

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

Jana Goručan

DIPLOMSKA NALOGA

Visokošolski strokovni program
Laboratorijske biomedicine

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

Jana Goručan

DOKAZOVANJE VRSTE BORELIJ LYMSKE BORELIOZE GLEDE NA
ANALIZO GENA *ospA* Z UPORABO PCR V REALNEM ČASU

IDENTIFICATION OF LYME BORRELIOSIS BORRELIA SPECIES AS
FOR ANALYSIS BASED ON GENE *ospA* WITH OF APPLICATION
REAL TIME – PCR

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo sem opravljala v Laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroz na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Miroslava Petrovca, dr. med. in somentorstvom izredne profesorice dr. Eve Ružić Sabljic, dr. med.

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Miroslavu Petrovcu dr. med. in somentorici izredni profesorici dr. Evi Ružić Sabljic, dr. med. za pomoč in vodenje pri izdelavi diplomskega dela.

Prav tako se zahvaljujem Jasmini Zlatorg za nesebično pomoč pri vodenju in izvajanju praktičnega dela.

Posebna zahvala pa velja mojim staršem, ki so me podpirali in omogočili študij, mojim prijateljem ter še posebno mojemu fantu Alešu, ki mi je skozi celoten potek diplomskega dela stal ob strani.

Izjava:

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Miroslav Petrovca, dr. med. in somentorstvom izredne profesorice dr. Eve Ružić Sabljic, dr. med.

Ljubljana, junij 2010

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Darko Černe.

Član diplomske komisije: asist. dr. Simon Žakelj.

Povzetek

Lymfska borelioza je klopno prenosljiva bolezen razširjena predvsem v severni zemeljski polobli in jo povzroča *B. burgdorferi* sensu lato. V Sloveniji je lymfska borelioza poznana kot endemična bolezen. Zaradi velikega števila obolelih je vse bolj priporočljivo samopregledovanje in spremljanje kožnih sprememb po klopnem ugrizu, kar pomembno vpliva pri nadaljnjem diagnosticiranju in zdravljenju. Diagnoza temelji na kožni spremembi in mikrobioloških metodah. Slednje so izvedli s postopkom izolacije kužnin (koža, kri in likvor) na gojišču. Po izolaciji DNA iz kulture, je potekala metoda pomnoževanja v realnem času z uporabo diagnostičnega kompleta LightMix in začetnimi oligonukleotidi na *hbb* genu. Na podlagi dokazanih pozitivnih sevov *B. burgdorferi* sensu lato smo z metodo pomnoževanja v realnem času z diagnostičnim kompletom LightMix in začetnimi oligonukleotidi na *ospA* genu analizirali seve po navodilih proizvajalca z uporabo 50 µl Taq polimeraze in po predhodnjih izkušnjah laboratorija z uporabo 10 µl Taq polimeraze. Takšen postopek smo uporabili na 68 sevih *B. burgdorferi* sensu lato, kar nam je omogočilo primerjavo glede na predhodne rezultate na *hbb* genu in uporabljene količine Taq polimeraze. Ugotovili smo, da je pomnoževanje molekul DNA *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* in *B. afzelii* uspešno potekalo pri uporabi 50 µl Taq polimeraze. Pri uporabi 10 µl Taq polimeraze pa pomnoževanje ni potekalo tako uspešno, verjetno zaradi premajhne količine le te. S pomočjo specificiranih vrednosti talilnih temperatur s strani proizvajalca smo nato identificirali pomnožene pridelke. Izmerjeni rezultati talilnih temperatur, ob uporabi obeh količin Taq polimeraze, so bili blizu specificiranih vrednosti in medsebojno primerljivi. Vrsti *B. burgdorferi* sensu stricto in *B. afzelii* sta bili pri uporabi 50 µl Taq polimeraze identificirani v 100 %, *B. garinii* pa v 50 %. Pri uporabi 10 µl Taq polimeraze smo zaznali identifikacijo *B. burgdorferi* sensu stricto v 75 % in *B. afzelii* v 86,95 %, medtem, ko smo pri *B. garinii* zaznali identifikacijo v 82,75 %. Takšne rezultate pri identifikaciji *B. garinii*, lahko pripišemo nespecifičnemu pomnoževanju heterogene DNA *B. garinii*. Med posamezno identifikacijo borelijske vrste smo poleg specifične talilne temperature posamezne vrste, zaznali še nespecifično talilno temperaturo in talilno temperaturo, ki pripada drugi borelijski vrsti. Do identificiranih talilnih temperatur, ki pripadajo drugi borelijski vrsti je prišlo, ker ima gen *ospA* med različnimi sevi znotraj vrste le 80 % homologijo. Z raziskavo smo potrdili, da izbira začetnega oligonukleotida na *ospA* genu ni optimalna izbira za identifikacijo borelijskih vrst.

Vsebina

Kazalo slik.....	VI
Kazalo preglednic.....	VII
Seznam okrajšav.....	VIII
1 UVOD	1
1.1 ZAČETKI LYMSKE BORELIOZE.....	1
1.2 EPIDEMIOLOŠKA IN GEOGRAFSKA RAZŠIRJENOST LYMSKE BORELIOZE	1
1.2.1 Epidemiološka in geografska razširjenost lymске borelioze v Sloveniji	2
1.3 ZNAČILNOSTI KLOPOV	3
1.4 POVZROČITELJICA LYMSKE BORELIOZE – <i>B. burgdorferi</i> sensu lato.....	6
1.4.1 Taksonomija borelij	6
1.4.2 Zgradba in lastnosti borelij	8
1.4.3 Borelijski genom in kromosom.....	10
1.4.4 Borelijski plazmidi.....	11
1.4.5 Lipoprotein OspA	11
1.5 LYMSKA BORELIOZA.....	12
1.5.1 Patogeneza in klinična slika lymске borelioze.....	12
1.5.2 Diagnoza lymске borelioze.....	14
1.5.3 Diagnostične metode.....	14
1.5.3.1 Osamitev borelij.....	14
1.5.3.2 Serološke metode	15
1.5.3.3 Molekularne metode.....	15
1.5.3.3.1 PCR v realnem času	16
1.5.4 Zdravljenje lymске borelioze.....	20
1.5.5 Preprečevanje.....	20
2 NAMEN DELA	22
3 MATERIALI IN METODE	23
3.1 MATERIALI	23
3.1.1 Vzorci.....	23
3.1.2 Kulture bakterij <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	23
3.2. METODE.....	23
3.2.1 Izolacija borelij iz kužnin.....	24
3.2.2 Izolacija DNA iz kulture	25
3.2.3 Pomnoževanje DNA v realnem času.....	25
3.2.3.1 Opredelitev vrste borelij glede na <i>hbb</i> gen	25
3.2.3.2 Opredelitev vrste borelij glede na <i>ospA</i> gen	26
3.2.3.2.1 Predstavitev diagnostičnega kompleta LightMix	26
3.2.3.2.2 Postopek priprave LightCycler reakcijske mešanice	27
3.2.3.2.3 Potek pomnoževanja v realnem času na LightCycler-ju.....	29
3.2.3.2.4 Način detekcije PCR pridelkov na LightCycler-ju	29
3.2.3.2.5 Analiza rezultatov PCR.....	30
3.2.3.2.6 Analiza rezultatov	30
4 REZULTATI.....	31
4.1 IDENTIFIKACIJA BORELIJSKIH SEVOV GLEDE NA GEN <i>hbb</i>	31
4.2 IDENTIFIKACIJA BORELIJSKIH SEVOV GLEDE NA GEN <i>ospA</i>	31

4.2.1 Rezultati identifikacije <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto pridobljene z metodo PCR v realnem času z začetnimi oligonukleotidi za zunanjo površinsko beljakovino ospA	31
4.2.1.1 Rezultati identifikacije <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto pri uporabi 50 µl Taq polimeraze	32
4.2.1.2 Rezultati identifikacije <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto pri uporabi 10 µl Taq polimeraze	33
4.2.2 Rezultati identifikacije <i>B. garinii</i> pridobljeni z metodo PCR v realnem času z začetnimi oligonukleotidi za zunanjo površinsko beljakovino ospA	34
4.2.2.1 Rezultati identifikacije <i>B. garinii</i> pri uporabi 50 µl Taq polimeraze	35
4.2.2.2 Rezultati identifikacije <i>B. garinii</i> pri uporabi 10 µl Taq polimeraze	37
4.2.3 Rezultati identifikacije <i>B. afzelii</i> pridobljeni z metodo PCR v realnem času z začetnimi oligonukleotidi za zunanjo površinsko beljakovino ospA	39
4.2.3.1 Rezultati identifikacije <i>B. afzelii</i> pri uporabi 50 µl Taq polimeraze	39
4.2.3.2 Rezultati identifikacije <i>B. afzelii</i> pri uporabi 10 µl Taq polimeraze	40
5 RAZPRAVA	43
6 SKLEPI	46
7 LITERATURA.....	47

Kazalo slik

Slika 1: Razširjenost lymške borelioze in klopov, ki borelije prenašajo (7).....	2
Slika 2: Okuženost gozdnih klopov <i>I. ricinus</i> po Sloveniji (13).....	3
Slika 3: Različne razvojne stopnje klopa (20).	5
Slika 4: Prikaz življenjskega cikla klopov <i>Ixodes</i> spp. s parazitiranjem na človeku in na živalih ter prenos različnih borelijskih vrst iz ene faze v drugo in na gostitelje (9).	5
Slika 5: Razvrstitev spirohet v red, družino in rod (22).....	6
Slika 6: <i>B. burgdorferi</i> sensu lato (26).	8
Slika 7: Struktura <i>B. burgdorferi</i> sensu lato (27).	9
Slika 8: Spiroheta <i>B. burgdorferi</i> sensu lato v temnem polju (30).	10
Slika 9: Prijavljeni primeri lymške borelioze v Sloveniji (10).	12
Slika 10: Krivulje pomnoževanja pri verižni reakciji polimeraze v realnem času.....	17
Slika 11: Nespecifičen način detekcije pridelkov PCR v realnem času s SYBR Green I.....	18
Slika 12: Specifičen način detekcije pridelkov PCR v realnem času s TaqMan sondo.	19
Slika 13: Specifičen način detekcije pridelkov PCR v realnem času z hibridizacijsko sondo.....	19
Slika 14: Prikaz poteka dela.	24
Slika 15: Vstavljanje kapilar v krožno stojalo aparata.	29

Kazalo preglednic

Preglednica I: Patogene vrste borelij za človeka ter njihova razširjenost po svetu (12, 24).....	7
Preglednica II: Nepatogene vrste borelij za človeka ter njihova razširjenost po svetu (12, 24).....	8
Preglednica III: Bolezenski znaki zgodnje in pozne oblike bolezni (35).....	13
Preglednica IV: Program za pomnoževanje in analizo pomnožkov pri metodi pomnoževanja v realnem času glede na <i>hbb</i> gen	26
Preglednica V: Prikaz vrste borelij in njihovo število glede na gen <i>hbb</i>	31
Preglednica VI: Rezultati identifikacije pri <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto glede na Tm, gen <i>hbb</i> in <i>ospA</i>	32
Preglednica VII: Rezultati identifikacije pri <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto glede na Tm, gen <i>hbb</i> in <i>ospA</i>	33
Preglednica VIII: Rezultati identifikacije pri <i>B. garinii</i> glede na Tm, gen <i>hbb</i> in <i>ospA</i>	35
Preglednica IX: Rezultati identifikacije pri <i>B. garinii</i> glede na Tm, gen <i>hbb</i> in <i>ospA</i>	37
Preglednica X: Rezultati identifikacije pri <i>B. afzelii</i> glede na Tm, gen <i>hbb</i> in <i>ospA</i>	39
Preglednica XI: Rezultati identifikacije pri <i>B. afzelii</i> glede na Tm, gen <i>hbb</i> in <i>ospA</i>	41

Seznam okrajšav

DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
Osp	zunanja površinska beljakovina (angl. outer surface protein)
kDa	kilodalton (angl. kilodalton)
kB	kilo-baza (angl. kilobase)
bp	bazni par (angl. base pair)
Mb	mega-baza (angl. mega base)
EM	angl. erythema migrans
ACA	kronični atrofični akrodermatitis (angl. Acrodermatitis Chronica Atrophicans)
MKP	spremenjeno Kellyevo gojišče za kultivacijo borelij (angl. modified Kelly Pettenkofer)
BSK	močno obogateno gojišče za kultivacijo borelij (okrajšava za Barbour, Stoenner, Kelly)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
T _m	talilna temperatura (angl. melting temperature)

1 UVOD

1.1 ZAČETKI LYMSKE BORELIOZE

V mestu Lyme v ameriški zvezni državi Connecticut so leta 1975, poročali o večjem izbruhu revmatoidnega artritisa pri otrocih. Kasnejše raziskave so pokazale, da je glavni povzročitelj artritisa bakterija (*Borrelia burgdorferi*) katere prenašalec je klop (*Ixodes* spp.) (1). Leta 1982 je Willy Burgdorfer prvič opisal borelije (2), ki so jih izolirali in jih kultivirali na modificiranem Kellyevem gojišču (3). Leta 1984 pa so bakterijo uvrstili v rod *Borrelia* in jo poimenovali po odkritelju *B. burgdorferi* (4). Sprva so vse izolate poimenovali *B. burgdorferi*, vendar so z natančnejšimi analizami dokazali, da gre za več vrst in ne samo za eno vrsto *B. burgdorferi* (5). Lymska borelioza je tako postala ena pogostejših okužb, ki jo prenašajo klopi, prepoznana kot prenosljiva bolezen v Ameriki kakor tudi v Evropi (6).

1.2 EPIDEMIOLOŠKA IN GEOGRAFSKA RAZŠIRJENOST LYMSKE BORELIOZE

Lymska borelioza kot zoonoza je razširjena predvsem v severni zemeljski polobli in jo povzroča *B. burgdorferi* sensu lato (sensu lato - v širokem pomenu). Zajema mnoga območja Evrope, Amerike in nekatere države Azije (Kitajska, Japonska) (1, 5). V Evropi se največje število primerov okužbe pojavlja v Srednji Evropi (najpogosteje v Avstriji in Sloveniji) in Skandinaviji (najpogosteje na Švedskem) (5, 7). V pasu od 33° do 65° severne širine, kjer so razširjeni ščitasti klopi se nahaja več borelijskih vrst. Za Severno Ameriko je značilna samo ena vrsta borelije *B. burgdorferi* sensu stricto (sensu stricto – v ozkem pomenu), med tem, ko lymsko boreliozo v Evropi povzročajo najmanj štiri vrste: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto in *B. spielmanii* (8, 29). Razširjenost lymske borelioze je sorazmerna s področji razširjenosti klopov. Klopi kompleksa *Ixodes* spp. so v vseh razvojnih stadijih glavni prenašalci borelij (3, 5). Tako poznamo štiri pomembne vrste klopov iz kompleksa *Ixodes*: *I. ricinus* (Evropa), *I. persulcatus* (Vzhodna Evropa in Azija),

I. scapularis (severovzhodni, centralni in atlantski del ZDA) in *I. pacificus* (zahodni del ZDA in Kanade) (5, 7). Slika 1 prikazuje porazdelitev teh štirih vrst in področja lymške borelioze. Incidenca bolezni se po svetu razlikuje, saj je odvisna od gostote razširjenosti klopov, živalskih rezervoarjev primernih za *B. burgdorferi* sensu lato, življenjskega okolja in načina življenja področnih prebivalcev (9).



