

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tanja SKOK

**DOLOČANJE BORELIJ LAJMSKE BORELIOZE V KLOPIH Z  
DOKAZOM GENA ZA BELJAKOVINO OspA**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**DETECTION OF LYME DISEASE SPIROCHAETES IN TICKS BY  
AMPLIFICATION OF OspA GENE**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija. Opravljeno je bilo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani v Laboratoriju za diagnostiko boreloz in leptospiroze.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je na seji dne 1. julija 2005 odobrila temo diplomske naloge in za mentorico imenovala doc. dr. Eva Ružić - Sabljić, za somentorico dr. Anamarijo Zore, za recenzentko prof. dr. Jožico Marin.

Mentorica : doc. dr. Eva Ružić - Sabljić

Somentorica: dr. Anamarija Zore

Recenzentka: prof. dr. Jožica Marin

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur Bertok  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Eva Ružić - Sabljić  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

Članica: dr. Anamarija Zore  
Univerza v Ljubljani, Visoka šola za zdravstvo

Članica: prof. dr. Jožica Marin  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tanja SKOK

### **KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)**

- ŠD Dn
- DK UDK 579.25:595.4:616.993(043)=863
- KG bakterije / *Borrelia Burgdorferi* sensu lato / lajmska borelioza / klopi / *Ixodes ricinus* / nested PCR /gen za OspA
- AV SKOK, Tanja
- SA RUŽIĆ - SABLJIĆ, Eva (mentorica) / ZORE, Anamarija (somentorica) / MARIN, Jožica (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2006
- IN DOLOČANJE BORELIJ LAJMSKE BORELIOZE V KLOPIH Z DOKAZOM GENA ZA BELJAKOVINO OspA
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 61 str., 11 pregl., 6 sl., 121 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Lajmska borelioza je široko razširjena zoonoza, ki jo povzročajo borelije iz kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Borelije prenašajo ščitasti klopi rodu *Ixodes*. Bolezen je v Sloveniji endemična, najpogosteša vrsta klopa v Sloveniji je *I. ricinus*. Namen naloge je bil določiti delež okuženih nenapitih kloporodov *I. ricinus* z *B. burgdorferi* sensu lato. Spomladti leta 2000 smo na treh območji v Sloveniji (Dvorska vas, Kras, Mežakla) z metodo zastave na podrasti nabrali 250 kloporodov v razvojni stopnji nimfe. Klope smo homogenizirali in DNK izolirali s kompletom reagentov QIAamp po navodilih proizvajalca. Uspešnost izolacije DNK smo preverili z začetnimi oligonukleotidi za 16S rRNA (rDNK) za klopnega DNK. *B. burgdorferi* sensu lato v klopih smo dokazovali z nested PCR in z začetnimi oligonukleotidi za pomnoževanje gena za zunanjou površinsko beljakovino OspA. Produkte reakcije smo analizirali z elektroforezo v agaroznem gelu. Izmed vseh kloporodov je bilo v povprečju okuženih 14,8 % nimf. Med tremi območji nismo opazili razlik v prevalenci (Dvorska vas 15,5 %, Kras 9,4 %, Mežakla 24,1 %). Študija kaže, da so klopi v Sloveniji precej okuženi z *B. burgdorferi* sensu lato. Menimo, da je gen za OspA primerni tarčni odsek DNK za dokazovanje borelij v klopih z metodo nested PCR. Dodatne študije bodo pokazale, ali rezultati, ki smo jih dobili, res kažejo dejanski delež okuženih kloporodov z *B. burgdorferi* sensu lato.

### KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dn  
DC UDK 579.25:595.4:616.993(043)=863  
CX bacteria / *Borrelia burgdorferi* sensu lato / Lyme boreliosis / ticks / *Ixodes ricinus* / nested PCR / OspA gene  
AU SKOK, Tanja  
AA RUŽIĆ - SABLJIĆ, Eva (supervisor) / ZORE, Anamarija (co-advisor) / MARIN, Jožica (reviewer)  
PB SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PP University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology  
PY 2006  
TI DETECTION OF LYME DISEASE SPIROCHAETES IN TICKS BY AMPLIFICATION OF OspA GENE  
DT Graduation thesis (University studies)  
NO X, 61 p., 11 tab., 6 fig., 121 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Lyme borreliosis is widespread zoonosis caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex. The main vectors of borreliae are ticks of the genus *Ixodes*. In Slovenia Lyme borreliosis is endemic and the most abundant tick species is *I. ricinus*. The aim of this study was to evaluate the natural infection rate of unfed ticks *I. ricinus* with *B. burgdorferi* sensu lato. In spring 2000 we collected 250 ticks in nymphal stage from vegetation by flagging at three different locations in Slovenia (Dvorska vas, Kras, Mežakla). Ticks were homogenized, DNA extraction was performed with QIAamp set of reagents according to the instructions of the manufacturer. DNA extraction was confirmed by using tick's mitochondrial 16S rRNA (rDNA) primers. *B. burgdorferi* sensu lato in ticks was demonstrated with nested PCR using primers for amplification gene of outer surface protein A (OspA). PCR products were separated on agarose gel. An average of 14,8 % of the nymphs tested positive for *B. burgdorferi* sensu lato. No difference in prevalence was observed between three locations (Dvorska vas 15,5 %, Kras 9,4 %, Mežakla 24,1 %). This study shows that a great deal of tick population in Slovenia is infected with *B. burgdorferi* sensu lato. We think that gene coding OspA protein is suitable for detecting borreliae in ticks with nested PCR metod. Some additional studies will show, if the results obtained by OspA primers indeed reflect real infection rates of *B. burgdorferi* sensu lato in ticks.

## KAZALO VSEBINE

<b>Ključna dokumentacijska informacija .....</b>	<b>III</b>
<b>Key words documentation .....</b>	<b>IV</b>
<b>Kazalo vsebine .....</b>	<b>V</b>
<b>Kazalo preglednic .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Kazalo slik .....</b>	<b>IX</b>
<b>Okrajšave in simboli.....</b>	<b>X</b>

<b>1</b>	<b>UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1	TAKSONOMIJA BORELIJ.....	2
2.2	BIOLOGIJA BAKTERIJE <i>B. BURGDORFERI</i> SENSU LATO .....	4
2.2.1	Strukturne in fiziološke značilnosti .....	4
2.2.2	Genom.....	6
2.2.2.1	Kromosom .....	7
2.2.2.2	Plazmidi .....	8
2.2.3	Zunanji površinski proteini .....	9
2.3	KLOPI .....	12
2.3.1	Taksonomija klopor .....	12
2.3.2	Življenski prostor klopor .....	12
2.3.3	Življenski cikel klopor .....	13
2.3.4	Sezonska pojavnost klopor .....	15
2.3.5	Klopi kot prenašalci povzročiteljev bolezni .....	15
2.4	LAJMSKA BORELIOZA .....	18
2.4.1	Patogeneza in klinična slika borelioze .....	18
2.4.2	Imunski odziv gostitelja .....	20
2.4.3	Laboratorijska diagnostika lajmske borelioze .....	21
2.4.4	Zdravljenje lajmske borelioze .....	21
2.4.5	Preprečevanje lajmske borelioze.....	21
2.4.6	Epidemiologija lajmske borelioze .....	22

2.5	DOKAZOVANJE BORELIJ V KLOPIH .....	23
2.5.1	<b>Osamitev borelij v kulturi</b> .....	23
2.5.2	<b>Mikroskopiranje</b> .....	24
2.5.3	<b>Posredni imunofluorescenčni test</b> .....	24
2.5.4	<b>Verižna reakcija s polimerazo (PCR)</b> .....	24
2.5.4.1	Nested PCR .....	26
2.5.4.2	Izbira začetnih oligonukleotidov .....	27
2.5.4.3	Analiza produktov PCR.....	28
2.6	CILJI RAZISKOVANJA .....	29
2.7	DELOVNE HIPOTEZE .....	29
3	<b>MATERIALI IN METODE</b> .....	30
3.1	MATERIALI .....	30
3.1.1	<b>Kulture bakterij <i>B. burgdorferi</i> sensu lato</b> .....	30
3.1.2	<b>Klopi</b> .....	30
3.2	METODE .....	30
3.2.1	<b>Identifikacija klopor</b> .....	30
3.2.2	<b>Izolacija DNK iz klopor</b> .....	31
3.2.3	<b>Verižna reakcija s polimerazo (PCR)</b> .....	31
3.2.3.1	Izbira začetnih oligonukleotidov .....	32
3.2.3.2	Priprava mešanice reagentov za PCR.....	32
3.2.3.3	Kontrola kontaminacije .....	33
3.2.3.4	Pomnoževanje.....	34
3.2.3.5	Analiza produktov PCR.....	35
3.2.4	<b>Statistične metode</b> .....	35
4	<b>REZULTATI</b> .....	36
4.1	KLOPI .....	36
4.1.1	<b>Dokazovanje mitohondrijske DNK za 16S rRNK klopa</b> .....	36
4.1.2	<b>Dokazovanje <i>B. burgdorferi</i> sensu lato v klopih z začetnimi oligonukleotidi za zunanjou površinsko beljakovino OspA</b> .....	37

<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI .....</b>	39
5.1	RAZPRAVA .....	39
5.2	SKLEPI .....	48
<b>6</b>	<b>POVZETEK .....</b>	49
<b>7</b>	<b>VIRI.....</b>	50

### **ZAHVALA**

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b>	Borelijske vrste povezane z lajmsko boreliozo, njihovi vektorji in gostitelji ter geografska porazdeljenost (Wang in sod., 1999; Aguero - Rosenfeld in sod., 2005)	<b>3</b>
<b>Preglednica 2:</b>	Bolezenski znaki zgodnje in pozne oblike lajmske borelioze (Strle 2000: 54; Ružić - Sabljić, 2002: 298; Stanek in Strle, 2003)	<b>20</b>
<b>Preglednica 3:</b>	Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov (v smeri 5' → 3'), mesta vezav na genu in velikost produktov reakcije PCR	<b>32</b>
<b>Preglednica 4:</b>	Priprava PCR mešanice za eno reakcijo PCR za dokaz klopne DNK s končnim volumnom 50 µl	<b>33</b>
<b>Preglednica 5:</b>	Priprava PCR mešanice za eno reakcijo PCR za dokaz gena OspA s končnim volumnom 50 µl	<b>33</b>
<b>Preglednica 6:</b>	Pogoji pomnoževanja za izbrane začetne oligonukleotide	<b>34</b>
<b>Preglednica 7:</b>	Pregled klopor po posameznih področjih	<b>36</b>
<b>Preglednica 8:</b>	Pogostnost z borelijami okuženih klopor z nested PCR začetnimi oligonukleotidi za pomnoževanje gena za OspA	<b>38</b>
<b>Preglednica 9:</b>	Različne študije o pogostnosti okuženih klopor <i>Ixodes ricinus</i> z bakterijo <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato v Sloveniji	<b>43</b>
<b>Preglednica 10:</b>	Okuženost klopor vrste <i>Ixodes ricinus</i> z bakterijo <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato v nekaterih evropskih državah	<b>45</b>
<b>Preglednica 11:</b>	Okuženost drugih vrst klopor rodu <i>Ixodes</i> z bakterijo <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	<b>46</b>

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Bakterije <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato v temnem polju (Ružić-Sabljić, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani)	5
<b>Slika 2:</b> <i>Ixodes ricinus</i> : na levi strani larva in odrasla samička, na desni strani nimfa in odrasli samček. En kvadrat = 1 mm <sup>2</sup> . (Humair in Gern, 2000)	14
<b>Slika 3:</b> Geografska porazdelitev najpomembnejših prenašalcev lajmske borelioze (Eisen in Lane, 2002)	16
<b>Slika 4:</b> Dva načina izvedbe reakcije nested PCR (Persing, 1993a)	27
<b>Slika 5:</b> Dokaz mitohondrijske DNK za 16S rRNK pri enajstih klopih	37
<b>Slika 6:</b> Dokaz gena za OspA pri desetih klopih	38

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<b>bp</b>	bazni par
<b>DNK</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b>G + C</b>	gvanin in citozin
<b>IFT</b>	imunofluorescenčni test
<b>kb</b>	kilobaza
<b>kDa</b>	kiloDalton
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	magnezijev diklorid
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo (ang. - polymerase chain reaction)
<b>RNK</b>	ribonukleinska kislina

<b>TAE</b>	<b>pufer: tris, ocetna kislina, EDTA</b>
<b>U</b>	<b>encimska enota (ang. Unit); količina encima, ki oksidira (reducira) 1 µmol substrata v 1 minutu</b>
<b>UV</b>	<b>ultravijoličen</b>

## 1 UVOD

Lajmsko boreliozo povzročajo bakterije iz skupine *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Bakterija *B. burgdorferi* sensu lato je bila prvič odkrita leta 1982 iz klopa *Ixodes dammini* (zdaj *I. scapularis*). Izoliral in opisal jo je biolog William Burgdorfer s sodelavci (1982).

Vrste rodu *Borrelia* so spiralne bakterije in jih uvrščamo v družino Spirochaetaceae (Berkeley, 1984).

Analize različnih izolatov so pokazale, da ne gre za eno samo vrsto borelije, ampak za več vrst. Tako skupek različnih vrst, ki povzročajo lajmsko boreliozo imenujemo *B. burgdorferi* sensu lato (sensu lato - iz lat. v širšem smislu). Po svetu so opisali 11 vrst borelij v kompleksu *B. burgdorferi* sensu lato (Kurtenbach in sod., 2002). V njem so vključene tudi za človeka patogene vrste: *B. burgdorferi* sensu stricto (sensu stricto - iz lat. v ozkem smislu), *B. garinii* in *B. afzelii* (Burgdorfer, 1995 in 1996).

Lajmska borelioza je široko razširjena zoonoza. Sesalci, še posebej glodavci, dvoživke, plazilci in ptiči so naravni rezervoar *B. burgdorferi* sensu lato, človek je le naključni

gostitelj (Burgdorfer in sod., 1982; Black in Piesman, 1994; Strle in sod., 1995a). Bolezen je razširjena predvsem na severni polobli, najpogosteje tam, kjer se pojavljajo klopi (Burgdorfer, 1996).

Kot glavni in najpomembnejši prenašalci lajmske borelioze so bili identificirani klopi rodu *Ixodes* (Strle in sod., 1995a; Nadelman in Wormser, 1998), med katerimi so najpomembnejši *I. ricinus*, *I. persulcatus*, *I. scapularis* in *I. pacificus* (Burgdorfer, 1996).

V Sloveniji je lajmska borelioza endemična. Od leta 1986 je to v Sloveniji tudi najpogostejša bolezen, ki jo prenašajo klopi. Do danes je število bolnikov letno naraščalo. Opažena sprememba v epidemiologiji lajmske borelioze je verjetno povezana z večjo frekvenco okuženosti populacije kloporodov z *B. burgdorferi* sensu lato (Strle in sod., 1995a in 1995b).

V Sloveniji je največ kloporodov vrste *I. ricinus* (Tovornik, 1970), katerih okuženost je po območjih zelo različna, v povprečju pa znaša 41 % (Zore in sod., 2000).

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 TAKSONOMIJA BORELIJ

Spirohete so ena izmed redkih večjih bakterijskih skupin, katerih naravna filogenetska sorodnost je očitna na stopnji celotnih fenotipskih značilnosti (Paster in sod., 1991). Na podlagi teh značilnosti so uvrstili rod *Borrelia* v družino Spirochaetaceae (Wang in sod., 1999), kamor spadajo še rodovi *Spirochaeta*, *Cristispira*, *Treponema* in *Brachyspira* (Berkeley, 1984; Paster in sod., 1991; Wang in sod., 1999).

V preteklosti so vrste znotraj rodu *Borrelia* ločevali glede na njihove prenašalce (Barbour in Hayes, 1986). Šele z novejšimi metodami molekularne biologije (restriktivna analiza celokupne DNK, sekveniranje odseka DNK, homologija DNK, restriktivni vzorci rRNA genov, serotipizacija, itd.) so lahko naredili natančnejšo analizo borelijskih vrst in njihovo porazdelitev (Burgdorfer, 1996; Picken R. N. in sod., 1996a; Wang in sod., 1999; Olsen in sod., 2000).

Povzročiteljico lajmske borelioze je leta 1982 izoliral in opisal William Burgdorfer (Burgdorfer in sod., 1982). Bakterijo so čez dve leti uvrstili v rod *Borrelia* in jo poimenovali po odkritelju *B. burgdorferi* (Johnson in sod., 1984). Najprej so vse izolate poimenovali *B. burgdorferi*, njihove natančnejše analize pa so pokazale, da ne gre za eno samo vrsto *B. burgdorferi*, ampak za več vrst (Wang in sod., 1999).

