų rezervuaras gamtoje yra smulkieji graužikai, elniai ir kiti laukiniai, rečiau naminiai žinduoliai, paukščiai, driežai. Iš vieno gyvūno kitam borelijas perneša *Ixodes* rūšies erkės. Žmogus užsikrečia įsisiurbus borelijomis užkrėstai erkei. Galimas, tačiau labai retas, transplacentinis borelijų perdavimas. Per karvių ir ožkų pieną Laimo ligos sukėlėjai neplinta. Nors borelijos kartais išskiriamos ir iš kitų kraujasiurbių vabzdžių, vienintelis infekcijos perdavėjas žmogui yra iksodinės erkės.

Per 2 gyvenimo metus erkės praeina 4 vystymosi stadijas: kiaušinėlis, lerva, nimfa ir suaugusi erkė. Kiekviena judri erkės forma maitinasi tik kartą per metus: lerva ir nimfa – pavasarį/vasarą, suaugusi erkė – vėlyvą rudenį. Visose vystymosi stadijose (išskyrus kiaušinėlio) erkė gali užkrėsti žmogų. Kai erkė įsisiurbia, borelijos migruoja iš žarnyno į seilių liaukas ir su seilėmis patenka į gyvūną. Užsikrečiama dažniausia praėjus 48 – 72 val. po erkės įsisiurbimo, nors yra aprašyta atvejų, kai borelijos pateko po keleto valandų. Tiesioginių duomenų apie borelijų perdavimą kraujo ar jo produktų perpylimo metu nėra, tačiau žinoma, kad borelija gali išgyventi kraujo produktuose [6, 15].

### **2.13. Laimo ligos inkubacinis laikotarpis**

Laimo ligos inkubacinis laikotarpis nuo 2 iki 30 dienų, t. y. vidutiniškai beveik 2 savaitės. Pradiniai ligos požymiai būna panašūs į infekcinį procesą ir dažnai su odos pažeidimais. Dažniausiai susirgimo pradžioje atsiranda migruojanti eritema aplink pirminio afekto – tai vieta, kur buvo prisisiurbusi erkė [26]. Kaip jau buvo minėta, susirgimas gali prasidėti migruojančia eritema arba bendrais Laimo ligai būdingais simptomais: galvos skausmas, negalavimas, migruojančiais skausmais kauluose bei raumenyse, pykinimas, bendras silpnumas, negalavimas, karštligė. Karštinės periodas gali trukti keletą dienų (apie 15 dienų).

Erkės įgėlimo vietoje inkubacinio periodo pabaigoje pasireiškia nedidelis niežulys, kartais skaudantis ir matosi paraudimas. Dėmė pamažu didėja ir negydant jos skersmuo gali siekti nuo kelių iki 90 cm [5, 15, 26].

Dėmė (pritemai) būna ovalios, apvalios, rečiau triangulinės formos. Centras dažniausiai pašviesėjęs, kraštas ryškesnis, raudonos alyvinės spalvos „Jaučio akis“. Retkarčiais raudonės centre gali atsirasti mazgelis, pūslelės, pūklė, išopėjimas ar šašas. Kraštas palaipsniui plečiasi ir po 4–8 savaičių paraudimas spontaniškai gali išnykti ir be gydymo. Dažniausiai lokalizuojasi pakinklyje, ant šlaunų, blauzdų, pilvo, rankų odos, nes borelijos iš pirminės patekimo vietos keliauja į kitas vietas. Borelijos plinta organizme hematogeniniu ar limfogeniniu būdu. Antrinės eritemos skiriasi nuo pirminių tuo, kad jos yra mažesnės. Ankstyvose Laimo

ligos stadijose gali atsirasti retas odos pažeidimas - limfocitoma taip pat gali padidėti kepenys.

Laimo liga gali plėstis ir nesant odos pažeidimų, esant bendriems intoksikacijos požymiams ir karščiavimui.

Po 2 – 10 savaičių nuo ligos pradžios klinika charakterizuojama migruojančios eritemos išnykimu ir patologinių požymių pasireiškimu. Pažeidimai pasireiškia vidaus organuose: nervų sistemoje, širdyje, akyse ir kitur.

Dažnai nervų sistemos pažeidimai pasireiškia meningitu, radikuloneuritu, galvos nervų neuritu. Artritas išryškėja per keletą savaičių nuo ligos pradžios arba po migruojančios eritemos. Sąnarių pažeidimai neretai gali būti beeriteminės formos Laimo ligos sindromas. Pirmas besivystančio artrito požymis yra skausmas sąnariuose, sunku judėti [19, 26].

#### **2.14. Laimo ligos patologija**

Borelijos yra labai jadrūs invaziniai mikroorganizmai, galintys penetruoti į įvairių organų audinių endotelio ląsteles ir kolonizuotis ekstraląsteliniuose tarpuose. Patekusios į žmogaus organizmą, borelijos pradeda daugintis odoje ir sukelia jos uždegimą. Kartais iš odos borelijos patenka į kraują ir diseminuoja po visus organus ir sistemas. Nors borelijos dažniausiai veikia kaip ekstraląstelinis sukėlėjas, jos gali įsiskverbti į jungiamojo audinio ląsteles, pvz., fibroblastus, tuo pačiu gali išvengti šeimininko imuninės sistemos poveikio bei imuninio atsako. Nors kraujo keliu borelijos diseminuoja po visą organizmą, pažeidimas išsivysto tik tam tikruose organuose, kuriems borelijos turi didžiausią tropizmą ir kurie yra vienaip ar kitaip izoliuoti nuo žmogaus organizmo imuninės sistemos (sąnariuose, širdies laidžiojoje sistemoje, nervų sistemoje, labai retai akyse). Nežiūrint ankstyvos diseminacijos, infektuotų organų pažeidimas atsiranda tik po kurio laiko – kelių savaičių, mėnesių, o kartais net metų. Apie 20% atvejų borelijos iš odos patenka tiesiai į kraują arba išplinta nervų skaidulomis, nesukeldamos odos uždegimo pirminio patekimo vietoje. Laikas tarp borelijų dalijimosi yra ilgas, o žmogaus organizmo uždegiminis ir imuninis atsakas į borelijas vystosi lėtai. Ankstyva lokalizuota ir ankstyva diseminuota boreliozės stadijos yra sąlygotos tiesioginio borelijų poveikio, t.y. mikroorganizmai dauginasi, dėl to kyla uždegimas ir organų pažeidimas. Šių stadijų prognozė yra palanki - 90% atvejų per pusę metų organizmo imuninė sistema eliminuoja infekciją be gydymo. Deja, kartais recidyvai, besikeisdami su remisijomis, arba ligos progresavimas nebylioje formoje baigiasi negrįžtamais organų pakitimais. Manoma, kad negydomos boreliozės perėjimas į lėtinę stadiją yra predisponuotas genetiškai. Šios stadijos patogenezė nėra visiškai neaiški (infekcinė ir/ar autoimuninė) ir prognozė nepalanki [15, 26].

## 2.15. Klinikinė Laimo ligos klasifikacija

Laimo Boreliozė yra sisteminė liga, pažeidžianti odą, centrinę – periferinę nervų sistemą, atramos judėjimo aparatą, širdį, akis [26].

Kiekvienam ligoniui patologiniai simptomai pasireiškia individualiai. Tai nulemia įvairios priežastys: amžius, premorbidinis fonas, gretutinės alerginės ir sisteminės ligos, širdies kraujagyslių ir nervų sistemos būklė [5].

Laimo liga, panašiai kaip sifilis, skirstoma į tris ligos stadijas. Pagal laiką ir klinikinius simptomus sunku tiksliai pabrėžti ligos stadiją.

Ankstyvoji Laimo liga (ūmi eiga):

I stadija - lokalaus pažeidimo stadija

II stadija - sukėlėjo diseminacijos stadija

Vėlyvoji Laimo liga (lėtinė eiga):

III stadija - organų morfologinių pažeidimų stadija

Laimo ligos pirmojoje stadijoje 60 - 80% ligonių ant odos atsiranda ECM (lėtinė migruojanti raudonė). Tai patognominis (neabejotinas) Laimo ligos simptomas. Diagnozavus šį pažeidimą, nebūtinas serologinis tyrimas ir privaloma skirti antibiotikų kursą [15].

## 2.16. Laimo ligos diagnostika

Laimo ligos laboratorinei diagnostikai taikomi imunologiniai tyrimai (imunofluorescencijos reakcija, įvairių modifikacijų imunofermentiniai tyrimai, imunoblotingas, antigeno nustatymas šlapime, T – limfocitų proliferacijos tyrimai ir kt.), molekulinės biologijos metodai – polimerazės grandininė reakcija (PGR), borelijų kultūros auginimas ir kt.

1. Humoraliniai testai:

IFR (netiesioginės imunofluorescencijos reakcija)

ELISA (imunofermentinis tyrimas)

Western blot (imunoblotingas)

2. Sukėlėjo tyrimas:

Kultūrų tyrimas (BSK - Mdiu)

Histologiniai tyrimai (Warthin - Starry)

Elektroninė mikroskopija

3. Imunohistochemija:

Tyrimai monokloninių monospecifinių antikūnų pagalba (APAAP)

4. Ląsteliniai testai:

Specifinių ląstelių imuninės reakcijos (T – limfocitų proliferacija, granulocitų – makrofagų kolonijos stimuliuojančio faktoriaus sekrecija *in vitro*)

4. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) [15, 51].

### 3. EKSPERIMENTINĖ DALIS

#### 3.1. Tyrimo medžiaga

Tyrimai atlikti Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikos (VULSK) Laboratorinės diagnostikos centro Mikrobiologijos laboratorijos Infekcijų žymenų tyrimų padalinyje.

Tyrimo medžiagą sudarė 40 serumų.

Serumai buvo surinkti ir ištirti nuo 2005 m. vasario iki 2006m. kovo mėn. Serumai įtraukti į tyrimą pagal kriterijus.

Įtraukimo į tyrimą kriterijai:

1. Teigiami serumai dėl sifilio buvo atrinkami atlikus nors vieną reakciją dėl sifilio, t.y. RPR, TPHA, *Treponema pallidum* IFA ar IFR. Į tyrimą buvo įtraukiami gavus teigiamą rezultatą (23 serumai dėl sifilio tyrimų buvo gauti iš VULSK Dermatovenerologijos centro) (1 lentelė).
2. Teigiami serumai dėl Laimo ligos buvo atrinkti gavus teigiamą rezultatą tiriant imunofluorescencijos metodu dėl Laimo ligos (8 serumai dėl Laimo ligos tyrimų buvo gauti iš VULSK Dermatovenerologijos centro) (1 lentelė).
3. Teigiami serumai dėl Laimo ligos taip pat buvo atrinkti atliekant reakciją su DRG (JAV) *Borrelia* 14 kD ir OspC IgM ELISA. Šios reakcijos teigiamas rezultatas – > 1.1.

Į Vilniaus universiteto ligoninės Santariškių klinikos laboratorinės diagnostikos centro Mikrobiologijos laboratorijos Infekcijų žymenų tyrimų padalinį iš UAB „Endemik“ buvo gauti serumai, kurių rezultatas buvo > 1.1 (UAB „Endemik“ atrinkti 24 serumai ištirti dėl Laimo ligos). Visi gauti iš UAB „Endemik“ 24 serumai buvo ištirti mūsų laboratorijoje su *Borrelia burgdorferi* IFR reakcija ir į tyrimą buvo įtraukiami tik tie serumai, kuriu titras  $\geq 1:256$  taigi, iš 24 serumų į mūsų tyrimą buvo įtraukti 9 serumai.