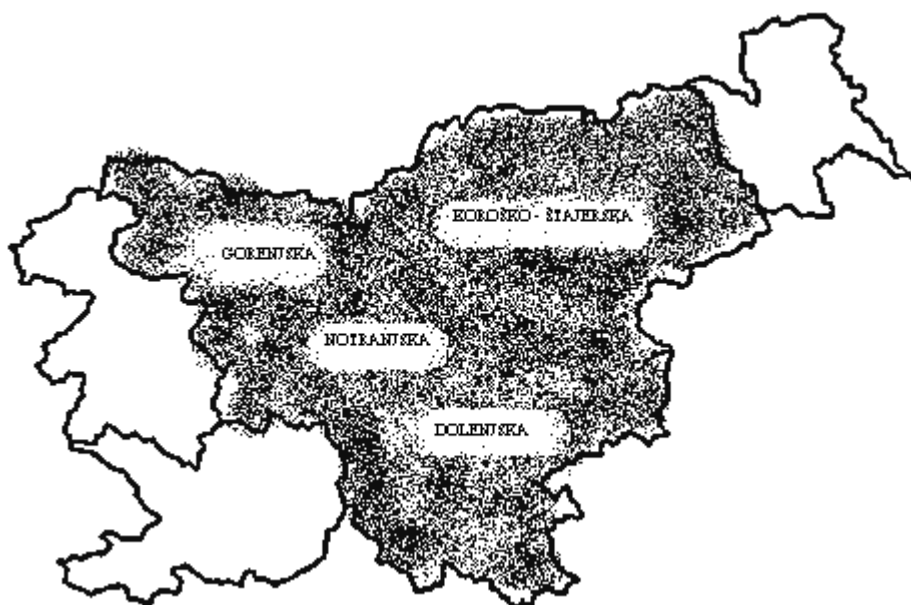
Slika 1: Razširjenost lymške borelioze in klopov, ki borelije prenašajo (7).

1.2.1 Epidemiološka in geografska razširjenost lymške borelioze v Sloveniji

Celotna Slovenija je zelo bogata z gozdovi, posledično temu pa tudi s klopi. Prav zaradi tega spada med endemična območja lymške borelioze. V Sloveniji zato poteka od leta 1986 obvezna prijava (registracija) lymške borelioze, v Ameriki pa je pričela potekati od leta 1991 (10, 11). Iz števila prijavljenih primerov je razvidno, da je v Sloveniji letno na novo registriranih okoli 3000 do 5000 bolnikov, kar dokazuje, da se število bolnikov v Sloveniji iz leta v leto povečuje. Lymška borelioza je takoj za vodenimi kozami uvrščena v drugo najpogostejšo infektivno obolenje. Bolezen zajame ljudi vseh starosti in obeh spolov, vendar je na podlagi raziskovanj razvidno, da v Sloveniji zbolijo več žensk kot moških (10).

Bakterijo *B. burgdorferi* sensu lato, ki povzroča lymsko boreliozo, prenašajo klopi s svojim ugrizom. V Sloveniji je vrsta gozdnega klopa *I. ricinus* najbolj pogosta in velja za glavni vektor za do sedaj znane za človeka patogene vrste. Te so: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto in *B. spielmanii* (12). Okuženost klopov je možno zaznati predvsem v gozdovih Gorenjske, Koroške in Štajerske, nekoliko manj pa na Kočevskem, Notranjskem in Novomeškem območju (slika 2) (13). Z epidemiološkim in kliničnim raziskovalnim delom so slovenski raziskovalci dokazali, da (3):

- Slovenija spada v endemično območje,
- razširjenost klopov zajema skoraj celotno Slovenijo in
- polovica odraslih klopov je že okužena z borelijami.



Slika 2: Okuženost gozdnih klopov *I. ricinus* po Sloveniji (13)

1.3 ZNAČILNOSTI KLOPOV

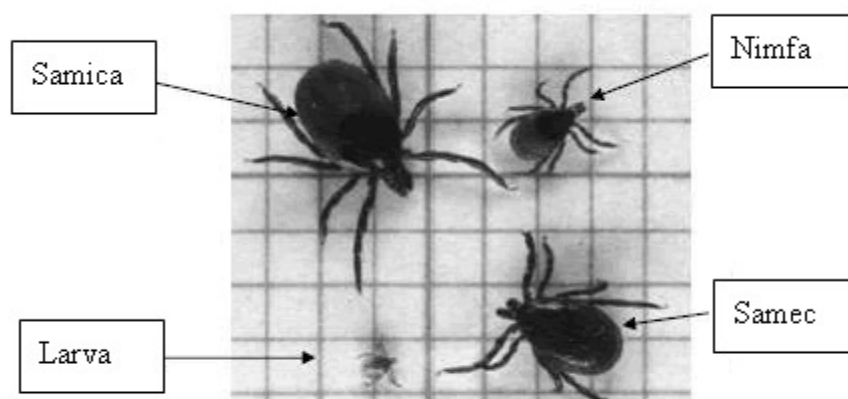
Glavni prenašalci borelij so različni ščitasti klopi, predvsem klopi iz rodu *Ixodes* spp., ki se okužijo na vretenčarjih (sesalci, plazilci in ptice). Klopi prenašajo borelije s parazitiranjem na živalih ter na takšen način širijo okužbo tudi na človeka (7, 14). Po svetu je poznanih veliko vrst klopov, ki so značilni za določena območja (7, 9). V Sloveniji prenaša klop vrste *I. ricinus* povzročitelja dveh najpogostejših in endemičnih bolezni, lymške borelioze

in klopnega meningoencefalitisa. S številčnostjo klopov se povečuje pogostost lymške borelioze po svetu in tudi pri nas (15, 16).

Za preživetje potrebuje klop primerne gostitelja, od 92 do 95 % relativno vlažnost in temperaturo okolja med 14 in 24 °C. Kadar nastopijo mile zime in vlažne pomladi, se dejavnost klopov ohrani in ojača (17, 18). Njihovo aktivnost je mogoče zaznati vse od februarja pa do novembra, najbolj pa maja, junija in septembra (10, 9). Klopi se nahajajo v gozdni podrasti – grmovju, vlažnih mešanih gozdovih, travi, listju in preperelih štorih (9). Najdemo jih vse do nadmorske višine 1000 m (17).

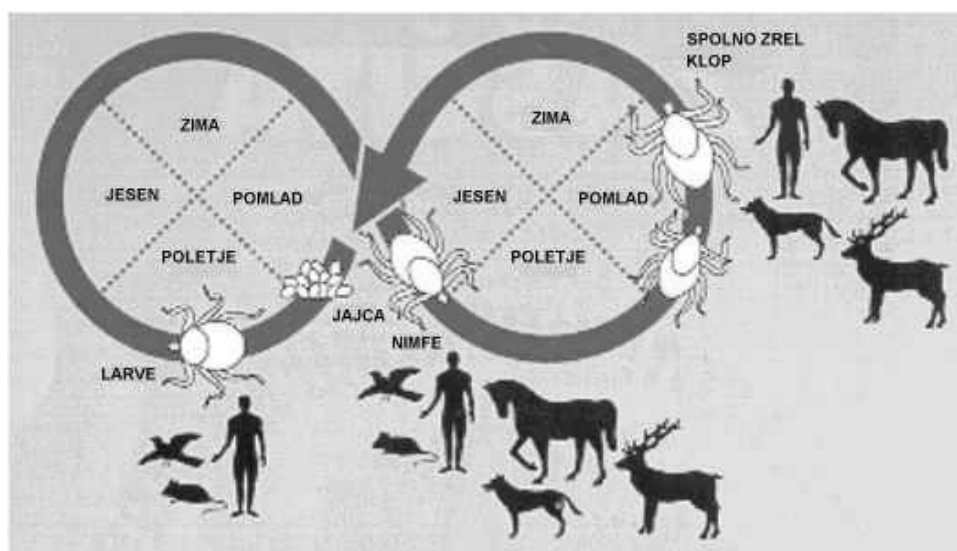
Rezervoar *B. burgdorferi* sensu lato, predstavljajo različne divje in domače živali. Med najpomembnejše predstavnike živalskega rezervoarja za *B. burgdorferi* sensu lato sodijo mali sesalci in ptice (14). V Connecticutu v ZDA sodijo med najpomembnejše gostitelje mali glodavci, predvsem miši, kjer je bila okuženost na endemičnem območju kar 75 do 100 % (13). V Sloveniji sta najpogosteje okuženi vrsti gozdna voluharica in rumenogrla miš, med ptičjimi predstavniki pa so okuženi kosi, taščice, črnoglavke in galebi. Te živali imajo sposobnost vzdrževanja borelij in prenosa okužbe na klope (14).

Življenjski cikel klopa traja od 2 do 3 leta, v hladnejših območjih pa tudi od 5 do 6 let. Dolžina razvojnega cikla je odvisna od temperaturnih razmer, sezone v kateri se klop nahaja in razpoložljivosti gostiteljev (7). Klopi imajo štiri razvojne stopnje in sicer: iz jajčec se razvijejo v larve (s tremi pari nog in so s prostim očesom skoraj nevidne), nato se preobrazijo v nimfo (štirje pari nog, velikost za bučino glavo), ta pa v odraslega klopa. Samice (rdečkast zadek), so večje od samcev (črne barve) (7, 19). Slika 3 prikazuje razvojne stopnje klopa (20). Velika večina bolnikov z lymsko boreliozo se pika klopa ne spominja, saj *B. burgdorferi* sensu lato ne prenašajo le odrasli klopi, temveč tudi vse zgodnje razvojne oblike. Klopi v zgodnjih razvojnih oblikah so tako majhni, da jih ljudje velikokrat spregledajo (16).



Slika 3: Različne razvojne stopnje klopa (20).

Klopi si morajo v vsaki stopnji razvoja poiskati primerne gostitelja in piti kri (7, 21). Pri tem imajo veliko možnost okužbe in prenosa borelij na naslednje gostitelje. S tem ohranjajo in vzdržujejo kronične okužbe, kljub njihovem imunskemu sistemu. Larve in nimfe se hranijo predvsem na majhnih sesalcih, pticah, glodavcih, pa tudi na človeku. Odrasli klopi raje gostujejo na velikih ali srednje velikih sesalcih, kot so na primer srnjad, človek in manj pogosto na pticah (Slika 4 4) (9).



Slika 4: Prikaz življenjskega cikla klopotov *Ixodes* spp. s parazitiranjem na človeku in na živalih ter prenos različnih borelijskih vrst iz ene faze v drugo in na gostitelje (9).

povzročitelji lymške borelioze. Razdeljene so na podlagi razlik med ekološkimi in genetskimi značilnostmi (5, 23).

Lymsko boreliozo povzročajo bakterije iz kompleksa *B. burgdorferi* sensu lato. Glede na homologijo molekule DNA je do sedaj opredeljenih 12 vrst. Vsaka od teh vrst je različno razporejena po severni polobli, različno povezana z vektorji in gostitelji. Te so *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bissettii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. andersonii*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. japonica*, *B. spielmanii* in *B. sinica* (12). Preglednica I prikazuje pogoste in redke borelijske vrste, katere so bile dokazane kot patogene za človeka, ter njihova razširjenost po svetu (12).

Preglednica I: Patogene vrste borelij za človeka ter njihova razširjenost po svetu (12, 24).

PATOGENE VRSTE BORELIJ ZA ČLOVEKA		OBMOČJA
Pogoste	<i>B. afzelii</i>	Evropa in ponekod v Aziji
	<i>B. garinii</i>	Evropa in ponekod v Aziji
	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	Evropa in severna Amerika
Redke	<i>B. bissettii</i>	Severna Amerika in Slovenija redko
	<i>B. lusitaniae</i>	Portugalska in Tunizija, redko osrednja in vzhodna Evropa
	<i>B. spielmanii</i>	Osrednja Evropa

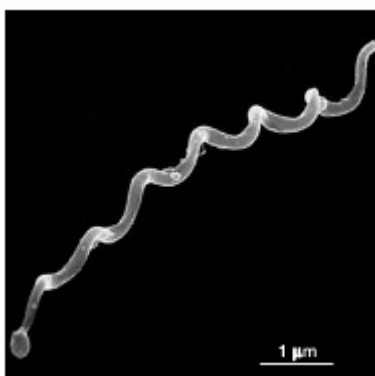
Preostale borelijske vrste, ki jih prenašajo klopi iz rodu *Ixodes* naj nebi povzročale okužbe pri človeku, izolirali so jih le pri klopih in živalih. Preglednica II prikazuje nepatogene borelijske vrste ter njihovo razširjenost po svetu (12).

Preglednica II: Nepatogene vrste borelij za človeka ter njihova razširjenost po svetu (12, 24).

NEPATOGENE VRSTE BORELIJ ZA ČLOVEKA	OBMOČJA
<i>Borrelia valaisiana</i>	Osrednja Evropa, Irska, Velika Britanija in Nizozemska in Slovenija
<i>Borrelia japonica</i>	Japonska
<i>Borrelia sinica</i>	Kitajska
<i>Borrelia tanukii</i>	Japonska
<i>Borrelia turdi</i>	Japonska
<i>Borrelia andersonii</i>	Severna Amerika

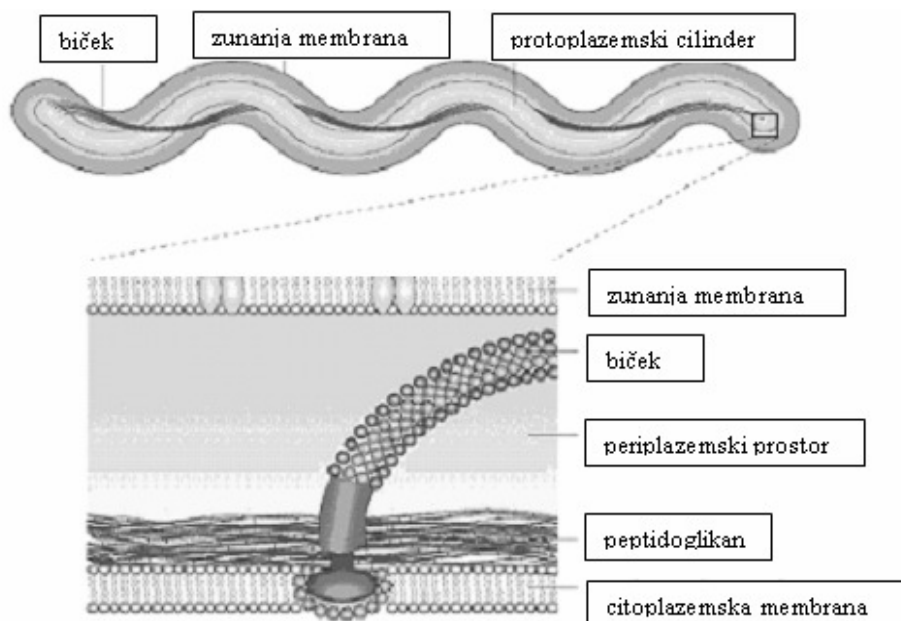
1.4.2 Zgradba in lastnosti borelij

Borelije so spiralno zavite bakterije imenovane tudi zajedalske spirohete (25). Spirohete se od ostalih prokariontov razlikujejo po morfoloških, strukturnih, ekoloških in genetskih značilnostih. So zelo dolgi in tanki organizmi. V dolžino dosežejo od 8 μm do 30 μm , v širino pa od 0,2 do 0,3 μm (slika 6). Celična dolžina je odvisna od starosti bakterije, hranilnega medija ali živali v kateri se borelija nahaja (23).



