

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA EKAR

**VREDNOTENJE KOMERCIALNO DOSTOPNEGA MOLEKULARNEGA TESTA
ZA DOKAZ BORELIJSKE DNK V HUMANIH VZORCIH**

**EVALUATION OF COMMERCIALLY AVAILABLE MOLECULAR TEST FOR
DETECTION OF BORRELIA DNA IN HUMAN SAMPLES**

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, v laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroze, pod mentorstvom prof. dr. Eve Ružič-Sabljić, dr. med. in somentorstvom asist. dr. Tjaše Cerar, univ. dipl. mikr..

Zahvala

Hvala mentorici, profesorici Evi Ružič-Sabljić, in somentorici, asistentki Tjaši Cerar, za vso strokovno pomoč, usmerjanje in vse spodbude pri diplomskem delu. Hvala celotnemu kolektivu laboratorija za diagnostiko borelioz in leptospiroze, še posebej Jasmini Zlotrg, za vso pomoč v laboratoriju. Hvala tudi vsem zaposlenim iz laboratorija za bakteriološko diagnostiko infekcij sečil za vse nasvete in prijetno delovno vzdušje. Hvala vsem zaposlenim na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo, ki so mi kakorkoli pomagali. Nenazadnje, hvala moji družini, še posebej sestri Petri in svaku Robiju, in vsem prijateljem, ki so mi tekom študija stali ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno, pod mentorstvom prof. dr. Eve Ružič-Sabljić, dr. med. in somentorstvom asist. dr. Tjaše Cerar, univ. dipl. mikr..

Tjaša Ekar

Ljubljana, oktober 2011

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Slavko Pečar, mag. farm.

Članica diplomske komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, mag. farm.

VSEBINA

1. UVOD.....	1
1.1. Lymska borelioza	1
1.2. Diagnostika lymske borelioze	9
1.2.1. Prikaz <i>B. burgdorferi</i> sensu lato z neposrednim mikroskopiranjem	9
1.2.2. Osamitev <i>B. burgdorferi</i> sensu lato	9
1.2.3. Dokazovanje molekule DNK <i>B. burgdorferi</i> sensu lato.....	11
1.2.4. Dokaz specifičnih protiteles	19
1.3. Zdravljenje lymske borelioze	22
2. NAMEN DELA	25
3. MATERIALI IN METODE	27
3.1. VZORCI	27
3.2. METODE.....	28
3.2.1. Klasična PCR – pomnoževanje medgenske regije <i>rrl-rrf</i>	28
3.2.2. Enostopenjska vgnezdna PCR (<i>angl. »nested« PCR</i>) - pomnoževanje medgenske regije <i>rrl-rrf</i> z uporabo zunanjih in notranjih oligonukleotidnih začetnikov	29
3.2.3. Dvostopenjska vgnezdna PCR (<i>angl. »nested« PCR</i>) - pomnoževanje gena <i>OspA30</i>	32
3.2.4. Analiza pridelkov PCR reakcij	32
3.2.5. Encimska restrikcija PCR pridelkov medgenske regije <i>rrl-rrf</i> z endonukleazo <i>MseI</i>	32
3.2.6. Izolacija borelijske DNK iz vzorcev, dobljenih z avtomatsko ali ročno DNK izolacijo iz mešanice likvorja in znane količine borelijske kulture.....	35
3.2.7. artus® Borrelia LC PCR Kit.....	37
4. REZULTATI	41
4.1. Metoda klasične PCR	41
4.1.1. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste <i>B. garinii</i>	42
4.1.2. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih DNK, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev	42
4.2. Metoda dvostopenjske vgnezdene PCR	43

4.2.1. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste <i>B. garinii</i>	44
4.2.2. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih DNK, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev	44
4.2.3. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih zunanjih kontrol	45
4.3. Metoda enostopenjske vgnezdene PCR.....	47
4.3.1. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste <i>B. garinii</i>	47
4.3.2. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih DNK, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev	48
4.3.3. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih zunanjih kontrol	49
4.4. Metoda PCR v realnem času - artus® Borrelia LC PCR Kit	50
4.4.1. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste <i>B. garinii</i>	50
4.4.2. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih DNK, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev	51
4.4.3. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih zunanjih kontrol	52
4.4.4. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih DNK posameznih borelijskih vrst	54
4.4.5. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih mešanice likvorjev	55
4.5. Primerjava metod PCR	56
4.5.1. Primerjava rezultatov dokazovanja borelijskega genoma v vzorcih, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste <i>B. garinii</i>	56
4.5.2. Primerjava rezultatov dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih DNK, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev	57
4.5.3. Primerjava rezultatov dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih zunanjih kontrol	59
5. RAZPRAVA.....	63
5.1. Analiza rezultatov dokazovanja borelijskega genoma v vzorcih, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste <i>B. garinii</i>	63

5.2. Analiza rezultatov dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih DNK, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev	63
5.3. Analiza rezultatov dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih zunanjih kontrol.....	64
5.4. Analiza rezultatov dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih DNK posameznih borelijskih vrst (uporaba artus® Borrelia LC PCR Kit-a).....	65
5.5. Analiza rezultatov dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih mešanice likvorjev (uporaba artus® Borrelia LC PCR Kit-a)	65
6. SKLEP	67
7. LITERATURA	68

POVZETEK

Lymska borelijoza je v širokem pasu severne poloble najpogostejša bolezen, ki jo prenašajo klopi (spirohetoza). Povzročajo jo bakterije iz družine spirohet, ki jih skupno imenujemo *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Bolezen lahko prizadene številne organske sisteme in ima zelo raznolik potek. Mnoge pojavne oblike za lymsko borelijozo niso značilne, zato je mikrobiološka potrditev borelijske okužbe pogosto potrebna in pomembna. Danes v diagnostiki infekcijskih bolezni v ospredje vse bolj stopa metoda PCR* v realnem času, vendar kljub številnim raziskavam ni na voljo še nobenega testa, ki bi to metodo uvedel v rutinsko diagnostiko. V diplomskem delu smo komercialno dostopni test metode PCR v realnem času (artus *Borrelia* LC PCR Kit, Qiagen) primerjali s tremi metodami PCR, ki so v laboratoriju za dokazovanje borelijske DNK že rutinsko uporabljane. Uporabljene rutinske metode so bile klasična PCR – pomnoževanje medgenske regije *rml-rml*, dvostopenjska vgnezdna PCR – pomnoževanje gena *OspA* ter enostopenjska vgnezdna PCR – pomnoževanje medgenske regije *rml-rml*. Primerjali smo rezultate 56 rutinskih kliničnih vzorcev, ki smo jih analizirali z vsemi štirimi metodami PCR, vključujoč test z metodo PCR v realnem času. Test je sedem vzorcev ovrednotil kot pozitivne. Pri analizi z metodo dvostopenjske vgnezdene PCR smo dobili šest pozitivnih rezultatov. Metoda enostopenjske vgnezdene PCR nam je dala pet pozitivnih rezultatov, medtem ko smo z metodo klasične PCR prisotnost borelijske DNK dokazali le v treh vzorcih. Občutljivost testa smo dokazovali z vzorci, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste *B. garinii*. Test se je napram že uporabljanim tehnikam PCR izkazal kot občutljivejši. Z analizo vzorcev, ki smo jih iz mešanice likvorja in znane količine borelijske kulture dobili bodisi z ročno bodisi z avtomatsko izolacijo, smo pokazali, da sam način izolacije na rezultat bistveno ne vpliva. Sposobnost testa, da v vzorcu dokaže prisotnost borelijskega genoma, smo dokazovali z uporabo 30 zunanjih kontrol. Z analizami smo uspešno dokazali tako borelije lymske borelijoze, kot tudi borelije, ki jih v kompleks *B. burgdorferi* sensu lato ne uvrščamo, kar kaže na njegovo nespecifičnost za borelije lymske borelijoze. Test prav tako borelij ne opredeli do vrste, kar je prednost treh primerjanih metod. Največjo prednost predstavlja njegova hitrost in zmožnost kvantifikacije bakterij v vzorcu, česar ostale tri metode ne omogočajo.

*PCR – »verižna reakcija s polimerazo«, angl. »polymerase chain reaction«

ABSTRACT

Lyme disease is one of the most common tick-borne diseases in Northern Hemisphere (spirochetosis). It is caused by spirochetes of *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex. The disease can affect many organ systems and has a very varied course. Many Lyme disease manifestations are nonspecific, thus the microbiological confirmation is often necessary and important. Real-time PCR* is nowadays becoming one of the most promising diagnostic tools in diagnosis of infectious diseases, but despite numerous investigations, there is still no diagnostic real-time PCR test for routine diagnosis of Lyme disease. In our research, we evaluated commercially available test of real-time PCR for the detection of *Borrelia* DNA in human specimens (Borrelia LC Artus PCR Kit, Qiagen). Test was compared with three, in the laboratory routinely used PCR methods. These were classic PCR – targeting the *rfl-rrf* region, two-stage nested PCR – targeting *OspA* gene and one-stage nested PCR – targeting the *rfl-rrf* region. We compared results for PCR analysis of 56 DNA isolates from clinical samples for all four PCR methods, including real-time PCR. Using commercially available test (real-time PCR), seven specimens were positive. There were six positive results with method of two-stage nested PCR and five positive results with one-stage nested PCR. With classical PCR we obtained positive result in only three samples. The sensitivity of the test was evaluated with the use of diluted DNA samples of *B. garinii*. Test has proved to be more sensitive than other evaluated PCR techniques. By analyzing DNA samples, gained either by manual or automatic isolation from mixture of cerebrospinal liquid and *Borrelia* culture, we showed that the type of isolation did not significantly affect the result. With use of 30 external controls we demonstrated test ability to show the presence of *Borrelia* genome in tested specimens. The observed weakness of the test is its non-specificity for bacteria of *B. burgdorferi* sensu lato complex. Additionally, it does not identify *Borrelia* to its species, which is an advantage of the three compared PCR methods. The biggest advantage of the test is its speed and ability to quantificate bacteria in the sample, which the other three methods do not allow.

*PCR - »polymerase chain reaction«

Seznam okrajšav

okrajšava	pomen
ACA	<i>acrodermatitis chronica atrophicans</i> , kronični atrofični akrodermatitis
atb terapija	antibiotična terapija
BSA	bovine serum albumine (<i>angl.</i>), goveji serumski albumin
Ct	cikel PCR v realnem času, ko merjena fluorescenca poraste nad fluorescenco ozadja
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (<i>angl.</i>), etilendiamintetraocetna kislina
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay (<i>angl.</i>), encimski imunski test
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IFT	imunofluorescenčni test
IMI	inštitut za mikrobiologijo in imunologijo
Kb	kilobazni pari (tisoč baznih parov)
Osp	outer surface proteins (<i>angl.</i>), bakterijski zunanji površinski proteini
PCR	polymerase chain reaction (<i>angl.</i>), verižna reakcija s polimerazo
RNK	ribonukleinska kislina
<i>rrf</i>	gen, ki nosi zapis za 5S ribosomsko ribonukleinsko kislino
<i>rpl</i>	gen, ki nosi zapis za 23S ribosomsko ribonukleinsko kislino
<i>rpl-rrf</i>	182-bp velika intergenska sekvenca med genoma <i>rpl</i> in <i>rrf</i>
rRNK	ribosomska ribonukleinska kislina
Salp15	salivary protein (<i>angl.</i>), klopov salivarični protein
TAE	tris(hidroksimetil)aminometan/acetat/EDTA , pufer
TBE	tris(hidroksimetil)aminometan/borova kislina/EDTA , pufer
TEMED	tetrametiletilenediamin , potreben za polimerizacijo akrilamida pri pripravi poliakrilamidnega gela
TROSPA	tick receptor for OspA (<i>angl.</i>), receptor, ki preko površinske borelijske beljakovine OspA omogoča pritrditev <i>B. burgdorferi</i> sensu lato na klopovo črevo

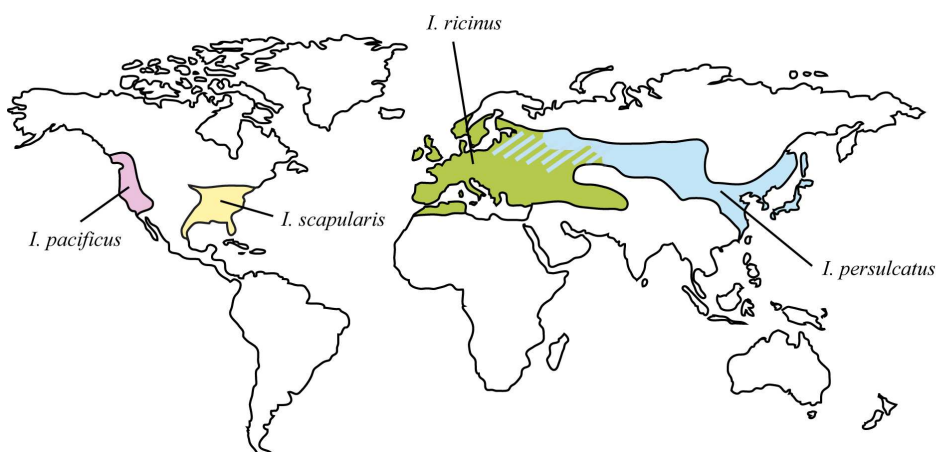
Pogosto uporabljeni termini

termin	obrazložitev termina
antigen	vsaka snov, ki sproži imunski odziv
<i>erythema migrans</i>	značilna kožna sprememba, zgodnji lokalizirani klinični znak lymške borelioze
patogen	mikroorganizem, ki povzroči bolezen
spiroheta	bakterija iz družine <i>Spirochaetaceae</i> (družina spirohet, v katero sodijo rodovi <i>Spirochaeta</i> , <i>Cristispira</i> , <i>Treponema</i> , <i>Borrelia</i> in <i>Leptospira</i>)
spirohetoza	bolezen, ki jo povzročajo spirohete
spirohetemija	spirohete v krvi

1. UVOD

1.1. Lymška borelioza

Lymška borelioza je najpogostejša spirohetoza, ki jo prenašajo klopi [1]. Ime je dobila po ameriškem mestu Lyme, kjer so leta 1975 pri otrocih opazili nenavadno visoko pojavnost artritisa velikih sklepov. Razširjena je v širokem pasu severne poloble, najpogosteje se pojavlja v Evropi in Severni Ameriki in se ujema z razširjenostjo njenih poglavitnih prenašalcev, ščitastih klopov iz rodu *Ixodes* [1, 2] (slika 1).



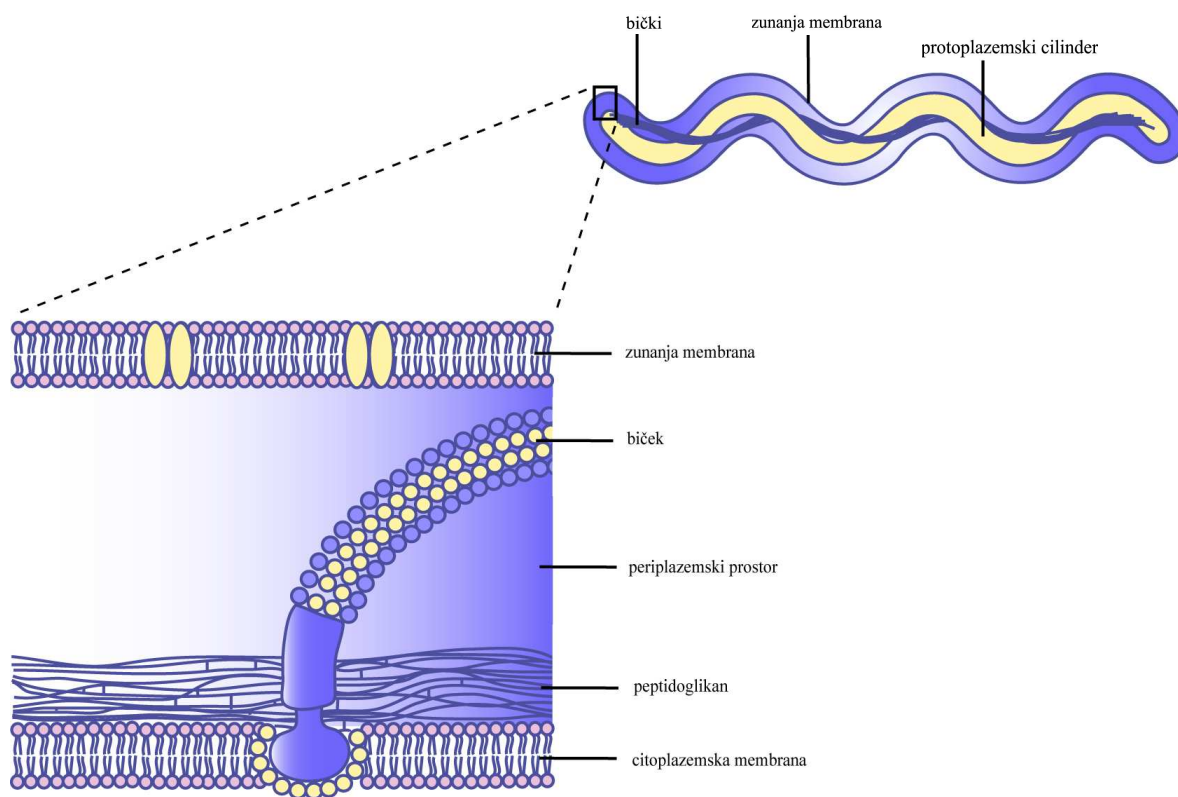
Slika 1: Geografska porazdelitev poglavitnih prenašalcev lymške borelioze – ščitastih klopov iz rodu *Ixodes*: *I. ricinus* v Evropi, *I. persulcatus* v Evraziji ter *I. pacificus* in *I. scapularis* v ZDA (prirejeno po [3]).

Slovenija sodi med države z visoko stopnjo zbolevanja prebivalstva za lymško boreliozo, ki je pri nas endemična [4]. Smo ena redkih držav Evropske unije, kjer je prijava bolnika z lymško boreliozo obvezna [5, 6].

Povzročitelji lymške borelioze so borelije, bakterije iz družine spirohet, ki jih skupno imenujemo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sensu lato - v širokem pomenu). Delijo se na vsaj enajst borelijskih vrst, od katerih jih najmanj pet povezujejo z boleznijo pri človeku (pogosto *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto (sensu stricto - v ožjem pomenu); redko: *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*) [2, 7, 8]. V nasprotju z Ameriko, kjer so kot

vzrok lymfske borelioze do sedaj kot edino patogeno vrsto izolirali *B. burgdorferi* sensu stricto, v Evropi bolezen najpogosteje povzročata vrsti *B. afzelii* in *B. garinii* [9]. V Sloveniji med humanimi izolati prevladuje *B. afzelii* (najmanj 80% vseh izolatov), sledi *B. garinii* (približno 16%), najredkeje pa izoliramo *B. burgdorferi* sensu stricto (do 4%) [4].

Borelije so izredno gibljive, od 5 do 30 μm dolge bakterije, s premerom od 0,2 do 0,3 μm . Gibanje jim omogoča od sedem do enajst bičkov, ki se nahajajo v periplazemskem prostoru (prostor med notranjo in zunanjo membrano) in so pritrjeni na nasprotna bakterijska pola. Oviti so okrog protoplazemskega cilindra (*Protoplazemski ali celični cilinder predstavlja centralno strukturo spirohete in zajema genetski material, citoplazmo, citoplazemsko membrano ter plast peptidoglikana* [10].) in se na sredini bakterije med seboj prekrivajo [7, 8, 11]. Značilna zgradba borelijam omogoča učinkovito gibanje v viskoznem okolju, kjer ostale bakterije zmožnost premikanja navadno že izgubijo [12] (slika 2).

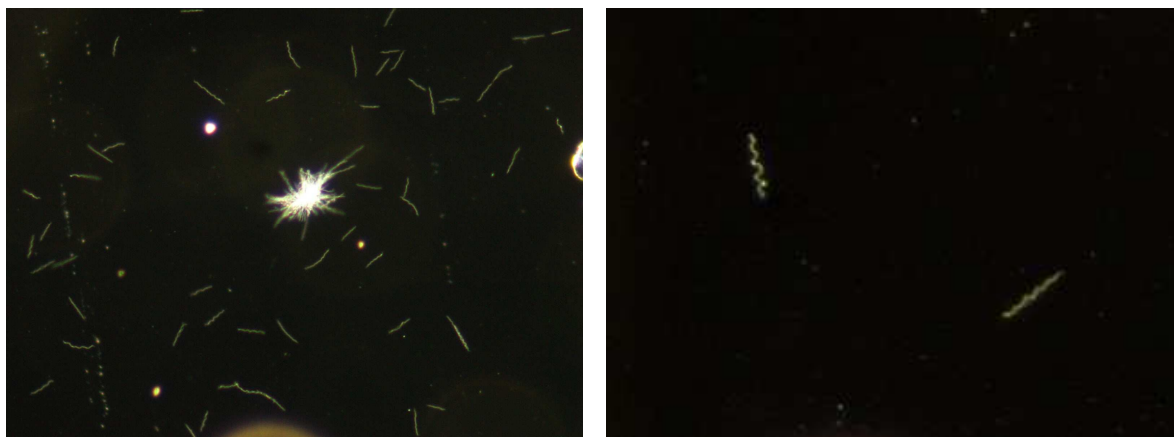


Slika 2: Struktura bakterije *Borrelia burgdorferi* sensu lato (prirejeno po [13]).