Iš 40 pacientų buvo paimta po vieną serumo mėginį. Atrinkti serumai buvo užšaldomi, o vėliau atšildžius pakartotinai ištiriami dėl sifilio ir Laimo ligos.

1 lentelė. Klinikinė informacija apie tyrimo medžiagą

Serumai	Sifilio diagnozė		Laimo ligos diagnozė	
	Įtariami	Patvirtinti	Įtariami	Patvirtinti
Dėl sifilio	-	23	-	-
Dėl Laimo ligos	-	-	9	8

Visi į tyrimą įtraukti serumai buvo ištirti šiomis reakcijomis:

- 1) RPR kokybinis ir kiekybinis vertinimas,
- 2) TPHA,
- 3) *Treponema pallidum* ELISA,
- 4) *Treponema pallidum* imunofluorescencija,
- 5) *Borrelia burgdorferi* imunofluorescencija.



## 3.2. Tyrimo metodai

### 3.2.1. RPR - greitoji plazmos reagentų reakcija

(angl. *Rapid Plasma Reagin*)

**Paskirtis.** RPR kokybinės ir kiekybinės reakcijos atliekamos ant kortelės, su 18 mm diametro tyrimo paviršiumi, skirtos serologiniam sifilio aptikimui netreponeminiais tyrimo metodais.

**Tyrimo principas.** RPR reagento sudėtyje yra antigenai, išskirti iš netreponeminių šaltinių (tai yra tiesiogiai nesusiję su treponeminiais mikroorganizmais), nustatantys reagento tipo imuninius baltymus serume. Šie į antikūnus panašūs baltymai išsiskiria į kraują, vykstant treponemos mikroorganizmų reakcijai su organizmo audiniais.

RPR antigeno suspensija – tai kardiolidiniu antigenu padengtos anglies dalelės, reaguojančios su į antikūnus panašiomis medžiagomis - „reagiais“, kurių būna sifiliu sergančių asmenų serume ar plazmoje. Kai kuriais atvejais jų gali būti ir kitų ūminių, chroninių ligų atvejais. Tiriamuose pavyzdžiuose reagentai jungiasi su testo antigenu, kurį sudaro kardiolidinu – lecitinu dengtos anglies dalelės, vyksta anglies dalelių ir reagentų flokuliacija bei koaguliacija, gerai matoma tamsių dribsnių šviesiame fone pavidalu. Reakcija yra makroskopinė ir todėl gerai optiškai matoma (3 pav.). Tiriamuosiuose pavyzdžiuose, kuriuose nėra reagentų, koaguliacija neįvyksta, tirpalas lieka homogeniškai šviesiai pilkos spalvos („Becton Dickinson and Company”, JAV).

**Reagentai.** RPR plokštelinio antigeno suspensijos sudėtinės dalys: 0.003% kardiolidino, 0.020 – 0.022% lecitino, 0.09% cholesterolio, 0.0125 M EDTA, 0.01 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% timerosalio (konservanto), 0.02% anglies (specialiai paruoštos), 10% cholino chlorido ir dejonizuotas arba distiliuotas vanduo.

#### **Priemonės, reikalingos atliekant testą.**

1. Į kasdieninį testavimą turi įeiti žinomo reaktyvumo titruoti kontroliniai serumai, kad galima būtų įsitikinti optimaliu antigeno reaktyvumu.

2. Rotatorius, 100 ± 2 apsukimų per min., kurio apskukos diametras – 2 cm su automatiniu taimeriu ir dangčiu.

**Pavyzdžių paruošimas.** Veninis kraujas imamas į mėgintuvėlius be antikoagulantų. Serumai atskiriami nuo kraujo krešulio kaip galima greičiau po kraujo sukrešėjimo.

**Kokybinis testas.** Atskirtą serumą automatine pipete 50 μl užlašinam ant kortelės skritulio, atsargiai paskirstom po visą skritulio paviršių. Po to užlašinama RPR antigeno suspensijos ir kortelė sukama 8 minutes po dangčiu mechaniniu rotatoriumi.

Norint atskirti neigiamą nuo silpnai teigiamo rezultato, po rotacijos reikia trumpai pasukinėti ir pavartyti plokštelę rankoje (3 ar 4 kartus pirmyn atgal). Tyrimo rezultatai makroskopiškai vertinami tuojau pat ryškioje kaitrinės lempos ar dienos šviesoje.

Tyrimo rezultatas:

- „teigiamas“ – jei matomas charakteringas dribsnių iškritimas, kurio intensyvumas svyruoja nuo nedidelio bet aiškaus iki ryškaus ir intensyvaus.

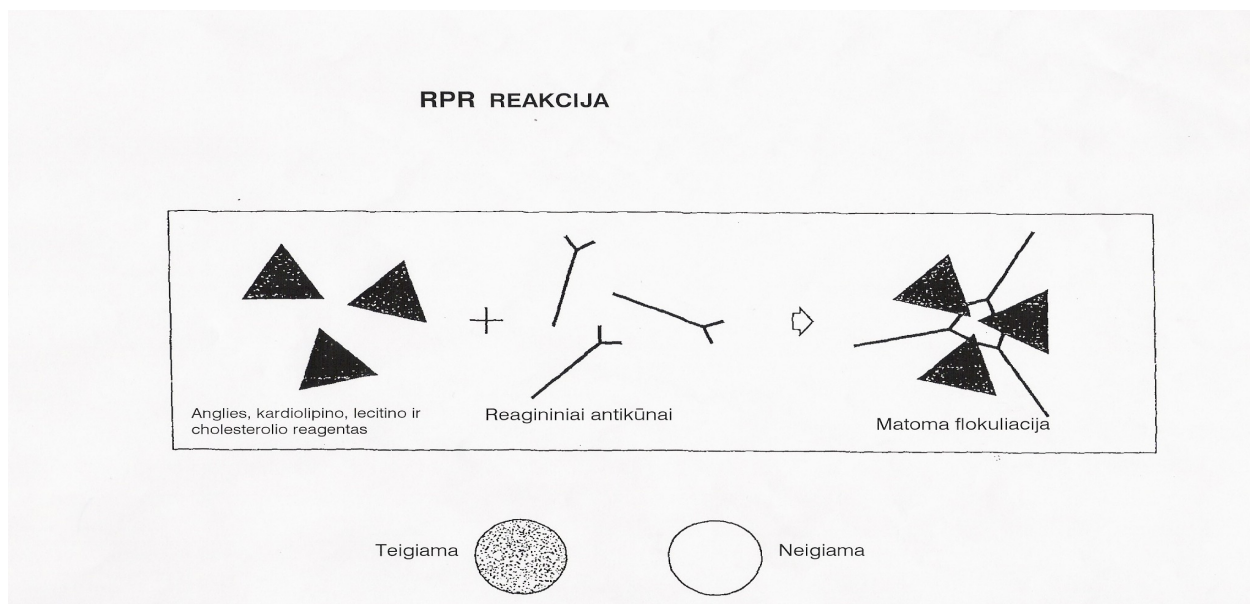
- „neigiamas“ – jei dribsnių iškritimo nėra.

Silpnai – vidutiniškai teigiamas visada vertinamas kaip teigiamas.

Jei gavome teigiamą ar silpnai – vidutiniškai teigiamą rezultatą, toliau yra atliekamas **kiekybinis testas**:

Priklausomai nuo kokybinio rezultato intensyvumo, serumas toliau titruojamas. Jei yra stipri agliutinacija, tai titruojama maždaug 5 kortelės skrituliuose, o jei silpnai – 3 skrituliuose. Ant kiekvieno skritulio sulašinama po 0.05 ml. 0.9 % Na Cl, po to tiek pat tiriamojo serumo užlašinama į pirmą skritulį, sumaišoma automatine pipete. Pernešama 0.05 ml. mišinio nuo pirmo skritulio ant antro, nuo 2 iki 3 ir t.t. Gale išpilamas likęs 0.05 ml. mišinio. Užlašinus RPR antigeno suspensijos į visus skritulius, daroma viskas taip pat kaip ir kokybiniame teste.

Vertinama pagal didžiausią praskiedimą, kuriame yra teigiamas rezultatas, taip pat, jei reakcija silpnai teigiama ar vidutiniškai teigiama (3 pav.).



3 pav. RPR reakcijos principas bei įvertinimas

**Kokybės kontrolė.** Atliekant seriją tyrimų, būtina kiekvieną dieną atlikti kokybės kontrolės tyrimus. Tyrimų rezultatai gali būti vertinami tik tada, kai yra tikslūs kontrolinių tyrimų rezultatai.

### 3.2.2. TPHA - *Treponema pallidum* hemoaglutinacijos reakcija (angl. *Treponema Pallidum Haemagglutination Assay*)

**Paskirtis.** Netiesioginės hemaglutinacijos reakcija skirta specifinių antikūnų prieš *Treponema pallidum* nustatymui žmogaus serume.

**Principas.** Paruošti viščiuko eritrocitai yra sensibilizuoti *Treponema pallidum* (Nikolso štamo) antigeno ekstraktu. Jei tiriamieji mėginiai yra teigiami, tai reakcijos pasekoje mikroplokštelės paviršiuje susidaro rausvos spalvos agliutinatai (4 pav.). Klaidingi teigiami reakcijų rezultatai gali būti gauti, sureagavus nepatogeninių štamų treponemų antikūnams („Omega diagnostics LTD”, United Kingdom).

#### **Reagentai.**

- a) antigeninis reagentas: sensibilizuoti viščiuko eritrocitai;
- b) kontrolinis reagentas: nesensibilizuoti viščiuko eritrocitai;
- c) skiediklio tirpalas: fosfatinis buferis fiziologiniame tirpale su Reiterio štamo treponemų ir stabilizatoriaus tirpiaisiais komponentais;
- d) teigiama kontrolė: imunizuoto triušio serumas; praskiestas 1:20. Tikslus titras nurodytas ant buteliuko etiketės. Yra leistinas  $\pm$  vieno praskiedimo nukrypimas;
- e) neigiama kontrolė: normalus triušio serumas praskiestas 1:20.

Visi reagentai yra su 0.1% natrio azidu.

#### **Reikalinga įranga.**

- Apvaliadugnės mikrotitravimo plokštelės (U formos dugnu).
- Automatinės pipetės.

#### **Tyrimo eiga.**

Atšildyti reagentus kambario temperatūroje (20 – 30 °C). Antigeninis ir kontrolinis reagentai turi būti kruopščiai resuspenduoti.

#### **Kokybinis testas.**

Kiekvienam tyrimui reikia 3 plokštelės šulinėlių.