Danes rod *Borrelia* predstavlja ozko filogenetsko skupino. Več kot 20 vrst je bilo do zdaj identificiranih v tem rodu. Te vrste so ponavadi razdeljene v dve večji skupini. Prva skupina so borelije, ki povzročajo povratno mrzlico; to so *B. caucasica*, *B. crocidurae*, *B. duttonii*, *B. hermsii*, *B. hispanica* in druge. Prenašajo jih mehki klopi rodu *Ornitodoros*. Druga skupina so borelije, ki so povezane z boleznijo lajmske borelioze in jih uvrščamo v kompleks *B. burgdorferi* sensu lato, prenašajo jih klopi rodu *Ixodes*. Razdeljene so na osnovi razlik med njihovimi ekološkimi in genetskimi značilnostmi (Barbour in Hayes, 1986; Olsen in sod., 2000).

Nobene izmed vrst *Borrelia* ne najdemo med prostoživečimi bakterijami (Berkeley, 1984).

Od odkritja borelij lajmske borelioze leta 1982 so do danes opisali 11 različnih vrst borelij v kompleksu *B. burgdorferi* sensu lato (Wang in sod., 1999; Kurtenbach in sod., 2002; Aguero - Rosenfeld in sod., 2005). Kljub temu da razvrščanje borelij ni dokončno, štejemo borelije znotraj tega kompleksa za samostojne vrste (Borko in Ružić - Sabljić, 2001). Preglednica 1 prikazuje borelijske vrste, povezane z lajmsko boreliozo, njihove vektorje in gostitelje ter geografsko porazdeljenost.

Preglednica 1: Borelijske vrste, povezane z lajmsko boreliozo, njihovi vektorji in gostitelji ter geografska porazdeljenost (Wang in sod., 1999; Aguero - Rosenfeld in sod., 2005).

Vrsta	Vektor	Gostitelj	Geografska porazdeljenost
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	<i>I. scapularis</i> <i>I. pacificus</i> <i>I. ricinus</i>	sesalci, ptiči, človek	ZDA Evropa
<i>B. garinii</i>	<i>I. ricinus</i> <i>I. persulcatus</i>	ptiči, mali sesalci, človek	Evropa Azija
<i>B. afzelii</i>	<i>I. ricinus</i> <i>I. persulcatus</i>	mali sesalci, človek	Evropa Azija

<i>B. bissettii</i>	<i>I. pacificus</i> <i>I. neotomae</i> <i>I. scapularis</i>	glodavci, ptiči	ZDA
<i>B. japonica</i>	<i>I. ovatus</i>	mali sesalci	Japonska
<i>B. valaisiana</i>	<i>I. ricinus</i> <i>I. granulatus</i> <i>I. columnae</i>	ptiči	Evropa Azija
<i>B. lusitaniae</i>	<i>I. ricinus</i>	neznan	centralna Evropa
<i>B. andersonii</i>	<i>I. dentatus</i>	zajci	ZDA
<i>B. tanukii</i>	<i>I. tanuki</i>	mali sesalci	Japonska
<i>B. turdi</i>	<i>I. turdus</i>	mali sesalci	Japonska
<i>B. sinica</i>	?	?	Azija

Vse zgoraj naštete borelije niso patogene za človeka. Samo vrste *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* in *B. afzelii* so pogosto izolirane pri bolnikih z lajmsko boreliozo. V Sloveniji so v študiji devetih *B. burgdorferi* sensu lato izolatov pri pacientih z lajmsko boreliozo odkrili, da so ti izolati tesno sorodni severnoameriškemu izolatu 25015, ki pripada *B. bissettii*. Torej je lahko *B. bissettii* četrta vrsta borelij, ki lahko povzroči lajmsko boreliozo pri ljudeh (Picken R. N. in sod., 1996b; Wang in sod., 1999). Za vrsti *B. valaisiana* in *B. lusitaniae* še ni popolnoma znano, ali povzročajo bolezen ali ne (Wang in sod., 1999). Ostalih 5 vrst, ki jih prenašajo klopi rodu *Ixodes*, *B. andersonii*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi* in *B. sinica*, ni patogenih za človeka (Picken R. N. in sod., 1996a; Wang in sod., 1999).

## 2.2 BIOLOGIJA BAKTERIJE *B. BURGDORFERI* SENSU LATO

Borelije so spirohete in kot take imajo nekaj skupnih strurnih lastnosti z drugimi spirohetami (Barbour in Hayes, 1986; Paster in sod., 1991):

- celice so spiralno oblikovane in se lahko gibljejo na tri načine: s svedrastim zvijanjem, z obračanjem ali z upogibanjem na mestu
- imajo protoplazmatski cilinder, ki ga od zunaj prekriva kompleks citoplazmatske membrane in celične stene

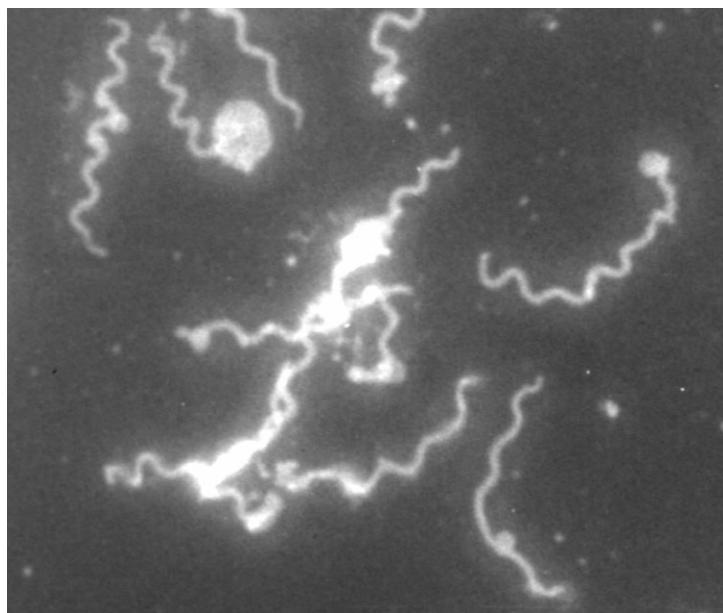
- imajo bičke, imenovane tudi aksialni filament, ki se nahajajo med zunanjim in citoplazemsko membrano oz. v periplazemskem prostoru, po zgradbi pa so enakovredni bičkom vseh ostalih bakterij.

### 2.2.1 Strukturne in fiziološke značilnosti

Borelije so po Gramu negativne bakterije spiralaste oblike. Imajo različno število zavojev (3 do 10) in v dolžino merijo od 3 do 20  $\mu\text{m}$ , v širino pa od 0,2 do 0,5  $\mu\text{m}$  (Berger, 1984; Barbour in Hayes, 1986).

Zunanjo površino bakterij pokriva amorfna sluzasta plast. Ne ve se, ali so to komponente gostitelja ali gojišča ali snovi proizvaja celica sama. Testi pa kažejo, da ta sluzasta plast vsebuje mnogo ogljikovih hidratov (Barbour in Hayes, 1986), kot so ramnoza, fruktoza, riboza, ksiloza, manoza, galaktoza in glukoza (Olsen in sod., 2000). Plast amorfne sluzi enostavno odstranimo s spiranjem s fosfatnim pufrom (Barbour in Hayes, 1986).

Zunanja membrana borelij je zelo fluidna. Je triplastna in podobna ostalim citoplazmatskim membranam. Vsebuje lipopolisaharid, ki ima endotoksinske lastnosti. Poleg tega vsebuje tudi zunanje površinske proteine Osp (Osp - iz ang. Outer surface protein). Takšnih proteinov je 6 - OspA - F (Barbour in Hayes, 1986; Fernandez in sod., 1997). Njihova velikost je različna, kodirani pa so na linearnih in krožnih plazmidih (Fernandez in sod., 1997).



Slika 1: Bakterije *Borrelia burgdorferi* sensu lato v temnem polju (Ružić - Sabljić, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani).

Borelijski bički se nahajajo v periplazemskem prostoru in se po zgradbi ne razlikujejo od bičkov pri drugih evbakterijah. V primerjavi z večino periplazmatskih bičkov spirohet, ki so zgrajeni iz večih polipeptidov, je biček *B. burgdorferi* sensu lato le iz enega tipa podenote – 41 kDa velikega proteina Fla (Olsen in sod., 2000). Bički izraščajo iz obeh nasprotnih koncev celice. Raztezajo se vzdolž celice in se na sredini prekrivajo (Barbour in Hayes, 1986). Bički, oviti okoli celice, omogočajo svedrasto gibanje v zelo viskoznem okolju, kjer se druge bakterije ne morejo premikati (Fraser in sod., 1997). Število bičkov po Barbouru in Hayesu (1986) ter Sreereu (1989) variira od 7 do 11.

Borelije so mikroaerofilne in kemoorganotrofne bakterije. Njihove prehranjevalne zahteve za *in vitro* rast so kompleksne (Berger, 1984; Steere, 1989). Gojimo jih lahko v modificiranem osnovnem Kellyjevem gojišču - Barbour-Stoenner-Kellyjevo gojišče (Steere, 1989), ki mu dodamo zajčji serum, serumski albumin in želatino (Preac - Mursic in sod., 1986). V gojišču je pomembna prisotnost N-acetilglukozamina, ki je glavni gradnik peptidoglikana in ga borelije vključujejo v svoje celične stene. Hkrati je N-acetilglukozamin tudi primarna komponenta hitina v eksoskeletu klopa (Barbour in Hayes, 1986; Fraser in sod., 1997). To verjetno omogoča tudi preživetje borelije v klopu (Fraser in sod., 1997). *B. burgdorferi* sensu lato lahko gojimo tudi na trdnem gojišču z agarozo, ki

strdi tekoče gojišče. Prednost tega gojišča je, da se lahko identificirajo posamezne kolonije borelijskih sevov (Aguero - Rosenfeld in sod., 2005).

Borelije v *in vitro* pogojih najbolje rastejo pri temperaturah od 30 °C do 37 °C (Barbour, 1984; Preac-Mursic in sod., 1986; Steere, 1989). Pri 39 °C se rast upočasni in pojavijo se filamentozne oblike. Pri temperaturah nad 40 °C se rast sploh ne pojavi in kot izgleda se borelije niso sposobne razmnoževati niti ko se znižamo temperaturo (Barbour, 1984). Generacijski čas borelij iz kompleksa *B. burgdorferi* sensu lato je od 6 do 12 ur (Barbour in Hayes, 1986) ali tudi od 7 do 20 ur (Preac - Mursic in sod., 1986), po Steereu (1989) pa celo od 12 do 24 ur. Generacijski čas je odvisen od prilagoditve borelij na umetno gojišče (Preac - Mursic in sod., 1986). Gostota celic, ki jo dosežejo borelije v umetnem gojišču, je do  $10^8$ /ml, kulturo pa lahko vzgojimo že iz ene same celice (Barbour in Hayes, 1986).

V neugodnih prehranskih razmerah lahko celice preidejo v mirujočo obliko. Prenehajo se gibati in tvorijo ciste (Preac - Mursic in sod., 1996; Alban in sod., 2000). Takšne ciste bi lahko bile tudi sferoplasti (celice brez celične stene), ki zaradi odsotnosti celične stene in metabolne neaktivnosti ne reagirajo na delovanje antibiotikov in tako povzročijo bolj zapleten potek lajmske borelioze (Preac - Mursic in sod., 1996; Bronson Ø in Bronson S. H., 1997 in 1998; Gruntar, 2000). Norveški znanstvenik Bronson pa je leta 1997 dokazal, da ciste so metabolično aktivne in se v *in vitro* pogojih lahko ponovno razvijejo v običajne, gibljive borelije (Bronson Ø in Bronson S. H., 1997 in 1998; Gruntar, 2000).

## 2.2.2 Genom

Borelijski genom se precej razlikuje od prokariotskih genomov in je precej nenavaden. Sestavlja ga linearni kromosom in različno število krožnih in linearnih plazmidov (Saint Girons in sod., 1992; Fraser in sod., 1997; Casjens in sod., 2000).

*B. burgdorferi* sensu lato je prva spiroheta, katere genom je bil v celoti sekveniran (Fraser in sod., 1997). Velikost genoma tipske vrste *B. burgdorferi* sensu stricto sev B31 je 1,512.419 bp. Ta genom sestoji iz linearnega kromosoma (910.725 bp) z 28,6 % G + C vsebnostjo, in iz 21 plazmidov (9 krožnih in 12 linearnih), ki so skupaj veliki 610.694 bp. Nimajo pa vsi sevi *B. burgdorferi* sensu stricto celotnega kompleta plazmidov, zato velikost genoma posameznih izolatov variira (Fraser in sod., 1997; Casjens in sod., 2000).

Genomska analiza vrste *B. burgdorferi* sensu lato je pokazala nekatere genetske strukture, ki so za prokarionte nenavadne. To vključuje (Fraser in sod., 1997; Casjens in sod., 2000):

- linearni kromosom ter linearne in krožne plazmide v eni bakteriji;
- edinstveno organizacijo rRNK genske skupine iz enega 16S rRNK gena in tandemsko ponovljenih 23S in 5S rRNK genov;
- preko 150 lipoprotein-kodirajočih genov, ki zavzamejo 4,9 % kromosomskih genov in 14,5 % plazmidnih genov;
- precejšnjo frakcionacijo plazmidne DNK;
- dokaz o številnih preureeditvah med plazmidnimi geni in
- odsotnost genov, ki kodirajo encime za sintezo aminokislin, maščobnih kislin, encimskih kofaktorjev in nukleotidov. *B. burgdorferi* sensu lato tudi nima genov za encime trikarboksilnega kislinskega cikla ali za snovi vključene v elektronski transport - najdbe, ki kažejo na parazitsko naravo tega mikroorganizma.

Večina genoma sestoji iz linearne DNK s kovalentno zaprtimi konci ali telomerami. *B. burgdorferi* sensu lato je razvila visoko učinkovite encime, ki podvajajo takšne telomerne DNK strukture. Nedavno je bila odkrita nova telomerna resolvaza, ki izvaja visoko učinkovito, a kompleksno dvostopenjsko transesterifikacijo DNK med podvajanjem in omogoči nastanek kovalentno zaprtih telomer (Kobryn in Chaconas, 2002; Pal in Fikrig, 2003).

#### 2.2.2.1 Kromosom

Borelije so ene redkih bakterij in edine med spirohetami, ki imajo linearni kromosom. Velik je med 935 in 958 kb. Kromosom *B. burgdorferi* sensu stricto sev B31 vsebuje 853 genov, ki kodirajo osnovno garnituro znanih evbakterijskih proteinov, ki vodijo celični

cikel, rast in metabolizem. Kot že rečeno, pa manjkajo geni, odgovorni za celične biosintetske reakcije (Fraser in sod., 1997).

Primerjalne analize nedavno sekvenirane vrste *B. garinii* sev PBi z *B. burgdorferi* sensu stricto sev B31 kažejo, da je večina borelijskega kromosoma konzervirana - 92,7 % identičnost obeh nukleinskih kislin (Aguero - Rosenfeld in sod., 2005).

Vsebnost G + C je med 27 in 32 % (Barbour in Hayes, 1986; Baril in sod., 1989; Saint Girons in sod., 1992).

Vrste v enem rodu se po vsebnosti G + C med seboj naj ne bi razlikovale za več kot 10 %. Če se razlikujejo za več kot 15 %, je to ponavadi znak filogenetske heterogenosti. Kljub temu se samo vsebnosti G + C ne more smatrati kot mero za filogenetsko oddaljenost (Olsen in sod., 2000).

#### 2.2.2.2 Plazmidi

Plazmidi predstavljajo precejšen del borelijskega genoma. Edinstvenost pri borelijah so ekstrakromosomalni deli DNK, ki so linearni. Linearne plazmide so našli tudi pri kvasovkah in pri eni vrsti *Streptomyces* (Barbour in Hayes, 1986). Poleg linearnih imajo borelije tudi krožne plazmide. Število obojih se razlikuje od seva do seva (Baril in sod., 1989; Saint Girons in sod., 1992; Casjens in sod., 2000).

Plazmidi *B. burgdorferi* sensu stricto sev B31 kodirajo 535 genov in 90 % teh genov nima nobene prepričljive podobnosti z geni izven rodu *Borrelia*. To nakazuje, da imajo specializirane funkcije, verjetno povezane s prilagajanjem spirohet. Eksperimenti so pokazali, da se lahko v *in vitro* pogojih nekateri plazmidi tudi izgubijo, zaradi česar se izgubi tudi infektivnost borelij (Barbour in Hayes, 1986; Schwan in sod., 1988; Xu in sod., 1996; Casjens in sod., 2000; Pal in Fikrig, 2003). Xu in sodelavci (1996) pa so ugotovili, da izguba enega izmed linearnih plazmidov, ki je drugače prisoten pri *B. burgdorferi* sensu stricto sev B31, celo poveča razširitev borelij po organizmu.