Osnovna strukturna enota borelijskih bičkov je flagelin, ena izmed najpomembnejših imonogenih beljakovin, ki v poteku okužbe sproži prvi protitelesni odziv. Pomembni antigeni so tudi zunanji površinski proteini, imenovani Osp (*angl.: »outer surface protein«*) A, B, C, D, E in F, ki jih posamezni sevi različno izražajo [10].

Borelijski genom je majhen (1,5 Mb parov) in ga sestavljajo (za bakterije nenavaden) linearen kromosom ter linearni in krožni plazmidi, katerih število se glede na sev spreminja [8, 9]. Znano je, da vrste borelij, glede na svojo okolico, prilagajajo izražanje genov in nekatere izražajo izključno v vretenčarskih gostiteljih ali pa je njihovo izražanje v tem okolju močno povečano. Tako na primer spirohete, ko se nahajajo v lumnu klopovega črevesja, na svoji površini izražajo beljakovino OspA, ki *B. burgdorferi* sensu lato omogoča pritrditev na receptorsko molekulo TROSPA v klopovem črevesju. Ko se klop prisesa na svojega gostitelja, borelije zmanjšajo izražanje gena *OspA* in prično na svoji površini izražati protein OspC, ki nase veže klopov salivarični protein Salp15, ki s svojimi imunosupresivnimi lastnostmi pospeši infekcijo in s tem prehod *B. burgdorferi* sensu lato s klopa na gostitelja [14, 15].

Kljub splošno sprejeti ugotovitvi, da so borelije mikroaerofilne bakterije, so dokazali, da so borelijske vrste sposobne tudi anaerobne rasti [16]. Po Gramu jih težko obaravamo. Najlaže jih vidimo z mikroskopiranjem v temnem polju (slika 3).



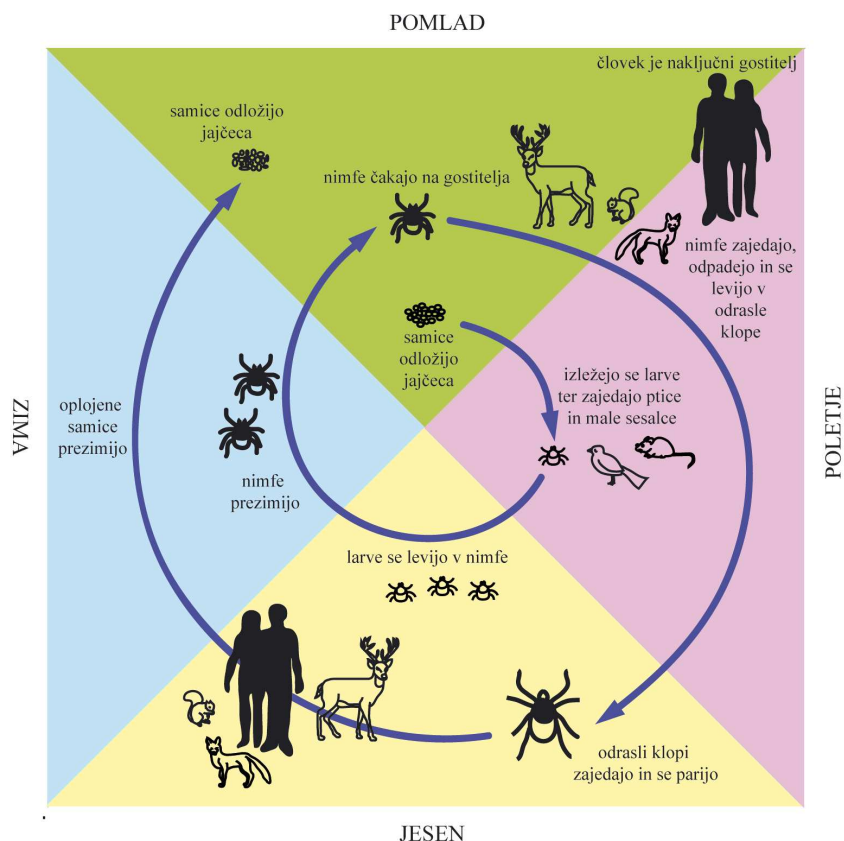
Slika 3: Borrelia burgdorferi sensu lato v mikroskopskem preparatu pri mikroskopiranju v temnem polju. Na levi fotografiji (400-krat povečano) je na sredini viden svetel skupek spirohet, v okolici so vidne posamezne borelije. Desna fotografija je povečava (1000-krat povečano) in na njej lahko opazimo značilne bakterijske zavoje (IMI 2011).

Za kultivacijo so vrste borelij zahtevne bakterije in potrebujejo gojišča, obogatena z zajčjim serumom, serumskimi albumini in želatino. Rastejo zelo počasi pri temperaturah od 30 do 34 °C, generacijski čas pa v odvisnosti od prilagoditve na umetni medij niha med 7 do 20 urami [4, 8]. So izredno prilagodljive bakterije, ki pri kroženju med členonožci in vretenčarji prehajajo iz okolja brez imunskega sistema v okolje z visoko razvito protitelesno obrambo in se pri tem hkrati prilagajajo tudi velikim temperaturnim spremembam [7].

Vrste borelij lahko poleg kloпов prenašajo tudi drugi insekti, ki sesajo kri: mušice, obadi, komarji; vendar je v primerjavi s klopi njihova vloga stranska in slabo raziskana [4, 17].

V naravi *B. burgdorferi* sensu lato preživi in se razmnožuje v vretenčarskih rezervoarjih, s katerih se ob sesanju krvi prenese na prenašalce - klope. V Evropi najpomembnejši rezervoar med malimi sesalci predstavljajo miši in voluharice (rezervoar za *B. afzelii*, *B. burgdorferi* sensu stricto ter redkeje tudi *B. garinii*) [7], med pticami pa kot rezervoar prevladujejo kosi in njihovi sorodniki [1]; predstavljajo rezervoar za *B. garinii* in *B. valaisiana* [7]. Človek je za borelije le naključni gostitelj [1].

Klopi gostitelja v življenjskem ciklu zamenjajo trikrat: prvič kot larve, drugič kot nimfe in tretjič kot odrasli zajedalci [4] (slika 4).



Slika 4: Klopov življenjski krog (prirejeno po [18, 19]).

Iz jajčec se izležejo larve, ki se hranijo na vretenčarskem gostitelju 3-5 dni. Po hranjenju odpadejo in se preobrazijo v nimfe. Tudi nimfe sesajo na gostitelju 3-5 dni. Po hranjenju odpadejo in se preobrazijo v odraslo žival. Preobrazba poteka na rastlinju ali na velikem sesalcu, kjer odrasla samica sesa kri 9-11 dni. Samica nato v zemljo odleže jajčeca in cikel se ponovi. Življenjski krog klopa traja običajno 2 leti, lahko pa tudi 5-6 let [1].

Ob hranjenju spiroheta preide v lumen klopovega črevesja in tam dalj časa miruje. Ob klopovem naslednjem sesanju krvi se začne razmnoževati in preide iz črevesja v žleze slinavke. Ker sesanje klopa na gostitelju spremlja izločanje žlez slinavk, vrste borelij tako z izločki potujejo v gostitelja in ga okužijo. Za uspešen prenos borelij mora klop sesati praviloma več kot 24 ur [1], čeprav so nekatere študije na nimfah *I. ricinus* pokazale, da lahko do prenosa pride tudi že po samo 16 urah pritrditve [16]. Pri sistemsko okuženih klopih, ki imajo borelije tudi v ostalih tkivih, predvsem v žlezah slinavkah, je ta čas krajši.

Lahko le nekaj ur. Z daljšim sesanjem gostiteljeve krvi se verjetnost prenosa vrst borelij z gostitelja na klopa in obratno močno poveča [1].

Lymska borelioza lahko prizadene številne organske sisteme in ima zelo raznolik potek. Delimo jo na zgodnje in pozno obdobje. Zgodnje obdobje še naprej delimo na lokalizirano in diseminirano zgodnje obdobje (preglednica I) [20].

Preglednica I: Klinična slika lymske borelioze [20].

	OBD OBJE (stadij) BOLEZNI	KLINIČNI ZNAK	ZAČETEK BOLEZNI	TRAJANJE BOLEZNI*
ZGODNJE BOLEZENSKO OBD OBJE	lokalizirana okužba	<i>erythema migrans</i> borelijski limfocitom	nekaj dni do tednov** nekaj dni do tednov**	nekaj tednov do mesecev nekaj tednov do več mesecev
	diseminirana okužba	multipli <i>erythema migrans</i> nevroborelioza prizadetost srca prizadetost sklepov	nekaj dni do tednov** nekaj dni do mesecev** nekaj dni do mesecev** običajno več mesecev**	nekaj tednov do mesecev več mesecev nekaj tednov več mesecev
POZNO BOLEZENSKO OBD OBJE	kronična prizadetost:	sklepov živčevja kože (ACA)	vsaj 6-12 mesecev*** vsaj 6-12 mesecev*** več mesecev do let**	neomejeno neomejeno neomejeno (trajno)

* brez ustreznega zdravljenja

** po okužbi

*** po začetku prvih bolezenskih znakov

ACA – *acrodermatitis chronica atrophicans*

Sami znaki bolezni so deloma odvisni od vrste povzročitelja: *B. garinii* največkrat povzroča okvare živčevja, *B. afzelii* okvare kože, *B. burgdorferi* sensu stricto pa

razmeroma pogosto povzroča okvare sklepov. Okužbe z vrstami borelij so pogosto tudi brezsimptome [20].

Prizadetost kože predstavlja približno 80 % vseh primerov lymške borelioze. Za kožno prizadetost so značilne tri spremembe: *erythema migrans*, borelijski limfocitom in *acrodermatitis chronica atrophicans* [20].

Bolezen se pri večini bolnikov začne s počasi razširjajočo kožno spremembo (*erythema migrans*), ki se običajno pojavi na mestu klopovega vboda, nekaj dni do nekaj tednov kasneje. *Erythema migrans* se kaže kot rdečina, ki se postopno veča, v sredini začne bledeti in dobi obliko obroča, ki se še naprej širi navzven. Lahko se pojavi kjerkoli na telesu [20, 21]. Je odraz reakcije organizma na lokalno širjenje povzročitelja po koži in ga uvrščamo v zgodnjo, lokalizirano obliko lymške borelioze. Oznaka, da gre za lokalizirano obliko okužbe, je glede na prisotne klinične znake sicer upravičena, vendar včasih zavaja oz. ne drži, saj vdoro bakterije v tem obdobju pri nekaterih bolnikih v kri in se razsejejo v razna tkiva; možen je tudi razsoj preko limfe [22]. Razsoj povzročitelja lahko spremljajo gripi podobni simptomi, kot so vrtoglavica, oslabelost, glavobol, bolečine v sklepih in mišicah, povišana telesna temperatura ter lokalno povečane bezgavke [9]. Vrste borelij na svojo površino vežejo človeški plazminogen in aktivator plazminogena. Plazmin ima močno proteolitično aktivnost, kar borelijam olajšuje vstop v tkiva. Tako se lahko pripnejo na številne receptorske molekule, vključno z integrinskimi receptorji, glikoproteini in proteoglikani celic gostitelja in ekstracelularnega matriksa [12, 21]. Preko dekorin-vezočih proteinov A in B na primer vežejo dekorin, glikozaminoglikan na kolagenskih vlaknih, kar lahko razloži značilen razsoj bakterij ob kolagenskih vlaknih ekstracelularnega matriksa srca, živčnega sistema in sklepov [9]. Posledice takega razsoja se pri vseh bolnikih klinično ne pokažejo takoj. Obdobje brez bolezenskih znakov lahko traja nekaj dni, večinoma pa več tednov ali mesecev, včasih celo let; nato se pojavijo dodatne kožne spremembe (multipli *erythema migrans*), znaki prizadetosti živčevja, srca, sklepov in/ali drugih tkiv oz. organov. Pri večini bolnikov so izraženi le posamezni bolezenski znaki. *Erythema migrans* po nekaj tednih sam od sebe izgine [22, 23].

Druga zgodnja lokalizirana oblika lymške borelioze je borelijski limfocitom, ki je odraz imunske reakcije na prisotnost borelijskih antigenov v koži in podkožju. Pogostejši je pri otrocih in se kaže kot modrikasto-rdečkast vozlič na ušesni mečici. Pri odraslih se borelijski limfocitom najpogosteje pojavlja na prsni bradavici [23]. Je mnogo redkejša

sprememba kot *erythema migrans*, pojavi se nekoliko pozneje in traja dlje. Izgine spontano, vendar včasih šele po letu dni ali pozneje [21].

Med pozne borelijske spremembe kože prištevamo *acrodermatitis chronica atrophicans*, ki v nasprotju z *erythema migrans* in borelijskim limfocitomom sam od sebe ne izgine. Prve spremembe se pokažejo mesece do leta po vnosu borelij v organizem. Začetek bolezni je postopen, komaj zaznaven: pojavi se rdeče-modrikasto obarvana koža (največkrat na hrbtišču ene od rok, na hrbtni strani stopala ali v predelu kolena), ki se zelo počasi širi. Prve mesece do leta je prizadeti predel običajno otekel. Kasneje oteklina izgine, vse bolj pa v ospredje stopa atrofija [23].

Prizadetost živčevja pri lymski boreliozii imenujemo lymska nevroborelioza. Zajame lahko osrednje živčevje in/ali periferno živčevje. V zgodnjem obdobju se pri odraslih bolnikih v Evropi najpogosteje srečujemo s klinično sliko meningoradikulonevritisa (Garin-Bijadoux-Bannwarthov sindrom), ki jo označujejo značilne, seleče se, hude, stalno prisotne bolečine, ki se na analgetike slabo odzivajo. Med pojavne zgodnje oblike lymske nevroborelioze sodi tudi borelijski meningitis. Meningitisni znaki (slabost, bruhanje in zvišana telesna temperatura), ki so pri drugih vnetjih osrednjega živčevja praviloma izraziti, so pri lymski nevroboreliozii običajno slabo izraženi. V poznem obdobju lymske nevroborelioze najpogosteje srečamo periferno nevropatijo, pridruženo *acrodermatitis chronica atrophicans* [24]. Pojavi se lahko tudi kronični encefalomyelitis, ki ga v Evropi najpogosteje povzroča *B. garinii* [9].

Lymski artritis je najpogostejši klinični znak zgodnje diseminirane in pozne okužbe z *B. burgdorferi* sensu stricto pri bolnikih v ZDA. Značilno je, da bolnik zbolí nenadoma, z oteklino enega ali več sklepov. Prizadeti so predvsem veliki sklepi, najpogosteje koleno, redkeje komolec, gleženj, čeljustni sklep, le včasih ramenski sklep ali kolk. V začetku so napadi lymskega artritisa pogostejši in krajši, nato se trajanje vnetja sklepov podaljša na več tednov ali mesecev. Pri približno 10 % bolnikov nastane kronični artritis, ki traja eno ali več let [25].

Lymska borelioza lahko prizadene tudi mišice, najpogosteje pride do vnetja ramenskega obroča ter spodnjih in zgornjih okončin [25]. Posamično, ali v kombinaciji z drugimi pojavnimi oblikami bolezni, se lahko razvije tudi prizadetost srca – lymski karditis. Prizadetost oči se pojavlja redko [26].

1.2. Diagnostika lymške borelioze

Klinična slika lymške borelioze je zelo pestra in spreminjajoča se. Nekateri pojavní znaki (npr. *erythema migrans*) so tako značilni, da omogočajo zanesljivo klinično diagnozo [4]. Mnoge pojavne oblike bolezni pa za borelijsko okužbo niso značilne (npr. meningitis, artritis) ali so takšne, da borelijsko etiologijo z večjo ali manjšo verjetnostjo le nakazujejo. Mikrobiološka potrditev borelijske okužbe je zato pogosto potrebna in pomembna [27].

Borelijsko okužbo lahko v kliničnih vzorcih neposredno dokazujemo:

- z uporabo neposrednega mikroskopiranja kliničnih vzorcev,
- osamitvijo *B. burgdorferi* sensu lato v tekočem gojišču in
- z dokazovanjem molekule DNK *B. burgdorferi* sensu lato.

Lymško boreliozo lahko dokažemo tudi posredno z dokazom bolnikovega imunskega odziva na borelijske antigene. Pri tem uporabljamo:

- metode dokaza specifičnih protiteles v bolnikovem serumu, likvorju ali sklepní tekočini [27].

Uporaba metod je odvisna od stadija bolezni in bolnikovega imunskega stanja; pogosto jih kombiniramo [4].

1.2.1. Prikaz *B. burgdorferi* sensu lato z neposrednim mikroskopiranjem

Spirohetemija je pri borelijah lymške borelioze kratkotrajna, število v krvi prisotnih bakterij pa je majhno, zato ima direktni razmaz krvi v mikrobiološki diagnostiki omejeno uporabnost. V tkivih je *B. burgdorferi* sensu lato sicer navadno prisotna v večjem številu kot v krvi, zato jo z opazovanjem pod svetlobnim mikroskopom lahko opazimo, vendar so tehnike barvanja drage in zamudne, zato se direktnih preparatov tkiv v mikrobiološki diagnostiki redko poslužujemo [16].

1.2.2. Osamitev *B. burgdorferi* sensu lato

Osamitev živega povzročitelja iz kliničnih vzorcev bolnika je najzanesljivejša metoda dokazovanja aktivne okužbe in ji rečemo tudi »zlati standard«. Borelije so za rast zelo

zahtevne. So počasi rastoče bakterije, ki potrebujejo nenehno skrb in optimalne pogoje za kultivacijo. Tudi vzorec iz katerega želimo borelije osamiti, mora biti ustrezno izbran, nacepljen in prenesen do laboratorija [27].

B. burgdorferi sensu lato najbolje rastejo v nevtralnem pH, v mikroaerofilnem okolju [16], pri temperaturi od 30 do 34° C [27]. Inkubacija na temperaturi 39°C ali več rast zavira ali celo prepreči. Za kultivacijo se po svetu uporabljajo različna tekoča gojišča, raziskuje se tudi kultiviranje *B. burgdorferi* sensu lato na trdnih gojiščih (tekočim gojiščem je dodana agaroz) v mikroaerofilnih ali anaerobnih okoliščinah [14]. Na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani za kultiviranje uporabljamo modificirano tekoče Kelly-Pettenkofer gojišče, ki vsebuje precejšnji odstotek živalskega seruma in želatino [27].

Poskus osamitve borelij iz kliničnih vzorcev traja zaradi dolgega generacijskega časa *B. burgdorferi* sensu lato 9 tednov ali več. V večini primerov vrste borelij zrastejo med drugim in tretjim tednom [27]. Rast v gojišču se med inkubiranjem periodično spremlja z mikroskopiranjem v temnem polju ali z uporabo fluorescenčno označenih protiteles [14]. Vizualno zaznane borelije lysmske borelioze v gojišču nato potrdimo s pomočjo monoklonskih ali poliklonskih protiteles [27], lahko tudi z uporabo verižne reakcije s polimerazo [14]. Z nadaljno analizo molekule DNK lahko posamezno vrsto borelij tudi določimo [4].

Najuspešnejša je osamitev borelij iz kože bolnikov s klinično sliko *erythema migrans* (70 % in več). Izolacije iz kože pri drugih kliničnih oblikah okužbe, kakor tudi iz likvorja, krvi, sklepne tekočine ali drugih kužnin, so precej manj uspešne [14, 27].

Kljub zanesljivosti ima metoda omejitve, ki se kažejo v količini potrebnega dela, visoki ceni, dolgem času bakterijske rasti in inkubiranja, preden lahko vzorec zaključimo kot negativen (do 12 tednov). Kultiviranje je uporabno le pri nezdravljenih pacientih, saj že po nekaj odmerkih antibiotika odvzeta kužnina, kljub prisotni bolezni, ne da več pozitivnega rezultata. Največja slabost diagnostike z osamitvijo vrst borelij pa ostaja prav v tem, da je izolacija izvenkožnih oblik bolezni precej manj uspešna, ravno to pa so bolniki, pri katerih je zaradi neznačilnosti simptomov mikrobiološka diagnostika najbolj potrebna [14].

1.2.3. Dokazovanje molekule DNK *B. burgdorferi* sensu lato

Borelijsko DNK dokazujemo z verižno reakcijo s polimerazo (*angl. »polymerase chain reaction«, PCR*), ki se v diagnostiki infekcijskih bolezni primarno uporablja za detekcijo patogenov, za katere so konvencionalne diagnostične tehnike prepočasne ali premalo občutljive. Tako je pri borelijski okužbi diagnostična vrednost seroloških testov na začetku bolezni nezadostna zaradi nizke občutljivosti, kasneje se pojavi problem navzkrižne reaktivnosti in nezmožnosti razlikovanja med aktivno in neaktivno obliko bolezni; detekcija *B. burgdorferi* sensu lato z osamitvijo v tekočem gojišču pa je zamudna in cenovno neugodna [28]. PCR je neprimerno hitrejša metoda, saj poda rezultat že v roku nekaj dni [27] (klasična PCR) ali celo znotraj enega dneva (PCR v realnem času) [29]. Dokaže lahko že majhno število borelij - kar je za borelijsko okužbo značilno [4]. Posledično so odvzem vzorca, transport in izolacija DNK kritični koraki za doseg zanesljivega in konstantnega rezultata metode PCR [14]. Tehnološki razvoj metode je v zadnjem desetletju toliko napredoval, da PCR postaja vse bolj zaželen mikrobiološki test pri diagnostiki mnogih okužb - med njimi tudi v diagnostiki lymške borelioze [27].