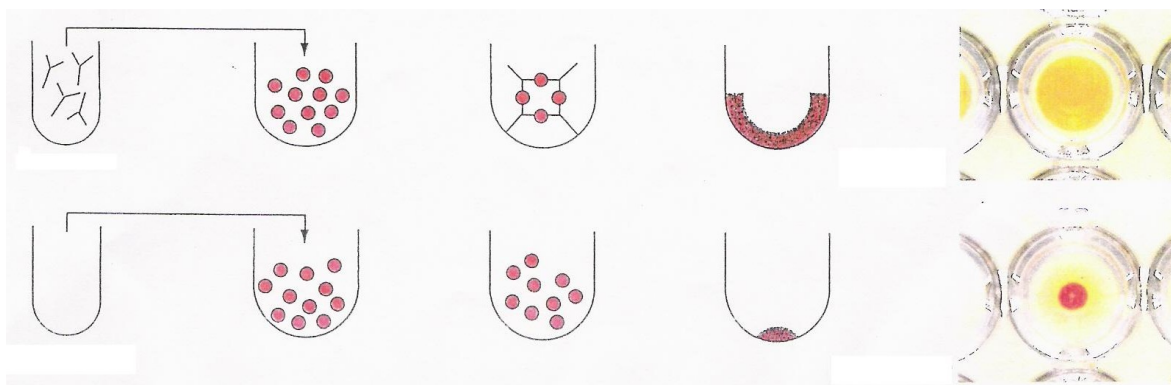
1. Įpilti 190  $\mu$ l skiediklio į pirmą šulinėlį, į kitus du nereikia.
2. Įpilti 10  $\mu$ l tiriamo serumo į pirmą šulinėlį.
3. Išmaišyti pirmo šulinėlio turinį ir iš jo perkelti 25  $\mu$ l į antrą šulinėlį. Sumaišyti vėl pirmame šulinėlyje likusį turinį ir perkelti į trečią šulinėlį 25  $\mu$ l.
4. Įpilti 75  $\mu$ l kontrolinio reagento į antrą ir 75  $\mu$ l antigeninio reagento į trečią šulinėlius.
5. Sumaišyti šulinėlių turinį, lengvai pasukant mikroplokštelę rankom arba apie 30 sek. rotatoriumi.
6. Inkubuoti uždengtą mikroplokštelę vieną valandą kambario temperatūroje. Saugoti ją nuo vibraciją ir karštį skleidžiančių šaltinių.

7. Įvertinti tyrimo rezultatus.

### Kokybės kontrolių panaudojimas.

Kiekvienai tyrimų partijai atliekami teigiamo ir neigiamo rezultato kontrolės testai. Atsižvelgiant į tai, kad kontroliniai serumai jau yra praskiesti 1:20, kokybiniame teste jų galutinis praskiedimas bus 1:80. Įpilti kiekvienos kontrolės po 25  $\mu$ l į antrą ir trečią šulinėlius. Skiediklio pilti nereikia.

Toliau – pakartoti kokybinio testo punktus 4 – 7.



4 pav. TPHA reakcijos principas, teigiama (viršuje) ir neigiama (apačioje) reakcija [39]

### Rezultatų vertinimas:

4+ : visą šulinėlio dugną dengia vienalytis agliutinuotų eritrocitų sluoksnis, kartais su ryškiais pakraščiais.

3+ : vienalytis sluoksnis nepilnai uždengia šulinėlio dugną.

2+ : siauras vienalytis sluoksnis su dalies nusėdusių eritrocitų žiedu.

1+ : labai siauras agliutinacijos sluoksnis su plačiu nusėdusių eritrocitų žiedu.

± : eritrocitai nusėdę šulinėlio dugne į kompaktišką darinį su skylute centre.

– : eritrocitai nusėdę šulinėlio dugne į kompaktišką darinį su labai maža skylute centre arba visai be jos.

Teigiamas rezultatas: nuo 4+ iki 1+

Abejotinas: ±

Neigiamas: –

### 3.2.3. *Treponema pallidum* serologinė diagnostika imunofluorescencijos reakcija (IFR)

(angl. *FTA – ABS (Fluorescent Treponemal Antibody ABSorbition)*)

**Principas.** Paciento serumas užnešamas ant objektinio stikliuko, padengto *Treponema pallidum* ekstraktu. Konjugatas - fluoresceinu pažymėti antikūnai prieš žmogaus imunoglobulinus parodo antikūnus prieš *Treponema pallidum*, prisijungusius prie antigeno ant stikliuko (5 pav.). Tam, kad būtų išvengta sąveika su nespecifiniais antikūnais, serumo bandiniai absorbuojami sorbentu („bio Merieux® sa”, France).

**Serumo paruošimas:** 20 µl serumo įpilame į 80 µl sorbento ir palaikome 5 min., kad įvyktų absorbcija.

**Inkubacija:** po to serumas užnešamas ant stiklelio su *T. pallidum* ir objektinis stiklis laikomas termostate 30 min., drėgnoje kameroje, 37° C temperatūroje.

**Plovimas:** po reakcijos stiklis plaunamas fosfatinio buferio tirpalu 10 min., po to nuskalaujamas distiliuotu vandeniu, džiovinamas.

**Dažymas:** koncentruotas konjugatas skiedžiamas buferiu (1 lašas į 5 ml buferio) ir užnešamas ant nudžiovinto stiklelio. Po to kartojamos ankstesnės procedūros.

**Inkubacija:** termostate 30 min., drėgnoje kameroje, 37° C temperatūroje.

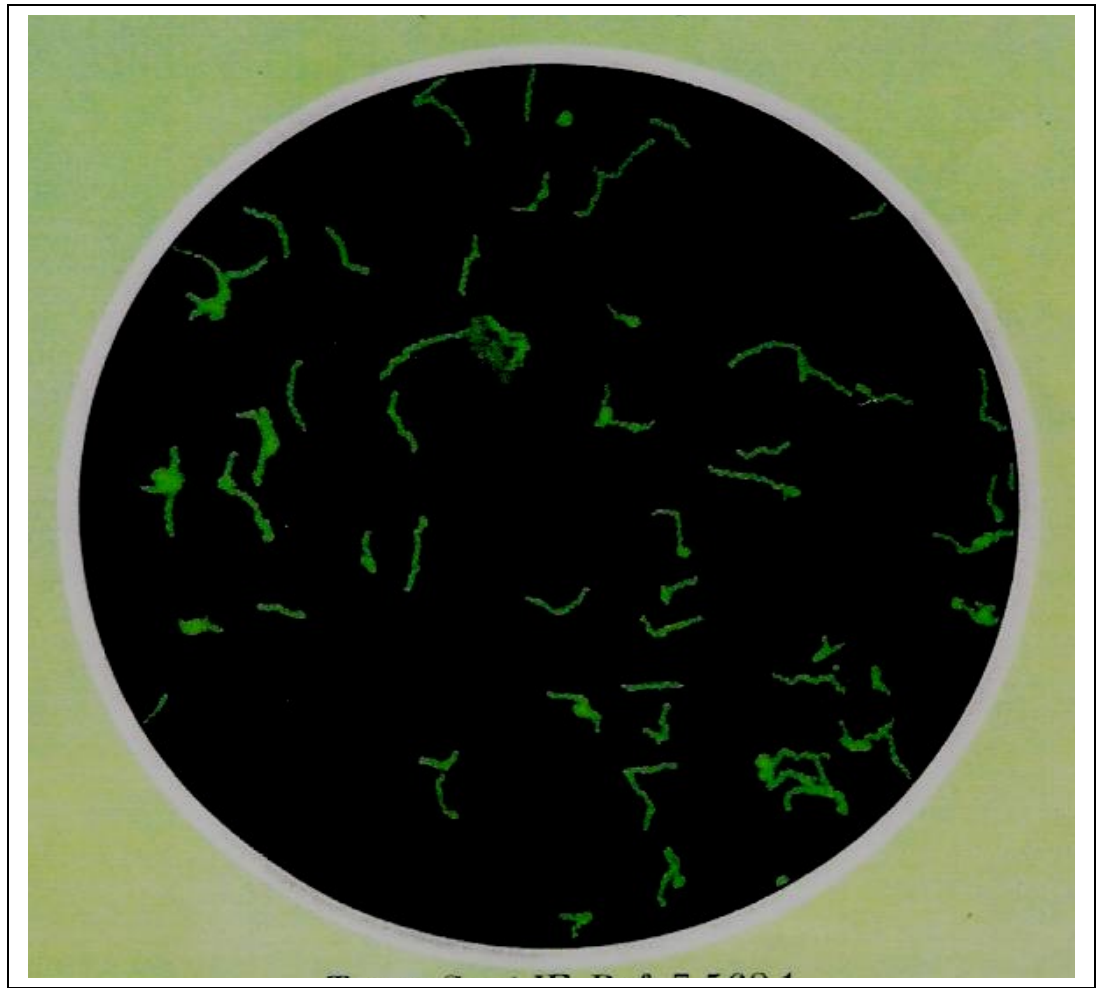
**Plovimas:** fosfatinio buferio tirpale 10 min., po to distiliuotame vandenyje, džiovinimas.

**Rezultatų vertinimas. Stiklelio mikroskopija fluorescenciniu mikroskopu.**

1. Neigiama reakcija: nėra fluorescencijos, arba treponemos vos matomos su silpnai žalsvu atspalviu.

2. Teigiama reakcija: treponemos švyti įvairaus laipsnio ryškiai žalia fluorescencija, vertinama nuo 1+ iki 4+.

**Interpretavimas.** FTA-ABS testas patvirtina antikūnų buvimą serume jau pirmosiomis sifilio infekcijos patekimo savaitėmis. Liekamieji antikūnai serume išlieka keletą metų ir po užbaigto gydymo.



5 pav. Sifilio sukėlėjo netiesioginė  
imunofluorescencija [36]

#### 3.2.4. *Borrelia burgdorferi* serologinė diagnostika imunofluorescencijos reakcija (IFR)

**Principas.** Objektiniai stikliukai yra padengti *Borrelia burgdorferi*, kurios antigenai reaguoja su serume esančiais antikūnais. Antigenas ir antikūnas sudaro imuninį kompleksą, prie kurio gali prisijungti konjugate esantis antikūnas, pažymėtas fluorescuojančia medžiaga (6 pav.). Mikroskopuojant matomas švytėjimas rodo, kad tiriamo žmogaus serume yra antikūnų prieš *Borrelia burgdorferi* (7 pav.) („bio Merieux® sa”, France).

**Serumo paruošimas:** praskiedimas 1:64 ( 10 µl serumo į 630 µl buferio). Titravimui – 100 µl skiesto serumo (1:64) pilama į 100 µl buferio ir gaunams praskiedimas (1:128). Taip pat gaunami tolesni praskiedimai 1: 256, 1:512 ir t. t.

**Inkubacija:** titruoto serumo mėginiai užnešami (1:64, 1:128, 1:256 ir t.t.) ant stiklelio su *Borrelia burgdorferi* ir objektinis stiklelis laikomas termostate 30 min., drėgnoje kameroje, 37° C temperatūroje.

**Plovimas:** po inkubacijos stiklelis plaunamas fosfatiniu buferio tirpalu 10 min., po to nuskalaujamas distiliuotu vandeniu, džiovinamas.

**Dažymas:** koncentruotas konjugatas skiedžiamas buferiu (1 lašas į 5 ml buferio) ir užnešamas ant nudžiovinto stiklelio. Po to kartojamos ankstesnės procedūros.

**Inkubacija:** termostate 30 min., drėgnoje kameroje, 37° C temperatūroje.

**Plovimas:** fosfatinio buferio tirpale 10 min., po to distiliuotame vandenyje, džiovinimas.

**Tyrimo rezultatų įvertinimas ir interpretacija.**

Tyrimo rezultatai vertinami, mikroskopuojant fluorescenciniu mikroskopu.

Rezultatai neigiami, jei nėra borelijų švytėjimo arba jos matomos blankios, žalsvai pilkos spalvos.

Rezultatas teigiamas, jei matoma ryškiai žalios spalvos borelijų fluorescencija, o ištirto serumo antikūnų titras yra didesnis už 1:256.

Serumo antikūnų titrą atitinka tas didžiausias serumo praskiedimas, kuriame dar aiškiai matomas borelijų švytėjimas.

Patologijos slenksčiu įprasta laikyti antikūnų titrą 1:256.