Slika 6: *B. burgdorferi* sensu lato (26).

Bakterija je zgrajena iz zunanje celične membrane, ta obdaja protoplazmični cilindrični kompleks, sestavljen iz citoplazme, notranje celične membrane in peptidoglikana. Slika 7 prikazuje strukturo *B. burgdorferi* sensu lato.

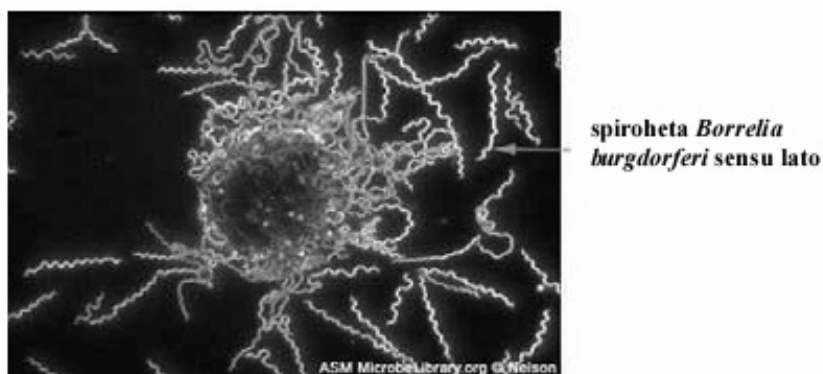


Slika 7: Struktura *B. burgdorferi* senus lato (27).

Zunanja membrana kaže izredno fluidnost; vsebuje transmembranske in zunanje površinske beljakovine (ang. - outer surface protein; osp). Te beljakovine so obrnjene navzven in so vir borelijskih antigenov, kar posledično pri ljudeh sproža nastajanje specifičnih protiteles. Zunanja membrana borelij je zelo podobna membranam po Gramu negativnih bakterij. Od njih se razlikuje po večji količini beljakovin in zelo majhni količini lipopolisaharidov (24).

Značilno obliko in gibanje jim omogočajo bički, ki se nahajajo v periplazemskem prostoru, kot prikazuje slika 7 (24, 27). Bički so vstavljeni na vsak konec protoplazmičnega cilindra in se prekrivajo v sredini. Borelijski bički imajo enako zgradbo kot bički drugih bakterij in so vstavljeni subterminalno in bipolarno. Posamezne borelije imajo od 7 do 11 bičkov. Ti omogočajo borelijam gibanje na tri načine: obračanje, svedrasto zavijanje in upogibanje na mestu (23, 24). Protoplazmični cilindar in bički so obdani s fleksibilno zunanjo membrano. Takšna razporeditev dovoljuje spirohetam gibljivost, celo v okolici visoke viskoznosti, pri čemer bi bile druge bakterije imobilizirane (11, 28).

Borelije so mikroaerofilne bakterije, ki rastejo v anaerobnih pogojih pri 30 do 34 °C. Gojenje poteka na kompleksnem tekočem gojišču, bogatem z zajčjim serumom, serumskimi albumini in želatino. So zelo počasi rastoče bakterije, saj njihov podvojitveni čas traja od 7 do 20 ur (21, 24). Ta je odvisen od prilagoditve borelij na umetni medij. Najlažje jih opazujemo z mikroskopiranjem v temnem polju (slika 8). Načeloma so borelije biokemijsko slabo aktivne. K boljši rasti pripomorejo glukoza, fruktoza, maltoza, trehaloza in rafinoza (9, 23). Zaradi naštetih značilnosti je kultivacija borelij počasna, intenzivna in draga (29).



Slika 8: Spiroheta *B. burgdorferi sensu lato* v temnem polju (30).

1.4.3 Borelijski genom in kromosom

B. burgdorferi sensu lato ima v primerjavi z drugimi prokarionti nenavadno strukturo genoma (3, 5, 11, 24). Sestavljena je iz linearnega kromosoma in različnega števila krožnih in linearnih plazmidov (3, 5, 28). Za določanje vrste se uporabljajo metode z analizo kromosomske ali plazmidne DNA (rezanje celotne DNA z različnimi restrikcijskimi encimi, pomnoževanje, hibridizacija, restrikcija, ali sekveniranje izbranega odseka DNA) (5). Posebnost borelij je kljub majhnemu genomu sposobnost prilagajanja v različnih gostiteljih. Takšne nenavadne lastnosti so povezane z velikim številom plazmidov (27).

Borelijski kromosom je eden najmanjših linearnih kromosomov pri bakterijah. Njegova velikost se giblje od 935 do 960 kb (skoraj 1 Mb) in je v primerjavi z 4700 kb velikim

genomom bakterije *Escherichia coli* resnično majhen. Borelije so ene izmed redkih bakterij in edine med spirohetami ki imajo linearen kromosom (3, 5, 27).

1.4.4 Borelijski plazmidi

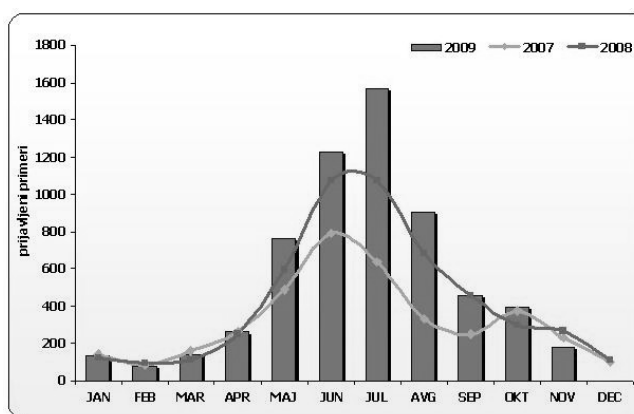
Plazmidi predstavljajo precejšen del borelijskega genoma. Med bakterijskimi vrstami so borelije znane po največjem številu plazmidov (24). Poznana sta dva tipa borelijskega plazmida: krožni in linearni, ki skupaj sestavljata okoli 613,000 bp. Skoraj vsi borelijski sevi vsebujejo po en velik linearen plazmid in različno število majhnih plazmidov (12). Posamezne seve borelij razlikujemo med seboj na podlagi števila in velikosti plazmidov (11, 27). Na plazmidih se nahajajo geni, ki kodirajo zunanje površinske proteine (osp). Poznanih je kar nekaj zunanjih površinskih proteinov: ospA, ospB, ospC, ospD, ospE in ospF. Ti igrajo pomembno vlogo v patogenosti lymške borelioze (24, 27).

1.4.5 Lipoprotein OspA

OspA je eden glavnih zunanjih membranskih lipoproteinov *B. burgdorferi* sensu lato. Uporablja se pri serološki diagnostiki, kot tudi pri razvoju cepiv (31). Molekularna masa OspA se med sevi *B. burgdorferi* sensu lato giblje od 31 do 34 kDa. Gen *ospA* je prisoten v skoraj vseh izolatih *B. burgdorferi* sensu lato (5, 24). Sekvenčna analiza *ospA* gena prikazuje homogenost znotraj sevov *B. burgdorferi* sensu stricto in *B. afzelii* in razkriva večje podskupine znotraj seva *B. garinii* (32).

1.5 LYMSKA BORELIOZA

Prvič je bila opisana v zgodnjih sedemdesetih letih na severovzhodu Amerike, kot skupek bolezenskih znakov. Spada med okužbe s spremenljivimi kliničnimi manifestacijami (28). Označena je kot kronična sistemska bolezen, saj prizadene različne organe in organske sisteme. Slika 9 jasno kaže sezonsko pojavljanje okužbe (10).



Slika 9: Prijavljeni primeri lymške borelioze v Sloveniji (10).

1.5.1 Patogeneza in klinična slika lymške borelioze

Patogeneza lymške borelioze je še vedno slabo pojasnjena, zaradi tega, ker (33):

- poznamo njen vzrok razmeroma malo časa,
- živalski modeli slabo oziroma nepopolno posnemajo razmere pri ljudeh,
- jo povzročajo različne borelijske vrste in
- so borelije znotraj vrste zelo raznolike.

Prav tako nastanejo težave pri postavljanju zanesljive diagnoze bolezni, zaradi raznolikih kliničnih simptomov in omejitev pri dokazovanju borelijske okužbe (33). Borelijska okužba pri ljudeh lahko poteka brez simptomov, lahko pa prizadene številne organe in organske sisteme. Glede na raznolik potek simptomov borelijsko okužbo delimo v zgodnje in pozno obdobje, zgodnje obdobje pa še na lokalizirano in razširjeno. Pozno obdobje je tudi kronično obdobje lymške borelioze (15, 25). Preglednica III prikazuje delitev na

obdobja. Po vbodu klopa se na mestu vboda po nekaj dneh razvije najbolj znan in pogost kliničen znak bolezni - erythema migrans in to pri kar 90 % okuženih (28). Značilno rdečino na mestu vboda lahko spremljajo še vročina, glavobol in utrujenost (34). Če se okužba ne pozdravi, se lahko borelije širijo v različne organe. Temu sledijo kronične motnje kot so zapleti na srcu, živčevju, očeh, jetrih, limfnem sistemu, ledvicah in kasneje na sklepih (arthritis) (11, 28, 34). Pri veliki večini bolnikov se bolezenski znaki ne izrazijo v celoti (35). Znaki bolezni so deloma odvisni od vrste povzročitelja. Tako *B. garinii* največkrat povzroča okvare živčevja (neuroborelioza), *B. afzelii* pa je povezana s kožnimi manifestacijami (eritema migrans in acrodermatitis chronica atrophicans), *B. burgdorferi* sensu stricto pa z artritidom (8, 36, 37).

Preglednica III: Bolezenski znaki zgodnje in pozne oblike bolezni (35).

OBDOBJE BOLEZNI	KLINIČNI ZNAKI IN PRIZADETOST ORGANA		ZAČETEK	TRAJANJE
ZGODNJE			(po okužbi)	(brez zdravljenja)
1. stadij: Lokalizirana okužba	EM	koža	nekaj dni - tednov	nekaj tednov - mesecev
	borelijski limfocitom			
2. stadij: Diseminirana okužba	multipli EM			
	neuroborelioza	živčevje in možgani	nekaj tednov - mesecev	več mesecev
	prizadetost srca (motnje ritma, mio/perikarditis)			nekaj tednov
prizadetost sklepov (arthritis)			več mesecev	več mesecev
POZNO			(po okužbi)	(brez zdravljenja)
3. stadij: Kronična prizadetost	sklepov (arthritis)		vsaj 6 (12) mesecev*	neomejeno
	živčevja (meningitis, prizadetost perifernih živcev)			
	kože (ACA)		več mesecev do let**	

EM = erythema migrans; ACA = acrodermatitis chronica atrophicans; * po prvih simptomih; ** po okužbi

Pri okužbi z *B. burgdorferi* sensu lato je znano, da lahko ta ostane v organizmu in je niti antibiotik niti aktiviran imunski odziv ne uspeša zatreti. Še vedno pa ni povsem jasno kako ji to uspe. Eni so mnenja in vzrok temu pripisujejo umiku borelij v tako imenovane

imunsko privilegirane predele organizma ali spremembi antigenske strukture borelije. Tako je možno, da borelijska okužba poteka tudi v primeru odsotnosti imunskega odziva (3, 33).

1.5.2 Diagnoza lymške borelioze

Diagnoza je osnovana na kliničnih predstavitev (simptomi, telesne ugotovitve), anamnezi (možnosti izpostavljanja okuženim klopom) in ob pomoči laboratorijskih rezultatov (28, 34). Samo diagnosticiranje, če se ne kaže erythema migrans, je zelo težko, saj njeni simptomi in znaki oponašajo mnogo drugih bolezni. Prav zaradi tega se okužbo v velikih primerih odkrije z zamudo, ko je ta že napredovala. Zanimivo, da kar 87 % obolelih za lymsko boreliozo ne kaže simptomov. Neposredno zaznavanje okužbe je najbolj uspešno z zgodnjimi kožnimi manifestacijami (erythema migrans) in te se ponavadi klinično diagnosticirajo (11, 37). Pri vseh drugih oblikah borelioze kadar klinična slika ni jasna, pa je potrebna za potrditev bolezni nadaljna laboratorijska diagnostika.

1.5.3 Diagnostične metode

Za dokazovanje okužbe z *B. burgdorferi* sensu lato lahko izvajamo posredne ali neposredne laboratorijske metode, pri čemer ima vsaka metoda svojo specifičnost in občutljivost.

Metode s katerimi dokazujemo lymsko boreliozo so (11):

- osamitev borelij v gojišču,
- serološke metode (encimsko-immunske, imunofluorescentne ali immuno-blot) in
- molekularne metode.

1.5.3.1 Osamitev borelij

Osamitev in gojenje borelij na umetnem gojišču se še vedno rutinsko izvaja kljub nekaterim pomanjkljivostim, ki jih ima metoda. Izolacija borelij iz kliničnih vzorcev

poteka na gojišču MKP (MPK - angl. modified Kelly Pettenkofer) ali BSK (okrajšava za Barbour, Stoenner, Kelly). Gojišče je obogateno s pomembnimi sestavinami, kot je gradbena surovina peptidoglikana, N-acetilglukozamin, želatina, goveji serumski albumin, zajčji serum in natrijev bikarbonat (23). Gojenje na takšnih gojiščih poteka precej dolgo (traja najmanj 9 tednov) zaradi počasi rastočih borelij in njihovega prilagajanja umetnemu mediju. Pomanjkljivost metode se kaže tudi v kompleksni sestavi gojišča, visoki ceni in nizki občutljivosti metode za nekatere kužnine (38).