V borelijah prisotni plazmidi kodirajo zunanje površinske beljakovine Osp (Xu in sod., 1995).

Lipoproteina OspA in OspB sta kodirana na 49 kb velikem linearinem plazmidu (Fernandez in sod., 1997). OspC je kodiran na krožnem plazmidu velikem od 26 do 27 kb (Xu in sod., 1995) in je reguliran z represorjem na 16 kb velikem linearinem plazmidu (Marconi in sod., 1993; Fernandez in sod., 1997). Na 38 kb velikem linearinem plazmidu je kodiran zunanji površinski protein OspD (Norris in sod., 1992; Xu in sod., 1995; Fernandez in sod., 1997), na 45 kb velikem krožnem plazmidu pa sta skupaj kodirana OspE in OspF (Lam in sod., 1994; Xu in sod., 1995; Fernandez in sod., 1997).

Glede na plazmidni profil se vrste borelij med seboj razlikujejo. Ali vsebujejo različne plazmide ali pa variira njihova molekulska masa. Ta lastnost je tudi odločilna pri razločevanju vrst (Baril in sod., 1989).

Vsebnost gvanina in citozina je pri plazmidih med 23,1 in 32,3 % (Baril in sod., 1989; Wang in sod., 1999). Pri plazmidih *B. burgdorferi* sensu stricto sev B31 je vsebnost G + C med 20,7 in 31,6 % (Casjens in sod., 2000).

### 2.2.3 Zunanji površinski proteini

Zunanji površinski proteini Osp so povezani s patogenezo borelioze, zato je pomembno poznati natančne imunološke in molekularne lastnosti teh proteinov (Lottman in sod., 1996).

OspA je eden glavnih površinskih lipoproteinov pri *B. burgdorferi* sensu lato in se uporablja za serološko diagnozo in razvoj cepiva (Sadziene in Barbour, 1996; Lottman in sod., 1996; Wang in sod., 1999). Molekularna velikost OspA je od 30,5 do 34 kDa med različnimi vrstami *B. burgdorferi* sensu lato (Fernandez in sod., 1997; Wang in sod., 1999). Evropski in ameriški sevi *B. burgdorferi* sensu stricto imajo 31 kDa velike OspA. OspA proteini v sevih iz *B. garinii* in *B. afzelii* pa imajo molekulska maso od 32 do 33 kDa (Fernandez in sod., 1997). Primerjave odseka DNK za OspA so pokazale, da je zaporedje nukleotidov pri *B. burgdorferi* sensu stricto in *B. afzelii* skoraj identično, pri *B. garinii* pa se to zaporedje vidno razlikuje (Will in sod., 1995).

Wilske in sodelavci so leta 1993 z monoklonskimi protitelesi proti beljakovini OspA določili 7 različnih serotipov OspA. *B. burgdorferi* sensu stricto ustreza tip 1, tip 2 ustreza *B. afzelii*, tipi od 3 do 7 pa *B. garinii* (Wilske in sod., 1993). Kasneje so poročali še o tipu 8, ki tudi ustreza *B. garinii* (Wang in sod., 1999). Borelige, ki nimajo beljakovine OspA, so poimenovali tip 0 (Wilske in sod., 1993).

Serotipi beljakovine OspA so verjetno različno razširjeni med klopniimi in človeškimi izolati in so povezani z različnimi kliničnimi izražanji lajmske borelioze (Wang in sod., 1999). V Evropi so iz kože izolirani sevi pripadali najpogosteje vrsti *B. afzelii*, medtem ko so bili sevi, izolirani iz likvorja, zelo heterogeni (Wilske in sod., 1993; Eiffer in sod., 1995; Will in sod., 1995). Vprašanje je, ali je ta heterogenost sevov iz likvorja odsev heterogenosti klopnih sevov (Eiffer in sod., 1995) ali so morda sevi z določenim OspA tipom (kot npr. tip 4) bolj nagnjeni k povzročanju nevroborelioze kot drugi tipi (Wilske in sod., 1993; Will in sod., 1995).

OspA igra precejšnjo vlogo v invaziji ekstracelularnega matriksa, v procesu adhezije na epitelijске celice v črevesju klopa (Kurtenbach in sod., 2002) in kot stimulirajoči faktor pri tvorbi citokinov (Will in sod., 1995). OspA je tudi receptor za plazminogen. Potem ko bakterija vdre v telo, nase veže plazminogen in se izogne imunsemu odzivu. Ta mehanizem je verjetno pomemben za razsoj bakterij po telesu (Fuchs in sod., 1994).

Podobno kot OspA je tudi OspB lipoprotein vključen v adherenco bakterij. Variabilnost v velikosti OspB je opazno večja pri posameznih ameriških sevih *B. burgdorferi* sensu stricto. *B. burgdorferi* sensu stricto in *B. afzelii* imata 34 in 35 kDa velik OspB lipoprotein. Kot kaže, je OspB redkeje prisoten pri *B. garinii* (Fernandez in sod., 1997).

OspC je prevladujoč seroaktivni antigen v zgodnjih stopnjah okužbe z *B. burgdorferi* sensu lato (Wang in sod., 1999). Velik je približno 22 kDa pri 40 % evropskih sevov *B. afzelii*, podobno pa približno 50 % ameriških sevov izraža analogen protein velik 20 kDa do 25 kDa (Fernandez in sod., 1997; Wang in sod., 1999). Podobno kot pri OspA so z monoklonskimi protitelesi proti OspC določili 16 različnih OspC serotipov pri evropskih in ameriških sevih. V primerjavi z OspA je OspC bolj heterogena beljakovina (Wang in sod., 1999).

OspA in OspB sta dva antigena, ki se bogato izražata na površini spirohete v nenapitih klopih. Ko se klop hrani, večina *B. burgdorferi* sensu lato preneha izražati OspA in OspB s površine in začne izražati OspC (Kurtenbach in sod., 2002). Spremembo v aktivnosti genov povzročijo sprememba temperature, pH, stik z gostiteljskim imunskim sistemom (Fingerle in sod., 2002; Anguita in sod., 2003) in osmotski tlak (Fingerle in sod., 2002). Samo tiste borelije, ki začno izražati OspC, lahko pobegnejo iz črevesja v žleze slinavke (Kurtenbach in sod., 2002). Fingerle in sodelavci (2002) so tudi ugotovili, da tistih borelij, ki nimajo gena za OspC, ni moč zaznati v žlezah slinavkah. Torej je to pokazatelj, da je OspC pomemben za razširitev borelij (Fingerle in sod., 2002). Vprašanje, kako dolgo lahko borelije ostanejo v žlezah slinavkah, ostaja še odprto (Fingerle in sod., 2002).

Spirohete, ki preidejo v gostitelja, nadaljujejo z izražanjem OspC in ne OspA in OspB. Na splošno sta OspA in OspB antigena specifična za nenapite klope, medtem ko se OspC izraža v klopih, ki se hranijo in v vretenčarskih gostiteljih (de Silva in Fikrig, 1997; Fingerle in sod., 1995 in 1998). Protitelesa proti OspA je možno najti tudi pri človeku. Pogosteje pri pacientih s kronično lajmsko boreliozo, sicer pa so ta protitelesa redkeje zaznavna tudi v pozinem stadiju bolezni (Wilske in sod., 1992).

Poleg teh treh zunanjih površinskih beljakovin, ki so pomembnejši virulenčni faktorji, poznamo še beljakovine OspD, E in F.

Za OspD predvidevajo, da je virulenčni faktor *B. burgdorferi* sensu lato (Fernandez in sod., 1997), vendar za okužbo organizma ni nujen in ne igra najpomembnejše vloge pri infektivnosti borelij, ki povzročajo lajmsko boreliozo (Xu in sod., 1996). Med vsemi zunanjimi površinskimi proteini je antigensko najbolj variabilen (Fernandez in sod., 1997). Njegova molekulska masa je približno 30 kDa. Gen z OspD ni bil najden v spirohetah, izoliranih iz bolnikov z lajmsko boreliozo, vendar se je pojavil v 90 % pri *B. garinii* in v 24 % pri *B. burgdorferi* sensu stricto (Fernandez in sod., 1997).

OspE in OspF nadzoruje skupni promotor. OspE je velik 19 kDa, OspF pa 26 kDa (Lam in sod., 1994).

## 2.3 KLOPI

Klopi so pajkovci, ki sesajo kri. So značilni ektoparaziti živali in tudi človeka (Black in Piesman, 1994; Logar, 1999; Eisen in Lane, 2002). Razširjeni so po vsem svetu. Različne vrste klopor so med členonožci najpogosteji prenašalci patogenih virusov, praživali in bakterij. Med slednjimi prenašajo tudi borelike (Logar, 1999).

### **2.3.1 Taksonomija klopor**

Klopi so razvrščeni v podred Ixodida v redu Parasitiformes, ki je eden izmed dveh redov pršic (Acari). Skupina je relativno majhna. V njej je okoli 850 vrst, razdeljenih v tri družine. Večji sta Argasidae (mehki ali usnjati klopi) in Ixodidae (trdi ali ščitasti klopi), v tretji družini Nuttalliellidae pa je ena sama vrsta, ki ima lastnosti obeh zgornjih družin (Black in Piesman, 1994).

Družina Ixodidae se deli na Prostriata in Metastriata.

Prostriata (poddružina Ixodinae) vključuje 240 vrst v enem samem rodu *Ixodes*.

Metastriata je razdeljena v štiri poddružine: Amblyomminae, Haemaphysalinae, Hyalomminae in Rhipicephalinae (Black in Piesman, 1994).

Družina Argasidae vsebuje okoli 170 vrst, razdeljenih v dve poddružini - Argasinae in Ornithodorinae (Black in Piesman, 1994).

### **2.3.2 Življenjski prostor klopor**

Življenjski prostor mora klopu zagotoviti dve osnovni zahtevi za preživetje. To sta vedno dovolj visoka vlaga, da lahko klop hranja vodno ravnotežje, in mešanica živalskih vrst, ki služi kot gostitelj vsem trem razvojnim oblikam klopa - larvi, nimfi in odraslemu klopu (Daniel in sod., 1998; Eisen in Lane, 2002).

Klopi so občutljivi na izsušitev med iskanjem gostitelja in na izpostavljenih območjih lahko dovolj visoka vlaga traja le nekaj tednov. Izsušitev negativno vpliva na klope med njihovo preobrazbo iz ene razvojne stopnje v drugo, saj so takrat blizu površine tal. Relativna vlaga njihovega klimata tako ne sme pasti pod 80 % (Burgdorfer, 1995; Daniel

in sod., 1998). Klopi zato preživijo le na območjih z gosto vegetacijo, kjer vlaga tudi poleti ne pade pod 80 % (Daniel in sod., 1998).

Življenjski prostor mora imeti dovolj različne gostitelje za parazitske stopnje klopov. Odrasli klopi lezejo v višjo vegetacijo in se uspešno hranijo le na večjih živalih, kot so srnjad, ovce, krave in psi. Neodrasle stopnje se lahko hranijo na skoraj vseh živalih, majhnih in velikih, vendar so nimfe manj uspešne na manjših živalih kot larve. Za vse tri življenjske oblike pa je znano, da so lahko paraziti človeka (Burgdorfer, 1995; Logar, 1999).

Ti pogoji pomenijo, da se klop najpogosteje nahaja v listnatih gozdovih (Burgdorfer, 1995). So pa tudi v iglastih gozdovih, dokler je tam dovolj vegetacije pri tleh in je mikroklimat vlažen. V odprtih habitatih, kot so travniki, so glavni krvni obrok za vse razvojne stopnje ovce in krave (Daniel in sod., 1998).

*I. ricinus* živi na širokem območju Evrope. Od 10° zahodne zemljepisne dolžine (Irska) do 45° vzhodne zemljepisne dolžine (gorovje Ural, Rusija). Na severu se nahaja do 60° severne zemljepisne širine (Švedska) na jugu pa do 30° severne zemljepisne širine (Egipt) (Stanek in sod., 1986; Daniel in sod., 1998; Randolph in sod., 2002). Preživetje mu omogočajo temperature od –10 do 35 °C. Od zunanjega temperature je odvisna tudi njegova aktivnost, zato pri temperaturi pod 5 °C miruje (Stanek in sod., 1986).

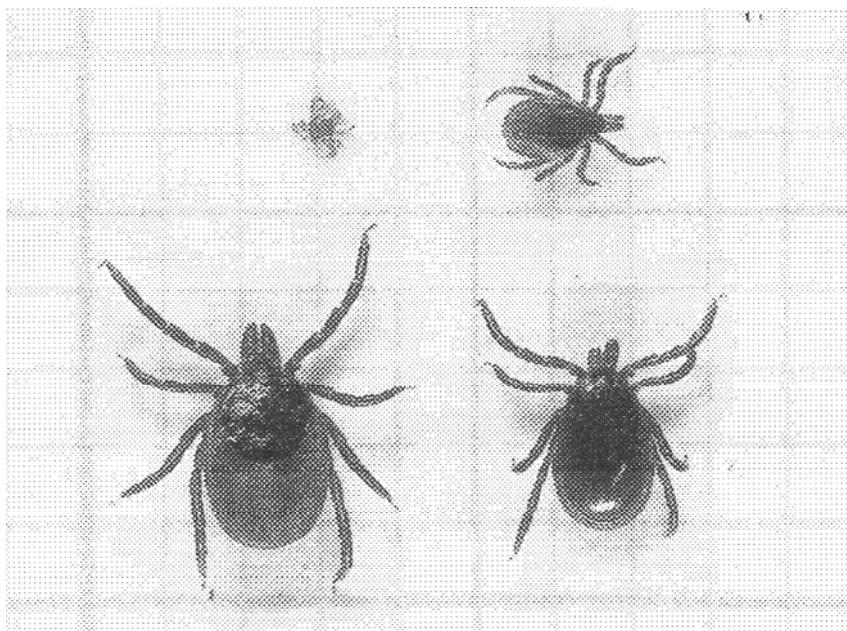
### 2.3.3 Življenjski cikel klopov

Razvojni cikel je pri vseh klopih zelo podoben. Predvsem pri *I. pacificus*, *I. persulcatus*, *I. ricinus* in *I. scapularis*, ki so pomembnejši prenašalci borelij (Eisen in Lane, 2002).

Dolžina razvojnega cikla je odvisna od temperturnih razmer, sezone, v kateri se klop razvija, in razpoložljivosti gostiteljev. *I. scapularis* ponavadi zaključijo svoj razvojni cikel v 2 do 4 letih, *I. pacificus*, *I. persulcatus* in *I. ricinus* pa v treh letih. Pri teh treh lahko cikel traja tudi 2 do 6 let (Gray, 1991; Logar, 1999; Eisen in Lane, 2002).

V življenju klopa se pojavi štiri razvojne stopnje - jajčeca, larva, nimfa in odrasli klop (Logar, 1999; Eisen in Lane, 2002). Nekatere razvojne stopnje so prikazane na sliki 2.

Hranjenje s krvjo se v vsaki stopnji razvoja pojavi enkrat (Steere, 1989). Čas hranjenja je odvisen od izbire gostitelja, mesta pritrditve, gostiteljevega imunskega odziva in temperature gostitelja (Lane, 1994; Eisen in Lane, 2002).



Slika 2: *Ixodes ricinus*: na levi strani larva in odrasla samička, na desni strani nimfa in odrasli samček. En kvadrat = 1 mm<sup>2</sup> (Humair in Gern, 2000).

Larva se razvije iz svežnja več tisoč jajčec in po nekaj dneh je pripravljena na hranjenje. Larva ima 3 pare nog, ki so že vidne s prostim očesom. Spleza na vegetacijo in čaka na gostitelja, ponavadi miš ali voluharja. Mnoge larve kljub toleranci na stradanje umrejo. Ko najdejo gostitelja, se na njem hrani 2 do 3 dni, pri tem se njihova masa poveča za 10 do 20-krat. Po hranjenju pade nazaj na tla v vegetacijo in se po nekaj mesecih preobrazi v nimfo (Lane, 1994; Logar, 1999; Eisen in Lane, 2002).

Nimfa je velika od 1,5 do 2 mm in ima 4 pare nog. Na gostitelju se hrani 4 do 5 dni. Njeni gostitelji so večje živali. Nimfe lahko mirujejo precej časa, preden se preobrazijo v odraslega klopa (Lane, 1994; Logar, 1999; Eisen in Lane, 2002).

Samičke klopovali se na gostitelju hrani 7 do 11 dni in se lahko s 4 mm povečajo na velikost manjšega fižola. Samček ostane na gostitelju dalj časa in se hrani večkrat z

manjšimi količinami krvi. Tako si zagotovi parjenje s samičkami (Lane, 1994; Logar, 1999; Eisen in Lane, 2002).