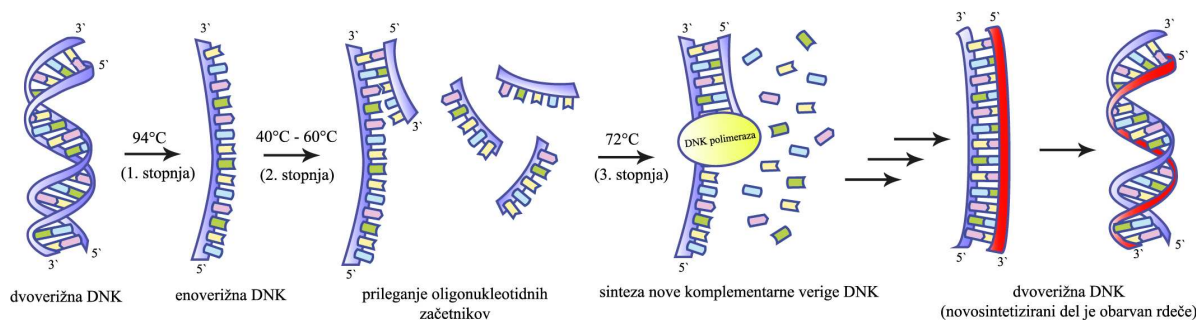
Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo je metoda, ki jo je leta 1985 prvi opisal in patentiral Kary B. Mullis. Doživela je že veliko nadgradenj in izboljšav, v molekularni biologiji pa ostaja ena vodilnih tehnik na področju študij genetskega materiala [30].

Sam princip PCR temelji na *in vitro* sintezi nukleinskih kislin, s katero lahko v kratkem času pridobimo veliko število kopij izbranega odseka DNK s poznano (ali vsaj delno poznano) sekvenco [30].

Pri metodi uporabimo reakcijsko zmes, ki jo sestavljajo DNK z odsekom, ki ga želimo pomnožiti, dva oligonukleotidna začetnika, ki opredelita regijo pomnoževanja, deoksinukleozid-trifosfati, ki služijo kot gradniki novo sintetizirane verige, termostabilna DNK-polimeraza (najpogosteje *Taq* DNK-polimeraza), Mg^{2+} kot kofaktor encima ter reakcijski pufer. Reakcija poteka v treh stopnjah, ki jih poljubnokrat ponovimo. V prvi stopnji s segrevanjem na 94°C dvojnovično DNK denaturiramo in tako iz dvoverižne dobimo enoverižno DNK. Nato temperaturo reakcijske mešanice znižamo na temperaturo, ki je optimalna za prileganje izbranih oligonukleotidnih začetnikov. Temperatura je izbrana tako, da pri prileganju začetnikov dosežemo čim večjo specifičnost in je edina temperatura, ki se lahko od reakcije do reakcije precej spreminja (ponavadi od 40°C do

60°C). Po prileganju oligonukleotidnih začetnikov na izbrane odseke enoverižne DNK temperaturo dvignemo na 72°C in termostabilna DNK-polimeraza s približno 1000 baz/minuto v smeri od 5' proti 3' sintetizira novo komplementarno verigo DNK (slika 5).



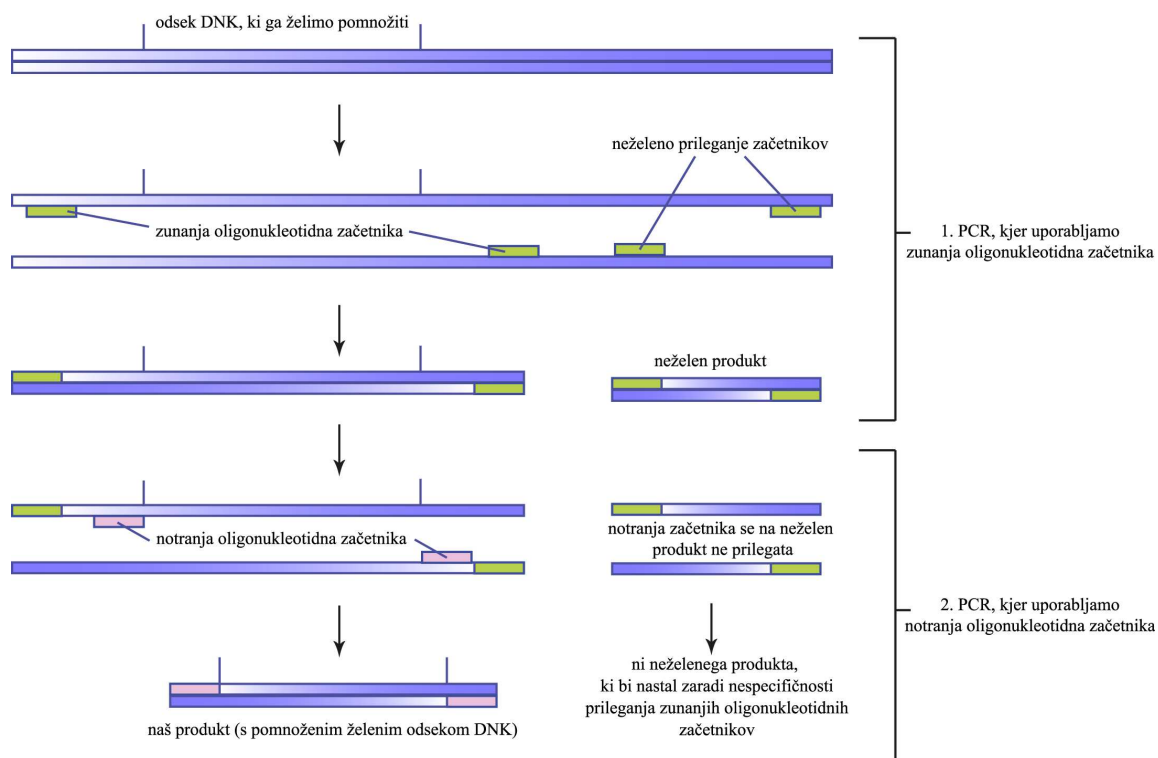
Slika 5: Verižna reakcija s polimerazo.

Ko pričnemo z novim ciklom (segrevanje na 94°C), se DNK-polimeraza ustavi, DNK se zopet denaturira in reakcija se ponovi. Teoretično se z vsakim ciklom število kopij podvoji, reakcijo navadno ponovimo od 20 do 40-krat [30].

Vgnezdena PCR (*angl. »nested« PCR*)

Vgnezdena PCR je modifikacija klasične verižne reakcije s polimerazo, pri kateri zaradi uporabe dveh parov različnih oligonukleotidnih začetnikov povečamo specifičnost in občutljivost same reakcije.

Lahko jo opišemo kot sestavljeno iz dveh klasičnih pomnoževanj PCR. Pri prvem pomnoževanju uporabimo prvi, zunanji par oligonukleotidnih začetnikov. Nato 1-3 μL produkta prenesemo v novo reakcijsko zmes, ki vsebuje drugi, notranji par začetnikov ter PCR ponovimo (slika 6).



Slika 6: Princip vgnezdene verižne reakcije s polimerazo.

Kljub doseženi večji specifičnosti in občutljivosti napram klasični PCR, je tehnika vgnezdene PCR zaradi vmesnega odpiranja reakcijske posodice, bolj izpostavljena kontaminaciji. Najbolj kritičnemu koraku se lahko izognemo z uporabo enostopenjske vgnezdene PCR, kjer reakcijske posodice ne odpiramo. To lahko dosežemo z uporabo oligonukleotidnih začetnikov z različno optimalno temperaturo prileganja (uporabimo zunanja oligonukleotidna začetnika z visoko temperaturo prileganja in notranja oligonukleotidna začetnika z nizko temperaturo prileganja). Temperatura pri prvi PCR tako niha med temperaturo prileganja zunanjih začetnikov ter temperaturo potrebno za denaturacijo DNK, ki jo želimo pomnožiti. Notranji oligonukleotidni začetniki se v tem temperaturnem območju ne morejo optimalno prilegati. V naslednji stopnji (druga stopnja vgnezdene PCR) se temperatura prileganja spusti na temperaturo, optimalno za prileganje notranjih začetnikov in pomnoži se še drugi, notranji del ciljanega DNK odseka [28].

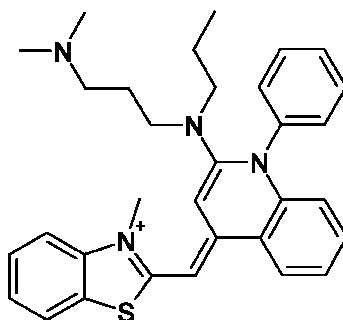
Produkti klasične PCR metode so tradicionalno analizirani z agarozno elektroforezo in uporabo etidijevega bromida kot barvila. Metoda elektroforeze je preprosta in poceni, vendar je njena slabost nizka občutljivost. Z uporabo etidijevega bromida kot barvila pa

ne zaznamo le želenega odseka DNK, temveč vsako prisotno dvoverižno DNK. Omenjeni slabosti se lahko izognemo z uporabo označenih oligonukleotidnih sond s specifično sekvenco, ki jih DNK fragmentom dodamo po prenosu z agaroze na nitrocelulozno membrano [28].

PCR v realnem času (*angl. »real-time PCR«*)

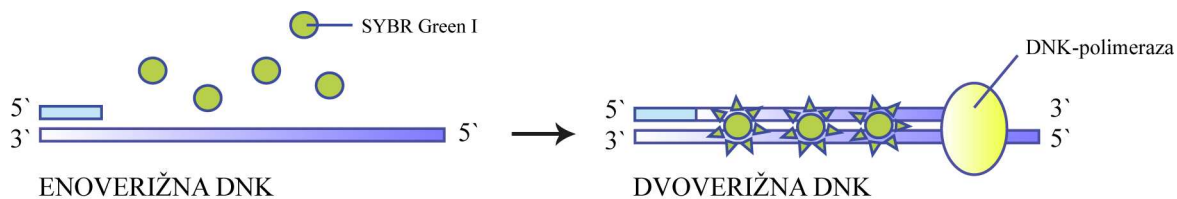
PCR v realnem času predstavlja nadgradnjo konvencionalne PCR. Ker omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu reakcije, je sinonim zanjo tudi kinetični PCR. Pomnoževanje in detekcija produktov potekata sočasno [31].

Za detekcijo produktov, ki temelji na merjenju fluorescence, lahko uporabljamo barvila, ki se nespecifično vgradijo v dvoverižno DNK. Včasih se je v te namene uporabljal etidijev bromid, ki je danes zaradi svoje toksičnosti že skoraj popolnoma nadomeščen s SYBR Green I (slika 7).



Slika 7: Struktura barvila SYBR Green I [32].

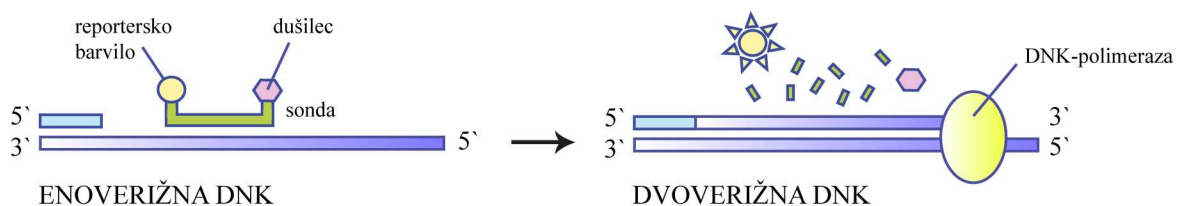
Barvilo SYBR Green I ima prosto nezaznavno fluorescenco, vgrajeno v dvoverižno DNK pa ob ekscitaciji močno fluorescira. V stopnji prileganja oligonukleotidnih začetnikov je DNK enoverižna, SYBR Green I pa je prost in ne fluorescira. V stopnji podaljševanja se vgradi v nastajajočo dvoverižno DNK in fluorescenca poraste (slika 8). Količina fluorescence je sorazmerna s količino nastale dvoverižne DNK. Njegova prednost je v nizki ceni, ima pa manjšo specifičnost od ostalih načinov detekcije, saj z njim ne detektiramo samo želenih, specifičnih produktov, ampak vsako dvoverižno DNK, ki je v zmesi prisotna [31].



Slika 8: Princip delovanja fluorescentnega barvila SYBR Green I (prirejeno po [31]).

Drug način detekcije je uporaba s fluorofori označenih oligonukleotidov – sond, ki se specifično vežejo na odsek, ki ga pomnožujemo. Iz te skupine se najpogosteje uporabljajo hidrolizirajoče in hibridizacijske sonde ter molekularna svetila [31].

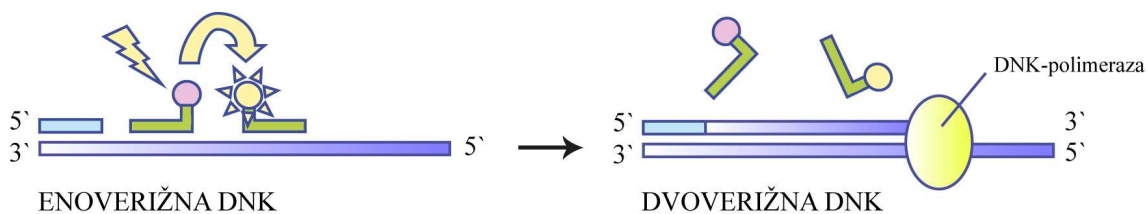
Pri hidrolizirajočih sondah izkoriščamo 5'-eksonukleazno aktivnost nekaterih DNK-polimeraz. V reakcijsko zmes dodamo sondo, ki specifično prepozna tarčno zaporedje DNK in se v stopnji prileganja veže nanj. Sonda ima na obeh koncih vezana različna fluorofora. Pri intaktni sondi fluorescenco, ki jo emitira reportersko barvilo, vezano na 5' koncu, prestreže drugo barvilo, imenovano dušilec, ki je vezano na 3' koncu. Tekom PCR 5'-eksonukleazna aktivnost DNK-polimeraze povzroči hidrolizo na tarčno zaporedje vezane sonde, razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem se poveča in tako je onemogočeno dušenje fluorescence. Fluorescenca reporterskega barvila zato poraste in je sorazmerna s količino produkta PCR (slika 9) [31].



Slika 9: Princip delovanja hidrolizirajoče sonde (prirejeno po [31]).

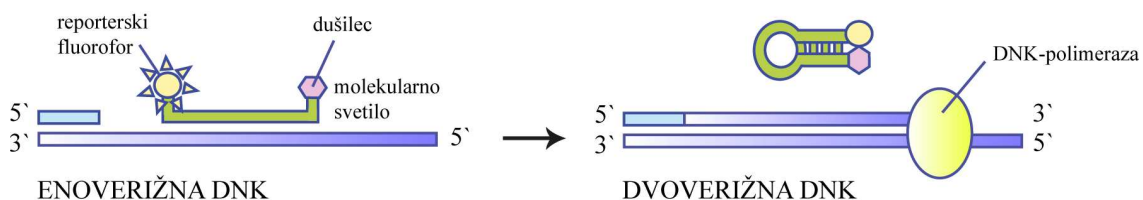
Hibridizacijske sonde delujejo po principu dveh sekvenčno specifičnih sond, ki sta označeni ena z donorskim, druga z akceptorskim fluoroforom. V stopnji prileganja se zaporedno vežeta na odsek, ki ga pomnožujemo. Bližina obeh sond omogoči prenos

energije zaradi ekscitacije donorskega fluorofora na 3' koncu prve sonde na akceptorski fluorofor na 5' koncu druge sonde. Ta emitira svetlobo daljše valovne dolžine, ki jo merimo in je sorazmerna količini produkta PCR (slika 10) [31].



Slika 10: Princip delovanja hibridizacijske sonde (prirejeno po [31]).

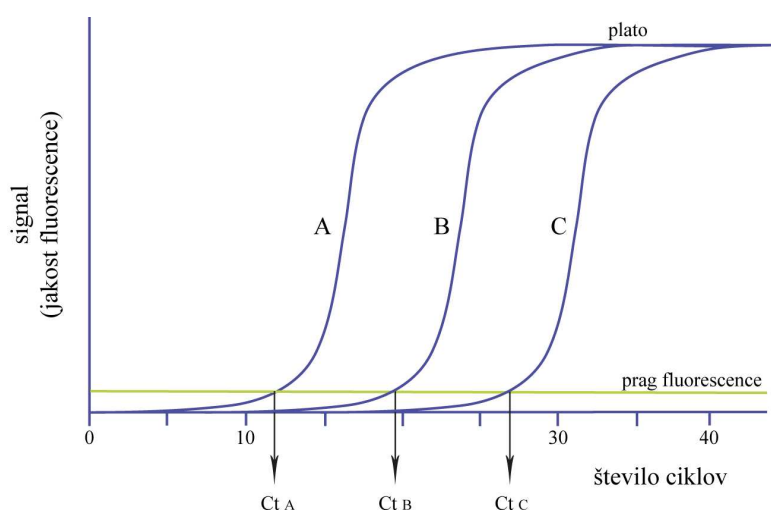
Molekularna svetila so sonde, ki zaradi komplementarnih zaporedij na 5' in 3' koncih lahko tvorijo stebelno zanko. Sonda ima na enem koncu vezan reporterski fluorofor, na drugem pa nefluorescentni dušilec. Kadar je sonda v obliki zanke, dušilec prestreže fluorescenco reporterskega barvila. V stopnji prileganja pride do vezave sonde na odsek, ki ga pomnožujemo. Stebelna zanka se razpre, razdalja med reporterskim barvilom in dušilcem se poveča, zato fluorescenca reporterskega barvila poraste ter je sorazmerna s količino produkta PCR. V stopnji podaljševanja DNK se sonda s tarčnega zaporedja odlepi in ponovno oblikuje stebelno zanko (slika 11) [31].



Slika 11: Princip delovanja molekularnega svetila (prirejeno po [31]).

Najpomembnejša prednost PCR v realnem času pred klasično PCR je lažja kvantifikacija nukleinskih kislin. Kontinuirano spremljanje poteka reakcije v vsakem ciklu nam omogoči,

da izmerimo količino produkta PCR, ko je reakcija še v eksponentni fazi. To naredimo tako, da na osnovi izmerjenih podatkov narišemo krivuljo, ki podaja odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov. Na eksponentnem delu krivulje določimo linijo fluorescenčnega praga, ki predstavlja tisto intenziteto fluorescence, ki je značilno višja od fluorescence ozadja. Nato za vsak vzorec določimo cikel, ko je ta prag presežen (Ct). Vrednosti Ct so obratnosorazmerne z začetnim številom kopij matrice. Na tej osnovi lahko nato vzorce med seboj primerjamo [31] (slika 12).



Slika 12: Krivulje pomnoževanja pri PCR v realnem času.

Stopnja fluorescence s številom ciklov narašča. Za vsak vzorec lahko določimo cikel, v katerem fluorescenca poraste nad fluorescenco ozadja (Ct). Vrednosti Ct so obratnosorazmerne z začetnim številom kopij matrice. Tako lahko na zgornjem primeru treh hipotetičnih vzorcev A, B in C primerjamo začetno prisotno količino DNK. V vzorcu A je bilo matrične DNK največ (najmanjši Ct), v vzorcu C pa najmanj (najvišji Ct) (prirejeno po [30]).

Z metodo PCR v diagnostiki lymške borelioze dokazujemo bodisi kromosomsko bodisi plazmidno borelijsko DNK [1]. Najpomembnejša pri izbiri tarče pomnoževanja je njena genetska stabilnost, saj bi izguba ali sprememba ciljnega odseka pomnoževanja namreč

pomenila izgubo reaktivnosti in nezmožnost pomnoževanja. Pri izbiri tarče je potrebno biti pozoren tudi na testno specifičnost, saj genetsko sorodni patogeni, kot je na primer *Borrelia hermsii* (povzročiteljica povratne mrzlice), v testu ne smejo reagirati. Hkrati mora biti test sposoben detektirati vse vrste borelij kompleksa *B. burgdorferi* sensu lato [28]. Pri tem so tarča pomnoževanja različni borelijski geni. Gena *OspA* in *OspB*, ki nosita zapis za bakterijski zunanji površinski beljakovini [1] in se v citoplazmi nahajata na 49-kb velikem linearnem plazmidu s kovalentno zaključenimi konci [33], sta pogosti tarči, vendar sta zaradi visoke vrstne variabilnosti za vse evropske seve neprimerna [28]. Za tarčo pomnoževanja se uporabljajo tudi različna zaporedja kromosomskega gena za flagelarni protein, pri katerem je za *B. burgdorferi* sensu lato specifičen le notranji del gena. Kot tarča pomnoževanja so pogosto opisani tudi *hbb* gen, ki kodira konzervativni, histonu podoben borelijski protein, genski segmenti 16S ribosomske RNK ter intergenska sekvenca 5S/16S ribosomske RNK [12, 28].

Pri metodi PCR lahko dokazujemo bodisi žive bodisi mrtve bakterije, pomembno je le, da se DNK v vzorcih ohrani. DNK lahko dokažemo v kateremkoli kliničnem vzorcu, dobro je, da je le-ta čim večji, saj koncentracija spirohet v vzorcu neposredno vpliva na rezultat preiskave [27].