1.5.3.2 Serološke metode

S serološkimi testi dokazujemo specifična protitelesa IgM in IgG proti *B. burgdorferi* sensu lato (16, 38). Rezultati seroloških testov lahko pripomorejo pri kliničnih diagnozah. Prva omejitev tega testiranja je ta, da je njegova zanesljivost problematična v zgodnji obliki okužbe, saj se v večini primerov kaže kot negativna. Druga je ta, da lahko borelijska protitelesa ostanejo zaznavna leta po okužbi in tako pride do dvomov ali gre za aktivno ali preteklo okužbo. Sporno je tudi zdravljenje z antibiotiki, če so serološki testi pozitivni in je oseba brez kliničnih znakov okužbe (11). Serološki testi lahko dajejo negativen rezultat v zgodnji obliki borelijske okužbe, pri kronični obliki pa so skoraj vedno pozitivni (37, 38). Serološke preiskave omogočajo skupaj z ustreznimi kliničnimi manifestacijami visoko diagnostično specifičnost (38).

1.5.3.3 Molekularne metode

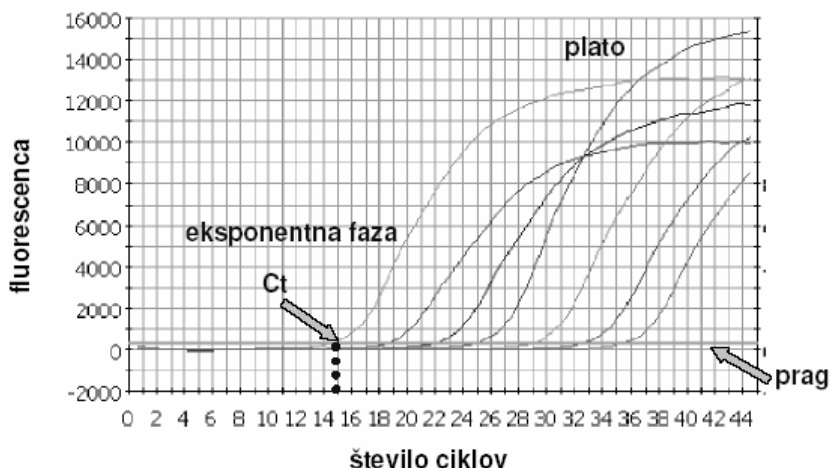
Molekularne metode za dokazovanje borelijske DNA so ene izmed najnovejših. V današnjem času se predstavljajo kot ene izmed močnih orodij na področju molekularne biologije (39). Tako je PCR (ang. – polymerase chain reaction; PCR) metoda postala nepogrešljiva pri uporabi in diagnosticiranju lymške borelioze z neposrednim odkrivanjem DNA *B. burgdorferi* sensu lato v različnih vzorcih (koža, tkivo, cerebrospinalna tekočina, kri, sinovialna tekočina) kot tudi v okuženih klopah (11, 36, 40). Prednost te metode je tudi v tem, da za analizo zadostuje že zelo majhna količina vzorca (39). Princip temelji na pomnoževanju tarčnih odsekov DNA ali dela borelijskega genoma v več tisočih kopijah

(41). Ojačan signal nam uspešno nakazuje prisotnost patogene bakterije s pomočjo merjenja fluorescence (39). Prednosti PCR metode se kažejo v njegovi večji občutljivosti in v hitrejši izvedbi v primerjavi s kultivacijo (42). PCR so razvili ne samo, da potrdi prisotnost borelijske DNA v vzorcih ampak tudi, da opredeli vrsto borelije v vzorcu.

1.5.3.3.1 PCR v realnem času

Nedavno je bil PCR v realnem času uveden pri diagnozi lymške borelioze. Ta metoda je hitra, občutljiva in tudi specifična ter ima zaradi zaprtega sistema majhno možnost kontaminacije (36). Metoda omogoča hitro obdelavo velikega števila vzorcev in ne zahteva nobenega dela po končani reakciji. Edine slabosti te tehnike so visoki začetni stroški in nezmožnost določevanja velikih pomnožkov (43).

PCR v realnem času omogoča kontinuirano merjenje količine pridelka v posameznem ciklu med samo reakcijo. Takšno merjenje nam omogoči, da določimo količino pridelka, ko je reakcija še v eksponentni fazi (39). Merjenje količine pridelka temelji na merjenju fluorescence. Na osnovi izmerjenih podatkov se izriše krivulja, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov, kot prikazuje slika 10. Na eksponentnem delu krivulje določimo linijo fluorescenčnega praga, ki predstavlja tisto intenziteto fluorescence, ki je značilno večja od fluorescence ozadja. Nato za vsak vzorec določimo cikel, pri katerem izmerjena fluorescenca preseže ta prag. Pri večjem začetnem številu kopij matrice signal prej preseže linijo fluorescenčnega praga in zato določimo nižje število ciklov (44). Specifičnost pomnoženega pridelka se lahko preverja z analizo talilne temperature (angl. Melting temperature – T_m). T_m je opredeljena kot temperatura, pri kateri je polovica pomnožene DNA v enoverižni in polovica DNA v dvoverižni obliki. Na T_m vpliva tudi zaporedje nukleotidov. Na koncu pomnoževanja računalniški program za vsak vzorec izriše graf in določi T_m (43).

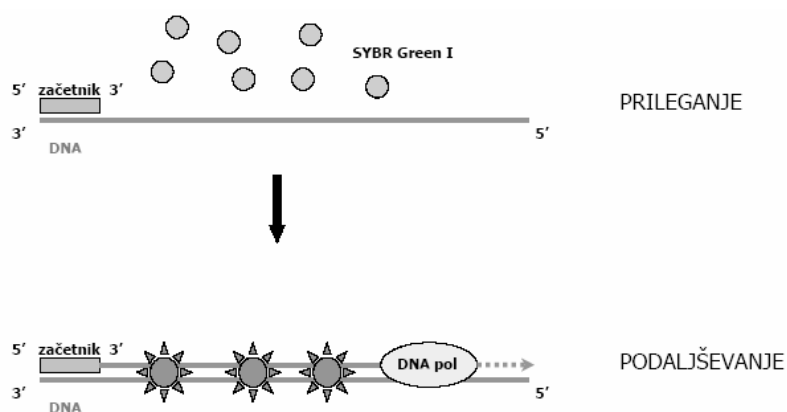


Slika 10: Krivulje pomnoževanja pri verižni reakciji polimeraze v realnem času.

Pri PCR v realnem času poteka pomnoževanje tarčnega odseka in dokazovanje nastalega pridelka sočasno. Za opazovanje nastale količine PCR pridelka potrebujemo molekule, ki se vežejo na PCR pridelke. V ta namen se uporabljajo oligonukleotidne sonde, ki so označene s fluoresceinom. Poznamo hibridizacijske in TaqMan sonde ter barvilo SYBR Green I. (43). Glede na sam način detekcije pomnoženih pridelkov PCR v realnem času ločimo dve skupini detekcije; specifičen način in nespecifičen način detekcije. Pri prvi zaznamo samo specifične pridelke pri drugi pa tudi morebitne nespecifične pridelke.

1.5.3.3.1 Nespecifičen način detekcije z uporabo SYBR Green I

Med nespecifične načine detekcije spadajo fluorescentna barvila, ki se nespecifično vgradijo v dvoverižno DNA. To sta barvila SYBR Green I in etidijev bromid, kateri se ne uporablja več. Barvilo SYBR Green I se veže na vsako dvojnovijačno DNA, vendar se veže tudi na nespecifične pridelke PCR in dimere oligonukleotidnih začetnikov, kar se je pokazalo kot slabost (43). Tako pri tej metodi poleg specifičnih pridelkov zaznamo celotno dvoverižno DNA, ki je prisotna v zmesi (slika 11) (45).

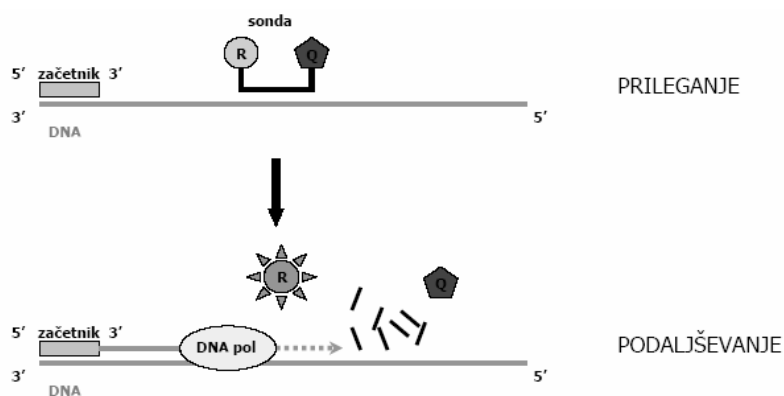


Slika 11: Nespecifičen način detekcije pridelkov PCR v realnem času s SYBR Green I.

1.5.3.3.1.2 Specifičen način detekcije z uporabo TaqMan sonde

Med specifične načine detekcije spadajo s fluorokromi označeni oligonukleotidi. Ti se vežejo samo na specifičen odsek DNA, ki ga želimo pomnožiti. Meritev signala poteka po principu fluorescentnega resonančnega prenosa energije iz donorske na akceptorsko molekulo (46). Najpogosteje se uporabljajo TaqMan sonde in hibridizacijske sonde (43). Ti dve sondi imata podoben način delovanja.

Pri TaqMan analizi se najpogosteje uporablja Taq DNA-polimeraza. Sonda ima na obeh koncih vezana različna fluorokroma. Na 5' koncu je vezano reportersko barvilo (R na sliki 12), ki seva fluorescenco, na 3' koncu pa barvilo, ki to fluorescenco prepreči (dušilec, Q na sliki 12). V stopnji podaljševanja povzroči Taq DNA-polimeraza s 5'-eksonukleidno aktivnostjo hidrolizo sonde. Nato se reportersko barvilo in dušilec oddaljeta in to onemogoči preprečanje fluorescence. Pri tem fluorescenca reporterskega barvila naraste in je sorazmerna s količino PCR pridelka (43, 47).

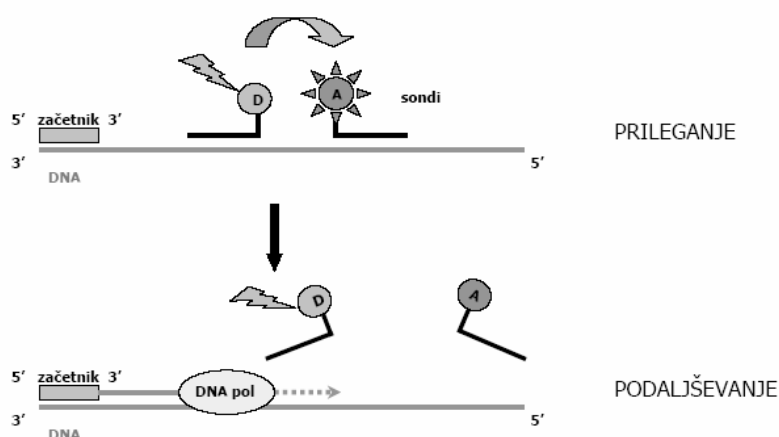


Slika 12: Specifičen način detekcije pridelkov PCR v realnem času s TaqMan sondo.

R = reportersko barvilo; Q = dušilec

1.5.3.3.1.3 Specifičen način detekcije z uporabo hibridizacijske sonde

Značilnost hibridizacijske sonde je, da je sestavljena iz dveh fizično ločenih delov, ki se vežeta eden za drugim. Vsak del hibridizacijske sonde vsebuje enega od označevalcev, donorski (D) in akceptorski (A) fluorofor in pri vzburjenju vsak oddaja svoj signal (43). V stopnji prileganja se zaporedno vežeta na odsek, ki ga pomnožujemo (slika 13). Zaradi bližine dveh sond na 3' koncu prve sonde vzburjen donorski fluorofor povzroči prenos energije na akceptorki fluorofor na 5' koncu. Ta seva svetlobo z daljšo valovno dolžino, ki jo zaznamo. Izmerjena svetloba je sorazmerna s količino nastalega pridelka PCR (48).



Slika 13: Specifičen način detekcije pridelkov PCR v realnem času z hibridizacijsko sondo.

D = donorski fluorofor; A = akceptorski fluorofor

1.5.4 Zdravljenje lymške borelioze

Lymška borelioza se zdravi z antibiotiki (penicilinom, tetraciklinom, makrolidi, cefalosporinom in drugimi) v vseh stadijih lymške borelioze (28, 37). Izbira antibiotika je odvisna od kliničnih manifestacij (28). Antibiotično zdravljenje se izvaja v vseh oblikah bolezni, vendar je v zgodnji obliki obolelosti najučinkovitejše (11). Zdravnik se za zdravljenje odloči na podlagi značilne bolezenske slike lymške borelioze, ne glede na izvide seroloških preiskav ali drugih testov. Pri bolnikih z manj izraženimi bolezenskimi znaki pa predpiše zdravljenje samo ob laboratorijsko pozitivnih izvidih. Uspešnost zdravljenja se tako kaže pri kar 90 % okuženih z *B. burgdorferi* sensu lato. Žal, pa za enkrat cepiva proti lymski boreliozi še ni. To pa najverjetneje zato, ker je *B. burgdorferi* sensu lato antigensko zelo heterogen mikroorganizem in ima mnogo različic (5).

1.5.5 Preprečevanje

Preventivni ukrepi proti okužbi so (37):

- nošenje primernih zaščitnih oblačil svetlih barv, da se klope hitreje opazi,
- uporaba repelentov,
- izogibanje področjem infestiranih s klopi, predvsem v poletnih mesecih (junij, julij),
- preventivno pregledovanje kože in
- hitra odstranitev klopa.

Ko opazimo klopa, ga čim hitreje in previdno odstranimo s pinceto, tako da ga zgrabimo tik ob koži in ga počasi izvlečemo. Če to naredimo v manj kot 48 urah imamo manjšo možnost za okužbo z borelijo (49). Po odstranitvi klopa, namenimo pozornost opazovanju na mestu vboda ob morebitni spremembi nastalega kožnega izpuščaja (erythema migrans). S takšnim opazovanjem preprečimo pojave, ki se razvijejo kasneje v pozni obliki lymške borelioze. Kadar se poleg kožne spremembe, ki se ponavadi širi in veča, pojavijo še vročina, glavobol, bruhanje in otekanje sklepov, je potrebno nemudoma poiskati zdravniško pomoč. Vsak klop ni prenašalec borelij, zato je preventivno jemanje antibiotikov nesmiselno in nepriporočljivo (11).