Oplojena samička pade na tla in po 3 do 10 dneh odloži več tisoč jajčec in umre. Jajčeca zorijo od nekaj tednov do več mesecov, odvisno od temperature, vlage in drugih okoljskih razmer (Lane, 1994; Logar, 1999; Eisen in Lane, 2002).

#### **2.3.4 Sezonska pojavnost klopor**

Sezonsko pojavljanje klopne aktivnosti je primarno pogojeno z obdobji mirovanja aktivnosti med razvojnim ciklom. To klopu omogoči, da se izogne slabim podnebnim razmeram, ki so pozimi na višjih zemljepisnih širinah, in v vročih poletnih mesecih v južni Evropi in zahodnem delu ZDA (Gray, 1991).

Aktivnost klopor med letom se razlikuje med posameznimi vrstami klopor in zaradi podnebnih pogojev tudi med isto vrsto klopor. Odrasle oblike vrst *I. persulcatus* in *I. ricinus* dosežejo vrh svoje aktivnosti spomladi in zgodaj poleti, *I. scapularis* jeseni in *I. pacificus* pozimi (Gray, 1991; Eisen in Lane, 2002; Randolph in sod., 2002).

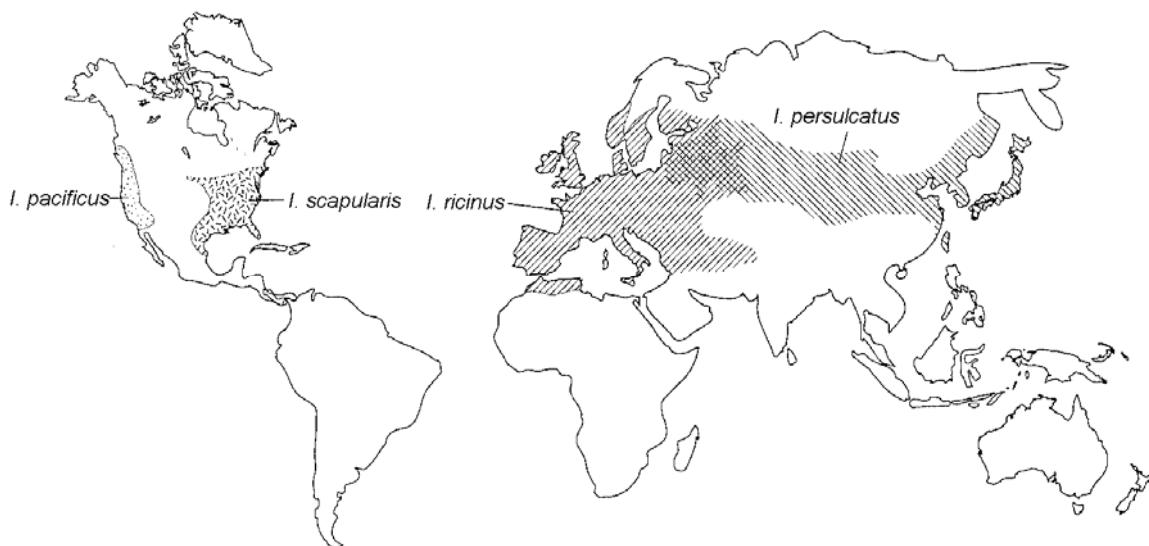
Večinoma se *I. ricinus* hrani na gostiteljih od marca do oktobra in na večini območij se pojavljata dve subpopulaciji - ena je aktivna spomladi in zgodaj poleti, druga pa pozno poleti in jeseni (Stanek in sod., 1986; Gray, 1991; Randolph in sod., 2002). Hrani se le pri temperaturah od 23 °C do 27 °C (Stanek in sod., 1986).

#### **2.3.5 Klopi kot prenašalci povzročiteljev bolezni**

Klopi poleg borelij, ki povzročajo lajmsko boreliozo, prenašajo še številne druge povzročitelje infekcijskih obolenj, kot so povzročitelji mrzlice skalnega gorovja, severnoazijskega klopnega tifusa, queenslandskega klopnega tifusa, orientalske mrzlice, monocitne erlihioze, povratne mrzlice, ruskega spomladansko-poletnega encefalitisa, krimsko-kongoške hemoragične mrzlice, sredozemske mrzlice, mrzlice Q, granulocitne erlihioze, tularemije, babezioze in klopne meningoencefalitisa. Od teh je zadnjih 6 prisotnih tudi v Sloveniji (Strle, 1991).

Porazdelitev lajmske borelioze po svetu sovpada z geografsko porazdelitvijo prenašalcev borelij - klopor. To so klopi iz skupine *Ixodes ricinus/persulcatus*. V njej so štiri pomembnejše vrste: *I. ricinus* (Evropa), *I. persulcatus* (Vzhodna Evropa, Azija), *I. scapularis* (severovzhodni, atlantski in centralni del ZDA) in *I. pacificus* (zahodni del ZDA, Kanada) (Burgdorfer, 1995 in 1996; Lottman in sod., 1996; Nadelman in Wormser, 1998; Eisen in Lane, 2002). Porazdelitev teh štirih vrst klopor po svetu je prikazana tudi na sliki 3.

Poleg teh štirih vrst so vsaj še v desetih vrstah klopor našli borelije, vendar bi lahko bili z lajmsko boreliozo pri ljudeh povezani le trije klopi: *I. ovatus* (Japonska), *I. holocyclus* (Avstralija) in *Amblyomma americanum* (ZDA). Ostali klopi ponavadi ne napadejo človeka, so pa pomembni, da se borelije ohranijo v naravi (Burgdorfer, 1996).



Slika 3: Geografska porazdelitev najpomembnejših prenašalcev lajmske borelioze (Eisen in Lane, 2002).

Klopi se okužijo z borelijami pri pitju krvi na različnih gostiteljih oz. rezervoarjih *B. burgdorferi* sensu lato. Več kot 100 naravnih vretenčarskih gostiteljskih vrst je bilo odkritih kot pomembnih v ekologiji *B. burgdorferi* sensu lato (Kurtencach in sod., 2002). Najpogostejsi rezervoar borelij in hkrati gostitelj larv in nimf so miši, voluharice, veverice, podgane, polhi, rovke, ježi, zajci in ptiči (Burgdorfer, 1995 in 1996; Humair in Gern, 2000;

Kurtenbach in sod., 2002). Študije so pokazale, da so borelije tudi gostiteljsko specifične. V osrednjih delih Evrope so miši vrste *Apodemus sylvaticus* največkrat okužene z *B. afzelii*, v osrednjih delih Severne Amerike pa podgane rudu *Neotoma* z *B. bissettii*. V vzhodnem delu ZDA so miši rodu *Peromyscus* okužene z *B. burgdorferi* sensu stricto. Na Japonskem so glodavci najpogosteje nosilci vrste *B. japonica*. Ptiči na otokih severnega morja pa so okuženi z *B. garinii*, vendar ne z *B. afzelii* (Humair in Gern, 2000; Kurtenbach in sod., 2002; De Meeûs in sod., 2004). Na splošno bi lahko rekli, da so sevi *B. burgdorferi* sensu lato razdeljeni v tri skupine (Kurtenbach in sod., 2002):

- sevi, ki so prilagojeni malim sesalcem (*B. garinii* OspA serotip 4, *B. afzelii*, *B. bissettii* in *B. japonica*);
- sevi, ki so prilagojeni pticam (*B. garinii* OspA serotip 3, 5, 6, 7 in *B. valaisiana*) in
- sevi, ki niso specializirani (*B. burgdorferi* sensu stricto)

Tudi posamezna vrsta klopa ne prenaša vseh vrst borelij, ki povzročajo lajmsko boreliozo pri človeku. *I. persulactus* je prenašalec *B. afzelii* in *B. garinii*, *I. pacificus* in *I. scapularis* prenašata le *B. burgdorferi* sensu stricto, *I. ricinus* pa prenaša vse tri vrste; *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* in *B. garinii* (Eisen in Lane, 2002).

Pri klopih se spirohete prenašajo na dva načina. Prvi je horizontalni (transstacialni) prenos, pri katerem se klop okuži pri pitju krvi na okuženem gostitelju. Klop ostane kužen med celotnim razvojnim ciklom. Okuži se lahko v katerikoli razvojni stopnji. Drugi in za obstoj spirohet v naravi manj pomemben prenos je vertikalni (transovarialni), pri katerem spirohete pri samički odraslega klopa okužijo jajčeca, od tod pa se nato prenesejo na larvo, nimfo in odraslega klopa med življenskim ciklom (Stanek in sod., 1986; Humair in Gern, 2000). Vertikalni prenos spirohet je redek pojav pri *I. ricinus*; samo okoli 1 % larv se izleže iz okuženih jajčec na tak način (Humair in Gern, 2000).

Na drugega gostitelja, vključno s človekom, se borelije prenesejo v klopovi slini med njegovim hranjenjem, potem ko se preselijo iz črevesja v žleze slinavke. Ta selitev ponavadi traja 2 do 3 dni. Uspešen prenos borelij iz klopa na gostitelja pri *I. ricinus* se lahko zgodi tudi že v 17 do 29 urah po vbodu (Humair in Gern, 2000). Pri živalih so sicer ugotovili, da je možnost za okužbo z *B. burgdorferi* sensu lato v prvih 24 urah prisesanosti

okuženega klopa zanemarljiva in da se začne strmo povečevati šele po 48 in več urah (Funa in sod., 1996). Funa in sodelavci (1996) pa so ugotovili, da odstranitev klopa v 48 urah po vbodu človeku zagotavlja, da s tem preprečimo lajmsko boreliozo.

Za prenos okužbe na človeka so pri *I. scapularis*, *I. ricinus* in *I. pacificus* pomembne nimfe, pri *I. persulcatus* pa odrasli klop (Nadelman in Wormser, 1998).

## 2.4 LAJMSKA BORELIOZA

Lajmska borelioza je kompleksna bolezen (Burgdorfer, 1996), ki jo je prvi prepoznal Steere s sodelavci leta 1977 v mestu Old Lyme (Connecticut, ZDA) v oligoartikularnem artritisu, epidemičnem pri otrocih, živečih na tem območju (Steere in sod., 1977). Je široko razširjena zoonoza, ki jo povzročajo vsaj tri borelije: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* in *B. afzelii* (Strle in sod., 1995a; Burgdorfer, 1995 in 1996; Wang in sod., 1999).

### 2.4.1 Patogeneza in klinična slika lajmske borelioze

Patogeneza lajmske borelioze je še vedno slabo pojasnjena. Vzrok tiči v tem, da je povzročitelj bolezni poznan razmeroma kratek čas, da živalski modeli slabo oz. nepopolno posnemajo razmere pri ljudeh, da povzroča bolezen pri ljudeh več različnih borelijskih vrst in da so borelije tudi znotraj vrste zelo raznolike (Strle, 2000a).

Borelija lahko izzove vnetje v organu, v katerem perzistira, avtoimunost in organizmu onemogoča uničenje patogena. Z antigenskimi variacijami Osp se izogne imunskemu odgovoru gostitelja (Wilske in Pfister, 1995). Verjetno je, da je prilagajanje površinskih antigenov borelij transkripcijsko in translacijsko regulirano (Seiler in Wies, 1996). V gostiteljevem tkivu lahko vztraja zaradi vdora v imunološko priliviligirana mesta, kot so možgani, sklepi in oči (Wilske in Pfister, 1995; Seiler in Weis, 1996).

Lajmska borelioza se deli na zgodnjo in pozno obliko. Zgodnja oblika bolezni se še naprej deli na lokalizirano in razširjeno obliko. Pozna oblika je kronična oblika lajmske borelioze (Steere, 1989; Strle, 2000b). Bolnik ima lahko vse ali posamezne oblike bolezni (Steere, 1989).

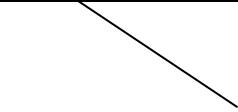
Bolezen prizadane različna tkiva in organe: kožo, sklepne, notranje organe, živčni sistem (preglednica 2), znaki bolezni pa so deloma odvisni tudi od vrste povzročitelja. *B. garinii* največkrat povzroča okvare živčevja, *B. afzelii* pozne okvare kože, *B. burgdorferi* sensu stricto pa razmeroma pogoste okvare sklepov (Cimmino in sod., 1998; Nadelman in Wormser, 1998; Strle, 2000b; Humair in Gern, 2000). Vse tri patogene vrste pa lahko povzročijo erythema migrans (Cimmino in sod., 1998). Na mestu vboda klopa se erythema migrans razvije pri 90% bolnikov, od koder se borelije ražširijo v različne organe (Nadelman in Wormser, 1998).

Nekatere klinične slike lajmske borelioze, ki se izražajo na koži, so bile v Evropi opisane že pred skoraj 100 leti. Tako sta leta 1909 Šved Afzelius in leta 1913 Lipschutz z Dunaja poročala o kožni spremembi erythema migrans. Še pred tem so poročali o kožni spremembi acrodermatitis chronica atrophicans. Danes vemo, da sta obe kožni spremembi značilni za lajmsko boreliozo. Slovenija pozna erythema migrans več kot 50 let, le da ji zdravniki niso posvečali preveč pozornosti. Prvi jo je opisal Lesničar leta 1981 (Lesničar, 1981; Ružić - Sabljić, 2002).

Redkejše oblike lajmske borelioze so še okužbe očesa, miozitis, osteomielitis, panoftalmitis itd. (Stanek in Strle, 2003), možna pa je tudi okužba ploda v maternici preko posteljice okužene matere (Steere, 1989; Maraspin - Čarman in sod., 2000).

Preglednica 2: Bolezenski znaki zgodnje in pozne oblike lajmske borelioze (Strle 2000b: 54; Ružić - Sabljić, 2002: 298; Stanek in Strle, 2003).

Oblika bolezni	Zgodnja oblika bolezni	Pozna ali kronična
----------------	------------------------	--------------------



Organ/ organski sistem	Lokalizirana oblika	Razširjena oblika	oblika bolezni
Koža	Erythema migrans, Borelijski limfocitom	Multipli erithema migrans	Acrodermatitis cronica atrophicans
Živčevje in možgani		Meningitis, Encefalitis, Kranialni nevritis, Mielitis	Kronični progresivni encefalomielitis, Kronična polinevropatija, Kronična aksonalna poliradikulopatija, Demenca
Sklepi in mišice		Artritis, Miozitis, Osteomielitis	Kronični artritis, Periozitis
Srce		Karditis	
Drugo	Slabo počutje, Lokalna limfadenopatija	Konjunktivitis, Iridociklitis, Uveitis, Lokalna ali razširjena limfadenopatija	Keratitis

#### 2.4.2 Imunski odziv gostitelja

Borelijski lipoproteini, ki se izražajo med okužbo gostitelja, aktivirajo številne celice: makrofage, dendritične celice, signalne celice, B celice in glialne celice, in s tem sprožijo obsežen vnetni proces (Stanek in Strle, 2003).

Protitelesa IgM se razvijejo 3 do 6 tednov po okužbi, usmerjena so proti 41 kDa veliki podenoti bičkov (Steere, 1989; Szczepanski in Benach, 1991). Odgovor z IgG protitelesi se pojavi po šestih tednih po okužbi in je usmerjen proti različnim borelijskim antigenom (Steere, 1989; Szczepanski in Benach, 1991).

#### 2.4.3 Laboratorijska diagnostika lajmske borelioze

Za zanesljiv dokaz okužbe z *B. burgdorferi* sensu lato je poleg klinične diagnoze pomembna tudi mikrobiološka diagnoza. Mikrobiološke metode, s katerimi dokazujemo borelijsko okužbo, delimo na posredne in neposredne (Nadelman in Wormser, 1998; Ružić - Sabljić, 2000).

Neposredno dokazujemo borelijsko okužbo z osamitvijo borelij v kulturi, z dokazovanjem prisotnosti borelijske DNK z verižno reakcijo s polimerazo (PCR - iz. ang. - polymerase chain reaction) in z dokazovanjem borelij v tkivih z mikroskopiranjem (Ružić - Sabljić, 2000). Pri tem lahko uporabimo svetlobno mikroskopijo v povezavi s srebrenjem ali s fluorescentnimi barvili, ali pa mikroskopijo v temnem polju ali fazno-kontrastni mikroskop (Aguero - Rosenfeld in sod., 2005).

Posredno dokazujemo borelijsko okužbo z dokazom specifičnih protiteles z encimsko imunskim testom (ELISA), s posredno imunofluorescenco (IFT), s testom Western blot (WB) ali s hemaglutinacijskimi testi, lahko tudi z dokazom aktiviranih limfocitov T (Ružić - Sabljić, 2000).