Kritična in najpomembnejša elementa v razvoju metode PCR sta izbira primerne tarčnega gena in oligonukleotidnih začetnikov [28]. Na rezultate sicer vpliva več dejavnikov: tako heterogenost borelijskega genoma (občutljivost in specifičnost reakcije), kot različen potek in patogeneza okužbe (klinična slika okužbe, izbira vzorca, število borelij v vzorcu, obdelava vzorca) [27]. V kliničnih vzorcih so lahko prisotni tudi različni inhibitorji PCR, ki pomnoževanje ovirajo [28].

PCR ima ravno tako kot osamitev borelij s pomočjo kulture visoko občutljivost v vzorcih kože pri pacientih z *erythema migrans* (50-70 %) [12]. Pred uporabo bakterijske kulture kaže svojo prednost ne samo s hitrostjo, temveč tudi z večjo občutljivostjo pri diagnostiki vzorcev sklepne tekočine pri pacientih z lymskim artritidom, ki pri kultiviranju le redko dajo pozitivni rezultat [12, 34]. Občutljivost metode pri drugih vzorcih ostaja razmeroma nizka, kar sicer lahko pripišemo nizkemu številu borelij, ki so v telesu med okužbo prisotne [14] (preglednica II).

Preglednica II: Primerjava občutljivosti direktnih metod pri dokazovanju borelijske DNK v kliničnih vzorcih bolnikov z lymsko boreliozo [12].

Vzorec	Občutljivost metode		
	direktno mikroskopiranje	PCR	bakterijska kultura
koža (<i>erythema migrans, acrodermatitis chronica atrophicans</i>)	direktnih preparatov tkiv se v mikrobiološki diagnostiki lymске borelioze redko poslužujemo	50-70 %	50-70 %
cerebrospinalna tekočina (akutna nevborelioza)		10-30 %*	10-30 %*
sklepna tekočina (lymski artritis)		50-70 %	le redko pozitivna

* Odstotek pozitivnih testov je pri pacientih s trajanjem bolezni manj kot 14 dni do 50%, pri pacientih s trajanjem bolezni daljšim od 14 dni ta odstotek pade na 13 %.

Kot kaže, je največja pomanjkljivost metode PCR za dokazovanje lymске borelioze v tem, da še ni standardizirana, zato lahko dobimo lažno pozitivne ali lažno negativne rezultate [27]. Kljub številnosti študij so vzporedne ocene metod v različnih laboratorijih redke, velike primerjalne študije različnih metod PCR, ki bi okarakterizirale najboljšo, pa še vedno niso bile narejene, a bi bile za standardizacijo nujno potrebne [12, 28].

1.2.4. Dokaz specifičnih protiteles

Določanje titra specifičnih protiteles, katerih nastanek izzove prisotnost *B. burgdorferi* sensu lato v telesu, je danes rutinska metoda dokazovanja borelijske okužbe [4]. Kljub temu, da so mnogi borelijski antigeni sposobni spodbuditi imunski sistem, izdelovanje specifičnih protiteles nastaja zelo počasi. Za nastanek imunskega odziva ne zadostuje le navzočnost antigena - ta mora biti prisoten v zadostni količini in tudi dostopen imunsko kompetentnim celicam. Kaže da je za borelijsko okužbo značilno relativno majhno število borelij v tkivih. Le-te se še dodatno skrijejo v predelih, ki niso najbolj dostopni celicam imunskega sistema. Tudi sama *B. burgdorferi* sensu lato lahko npr. s prekritjem površine s sluzjo prekrije svoje antigene, tako da so prva protitelesa, ki pri bolniku sploh nastanejo,

usmerjena le proti enemu ali dvema borelijskima antigenoma. Za nastanek specifičnih protiteles je zato potrebno čakati več tednov (nastanek IgM) ali mesecev (IgG). Ko je imunski sistem enkrat zadostno spodbujen z borelijskimi antigeni, izdelovanje protiteles postane bolj dinamičen proces, količina protiteles v telesnih tekočinah se povečuje, pojavljajo se tudi protitelesa proti vse večjemu številu različnih borelijskih antigenov [27]. Specifična protitelesa dokazujemo v serumu, likvorju in sklepni tekočini bolnikov z encimskoimunskimi (ELISA), imunofluorescenčnimi (IFT) ali imuno(western)blot testi [27]. Serološka diagnostika naj bi sledila principu dvostopenjskega testa: uporaba presejalnega serološkega testa z visoko občutljivostjo (npr. ELISA) in nato uporaba potrditvenega testa [imuno(western)blot] v primeru pozitivnega ali mejnega rezultata presejalnega testa [12].

Dokazovanje specifičnih protiteles danes v mikrobioloških laboratorijih zaradi praktičnosti in nizke cene predstavlja najpogostejši način potrjevanja borelijske okužbe [16].

Velik pomen pri nastanku specifičnih protiteles ima antigenska heterogenost borelij. Zaradi izražanja različnih antigenov (različni proteinski profili borelij) lahko vrste borelij izzovejo dokaj različen imunski odziv. Bolnik se bo odzval na okužbo s tvorbo specifičnih protiteles, ki so usmerjena proti tistim antigenom, ki jih izraža sev s katerim je bil okužen. Poleg raznolikosti borelijskih antigenov imajo borelije tudi antigene, ki so podobni, ali v nekaterih delih celo enaki antigenom drugih bakterij, zato je možno, da bolnikova protitelesa reagirajo navzkrižno. Tako lahko pri bolnikih s povratno mrzlico, sifilisom, leptospirozo ali parodontalno boleznijo dobimo lažno pozitivne rezultate [16]. Heterogenost borelijskih antigenov in različna geografska porazdeljenost borelij nam onemogočata izbiro enotnega seva za antigen seroloških testov. Tako se serološki testi med seboj, glede na sev, ki je na določenem geografskem predelu dominanten, razlikujejo v izbiri seva borelije za antigen (vrsta borelije, sev znotraj vrste), v načinu priprave antigena (cela borelija, prečiščeni ali rekombinantni borelijski antigeni), v postopku izvajanja testa [IFT, ELISA, imuno(western)blot] in izbiri »cut-off« titra. Poleg tega na rezultate vpliva tudi sam imunski odziv bolnika, zato sta izvajanje in interpretacija seroloških testov nedvomno zahtevna [27].

Preglednica III: Občutljivost seroloških metod v različnih stadijih oz. oblikah lymške borelioze (prirejeno po [12]).

Občutljivost seroloških testov je zaradi počasnega protitelesnega odziva na začetku bolezni nizka, pacienti so kljub bolezni lahko seronegativni. Čeprav pri pozni obliki bolezni seropozitivnost naraste na 100 %, to še ne dokazuje prisotnosti bolezni, saj je pozitiven serološki test lahko odraz v preteklosti prebolele okužbe.

Oblika lymške borelioze	Občutljivost	
zgodnja, lokalizirana	20-50 %	prevladujejo protitelesa razreda IgM
zgodnja, diseminirana	70-90 %	na začetku so prevladujoča protitelesa IgM, kasneje prično prevladovati IgG
pozna	blizu 100 %	navadno prisotna le IgG protitelesa

1.3. Zdravljenje lymške borelioze

V vsakdanji praksi se z antibiotiki zdravi vse bolnike z značilno klinično sliko lymške borelioze, ne glede na izvide seroloških preiskav oziroma testov za dokaz borelijske okužbe. Pri bolnikih z neznačilnimi težavami se antibiotičnega zdravljenja poslužujemo le v primeru laboratorijske potrditve okužbe [35]. Za zdravljenje lymške borelioze uporabljamo antibiotike, ki so proti borelijam lymške borelioze učinkoviti *in vitro*, hkrati pa so se obnesli tudi v kliničnih raziskavah [21] (preglednica IV).

Preglednica IV: V tabeli so prikazana priporočila za antibiotično zdravljenje zgodnje in pozne lymške borelioze. Priporočila so povzeta po priporočilih prof. Strleta s Klinike za nalezljive bolezni in vročinska stanja [21].

Klinični znaki	Antibiotik	Odmerjanje (na dan)		Trajanje atb terapije (dni)	Kontraindikacije
		Odrasli	Otroci		
<i>erythema migrans</i> , borelijski limfocitom	amoksicilin per os	500-1000 mg 3-krat dnevno	20-50 mg/kg	14 (10-30)	alergija
	ali azitromicin per os	500 mg 2-krat dnevno, nato 500 mg 1-krat dnevno	20 mg/kg 10 mg/kg	1. dan 2.-5. dan	alergija
	ali cefuroksim per os	500 mg 2-krat dnevno	30-40 mg/kg	14 (10-30)	alergija
	ali doksiciklin per os	100 mg 2-krat dnevno		14 (10-30)	otroci, nosečnost, dojenje, alergija
	ali fenoksimetilpenicilin per os	0,5-1,0 MIE	100.000-150.000 IE/kg	14 (10-30)	alergija
	eritromicin* per os	250 mg 4-krat dnevno	30 mg/kg	14 (10-30)	alergija
	ceftriakson** i.v. ali penicilin G** i.v.	2g 20 MIE	50-100 mg/kg (do 2g dnevno) 0,25-0,5 MIE/kg	14 14	alergija alergija

Klinični znaki	Antibiotik	Odmerjanje (na dan)		Trajanje atb terapije (dni)	Kontraindikacije
		Odrasli	Otroci		
prizadetost živčevja (zgodnja ali pozna)	ceftriakson i.v.	2g	50-100 mg/kg	14 (10-30)	alergija
	ali penicilin G i.v.	20 MIE	0,25-0,5 MIE/kg	14 (10-30)	alergija
prizadetost srca	doksiciklin per os	200 mg 2-krat dnevno		14 (10-30)	otroci, nosečnost, dojenje, alergija
artritis (intermitentni ali kronični), <i>acrodermatitis chronica atrophicans</i> ***	ceftriakson i.v.	2 g	50-100 mg/kg	14 (10-30)	alergija
	ali penicilin G i.v.	20 MIE	0,25-0,5 MIE/kg	14 (10-30)	alergija
	ali doksiciklin per os	100-200 mg 2-krat dnevno		14 (10-30)	otroci, nosečnost, dojenje, alergija
	ali amoksicilin per os	500-1000 mg 3-krat dnevno		14 (10-30)	alergija

* Eritromicin se uporablja le pri alergiji na penicilin in/ali tetracikline.

** Ceftriakson in penicilin G se za zdravljenje *erythema migrans* uporabljata le v posebnih okoliščinah (multipli *erythema migrans* [7]).

*** *Acrodermatitis chronica atrophicans* praviloma zdravimo več kot 14 dni. Z antibiotičnim zdravljenjem atrofije ne odpravimo, zavremo pa njeno napredovanje.

Zdravljenje je smiselno v vseh stadijih lymške borelioze, najuspešnejše pa je zgodaj v poteku bolezni [21]. Poleg antibiotikov se pri pozni lymski boreliozi za zdravljenje kroničnega vnetja uporablja tudi različna protivnetna zdravila [36]. Uspešnost zdravljenja je odvisna tako od lokacije, obsega in trajanja klinične oblike bolezni, pa tudi od številnih drugih faktorjev, kot so izbira antibiotika, odmerka, trajanja zdravljenja, potencialnih neželenih učinkov zdravila in same compliance bolnika [7].

Erythema migrans se praviloma pozdravi spontano, brez antibiotičnega zdravljenja, vendar je možno, da borelije ostanejo v telesu in lahko čez mesece ali leta kasneje povzročijo nevrološke, srčne ali sklepne okvare. Z ustreznim zdravljenjem kožne spremembe mnogo hitreje izginejo in s precejšnjo verjetnostjo preprečimo kasnejše bolezenske spremembe [35].

V Evropi cepiva za preventivno zaščito pred lymsko boreliozo še nimamo [21]. Težave pri pripravi cepiva izhajajo iz različne geografske razširjenosti posameznih borelijskih vrst in antigenske heterogenosti borelij tako med vrstami, kot sevi znotraj vrste [4]. V ZDA je bilo cepivo z rekombinantnim proteinom OspA že registrirano [9], vendar ga je proizvajalec leta 2002, zaradi domnevno premajhnega povpraševanja, s tržišča umaknil [37].

Ker obstaja možnost transplacentarnega prenosa *B. burgdorferi* sensu lato, je antibiotična terapija kljub nezadostnim dokazom o povezavi sveže okužbe v nosečnosti z okvarami ali celo smrtjo ploda, priporočena tudi v nosečnosti [9, 21, 38]. Izogibati se je potrebno doksiciklinu, ki je v nosečnosti in pri doječih materah kontraindiciran [9].

2. NAMEN DELA

Lymska borelioza je na področju Slovenije endemična in pogosta bolezen. Spremembe v življenjskem slogu danes težijo k pogostejšemu gibanju in stiku z naravo, hkrati pa nas to v vse večji meri izpostavlja okužbi z *B. burgdorferi* sensu lato.

V diagnostiki značilna kožna sprememba, *erythema migrans*, predstavlja nedvoumno postavitev diagnoze, vendar je izpuščaj včasih neznačilen ali pa se ne pojavi. Ljudje zbolijo tudi tedne ali mesece po klopovem vbodu. V teh, za lymsko boreliozo neznačilnih primerih, je mikrobiološka diagnostika ključnega pomena.

Vse večjo uporabnost v mikrobiološki diagnostiki infekcijskih bolezni zaradi svoje specifičnosti, občutljivosti in hitrosti dobivajo metode PCR. Rutinsko se v laboratoriju že poslužujemo klasične in vgnezdene metode PCR, v zadnjem času pa zaradi svoje hitrosti v ospredje vse bolj prihaja metoda kinetične PCR ali PCR v realnem času.

Ker metoda PCR v realnem času v mikrobiološki diagnostiki lymske borelioze še ni standardizirana in se optimalno metodo še išče, bomo v okviru diplomske naloge ugotavljali prednosti in slabosti komercialno dostopnega testa PCR v realnem času za dokaz borelijske DNK:

1. S pomočjo vzorcev DNK različnih borelijskih sevov in vzorcev DNK zunanjih kontrol bomo določili sposobnost testa, da pomnožuje borelijsko DNK. Rezultate analiz zunanjih kontrol bomo primerjali z metodo enostopenjske vgnezdene PCR - pomnoževanje medgenske regije *rrl-rrf* in metodo dvostopenjske vgnezdene PCR - pomnoževanje gena *OspA*.

Hipoteza 1: Test je specifičen za borelije lymske borelioze; vse borelijske seve bo ovrednotil pravilno.

2. S pomočjo vzorcev DNK, izoliranih iz kliničnih vzorcev, bomo test primerjali s tremi, v laboratoriju že uporabljanimi metodami PCR (metoda klasične PCR, metoda dvostopenjske vgnezdene PCR, metoda enostopenjske vzgnezdene PCR).

Hipoteza 2: Test daje enake rezultate kot ostale metode PCR.

3. Z analiziranjem vzorcev, ki jih bomo dobili z redčenjem vzorca DNK, seva *B. garinii*, bomo primerjali občutljivost testa napram trem, v laboratoriju že uporabljanim metodam PCR.

Hipoteza 3: Test ima v primerjavi z že uporabljanimi metodami PCR večjo občutljivost.

4. Primerjali bomo vpliv ročne in avtomatske izolacije DNK iz mešanice vzorcev likvorja in dodane borelijske kulture na rezultate testa.

Hipoteza 4: Pričakujemo, da avtomatska izolacija DNK iz vzorca temeljiteje odstrani morebitne inhibitorje PCR.

5. Z rezultati bomo skušali oceniti morebitno prihodnjo uporabo komercialno dostopnega testa v mikrobiološki diagnostiki lymške borelioze.

3. MATERIALI IN METODE

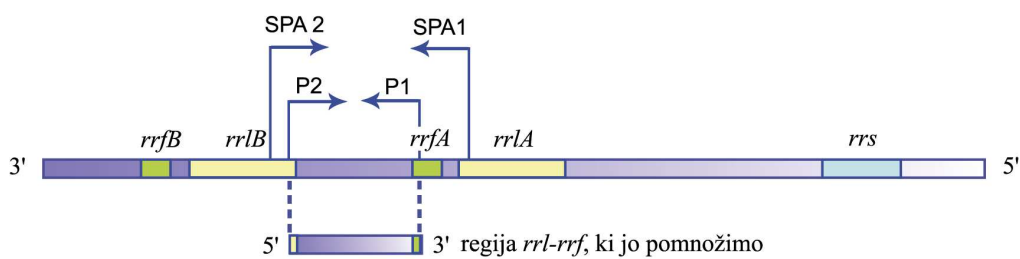
3.1. VZORCI

1. Vzorci DNK, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste *B. garinii* (shranjen pri -20°C).
2. Vzorci DNK (56 vzorcev, shranjenih na -20°C), izolirani iz kliničnih vzorcev bolnikov, ki so bili zaradi suma na lymsko boreliozo poslani na Oddelek za diagnostiko borelioz in leptospiroze na Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Od tega smo preiskali 11 vzorcev likvorja, 27 vzorcev kolenskega punktata, 13 vzorcev biopta kože, 2 vzorca sklepne tekočine ter po en vzorec komolčnega punktata, seruma in plazme.
3. Vzorci zunanjih kontrol INSTAND e.V. (30 vzorcev različnih bakterijskih sevov, shranjenih na -20°C), ki so bili na Oddelek za diagnostiko borelioz in leptospiroze, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, poslani v obdobju med septembrom 2007 in oktobrom 2010.
4. Vzorci DNK posameznih borelijskih vrst (*Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia garinii* - podvrsta Mlg4, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia spielmanii*, *Borrelia valaisiana*, *Borrelia coriaceae*), shranjeni pri -20°C .
5. Mešanica vzorcev likvorja. Vzorci likvorja so bili v laboratorij poslani zaradi suma na lymsko boreliozo. Najprej smo izključili prisotnost borelijske DNK in vzorce likvorja med sabo pomešali. Nadalje smo mešanico razdelili na več vzorcev, v katere smo dodali znane količine borelije. Po avtomatski ali ročni izolaciji DNK smo v vzorcih nato dokazovali borelijsko DNK.

3.2. METODE

3.2.1. Klasična PCR – pomnoževanje medgenske regije *rrl-rrf*

B. burgdorferi sensu lato ima med bakterijami edinstveno organizacijo ribosomskih genov. V svojem genskem zapisu bakterija nosi po eno kopijo gena za 16S ribosomsko RNK (*rrs*) ter po dve kopiji gena za 23S (*rrl*) in 5S ribosomsko RNK (*rrf*), ki sta tandemsko podvojena. Posamezni kopiji obeh genov sta med seboj ločeni s 182-bp veliko intergensko sekvenco (*rrl-rrf*) [39], ki smo jo v klasični (in kasneje enostopenjski vgnezdni) metodi PCR uporabili kot cilj pomnoževanja (slika 13).



Slika 13: Prikaz organizacije ribosomskih genov bakterije *Borrelia burgdorferi* sensu lato in regija *rrl-rrf*, ki jo pomnožimo. Na sliki so prikazana tudi prijemališča oligonukleotidnih začetnikov P1 in P2 ter oligonukleotidnih začetnikov SPA1 in SPA2. (Prirejeno po [40]).

Pri metodi klasične PCR smo v reakciji za pomnoževanje medgenske regije *rrl-rrf* uporabili oligonukleotidna začetnika P1, P2 (slika 12).

Pomnoževanje z oligonukleotidnima začetnikoma P1 in P2 je potekalo 30 ciklov pri naslednjih pogojih:

- začetna denaturacija pri 94 °C (1 min),
- pripenjanje začetnikov pri 53 °C (1 min) in
- pomnoževanje pri 72 °C (1,15 min).

Mešanica za PCR je vsebovala 5 μL vzorca, 31,5 μL vode (voda, ki ne vsebuje nukleaz – *angl. nuclease free water*, Promega corporation, ZDA), 5 μL pufra (10 x PCR Buffer, Roche, Nemčija), 4 μL mešanice deoksinukleotidov (10 mM), 3 μL MgCl_2 (25 mM), 0,5 μL začetnih oligonukleotidov (50 μM) in 0,5 μL *Taq* polimeraze (5 E/ μL). V vsako reakcijo smo vključili tudi pozitivno (borelijski sev) in negativno kontrolo (voda, ki ne vsebuje nukleaz – *angl. nuclease free water*, Promega corporation, ZDA). Pri delu smo upoštevali standarde za preprečitev kontaminacije.

3.2.2. Enostopenjska vgnezdna PCR (*angl. »nested« PCR*) - pomnoževanje medgenske regije *rml-rrf* z uporabo zunanjih in notranjih oligonukleotidnih začetnikov

Pri metodi enostopenjske vgnezdene PCR smo za razliko od metode klasične PCR v reakcijo, poleg notranjih (P1, P2), vključili še zunanji (SPA1, SPA2) par oligonukleotidnih začetnikov (slika 13, preglednica V).

Preglednica V: Sekvence izbranih začetnih oligonukleotidov pomnoževanja medgenske regije rml-rrf. Pri metodi klasične PCR se uporabljata začetna oligonukleotida P1 in P2, pri metodi enostopenjske vgnezdene PCR se v reakcijo dodata še zunanja začetnika SPA1 in SPA2.