Velik del preventive je torej odvisen od nas samih v samopregledovanju, prepoznavanju znakov in hitrem ukrepanju ob pojavu le teh. Še večjo pozornost temu pa naj namenijo predvsem tisti, ki živijo in delajo na območjih infestiranih s klopi, to so predvsem kmetje in gozdarski delavci.

2 NAMEN DELA

V laboratoriju za diagnostiko borelioz in leprospiroz na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani smo naključno izbrali vzorce 68 borelijskih sevov, ki so bili z metodo PCR v realnem času identificirani glede na gen *hbb*. Vzorce smo analizirali z enako metodo ampak drugačnim diagnostičnim kompletom. Z uporabo diagnostičnega kompleta LightMix smo identificirali vrsto borelij glede na gen *ospA*.

Namen naše naloge je bil:

- analizirati vseh 68 borelijskih sevov z metodo pomnoževanja v realnem času in pomnožiti gen *ospA* z diagnostičnim kompletom LightMix,
- analizirati vse seve po navodilih proizvajalca LightMix z uporabo 50 µl Taq polimeraze,
- hkrati analizirati vse seve, po predhodnjih izkušnjah v laboratoriju, z uporabo 10 µl Taq polimeraze,
- opredeliti vrsto borelij glede na *ospA* gen in
- primerjati rezultate identifikacije s predhodno identifikacijo glede na gen *hbb*.

Pred samim začetkom dela smo načrtovali in predpostavili da:

- bomo z metodo pomnoževanja v realnem času pomnoževali *ospA* gen vseh borelij,
- bomo lahko opredelili vrsto vsaki posamezni boreliji in
- se identifikacija z *ospA* genom ne bo razlikovala od identifikacije z *hbb* genom.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Vzorci

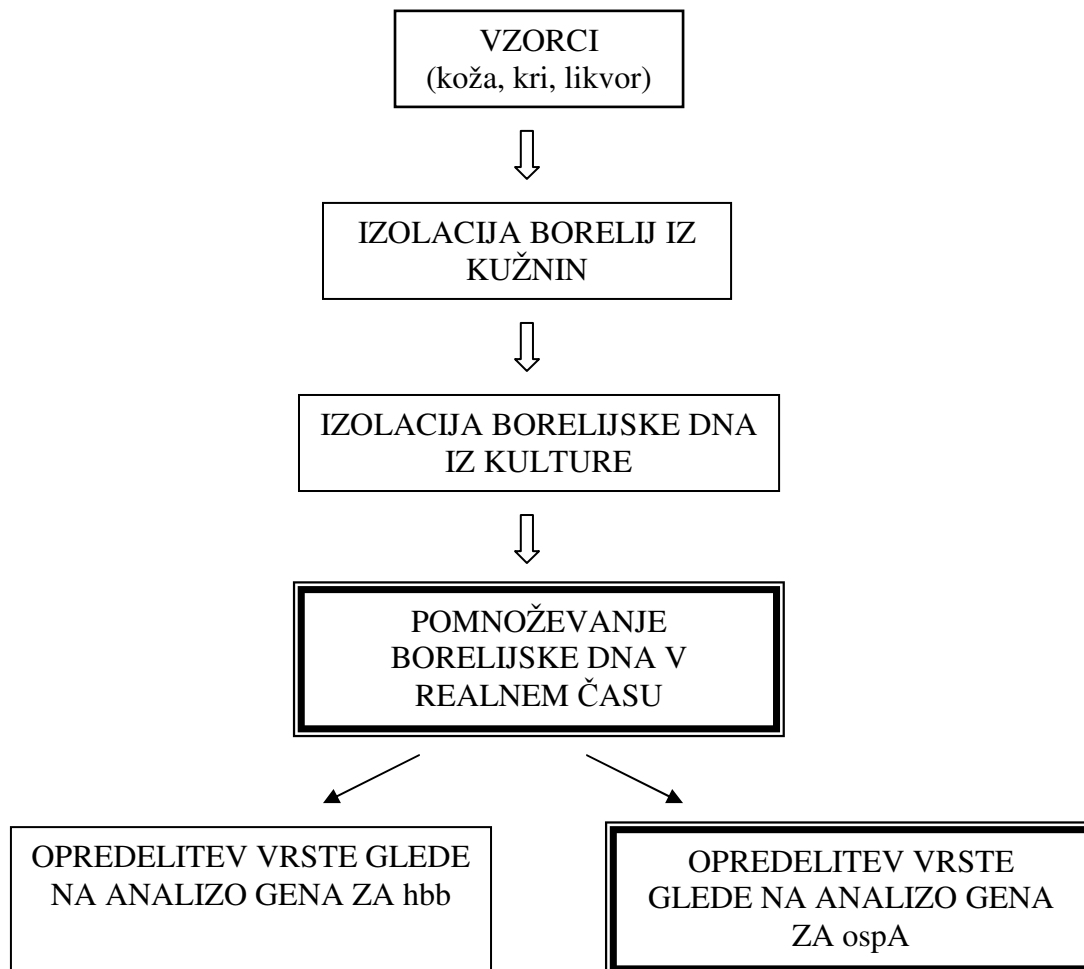
V nalogi smo uporabili 68 sevov *B. burgdorferi* sensu lato, ki so predhodno že bili opredeljeni glede na vrsto. Uporabili smo 37 sevov izoliranih iz kože, 22 iz likvorja in 9 iz krvi. Nato smo iz vseh sevov izolirali DNA in jih do uporabe hranili v zmrzovalniku pri minus 20 °C. V Laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroz na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani vzorce za raziskovalne namene hranijo od leta 1994, borelije iz te študije so bile izolirane v tem času.

3.1.2 Kulture bakterij *B. burgdorferi* sensu lato

Pri izvajanju in kvalitativnem vrednotenju testa PCR v realnem času smo uporabili tri najpogostejše patogene vrste borelij v Evropi. Te tri vrste so *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* in *B. garinii* (12).

3.2. METODE

Na sliki 14 je predstavljen celoten potek dela od izbire vzorcev do končne metode pomnoževanja DNA v realnem času. Določeni koraki so bili predhodno že narejeni, tako, da je delo opravljeno v okviru te diplomske naloge na sliki 14 poudarjeno. Pri naslednjih poglavjih smo posamezne korake dela podrobneje opisali.



Slika 14: Prikaz poteka dela.

3.2.1 Izolacija borelij iz kužnin

V Laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroz na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani vsakodnevno sprejmejo veliko število kužnin (koža, kri, likvor) iz vseh predelov Slovenije.

S pravilnim transportom so kužnine dostavljene v laboratorij in pripravljene za nadaljnjo obdelavo. Izolacija borelij iz kužnin je potekala na MKP gojišču obogatenem z nekaterimi dodatki. Po končani izolaciji, katera je trajala približno 9 tednov, je sledilo mikroskopiranje v temnem polju. Z mikroskopiranjem v temnem polju se z opazovanjem

gibljivih spirohet potrdi prisotnost le teh v kužninah, v nasprotnem primeru pa je rezultat negativen (50).

3.2.2 Izolacija DNA iz kulture

Izolacijo DNA iz bakterijske kulture smo izvajali v za to namenjenem prostoru. Delovno mizo smo pred in po izolaciji temeljito očistili s posebno kemikalijo za odstranjevanje DNA (DNA Remover). Uporabili smo 1 ml bakterijske kulture in ga prenesli v epruvetko ter centrifugirali 10 min pri 10.000 obr/min. Supernatant smo odlili, sediment pa 2x sprali s pufrom PBS. Po spiranju smo dodali 100 – 500 µl vode, odvisno od gostosti kulture. Na koncu smo dobili mlečno belo raztopino. Termoblok smo segreti na 95 °C, vanj postavili epruveto z vzorcem in inkubirali 15 min. Vzorec smo nato takoj zamrznili na - 20 °C in je bil tako pripravljen za nadaljnjo analizo.

3.2.3 Pomnoževanje DNA v realnem času

Borelijsko DNA smo pomnoževali z metodo pomnoževanja v realnem času in sicer gen za *hbb* in *ospA*.

3.2.3.1 Opredelitev vrste borelij glede na *hbb* gen

Z metodo PCR v realnem času smo s postopkom, ki temelji na *hbb* genu, iz borelijske kulture določili vrsto borelij. Uporabili smo diagnostični komplet LightCycler Fast Start DNA Master^{plus} Hybprobes, Roche, Mannheim, Nemčija in začetne oligonukleotide za gen *hbb* (TIB, Molbiol, Berlin, Nemčija).

Pripravili smo reakcijsko mešanico, ki je vsebovala: reakcijski puffer, Hot Start Taq DNA polimerazo, deoksinukleotidne trifosfate in MgCl₂. Končna količina v vsaki kapilari je znašala 20 µl, od tega je bilo 15 µl reakcijske mešanice in 5 µl vzorca. Tako napolnjene kapilare so bile pripravljene za analiziranje na LightCycler-ju. V preglednici IV so

predstavljeni štirje programski koraki metode PCR v realnem času opravljeni na LightCycler-ju.

Preglednica IV: Program za pomnoževanje in analizo pomnožkov pri metodi pomnoževanja v realnem času glede na *hbb* gen

Programski koraki		Temperatura / Čas	Število ciklov
Denuracijski program		95 °C / 10 min	1
Amplifikacijski program	Denaturacija	95 °C / 8 min	55
	Prileganje	50 °C / 10 s	
	Podaljševanje	72 °C / 10 s	
Talilni program		48 – 75 °C / 30 s; 0,1 °C/s	1
Ohlajevalni program		40 °C / 30 s	1

Po končani analizi smo s pomočjo računalniškega programa dobili prikaz rezultatov pomnožene DNA in talilnih krivulj. Na podlagi talilnih krivulj smo določili vrsto borelij v preiskovani kulturi.

3.2.3.2 Opredelevitev vrste borelij glede na *ospA* gen

Z metodo pomnoževanja v realnem času smo z uporabo novega diagnostičnega kompleta LightMix, ki temelji na genu *ospA*, določili vrsto borelij. Analizirali smo vseh 68 borelijskih DNA, predhodno že opredeljenih glede na vrsto z analizo gena *hbb*.

3.2.3.2.1 Predstavitev diagnostičnega kompleta LightMix

Za dokaz molekul DNA *Borrelia* spp. smo pri nalogi uporabili diagnostični komplet LightCycler FastStar DNA Master Hybridization Probes, Roche, Mannheim, Nemčija in začetne oligonukleotide za gen *ospA* (LightMix for detection of *Borrelia* spp., TIB, Molbiol, Berlin, Nemčija). Natančneje, z omenjenim diagnostičnim kompletom smo zaznavali želeni del genoma *ospA*. Sama uporaba diagnostičnega kompleta nam zagotavlja

hiter, enostaven in natančen sistem pri identifikaciji in kvalifikaciji našega cilja. Pomnoževanje in identifikacijo smo izvedli na LightCycler Instrument 2,0 Roche, Mannheim, Nemčija.

Diagnostični komplet LightMix vsebuje (51):

- 6 stekleničk z zelenim zamaškom, ki vsebujejo pomešane in liofilizirane začetne oligonukleotide in hibridizacijske sonde za gen *ospA* (1 steklenička nam služi za 16 reakcij),
- 6 stekleničk z belim zamaškom, ki vsebujejo notranjo pozitivno kontrolo (teh stekleničk pri nalogi nismo uporabili, saj smo za pozitivne kontrole uporabili že znane seve borelij),

Ti reagenti so liofilizirani in stabilni pri sobni temperaturi od 18 do 25 °C najmanj 3 mesece. Že raztopljeni reagenti so stabilni najmanj 5 dni, morajo pa biti zaščiteni pred sončno svetlobo in ohlajeni na 4 °C.

3.2.3.2.2 Postopek priprave LightCycler reakcijske mešanice

Za pripravo reakcijske mešanice smo uporabili diagnostični komplet LightCycler FastStar DNA Master Hybridization Probes, Roche, Mannheim, Nemčija in začetne oligonukleotide za gen *ospA* (LightMix for detection of *Borrelia* spp., TIB, Molbiol, Berlin, Nemčija). Reakcijsko mešanico smo zaradi nizke stabilnosti odprtih reagentov in njihove občutljivosti na sončno svetlobo pripravljali vsakodnevno. Postopek priprave je potekal v posebnem za to namenjenem prostoru oziroma posebnem delovnem mestu. Delali smo s posebnim setom pipet, nastavki za pipete, centrifugo, nosili posebno zaščitno obleko in rokavice, ter s tem preprečili kakršno koli kontaminacijo reagentov z izolirano molekulo DNA. Pri nalogi nismo uporabili interne kontrole iz diagnostičnega kompleta LightMix, saj smo pri nalogi uporabili kot pozitivne kontrole 3 najpogostejše vrste borelij *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* in *B. afzelii*.

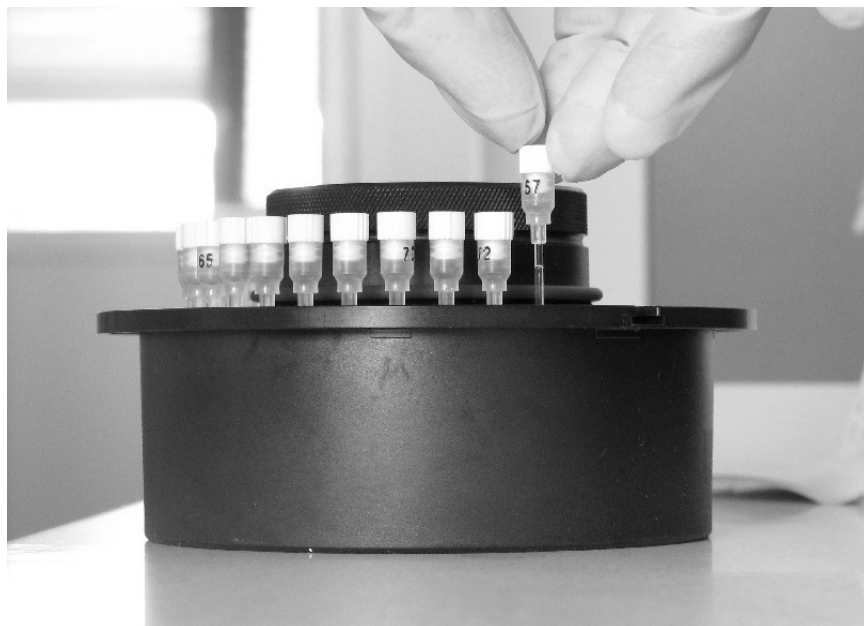
Pred začetkom dela smo morali reagente, začetne oligonukleotide in vzorce, ki so bili do naše uporabe shranjeni v zmrzovalniku, odmrzniti na sobni temperaturi približno 20 minut.