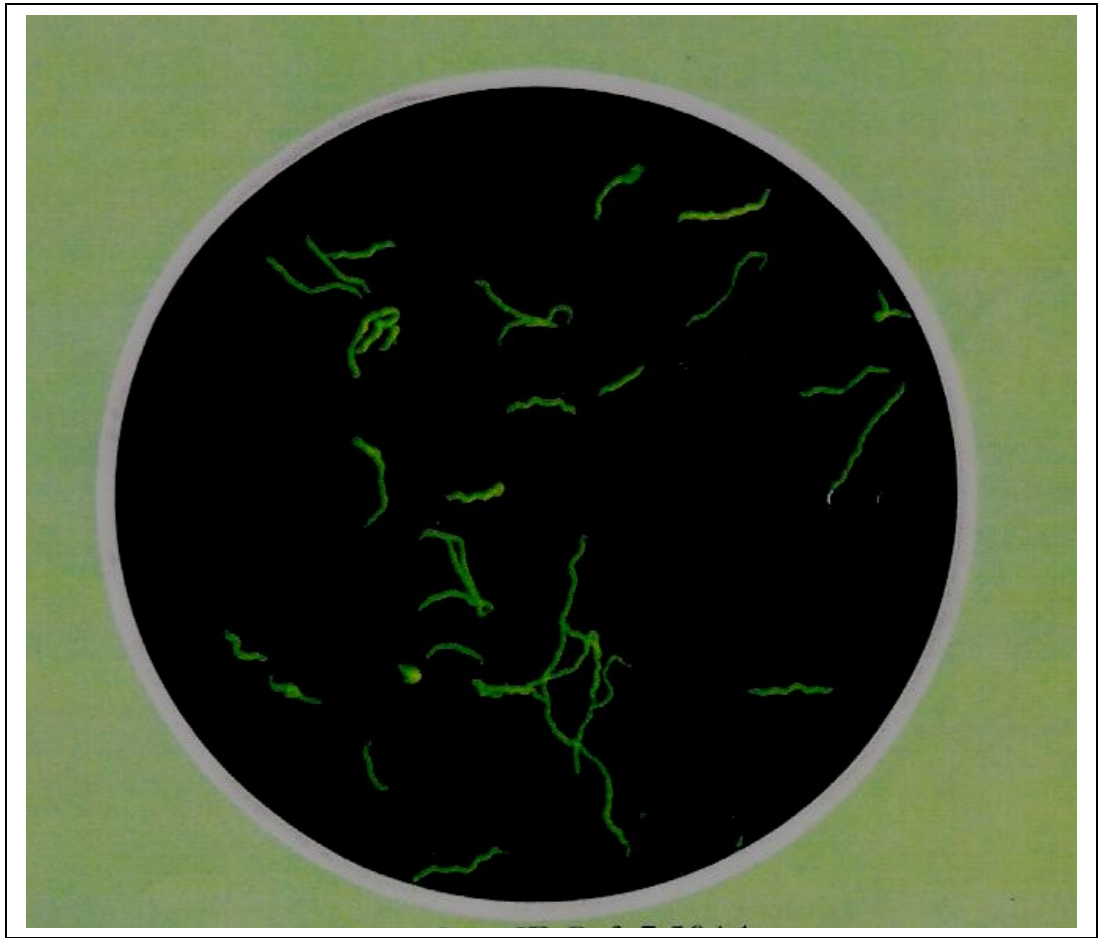
Nustačius antikūnų titrą 1:128 – 1:256, tokį serumą reikėtų pakartotinai iširti, paėmus naują mėginį po 7 – 15 dienų. Tai leistų nustatyti antikūnų lygio pokyčius.

Interpretuojant tyrimų rezultatus, būtina atsižvelgti į Laimo ligos klinikos ir epidemiologijos duomenis.

Kai kurios, kitų spirochetų sukeltos infekcijos gali rodyti teigiamas kryžmines reakcijas serologiniuose tyrimuose dėl Laimo ligos. *Treponema pallidum* infekcija dažnai rodo kryžmines reakcijas imunofluorescencijos testuose, todėl visi teigiami rezultatai, gauti tiriant Laimo ligą, turi būti patikrinti kitais sifilio serodiagnostikos testais (RPR, TPHA). Laimo ligos diagnozė gali būti tvirtinama tik tuomet, kai RPR ir TPHA testai yra neigiami.



6 pav. Laimo ligos nustatymo netiesioginės imunofluorescencijos reakcija principas [37]



7 pav. Laimo ligos sukėlėjo netiesioginė imunofluorescencija [36]

### 3.2.5. *Treponema pallidum* imunofermentinė analizė (IFA) (angl. *ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)*, *EIA (Enzyme Immuno Assay)*)

Imunofermentinė reakcija yra konkurentinis testas bendrųjų antikūnų prieš *Treponema pallidum* nustatymui žmogaus serume.

**Paskirtis.** IFA yra serologinis diagnostinis testas, patvirtinantis atrankinių sifilio serodiagnostikos testų rezultatus.

Testu nustatomi specifiniai Ig G, M, A antikūnai, todėl testas jautrus visose ligos stadijose.

**Principas.** Mikrotitravimo plokštelės šulinėliai padengti išgrynintais *Treponema pallidum* antigenais. Į šulinėlius lašinami neskiesti tiriamieji serumai, po to – konjugatas, t. y. *T. pallidum* antikūnai, žymėti fermentu – krienų peroksidaze.

Specifiniai antikūnai prieš *T. pallidum* tiriamajame serume ir konjugatas konkuruoja dėl antigeno, kuriuo padengti šulinėliai. Nesusirišusi medžiaga išplaunama iš šulinėlio. Sulašinus



substratą, spalva pasikeičia tuose šulinėliuose, kuriuose yra fermento – tai yra juose nebuvo žmogaus anti – *Treponema pallidum* antikūnų ir rezultatas vertinamas kaip neigiamas. Fermentinė reakcija stabdoma sieros rūgšties tirpalu ir matuojama 450 nm šviesos bangos absorbcija. Jei optinis tankis mažesnis už mažiausią leistiną (angl. *Cuf off*) reikšmę, rezultatai laikomi teigiamais. Geltonos spalvos, atsiradusios sustabdžius reakciją, intensyvumas yra atvirkščiai proporcingas antikūnų prieš *T. pallidum* koncentracijai tiriamajame serume (8, 9, 10 pav.) („Omega diagnostics LTD”, United Kingdom).

#### **Tyrimo procedūra.**

1. Prieš pradėdant tyrimą, visiems tyrimo komponentams ir tiriamajam serumui leidžiama sušilti iki kambario temperatūros.
2. Tiriamieji serumai ir kontrolės neskiedžiami.
3. Į pasižymėtus šulinėlius sulašinama po 25 µl tiriamųjų arba kontrolinių serumų ir po 100 µl anti – *Treponema pallidum* HRP konjugato (ne vėliau kaip per 30 min. nuo pirmojo tiriamojo serumo sulašinimo). Švelniai 5 sek. Pamaišoma sukant.
4. Inkubuojama 37°C 90 minučių.
5. Po inkubacijos šulinėlių turinys išpilamas, plokštelė plaunama 3 kartus plovimo buferiu, tarp plovimų po 30 sek pamirkant.
6. Į kiekvieną šulinėlį lašinama po 100 µl substrato.
7. Inkubuojama tamsoje 15 min. 37°C temperatūroje.
8. Reakcija sustabdoma įlašinant po 100 µl Stop tirpalo į kiekvieną šulinėlį.
9. Optinis tankis matuojamas spektrofotometru, naudojant 450 nm šviesos bangos filtrą.
10. Rezultatų vertinimas ir interpretacija.

Kiekvienam tiriamajam ir kiekvienam kontroliniam serumui išmatuojamas optinis tankis (OT), išreiškiamas šviesos absorbcijos vienetais.

Spektrofotometras apskaičiuoja mažiausią leistiną šviesos bangos absorbcijos reikšmę (angl. *Cut off*) pagal formulę, kurioje dviejų silpnai teigiamų kontrolinių serumų išmatuotas OT vidurkis dauginamas iš koeficiento 1,2.

$$Cut\ off = \frac{\text{silpnai teigiamų kontrolinių serumų OT vidurkis}}{1,2}$$

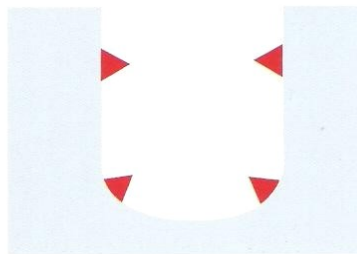
Jei kontrolinių serumų ištyrimo rezultatai nėra tokie, kokie turėtų būti (jų reikšmės nurodytos metodikoje), tiriamųjų serumų rezultatai laikomi negaliojančiais.

Tiriamųjų serumų rezultatai įvertinami, lyginant jų išmatuotas šviesos absorbcijos reikšmes su *Cut off* reikšme.

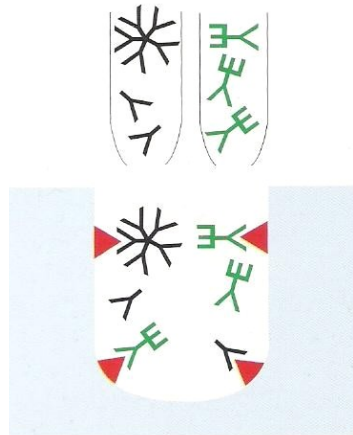
Neigiamas rezultatas. Neigiamu tiriamojo serumo rezultatas laikomas tada, kai jo OT yra didesnio už apskaičiuotą *Cut off* reikšmę (9 pav.).

Abejotinas ( $\pm$ ) rezultatas gali būti tuomat, kai tiriamojo serumo OT reikšmė visiškai sutampa su *Cut off* reikšme (8 pav.).

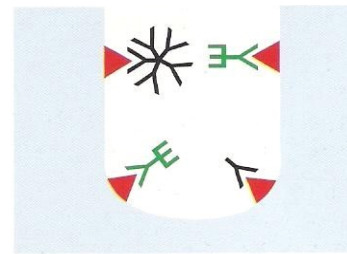
Teigiamas rezultatas gaunamas tada, kai tiriamojo serumo išmatuoto OT reikšmė yra mažesnė už *Cut off* reikšmę. Šį rezultatą interpretuojant, galima įvertinti jo šviesos absorbcijos intensyvumą ir tuo pačiu – fermentinį aktyvumą, kuris yra atvirkščiai proporcingas antikūnų koncentracijai mėginyje (10 pav.).



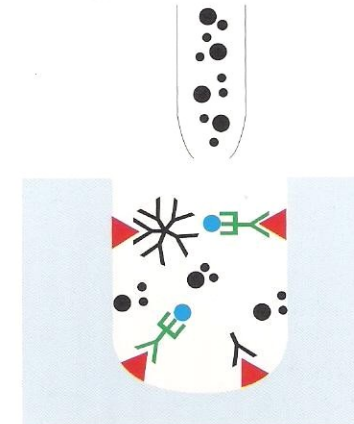
1) Mikrotitravimo plokštelės šulinėliai padengti išgrynintais *Treponema pallidum* antigenais.



2) Į šulinėlius lašinami neskiesti tiriamieji serumai, po to – konjugatas, t. y. *T. pallidum* antikūnai, žymėti fermentu – krienų peroksidaze.