		Nukleotidno zaporedje	Tarčni gen
Notranja začetna oligonukleotida	P1	5'-CTGCGAGTTCGCGGGAGA-3'	<i>rrf A</i> (77-95)
	P2	5'-TCCTCGGCATTCACCATA-3'	<i>rml B</i> (38-20)
Zunanja začetna oligonukleotida	SPA1	5'-TAAGCTGACTAATACTAATTACCCGTATCT-3'	<i>rml A</i> (2890-2919)
	SPA2	5'-AATCTTGGGATCAATAAATGTTTGCTTCTC-3'	<i>rml B</i> (113-84)

Pomnoževanje z zunanjimi začetniki SPA1 in SPA2 je potekalo 20 ciklov pri naslednjih pogojih:

- začetna denaturacija pri 93 °C (3 min),
- pripenjanje začetnikov pri 70 °C (2 min) in
- pomnoževanje pri 72 °C (2 min).

Pomnoževanje z notranjimi začetniki P1 in P2 je obsegalo 40 ciklov pri naslednjih pogojih:

- začetna denaturacija pri 93 °C (1 min),
- pripenjanje začetnikov pri 50 °C (2 min) in
- pomnoževanje pri 72 °C (2 min).

Mešanica za PCR je vsebovala 10 µL vzorca, 27,2 µL vode (voda, ki ne vsebuje nukleaz – *angl. nuclease free water*, Promega corporation, ZDA), 5 µL pufra (10 x PCR Buffer, Roche, Nemčija), 4 µL mešanice deoksinukleotidov (10 mM), 3 µL MgCl₂ (25 mM), 0,1 µL začetnih oligonukleotidov (50 µM), 0,1 µL *Taq* polimeraze (5 E/µL) in 0,3 µL Gold *Taq* polimeraze (5 E/ µL). V vsako reakcijo smo vključili tudi pozitivno (borelijski sev) in negativno kontrolo (voda, ki ne vsebuje nukleaz – *angl. nuclease free water*, Promega corporation, ZDA). Pri delu smo upoštevali standarde za preprečitev kontaminacije.

3.2.3. Dvostopenjska vgnezdna PCR (*angl. »nested« PCR*) - pomnoževanje gena *OspA*

Za pomnoževanje smo izbrali dva para oligonukleotidnih začetnikov, komplementarna regiji, ki je v genu *OspA* visoko ohranjena. Hkrati je izbor regije specifičen za borelije lymške borelioze, zato sorodnih humanih patogenov, kot sta *Borrelia hermsii* in *Treponema pallidum*, z uporabo omenjenih začetnikov ne zaznamo [41] (preglednica VI).

Preglednica VI: Sekvence izbranih začetnih oligonukleotidov in njihovo mesto vezave na genu *OspA*.

	Nukleotidno zaporedje	Tarčno mesto na genu <i>OspA</i>
Zunanja začetna oligonukleotida	5'-GAGCTTAAAGGAACTTCTGATAA-3'	334-356
	5'-GTATGTTGTACTGTAATTGT-3'	874-894
Notranja začetna oligonukleotida	5'-ATGGATCTGGAGTACTTGAA-3'	362-381
	5'-CTTAAAGTAACAGTTCCTTCT-3'	693-713

V prvi stopnji smo v 5 μ L vzorca, z uporabo naslednjih pogojev, v 30 ciklih pomnožili 560 bp dolg odsek gena *OspA*:

- začetna denaturacija pri 95 °C (45 s),
- pripenjanje začetnikov pri 50 °C (45 s),
- pomnoževanje pri 72 °C (60 s).

Po končanem prvem delu pomnoževanja smo 2 μ L pridelka PCR prenesli v novo pripravljeno mešanico z začetnima oligonukleotidoma, ki sta pomnoževala 351 bp dolg odsek gena za *OspA*. Pomnoževanje je obsegalo 30 ciklov pod enakimi, zgoraj opisanimi, pogoji. V vsako reakcijo smo vključili tudi pozitivno (borelijski sev) in negativno kontrolo (voda, ki ne vsebuje nukleaz – *angl. nuclease free water*, Promega corporation, ZDA).

Mešanica PCR je vsebovala 30,25 oz. 33,25 μ L (drugi del pomnoževanja) vode (voda, ki ne vsebuje nukleaz – *angl. nuclease free water*, Promega corporation, ZDA), 5 μ L pufru (10 x PCR Buffer, Roche, Nemčija), 4 μ L mešanice deoksinukleotidov (10 mM), 5 μ L $MgCl_2$ (25 mM), 0,25 μ L začetnih oligonukleotidov (1 μ g/ μ L) ter 0,25 μ L *Taq* polimeraze (5 E/ μ L).

Pri delu smo upoštevali standarde za preprečitev kontaminacije.

3.2.4. Analiza pridelkov PCR reakcij

Pridelke PCR smo analizirali s pomočjo agarozne gelske elektroforeze. Metodo smo izvedli horizontalno, z 1 % agaroznim gelom, popolnoma potopljenim v raztopino elektrolita (pufer TAE). Gel smo pripravili iz 50 mL 1x koncentriranega pufera TAE s pH 8,34 (Tris baza/acetat/EDTA), ki smo mu dodali 0,5 g agaroze (Sigma chemical, St.Luis, ZDA). Mešanico smo zavreli, delno ohladili in ji nato dodali še 3,5 μ L etidijevega bromida (0,5 μ g/mL H₂O). Raztopino smo zlili v model za pripravo gela in počakali, da se je gel strdil. Vzorcju smo za lažji nanos dodali 10 μ L 0,36 mM indikatorskega barvila brom fenol modro (SIGMA-Aldrich, St. Louis, ZDA). Elektroforeza je potekala pri napetosti 120 V, 20 minut v 1x koncentriranem TAE pufru. Gel smo po končani elektroforezi presvetlili z UV svetlobo (310 nm). Posledično je etidijev bromid pod UV-lučjo fluoresciral ter emitiral oranžno svetlobo z valovno dolžino 590 nm, ki smo jo s kamero vizualno zaznali. Prisotnost pridelka DNK določene molekulske mase nam je potrdila prisotnost pomnoženega odseka. Sliko smo dokumentirali s programom Quantity One, proizvajalca BioRad, ZDA.

Priprava pufera TAE: 10x koncentrirani pufer TAE smo dobili tako, da smo 48,45 g Tris baze (Sigma chemical, St.Luis, ZDA) in 3,72 g EDTA (Sigma chemical, St.Luis, ZDA) natehtali v 1000 mL merilno bučko, ki je vsebovala približno 500 mL prečiščene vode. Pustili smo, da so se sestavine raztopile in dobro premešale z magnetnim mešalom, nato smo z očetno kislino (Merck, ZDA) pH umerili na 8,3. Bučko smo s prečiščeno vodo dopolnili do oznake ter raztopino nato prefiltrirali skozi filter s porami velikosti 0,2 μ m v sterilno steklenico. 1x koncentrirani pufer TAE smo dobili z redčenjem 10x koncentriranega pufera TAE.

3.2.5. Encimska restrikcija PCR pridelkov medgenske regije *rrl-rrf* z endonukleazo *MseI*

Encimsko restrikcijo z encimom *MseI* smo izvedli pri uspešno pomnoženih (pozitivnih in dvomljivo pozitivnih) vzorcih klasične in enostopenjske vgnezdene PCR. Z namenom

določitve vrste *B. burgdorferi* sensu lato, smo z endonukleazo *MseI* pomnoženo območje med 23S rRNK in 5S rRNK razrezali na manjše fragmente.

Restriksijska mešanica za restrikcijo enega PCR pridelka je vsebovala 3,15 μL 10x koncentriranega pufru (pufer 2, Biolabs, Ipswich, MA, ZDA), 0,35 μL 100x BSA (*angl. bovine serum albumine* – goveji serumski albumin), ter 0,5 μL (10 E/ μL) encima *MseI* (Biolabs Inc., New England, ZDA). Restriksijski mešanici smo dodali 20 μL PCR pridelka in vse skupaj inkubirali 2 uri pri 37 °C.

3.2.5.1. Priprava poliakrilamidnega gela za analizo restrikcije PCR pridelkov

Za pripravo 16 % ločevalnega poliakrilamidnega gela debeline 1 mm smo pripravili mešanico 6,6 mL demineralizirane vode, 1,33 mL 10x koncentriranega TBE pufru (Tris baza/borova kislina/EDTA), 5,33 mL 40 % akrilamida (Amresco, Solon, ZDA), 100 μL 10 % amonijevega persulfata in 10 μL TEMED (**t**etrametiletilened**am**in), (Bio-Rad, Hercules, ZDA). Ločevalni poliakrilamidni gel smo nalili v dobro sestavljen vertikalni modelček za gel, ki ne prepušča tekočine (Bio-Rad, Muenchen, Nemčija). Ločevalni gel smo nalili do približno 2 cm pod vrhom in ga prelili z demineralizirano vodo, da se je gladina gela izravnala. Po enourni inkubaciji smo odvečno vodo odstranili s filter papirjem, vstavili glavniček in model do vrha zapolnili s 5 % gelom za koncentriranje vzorca. Le-tega smo pripravili iz 3,8 mL demineralizirane vode, 500 μL 10x TBE pufru, 650 μL akrilamida, 40 μL 10 % amonijevega persulfata in 12 μL TEMED-a. Po polurnem strjevanju so bili geli pripravljene za takojšnjo uporabo, lahko pa bi jih v vlažni posodi za en teden shranili pri 4 °C.

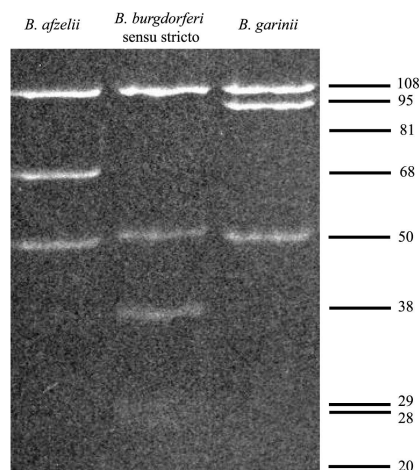
Priprava pufru TBE: 10x koncentrirani pufer TBE smo dobili tako, da smo 108 g Tris baze (Sigma chemical, St.Luis, ZDA), 55 g borove kisline (Merck, ZDA) in 4,6 g EDTA (Sigma chemical, St.Luis, ZDA) natehtali v 1000 mL merilno bučko, ki je vsebovala približno 500 mL prečiščene vode. Pustili smo, da so se sestavine raztopile in dobro premešale z magnetnim mešalom, nato smo s prečiščeno vodo bučko dopolnili do oznake. Raztopino smo nato prefiltrirali skozi filter s porami velikosti 0,2 μm v sterilno steklenico.

3.2.5.2 Analiza fragmentov na vertikalnem poliakrilamidnem gelu

Pripravili smo dva gela, ju vpeli na stojalo in vse skupaj vstavili v elektroforezno kadičko. V prostor med geloma smo vlili pufer TBE in odstranili glavnička. Vsakemu vzorcu smo dodali kapljico barvila (0,36 mM bromfenol modro), dobro premešali in nanесли v jamico gela. Iglo, s katero smo nanašali vzorce v luknjice, smo med posameznimi vzorci dobro sprali s pufrom TBE. Po končanem nanosu smo gele popolnoma prelili s pufrom TBE. Elektroforeza je potekala 2 uri pri napetosti 110 V. Po končani elektroforezi smo gela 30 minut barvali z 1 µg/mL raztopino etidijevega bromida, ter ju analizirali pod UV svetlobo. Ločene restrikcijske fragmente pomnoženega odseka DNK smo primerjali z značilno razporeditvijo restrikcijskih fragmentov znanih, za človeka patogenih, borelijskih vrst (preglednica VII, slika 14).

Preglednica VII: Prikaz fragmentov treh najpogosteje izoliranih patogenih borelijskih vrst (v bp) po rezanju medgenskega odseka rrl-rrf PCR pridelka z restrikcijsko endonukleazo MseI (prirejeno po [40]).

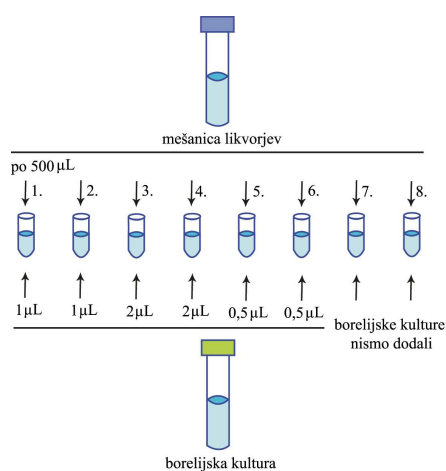
Borelijska vrsta	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	<i>B. garinii</i>		<i>B. afzelii</i>
sev	B31	20047	NT29	VS461
	-	-	-	-
	108	108	108	108
	-	95	-	-
restrikcijski	-	-	-	-
fragmenti,	-	-	-	68
dobljeni	-	-	57	-
po uporabi	51	50	50	50
encima	-	-	-	-
<i>MseI</i>	38	-	38	-
	-	-	-	-
	29	-	-	-
	28	-	-	-
	-	-	-	-
	-	-	-	20
	-	-	-	-



Slika 14: Slika elektroforezne ločbe treh, za človeka najpogosteje patogenih, borelijskih vrst (IMI 2011; fotografija je bila dokumentirana s programom Quantity One, proizvajalca BioRad, ZDA).

3.2.6. Izolacija borelijske DNK iz vzorcev, dobljenih z avtomatsko ali ročno DNK izolacijo iz mešanice likvorja in znane količine borelijske kulture

Mešanico prejetih vzorcev likvorja (negativnih na borelijsko DNK) smo razdelili na osem 500 μ L paralel. V vsako od osmih paralel smo dodali znano količino borelijske kulture, za katero smo pod mikroskopom ocenili, da vsebuje približno 1 borelijo/ μ L (slika 15).



Slika 15: Iz mešanice vzorcev likvorja smo pripravili osem 500 μ L vzorcev, v katere smo dodali različen volumen borelijske kulture.

Vsakega od osmih vzorcev smo nato razdelili na dve 250 μL paraleli. Borelijsko DNK prve paralele smo izolirali **s segrevanjem na 95° (15 min.)**, pri drugi smo za izolacijo uporabili **avtomatski procesor MagNA Pure Compact Instrument** (Roche, Nemčija).

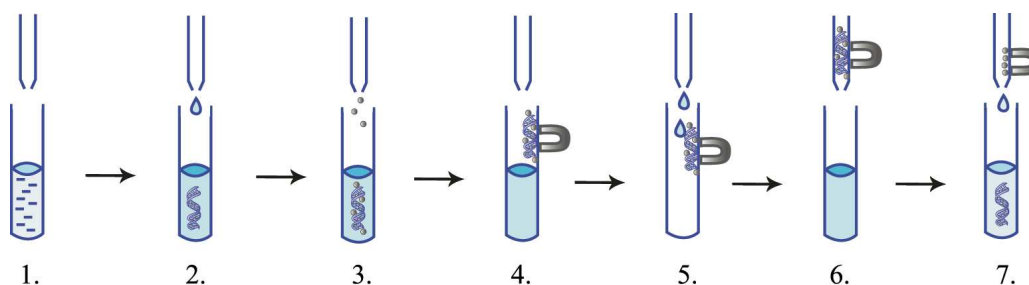
1. Izolacija bakterijske DNK s segrevanjem likvorja na 95°C

Vzorci smo najprej 15 minut centrifugirali (13200 obratov/min), nato smo 200 μL supernatanta zavrgli, 50 μL sedimenta dodali 100 μL vode in nato vzorec za 15 minut izpostavili 95°C. Po obdelavi smo vzorce ohladili na sobni temperaturi ter jih do nadaljne uporabe shranili v zmrzovalniku (-20°C).

2. Avtomatska izolacija bakterijske DNK (uporaba avtomatskega procesorja MagNA Pure Compact Instrument)

Za avtomatsko izolacijo borelijske DNK iz vzorcev likvorja smo uporabili komplet MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (Roche, Nemčija).

Vzorci smo najprej 15 minut centrifugirali (13200 obratov/min.). Po centrifugiranju smo iz posameznega vzorca odpipetirali 100 μL supernatanta, ga zavrgli ter usedlini dodali 250 μL MagNA Pure Bacterial Lysis Buffer (BLB-pufer) (Roche, Nemčija) in 20 μL proteinaze K (Roche, Nemčija). Nastalo mešanico smo najprej 10 minut inkubirali na 65°C, nato 10 minut na 95°C. Po inkubaciji smo mešanico ohladili na sobno temperaturo in 410 μL prenesli v avtomatski procesor MagNA Pure Compact Instrument z nastavljenim 100 μL elucijskim volumnom (slika 16). Po eluciji smo vzorce do nadaljnih analiz shranili v zmrzovalniku (-20°C).



Slika 16: Princip avtomatske izolacije DNK z MagNA Pure Compact Instrumentom.

1. V epruvetki se nahaja vzorec mešanice likvorja z dodano znano količino kulture bakterije *Borrelia burgdorferi sensu lato*.
2. Vzorcju se dodata lizirajoči pufer ter proteinaza K. DNK se sprosti, proteini se denaturirajo.
3. Sproščena DNK se veže na površino magnetnih kroglic.
4. Magnetne kroglice z vezano DNK se ločijo od preostale vsebine.
5. Magnetne kroglice z vezano DNK se večkrat spirajo s pufrom. Odstranijo se nevezani proteini, deli celične membrane in nekateri inhibitorji PCR.
6. Magnetni delci z DNK se ločijo od pufra, ki vsebuje ostanek vzorca.
7. Očiščena DNK se iz magnetnih kroglic eluira pri 70°C v elucijske epruvetke. Kroglice ostanejo v nastavkih za pipete in aparatura jih zavrže.

3.2.7. artus® *Borrelia* LC PCR Kit

Artus® *Borrelia* LC PCR Kit je komercialni kit, proizvajalca QIAGEN, ki smo ga pri našem delu vrednotili in uporabili za detekcijo prisotnosti *B. burgdorferi sensu lato* v kliničnih vzorcih.

Artus® *Borrelia* LC PCR Kit (za 24 ali 96 vzorcev) vsebuje:

- *Borrelia* LC Master,
- *Borrelia* LC QS1 (3×10^4 kopij/ μ L),
- *Borrelia* LC QS2 (3×10^3 kopij/ μ L),
- *Borrelia* LC QS3 (3×10^2 kopij/ μ L),
- *Borrelia* LC QS4 (3×10^1 kopij/ μ L),
- *Borrelia* LC IC (interna kontrola testa),
- vodo za PCR.

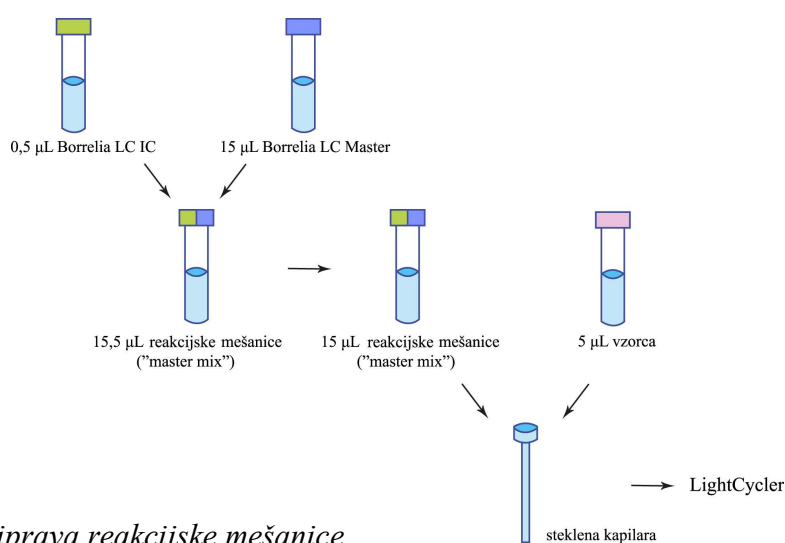
Borrelia LC Master poleg reagentov in encimov za specifično pomnoževanje 102 bp velikega odseka borelijskega genoma (*Proizvajalec nam zaradi zaupnosti podatkov ciljanega dela genoma ni želel razkriti.*), vsebuje tudi specifičen, s fluoroforom označen oligonukleotid – sondo, ki nam služi za detekcijo signala na *LightCycler 2.0* instrumentu.

Kvantitativni standardi (*angl. quantitation standards, QS*), *Borrelia* LC QS1-4, omogočajo kvantitativno vrednotenje borelij v odvzeti kužnini.

Borrelia LC IC je interna kontrola, ki se jo vsakemu vzorcu doda z namenom odkrivanja možne inhibicije PCR. Pomnoževanje in detekcija interne kontrole na zaznavanje prisotnosti *B. burgdorferi* sensu lato v kliničnem vzorcu ne vplivata.

3.2.7.1. Priprava vzorcev

Vzorci smo pripravili tako, da smo v predhodno ohlajene *LightCycler* kapilare (4°C) najprej odmerili 15 µL predhodno pripravljene mešanice 15 µL *Borrelia* LC Master in 0,5 µL *Borrelia* LC IC. Nato smo v kapilare dodali še 5 µL preiskovanega vzorca. Hkrati smo analizirali po 12 ali 24 vzorcev, vsakič pa smo v reakcijo vključili še negativno in pozitivno kontrolo. Za negativno kontrolo smo namesto 5 µL vzorca v zmes dodali 5 µL vode (voda, priložena artus® *Borrelia* PCR Kit-u), za pozitivno kontrolo pa 5 µL izbranega kvantifikacijskega standarda (*Borrelia* LC QS1-4) (slika 17).



Slika 17: Priprava reakcijske mešanice.