Po odtaljevanju smo jih previdno in po hitrem postopku (približno za 2 sekundi) vorteksirali. Iz zmrzovalnika smo prav tako vzeli hladilni blok v katerega smo vstavili 16 kapilar. Pripravili smo si pravilno količinsko razmerje začetne mešanice, ki vsebuje 2 steklenički 1a (Taq polimeraza) in 1b (reakcijska mešanica).

Po navodilih proizvajalca diagnostičnega kompleta LightMix smo odpipetirali **50 µl 1a** (Taq polimeraza) in jo dali v **1b** (reakcijska mešanica). Glede na predhodne izkušnje z omenjenim diagnostičnim kompletom smo uporabili tudi **10 µl 1a** (Taq polimeraza) in jo dali v **1b** (reakcijska mešanica).

V eni seriji pomnoževanja smo delali samo z eno količino Taq polimeraze (50 µl), v nasledni pa smo pri istih vzorcih delali še z drugo količino Taq polimeraze (10 µl). Tako smo zaradi dveh različnih začetnih količinskih razmerij, vsak testirani vzorec analizirali dvakrat, vsakič z drugo koncentracijo Taq polimeraze.

Pripravili smo si prazno epruvetko za reakcijsko mešanico in vanjo napipetirali 118,4 µl destilirane vode, 25,6 µl raztopine MgCl₂, 64 µl reakcijske mešanice in 32 µl začetne mešanice. Vse skupaj smo premešali na vorteksu, da so se sestavine med seboj lepo razporedile. Natančno in previdno smo napolnili vseh 16 kapilar s 15 µl reakcijske mešanice. Pri vsaki seriji smo k preiskovanim vzorcem delali negativni kontroli. S 5 µl vzorca smo napolnili kapilare in jih sproti zapirali. Tako napolnjene kapilare v hladilnem bloku so bile pripravljene za nadaljnjo obdelavo za pomnoževanje v realnem času na LightCycler-ju. Pred pomnoževanjem smo kapilare previdno vstavili v poseben okrogel nosilec, kakor to prikazuje slika 15 in centrifugirali 5 minut. Po končanem centrifugiranju smo nosilec vstavili v analizator LightCycler 2.0 in s pomočjo računalniškega programa pričeli s pomnoževanjem v realnem času (51).



Slika 15: Vstavljanje kapilar v krožno stojalo aparata.

3.2.3.2.3 Potek pomnoževanja v realnem času na LightCycler-ju

Program, ki vodi celoten potek pomnoževanja je sestavljen iz štirih ključnih procesov. Prične se z denaturacijo DNA, pri čemer temperatura v 10 minutah naraste na 95 °C. V naslednjih 55 – tih ciklih potekala denaturacija pri 95 °C - 10 sekund, pripenjanje začetnih oligonukleotidov pri 60 °C - 10 sekund in podaljševanje verige pri 72 °C - 13 sekund. Količina PCR pridelka je merjena v vsakem ciklu. Linearno merjenje analize je od 10^2 do 10^6 kopij *Borrelia* spp. DNA. Po končanem pomnoževanju sledi identifikacija PCR pridelka glede na T_m pridelka. Talilna krivulja, ki identificira ciljno DNA se beleži od začetka denaturacije pri 95 °C do ohlajevanja na 40 °C PCR pridelka. Celoten postopek traja eno uro (51).

3.2.3.2.4 Način detekcije PCR pridelkov na LightCycler-ju

Prične se s pripenjanjem oligonukleotidov in vezave sond na tarčne odseke gena za ospA. Taq polimeraza sproži pričetek pomnoževanja in s 5' eksonukleazno aktivnostjo hidrolizira sondo na svoji poti. Nakar se fluoroforna molekula sprosti in ob dražljaju s svetlobo določene valovne dolžine iz aparature odda svetlobo drugačne valovne dolžine, ki odstopa

od fluorescence ozadja. LightCycler ob koncu vsakega cikla izmeri količino fluorescentne svetlobe in sproti izrisuje graf.

3.2.3.2.5 Analiza rezultatov PCR

Po končanem pomnoževanju sledi še ugotovitev talilne temperature (T_m) PCR pridelka. T_m pomeni temperaturo pri kateri je 50 % pomnožene DNA dvojnovijačne in 50 % enovijačne (43). Vsaka molekula DNA ima značilno T_m .

Navodila proizvajalca diagnostičnega kompleta LightMix določajo specifične T_m vsaki borelijski vrsti. Tako ima *B. burgdorferi* sensu stricto T_m pri 62,7 °C, *B. garinii* pri 67,2 °C in *B. afzelii* pri 71,0 °C (51).

3.2.3.2.6 Analiza rezultatov

Rezultate identifikacij vrste borelij, ki smo jih dobili z pomnoževanja v realnem času glede na analizo gena za ospA smo primerjali z identifikacijo vrste borelij, ki smo jo dobili z pomnoževanjem v realnem času glede na *hbb* gen.

4 REZULTATI

4.1 IDENTIFIKACIJA BORELIJSKIH SEVOV GLEDE NA GEN *hbb*

Skupno smo uporabili 68 naključno izbranih borelijskih sevov, ki so bili z metodo pomnoževanja v realnem času na tarčnem zaporedju gena *hbb* že predhodno identificirani. Vsi vzorci so bili opredeljeni glede na vrsto *B. burgdorferi* sensu lato. Od skupnih 68 sevov jih je 16 pripadalo *B. burgdorferi* sensu stricto, 29 *B. garinii* in 23 *B. afzelii* (preglednica V).

Preglednica V: Prikaz vrste borelij in njihovo število glede na gen *hbb*

Borelijska vrsta	Število pozitivnih sevov
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	16
<i>B. garinii</i>	29
<i>B. afzelii</i>	23
SKUPAJ	68

4.2 IDENTIFIKACIJA BORELIJSKIH SEVOV GLEDE NA GEN *ospA*

Z metodo pomnoževanja v realnem času smo pomnoževali 68 borelijskih sevov glede na gen *ospA*. Vsak sev smo analizirali dvakrat, saj smo delali z dvema različnima količinama Taq polimeraze. Če je prišlo do pomnoževanja DNA in nastanka PCR pridelka, smo vrste borelij identificirali glede na specifično Tm PCR pridelka.

4.2.1 Rezultati identifikacije *B. burgdorferi* sensu stricto pridobljene z metodo PCR v realnem času z začetnimi oligonukleotidi za zunanjo površinsko beljakovino *ospA*

Vsak sev smo analizirali z dvema količinama Taq polimeraze, 50 μ l in 10 μ l v začetni PCR mešanici in primejali rezultate.

4.2.1.1 Rezultati identifikacije *B. burgdorferi* sensu stricto pri uporabi 50 μ l Taq polimeraze

Preglednica VI prikazuje, da smo pri vseh 16 sevih *B. burgdorferi* sensu stricto ob uporabi 50 μ l Taq polimeraze in začetnih oligonukleotidov za gen *ospA* pomnožili borelijsko DNA in sev opredelili do vrste. Proizvajalec diagnostičnega kompleta LightMix nakazuje za *B. burgdorferi* sensu stricto T_m pri 62,7 °C. Analizirane vrednosti vseh 16 sevov se nahajajo v območju vrednosti T_m od 62,6 do 63,82 °C (preglednica VI). Pri 5/16 sevih (31,25 %) smo dobili zraven specifične T_m tudi nespecifično T_m ali T_m druge borelijske vrste.

Preglednica VI: Rezultati identifikacije pri *B. burgdorferi* sensu stricto glede na T_m , gen *hbb* in *ospA*.

Zaporedno št. sevov (gen <i>hbb</i> - <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto)	Gen <i>ospA</i> <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto / 50 μ l	Komentar
	Specifičen T_m	
1	63,78	
2	63,71	Zaznava tudi drugo T_m (72, 08- <i>B.afzelii</i>)
3	63,82	
4	63,76	Zaznava tudi nespecifične T_m (54,96)
5	63,80	Zaznava tudi nespecifične T_m (55,19)
6	63,72	
7	63,79	
8	63,73	Zaznava tudi nespecifične T_m (54,81)
9	62,72	
10	62,87	
11	63,09	
12	62,60	Zaznava tudi nespecifične T_m (54,52)
13	62,76	
14	62,81	

15	62,73	
16	62,82	

Ba = *B. afzelii*

4.2.1.2 Rezultati identifikacije *B. burgdorferi* sensu stricto pri uporabi 10 µl Taq polimeraze

Preglednica VII prikazuje, da je do pomnoževanja borelijske DNA prišlo pri 12/16 sevih (75 %) *B. burgdorferi* sensu stricto ob uporabi 10 µl Taq polimeraze in začetnih oligonukleotidov za gen *ospA*. Proizvajalec diagnostičnega kompleta LightMix nakazuje za *B. burgdorferi* sensu stricto Tm pri 62,7 °C. Vrednosti Tm 12 PCR pozitivnih sevih se nahajajo v območju vrednosti od 62,41 do 64,75 °C in so značilne za *B. burgdorferi* sensu stricto. Le pri 1/16 sevih (6,25 %) smo zasledili prisotnost Tm druge borelijske vrste (preglednica VII).

Preglednica VII: Rezultati identifikacije pri *B. burgdorferi* sensu stricto glede na Tm, gen *hbb* in *ospA*.

Zaporedno št. sevov (gen <i>hbb</i> - <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto)	Gen <i>ospA</i> <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto / 10 µl		Komentar
	Specifičen Tm		
1	62,75		
2	62,74		Zaznava tudi druge Tm (71,96- <i>B. afzelii</i>)
3	62,95		
4	62,83		
5	62,41		
6	62,41		
7	62,66		
8	62,57		
9	PCR -		Ni bilo pomnoževanja
10	PCR -		Ni bilo pomnoževanja
11	63,25		
12	PCR -		Ni bilo pomnoževanja
13	PCR -		Ni bilo pomnoževanja
14	64,27		

15	64,75	
16	64,02	

Ba = *B. afzelii*

4.2.1.3 Primerjava rezultatov za *B. burgdorferi* sensu stricto pri uporabi 50 µl in 10 µl Taq polimeraze

Pomnoževanje *B. burgdorferi* sensu stricto je bilo boljše pri uporabi 50 µl Taq polimeraze kot pri uporabi 10 µl Taq polimeraze (100 % in 75 %) (preglednica VI in preglednica VII).

T_m *B. burgdorferi* sensu stricto so se pri uporabi 50 µl Taq polimeraze nahajale v območju od 62,60 do 63,82 °C, pri uporabi 10 µl Taq polimeraze pa v območju od 62,41 do 64,75 °C in so bile primerljive s T_m , ki jo nakazuje proizvajalec (62,7 °C).

Pri uporabi 50 µl Taq polimeraze smo vsem sevom opredelili za *B. burgdorferi* sensu stricto značilno T_m in zaznali tudi nespecifično T_m pri 4/16 sevih (25 %), pri enem sevu (6,25 %) pa T_m značilno za vrsto *B. afzelii* (preglednica VI). Ob uporabi 10 µl Taq polimeraze pa smo zaznali T_m značilno za vrsto *B. burgdorferi* sensu stricto pri vseh 12 PCR pozitivnih sevih in *B. afzelii* pri enem sevu (6,25 %) (preglednica VII). Tako smo pri enakem vzorcu (št. 2 v preglednici V in VI) z različnimi mešanicami identificirali T_m značilno za *B. afzelii*.

4.2.2 Rezultati identifikacije *B. garinii* pridobljeni z metodo PCR v realnem času z začetnimi oligonukleotidi za zunanjo površinsko beljakovino ospA

Vsak sev smo analizirali z dvema količinama Taq polimeraze, 50 µl in 10 µl v začetni PCR mešanici in primerjali rezultate.

4.2.2.1 Rezultati identifikacije *B. garinii* pri uporabi 50 µl Taq polimeraze

Preglednica VIII prikazuje, da je do pomnoževanja borelijske DNA prišlo pri vseh sevih *B. garinii* ob uporabi 50 µl Taq polimeraze in začetnih oligonukleotidov za gen *ospA*. Proizvajalec diagnostičnega kompleta LightMix nakazuje za *B. garinii* Tm pri 67,2 °C; Tm v tem območju (od 66,11 do 68,21 °C) smo zasledili le pri 14/29 sevih (48,27 %). Tako smo pri vsakem analiziranem sevu zasledili bodisi nespecifično Tm (pri 14/29; 48,27 %), ali Tm značilno za drugo vrsto borelij (pri 15/29; 51,72 %) in sicer ne glede na to, ali so sevi kazali specifično Tm za *B. garinii* ali ne. Iz preglednice VIII je razvidno, da so nespecifično Tm imeli le sevi, ki so bili opredeljeni do vrste (in s tem specifično Tm za *B. garinii*). PCR pozitivni sevi, ki niso kazali značilne Tm za *B. garinii*, so kazali Tm značilno za *B. burgdorferi* sensu stricto ali *B. afzelii*, ali oboje.

Preglednica VIII: Rezultati identifikacije pri *B. garinii* glede na Tm, gen *hbb* in *ospA*.

Zaporedno št. sevov (gen <i>hbb</i> - <i>B. garinii</i>)	Gen <i>ospA B. garinii</i> / 50 µl		Komentar
	Specifična Tm		
1	68,10		Zaznava tudi nespecifične Tm (60,50)
2	68,00		Zaznava tudi nespecifične Tm (60,53)
3	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (63,62-Bbss in 72,47-Ba)
4	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (63,68-Bbss in 72,45-Ba)
5	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (63,78-Bbss in 72,49-Ba)
6	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (63,92-Bbss in 72,52-Ba)
7	68,05		Zaznava tudi nespecifične Tm (60,65)
8	68,21		Zaznava tudi nespecifične Tm (60,84)
9	67,05		Zaznava tudi nespecifične Tm (60,13)

10	67,15		Zaznava tudi nespecifične Tm (60,12)
11	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (63,24-Bbss in 70,60-Ba)
12	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (63,99-Bbss in 70,69-Ba)
13	67,07		Zaznava tudi nespecifične Tm (60,50)
14	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (62,11-Bbss)
15	67,00		Zaznava tudi nespecifične Tm (60,27)
16	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (62,52-Bbss)
17	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (63,23-Bbss in 71,36-Ba)
18	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (64,34-Bbss in 72,43-Ba)
19	67,77		Zaznava tudi nespecifične Tm (61,15)
20	67,88		Zaznava tudi nespecifične Tm (61,00)
21	67,96		Zaznava tudi nespecifične Tm (60,87)
22	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (62,56-Bbss)
23	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (63,99-Bbss)
24	67,19		Zaznava tudi nespecifične Tm (60,62)
25	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (63,74-Bbss in 71,36-Ba)
26	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (63,86-Bbss in 70,91-Ba)
27	66,11		Zaznava tudi nespecifične Tm (60,54)
28	67,16		Zaznava tudi nespecifične Tm (60,61)
29	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (58,48 in 64,40-Bbss)

Ba = *B. afzelii*, Bbss = *B. burgdorferi* sensu stricto

4.2.2.2 Rezultati identifikacije *B. garinii* pri uporabi 10 µl Taq polimeraze

Preglednica IX prikazuje, da je do pomnoževanja borelijske DNA prišlo pri 24/29 sevih (82,75 %) *B. garinii* ob uporabi 10 µl Taq polimeraze in začetnih oligonukleotidov za gen *ospA*. Proizvajalec diagnostičnega kompleta LightMix nakazuje za *B. garinii* Tm pri 67,2 °C. V območju vrednosti Tm od 65,2 do 68,73 °C smo opredelili 19/24 sevov (79,16 %), pri 5/24 sevih (20,83 %) pa Tm ni bila značilna za *B. garinii* (preglednica IX). Nespecifično ali za drugo vrsto borelij značilno Tm smo opredelili pri 11/24 (45,83 %) PCR pozitivnih sevih (preglednica IX). Pri tem smo pri petih PCR pozitivnih sevih, ki niso kazali za *B. garinii* specifično Tm, opredelili pri štirih sevih Tm značilno za *B. burgdorferi* sensu stricto in pri enem Tm za *B. afzelii*.