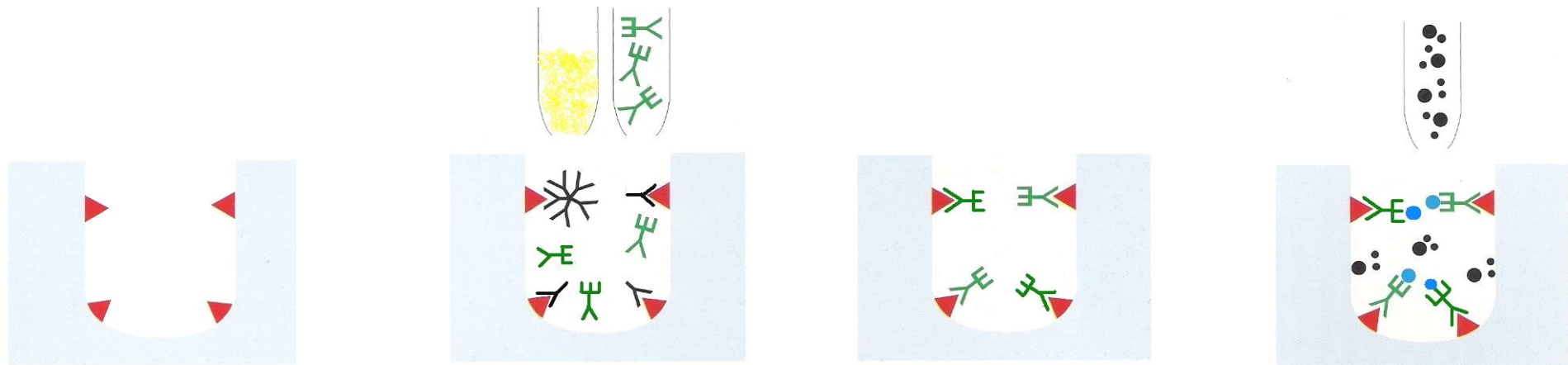
3) Nesusirišusi medžiaga išplaunama iš šulinėlių.



4) Į kiekvieną šulinėlį lašinama substrato.

5) Fermentinė reakcija stabdoma sieros rūgšties tirpalu ir matuojama 450 nm šviesos bangos absorbcija.

8 pav. Imunofermentinės reakcijos principas [34]



1) Mikrotitravimo plokštelės šulinėliai padengti išgrynintais *Treponema pallidum* antigenais.

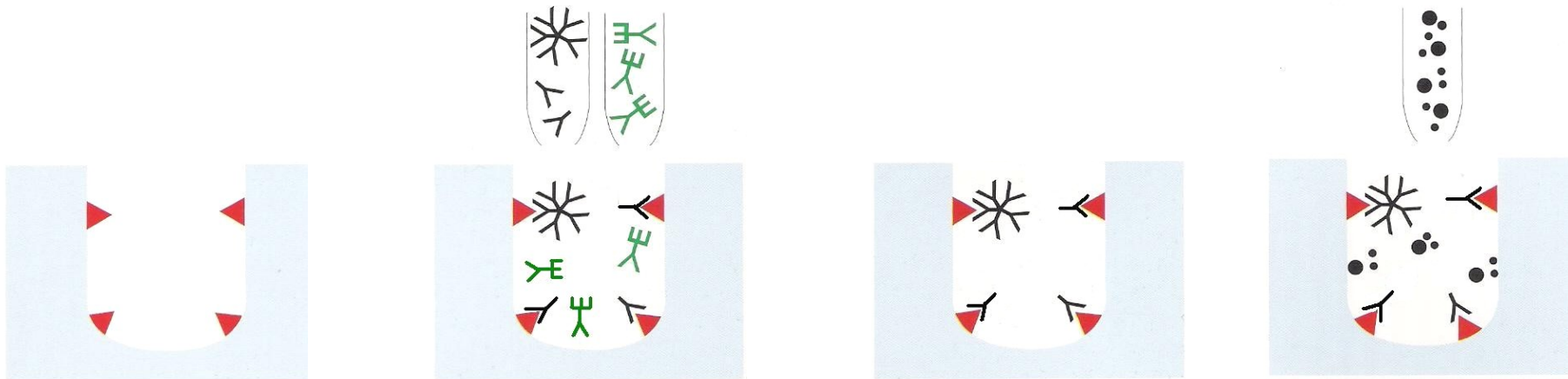
2) Į šulinėlius lašinami neskiesti tiriamieji serumai, po to – konjugatas, t. y. *T. pallidum* antikūnai, žymėti fermentu – krienų peroksidaze.

3) Nesusirišusi medžiaga išplaunama iš šulinėlių.

4) Į kiekvieną šulinėlį lašinama substrato. Spalva pasikeičia tuose šulinėliuose, kuriuose yra fermento – tai yra juose nebuvo žmogaus anti - *T. pallidum* antikūnų ir rezultatas vertinamas kaip neigiamas.

5) Fermentinė reakcija stabdoma sieros rūgšties tirpalu ir matuojama 450 nm šviesos bangos absorbcija.

9 pav. Neigiamos imunofermentinės reakcijos principas [34]



1) Mikrotitravimo plokštelės šulinėliai padengti išgrynintais *Treponema pallidum* antigenais.

2) Į šulinėlius lašinami neskiesti tiriamieji serumai, po to – konjugatas, t. y. *T. pallidum* antikūnai, žymėti fermentu – krienų peroksidaze.

3) Nesusirišusi medžiaga išplaunama iš šulinėlių.

4) Į kiekvieną šulinėlį lašinama substrato. Tuose šulinėliuose, kuriuose spalva nepasikeitė - nebuvo fermento, bet juose buvo žmogaus anti-*T. pallidum* antikūnų ir rezultatai vertinami kaip teigiami.

5) Fermentinė reakcija stabdoma sieros rūgšties tirpalu ir matuojama 450 nm šviesos bangos absorbcija.

10 pav. Teigamos imunofermentinės reakcijos principas [34]

## 4. TYRIMO REZULTATAI

### Sifilio serologiniai testai

#### 1. Greitas plazmos reagentų testas (RPR)

RPR testai buvo atlikti su 40 serumų. 16 serumų testų buvo teigiami. Du testai buvo laboratoriskai abejotini ( $\pm$ ). Abejotini rezultatai reiškia, kad pacientui gali būti ligos pradžia arba jis gali būti po gydymo. RPR reaktyvių serumų kiekybinio ištyrimo titrai matomi 2 lentelėje.

Nereaktyvūs RPR testui serumai buvo 22 atvejais iš visų tyrimų.

#### 2. *Treponema pallidum* hemoaglutinacijos reakcija (TPHA)

TPHA reakcija buvo atlikta irgi su visais 40 pacientų serumais. Teigiami buvo 22 serumų tyrimų rezultatai (2 lentelė).

Neigiami buvo 18 serumų tyrimų rezultatai.

#### 3. Imunofermentinė analizė (IFA)

IFA reakcija buvo ištirta 40 serumų: teigiamu rezultatas buvo 22 serumų, o neigiamu – 18 serumų (2 lentelė).

#### 4. Imunofluorescencijos reakcija (IFR)

IFR buvo atlikta su 40 serumų. Teigiami rezultatai buvo gauti ištyrus 28 serumus. Nebuvo gauta abejotinių rezultatų. Neigiamus rezultatus rodė 12 serumų.

### Serologinis tyrimas dėl Laimo ligos

#### Imunofluorescencijos reakcija (IFR)

Šiame tyrime dėl Laimo ligos imunofluorescencijos reakcija (IFR) buvo atlikta su 40 serumų: teigiamą rezultatą turėjo 16 serumų, o neigiamą – 24 serumai (2 lentelė).

2 lentelė. Laimo ligos ir sifilio serologinių tyrimų rezultatai

Nr.	KLINIKINĖ INFORMACIJA APIE SERUMUS (PS, IL, PL)	TYRIMAI DĖL SIFILIO				TYRIMAI DĖL LAIMO LIGOS
		RPR	TPHA	IFA	IFR	IFR
1.	PS	1:8	2+	teig.	4+	3+ (1:256)
2.	PS	1:4	3+	teig.	4+	3+ (1:256)
3.	PS	neig.	neig.	neig.	1+	3+ (1:256)
4.	PS	neig.	2+	teig.	2+	neig.
5.	PS	neig.	2+	teig.	2+	1+ (1:64)
6.	PS	1:2	3+	teig.	3+	2+ (1:128)
7.	PS	neig.	3+	teig.	3+	1+ (1:64)
8.	PS	1:16	4+	teig.	4+	3+ (1:256)
9.	PS	neig.	4+	teig.	4+	3+ (1:256)
10.	PS	1:64	4+	teig.	4+	4+ (1:512)
11.	PS	1:64	4+	teig.	4+	4+ (1:1024)
12.	PS	1:8	4+	teig.	4+	3+ (1:256)
13.	PS	neig.	3+	teig.	3+	3+ (1:256)
14.	PS	±	3+	teig.	4+	4+ (1:512)
15.	PS	1:64	4+	teig.	4+	2+ (1:128)
16.	PS	1:1	3+	teig.	3+	4+ (1:512)
17.	PS	1:1	4+	teig.	4+	1+ (1:256)
18.	PS	1:16	4+	teig.	4+	4+ (1:512)
19.	PS	1:8	4+	teig.	4+	4+ (1:512)
20.	PS	1:4	4+	teig.	3+	3+ (1:256)
21.	PS	1:256	4+	teig.	4+	4+ (1:1024)
22.	PS	1:16	4+	teig.	4+	2+ (1:256)
23.	PS	1:32	4+	teig.	4+	4+ (1:1024)
24.	IL	neig.	neig.	neig.	neig.	3+ (1:256)
25.	IL	neig.	neig.	neig.	neig.	2+ (1:256)
26.	IL	neig.	neig.	neig.	neig.	2+ (1:512)
27.	IL	neig.	neig.	neig.	neig.	1+ (1: 256)
28.	IL	neig.	neig.	neig.	neig.	2+ (1:256)
29.	IL	neig.	neig.	neig.	neig.	3+ (1:256)
30.	IL	neig.	neig.	neig.	neig.	3+ (1:256)
31.	PL	neig.	neig.	neig.	neig.	4+ (1:1024)
32.	PL	neig.	neig.	neig.	neig.	4+ (1:512)
33.	PL	neig.	neig.	neig.	2+	4+ (1:1024)
34.	PL	neig.	neig.	neig.	2+	4+ (1:512)
35.	PL	neig.	neig.	neig.	1+	4+ (1:1024)
36.	PL	neig.	neig.	neig.	neig.	4+ (1:512)
37.	PL	neig.	neig.	neig.	1+	3+ (1:256)
38.	IL	±	neig.	neig.	neig.	2+ (1:256)
39.	IL	neig.	neig.	neig.	neig.	2+ (1:256)
40.	PL	neig.	neig.	neig.	3+	4+ (1:512)

PS – serumai ligonių su patvirtinta sifilio diagnoze

IL – serumai pacientų su įtariama Laimo ligos diagnoze

PL – serumai ligonių su patvirtinta Laimo ligos diagnoze

#### 4.1. Tyrimo rezultatų aptarimas

Sifilis ir Laimo boreliozė gali stipriai žaloti žmogaus sveikata ir sąlygoti rimtas komplikacijas. Klinikinis pacientų ištyrimas abiejų šių infekcijų atvejais gali būti nepakankamai informatyvus pagrįsto ir aiškaus įtarimo suformavimui. Jei bus įtarta, kad pacientas gali sirgti sifiliu, šiuo metu egzistuojanti serologinė diagnostika ir jos kitimai dinamikoje padės gydytojui teisingai diagnozuoti šią infekciją ir paskirti adekvatų gydymą. Dėl įvairių priežasčių (anamnezės neaiškumas ar noras ją nuslėpti, neaiškus klinikinis susirgimo vaizdas ir panašiai) sifiliu sergančiam pacientui gali būti pirmiausia įtarta Laimo boreliozė ir neįtartas sifilis. Remiantis egzistuojančia praktika, toks įtarimas bus tikrinamas atliekant serologinius tyrimus Laimo boreliozei nustatyti. Šio darbo rezultatai rodo, kad dėl kryžminio serumų reaktyvumo, sifiliu sergančio paciento kraujo serumas gali būti įvertintas kaip teigiamas (iš tikrųjų kaip klaidingai teigiamas) ir dėl Laimo boreliozės. Toks įvertinimas gali sąlygoti neadekvataus gydymo paskyrimą ir potencialų komplikacijų pavojų.