#### **2.4.4 Zdravljenje lajmske borelioze**

Zdravljenje z antibiotiki je primerno v vseh stopnjah lajmske borelioze in pri vseh kliničnih oblikah, vsekakor pa je najbolj učinkovito v zgodnji stopnji bolezni. Učinkovitost zdravljenja je odvisna od kliničnih znakov (resnost in trajanje bolezni ter prizadetost določenega organa/organskega sistema) in od izbire učinkovitega antibiotika. Ta mora biti dan v optimalni količini za primeren čas s privolitvijo bolnika. Izbira antibiotika vključuje mnogo faktorjev, kot so učinkovitost, farmakokinetika, stranski učinki in cena. Zaenkrat še ni bil predstavljen najbolj učinkovit antibiotik, optimalna količina in primerna dolžina zdravljenja za katerokoli klinično obliko lajmske borelioze (Strle, 2001).

#### **2.4.5 Preprečevanje lajmske borelioze**

Okužbi z lajmsko borelozo se lahko izognemo tudi sami. Primerno je izogibanje izpostavljenosti klopm z omejenimi aktivnostmi na prostem v območjih s klopi (Nadelman in Wormser, 1998; Stanek in Strle, 2003). Priporočljiva je uporaba zaščitnih

sredstev, uporaba primernih oblačil in s pogosti pregledi kože za zgodnje odkritje in odstranitev klopor (Nadelman in Wormser, 1998).

Ukrep za preprečevanje lajmske borelioze je cepljenje. Sprva so testirali celično cepivo iz inaktiviranih borelij, vendar je bilo cepivo vprašljivo za uporabo pri ljudeh zaradi potencialne toksičnosti in navzkrižne reaktivnosti s človeškimi antigeni (Wormser, 1996; Poland in Jacobson, 2001). Za nekatera protitelesa proti *B. burgdorferi* sensu lato je namreč znano, da v *in vitro* poskusih navzkrižno reagirajo z aksoni živčnih celic, s sinovijskimi celicami, hepatociti in proteini srčne in skeletnih mišic (Wormser, 1996).

Najbolj obetavna komponenta borelij za cepivo je zunanj površinski lipoprotein OspA (Sadziene in Barbour, 1996). Takšno rekombinantno cepivo je v uporabi pri psih od leta 1990. Cepivo je bilo zelo uspešno pri preprečevanju okužbe z borelijami pri živalih (Nadelman in Wormser, 1998), kot so zajci, miši, hrčki (Sadziene in Barbour, 1996) in kot izgleda, je varno in imunogeno tudi pri ljudeh. Vendar je cepivo manj učinkovito v Evropi in Aziji, saj so tu vrste borelij bolj heterogene in OspA proteini bolj variabilni kot v Severni Ameriki (Nadelman in Wormser, 1998).

Poskusi so potekali še z rekombinantnimi cepivi iz drugih Osp proteinov. OspB je učinkovit pri miših, vendar le proti istemu sevu borelij zaradi velike variabilnosti med sevi. OspC je tudi zelo variabilen in zato slabo uporaben. OspD, E in F pa ne kažejo posebne učinkovitosti pri zaščiti živali pred okužbo z borelijami (Sadziene in Barbour, 1996).

#### **2.4.6 Epidemiologija lajmske borelioze**

Lajmska borelioza se pojavlja na severni polobli in je pogojena z razširjenostjo in aktivnostjo prenašalcev borelij, to je klopor iz rodu *Ixodes* (Burgdorfer, 1995 in 1996; Stanek in Strle, 2003). Do sedaj še ni bilo nobenih primerov bolezni na južni polobli (Stanek in Strle, 2003).

Lajmska borelioza primarno prizadene človeka in nekatere domače živali, kot so psi, konji, govedo (Borko in Ružić - Sabljić, 2001). Pri človeku se enako pogosto pojavlja pri moških in ženskah in prizadene ljudi vseh starosti (Nadelman in Wormser, 1998).

V ZDA poročajo, da je v zadnjih desetih letih incidenca bolezni zelo narasla, kar je delno posledica večje medicinske in javne zavesti o lajmski boreliozi, delno pa zaradi geografskega razširjenja bolezni na območja, ki prej niso bila prizadeta. V bolezen je najpogosteje vpletena *B. burgdorferi* sensu stricto in večinoma povzroča arthritis (O'Connell in sod., 1998).

V Evropi je bolezen najpogostejša v centralnih in vzhodnih državah, kjer je letna incidenca več kot 300 na 100.000 prebivalcev. Od leta 1986 dalje ugotavlja, da je Slovenija endemsko področje za lajmsko boreliozo. Pri nas vsako leto zboli okrog 3.000 ljudi. Z incidenčno stopnjo med 130 in 150 obolelih na 100.000 prebivalcev se Slovenija uvršča v sam evropski vrh (Strle in sod., 1995a in 1995b; Strle, 1999).

## 2.5 DOKAZOVANJE BORELIJ V KLOPIH

Za dokazovanje borelij v klopih uporabljam različne tehnike (Wittenbrink in sod., 1994):

- osamitev borelij v kulturi,
- mikroskopiranje v temnem polju ali fazno-kontrastnem mikroskopu,
- posredni imunofluorescenčni test IFT in
- verižna reakcija s polimerazo PCR.

### 2.5.1 Osamitev borelij v kulturi

Izolacija v gojišču je kljub zamudnosti in precejšni nepraktičnosti še vedno »zlati standard« za dokaz borelijske okužbe (Nadelman in Wormser, 1998), saj je tudi najbolj zanesljiva metoda dokazovanja borelijske okužbe (Ružić - Sabljić, 2000).

Metoda osamitve borelij se uporablja tako v raziskovalnih študijah kot v rutini kot diagnostični test, čeprav ima mnogo pomanjkljivosti. Ena izmed njih je spremenljiva kvaliteta gojišča, saj gojišče ni komercialno dostopno. Poleg tega je metoda draga in počasna ter zahteva inkubacijo tudi do 12 tednov, da se kulturo lahko razglasí za negativno (Aguero - Rosenfeld in sod., 2005). Problem je lahko tudi močna kontaminacija primarnih kultur in visoka občutljivost mikroorganizma (Borko in Ružić - Sabljić, 2001).

### 2.5.2 Mikroskopiranje

Preiskava prenašalčevega črevesa z mikroskopiranjem v temnem polju je zamudno in za preiskovalca naporno delo, saj so borelije neenakomerno razporejene v klopovem črevesu. Predvsem pri odraslih in napitih klopih potrebujemo za pregled veliko časa, posebno kadar je borelij malo. Po Gramu jih težko obarvamo, lahko pa jih obarvamo s karbol fuksinom, po Giemsi ali po Wrightu (Ružić - Sabljić, 2002).

### 2.5.3 Posredni imunofluorescenčni test

Posredni imunofluorescenčni test (IFT - iz ang. Imunofluorescent test) je metoda posrednega dokazovanja borelijske okužbe. Metoda je dokaj poceni, pomanjkljivost pa je, da je za objektivno ugotavljanje in razlaganje rezultatov potrebna zelo izkušena oseba (Aguero - Rosenfeld in sod., 2005) in da zahteva specifičen antiserum. Metoda je pri ugotavljanju prisotnosti borelij v kri pijočem členonožcu tudi nezanesljiva zaradi prisotnosti kompleksne mikrobne flore v členonožcu (Higgins in Azad, 1995).

### 2.5.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

PCR je *in vitro* encimsko pomnoževanje izbranega dela zaporedja molekule DNK med dvema znanima začetnima oligonukleotidoma. Metoda temelji na ponavljajočih se krogih sinteze DNK (Persing, 1993a; Busch in Nitschko, 1999). Vsak krog reakcije PCR sestoji iz treh korakov (Persing, 1993b):

- denaturacija, kjer se vzorčna dvojnovijačna DNK pri visoki temperaturi (95 °C) razklene na dve enojnovijačni DNK in tako postane dostopna za hibridizacijo s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi;
- specifično pripenjanje začetnih oligonukleotidov na njihovo komplementarno tarčno zaporedje pri temperaturi med 45 °C in 75 °C in
- podaljševanje začetnih oligonukleotidov pri temperaturi 72 °C, kjer se enojnovijačna DNK dogradi v dvojnovijačno DNK.

Ti trije inkubacijski koraki so povezani v en topotni krog. Tipičen protokol PCR obsega do 30 takšnih krogov (Persing, 1993b). V vsakem krogu se število kopij izbranega dela zaporedja DNK podvoji, tako da količina tarčne DNK eksponentno naraste (Busch in Nitschko, 1999).

PCR je metoda, ki je zelo specifična in občutljiva. Specifičnost reakcije je odvisna od specifičnih začetnih oligonukleotidov in od specifične tarče. Nanjo lahko vpliva tudi koncentracija reagentov v reakcijski mešanici (PCR pufer, deoksinukleotidi, začetni oligonukleotidi, MgCl<sub>2</sub>, Taq-polimeraza in vzorec) in izbira metode PCR. Na občutljivost reakcije vpliva priprava DNK, prisotnost tuje DNK, inhibitorne snovi in postopki analize produktov. Občutljivost testa lahko povečamo tudi s primerno izbiro metode, kot je postopek nested PCR (Persing, 1993b; Schmidt, 1997).

Za pomnoževanje DNK se uporablajo različna tarčna zaporedja. Pomembno je, da so le-ta genetsko obstojna. Izguba ali sprememba tarčnega zaporedja lahko povzroči izgubo reaktivnosti (Schmidt, 1997). Uporablja se lahko geni za zunanjji površinski beljakovini OspA in OspB, gen za flagelin, proteini bičkov, 16S rRNK ali 5S/23S rRNK medgenska regija (Faruki, 1994; Higgins in Azad, 1995; Wilske, 2003 ).

Kot vsak test ima tudi verižna reakcija s polimerazo svoje prednosti in pomanjkljivosti. Prednosti PCR pri diagnostiki *B. burgdorferi* sensu lato so v hitrosti, visoki specifičnosti in občutljivosti metode. Pomanjkljivosti sta kontaminacija vzorcev in spremenljiva narava borelijske DNK, kar lahko privede do lažno negativnih rezultatov zaradi razlik v tarčnem zaporedju. Zaporedja zunanjih površinskih proteinov borelij so zelo spremenljiva in obstajajo značilne genetske razlike med evropskimi in ameriškimi sevi. Katerikoli kontaminant pa lahko zaradi velike občutljivosti reakcije privede do lažno pozitivnih rezultatov (Schmidt, 1997).

Pomanjkljivost je tudi ta, da PCR zazna DNK tako živih kot mrtvih organizmov, pri čemer se ne ve, ali gre za aktivno ali za preteklo okužbo (Humair in Gern, 2000).

#### 2.5.4.1        Nested PCR

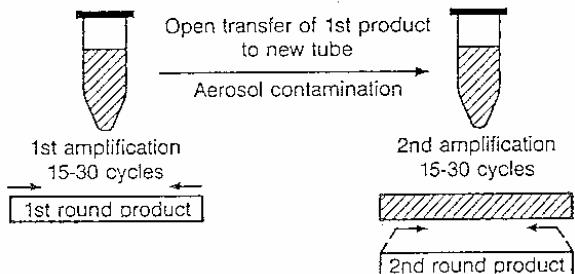
Nested PCR je priljubljena prikrojitev reakcije PCR, ki uporablja »vgnezden« (nested) set začetnih oligonukleotidov. Pri tej metodi se uporabita dva kroga pomnoževanja. V tipičnem nested PCR protokolu se najprej pri prvem, običajnem, PCR uporabi en par začetnih oligonukleotidov v 15 do 30 krogih pomnoževanja. Del (1–3 µl) nastalega produkta se prenese v novo reakcijsko mešanico z drugim parom začetnih oligonukleotidov, specifičnim za notranji del pomnoževanega tarčnega zaporedja in se zopet v 15 do 30 krogih izvede pomnoževanje želene DNK (Persing, 1993a; Schmidt, 1997).

Čeprav nested PCR zagotovi boljšo občutljivost in specifičnost kot običajni PCR, pa je veliko bolj dovzeten za okužbo (Schmidt, 1997). To je zaradi odprtrega prenosa produkta prve reakcije v drugo reakcijo nested PCR. Pri prenosu se tako lahko ustvari aerosol s produkti prve reakcije. Produkta te reakcije se namreč ne more inaktivirati, saj mora ostati intakten, če naj bi protokol za nested PCR nemoteno deloval (Persing, 1993a). Zaradi možnosti okužbe ta metoda tudi ni primerna za klinične preiskave (Persing, 1993a), saj lahko pride do okužbe negativnih vzorcev in s tem do lažno pozitivnih rezultatov (Picken M. M. in sod., 1996).

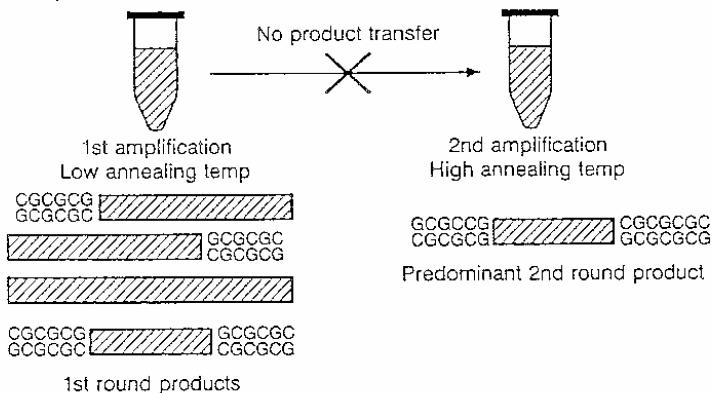
Rešitev pred okužbo vzorca je lahko metoda nested PCR v eni sami reakcijski posodici (Picken M. M. in sod., 1996; Schmidt, 1997). Pri tej metodi odpiranje reakcijske posodice in prenos produkta nista potrebna, ker vanjo že na začetku damo oba para začetnih oligonukleotidov. Nastajanje produktov reakcije se loči termodinamično, tako da se uporabi zunanje začetne oligonukleotide z visoko temperaturo taljenja in notranje začetne oligonukleotide z nizko temperaturo taljenja (Schmidt, 1997).

Oba načina metode nested PCR prikazuje slika 4.

#### A. Two-step nested protocol



#### B. Single-tube nested protocol



Slika 4: Dva načina izvedbe reakcije nested PCR (Persing, 1993a).

#### 2.5.4.2 Izbira začetnih oligonukleotidov

Za izbiro primernih začetnih oligonukleotidov moramo poznati nukleotidno zaporedje vsaj dela genoma mikroorganizma. Začetni oligonukleotidi so kratki, značilni odseki DNK, komplementarni z mejnima deloma tarčnega dela genoma, ki ga želimo pomnožiti. Z izbiro ustreznih začetnih oligonukleotidov lahko podvajamo bolj ohranjene ali spremenljive dele DNK. Tako dokažemo genom na ravni rodu ali vrste (Zore, 1998).

Izbira začetnih oligonukleotidov je tudi kritični element pri določitvi občutljivosti PCR. Optimalni par začetnih oligonukleotidov za zaznavanje DNK *B. burgdorferi* sensu lato naj bi imel določene značilnosti (Schmidt, 1997):

- par naj bi omogočil pomnoževanje vseh sevov *B. burgdorferi* sensu lato;
- par naj bi omogočil, da se vsi sevi pomnožujejo z enako občutljivostjo;
- par naj bi bil visoko specifičen in naj ne bi omogočal pomnoževanja ostalih borelij, spirohet ali drugih bakterijskih ali virusnih patogenov;

- par naj bi tvoril stabilne dvojice s tarčnim zaporedjem;
- vsak posamezni začetni oligonukleotid naj bi bil dolg od 15 do 30 nukleotidov;
- par naj bi imel visoko G + C vsebnost (50 %), kar pa je težko doseči, saj borelijske vrste vsebujejo v povprečju le 28 % G + C vsebnost;
- par naj ne bi tvoril 3' dvojic med sabo;
- par naj ne bi vseboval homooligomerov ali kratkih ponovljenih sekvenc in
- par naj bi imel podobno temperaturo taljenja ( $T_m$ ). Temperaturo, ki ustreza obema začetnima oligonukleotidoma, poiščemo po enačbi:

$$T_m = 2 \text{ } ^\circ\text{C} * (\text{število A/T}) + 4 \text{ } ^\circ\text{C} * (\text{število G/C})$$

V praksi je seveda težko zagotoviti vse naštete lastnosti začetnih oligonukleotidov (Schmidt, 1997).

#### 2.5.4.3        Analiza produktov PCR

Po končani reakciji PCR je potrebno preveriti uspešnost pomnoževanja želenega tarčnega zaporedja DNK. Rezultat pomnoževanja ocenimo kot pozitiven, če dokažemo prisotnost pomnoženega tarčnega odseka, t. i. PCR pridelka. Prisotnost in velikost produkta reakcije PCR dokazujemo v električnem polju s horizontalno elektroforezo, ki omogoča ločevanje delcev DNK po velikosti. To je analitična metoda ločevanja DNK. Nabite molekule potujejo v odvisnosti od naboja, velikosti in oblike. DNK vsebuje fosfatne skupine, zato je negativno nabita in v električnem polju potuje proti anodi.