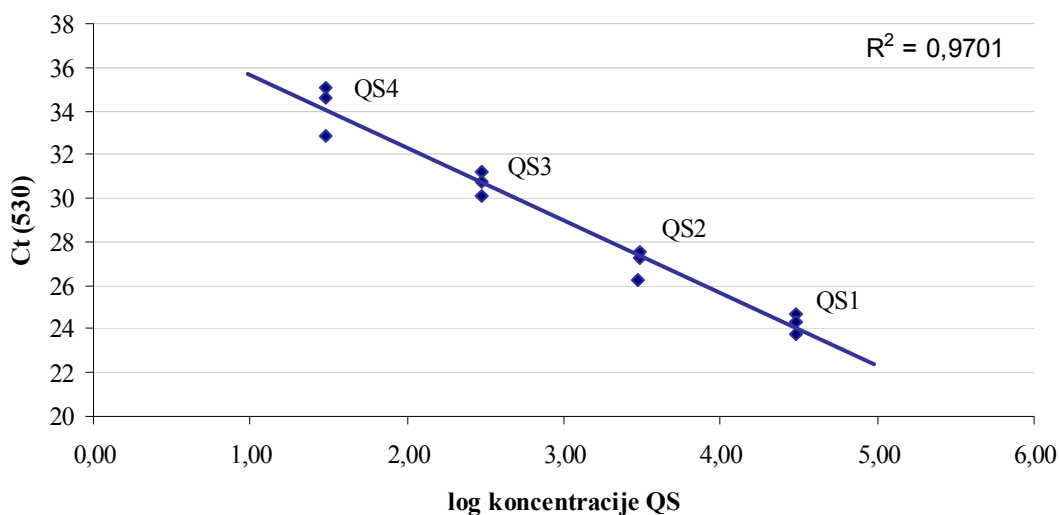
Pred začetkom pomnoževanja se je temperatura v aparaturi, z namenom aktivacije DNK polimeraze, za 15 minut povzpela na 95°C («hot start»). Verižno reakcijo s polimerazo smo nato izvedli v 45 ciklih pri naslednjih pogojih:

- začetna denaturacija pri 95 °C (1 s),
- pripenjanje začetnikov pri 70 °C (20 s) in
- pomnoževanje pri 72 °C (20 s).

Po končani reakciji pomnoževanja je sledilo 30-sekundno hlajenje pri 40°C.

3.2.7.2. Oblikovanje standardne krivulje

S pomočjo artus® Borrelia LC PCR Kit-u priloženih kvantifikacijskih standardov (QS1, QS2, QS3, QS4), smo pred začetkom dela oz. meritev, oblikovali standardno krivuljo. Korelacijo smo vnesli v program *LightCycler 2.0. Instrument-a* in jo uporabljali za vse prihodnje meritve (slika 18).



Slika 18: Standardna krivulja.

Vsakemu izmed štirih kvantifikacijskih standardov artus® Borrelia PCR LC Kit-a smo 3x izmerili Ct vrednosti (kanal 530) in na podlagi rezultatov v program vnesli standardno krivuljo z determinacijskim koeficientom 0,9701.

3.2.7.3. Interpretacija rezultatov

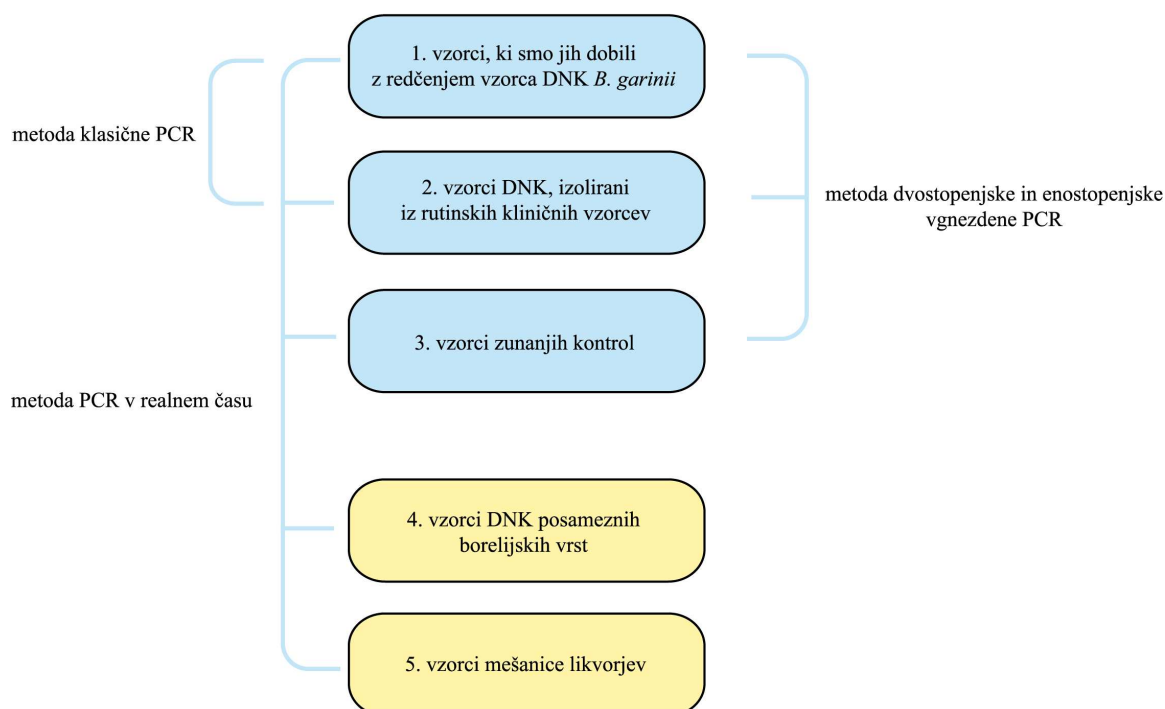
V primeru detekcije fluorescentnega signala na kanalu 530 *LyghtCycler 2.0. Instrument-a*, je rezultat pozitiven. Ct vrednosti kanala 530 nam podajo cikel, v katerem je fluorescenca reakcijske mešanice značilno porasla nad fluorescenco ozadja. Iz Ct vrednosti smo s pomočjo prej oblikovane standardne krivulje ocenjevali tudi bakterijsko koncentracijo.

Če je na kanalu 530 signal pozitiven, hkrati pa porasta fluorescenca na kanalu 610 (interna kontrola) ne zaznamo, vzorec še vedno obravnavamo kot pozitiven, saj je v mešanici verjetno prišlo do kompeticije in porabe materiala za pomnoževanje vzorčne DNK; posledično je interna kontrola ostala nepomnožena oz. fluorescenca ni presegla fluorescenca ozadja.

V primeru negativnega signala, tako na kanalu 530 kot na kanalu 610, zaključka o preiskavi ne moremo narediti, saj je v vzorcu lahko prišlo do inhibicije PCR. V primeru zaključka, da borelijska DNK v vzorcu ni prisotna, bi tako tvegali lažno negativen rezultat. Meritve smo vedno odčitavali na obeh kanalih (porast fluorescenca na kanalu 530 potrди prisotnost borelijske DNK, porast fluorescenca na kanalu 610 kaže na uspešnost pomnoževanja interne kontrole) in tako sledili morebitnemu pojavu inhibicije.

4. REZULTATI

S štirimi različnimi metodami PCR smo dokazovali prisotnost borelijskega genoma v treh različnih skupinah vzorcev. Z metodo PCR v realnem času smo dodatno analizirali dve skupini vzorcev; in sicer vzorce DNK posameznih borelijskih vrst in vzorce mešanice likvorjev (slika 19).



Slika 19: Shema dokazovanja borelijske DNK glede na metodo in vrsto vzorcev.

4.1. Metoda klasične PCR

Z metodo klasične PCR smo dokazovali prisotnost borelijskega genoma v dveh skupinah vzorcev:

1. v vzorcih, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste *B. garinii*,
2. v vzorcih DNK, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev.

4.1.1. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste *B. garinii*

Vzorec DNK, bakterije *Borrelia garinii*, smo z namenom opredelitve občutljivosti metode redčili do faktorja $\times 10^{-10}$. Poskus smo izvedli 2-krat in v obeh serijah redčitev dobili enake rezultate (preglednica VIII).

Preglednica VIII: Z metodo klasične PCR dobljeni rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste B. garinii

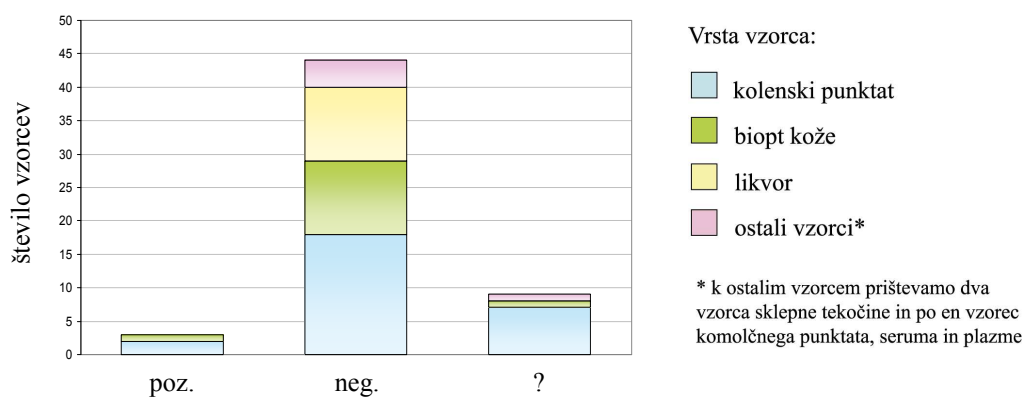
Faktor redčitve	<i>B. garinii</i>	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Rezultat	+	+	+	+	?	-	-	-	-	-	-

Znak + pomeni, da smo v vzorcu dokazali borelijsko DNK; znak - pomeni, da borelijske DNK v vzorcu nismo uspeli dokazati; znak ? pomeni, da so bile elektroforezne lise zabrisane in slabo vidne, zato rezultata ne moremo zanesljivo interpretirati kot pozitivnega.

Borelijsko DNK smo uspeli dokazati v vzorcih do vključno 1000-kratnega redčenja. Metoda nam za vzorec, kjer je bil začetni vzorec DNK redčen za faktor 10.000, ne da več zanesljivega rezultata.

4.1.2. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih DNK, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev

Z metodo klasične PCR smo analizirali 56 vzorcev DNK, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev. Tri vzorce smo ovrednotili kot pozitivne (*poz.*) (od tega dva vzorca kolenskega punktata in en vzorec biopta kože), v devetih primerih pa se o pozitivnosti/negativnosti reakcije zaradi neznačilnega rezultata nismo mogli odločiti (?). Ostali vzorci so bili negativni (slika 20).



Slika 20: Rezultati dokazovanja borelijske DNK v vzorcih rutinskih kliničnih vzorcev, dobljeni z metodo klasične PCR.

(poz. - borelijsko DNK smo v vzorcu dokazali; neg. - borelijske DNK v vzorcu nismo dokazali; ? - elektroforezne lise so bile zabrisane in slabo vidne, zato rezultata ne moremo zanesljivo interpretirati kot pozitivnega)

Pri devetih vzorcih, pri katerih se o rezultatu nismo mogli odločiti in pri dveh od treh, na borelijsko DNK pozitivnih vzorcev, smo izvedli restrikcijo z restrikcijskim encimom *MseI*. Pri dveh pozitivnih rezultatih smo pri enem vzorcu DNK, izoliranem iz vzorca kolenskega punktata, določili vrsto *B. afzelii*, pri drugem vzorcu pa zaradi neznačilnosti rezultata vrste nismo uspeli določiti. Od devet neopredeljenih vzorcev smo po analizi restrikcijskih fragmentov osem vzorcev zaključili kot negativne, pri enem pa je bil dvom o rezultatu še vedno prisoten.

4.2. Metoda dvostopenjske vgnezdene PCR

Z metodo dvostopenjske vgnezdene PCR (pomnoževanje gena *OspA*) smo dokazovali prisotnost borelijskega genoma v treh skupinah vzorcev:

1. v vzorcih, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste *B. garinii*,
2. v vzorcih DNK, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev,
3. v vzorcih zunanjih kontrol.

4.2.1. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste *B. garinii*

Vzorec DNK, bakterije *Borrelia garinii*, smo redčili do faktorja $\times 10^{-10}$. Rezultati so podani v preglednici IX.

Preglednica IX: Z metodo dvostopenjske vgnezdene PCR dobljeni rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste B. garinii

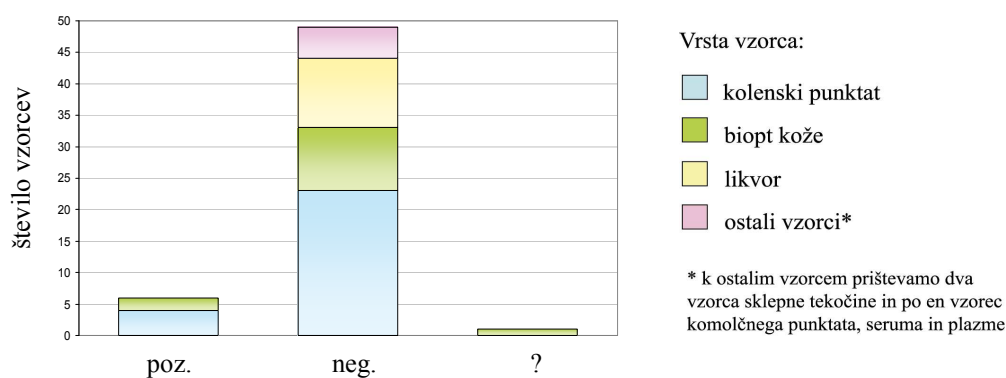
Faktor redčitve	<i>B. garinii</i>	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Rezultat	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Znak + pomeni, da smo v vzorcu dokazali borelijsko DNK; znak - pomeni, da borelijske DNK v vzorcu nismo uspeli dokazati.

Z metodo dvostopenjske vgnezdene PCR smo prisotnost borelijske DNK uspeli dokazati v vzorcih, kjer stopnja redčenja začetnega vzorca DNK ni presegla faktorja 1000.

4.2.2. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih DNK, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev

Z metodo dvostopenjske vgnezdene PCR smo analizirali 56 vzorcev DNK, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev. Prisotnost borelijske DNK (*poz.*) smo potrdili v šestih vzorcih, v enem primeru pa se o pozitivnosti/negativnosti PCR na podlagi rezultata nismo mogli odločiti (?). Ostali vzorci so bili negativni (slika 21).



Slika 21: Rezultati dokazovanja borelijske DNK v vzorcih rutinskih kliničnih vzorcev, dobljeni z metodo dvostopenjske vgnezdene PCR.

(poz. - borelijsko DNK smo v vzorcu dokazali; neg. - borelijske DNK v vzorcu nismo dokazali; ? - elektroforezne lise so bile zabrisane in slabo vidne, zato rezultata ne moremo zanesljivo interpretirati kot pozitivnega)

4.2.3. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih zunanjih kontrol

Z dvostopenjsko vgnezdeno metodo PCR smo dokazovali prisotnost borelijskega genoma v vzorcih DNK različnih bakterijskih sevov (zunanje kontrole). Rezultati so podani v preglednici X.

Preglednica X: Z metodo dvostopenjske vgnezdene PCR dobljeni rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih zunanjih kontrol.

Zunanja kontrola		Zunanja kontrola		Zunanja kontrola	
<i>E. coli</i> K12	-	<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+	<i>E. coli</i> K12	-
<i>B. garinii</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+	<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ³ org/mL)	?	<i>B. lusitaniae</i>	+
<i>Treponema phagedenis</i>	-	<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ⁶ org/mL)	+	<i>B. garinii</i>	+
<i>B. valaisiana</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+	<i>T. phagedenis</i> + <i>E. coli</i> K12	-	<i>Treponema phagedenis</i>	-

Zunanja kontrola		Zunanja kontrola		Zunanja kontrola	
<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ⁶ org/mL)	+	<i>B. bavariensis</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+	<i>E. coli</i> K12	-
<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ⁶ org/mL)	+	<i>B. afzelii</i> + <i>B.</i> <i>valaisiana</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ⁵ org/mL)	+	<i>E. coli</i> K12	-	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+	<i>B. miyamotoi</i>	-	<i>B. afzelii</i> + <i>B.</i> <i>valaisiana</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+
<i>E. coli</i> K12	-	<i>T. phagadenis</i>	-	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ⁵ org/mL)	+
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ³ org/mL)	?	<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ³ org/mL)	?	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+

Znak + pomeni, da smo v vzorcu dokazali borelijsko DNK; znak - pomeni, da borelijske DNK v vzorcu nismo uspeli dokazati; znak ? pomeni, da so bile elektroforezne lise zabrisane in slabo vidne, zato rezultata ne moremo zanesljivo interpretirati kot pozitivnega.

Z dvostopenjsko vgnezdno metodo PCR v treh primerih, zaradi neznačilnosti in zabrisanosti elektroforeznih lis, borelijske DNK v vzorcih zunanjih kontrol nismo uspeli zanesljivo dokazati, zato smo vzorce označili kot neopredeljene (?). Borelijsko DNK smo uspeli dokazati pri vseh ostalih zunanjih kontrolah, ki so vsebovale DNK borelij lysmske borelioze. DNK bakterije *Borrelia miyamotoi* z uporabljenno metodo nismo dokazali. Prav tako smo ovrgli prisotnost borelijske DNK v vzorcih, ki so vsebovali DNK nesrodne bakterije *E. coli* ali DNK sorodne bakterije *Treponema phagadenis*. Iz preglednice (preglednica X) je razvidno, da metoda dvostopenjske vgnezdene PCR borelijskega genoma ni uspela dokazati v vzorcih, ki so vsebovali do 1000 borelij/mL.

4.3. Metoda enostopenjske vgnezdene PCR

Z metodo enostopenjske vgnezdene PCR (pomnoževanje medgenske regije *rrl-rrf*) smo dokazovali prisotnost borelijskega genoma v treh skupinah vzorcev:

1. v vzorcih, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste *B. garinii*,
2. v vzorcih DNK, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev,
3. v vzorcih zunanjih kontrol.

4.3.1. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste *B. garinii*

Vzorec DNK bakterije *Borrelia garinii* smo redčili do faktorja $\times 10^{-10}$. Rezultati so podani v preglednici XI.

Preglednica XI: Z metodo enostopenjske vgnezdene PCR dobljeni rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste B. garinii.

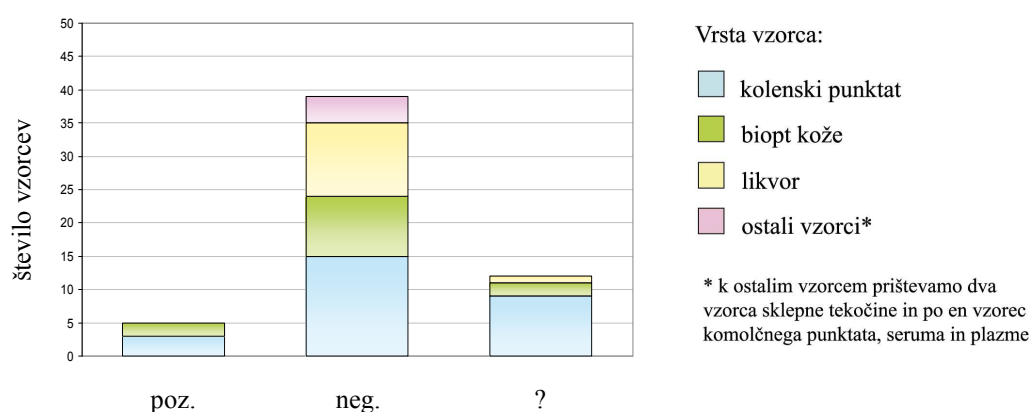
Faktor redčitve	<i>B. garinii</i>	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Rezultat	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Znak + pomeni, da smo v vzorcu dokazali borelijsko DNK; znak - pomeni, da borelijske DNK v vzorcu nismo uspeli dokazati.

Z metodo enostopenjske vgnezdene PCR smo uspeli dokazati prisotnost borelijske DNK v vzorcih, kjer stopnja redčenja začetnega vzorca DNK, seva *B. garinii*, ni presegla faktorja 100.000.

4.3.2. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih DNK, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev

Z metodo enostopenjske vgnezdene PCR smo analizirali 56 vzorcev DNK, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev. Borelijsko DNK smo dokazali v petih vzorcih. Od tega so bili trije vzorci DNK, izolirani iz vzorcev kolenskih punktata in dva vzorca DNK, izolirana iz bioptov kože. V dvanajstih primerih se zaradi neznačilnosti in zabrisanosti elektroforeznih lis nismo mogli odločiti o pozitivnosti/negativnosti reakcije (?). Ostali vzorci so bili negativni (slika 22).



Slika 22: Rezultati dokazovanja borelijske DNK v vzorcih rutinskih kliničnih vzorcev, dobljeni z metodo enostopenjske vgnezdene PCR.

(poz. - borelijsko DNK smo v vzorcu dokazali; neg. - borelijske DNK v vzorcu nismo dokazali; ? - elektroforezne lise so bile zabrisane in slabo vidne, zato rezultata ne moremo zanesljivo interpretirati kot pozitivnega)

Restrikcijo z encimom *MseI* smo naredili pri dveh od petih pozitivnih vzorcev in pri osmih od dvanajstih neopredeljenih vzorcev. Oba pozitivna vzorca smo po restrikciji opredelili kot *B. afzelii*, medtem ko smo osem prej neopredeljenih vzorcev po restrikciji označili kot negativne.