##### **Veiksniai, įtakoiantys šiame darbe naudotu serologinių tyrimų rezultatus**

**Sifilio serologinių tyrimų klaidingai teigiami ir klaidingai neigiami rezultatai.** Labai svarbu ir būtina visiems medikams žinoti, kad gali būti biologiškai klaidingai teigiamos reakcijos – ūmios (esančios mažiau kaip 6 mėnesius) ir lėtinės (esančios ilgiau kaip 6 mėnesius).

Ūmios klaidingai teigiamos netreponeminės reakcijos esti sergant jungiamojo audinio ligomis (raudonąja vilklige ir kt.), ūmiomis virusinėmis ligomis (vėjaraupiais, tymais, hepatitu, infekcine mononukleoze, pirmine herpetine infekcija), tuberkulioze, raupsais, pneumokokine pneumonija, šiltine, maliarija. Serologinės reakcijos klaidingai teigiamos gali būti po narkozės, sergant tiroiditu, bakteriniu endokarditu, taip pat dėl laborantų techninių klaidų.

Lėtinės klaidingai teigiamos serologinės reakcijos yra asocijuotos su jungiamojo audinio ligomis (sisteminė raudonąja vilklige), maliarija, raupsais ir piktybiniais navikais [15].

Tirdamas sergančius raupsais, Portnoy [33] nepastebėjo nei vienos klaidingai teigiamos reakcijos, Achimastos [1] aprašė 14 iš 50 raupsais sergančių teigiamas reakcijas, o Scotti [44] 1 iš 208 atvejų pastebėjo teigiamas RPR reakcijas, kai reakcijos IFR ir TPHA buvo neigiamos. Dorwart [10] tyrė lėtinių biologinių klaidingai teigiamų reakcijų dažnį, sergant įvairiomis jungiamojo audinio ligomis. 6 iš 41 sergančiųjų sisteminė raudonąja vilklige RPR reakcija buvo teigiama ir tik 1 iš 23 sergančiųjų reumatoidiniu artritu buvo teigiama.

Įgimto sifilio diagnostikai svarbu teisingai įvertinti teigiamas serologines reakcijas, nes jos naujagimiui gali būti teigiamos dėl motinos antikūnų. Teisingai įvertinti serologines reakcijas padeda sifilio IFR 19S IgM tyrimas. Jei naujagimio serume nustatomi IgM antikūnai, jie yra paties naujagimio, nes motinos IgM per placentą negali patekti į naujagimio kraują [15].



Yra keletas straipsnių apie klaidingai teigiamas reakcijas nėštumo metu [16]. Alkoholio, narkotikų vartojimas ir autoimuninės ligos taip pat gali būti klaidingai teigiamų reakcijų priežastis [22]. Pinta, frambezija ir kitos treponeminės ligos tiriant šiais testais, rodo serumo teigiamas reakcijas.

Klaidingai neigiami RPR rezultatai pasitaiko dėl taip vadinamo prozonos fenomeno, kai esant labai dideliame antikūnių kiekiui slopinama reakcija, tiriant neskiestą serumą, o tampa teigiama tik praskiedus kraujo serumą.

Klaidingai neigiami RPR, TPHA, *Treponema pallidum* IFR, *Treponema pallidum* IFA rezultatai gali būti gauti inkubaciniame ligos periode, o RPR - ir pirminio sifilio pradžioje, nes RPR reakcija būna teigiama po 4-6 savaičių nuo užsikrėtimo.

Klaidingai neigiami tyrimų rezultatai gali būti taip pat dėl techninių priežasčių.

**Laimo boreliozės tyrimų klaidingai teigiami ir klaidingai neigiami rezultatai.** Jie gali būti sergant kitomis spirochetų sukeltomis ligomis (sifiliu), esant periodonto ligoms, sukeltoms *T. denticola*, autoimuninių ligų metu, bei dėl nenustatytų priežasčių. Klaidingai teigiama boreliozės serologija ypač būdinga IgM klasės Ak: ji randama ligų, kurios indukuoja polikloninę B ląstelių aktyvaciją (citomegalinė infekcija, infekcinė mononukleozė ir kt.), metu. Borelijos irgi gali sukelti polikloninę B ląstelių aktyvaciją, padidintą bendro IgM, antinuklearinių Ak, antikardiolipininių Ak, reumatoidinio faktoriaus, krioglobulinų sintezę [17]. Klaidingai teigiami būna ir dėl laborantų techninių klaidų.

Klaidingai neigiami tyrimų rezultatai gali būti inkubaciniame ligos periode, taip pat dėl techninių priežasčių (reikalavimų pažeidimų paimtas kraujo ėminius, juos laikant ar transportuojant į laboratoriją ir pan.).

#### **Laboratorijoje atliktų tyrimų rezultatus įtakojantys veiksniai**

Laboratorijoje, kurioje atliekami tyrimus, gautus klaidingai teigiamus ir klaidingai neigiamus rezultatus įtakojantys veiksniai:

- 1) personalo techninės klaidos, atliekančio serumų ištyrimą,
- 2) netvarkinga arba netinkama laboratorinė įranga (mikroskopai, termostatai, šaldytuvai ir t.t.), naudojama tyrimams atlikti,
- 3) kiti veiksniai, įtakojantys tyrimų technologinius procesus (sutrikimai elektros, vandentikio tinkluose ir pan.).

#### **Tyrimo metodų jautrumas įvairiose ligos stadijose**

Į organizmą patekus *T. pallidum*, reaguoja humoralinio imuniteto 3 imunoglobulinų frakcijos: IgA, IgM, IgG. Į antigeną atsakoma specifiniais treponeminiais antikūnais ir nespecifiniais – reaginiais antikūnais. Ankstyvai infekcijos fazei labai būdingas IgM

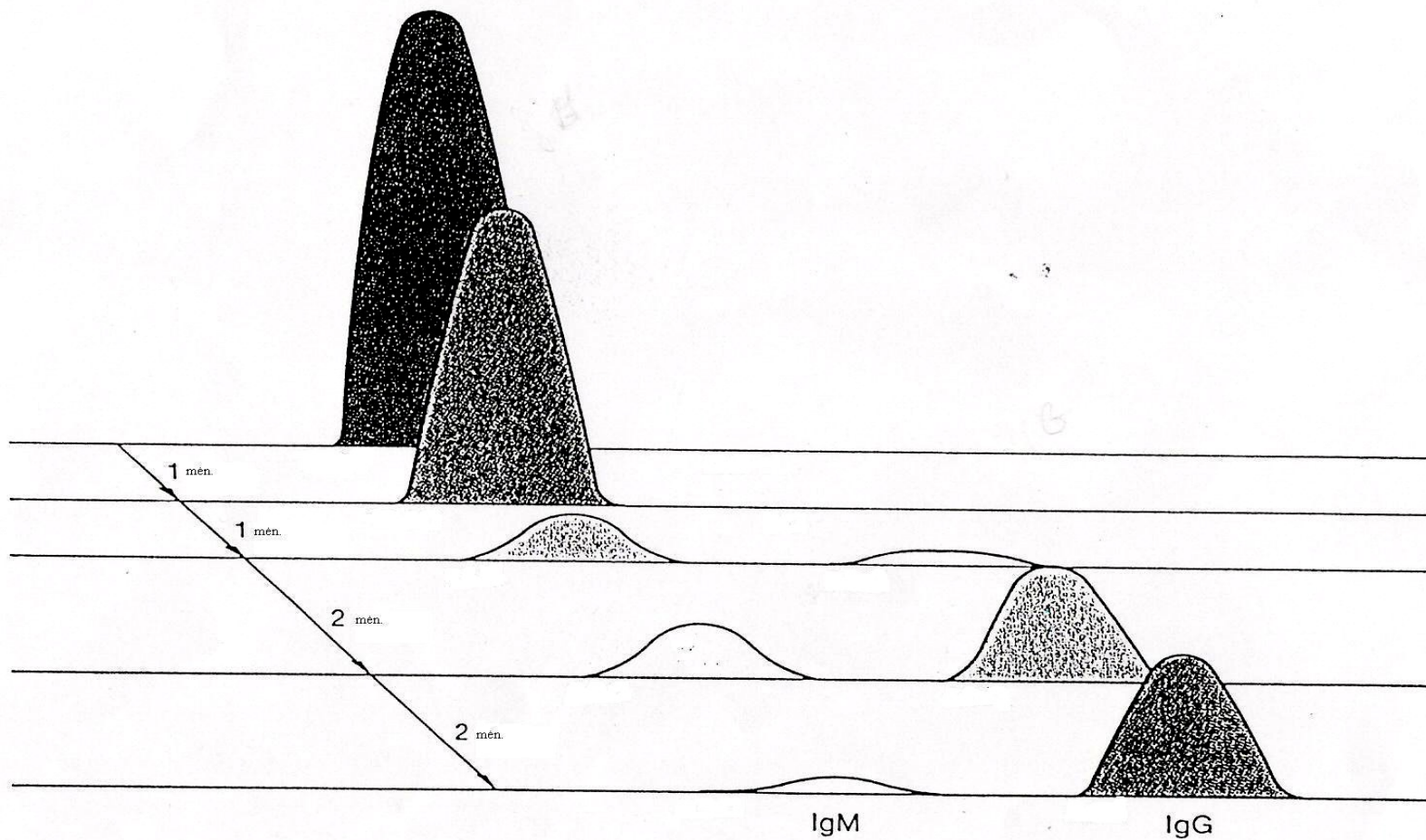
padaugėjimas, o IgG atsiranda tik vėlyvesnėje fazėje. Antrinio sifilio stadijoje lieka padaugėję IgA, IgM – mažėja ir palaipsniui pranyksta, o IgG – daugėja (11 pav.) [50].

RPR reakcija tampa teigiama po 4-6 savaičių nuo užsikrėtimo. RPR reakcija svarbi gydymo efektui stebėti, kadangi po sėkmingo gydymo RPR titras turėtų sumažėti ne mažiau kaip 4 kartus.