Da lahko rezultat vidimo, DNK obarvamo z etidijevim bromidom, ki se vgradi med bazne pare in absorbira svetlobo valovne dolžine 300 nm, odda pa svetlobo pri 590 nm, zato opazovana DNK oddaja rdeče-oranžno svetlobo. Tako v UV svetlobi vidimo dele DNK kot fluorescirajoče pasove (Madigan in sod., 2000).

## 2.6 CILJI RAZISKOVANJA

- Iz klopa izolirati celotno DNK, vključno z morebiti prisotno DNK bakterij *Borrelia burgdorferi* sensu lato ter jo pomnožiti z verižno reakcijo s polimerazo (PCR).
- Ugotoviti okuženost klopor *Ixodes ricinus* z bakterijo *Borrelia burgdorferi* sensu lato v Sloveniji z metodo PCR.
- Primerjati razlike v okuženosti klopor na treh različnih območjih v Sloveniji, ki do sedaj še niso bila vključena v raziskave: Dvorska vas pri Begunjah na Gorenjskem, Kras (okolica Kozine), Mežakla.

## 2.7 DELOVNE HIPOTEZE

- Predvidevamo, da so klopi v Sloveniji okuženi z bakterijo *Borrelia burgdorferi* sensu lato.
- Predpostavljamo, da s pomnoževanjem borelijske DNK lahko dokažemo prisotnost borelij v klopih.
- Predvidevamo, da bomo v izbrani populaciji klopor pri določenem deležu dokazali gen za zunanji površinski protein OspA z molekularno metodo PCR.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Kulture bakterij *B. burgdorferi* sensu lato

V nalogi smo iz kompleksa *B. burgdorferi* sensu lato uporabili tri najbolj znane vrste: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* in *B. garinii*. Izolate posameznih vrst smo uporabili kot pozitivno kontrolo pri izvajanju testa.

Kontrolni izolati so bili osamljeni iz kože bolnikov z erythema migrans. Njihova vrstna specifičnost je bila preverjena z restrikcijo kromosomske DNK, s plazmidnim profilom in z analizo proteinskih profila. Vsi trije izolati so bili osamljeni in identificirani v Laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroze na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani (Ružić - Sabljić in sod., 2000)

##### 3.1.2 Klopi

Analizirali smo 250 klopor vrste *Ixodes ricinus*. Klopi so bili nabrani že med 25. in 28. aprilom leta 2000 z metodo zastave na podrasti in od takrat shranjeni v hladilniku pri 4 °C (Zore in sod., 2000). Izbrali smo klope s treh območij Slovenije: Dvorska vas pri Begunjah na Gorenjskem, Kras (okolica Kozine) in Mežakla.

#### 3.2 METODE

##### 3.2.1 Identifikacija klopor

Klope smo iz posodic, v katerih so bili shranjeni, stresli v prazno petrijevko in s pomočjo povečevalnega stekla ter sheme ugotovili, v kateri razvojni stopnji je klop - larva, nimfa ali odrasli klop. Klope smo identificirali po shemi, ki jo opisujeta Eisen in Lane (2002) v svojem članku.

### 3.2.2 Izolacija DNK iz klopor

Klope smo namočili za 5 minut v 70 % etanol in s tem z njihove površine sprali umazanijo in mikrobe. Nato smo klope večkrat sprali še s sterilno destilirano vodo.

DNK iz klopor smo izolirali s kompletom reagentov QIAamp za tkivo (QIAGEN, Santa Clara, CA, ZDA), vendar smo nekoliko prilagodili navodila proizvajalca (Protocol, 2004). Klope smo homogenizirali s sterilnim pestilom v ependorfovi epruvetki, dodali 90 µl ATL pufra (angl. - tissue lysis buffer) in nato še 20 µl proteinaze K za razgradnjo tkiva in pustili delovati čez noč v termostresalniku pri 56 °C. Nato smo suspenziji dodali 100 µl pufra AL (angl. - lysis buffer), zmešali in inkubirali 10 minut pri 70 °C. Po inkubaciji smo dodali 100 µl etanola (96–100 %) in premešali. V zbiralne epruvetke smo postavili tubice s filtrom in vanje prepipetirali obdelan vzorec vključno s precipitatom ter centrifugirali 1 minuto pri 8.000 obratih. Zamenjali smo epruveto, kjer se je zbral pufer in tubice s filtrom postavili v novo zbiralno epruveto. Dodali smo 500 µl pufra AW1 (angl. - wash buffer 1) in centrifugirali 1 minuto pri 8.000 obratih. Zbiralno epruveto s prefiltirano tekočino smo zopet zavrgli in tubice s filtrom postavili v novo zbiralno epruveto. Dodali smo 500 µl pufra AW2 in centrifugirali 3 minute pri 15.000 obratih. Tubice s filtrom smo prestavili v 1,5 ml ependorfovo epruvetko in celotno DNA iz klopa izolirali s 30 µl pufra AE (angl. - elution buffer). Zbrani vzorec DNA smo shranili pri –20 °C (Protocol, 2004).

Za reakcijo PCR smo uporabili 5 oz. 2 µl DNA.

### 3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Z metodo nested PCR smo dokazovali borelijsko DNA pri vseh 250 klopih.

### 3.2.3.1 Izbira začetnih oligonukleotidov

Pri klopih smo najprej preverjali uspešnost izolacije DNK za klopno mitohondrijsko 16S rRNK (rDNK), da bi se izognili lažno negativnim rezultatom. Uporabili smo začetne oligonukleotide 16S-1 in 16S+2.

Za dokaz genoma *B. burgdorferi* sensu lato lahko uporabljam različne dele genoma. V naši nalogi smo pomnoževali dele linearnega plazmida. Uporabili smo začetne oligonukleotide za pomnoževanje odseka gena za zunanjo površinsko beljakovino OspA (Oext1 in Oext2 ter Oint1 in Oint2).

Začetne oligonukleotide, ki smo jih uporabili v študiji, smo natančno opisali v preglednico 3.

Preglednica 3: Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov (v smeri 5' → 3'), mesta vezav na genu in velikost produktov reakcije PCR.

Oznaka	Zaporedje	Velikost produkta
16S-1	CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT	
16S+2	TTGGGCAAGAACGACCTATGAA	290 bp
Oext 1	GAGCTTAAAGGAACCTCTGATAA	
Oext 2	GTATTGTTGACTGTAATTGT	560 bp
Oint 1	ATGGATCTGGAGTACTTGAA	
Oint 2	CTTAAAGTAACAGTTCCCTCT	351 bp

### 3.2.3.2 Priprava mešanice reagentov za PCR

Za uspešno pomnoževanje DNK morajo biti v reakcijski mešanici poleg začetnih oligonukleotidov še ustrezne koncentracije PCR pufra, deoksinukleotidov (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), MgCl<sub>2</sub> in Taq-polimeraze. Vse sestavine smo zmešali v PCR reakcijsko mešanico in dodali ustrezno količino vzorca. Sestavo mešanice prikazujeta preglednici 4 in 5.

Mešanica za pomnoževanje klopne DNK se je razlikovala od tiste za pomnoževanje borelijske beljakovine OspA.

Preglednica 4: Priprava PCR mešanice za eno reakcijo PCR za dokaz klopne DNK s končnim volumnom 50 µl.

Reagent	Izhodna koncentracija	Volumen v mešanici	Proizvajalec
PCR pufer	10 x koncentriran	5 µl	Perkin Elmer
dATP dCTP dTTP dGTP	200 µM	4 x 1 µl	Perkin Elmer
začetna oligonukleotida (16S-1, 16S+2)	50 pmol/µl	2 x 0,5 µl	TIB, MOLBIOL
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	4 µl	Perkin Elmer
Taq-polimeraza	5 U	0,3 µl	Perkin Elmer
vzorec DNK*	5-10 ng	5 µl	
bidestilirana voda		30,7 µl	

\* pri negativni kontroli smo dodali enako količino sterilne dvakrat destilirane vode

Preglednica 5: Priprava PCR mešanice za eno reakcijo PCR za dokaz gena OspA s končnim volumnom 50 µl.

Reagent	Končna koncentracija	Volumen v mešanici za Oext1 in Oext2	Volumen v mešanici za Oint1 in Oint2	Proizvajalec
PCR pufer	10 x koncentriran	5 µl	5 µl	Perkin Elmer
dATP dCTP dTTP dGTP	200 µM	4 x 1 µl	4 x 1 µl	Perkin Elmer
začetna oligonukleotida	50 pmol/µl	2 x 0,25 µl	2 x 0,25 µl	TIB, MOLBIOL
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	5 µl	5 µl	Perkin Elmer
Taq-polimeraza	5 U	0,25 µl	0,25 µl	Perkin Elmer
vzorec DNK*	5-10 ng	5 µl	2 µl	
bidestilirana voda		30,25 µl	33,25 µl	

\* pri negativni kontroli smo dodali enako količino sterilne dvakrat destilirane vode

### 3.2.3.3 Kontrola kontaminacije

Izolacija DNK iz klofov, priprava mešanice za reakcijo PCR, pomnoževanje in analiza produktov pomnoževanja so bili prostorsko ločeni. Pipet in uporabljenega potrošnega materiala nismo prenašali v druge prostore, prav tako smo oboje uporabljali le za določen korak.

Reagente za reakcijo smo hranili ločeno in v manjših količinah. Pri pripravi mešanice PCR smo vedno vključili še negativne kontrole.

### 3.2.3.4 Pomnoževanje

Reakcijo PCR smo izvedli v sterilnih 0,25 ml epruvetkah (Perkin Elmer Certus) v termičnem pomnoževalniku T3 Thermocycler (Biometra, Nemčija). Naprava omogoča programiranje in kontroliranje zaporedij korakov segrevanja in ohlajanja. Zaporedja so povezana v cikle, ki jih lahko poljubno mnogokrat ponavljamo.

V naši nalogi smo za pomnoževanje klopne DNK uporabili najprej 10 nato pa še 35 ciklov pomnoževanja. Pri tem sta se oba koraka pomnoževanja razlikovala v temperaturi in trajanju pripenjanja začetnih oligonukleotidov 16S-1 in 16S+2 na matrično DNK. Po končanem pomnoževanju smo produkte reakcije PCR ohladili in shranili pri 4 °C.

Za pomnoževanje odseka gena za zunanjou površinsko beljakovino OspA smo uporabili 2-krat po 30 ciklov pomnoževanja - najprej 30 ciklov pri uporabi začetnih oligonukleotidov Oext1 in Oext2 ter nato še pri začetnih oligonukleotidih Oint1 in Oint2. Po končanem prvem pomnoževanju smo produkte uporabili kot vzorec za drugo pomnoževanje.

Končne produkte drugega pomnoževanja v reakciji PCR smo prav tako ohladili in shranili pri 4 °C.

Natančni pogoji pomnoževanja za izbrane začetne oligonukleotide so prikazani v preglednici 6.

Preglednica 6: Pogoji pomnoževanja za izbrane začetne oligonukleotide.

Začetni oligonukleotidi	Denaturacija	Pripenjanje	Podaljševanje
16S-1 16S+2 10 ciklov 35 ciklov	92 °C /60 s 92 °C /60 s	48 °C /60 s 54 °C /35 s	72 °C /120 s 72 °C/120 s
Oext 1 Oext 2	95 °C /45 s	50 °C /45 s	72 °C /60 s
Oint 1 Oint 2	95 °C /45 s	50 °C /45 s	72 °C /60 s

### 3.2.3.5 Analiza produktov PCR

Analizirali smo tako produkte pomnoževanja klopne DNK kot produkte pomnoževanja odseka gena za zunanjo površinsko beljakovino OspA, in sicer šele produkte druge (nested) reakcije.

Prisotnost in velikost pridelkov obeh reakcij PCR smo ugotavljali z vodoravno elektroforezo (»Submarine« - Systeme Hoefer Scientific Instruments HE 99-15-1,5) v 1% agaroznem gelu (Agaroza, Sigma, ZDA). Gel smo pripravili z 1x koncentriranim pufrom TAE (0,04 M tris-acetat, 0,002 M EDTA, pH 8) v mikrovalovni pečici. Ko se je raztopina ohladila na približno 60 °C, smo dodali etidijev bromid do koncentracije 0,1 mg/ml (Sigma Chemical Co., St. Louis, ZDA).

K 10 µl pridelka reakcije PCR smo dodali 2 µl 15 % Ficola 400 z 0,35 % brom-fenolnim modrilom in mešanice nanesli v vdolbinice na agaroznem gelu. Nanesli smo tudi standard molekulske mase DNK z znanimi velikostmi fragmentov (123 bp DNK ladder, BRL, ZDA). Produkte PCR smo nato ločevali v električnem polju 100 voltov 25 minut. Pasove DNK smo opazovali v transluminatorju z UV svetlobo valovne dolžine 302 nm.

Velikost fragmentov smo določili s pomočjo njihove lege glede na lego fragmentov DNK molekularnega označevalca znane velikosti in standarda molekulske mase.

Agarozne gele smo fotografirali s polaroidno kamero (Polaroid MP4; tip filma 667, čas osvetlitve 8 s, zaslonka 5,6; oranžni filter) ali s pomočjo računalniškega programa in napravo Bio Rad (Nemčija).

### 3.2.4 Statistične metode

Rezultate smo statistično obdelali. Zanimala nas je primerjava frekvenc okužb po različnih območjih v Sloveniji. Pri tem smo uporabili neparametrični test  $\chi^2$  (Košmelj, 2001)

## 4 REZULTATI

### 4.1 KLOPI

Vseh 250 klopor vrste *I. ricinus* je bilo v razvojni stopnji nimfe. Preglednica 7 prikazuje pregled klopor po posameznih področjih Slovenije.

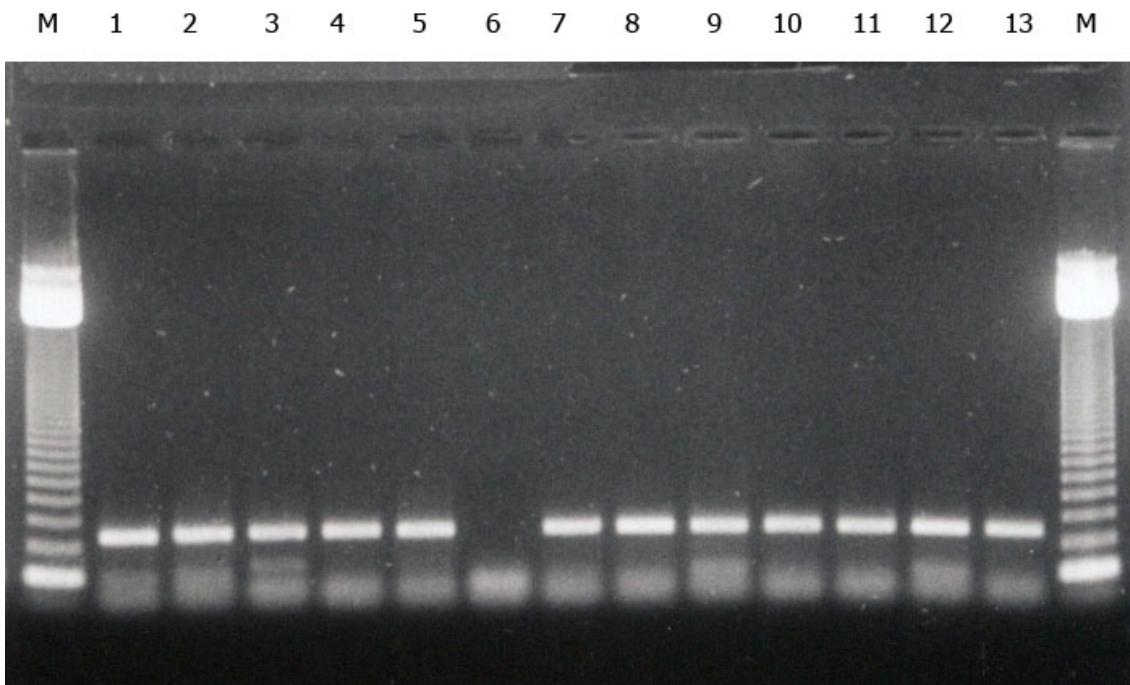
Preglednica 7: Pregled klopor po posameznih področjih.

Področje	Število nimf
Dvorska vas	90
Kras	106
Mežakla	54
Skupaj	250

#### 4.1.1 Dokazovanje mitohondrijske DNK za 16S rRNK klopa

Mitohondrijsko DNK za 16S rRNK klopa smo dokazali pri vseh 250 klopih (100 %). S tem smo dokazali, da je bila izolacija DNK iz vzorca uspešna.

Rezultati so vidni na sliki 5.