Preglednica IX: Rezultati identifikacije pri *B. garinii* glede na Tm, gen *hbb* in *ospA*.

Zaporedno št. sevov (gen <i>hbb</i> – <i>B. garinii</i>)	Gen <i>ospA B. garinii</i> / 10 µl		Komentar
	Specifična Tm		
1	67,29		Zaznava tudi nespecifične Tm (59,82)
2	67,30		Zaznava tudi nespecifične Tm (60,10)
3	65,20		Zaznava tudi drugo Tm (72,07-Ba)
4	65,60		Zaznava tudi drugo Tm (71,94-Ba)
5	66,19		
6	66,45		
7	67,18		
8	67,21		
9	PCR -		Ni bilo pomnoževanja
10	PCR -		Ni bilo pomnoževanja
11	PCR -		Ni bilo pomnoževanja
12	PCR -		Ni bilo pomnoževanja
13	68,73		Zaznava tudi nespecifične Tm (61,27)
14	66,13		Zaznava tudi nespecifične Tm (73,22)
15	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (62,39-Bbss)

16	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (62,43-Bbss)
17	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (62,49-Bbss)
18		65,72	
19		67,60	
20		67,28	
21		68,03	
22		66,68	
23		66,85	
24		67,02	
25	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (71,85-Ba)
26	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (62,31-Bbss)
27		66,97	
28		67,42	
29	PCR -		Ni bilo pomnoževanja

Ba = *B. afzelii*, Bbss = *B. burgdorferi* sensu stricto

4.2.2.3 Primerjava rezultatov za *B. garinii* pri uporabi 50 µl in 10 µl Taq polimeraze

Pomnoževanje DNA *B. garinii* je bilo uspešno pri vseh sevih (100 %) ob uporabi 50 µl Taq polimeraze in le pri 24/29 sevih (82,75 %) pri uporabi 10 µl Taq polimeraze (preglednica VIII in IX).

Tm *B. garinii* so se pri uporabi 50 µl Taq polimeraze nahajale v območju od 66,11 do 68,21 °C, pri uporabi 10 µl Taq polimeraze pa v območju od 65,2 do 68,73 °C in so bile primerljive s Tm, ki jo nakazuje proizvajalec (67,2 °C).

Tm značilno za *B. garinii* smo zasledili pri 14/29 sevih (48,27 %) ob uporabi 50 µl Taq polimeraze (preglednica VIII) in 19/24 (79,16 %) PCR pozitivnih sevih ob uporabi 10 µl Taq polimeraze (preglednica XI).

Pri uporabi 50 µl Taq polimeraze smo določili nespecifične, ali Tm značilne za druge borelijske vrste, ali oboje pri vsakem analiziranem sevu (preglednica VIII). Pri uporabi 10

μ l Taq polimeraze pa smo ugotovili nespecifično T_m , ali za drugo borelijsko vrsto značilno T_m pri 11/24 (45,83 %) PCR pozitivnih sevih (preglednica IX).

4.2.3 Rezultati identifikacije *B. afzelii* pridobljeni z metodo PCR v realnem času z začetnimi oligonukleotidi za zunanjo površinsko beljakovino ospA

Vsak sev smo analizirali z dvema koncentracijama Taq polimeraze, 50 μ l in 10 μ l v začetni PCR mešanici in primerjali rezultate.

4.2.3.1 Rezultati identifikacije *B. afzelii* pri uporabi 50 μ l Taq polimeraze

Preglednica X prikazuje, da je do pomnoževanja borelijske DNA prišlo pri vseh sevih *B. afzelii* ob uporabi 50 μ l Taq polimeraze in začetnih oligonukleotidov za gen *ospA*. Proizvajalec diagnostičnega kompleta LightMix nakazuje za *B. afzelii* T_m pri 71,0 °C. T_m vrednosti pri 22/23 (95,65 %) PCR pozitivnih sevih so se nahajale v območju vrednosti T_m od 71,01 do 72,01°C; le pri enem sevu (številka 19 v preglednica X) nismo mogli potrditi za *B. afzelii* značilno T_m . Pri vseh sevih smo zasledili bodisi nespecifično ali za druge vrste borelij značilno T_m , ali oboje. Večino sevov je poleg T_m za *B. afzelii* kazala še T_m značilno za *B. burgdorferi* sensu stricto.

Preglednica X: Rezultati identifikacije pri *B. afzelii* glede na T_m , gen *hbb* in *ospA*.

Zaporedno št. sevov (gen <i>hbb</i> - <i>B. afzelii</i>)	Gen <i>ospA B. afzelii</i> / 50 μ l	Komentar
	Specifična T_m	
1	71,80	Zaznava tudi drugo T_m (64,15-Bbss)
2	71,64	Zaznava tudi drugo T_m (64,05-Bbss)
3	71,58	Zaznava tudi drugo T_m (64,18-Bbss)
4	71,78	Zaznava tudi drugo T_m (64,27-Bbss)
5	71,67	Zaznava tudi drugo T_m (64,06-Bbss)

6	71,86	Zaznava tudi drugo Tm (64,15-Bbss)
7	71,81	Zaznava tudi drugo Tm (64,09-Bbss)
8	71,30	Zaznava tudi drugo Tm (63,27-Bbss)
9	71,01	Zaznava tudi drugo Tm (63,30-Bbss)
10	71,38	Zaznava tudi drugo Tm (63,49-Bbss)
11	71,24	Zaznava tudi drugo Tm (63,56-Bbss)
12	71,33	Zaznava tudi drugo Tm (63,90-Bbss)
13	71,42	Zaznava tudi drugo Tm (63,95-Bbss)
14	71,41	Zaznava tudi drugo Tm (63,82-Bbss)
15	72,01	Zaznava tudi drugo Tm (64,45-Bbss)
16	71,94	Zaznava tudi drugo Tm (64,51-Bbss)
17	71,40	Zaznava tudi drugo Tm (63,82-Bbss)
18	71,51	Zaznava tudi drugo Tm (64,23-Bbss)
19	PCR +	S pomnoževanjem zaznali nespecifično in drugo Tm (60,36 in 67,14-Bg)
20	71,36	Zaznava tudi drugo Tm (63,90-Bbss)
21	71,38	Zaznava tudi drugo Tm (63,61-Bbss)
22	71,12	Zaznava tudi drugo Tm (64,11-Bbss)
23	71,46	Zaznava tudi drugo Tm (64,37-Bbss)

Bg = *B. garinii*, Bbss = *B. burgdorferi* sensu stricto

4.2.3.2 Rezultati identifikacije *B. afzelii* pri uporabi 10 µl Taq polimeraze

Preglednica XI prikazuje, da je do pomnoževanja borelijske DNA prišlo pri 20/23 sevih (86,95 %) *B. afzelii* ob uporabi 10 µl Taq polimeraze in začetnih oligonukleotidov za gen *ospA*. Proizvajalec diagnostičnega kompleta LightMix nakazuje za *B. afzelii* Tm pri

71,0 °C. Tm značilno za *B. afzelii* smo določili pri 14/23 sevih (60,86 %); Tm se je nahajala v območju od 71,15 do 72,41°C. Pri vseh sevih smo zasledili bodisi nespecifično ali za druge vrste borelij značilno Tm, ali oboje. Večina sevov, ki so bili PCR pozitivni in niso kazali Tm za *B. afzelii* je kazala še Tm značilno za *B. burgdorferi* sensu stricto (preglednica XI). Sev številka 19 je pri uporabi 10 µl Taq polimeraze kazal Tm za *B. garinii*, ravno tako kot pri uporabi 50 µl Taq polimeraze.

Preglednica XI: Rezultati identifikacije pri *B. afzelii* glede na Tm gen *hbb* in *ospA*.

Zaporedno št. sevov (gen <i>hbb</i> - <i>B. afzelii</i>)	OspA <i>B. afzelii</i> / 10 µl		Komentar
	Specifična Tm		
1	71,61		
2	71,58		
3	71,59		
4	71,67		
5	71,15		
6	71,57		
7	71,44		
8	PCR -		Ni bilo pomnoževanja
9	PCR -		Ni bilo pomnoževanja
10	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (62,52-Bbss)
11	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (62,55-Bbss)
12	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (62,64-Bbss)
13	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (62,64-Bbss)
14	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (62,67-Bbss)
15	72,06		
16	72,13		
17	71,68		
18	71,79		
19	PCR +		S pomnoževanjem zaznali drugo Tm (67,84-Bg)
20	72,41		
21	71,81		
22	71,32		

23	PCR -		Ni bilo pomnoževanja
----	-------	--	----------------------

Bg = *B. garinii*, Bbss = *B. burgdorferi* sensu stricto

4.2.3.3 Primerjava rezultatov za *B. afzelii* pri uporabi 50 μ l in 10 μ l Taq polimeraze

Pomnoževanje DNA *B. afzelii* je bilo uspešno pri vseh sevih (100 %) ob uporabi 50 μ l Taq polimeraze (preglednica X) in le pri 20/23 (86,95 %) sevih pri uporabi 10 μ l Taq polimeraze (preglednica XI).

T_m *B. afzelii* se je pri uporabi 50 μ l Taq polimeraze nahajala v območju od 71,01 do 72,01 °C, pri uporabi 10 μ l Taq polimeraze pa v območju od 71,15 do 72,41 °C in so bile primerljive s T_m , ki jo nakazuje proizvajalec (71,0 °C).

T_m značilno za *B. afzelii* smo zasledili pri 22/23 (95,65 %) sevih ob uporabi 50 μ l Taq polimeraze (preglednica X) in 14/20 (60,86 %) PCR pozitivnih sevih ob uporabi 10 μ l Taq polimeraze (preglednica XI).

Pri uporabi 50 μ l Taq polimeraze smo določili nespecifično, ali za druge borelijske vrste značilno T_m , ali oboje pri vsakem analiziranem sevu (preglednica X), pri uporabi 10 μ l Taq polimeraze pa smo ugotovili za drugo borelijsko vrsto značilno T_m pri 6/20 (30 %) PCR pozitivnih sevih (preglednica XI).

5 RAZPRAVA

Za identifikacijo borelij izoliranih iz kliničnega materiala se uporabljajo različne metode, katere temeljijo na analizi borelijske DNA. V naši nalogi smo vrste borelijskih sevov dokazovali s pomnoževanjem molekul DNA *B. burgdorferi* sensu lato z uporabo PCR v realnem času metode. Metoda PCR v realnem času omogoča kvalitativno določanje borelijskih vrst v posameznem preiskovanem vzorcu (41). Kot tarčni odsek genoma *B. burgdorferi* sensu lato smo izbrali del linearnega plazmida in sicer del, ki kodira zunanjo površinsko beljakovino OspA in gen *Hbb*, sicer pa so v literaturi opisane še številne druge metode (5).

V Laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroz na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani rutinsko izvajajo identifikacijo izoliranih sevov *B. burgdorferi* sensu lato. V laboratoriju imajo na voljo več metod, med drugim tudi metodo PCR v realnem času glede na tarčno zaporedje *hbb* gena. V naši nalogi smo se poglobili v identifikacijo in primerjavo rezultatov pridobljenih z enako metodo (PCR v realnem času) na drugem tarčnem odseku DNA *B. burgdorferi* sensu lato (genu za *hbb* in *ospA*). Hkrati smo med seboj primerjali tudi rezultate analize ob uporabi navedene proizvajalčeve količine Taq polimeraze (50 µl) in uporabi 10 µl Taq polimeraze. Razlog uporabe manjše količina Taq polimeraze prihaja iz samega laboratorija in njihovih izkušenj, ki jih pojasnjujemo v nadaljevanju.

Med samim delom lahko pride do kontaminacije vzorca ter lažno pozitivnih rezultatov. Zato smo pri delu upoštevali stroge previdnostne ukrepe in tako zagotovili ustreznost rezultatov.

V postopek pomnoževanja smo večkrat vključili tudi negativne kontrole. Na koncu vsakega analiziranja smo preverjali ali so negativne kontrole tudi ostale negativne.

Pri uporabi 50 µl Taq polimeraze je pomnoževanje molekul DNA *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* in *B. afzelii* uspešno potekalo (preglednica VI, preglednica VIII in preglednica X). Medtem, ko pomnoževanje molekul DNA pri uporabi 10 µl Taq

polimeraze pri *B. burgdorferi* sensu stricto ni potekalo v 25 % (preglednica VII), pri *B. garinii* v 27,2 % (preglednica IX) in pri *B. afzelii* v 13 % (preglednica XI). Sklepamo, da do pomnoževanja DNA *B. burgdorferi* sensu lato pri uporabi 10 µl Taq polimeraze ni prišlo zaradi premajhne količine le te. V PCR mešanici proizvajalec diagnostičnega kompleta LightMix predpisuje količino uporabe 50 µl Taq polimeraze za PCR mešanico. Ob predpisani količini Taq polimeraze smo zaznali 100 % pomnoževanje DNA *B. burgdorferi* sensu lato.