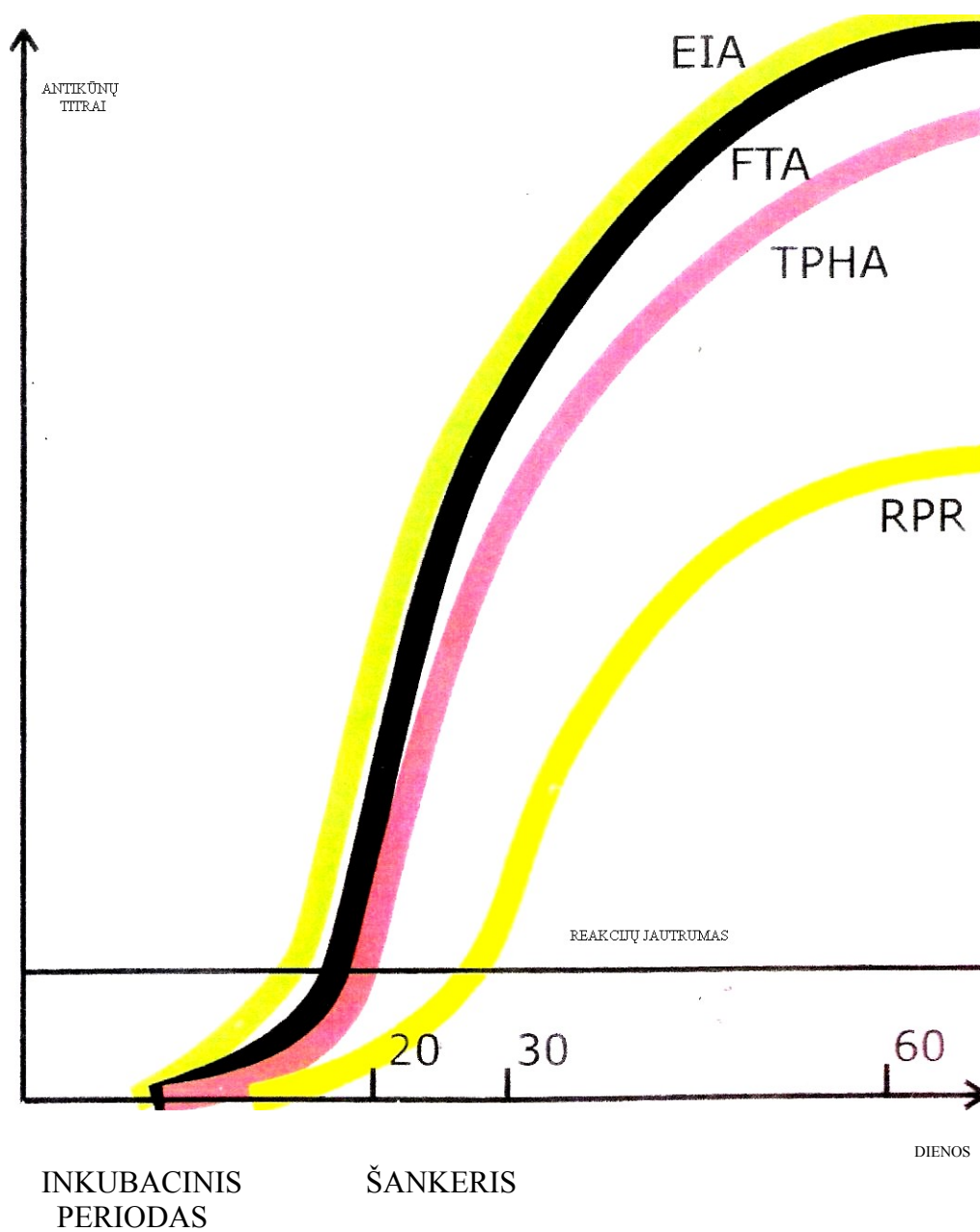
TPHA, *Treponema pallidum* IFR serologinės reakcijos tampa teigiamos po 2-3 savaičių nuo užsikrėtimo ir gali išlikti teigiamos po gydymo visą gyvenimą. Tik 15-25 % sirgusiųjų pirminiu sifiliu ir išgydytųjų jos tampa neigiamos po 2-3 metų. Treponeminės reakcijos neatspindi patologinio proceso aktyvumo, todėl gydymo veiksmingumui įvertinti nenaudojamos.

*Treponema pallidum* IFA serologinė reakcija tampa teigiama pirmiausiai - maždaug po 2 savaičių nuo užsikrėtimo (12 pav) [15].

Serologinei boreliozės diagnostikai naudojamas specifinių IgM ir IgG antikūnų nustatymas IFA, rečiau – netiesioginės imunofluorescencijos metodu. Kadangi imuninis atsakas prieš borelijas vystosi lėtai, o pirmasis IFA testas gali būti neigiamas, tolesnė ištyrimo taktika priklauso nuo esamų klinikinių-epidemiologinių duomenų. Jeigu pagal klinikinę simptomatiką boreliozė yra abejotina ar mažai tikėtina, gydymas neskiriamas ir ELISA kartojama po 0,5 - 1 mėnesio [14].



11 pav. Sifilio specifinių antikūnų dinamika po užsikrėtimo [38]



12 pav. Sifilio serologinių reakcijų jautrumas po užsikrėtimo [35]

### Šio tyrimo rezultatų aptarimas

40 serumų ištyrus penkiomis reakcijomis (RPR, TPHA, *Treponema pallidum* IFR, *Treponema pallidum* IFA ir *Borrelia burgdorferi* IFR), buvo pastebėtas kryžminis serumų reaktyvumas.

Atsižvelgiant į šio tyrimo gautus duomenis galima teigti, kad sifiliu sergančių pacientų serumai, esant teigiamoms sifilio serologinėms reakcijoms ir ypač RPR aukštam titrui (pvz. 10, 11, 21, 23 atvejais 2 lentelėje), kryžmiškai reaktyvūs tiriant juos *Borrelia burgdorferi* antikūnus nustatančia reakcija. 2 lentelėje matomi ir tokie atvejai, kai esant neigiamai RPR reakcijai pvz. 5, 7, 9, 13, o teigiamoms kitoms sifilio serologinėms reakcijoms, tyrimas dėl Laimo ligos buvo neigiamas. Taip pat stebimi atvejai, kai RPR titrai yra nemaži ir kitos reakcijos dėl sifilio yra teigiamos, o *Borrelia burgdorferi* IFR rezultatas yra neigiamas.

Analizuojant toliau šio tyrimo gautus duomenis taip pat galima teigti, kad Laimo liga sergančių (arba klinikinį įtarimą turinčių) pacientų serumai, kuriuose yra aptinkami antikūnai prieš *Borrelia burgdorferi* (2 lentelėje), kryžmiškai reaguoja ir salygoja teigiamus *Treponema pallidum* IFR rezultatus. Tuo tarpu TPHA, *Treponema pallidum* IFA reakcijos ir RPR (išskyrus vieną abejotiną ( $\pm$ )) (38 atvejį 2 lentelėje) yra neigiami.

3 lentelėje pateikti bendri duomenys apie serumų kryžminį reaktyvumą. Tiriant 17 serumų (teigiamus dėl Laimo ligos), kryžminis reaktyvumas (teigiamos *Treponema pallidum* IFR reakcijos) buvo aptiktas 5 serumuose (29 %). Tiriant 23 serumus (teigiamus dėl sifilio), kryžminis reaktyvumas (teigiamos *Borrelia burgdorferi* IFR reakcijos) buvo aptiktas 18 serumų (78 %).

3 lentelė. Serologinių reakcijų kryžminis reaktyvumas

Klinikinė informacija	Teigiamos sifilio serologinės reakcijos				Teigiama Laimo ligos serologinė reakcija
	RPR	TPHA	IFA	IFR	IFR titras $\geq 1:256$
Laimo liga 17 atvejai	1	0	0	5	17
Sifilis 23 atvejai	17	22	22	23	18

Panašius rezultatus gavo ir kiti tyrinėtojai [24]. Straipsnyje pateikti tyrimai buvo atlikti Bascom Palmer Akių Institute (BPAI) bendrabarbiaujant su Mikrobiologine Informacine Laboratorija (MRL) (Cypress, Kalifornija, JAV) nuo 1987 m. rugsėjo iki 1990 m. sausio mėn.

Per šį 27 mėnesių laikotarpį buvo ištirta 641 serumas. Serumai buvo paimti iš pacientų su neuro – oftalmologine patologija dėl *Borrelia burgdorferi*.

Šio straipsnio duomenimis, *Treponema pallidum* IFR reakcija buvo teigiama 22 % nuo visų ištirtų serumų. Mažesni negu mūsų kryžminio reaktyvumo dažnumą galima būtų paaiškinti tuo, kad mūsų serumai buvo atrinkti esant ankstyvai Laimo ligos stadijai, o straipsnio duomenimis serumai buvo gaunami iš pacientų su akių pažeidimais, kurie būdingi vėlyvajai Laimo ligos stadijai. Ir pacientų amžius, ir ligos trukmė, ir taikyti gydymai taip pat galėjo įtakoti šių tyrėjų rezultatus.

Tačiau kaip išskirtinį bruožą tyrėjai nurodo sifilio RPR nereaktyvūma tokiais atvejais [27], taip pat kaip ir mūsų darbe.

Labai panašūs rezultatai pateikti ir Hunterio, ir kolegų straipsnyje. Jų duomenimis, kryžminiu *Treponema pallidum* IFR reaktyvumu pasižymėjo 9 iš 40 (22,5 % ) diagnozuoti Laimo liga sergančiųjų pacientų serumai [20].

Vertinant mūsų tyrimo metu stebėtą šį kryžminį reaktyvumą, vertėtų atsižvelgti į tai, kad jis galėjo būti sąlygotas ir kad mes negalėjome mūsų tirtų serumų patikrinti dėl kitų ligų, kurios įtakoja klaidingai teigiamus rezultatus (pvz., sisteminė raudonoji vilkligė, vėjaraupiai, tymai, hepatitas, infekcinė mononukleozė, pirminė herpetinė infekcija, tuberkuliozė, raupsai, pneumokokinė pneumonija, šiltinė, maliarija ir kt.). Be to, mūsų tyrime atrinkti pacientų serumai dažniausiai galėjo sutapti su ankstyvąja Laimo ligos stadija. Jos metu pacientų kraujyje santykinai vyrauja IgM klasės antikūnai.

Kryžminį sifilių sergančiųjų pacientų serumų reaktyvumą (4 lentelė) galima paaiškinti dviejų atskirų procesų galimybe. Pirmiausia, šie pacientai galėjo sirgti ir Laimo liga, ir sifiliu. Antra, kryžminis reaktyvumas, ypač esant aukštiesiems RPR titrams, leidžia manyti, kad tai yra aktyvi sifilio stadija, kurios metu žmogaus organizme pasigamina didelis kiekis įvairių antikūnų, kurie kryžmiškai reaguoja su *Borrelia burgdorferi* antikūnus nustatančia reakcija.

4 lentelė. Sifilio kryžminis serologinis reaktyvumas

Laimo IFR	Sifilio IFR	sifilio IFA	TPHA	RPR
3+ (1:256)	4+	teig.	2+	1:8
3+ (1:256)	4+	teig.	3+	1:4
3+ (1:256)	1+	neig.	neig.	neig.
3+ (1:256)	4+	teig.	3+	1:16
3+ (1:256)	4+	teig.	4+	neig.
4+ (1:512)	4+	teig.	4+	1:64
4+ (1:1024)	4+	teig.	4+	1:64
3+ (1:256)	4+	teig.	4+	1:8
3+ (1:256)	3+	teig.	3+	neig.
4+ (1:512)	4+	teig.	3+	±
4+ (1:512)	3+	teig.	3+	1:1
1+ (1:256)	4+	teig.	4+	1:1
4+ (1:512)	4+	teig.	4+	1:16
4+ (1:512)	4+	teig.	4+	1:8
3+ (1:256)	3+	teig.	4+	1:4
4+ (1:1024)	4+	teig.	4+	1:256
2+ (1:256)	4+	teig.	4+	1:16
4+ (1:1024)	4+	teig.	4+	1:32

**Šio tyrimo reikšmė laboratorijos darbui.** Kryžminis serumų reaktyvumas ir dėl jo pasitaikantys klaidingai teigiami rezultatai Laimo ligos ir sifilio atvejais yra galimi. Šio fenomeno žinojimas gali padėti tiek praktikos gydytojui, tiek laboratorijos darbuotojui abejotinais atvejais siekti tikslesnio ištyrimo ir pakartotinio situacijos vertinimo. Norint patvirtinti arba paneigti kryžminį serumų reaktyvumą reikėtų skatinti gydytojus ypač abejotinais atvejais dažniau tirti pacientų serumus dėl abiejų šių infekcijų, o neaiškiais atvejais laboratorijoje naudoti labiau specifiskus tyrimus diagnozuojančius Laimo boreliozę (pvz., imunoblota).