Slika 5: Dokaz mitohondrijske DNK za 16S rRNK pri enajstih klopih

M - masni molekulski označevalec 123 kb

1–5, 8–13 - vzorci klopor

6 - negativna kontrola (destilirana voda)

7 - pozitivna kontrola (klopna DNK, dokazana že v predhodnih PCR)

#### **4.1.2 Dokazovanje *B. burgdorferi* sensu lato v klopih z začetnimi oligonukleotidi za zunanjo površinsko beljakovino OspA**

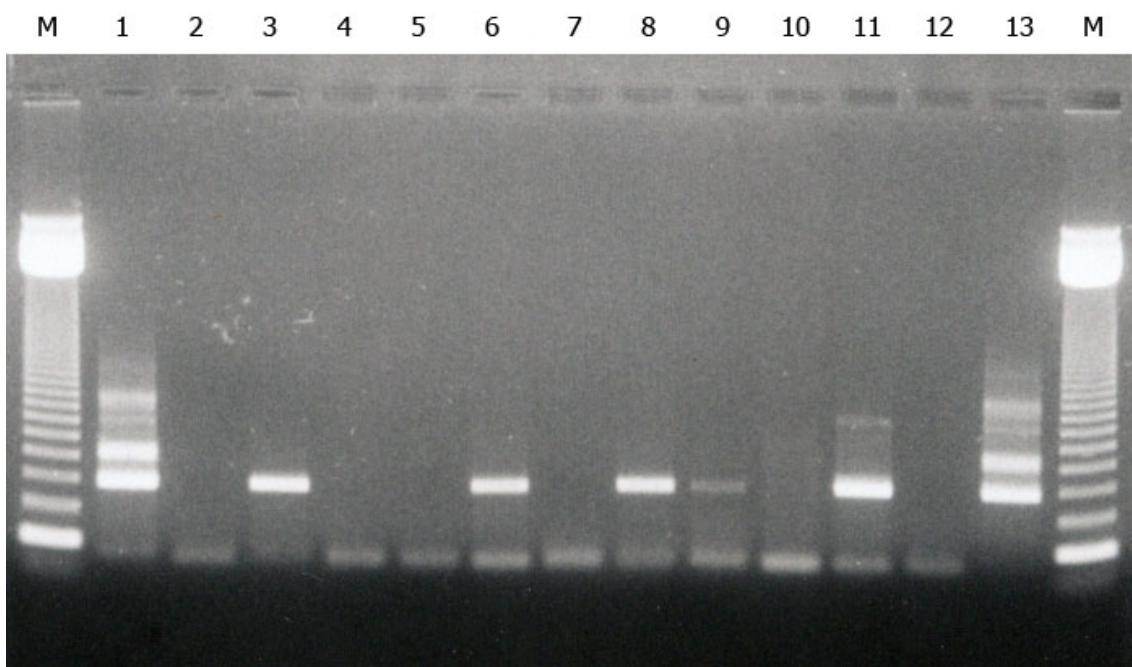
Z začetnimi oligonukleotidi za zunanjo površinsko beljakovino OspA smo ugotovili, da je bilo v povprečju okuženih 14,8 % (37 od 250) klopor.

Po posameznih območjih so bili klopi okuženi med 9,4 % in 24,1 %. Na območju Dvorske vasi je bilo okuženih 14 od 90 (15,5 %) klopor, na območju Krasa 10 od 106 (9,4 %) klopor in na Mežakli 13 od 54 (24,1 %) klopor. Razlike med posameznimi območji niso statistično značilne ( $p < 0,0001$ ). Rezultate prikazuje tudi preglednica 8.

Pomnoževanje gena za OspA kaže slika 6.

Preglednica 8: Pogostnost z borelijami okuženih klopor z nested PCR začetnimi oligonukleotidi za pomnoževanje gena za OspA.

Področje	Pogostnost okuženih klopor število okuženih klopor/število vzorčenih klopor (%)
Dvorska vas	14/90 (15,5 %)
Kras	10/106 (9,4 %)
Mežakla	13/54 (24,1 %)
Skupaj	37/250 (14,8 %)



Slika 6: Dokaz gena za OspA pri desetih klopih.

M - masni molekulski označevalec 123 kb

2–6, 8–12 - vzorci klopor

7 - negativna kontrola (destilirana voda)

1, 13 - pozitivna kontrola (kultura *B. burgdorferi* sensu lato)

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

V Sloveniji je od leta 1986 lajmska borelioza najpogostejša bolezen, ki jo prenašajo klopi. Od tega leta je število obolelih stalno letno naraščalo. Opažena sprememba v epidemiologiji te človeške bolezni je verjetno povezana z večjo pogostnostjo okuženih populacij kloporodov z *B. burgdorferi* sensu lato (Strle in sod., 1995a). Podobno kot druge po Evropi je tudi pri nas daleč najbolj pomemben prenašalec borelij klop *Ixodes ricinus* (Strle in sod., 1995b), ki je tudi najštevilčnejša vrsta kloporodov v Sloveniji (Strle in sod., 1995a).

V našo študijo smo vključili prav klope te vrste. Vseh 250 kloporodov smo identificirali kot nimfe *I. ricinus* po ključu, ki je opisan v literaturi (Eisen in Lane, 2002). Nimfe so tudi tista razvojna stopnja, ki je za prenos lajmske borelioze na človeka najpomembnejša.

Katera razvojna stopnja klopa je za prenos lajmske borelioze na človeka pomembna je odvisno od tega, kako pogosto se priseta na človeka, kakšna je okuženost posamezne stopnje z borelijami in kako lahko jo je odkriti in odstraniti s kože, preden pride do prenosa borelij (Eisen in Lane, 2002).

Larve so redko okužene z borelijami, ker so prvi stadij, ki sploh išče gostitelja in ponavadi njihovi gostitelji niso ljudje, zato za prenos bolezni na človeka niso pomembne.

Nimfe so pri *I. scapularis* v vzhodnih predelih ZDA in pri *I. ricinus* v Evropi primarni prenašalci borelij na človeka. Enako pogost je lahko tudi prenos borelij z odraslimi samičkami, vendar ker so te večje kot nimfe, jih je lažje odkriti in jih zato tudi prej odstranimo (Eisen in Lane, 2002). V takem primeru poteče premalo časa, da bi prišlo do prenosa borelij med klopom in človekom, za kar je potrebno vsaj 24 ur (Humair in Gern, 2000). V Ameriki je za pojav erythema migrans v 85 % krov prav vbod okuženih nimf, saj so te bolj aktivne v najugodnejših razmerah za hranjenje. V Evropi je težje reči, katera razvojna stopnja kloporodov je glavni krivec za pojav lajmske borelioze, saj je čas aktivnosti nimf in odraslih kloporodov enak. So pa študije pokazale, da so pri vrsti *I. ricinus* za 54 % do 82 % vbodov odgovorne ravno nimfe, za 3 do 43 % pa odrasle samičke (Eisen in Lane, 2002).

Ravno nasprotno pa so pri *I. persulcatus* odrasle samičke glavni prenašalci lajmske borelioze na človeka v vzhodni Evropi in Aziji, kajti nimfe le redko napadejo človeka (Korenberg, 1994).

Za dokazovanje borelij v klopih uporabljamo različne tehnike. Uporabimo lahko osamitev borelij v gojišču, mikroskopiranje v temnem polju ali fazno-kontrastnem mikroskopu, IFT ali PCR.

Čeprav je osamitev v gojišču še vedno zlati standard za dokaz borelijske okužbe, vzame ta metoda preveč časa, ker so borelije počasi rastoče in zahtevne za kultivacijo. Mikroskopiranje v temnem polju je zamudno in naporno. Primernejša metoda bi bila IFT, ki je hitrejša, vendar je pri njej problematična pravilna izbira monoklonskih protiteles ali diagnostičnega seruma za označevanje borelij (Zore, 1998). Zaradi heterogenosti borelijskih površinskih antigenov je izdelava monoklonskih protiteles, ki bi lahko prikazali različne antigene, težavna. Zato smo se odločili za uporabo metode PCR, ki je hitra metoda z dobro občutljivostjo in specifičnostjo. S PCR v naši nalogi lahko dokažemo žive in mrtve mikroorganizme v vzorcu, pomembno je da se DNK ohrani (naši klopi so bili iz leta 2000). Količinsko lahko dokažemo že od 10 do 100 borelij v vzorcu. Končne rezultate testa lahko dobimo že v dveh dneh (Zore, 1998).

Po izolaciji DNK iz klopa je bilo potrebno najprej preveriti pravilnost in učinkovitost postopka izolacije DNK. To smo naredili tako, da smo pri vsakem vzorcu dokazovali kloplno DNK. S tem smo se izognili lažno negativnim rezultatom pri dokazovanju borelijske DNK. Uporabili smo par začetnih oligonukletidov, ki sta jih opisala Black in Piesman v svoji študiji filogenije iksodidnih klopor, temelji pa na dokazu značilnega nukleotidnega zaporedja mitohondrijske DNK za 16S rRNK klopor iz družine Ixodidae (Black in Piesman, 1994). V naši nalogi smo z izbranimi začetnimi oligonukleotidi (16S-1, 16S+2) dokazali kloplno DNK pri vseh 250 klopih (100 %). Postopek izolacije DNK iz klopa je torej bil uspešen.

Kot tarčno zaporedje eventuelno navzočega genoma *B. burgdorferi* sensu lato v klopu smo izbrali del linearnega plazmida in sicer del, ki kodira zunanjo površinsko beljakovino OspA. Raziskave glede okuženosti klopor z vsemi vrstami *B. burgdorferi* sensu lato so

bile v Sloveniji narejene že z mnogimi drugimi tarčnimi zaporedji (Zore, 1998). Večinoma je bil izbran gen za flagelin, ki je lociran na kromosому in zelo homologen tako pri filogenetsko sorodnih (treponeme), kot pri filogenetsko nesorodnih bakterijah (enterobakterije, bacili), zato številni znanstveniki izberejo ta gen za dokazovanje borelij s PCR (Wallich in sod., 1990). Gen za zunanjov površinsko beljakovino OspA pa zaenkrat še ni bil uporabljen v takšnih študijah. Zanimalo nas je, ali lahko z amplifikacijo tega gena dokažemo borelige v klopih. Gen za OspA smo izbrali kljub temu, da ima med različnimi sevi le 80% homologijo (Wilske in sod., 1992) in da se lahko zgodi, da imamo zaradi genskega polimorfizma lažno negativne rezultate (Ružić - Sabljić in sod., 1992).

Za pomnoževanje smo izbrali dva para začetnih oligonukleotidov, saj smo kot diagnostično metodo izbrali nested PCR. Prvi par začetnih oligonukleotidov (Oext1, Oext2) pomnožuje 560 bp velik odsek gena za OspA, drugi par začetnih oligonukleotidov (Oint1, Oint2) pa 351 bp velik odsek znotraj prvega 560 bp velikega PCR produkta.

Da ne pride do nespecifičnega pomnoževanja morajo biti začetni oligonukleotidi optimizirani. Te začetne oligonukleotide je uporabila že Ružić - Sabljić v svoji študiji dokazovanja borelij, izoliranih iz bolnikov z lajmsko boreliozo (Ružić - Sabljić in sod., 1992). Optimizacija protokola PCR tako ni bila potrebna.

Klopi so bili od nabiranja dalje (leta 2000) shranjeni v hladilniku pri 4 °C. Kako ta temperatura vpliva na ohranjenost 49 kb velikega plazmida, na katerem je kodirana beljakovina OspA, ni znano. Sicer so bili klopi shranjeni na suhem v plastičnih posodicah z navojem, v katerih nabiranje kondenza ni mogoče, zato tudi ni verjetno, da bi prišlo do hidrolize DNK. Vemo pa, da je gen za OspA kodiran na plazmidu in lahko hitreje pride do poškodb le-tega kot do poškodb kromosomske DNK.

PCR je občutljiva metoda. Verjetnost kontaminacije vzorca in lažno pozitivnega rezultata je velika. V naši nalogi smo možnost lažno pozitivnih rezultatov zaradi kontaminacije izključili, saj smo med postopkom osamitve in pomnoževanja nukleinskih kislin kontaminacijo preprečevali z upoštevanjem strogih previdnostnih ukrepov. V postopek pomnoževanja želenega odseka DNK smo vključili tudi negativne kontrole in tekom dela so vse negativne kontrole tudi ostale negativne.

Med 250 preiskanimi nimfami smo dokazali *B. burgdorferi* sensu lato s paroma začetnih oligonukleotidov za OspA pri 37 nimfah (14,8 %). Uporabili smo klope z drugih območij kot avtorji prejšnjih študij. Izbrali smo tri območja: Dvorsko vas pri Begunjah na Gorenjskem, Kras (okolica Kozine) in Mežaklo. Po posameznih območjih je bil odstotek okuženih klopor med 9,4 % in 24,1 %.

V primerjavi s predhodnimi študijami narejenimi v Sloveniji v letih 1990, 1993, 1997 in 1997/98 (Ružić - Sabljić in sod., 1993; Strle in sod., 1995a; Zore, 1998; Borko, 2000) smo dobili precej podobne rezultate (preglednica 9). Delež okuženih nimf je bil namreč po letih 4 % (leto 1990), 13 % (leto 1993), 29 % (leto 1997) in 15 % (leto 1997/98). Avtorji teh študij so uporabljali različne metode dokazovanja okužbe klopor. Avtorji prve in četrte študije so okuženost klopor ugotavljali z metodo IFT, Strle in sodelavci so borelije najprej osamili iz klopor, nato pa jih identificirali s PFGE in RFLP. Zore je okužbo klopor dokazovala s PCR, vendar je za tarčno zaporedje pomnoževanja DNK izbrala gen za flagelin.

Rezultate vseh teh študij in naše naloge težko primerjamo, ker so bile uporabljeni različni metodi dokazovanja okužbe klopor, ki se razlikujejo po svoji specifičnosti in občutljivosti.

Rijpkema je s sodelavci v svoji študiji ugotovil, da z IFT dokažemo okužbo pri večjem številu klopor kot s PCR (Rijpkema in sod., 1995). Podobne rezultate je dobila Kampen v svoji študiji. Z IFT je ugotovila 14,4 % okužbo klopor, z običajnim PCR pa 11,9 % (Kampen in sod., 2004). Razlagi za neskladje rezultatov sta lahko dve. Možno je, da pod mikroskopom napačno identificiramo fluorescentne strukture in z metodo IFT dobimo lažno pozitivne rezultate. Lahko pa inhibitorji pomnoževanja povzročijo lažno negativne rezultate, dobljene z metodo PCR (Schwartz in sod., 1997). Zgodilo se je tudi, da je bil rezultat PCR pozitiven, pod mikroskopom pa bakterij ni bilo opaziti. Takšna situacija je lahko posledica neenakomerne razporeditve borelij v črevesju, posebno takrat, kadar je borelij malo (Wittenbrink in sod., 1994). Kampen pa v svoji študiji ni mogla dokazati borelij, čeprav je pod mikroskopom videla veliko število bakterij. Pozitivna kontrola se je pomnoževala, zato je lahko navzočnost zaviralcev izključila (Kampen in sod., 2004). Kampen je poleg IFT in običajnega PCR uporabila tudi metodo nested PCR (v obeh primerih reakcije PCR je za pomnoževanje tarčnega gena izbrala 5S/23S rRNK medgensko

regijo), ki je pokazala še višji odstotek okuženih klopor, in sicer 16,5 % (Kampen in sod., 2004). To je povsem možno, saj z uporabo nested PCR zvišamo občutljivost in specifičnost reakcije (Schmidt, 1997).

Preglednica 9: Različne študije o pogostnosti okuženih klopor *Ixodes ricinus* z bakterijo *Borrelia burgdorferi* sensu lato v Sloveniji.

Študija	Leto študije	Izbrana območja	Metoda	Delež okuženih klopor (vse razvojne stopnje)	Delež okuženih nimf	Vir
1	1990	Tolmin Postojna Kočevje Vevče Koseze Rakov Škocjan	IFT	8 %	4 %	Ružić - Sabljić in sod., 1993
2	1993	Koseze Rakov Škocjan Bled Bohinjska Bistrica Kamniška Bistrica Rožnik	Kultivacija PFGE	19 %	13 %	Strle in sod., 1995a
3	1997	Škofja loka Pokojišče na Lj. vrhu Rakovnik pri Medvodah Brezovica pri Borovnici	PCR	41 %	29 %	Zore, 1998
4	1997/ 98	Pohorje Slovenske gorice Ljubljana Tolmin Kočevje	IFT	17 %	15 %	Borko, 2000

Pri uporabi nested PCR se lahko tudi zgodi, da se število pozitivnih vzorcev prvega pomnoževanja (prvi par začetnih oligonukleotidov) v primerjavi z drugim pomnoževanjem (drugi par začetnih oligonukleotidov) razlikuje. To je ugotovil Davidson, ko je z običajnim PCR z začetnimi oligonukleotidi za OspA dobil več pozitivnih vzorcev kot z nested PCR s

paroma začetnih oligonukleotidov za isto beljakovino (Davidson in sod., 1999). Tudi Kampen je pri nekaj klopih ugotovila, da sta IFT in običajni PCR pozitivna, nested PCR pa negativen, s tem da je ona uporabila začetne oligonukleotide za 5S-23S rRNK medgensko regijo (Kampen in sod., 2004). Tudi pri kliničnih vzorcih se lahko pojavijo razlike med običajnim in nested PCR. To prikazuje Ružić-Sabljić v svoji študiji (Ružić - Sabljić in sod., 1992), kjer je uporabila enake začetne oligonukleotide kot mi v naši nalogi. V tem primeru se je zgodilo, da smo dobili pozitiven rezultat šele po drugem pomnoževanju tarčnega dela DNK.