4.3.3. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih zunanjih kontrol

Z metodo enostopenjske vgnezdene PCR smo dokazovali prisotnost borelijskega genoma v vzorcih DNK različnih bakterijskih sevov (zunanje kontrole). Rezultati so podani v preglednici XII.

Preglednica XII: Z metodo enostopenjske vgnezdene PCR dobljeni rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih zunanjih kontrol.

Zunanja kontrola		Zunanja kontrola		Zunanja kontrola	
<i>E. coli</i> K12	-	<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+	<i>E. coli</i> K12	-
<i>B. garinii</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+	<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ³ org/mL)	+	<i>B. lusitaniae</i>	+
<i>Treponema phagedenis</i>	-	<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ⁶ org/mL)	+	<i>B. garinii</i>	+
<i>B. valaisiana</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+	<i>T. phagedenis</i> + <i>E. coli</i> K12	-	<i>Treponema phagedenis</i>	-
<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ⁶ org/mL)	+	<i>B. bavariensis</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+	<i>E. coli</i> K12	-
<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ⁶ org/mL)	+	<i>B. afzelii</i> + <i>B. valaisiana</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ⁵ org/mL)	?	<i>E. coli</i> K12	-	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+	<i>B. miyamotoi</i>	-	<i>B. afzelii</i> + <i>B. valaisiana</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+
<i>E. coli</i> K12	-	<i>T. phagadenis</i>	-	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ⁵ org/mL)	+
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ³ org/mL)	?	<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ³ org/mL)	?	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+

Znak + pomeni, da smo v vzorcu dokazali borelijsko DNK; znak - pomeni, da borelijske DNK v vzorcu nismo uspeli dokazati; znak ? pomeni, da so bile elektroforezne lise zabrisane in slabo vidne, zato rezultata ne moremo zanesljivo interpretirati kot pozitivnega.

Z metodo enostopenjske vgnezdene PCR v treh primerih, zaradi neznačilnosti in zabrisanosti elektroforeznih lis, borelijske DNK v vzorcih zunanjih kontrol nismo uspeli zanesljivo dokazati, zato smo vzorce označili kot neopredeljene (?). Borelijsko DNK smo uspeli dokazati pri vseh ostalih zunanjih kontrolah, ki so vsebovale DNK borelij lymske borelioze. DNK bakterije *Borrelia miyamotoi* z uporabljen metodo nismo dokazali. Prav tako smo ovrgli prisotnost borelijske DNK v vzorcih, ki so vsebovali DNK nesorodne bakterije *E. coli* ali DNK sorodne bakterije *Treponema phagenis*.

Z analizo restrikcije fragmentov medgenske regije *rrl-rrf* z encimom *MseI* so znano vrsto borelij v laboratoriju že predhodno potrdili.

4.4. Metoda PCR v realnem času - artus® Borrelia LC PCR Kit

Z metodo PCR v realnem času (uporaba komercialno dostopnega testa artus® Borrelia LC PCR Kit) smo dokazovali prisotnost borelijskega genoma v petih skupinah vzorcev:

1. v vzorcih, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste *B. garinii*,
2. v vzorcih DNK, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev,
3. v vzorcih zunanjih kontrol,
4. v vzorcih DNK posameznih borelijskih vrst,
5. v vzorcih mešanice likvorjev.

4.4.1. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste *B. garinii*

Vzorec DNK bakterije *Borrelia garinii* smo redčili do faktorja $\times 10^{-10}$. Rezultati so podani v preglednici XIV.

Preglednica XIV: Z metodo PCR v realnem času dobljeni rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste B. garinii.

Faktor redčitve	<i>B. garinii</i>	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
Rezultat	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Znak + pomeni, da smo v vzorcu dokazali borelijsko DNK; znak - pomeni, da borelijske DNK v vzorcu nismo uspeli dokazati.

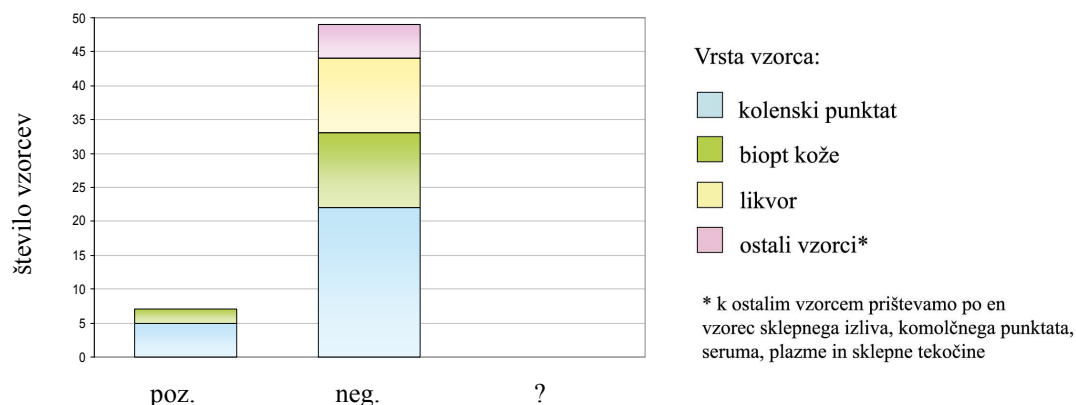
Borelijsko DNK smo uspeli dokazati v vzorcih do vključno 1.000.000-kratnega redčenja. V vzorcu, kjer smo začetni vzorec DNK redčili za faktor $\times 10^{-7}$, prisotnosti borelijske DNK nismo uspeli več dokazati.

4.4.2. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih DNK, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev

Borelijsko DNK smo z uporabo metode PCR v realnem času dokazovali v 56 vzorcih DNK, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev. Prisotnost borelijskega genoma smo dokazali v sedmih vzorcih. Od tega je bilo pet vzorcev kolenskih punktata in dva vzorca biopta kože.

Pri enem vzorcu (DNK izolirana iz vzorca kolenskega punktata) smo z metodo PCR v realnem času najprej dobili negativen rezultat, vendar smo na *LighCycler 2.0. Instrument-u* vizuelno opazili pozen dvig krivulje fluorescence, zato smo meritev ponovili. Pri drugi meritvi smo borelijsko DNK v vzorcu dokazali. Dobili smo pozitiven rezultat s Ct-jem več kot 40 ciklov, kar kaže na nizko število prisotnih bakterij.

V 49 vzorcih borelijske DNK nismo uspeli dokazati, zato smo jih označili kot negativne. Neopredeljenih rezultatov z metodo PCR v realnem času nismo dobili (slika 23).



Slika 23: Rezultati dokazovanja borelijske DNK v vzorcih DNK, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev, dobljeni z metodo PCR v realnem času (uporaba artus® Borrelia LC PCR Kit-a).

(poz. - borelijsko DNK smo v vzorcu dokazali; neg. - borelijske DNK v vzorcu nismo dokazali; ? - elektroforezne lise so bile zabrisane in slabo vidne, zato rezultata ne moremo zanesljivo interpretirati kot pozitivnega).

Med 49 negativnimi rezultati v devetih primerih nismo zasledili signala interne kontrole. Meritve smo ponovili, vendar je bil rezultat v vseh devetih primerih enak. Odsotnost porasta fluorescence negativne kontrole nakazuje na prisotnost PCR inhibitorjev, zato v teh devetih primerih negativnosti preiskave ne moremo potrditi.

4.4.3. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih zunanjih kontrol

Z metodo PCR v realnem času smo dokazovali prisotnost borelijskega genoma v vzorcih DNK različnih bakterijskih sevov (zunanje kontrole). Rezultati so podani v preglednici XIV.

Preglednica XIV: Z metodo PCR v realnem času dobljeni rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih zunanjih kontrol.

Zunanja kontrola		Zunanja kontrola		Zunanja kontrola	
<i>E. coli</i> K12	-	<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+	<i>E. coli</i> K12	-
<i>B. garinii</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+	<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ³ org/mL)	+	<i>B. lusitaniae</i>	+
<i>Treponema phagedenis</i>	-	<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ⁶ org/mL)	+	<i>B. garinii</i>	+
<i>B. valaisiana</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+	<i>T. phagedenis</i> + <i>E. coli</i> K12	-	<i>Treponema phagedenis</i>	-
<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ⁶ org/mL)	+	<i>B. bavariensis</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+	<i>E. coli</i> K12	-
<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ⁶ org/mL)	+	<i>B. afzelii</i> + <i>B. valaisiana</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ⁵ org/mL)	+	<i>E. coli</i> K12	-	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+	<i>B. miyamotoi</i>	-	<i>B. afzelii</i> + <i>B. valaisiana</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+
<i>E. coli</i> K12	-	<i>T. phagedenis</i>	-	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ⁵ org/mL)	+
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ³ org/mL)	+	<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ³ org/mL)	+	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ⁴ org/mL)	+

Znak + pomeni, da smo v vzorcu dokazali borelijsko DNK; znak - pomeni, da borelijske DNK v vzorcu nismo uspeli dokazati.

Z metodo PCR v realnem času smo borelijsko DNK uspeli dokazati pri vseh zunanjih kontrolah, ki so vsebovale DNK borelij lymške borelioze. DNK bakterije *Borrelia miyamotoi* s PCR v realnem času nismo dokazali. Prav tako smo ovrgli prisotnost borelijske DNK v vzorcih, ki so vsebovali DNK nesorodne bakterije *E. coli* ali DNK sorodne bakterije *Treponema phagedenis*.

4.4.4. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih DNK posameznih borelijskih vrst

Z metodo PCR v realnem času smo dokazovali prisotnost borelijskega genoma v sedmih vzorcih DNK različnih borelijskih vrst (preglednica XV).

Preglednica XV: Z metodo PCR v realnem času dobljeni rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih DNK posameznih borelijskih vrst.

Vrsta borelije	Ct (530)	Koncentracija [št. bakterij/ μ L]	Ct (610)
<i>B. afzelii</i>	27,63	$2,17 \times 10^3$	-
<i>B. garinii</i>	18,61	$6,39 \times 10^5$	-
<i>B. garinii – Mlg4</i>	24,73	$1,35 \times 10^4$	-
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	19,34	$4,04 \times 10^5$	-
<i>B. spielmanii</i>	17,38	$1,39 \times 10^6$	-
<i>B. valaisiana</i>	22,14	$6,93 \times 10^4$	-
<i>B. coriaceae</i>	16,91	$1,71 \times 10^6$	-

V zgornji preglednici (preglednica XV) vidimo, da smo pri vseh sedmih vzorcih dokazali prisotnost borelijske DNK. Interna kontrola je pri vseh sedmih vrstah negativna, kar lahko pripišemo velikemu številu borelijskih kopij v mikrolitru vzorca in posledični porabi materiala, potrebnega za pomnoževanje že vključene interne kontrole.

Poleg šestih vrst borelij, pripadajočim kompleksu *B. burgdorferi sensu lato* (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. garinii – Mlg4*, *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. spielmanii*, *B. valaisiana*), je test dal pozitiven rezultat tudi za vrsto *B. coriaceae*, ki pripada borelijam povratne mrzlice.

4.4.5. Rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih mešanice likvorjev

Vzorci DNK iz mešanice likvorjev z dodano znano količino borelijske kulture, izolirane bodisi z ročno bodisi z avtomatsko DNK izolacijo, smo analizirali z metodo PCR v realnem času (uporaba artus® Borrelia LC PCR Kit-a). Rezultati so podani v preglednici XVI.

Preglednica XVI: Z metodo PCR v realnem času dobljeni rezultati dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih mešanice likvorjev.

Vzorci od 1 do 6 vsebujejo različne količine dodane borelijske kulture. Sedmi in osmi vzorec služita kot negativna kontrola.

Št. vzorca	Ročna izolacija DNK s segrevanjem na 95° C		Avtomatska DNK izolacija	
	Ct (530)	Ct (610)	Ct (530)	Ct (610)
1.	34,73	-	29,72	-
2.	34,00	-	30,48	-
3.	30,58	-	29,61	-
4.	32,12	28,80	30,72	-
5.	33,45	27,83	32,84	29,05
6.	31,75	-	30,47	-
7.	-	> 40,00	-	33,06
8.	-	37,93	-	33,08

Znak - v stolpcu Ct (530) pomeni, da borelijske DNK v vzorcu nismo dokazali; znak - v stolpcu Ct (610) pomeni, da interna kontrola v reakciji ni bila pomnožena in posledično nismo zaznali njenega signala.

Pri obeh metodah izolacije smo pri šestih vzorcih, ki so vsebovali dodano borelijsko DNK, le-to dokazali.

Sedmi in osmi vzorec, ki sta služila kot negativna kontrola sta pri obeh metodah dala negativni rezultat (borelijske DNK v vzorcu nismo dokazali). Interni kontroli je pri obeh

metodah porasla fluorescenca kanala 610, kar izključuje možnost lažno negativnega rezultata.

4.5. Primerjava metod PCR

4.5.1. Primerjava rezultatov dokazovanja borelijskega genoma v vzorcih, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste *B. garinii*

Vzorec DNK, borelijske vrste *B. garinii*, smo redčili do faktorja $\times 10^{-10}$ in vzorce analizirali s štirimi metodami PCR. Rezultati so podani v preglednici XVII.

*Preglednica XVII: Primerjava rezultatov dokazovanja borelijskega genoma v vzorcih, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste *B. garinii*.*

Faktor redčitve	artus® Borrelia LC PCR Kit			Klasična PCR (<i>rrl-rrf</i>)	Enostopenjska vgnezdena PCR (<i>rrl-rrf</i>)	Dvostopenjska vgnezdena PCR (<i>OspA</i>)
	Ct (530)	Konc. [bor./ μ L]	Ct (610)			
10^{-1}	23,05	$9,17 \times 10^4$	-	+	+	+
10^{-2}	25,92	$1,32 \times 10^4$	-	+	+	+
10^{-3}	29,71	$1,04 \times 10^3$	34,71	+	+	+
10^{-4}	33,78	$6,64 \times 10^1$	29,65	?	+	-
10^{-5}	36,28	$1,23 \times 10^1$	30,79	-	+	-
10^{-6}	36,05	$1,44 \times 10^1$	30,47	-	-	-
10^{-7}	-	-	30,82	-	-	-
10^{-8}	-	-	30,53	-	-	-
10^{-9}	-	-	30,31	-	-	-
10^{-10}	-	-	31,11	-	-	-

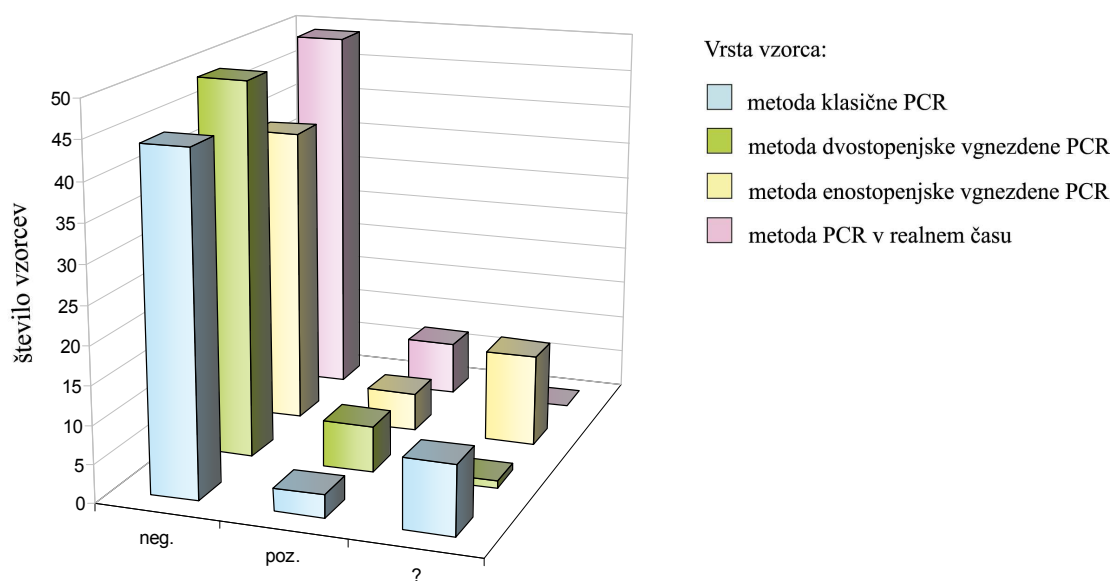
PCR v realnem času: znak - v stolpcu Ct (610) pomeni, da negativna kontrola v reakciji ni bila pomnožena in posledično nismo zaznali njenega signala.

Klasična PCR/enostopenjska vgnezdena PCR/dvostopenjska vgnezdena PCR: Znak + pomeni, da smo v vzorcu dokazali borelijsko DNK; znak - pomeni, da borelijske DNK v vzorcu nismo uspeli dokazati; znak ? pomeni, da so bile elektroforezne lise zabrisane in slabo vidne, zato rezultata ne moremo zanesljivo interpretirati kot pozitivnega.

Iz preglednice XVII je razvidno, da smo borelijsko DNK z metodo PCR v realnem času dokazali še do vključno vzorca, kjer smo začetni vzorec DNK redčili za faktor $\times 10^{-6}$. Z metodo enostopenjske vgnezdene PCR smo borelijsko DNK dokazali do vključno vzorca, redčenega za faktor $\times 10^{-5}$. Z metodo dvostopenjske vgnezdene PCR in metodo klasične PCR pa smo borelijsko DNK dokazali le do vzorca, ki je bil redčen za faktor $\times 10^{-3}$.

4.5.2. Primerjava rezultatov dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih DNK, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev

Prisotnost borelijskega genoma smo v vzorcih DNK, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev dokazovali s štirimi metodami PCR in rezultate med seboj primerjali (slika 24).



Slika 24: Grafična predstavitev negativnih (neg.), pozitivnih (poz.) in neopredeljenih (?) rezultatov vseh štirih primerjanih metod PCR.

Iz slike 24 je razvidno, da smo borelijsko DNK z metodo PCR v realnem času dokazali v največjem številu vzorcev. V spodnji preglednici so pozitivni vzorci prikazani podrobneje (preglednica XVIII).

Preglednica XVIII: Podrobneje prikazani pozitivni vzorci in metode s katerimi smo borelijsko DNK v vzorcu določili.

Vzorci DNK, pozitivni na borelijsko DNK	
Pozitivni z vsemi štirimi metodami PCR	<p>Borelijsko DNK smo z vsemi štirimi metodami dokazali v dveh vzorcih:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. v vzorcu DNK, izoliranem iz vzorca kolenskega punktata in 2. v vzorcu DNK, izoliranem iz vzorca kože.
Pozitivni s tremi metodami PCR	<p>Borelijsko DNK smo s tremi metodami PCR dokazali v štirih vzorcih:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. v vzorcu DNK, izoliranem iz vzorca kolenskega punktata; neopredeljen rezultat smo dobili z metodo enostopenjske vgnezdene PCR, 2. v vzorcu DNK, izoliranem iz vzorca kolenskega punktata; neopredeljen rezultat smo dobili z metodo klasične PCR, 3. v vzorcu DNK, izoliranem iz vzorca kože, 4. v vzorcu DNK, izoliranem iz vzorca kolenskega punktata <p>pri 3. in 4. vzorcu z metodo klasične PCR borelijske DNK nismo uspeli dokazati (dobili smo negativen rezultat).</p>
Pozitivni z eno metodo PCR	<p>V enem vzorcu smo borelijsko DNK uspeli dokazati le z uporabo metode PCR v realnem času:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. v vzorcu DNK, izoliranem iz vzorca kolenskega punktata.

Pri vzorcu, ki je v zgornji tabeli naveden kot 4. med pozitivnimi s tremi metodami PCR (izoliran iz vzorca kolenskega punktata), smo s PCR v realnem času najprej dobili negativen rezultat, vendar smo na *LighCycler 2.0. Instrument-u* vizuelno opazili pozen

dvig intenzitete fluorescence, zato smo meritev ponovili. Druga meritev je dala pozitiven rezultat s Ct-jem več kot 40 ciklov, kar kaže na nizko število prisotnih bakterij.

Borelijsko DNK smo dokazali tudi v vzorcu kolenskega punktata, ki je bil negativen pri vseh primerjanih metodah PCR. Dvig intenzitete fluorescence je bil sicer pozen ($Ct > 40,00$), kar nakazuje na majhno število borelijskih kopij v preiskovanem vzorcu. Meritev smo ponovili in drugič dobili negativen rezultat. Ker pri prvi meritvi ne kaže na kontaminacijo (negativna kontrola je bila negativna, držali smo se vseh potrebnih ukrepov za preprečitev kontaminacije), bi bilo potrebno vzorec še enkrat preučiti, saj obstaja možnost prisotnosti zelo nizke koncentracije borelijskih kopij, ki jih v drugi analizi nismo zajeli.

Z metodo PCR v realnem času smo prisotnost borelijskega genoma ovrgli v primeru 49 vzorcev. Enako število negativnih vzorcev smo dobili pri dvostopenjski vgnezdni metodi PCR. Klasična metoda PCR in enostopenjska vgnezdna metoda PCR imata na račun vzorcev, ki jih zaradi neznačilnih elektroforeznih lis nismo mogli nedvoumno določiti, manjše število negativnih vzorcev (slika 24).