## 5. IŠVADOS

1. Nustatyta, kad dėl Laimo ligos atrinkti serumai gali reaguoti kryžmiškai su *Treponema pallidum* IFR reakcija.
2. Nustatyta, kad dėl sifilio atrinkti serumai dažnai reaguoja kryžmiškai su *Borrelia burgdorferi* IFR reakcija.
3. Kryžminis serologinis reaktyvumas sergant sifiliu stebimas dažniau nei sergant Laimo liga.



## SUMMARY

### **Cross - reactivity in serological test for Lyme disease and syphilis**

Author: Tatjana Subočiūtė

Supervisor: Andrius Vagoras, MD

Work purpose: to determine the incidence of possibly false positive results of serological syphilis and Lyme borreliosis tests, routinely used in VULSK Diagnostics centre, occurring because of cross reactivity of patients, having one of these disease, blood.

Work methods: the research was carried out in Vilnius University Hospital Santariškių Klinikos (VULSK) Infection Markers Research Department of Microbiological Laboratory in Laboratory Diagnostics Centre.

Serum samples were collected and tested from February, 2005, till March, 2006. The investigation material was composed of 40 serum samples. 23 serum samples for syphilis test came from VULSK Centre of Dermatovenereology. 8 serum samples for Lyme borreliosis test were received from VULSK Centre of Dermatovenereology. 9 serum samples for Lyme borreliosis test were picked by UAB "Endemik".

All the samples, included into the research, were tested by following reactions: 1) RPR with titer, 2) TPHA, 3) *Treponema pallidum* ELISA, 4) *Treponema pallidum* immunofluorescence, 5) *Borrelia burgdorferi* immunofluorescence.

Research results: After testing the serums by five reactions (PRP, TPHA, *Treponema pallidum* FTA – ABS, *Treponema pallidum* ELISA and *Borrelia burgdorferi* immunofluorescence), a serological cross reactivity between *Borrelia burgdorferi* immunofluorescence and *Treponema pallidum* FTA - ABS was noticed.

According to the results of our research, in 5 serum samples (29%) cross reactivity (positive *Treponema pallidum* FTA - ABS reactions) was found when testing 17 serum samples (positive for Lyme disease). When testing 23 serum samples (positive for syphilis) cross reactivity (positive *Borrelia burgdorferi* immunofluorescence reactions) was found in 18 samples (78%). Moreover, false positive and false negative factors influencing the test results may affect serological test results.

#### Conclusions:

1. It was determined, that serum samples, picked out because of Lyme disease, cross react in *Treponema pallidum* FTA - ABS reaction.
2. It was determined, that serum samples, picked out because of syphilis, cross react in *Borrelia burgdorferi* immunofluorescence reaction.
3. Serological cross reactivity is more common in case of syphilis than Lyme disease.

### Literatūra:

1. Achimastos A., Tollis G., Papadopoulos G., and Kousoutzakoglou K. Public Health. Rep. – 1970; **85**:66 – 68.
2. Adimora A. A. Et al. Sexually transmitted diseases. – 2<sup>nd</sup> ed. – N. Y., 1994. – 436.
3. Aral S. O., Holmes K. K. Sexually transmitted diseases in the AIDS era // Sci. Am. – 1991. – Vol. 264. – 62 – 69.
4. Aral S. O. Sexual behavior in STD research: 93 // 10<sup>th</sup> Int. Meeting of the Int. Society for STD research: Abstr. book. – Helsinki. - 1993. – 100 .
5. Balevičienė G., Maciulevičienė R. Odos ligų atlasas. – V., 2002. – 217p., 205 – 215p.
6. Белеков В. Д., Яфаев Р. Х. Эпидемиология. – М., 1989. – 360.
7. Bingham J. S. Syphilis // Diseases in the homosexual male / Ed. M. W. Adler. – Berlin, 1988. – 111 – 128.
8. Charon N., et. al. Spirochete chemotaxis, motility, and the structure of the spirochetal periplasmic flagella. Res Microbiol. – 1992. – 143:597.
9. Crissey J. T. Syphilis // Sexually transmitted diseases / Ed. L. C. Parish, F. Gschnait. N. Y., 1989. – 11 – 31.
10. Dorwat B. B., and Myers A. R. Br. J. Vener.Dis. – 1974; **50**:435 – 436.
11. Evans B. A., McLean K. A., Dawson S. G. et al. Trends in sexual behavior and risk factors for HIV infection among homosexual men, 1984 – 1987 // Br. Med. J. – 1989.- Vol. 298. – 215 – 218.
12. Felman Y. Syphilis: From 1495 Naples to 1989 AIDS // Arch. Dermatol. – 1989. – Vol. 125. – P. 1698 – 1699.
13. Fiumara N. J. The treponematoses // Dermatology / Ed. S. L.Moschella, H. L. Hurley. - 2nd ed. – N. Dehli, 1985. – 817 – 869.
14. Gailevičius P., Ročkienė A., ir kt. Laimo liga. Metodinės rekomendacijos. – K., 1996. – 5 – 14 p.
15. Gailevicius P., Obelenienė D.M. Odos ir venerinės ligos. – V., 1996. – 111 – 133 p.
16. Gamer M. F., and Backhouse J. L. The rapid plasma reagin card test: a screening test for sypylis. Mad. J. Aust. – 1973; **1**:737 – 739.
17. Gorbach S.L., Barlett J.G., Blacklow N.R. Infectious Diseases, 3<sup>rd</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins. – 2004. – 256 – 260.
18. Harris J. R. W. Recent advances in sexually transmitted diseases. 2/Ed. – Edinburgh, 1981. – 281.

19. Hengge U.R., Tannapfel A., et al. Lyme borreliosis. *The Lancet Infectious Diseases*. - 2003. - **3**:89-98.
20. Hunter EF., Russell H., Farshy CE., et al. Evaluation of sera from patients with Lyme disease in the fluorescent treponemal antibody – absorption test for syphilis. *Sex Transm Dis* 1986; **13** – 232.
21. Young H. Syphilis: new diagnostic directions // *Int. J. STD/ AIDS*. – 1992.- Vol. 3. - 391 – 413.
22. Kafman R. E., Weiss S., Moore J. D., Falcone V., and Weisner P.J. Biological false positive serological for syphilis among drug addicts. *Br. J. Vener. Dis.* – 1974; **50**:350 – 353.
23. Lapinskaitė G. S. Socialiniai ir epidemiologiniai sifilio aspektai Lietuvoje. Disertacija medicinos daktoro laipsniui įgyti. – K., 1995. – 13 - 30 p.
24. Lawton J., Bret C., and Hummer J. The Bascom Palmer Eye Institute Lyme/Syphilis Survey. *Jurnal of Clinical Neuro – ophthalmology*. – New York, 1900. – 10(4):255 – 260.
25. Lelis J., Galevičius P., Ragaišis S., Balevičienė G. *Odos ir venerinės ligos*. – V., 1985. – 215 p.
26. Лобзин Ю. В., Рахманова А. Г., Антонов В. С., Усков А. Н., Антыкова Л. П., Скрипченко Н. В., Иванова Г. П., Платошина О. В. Эпидемиология, этиология, клиника, диагностика, лечение и профилактика иксодовых клещевых боррелиозов. - Санкт-Петербург, 2000. – 1 – 32.
27. Magnarelli LA. Laboratory diagnosis of Lyme disease. In: *Rheumatic disease clinics of North America: Lyme disease*; vol 15. Philadelphia: WB Saunders, 1989:735 – 46.
28. *Малая медицинская энциклопедия*. - Москва. 1968. – 814 - 842.
29. Милич М. В. Эволюция сифилиса. – Москва. 1987. – 7.
30. Moore J. W. An evaluation of public health measures for the control of syphilis // *Am. J. Syph., Gonorr., Vener. Dis.* – 1951. - 43 –Vol. 35. – 101 – 134.
31. Motiejūnas L. *Laimo liga. Metodinės rekomendacijos*. – V., 1997. – 13 – 22 p.
32. Parish C., Gschnait F. *Sexually transmitted diseases*. – N. Y., 1988. – 388.
33. Portnoy J., Brewer J. H., and Harris. Rapid plasma reagin card test for syphilis. *Public Health Rep.* – 1962; **77**:645 – 652.
34. Rinkinio teikėjas „Bering Diagnostics System”, Germany. Reagentų aprašas.
35. Rinkinio teikėjas „bio Rad”, USA. Reagentų aprašas.
36. Rinkinio teikėjas „bio Merieux ® sa ”, France. Reagentų aprašas.
37. Rinkinio teikėjas „Dako A/S ”, Denmark. Reagentų aprašas.
38. Rinkinio teikėjas „Fujirebio INC ”, Japan. Reagentų aprašas.

39. Rinkinio teikėjas „Rondox Laboratorie Ltd. ”, United Kingdom. Reagentų aprašas.
40. Samuel M. C., Guydish J., Ekstrand M. et. al. Changes in sexual practice over 5 years of follow – up among heterosexual men in San Francisco // AIDS. – 1991. – Vol. 4. – 896 – 900.
41. Самцов И. В. Руководство по кожным и венерическим болезням. – М., 1990. – 167 – 173.
42. Schoeter A., et. al. Therapy for incubating syphilis: Effectiveness of gonorrhea treatment Jama 1971. – 218:711.
43. Schofield C. B. S. Sexually transmitted diseases. – Edinburgh, 1979. – 251.
44. Scotti A. T., Mackey D. M., and Trautman J. R. Comparison of rapid plasma reagin card test and venereal disease reseonch laboratory test in detection of kidogical false positive reactions in systemic lupus. Arch. Dermatol. – 1970; **101**:328 – 330.
45. Smibert RM: Genus III: Treponema Schaudinn 1905, 1728 AL, in Bergey's Manual of Systematik Bakteriology, vol 1, Kreig NR, Holt JG (eds). Baltimore, Williams & Williams, 1984. – 49 – 57.
46. Skaržinskienė S., Kormonienė D. Sveikata. – 2003/5. 44 p.
47. Stamm WE., Holmes KK., Mardh PA., Sparling PF., Lemon SM., Piot R., Wasserheit JN. Sexually Transmitted Diseases. - 1999. - 473-479.
48. Sary A. Sexually transimitted infections. In. JL Bologna (eds) Dermatology, 2nd edition, Mosby, 2003. - 1271-1295
49. Sveikatos enciklopedija. – V., 2000. - 309 p.
50. Willcox R. R., Willcox J. R. Venereological medicine. - London, 1982. - 351.
51. Zaleckis G. Pagrindinių laboratorinių tyrimų žinynas. – V., 2002. – 385 p.
52. [www.uhavax.hartford.edu/bugl/histepi.Htm](http://www.uhavax.hartford.edu/bugl/histepi.Htm)
53. [www.agur.umd.edu/.../Graphies/fs\\_534\\_1.jpg](http://www.agur.umd.edu/.../Graphies/fs_534_1.jpg)
54. [www.sam.lt](http://www.sam.lt)