Po pomnoževanju molekul DNA je sledila identifikacija pomnoženih pridelkov z izvajanjem Tm. Pri identifikaciji smo primerjali Tm s Tm ki jo navaja proizvajalec. Tm za vse tri borelije pri 50 in 10 µl Taq polimeraze so bile primerljive. Glede na to, da proizvajalec navaja točno določeno Tm za določeno vrsto borelije, smo pri opravljeni analizi ugotovili, da so se naše Tm nahajale blizu proizvajalčevi Tm. Pri *B. garinii* smo pri uporabi 50 µl Taq polimeraze identificirali le približno 50 % sevov. Pri *B. burgdorferi* sensu stricto in *B. afzelii* pa smo identificirali večino sevov, ki so imeli PCR pozitiven. Sklicujemo se lahko na dejstvo, da imata *B. burgdorferi* sensu stricto in *B. afzelii* homologno tarčno zaporedje nukleotidov na *ospA* genu, med tem, ko se zaporedje pri *B. garinii* znatno razlikuje (32). Pri uporabi 10 µl Taq polimeraze smo pri *B. garinii* dobili proti našemu pričakovanju boljše rezultate (preglednica IX), kot pri uporabi 50 µl Taq polimeraze, kjer smo opredelili do vrste, glede na Tm veliko več sevov (79,16 %) (preglednica VIII). Zakaj je prišlo do takšnih rezultatov pri *B. garinii* ne vemo, lahko pa kot možen vzrok navedemo dejstvo, da je velika večina Taq polimeraze nespecifično pomnoževala heterogeno DNA *B. garinii*, kar se vidi iz dejstva, da je vsak sev imel še neznačilno, ali drugo Tm.

Pri uporabi obeh količin Taq polimeraze je moč zaslediti poleg identificirane specifične Tm, še nespecifično Tm in Tm druge borelijske vrste. Največji delež identifikacije Tm druge borelijske vrste zasledimo pri uporabi 50 µl Taq polimeraze pri *B. garinii* in *B. afzelii*, kjer smo kot identificirano drugo Tm zaznali *B. burgdorferi* sensu stricto (preglednica VIII in preglednica X). Seveda pa je prišlo do identifikacije Tm druge borelijske vrste tudi pri uporabi 10 µl Taq polimeraze, vendar ne v tako velikem deležu, kot pri uporabi 50 µl Taq polimeraze (preglednica IX in preglednica XI). Najmanjši delež nespecifičnih Tm in Tm drugih borelijskih vrst zasledimo pri identifikaciji

B. burgdorferi sensu stricto pri uporabi obeh količin Taq polimeraze (preglednica VI in preglednica VII). Kot vzrok zakaj je prišlo do takih rezultatov (identifikacije drugih Tm) za določeno vrsto borelij lahko navedemo, da ima gen *ospA* med različnimi sevi znotraj vrste le 80 % homologijo, kar pomeni enakost med pojavi glede na nastanek in zgradbo (52), različna sestava PCR mešanice pa privede do razlike v rezultatih. Izkazalo se je, da dajejo sevi obdelani na *hbb* genu boljše rezultate identifikacije, kot sevi obdelani na *ospA* genu, saj ni bilo drugih ali nespecifičnih Tm.

Po vseh navodilih in po vseh različicah količinske uporabe Taq polimeraze ni bilo pomnoževanja sevov vseh vrst. Sicer je pomnoževanje DNA pri 50 µl Taq polimeraze z diagnostičnim kompletom LightMix boljše kot pri uporabi 10 µl Taq polimeraze. Razlike so lahko odraz degradacije DNA v vzorcih skozi obdobje njihovega hranjenja (29) ali zaradi izredne heterogenosti *ospA* gena zaradi česar se začetni oligonukleotid ne pritrdi (5). Prvi vzrok (degradacijo DNA) lahko opustimo, saj v takšnem primeru ne bi prišlo do pomnoževanja in identifikacije Tm v 100 % predhodno že na *hbb* genu. Tudi za to obstaja še druga možnost razlage, saj se gen za *hbb* nahaja na kromosomu, gen za *ospA* pa na velikem plazmidu pri čemer bi lahko bilo možno, da ob dolgotrajnem shranjevanju DNA prej propadejo plazmidi kakor kromosom.

Zmotijo nas predvsem identifikacije Tm nespecifičnih in drugih borelijskih vrst. Kaže, da *ospA* gen ni optimalna izbira za načrtovanje raziskovalnega dela glede identifikacije borelijskih vrst. Znanstveniki si tako pogosteje želijo postaviti metodo, ki bi bila uporabna tudi za neposredno dokazovanje borelij v kliničnih vzorcih (koža, kri, likvor), saj je mikrobiološka diagnostika včasih zahtevna in negotova.

6 SKLEPI

- 1) Pomnoževanje DNA na *ospA* genu borelij je bilo pri uporabi 50 µl Taq polimeraze po navodilih proizvajalca diagnostičnega kompleta LightMix uspešno.
- 2) Po predhodnjih izkušnjah laboratorija ob uporabi 10 µl Taq polimeraze pa pomnoževanje DNA na *ospA* genu borelij pri nekaterih vzorcih ni potekalo.
- 3) Kljub dobri opredelitvi vrste pri nekaterih sevih, nismo opredelili vrst pri vseh borelijah glede na *ospA*.
- 4) Identifikacija na *ospA* genu je podala mnogo navzkrižnih ali nespecifičnih rezultatov.
- 5) Identifikacija, ki temelji na *ospA* genu se zato razlikuje od identifikacije z *hbb* genom.
- 6) Zaključili smo, da bodo v Laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroz na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani še naprej rutinsko uporabljali metodo pomnoževanja v realnem času z uporabo tarčnega zaporedja na *hbb* genu.

7 LITERATURA

1. Steere AC, Malawista SE, Hardin JA, Ruddy S, Askenase W, Andiman WA: Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum, *Annals of Internal Medicine*, 1977; 86: 685-698.
2. Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwald E, Davis JP: Lyme disease – a tick-borne spirochetosis? *Science*, 1982; 216: 1317-1319.
3. Preac-Muršič V: Lymfska borelioza, *Proteus*, 2000: 344-349.
4. Johnson RC, Schmid GP, Hyde FW, Steingewalt AG, Brenner DJ: *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiological agent of Lyme disease, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1984; 34: 496-497.
5. Wang G, van Dam AP, Achwartz I, Dankert J: Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications, *Clinical Microbiology Reviews*, 1999;12(4): 633-653.
6. Burgdorfer W: Lyme borreliosis: Ten years after discovery of the etiologic agent, *Borrelia burgdorferi*, MMV Medizin Verlag GmbH München, 1991;19(4): 257.
7. Eisen L, Lane RS, Vectors of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. In: Gray JS, Kahl O, Lane RS, Stanek G: Lyme borreliosis biology, epidemiology and control, CABI Publishing, New York, 2002: 91-115.
8. Strle F, Ružič-Sabljić E, Cimperman J, Lotrič-Furlan S, Maraspin V: Comparison of findings for patients with *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* isolated from cerebrospinal fluid, *Clinical Infectious Diseases*, 2006; 43(6): 704-10.
9. Barbour AG: Fall and rise of Lyme disease and other *Ixodes* tick-borne infections in North America and Europe, *British Medical Bulletin* 1998; 54(3): 647-658.
10. Ministrstvo za zdravje republike Slovenije, Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2006, 2007: 55-6 (http://www.ivz.si/javne_datoteke/datoteke/798-Epidemiolosko_spremljanje_NB_2006.pdf) (najdeno: 28.8.2009).
11. Stanek G, Strle F: Lyme borreliosis, *Lancet*, 2003; 362:1639-47.
12. Ružič – Sabljić E. 2006. Značilnosti bakterij, ki povzročajo Lymfsko borelioza pri ljudeh. V: Lymfska borelioza 2006. Ljubljana, maj 2006. Strle F. (ur.) Ljubljana,

- Društvo za boj proti lymski boreliozi: Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana: 2006, 15-21.
13. Strle F, Maraspin-Čarman V, Furlan-Lotrič S, Ružič-Sabljić E, Pleterski-Rigler D, Cimperman J: Epidemiološke značilnosti lymske borelioze v Sloveniji, Zdravstveni vestnik, 1995; 64: 145-50.
 14. Zore A., Trilar T., Ružič – Sabljić E., Avšič-Županc T. 2006. Okuženost klopov in malih sesalcev z bakterijami *Borrelia burgdorferi* sensu lato v Sloveniji. V: Lymska borelioza 2006. Ljubljana, maj 2006. Strle F. (ur.) Ljubljana, Društvo za boj proti lymski boreliozi: Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana: 2006, 23-30.
 15. Sočan M. 2006. Epidemiologija prijavljenih primerov lymske borelioze v Sloveniji. V: Lymska borelioza 2006. Ljubljana, maj 2006. Strle F. (ur.) Ljubljana, Društvo za boj proti lymski boreliozi: Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana: 2006, 31-38.
 16. Strle F: Kakšna je možnost, da po vbodu klopa dobimo lymsko boreliozo? Zdravstveni vestnik, 1991; 60: 140-0.
 17. Duh D: Gozdni klop (*Ixodes ricinus*) kot prenašalec babezij v Sloveniji, Magistersko delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, 2002: 62.
 18. Stanek G, Burger I, Hirsch A, Wewalka G, Radda A: *Borrelia* transfer by ticks during their life cycle, Studies on laboratory animals, Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, 1986; 1-2: 29-33.
 19. Logar J: Klopi in pršice (Acarina). V: Parazitologija v medicini, Ljubljana, DZS, 1999: 157-9.
 20. Humair PF, Gern L: The wild hidden face of Lyme borreliosis in Europe, Microbes and Infection, 2000; 2: 915-922.
 21. Steere AC: Medical progress, Lyme disease, New England Journal of Medicine, 2001; 345(2): 115-124.
 22. Paster BJ, Dewhirst FE, Weisburg WG, Tordoff LA, Fraser GJ, Hespell RB, Stanton TB, Zablen L, Mandelco L, Woese CO: Phylogenetic analysis of the spirochetes, Journal of Bacteriology, 1991, 173; 19: 6101-6109.
 23. Barbour AG, Hayer SF: Biology of *Borrelia* species, Microbiological Reviews, 1986; 50(4): 381-400.

24. Bergstroem S, Noppa L, Gylfe A, Ostberg Y: Molecular and cellular biology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. In: Gray JS, Kahl O, Lane RS, Stanek G: Lyme borreliosis biology, epidemiology and control, CABI Publishing, New York, 2002: 47-74.
25. Strle F. Lymska borelioza. V: Klopni meningoencefalitis, Lymska borelioza. Lešničar J., Strle F. (ur.). Celje, Bolnišnica Celje: 1992: 33-98.
26. Rosa PA, Tilly K, Stewart PE: The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete, Nature Publishing Group, 2005; 3(2): 129-143.
27. Skotarczak B: Adaptation factors of *Borrelia* for host and vector, Ann Agric Environ Med, Poland, 2009; 16: 1-8.
28. Stanek G: Borreliosis and travel medicine, J Travel Med, 1995; 2(4): 244-251.
29. Gooskens J, Templeton KE, Van Dam Claas in AP: Evaluation of an internally controlled real-time PCR targeting the *ospA* gene for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in cerebrospinal fluid, Clin Microbiol Infect, 2006; 12(9): 894-900.
30. Richard H: Spirochetes and *Neisseria*, University of South Carolina, Columbia, 2005: 1 (najdeno: 10.2.2010) <http://pathmicro.med.sc.edu:85/fox/spiro-neisseria.htm>
31. Hsieh YF, Liu HW, Hsu TC, Wei JCC, Shih CM, Krause PJ, Tsay GJ: Serum reactivity against *Borrelia burgdorferi* OspA in patient with rheumatoid arthritis, Clinical and Vaccine Immunology, 2007; 14(11): 1437-1441.
32. Will G, Jauris-Heipke S, Schwab E, Busch U, Rößler D, Soutcshek E, Wilske B, Preac-Muršič V: Sequence analysis of OspA genes shows homogeneity within *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* strains but reveals major subgroups within the *Borrelia garinii* species, Medical Microbiology and Immunology, 1995; 184: 73-80.
33. Strle F. 2006. Patogeneza lymske borelioze – mikrobiološki in klinični vidiki. V: Lymska borelioza 2006. Ljubljana, maj 2006. Strle F. (ur.) Ljubljana, Društvo za boj proti lymski boreliozi: Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana: 2006, 39-44.
34. Pavan WO: Local epidemiology and clinical manifestations of Lyme disease, Int J. Med. Sci., 2009; 6 (3): 123.

35. Strle F. 2006. Klinična slika lymške borelioze. V: Lymška borelioza 2006. Ljubljana, maj 2006. Strle F. (ur.) Ljubljana, Društvo za boj proti lymški boreliozi: Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana: 2006, 45-49.
36. Portnoi D, Sertour N, Ferquel E, Garnier M, Baranton G, Postic D: A single-run, real-time PCR for detection and identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, based on *hbb* gene sequence, Fems Microbiol Lett, 2006;259(1): 35-40.
37. Nau R, Christen HJ, Eiffert H: Lyme disease – current state of knowledge, Dtsch Arztebl Int, 2009; 106(5): 72-82.
38. Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GO: Diagnosis of Lyme boreliosis, Clinical Microbiology Reviews, 2005;18(3): 483-509.
39. Arko B: Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji, Farmacevtski vestnik, 2004, 55: 215-220.
40. Priem S, Ritting MG, Kamrandt T, Burmester GR, Krause A: Optimized PCR leads to rapid and highly sensitive detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme borreliosis, Journal of Clinical Microbiology, 1997;35(3): 685-690.
41. Pahl A, Kuhlbrandt U, Brune K, Rollinghoff M, Gessner A: Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* by real-time PCR, Journal of Clinical Microbiology, 1999;37(6): 1958-1963.
42. Cerar T, Ružič-Sabljić E, Glinšek U, Zore A, Strle F: Comparison of PCR methods and culture for the detection of *Borrelia* spp. in patients with erythema migrans, Clin Microbiol Infect, 2008; 14(7): 653-658.
43. Mackay IM: Real-time PCR in the microbiology laboratory, Clinical Microbiol Infect, 2004; 10: 190-212.
44. Bustin SA: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology, 2000; 25: 169-193.
45. Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT: Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification, Biotechniques, 1998; 24: 954-958.
46. Foy CA, Parkers HC: Emerging homogeneous DNA-based technologies in the clinical laboratory, Clinical Chemistry, 2001; 47: 990-1000.

47. Gut M, Leutenegger CM, Huder JB, Pedersen NC, Lutz H: One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses, *Journal of Virological Methods*, 1999; 77: 37-46.
48. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP: Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification, *Biotechniques*, 1997; 22: 130-138.
49. Funa A, Šavs T, Škrbat S: Kako dolgo imajo bolniki z erythema migrans prisesane klope? *Medicinski razgledi*, 1996; 35: 297-307.
50. Ružić – Sabljic E. 2006. Mikrobiloška diagnostika borelijskih okužb, V: *Lymenska borelioza 2006*. Ljubljana, maj 2006. Strle F. (ur.) Ljubljana, Društvo za boj proti lymski boreliozi: Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana: 2006, 139-145.
51. LightMix® for the detection on *Borrelia* spp., Verzija 080328, 2008 TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Germany, 2008: 1-4.
52. Wilske B, Luft B, Schubach WH, Zumstein G, Jauris S, Preac-Muršič V, Kramer MD: Molecular analysis of outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi* for conserved and variable antibody binding domains. *Medical Microbiology and Immunology*, 1992; 181: 191-207.