Med 49 vzorci, v katerih z metodo PCR v realnem času borelijske DNK nismo dokazali, v devetih primerih nismo zasledili signala interne kontrole. Meritve smo ponovili, vendar je bil rezultat v vseh devetih primerih enak.

Največ neopredeljenih rezultatov smo dobili pri enostopenjski vgnezdni metodi PCR. Pri metodi PCR v realnem času dvomljivo pozitivnih oz. neopredeljenih rezultatov ni bilo (slika 24).

4.5.3. Primerjava rezultatov dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih zunanjih kontrol

Vzorci zunanjih kontrol smo na prisotnost borelijskega genoma analizirali s tremi metodami PCR. Rezultati se razlikujejo pri štirih vzorcih zunanjih kontrol in so podani v preglednici XIX.

Preglednica XIX: Primerjava rezultatov dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih zunanjih kontrol.

Zunanja kontrola	artus® Borrelia LC PCR Kit			Vgnezdna PCR (<i>OspA</i>)	Vgnezdna PCR (<i>rrl-rrf</i>)
	Ct (530)	Koncentracija (org/ μ L)	Ct (610)		
<i>E. coli</i> K12	-	-	31,87	-	-
<i>B. garinii</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	32,98	3,39 x 10 ¹	26,06	+	+
<i>Treponema phagedenis</i>	-	-	33,03	-	-
<i>B. valaisiana</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	36,11	4,12	30,85	+	+
<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ⁶ org/mL)	32,12	6,07 x 10 ¹	28,08	+	+
<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	> 40,00	> 3,00 x 10 ⁻¹	32,64	+	+
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ⁵ org/mL)	32,00	6,55 x 10 ¹	-	+	?
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ⁴ org/mL)	35,75	5,24	33,52	+	+
<i>E. coli</i> K12	-	-	34,41	-	-
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ³ org/mL)	> 40,00	> 3,00 x 10 ⁻¹	34,69	?	-
<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ⁴ org/mL)	> 40,00	> 3,00 x 10 ⁻¹	33,72	+	+
<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ³ org/mL)	> 40,00	> 3,00 x 10 ⁻¹	34,88	?	+
<i>B. afzelii</i> (~ 1x10 ⁶ org/mL)	32,65	4,24 x 10 ¹	-	+	+
<i>T. phagedenis</i> + <i>E. coli</i> K12	-	-	34,51	-	-

Zunanja kontrola	artus® Borrelia LC PCR Kit			Vgnezdena PCR (<i>OspA</i>)	Vgnezdena PCR (<i>rrl-rrf</i>)
	Ct (530)	Koncentracija (org/ μ L)	Ct (610)		
<i>B. bavariensis</i> ($\sim 1 \times 10^4$ org/mL)	35,00	8,70	-	+	+
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto ($\sim 1 \times 10^6$ org/mL)	27,72	$1,17 \times 10^3$	-	+	+
<i>E. coli</i> K12	-	-	35,78	-	-
<i>B. miyamotoi</i>	-	-	35,76	-	-
<i>T. phagadenis</i>	-	-	33,05	-	-
<i>B. afzelii</i> ($\sim 1 \times 10^3$ org/mL)	> 40,00	$> 2,78 \times 10^{-1}$	31,89	?	?
Pričakovano: -	-	-	31,36	-	-
Pričakovano: +	26,16	$3,09 \times 10^3$	-	+	+
Pričakovano: +	25,57	$4,61 \times 10^3$	-	+	+
Pričakovano: -	-	-	32,50	-	-
<i>E. coli</i> K12	-	-	32,12	-	-
<i>B. afzelii</i> + <i>B. valaisiana</i> ($\sim 1 \times 10^4$ org/mL)	34,57	$1,08 \times 10^1$	30,03	+	+
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto ($\sim 1 \times 10^4$ org/mL)	31,38	$9,21 \times 10^1$	-	+	+
<i>B. afzelii</i> + <i>B. valaisiana</i> ($\sim 1 \times 10^4$ org/mL)	35,61	5,36	30,37	+	+
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto ($\sim 1 \times 10^5$ org/mL)	33,52	$2,19 \times 10^1$	-	+	+

4. REZULTATI

Zunanja kontrola	artus® Borrelia LC PCR Kit			Vgnezdna PCR (<i>OspA</i>)	Vgnezdna PCR (<i>rrl-rrf</i>)
	Ct (530)	Koncentracija (org/ μ L)	Ct (610)		
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto (~ 1x10 ⁴ org/mL)	38,28	8,84 x 10 ⁻¹	32,15	+	+

5. RAZPRAVA

5.1. Analiza rezultatov dokazovanja borelijskega genoma v vzorcih, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK borelijske vrste *B. garinii*

Metoda PCR v realnem času (uporaba artus® Borrelia LC PCR Kit-a) se je izkazala za tri velikostne razrede bolj občutljiva, kot metoda klasične in dvostopenjske vgnezdene PCR ter za en velikostni razred občutljivejša kot metoda enostopenjske vgnezdene PCR. Z metodo PCR v realnem času smo borelijsko DNK namreč dokazali v vzorcih do vključno vzorca, kjer smo začetni DNK vzorec, seva *B. garinii*, redčili za faktor 1.000.000. Pri redčitvi za faktor 100.000 in 1.000.000 so teoretične koncentracije sicer podobne, kar pa gre verjetno pripisati napaki zaradi nizke koncentracije borelijskih kopij v vzorcu. Pri pipetiranju se le-te lahko oprimejo nastavka za pipetiranje – tako v vzorec zanesemo več kopij; ali pa smo zaradi neenakomerne porazdelitve borelij pri redčenju za faktor 1.000.000 zajeli preveliko število le-teh.

Metoda PCR v realnem času (uporaba artus® Borrelia LC PCR Kit-a) je torej v primerjavi z metodami klasične in vgnezdenih PCR občutljivejša. Z komercialno dostopnim testom lahko v vzorcu določimo za faktor 10 manj borelijskih kopij, kot z uporabo metode enostopenjske vgnezdene PCR, ki se je med ostalimi tremi tehnikami izkazala za najobčutljivejšo. Rezultat, ki smo ga dobili z metodo dvostopenjske vgnezdene PCR je lahko znak heterogenosti gena *OspA* ter posledično neprileganja oligonukleotidnih začetnikov in ne same občutljivosti metode.

5.2. Analiza rezultatov dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih DNK, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev

Za najmanj zanesljivo se je pri preiskovanih vzorcih, izoliranih iz rutinskih kliničnih vzorcev, izkazala metoda klasične PCR. Borelijsko DNK je dokazala le v treh vzorcih. Ugotovitev se verjetno da pripisati njeni manjši občutljivosti napram metodam vgnezdene PCR [28] in metodi PCR v realnem času.

Z metodo PCR v realnem času smo borelijsko DNK dokazali v sedmih vzorcih, sledila ji je metoda dvostopenjske vgnezdene PCR s šestimi pozitivnimi vzorci. Z metodo

enostopenjske vgnezdene PCR smo prisotnost borelijskega genoma dokazali v petih vzorcih. Metoda PCR v realnem času je tudi edina s katero nismo dobili neopredeljenih rezultatov. Rezultat, ki nam ga metoda poda, je nedvoumen, izognemo se postopkom elektroforeze in odčitavanju elektroforezne fotografije. S tem zaobidemo subjektivni faktor odločanja o pozitivnosti/negativnosti rezultata. Nadaljna restrikcija neopredeljenih vzorcev klasične in vgnezdene PCR metode je zamudna in cenovno neugodna. Ta prednost pa vendar hkrati predstavlja slabost metode PCR v realnem času, da bi nam borelijo, ki jo v vzorcu dokažemo, opredelila do vrste. Ostale uporabljane tehnike, ravno zaradi uporabe restrikcije in elektroforeze, to omogočajo. Rešitev bi mogoče predstavljala določitev talilne temperature pomnoženega odseka borelijske DNK, ki se med posameznimi vrstami razlikuje [29], vendar bi bile za to potrebne nove podrobnejše analize, ki bi to možnost ovrednotile.

Prednost PCR v realnem času je tudi v tem, da nam zazna prisotnost inhibitorjev PCR v vzorcu, kar z ostalimi tehnikami ne moremo zaznati.

Zmožnost metode PCR v realnem času, da nam poleg kvalitativnega poda tudi kvantitativni rezultat, je vsekakor prednost, ki jo lahko izkoristimo za spremljanje uspešnosti zdravljenja, napovedovanje prognoze in ugotavljanje rezistence na zdravila [31]. Podatek lahko hkrati uporabimo tudi za samo analizo povezave resnosti bolezni s številom prisotnih bakterij. Nobena ostala od do sedaj uporabljenih tehnik nam v diagnostiki lymške borelioze tega ne omogoča [42]. Ravno tako nam nobena od primerjanih metod PCR ne pokaže prisotnosti inhibicije PCR v vzorcu. Z uporabo interne kontrole pri metodi PCR v realnem času inhibicijo zaznamo in to upoštevamo pri podajanju rezultata.

5.3. Analiza rezultatov dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih zunanjih kontrol

Z vsemi primerjanimi metodami smo borelijsko DNK dokazali v vseh vzorcih, ki so vsebovali DNK borelij lymške borelioze (*B. bavariensis* je vrsta borelij lymške borelioze, ki so jo predhodno uvrščali med *B. garinii* [43]). Prisotnosti borelijskega genoma v vzorcu, ki je vseboval DNK *B. miyamotoi* nismo dokazali (*B. miyamotoi* se ne uvršča med borelije lymške borelioze, temveč pripada skupini borelij povratne mrzlice [44].).

Ravno tako nobena od uporabljenih metod borelijske DNK ni dokazala v vzorcih, ki so vsebovali DNK sorodne bakterije *T. phagedenis* iz rodu treponem, ki se skupaj z rodom borelij uvršča v družino spirohet. Nobena od metod ni dokazala prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih, ki so vsebovali DNK nesorodne bakterije *E. coli*.

Pri metodi enostopenjske in dvostopenjske PCR smo v treh primerih dobili rezultat, ki ga nismo mogli zanesljivo opredeliti (oznaka »?« v preglednici XIX). Prednost metode PCR v realnem času je, da dvoumnih rezultatov nismo dobili.

5.4. Analiza rezultatov dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih DNK posameznih borelijskih vrst (uporaba artus® Borrelia LC PCR Kit-a)

Poleg šestih vrst borelij, pripadajočim kompleksu *B. burgdorferi* sensu lato (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. garinii – Mlg4*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. spielmanii*, *B. valaisiana*), je test dal pozitiven rezultat tudi za vrsto *B. coriaceae*, ki pripada skupini borelij, povzročiteljic povratne mrzlice [42].

Kot kaže metoda PCR v realnem času ni specifična za borelije lymške borelioze, temveč dokaže prisotnost borelijske DNK tudi v vzorcih, ki vsebujejo DNK borelij, ki ne pripadajo skupini *B. burgdorferi* sensu lato. Borelijske DNK v vzorcu zunanje kontrole, ki je vsebovala DNK *B. miyamotoi*, test ni dokazal. Ker omenjena bakterija skupaj z borelijo *B. coriaceae* pripada borelijam povratne mrzlice, bi bile za natančnejšo opredelitev potrebne nadaljne raziskave z vključitvijo širšega spektra borelij povratne mrzlice.

5.5. Analiza rezultatov dokazovanja prisotnosti borelijskega genoma v vzorcih mešanice likvorjev (uporaba artus® Borrelia LC PCR Kit-a), ki smo jih dobili bodisi z avtomatsko bodisi z ročno izolacijo

Borelijsko DNK smo z uporabo artus® Borrelia LC PCR Kit-a dokazali tako v vzorcih, ki smo jih dobili z avtomatsko, kot v vzorcih, ki smo jih dobili z ročno izolacijo DNK. V sedmem in osmem vzorcu DNK (DNK izolirana bodisi z avtomatsko bodisi z ročno izolacijo), ki sta služila kot negativna kontrola, borelijske DNK nismo dokazali.

Sodeč po Ct vrednostih (preglednica XVI), ki so pri ročni DNK izolaciji višje, sklepamo, da avtomatska izolacija vzorec DNK bolj uspešno očisti nečistot, zato je pomnoževanje hitrejše, fluorescenca pa prej doseže fluorescenco ozadja. Na sam izid analize vrsta izolacije DNK ne vpliva.

6. SKLEP

Rezultati metode PCR v realnem času, z uporabo artus® Borrelia LC PCR Kit-a, kažejo, da test ni specifičen samo za borelije lymske borelioze, temveč borelijsko DNK dokaže tudi v vzorcih, ki vsebujejo borelije, ki ne pripadajo skupini *B. burgdorferi* sensu lato. Za natančnejšo opredelitev testne specifičnosti bi bile potrebne še nadaljnje študije s širšim naborom borelijskih vrst.

V primerjavi z metodo klasične PCR in metodama vgnezenih PCR, je test pri analizi rutinskih kliničnih vzorcev podal več pozitivnih rezultatov. Z analizo vzorcev DNK, ki smo jih dobili z redčenjem vzorca DNK, seva *B. garinii*, smo dokazali, da je test napram ostalim metodam PCR občutljivejši za vsaj en velikostni razred.

Ročna in avtomatska izolacija DNK na rezultate bistveno ne vplivata. Zaznati je le povečano čistost izolata DNK, dobljenega z avtomatsko izolacijo.

Največja prednost uporabe artus® Borrelia LC PCR Kit-a je njegova hitrost, saj nam rezultat poda že v roku nekaj ur. Ravno tako je hiter postopek predpriprave vzorca, kar zelo olajša delo v primeru velikega števila vzorcev. Do rezultatov tako pridemo hitreje in z manj truda.

Z uvedbo testa v rutinsko delo bi zmanjšali človeški faktor subjektivne presoje o pozitivnosti/negativnosti nekaterih rezultatov, vendar bi bil za delo hkrati potreben ustrezno izobražen kader (možnost kontaminacije vzorca). Izognili bi se zamudnemu analiziranju DNK po samem PCR pomnoževanju (priprava gela, nanos vzorcev, potek elektroforeze, slikanje gela). Prav tako bi iz rutine odstranili kancerogen faktor etidijev bromid.

Žal je slabost testa njegova nespecifičnost za borelije lymske borelioze in nezmožnost identificiranja borelijske vrste.

7. LITERATURA

1. Zore A, Trilar T, Ružič-Sabljić E, Avšič-Županc T: Okuženost klopov in malih sesalcev z bakterijami *Borrelia burgdorferi* sensu lato v Sloveniji; v Strle F: Lymska borelioza 2006, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center Ljubljana, Društvo za boj proti lymski boreliozi, Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana, 2006: 23-30.
2. Bergström S, Noppa L, Gylfe Å, Östberg Y: Molecular and cellular biology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato; v Gray J, Kahl O, Lane R S, Stanek G: Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control, CAB International, Washington DC, 2002: 47-90.
3. Kaye B: Fig. 4.1. The geographical distributions of the primary vectors of Lyme borreliosis spirochaetes; v Gray J, Kahl O, Lane R S, Stanek G: Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control, CAB International, Washington, 2002: 95.
4. Ružič-Sabljić E: Borelije; v Gubina M, Ihan A: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Medicinski razgledi, Ljubljana, 2002: 293-302.
5. Zakon o nalezljivih boleznih – ZNB (uradno prečiščeno besedilo) (ZNB-UPB1), 2006, Ur.l. RS, št. 33/2006: 3488-3497.
6. Sočan M: Epidemiološke značilnosti prijavljenih primerov lymske borelioze v Sloveniji; v Strle F: Lymska borelioza 2006, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center Ljubljana, Društvo za boj proti lymski boreliozi, Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana, 2006: 31-39.
7. Stanek G, Strle F: Lyme borreliosis. The Lancet 2003; 362(9396): 1639-1647.
8. Ružič-Sabljić E: Značilnosti bakterij, ki povzročajo lymsko boreliozo pri ljudeh; v Strle F: Lymska borelioza 2006, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center Ljubljana, Društvo za boj proti lymski boreliozi, Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana, 2006: 15-21.
9. Steere A: Lyme disease. N Engl J Med 2001; 345: 115-125.

10. Gutiérrez Fernández J: Antigenic and genetic structure of *Borrelia burgdorferi*. *Microbios*, 1997; 91(368-369): 165-174.
11. Barbour A G, Hayes S F: Biology of *Borrelia* species. *Microbiological Reviews*, 1986; 50(4): 381-400.
12. Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U: Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2007; 49(1): 13-21.
13. <http://spirochetesunwound.blogspot.com/2009/02/viewing-arrangement-of-borrelia.html>
14. Agüero-Rosenfeld M E: Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clinical Microbiology Reviews* 2005; 18(3): 484-509.
15. Hytönen J: Borreliosis: recent research, diagnosis and management. *Scandinavian Journal Of Rheumatology* 2008; 37(3): 161-172.
16. Schwan T G, Burgdorfer W, Rosa P A: *Borrelia*; v Murray P R: *Manual of clinical microbiology*, 7th edition, American Society for Microbiology, Washington, 1999: 746-758.
17. Kosik-Bogacka D I: Ticks and mosquitoes as vectors of *Borrelia burgdorferi* s. l. in the forested areas of Szczecin. *Folia Biologica* 2007; 55(3-4): 143-146.
18. <http://www.yaleclimatemediaforum.org/2008/11/30-year-lyme-disease-war/>
19. Preac-Muršič V: Lymska borelioza. *Proteus* 2000; 62(8): 344-349.
20. Strle F: Klinična slika lymske borelioze - Uvod; v Strle F: *Lymska borelioza 2006*, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center Ljubljana, Društvo za boj proti lymski boreliozi, Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana, 2006: 47-49.
21. Medvešček-Radšel A: Lymska borelioza; v Marolt-Gomišček M, Medvešček-radšel A: *Infekcijske bolezni 1*, Založba Tangram, Ljubljana, 2002: 225-234.

22. Strle F: Patogeneza lymške borelioze; v Strle F: Lymška borelioza 2006, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center Ljubljana, Društvo za boj proti lymški boreliozi, Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana, 2006: 39-43.
23. Logar M: Prizadetost kože; v Strle F: Lymška borelioza 2006, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center Ljubljana, Društvo za boj proti lymški boreliozi, Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana, 2006: 51-59.
24. Cimperman J: Prizadetost živčevja – lymška nevroborelioza; v Strle F: Lymška borelioza 2006, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center Ljubljana, Društvo za boj proti lymški boreliozi, Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana, 2006: 73-78.
25. Lotrič-Furlan S: Prizadetost sklepov in mišic pri lymški boreliozi; v Strle F: Lymška borelioza 2006, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center Ljubljana, Društvo za boj proti lymški boreliozi, Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana, 2006: 87-94.
26. Maraspin Čarman V: Prizadetost drugih organskih sistemov pri lymški boreliozi; v Strle F: Lymška borelioza 2006, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center Ljubljana, Društvo za boj proti lymški boreliozi, Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana, 2006: 87-94.
27. Ružič-Sabljić E: Mikrobiološka diagnostika borelijskih okužb; v Strle F: Lymška borelioza 2006, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center Ljubljana, Društvo za boj proti lymški boreliozi, Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana, 2006: 139-145.
28. Schmidt B: PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. *Clinical Microbiology reviews* 1997; 10(1): 185-201.
29. Ferdin J: Evaluation of real-time PCR targeting *hbb* gene for *Borrelia* species identification. *Journal Of Microbiological Methods* 2010; 82(2): 115-119-
30. Dale J W, von Shantz M: From genes to genomes: Concepts and applications of DNA technology, 2nd edition, John Wiley & Sons, West Sussex, 2008: 135-157.

31. Arko B: Tehnologija PCR v realnem času in možnosti uporabe v laboratorijski diagnostiki in farmaciji. *Farmaceutski vestnik* 2004; 55: 215-220.
32. Zipper H: Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* 2004; 32(12): e103.
33. Barbour A G, Garon C F: Linear plasmids of the bacterium *Borrelia burgdorferi* have covalently closed ends. *Science (New York)* 1987; 237(4813): 409-411.
34. Nocton J J: Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by polymerase chain reaction in synovial fluid from patients with lyme arthritis. *New England Journal of Medicine* 1994; 330(4): 229-234.
35. Strle F: Pristopi k zdravljenju lymške borelioze z antibiotiki; v Strle F: *Lymška borelioza 2006*, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Klinični center Ljubljana, Društvo za boj proti lymški boreliozi, Združenje za infektologijo SZD, Ljubljana, 2006: 163-173.
36. Girschink H J, Morbach H, Tappe D: Treatment of lyme borreliosis. *Arthritis Research & Therapy* 2009; 11(6): 258-268.
37. <http://www.cdc.gov/lyme/prev/index.html>
38. Hercogova J, Vanousova D: Syphilis and borreliosis during pregnancy. *Dermatologic Therapy* 2008; 21(3): 205-209.
39. Postic D: Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of *rrf* (5S)-*rrl* (23S) intergenic spacer amplicons. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1994; 44(4): 743-752.
40. Wang G: Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews* 1999; 12(4): 633-653.

41. Guy E C, Stanek G: Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with lyme disease by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Pathology* 199; 44: 610-611.
42. Pahl A: Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* by real-time PCR. *Journal Of Clinical Microbiology* 1999; 37(6): 1958-1963.
43. Margos G: A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(16): 5410-5416.
44. Marti Ras N: Phylogenesis of relapsing fever *Borrelia spp.*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1996; 46(4): 859-865.