Slovenija je zelo primerno okolje za klope. Lega in geografske značilnosti z gozdovi, primernimi temperaturami ter primerno vlago omogočajo klopom primerno življenjsko okolje (Tovornik, 1970). Tudi deagrarizacija in propadanje kulturne krajine verjetno bistveno prispevajo k večanju populacije klopor pri nas. Borko v svoji študiji domneva, da so razlogi za visoko stopnjo okuženih nimf v večji koncentraciji živali na pregledovanih območjih in bližina kmetijskih gospodarstev, ki v svoji okolini omogočajo obstoj večjega števila glodalcev in srnjadi (Borko, 2000). Število okuženih klopor narašča. Če primerjamo samo študiji iz leta 1990 in 1993, ki sta obe uporabili klope z območja Kosez, ugotovimo, da je okuženost nimf od leta 1990 narasla z 2 % na 21 % v letu 1993. Odstotek okuženih odraslih klopor se pri tem ni bistveno spremenil - leta 1990 je bilo v Kosezah 32 % okuženih odraslih klopor, leta 1993 pa 31 % (Ružić - Sabljić in sod., 1993; Strle in sod., 1995a).

Na prevalenco okužbe klopor z borelijami vpliva tudi gostota klopor na posameznem območju. Med gostoto klopor in prevalenco okužbe obstaja visoka povezava. V italijanski študiji rezultati kažejo, da je bil višji odstotek okuženih klopor ( $> 70\%$ ) v določenem ekotopu in sicer tam, kjer je večja vlažnost, temperaturni obrati in poraščenost z gozdovi. Tu je bila tudi gostota klopor največja (Cinco in sod., 1998).

Prevalanca okuženosti klopor z *B. burgdorferi* sensu lato se očitno povečuje (preglednica 10). Kampen je ugotovila, da se je odstotek okuženih klopor v Nemčiji v desetih letih povečal s 5,5 % na 14 %, pri čemer se ekološke razmere niso spremajale (Kampen in sod., 2004). Finci so svojo študijo delali s klopi, ki so jih nabrali v rekreacijskih centrih in ugotovili, da je okuženost klopor precejšnja - od 19 % do 55 % (Junttila in sod., 1999). Na

Portugalskem so pesenetljivo ugotovili precej večji odstotek okuženih odraslih klopor - 75 % (De Michelis in sod., 2000) kot drugje po Evropi, kjer je po podatkih iz literature je navadni klop *I. ricinus* okužen največ v 43 % (Cinco in sod., 1998). Odkrili so tudi samo eno vrsto borelij v klopih in sicer *B. lusitaniae* in predvidevajo, da je tako velik odstotek okuženih klopor prav zaradi te vrste, ki ima morda širšo ekološko nišo in je s tem tudi širše navzoča v klopih (De Michelis in sod., 2000). V večini drugih študij so ugotavljali, da je največkrat navzoča *B. garinii* oz. *B. afzelii*, redkeje pa *B. burgdorferi* sensu stricto (Kampen in sod., 2004; Rijpkema in sod., 1995; Derdáková in sod., 2003; Christova in sod., 2001), na Irskem pa so ugotovili, da je v klopih največkrat *B. burgdorferi* sensu stricto (Kirstein in sod., 1997).

V naši nalogi genetske raznolikosti borelij v klopih, nismo določevali.

Preglednica 10: Okuženost klopor vrste *Ixodes ricinus* z bakterijo *Borrelia burgdorferi* sensu lato v nekaterih evropskih državah.

Država	Delež okuženih klopor (vse razvojne stopnje)	Vir
Italija	40 % (0–70 %)	Cinco in sod., 1998
Rusija (Moskva)	13,3 % (5,7–20 %)	Masuzawa in sod., 2005
Škotska	8,5 %	Davidson in sod., 1999
Belgija	23 %	Misonne in sod., 1998
Češka	20,5 %	Derdáková in sod., 2003
Nemčija - južni del	40 % odraslih klopor in 30 % nimf	Rauter in sod., 2002
Nemčija - zahodni del	14 % (5,5–21,8 %)	Kampen in sod., 2004
Irska	18,4 % (11,5–28,9 %)	Kirstein in sod., 1997
Finska	32 % (19–55 %)	Junttila in sod., 1999
Portugalska	75 %	De Michelis in sod., 2000
Nizozemska	13,2 % 19,5 % (IFA) in 15,6 % (PCR)	Schouls in sod., 1999 Rijpkema in sod., 1995
Švedska	11 %	Fraenkel in sod., 2002
Bolgarija	22,3 %	Christova in sod., 2001
Norveška	12 %	Jenkins in sod., 2001

Vedno večjo razširjenost borelij med klopi ugotavljajo tudi pri drugih vrstah klopor iz kompleksa *I. ricinus/persulcatus* (preglednica 11). V povprečju so drugi klopi podobno

okuženi kot *I. ricinus*. V neevropskem delu Rusije, kjer je najpogostejša vrsta klopa *I. persulcatus* ugotavljajo, da so klopi neglede na razvojno stopnjo v povprečju okuženi od 13,3 % (Masuzawa in sod., 2005) do 38 % (Morozova in sod., 2002).

V vzhodnih in osrednjih delih ZDA je največ klopor vrste *I. scapularis*. Ti so z borelijami okuženi v povprečju od 14,3 % (Stafford III in sod., 1998) do 33,6 % (Adelson in sod., 2004).

Seveda tudi rezultatov teh različnih študij ne moremo primerjati, saj so avtorji uporabili različne metode dokazovanja okožbe klopor z borelijami.

Preglednica 11: Okuženost drugih vrst klopor rodu *Ixodes* z bakterijo *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Država	Delež okuženih klopor (vse razvojne stopnje)	Vir
Rusija - zahodna Sibirija	<i>I. persulcatus</i> : 15,2 % (8,6–29,0 %) <i>I. pesulcatus</i> : 38,0 %	Beklemishev in sod., 2003 Morozova in sod., 2002
Rusija - Moskva	<i>I. persulcatus</i> : 13,3 % (9,6–42,9 %)	Masuzawa in sod., 2005
ZDA - Connecticut	<i>I. scapularis</i> : 14,3 % (8,6–24,4 %)	Stafford III in sod., 1998
ZDA - New Jersey	<i>I. scapularis</i> : 33,6 %	Adelson in sod., 2004
ZDA - severovzhodne države	<i>I. scapularis</i> : 20,7 % nimf in 25,0 % odraslih klopor	Wang in sod., 2003

Po končani elektroforezi smo na agaroznem gelu pod UV svetlobo opazili različno intenzivnost sevanja PCR pridelkov. Izolati so sevali od zelo šibko do zelo močno, podobno kot pozitivna kontrola. To lahko vidimo tudi na sliki 6, kjer vzorec št. 9 zelo šibko seva. Verjetno so bili nekateri klopi bolj okuženi kot drugi ali pa so bili nekateri okuženi z več vrstami *B. burdorferi* sensu lato hkrati. Do podobnih ugotovitev je prišel tudi Davidson s sodelavci (1999), ko je opazoval okuženost klopor na Škotskem in ugotovil, da so se nekateri izolati v kulturi pojavili hitreje kot drugi (1 do 6 tednov). Število spirohet v klopih je zelo različno. V klopu je lahko le nekaj spirohet, lahko pa jih je zelo veliko (Burgdorfer in sod., 1982).

Zaključimo lahko torej, da je stopnja okuženosti klopor, ugotovljena v Sloveniji, velika in verjetno še narašča. V naši nalogi smo z nested PCR z začetnimi oligonukleotidi za

zunanjo površinsko beljakovino OspA ugotovili, da so klopi v povprečju okuženi v 14,8 %. Da bi ugotovili, ali lahko temu podatku verjamemo ali ne, bi bilo dobro za primerjavo uporabiti še nekatere druge začetne oligonukleotide pri reakciji PCR ali celo kakšno drugo metodo, kot je IFT ali »Real-time« PCR, pri isti populaciji klopor.

## 5.2 SKLEPI

- Klopi vrste *Ixodes ricinus* v Sloveniji so okuženi z bakterijo *Borrelia burgdorferi* sensu lato.
- V izbrani populaciji klopor smo dokazali prisotnost gena za borelijski zunanji površinski protein OspA z molekularno metodo nested PCR.
- V povprečju je odstotek okuženih klopor 14,8 %.
- Razlike v okuženosti klopor na treh različnih območjih v Sloveniji statistično niso značilne. Na območju Dvorske vasi pri Begunjah na Gorenjskem je bilo okuženih 15,5 % nimf, na območju Krasa 9,4 %, na območju Mežakle pa 24,1 %.
- Pomnoževanje dela gena za OspA je primerna metoda dokazovanja okuženosti klopor.

## 6      POVZETEK

*Borrelia burgdorferi* sensu lato je kompleks več vrst borelij. Najpomembnejše vrste so *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* in *B. afzelii*, ki povzročajo lajmsko boreliozo pri človeku.

Lajmska borelioza je široko razširjena zootonoza. Pojavlja se predvsem v Evropi, številnih azijskih državah in Severni Ameriki. V Sloveniji je endemična. Borelije prenašajo ščitasti klopi rodu *Ixodes*. V Sloveniji je najpogostejša vrsta klop *I. ricinus*. Najpomembnejši gostitelji so mali sesalci, človek je le naključni gostitelj.

Namen naloge je bil ugotoviti odstotek okuženih kloporodov z *B. burgdorferi* sensu lato. Klope smo nabirali leta 2000 na treh območjih v Sloveniji - Dvorska vas pri Begunjah na Gorenjskem, Kras (okolica Kozine) in Mežakla. Zbrali smo 250 kloporodov vrste *I. ricinus* v razvojni stopnji nimfe. Kot metodo dokazovanja okuženosti kloporodov smo uporabili nested PCR s paroma začetnih oligonukleotidov za zunanjo površinsko beljakovino OspA.

V povprečju je bilo okuženih 14,8 % kloporodov, po posameznih območjih pa Dvorska vas 15,5 %, Kras 9,4 % in Mežakla 24,1 %. Razlike v okuženosti kloporodov na treh različnih območjih v Sloveniji niso bile statistično značilne.

Študija je pokazala, da so klopi v Sloveniji okuženi z *B. burgdorferi* sensu lato in da je odsek gena za zunanjo površinsko beljakovino OspA primerno tarčno zaporedje za pomnoževanje borelijske DNK. Tudi metoda nested PCR je primerna metoda za dokazovanje okužbe z borelijami pri prenašalcih. Menimo, da bi bilo potrebno dobljene rezultate primerjati še z rezultati, dobljenimi z amplifikacijo drugih odsekov borelijske DNK. Dodatne študije bodo pokazale ali rezultati, ki smo jih dobili, kažejo dejanski delež okuženih prenašalcev z *B. burgdorferi* sensu lato.

## ZAHVALA

Najprej se iskreno zahvaljujem mentorici doc. dr. Evi Ružić - Sabljić za vsestransko pomoč pri nastajanju diplomskega dela. Hvala za njen čas in trud, ki ga je žrtvovala zame ter za vse nasvete in vzpodbude.

Hvala tudi somentorici dr. Anamariji Zore, ki mi je prijazno priskočila na pomoč s strokovnimi nasveti. Hvala za njen čas in trud ob pregledovanju diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi recenzenti prof. dr Jožici Marin, ki si je vzela čas in skrbno prebrala diplomsko delo.

Zahvaljujem se vsem sodelavkam v Laboratoriju za diagnostiko borelioz in leptospiroze za pomoč pri delu v laboratoriju, za njihovo prijaznost in topel sprejem medse.

Hvala tudi mojim staršem, še posebej mami Jelki. Dajala mi je mnogo koristnih nasvetov, me vzpodbujala in podpirala, kadar mi je šlo dobro, in me tolažila, kadar mi je šlo slabo. Hvaležna sem ji za skrb zame, ne samo v času študija in pri nastajanju diplomskega dela, ampak pri vseh stvareh, ki jih počнем v življenju. Mami, hvala in rada te imam.

Hvala tudi prijateljici Meti, ki si je vzela čas za lektoriranje diplomskega dela.

Hvala tudi Alešu, ki mi je stal ob strani, me vzpodbujal in me ob težkih trenutkih vedno nasmejal.

## 7 VIRI

- Adelson M. E., Rao R.-V. S., Tilton R. C., Cabets K., Eskow E., Fein L., Occi J. L., Mordechai E. 2004. Prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Bartonella* spp., *Babesia microti*, and *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes scapularis* ticks collected in northern New Jersey. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 6: 2799-2801
- Aguero - Rosenfeld M. E., Wang G., Schwartz I., Wormser G. P. 2005. Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 3: 484-509
- Alban S., Johnson P. W., Nelson D. R. 2000. Serum-starvation-induced changes in protein synthesis and morphology of *Borrelia burgdorferi*. *Microbiology*, 146: 119-127
- Anguita J., Hedrick M. N., Fikrig E. 2003. Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the tick and the mammalian host. *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 493-504
- Barbour A G. 1984. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 57: 521-525
- Barbour A. G., Hayes S. F. 1986. Biology of *Borrelia* species. *Microbiological Reviews*, 50, 4: 381-400
- Baril C., Richaud C., Baranton G., Saint - Girons I. S. 1989. Linear chromosome of *Borrelia burgdorferi*. *Research in Microbiology*, 140, 8: 507-516
- Bergey D. H. 1984, 9<sup>th</sup> ed. Vol. 1. Group 1: The spirochetes. V: Bergey's manual of determinative bacteriology. Holt J. G. (ed.). Baltimore, Williams & Wilkins Comp.: 38-62
- Beklemishev A. B., Dobrotvorsky A. K., Piterina A. V., Ivanov I. D., Nomokonova N. Y., Livanova N. N. 2003. Detection and typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes persulcatus* ticks in West Siberia, Russia. *FEMS Microbiology Letters*, 227: 157-161
- Black IV W. C., Piesman J. 1994. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 10034-10038
- Borko Č. 2000. Okuženost klopor vrste *Ixodes ricinus* (Ixodidae, Acarina) z bakterijo *Borrelia burgdorferi* sensu lato na nekaterih območjih v Sloveniji in povezava s stopnjo okuženosti pašnih goved. V: Ljumska borelioza 2000. Zbornik predavanj 2. slovenskega posvetovanja o ljumski boreliozi, Ljubljana, 17-18 nov. 2000. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za ljumsko boreliozo: 35-39
- Borko Č., Ružić - Sabljić E. 2001. Izolacija in identifikacija sevov *Borrelia burgdorferi* sensu lato iz klopor *Ixodes ricinus*. *Slovenian Veterinary Research*, 38, 1: 45-54

- Bronson Ø., Bronson S. H. 1997. Transformation of cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to normal mobile spirochetes. Infection 25, 4: 240-246
- Bronson Ø., Bronson S. H. 1998. *In vitro* conversion of *Borrelia burgdorferi* to cystic forms in spinal fluid, and transformation to mobile spirochetes by incubation in BSK-H medium. Infection, 26, 3: 144-150
- Burgdorfer W., Barbour A. G., Hayes S. F., Benach J. L., Grunwald E., Davis J. P. 1982. Lyme disease – a tick-borne spirochetosis? Science, 216: 1317-1319
- Burgdorfer W. 1995. Lyme disease (borreliosis): a global perspective. Alpe Adria Microbiology Journal, 4: 227-233
- Burgdorfer W. 1996. Lyme borreliosis: of ticks and spirochetes. Acta Dermatovenerologica Alpina, Panonica, et Adriatica, 5, 3-4: 87-92
- Busch U., Nitschko H. 1999. Methods for differentiation of microorganisms. Journal of Chromatography B, 722: 263-278
- Casjens S., Plamer N., van Vugt R., Huang W. M., Stevenson B., Rosa P., Lathigra R., Sutton G., Peterson J., Dodson R. J., Haft D., Hickey E., Gwinn M., White O., Fraser C. M. 2000. A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. Molecular Microbiology, 35, 3: 490-516
- Christova I., Schouls L., van de Pol I., Park J., Panayotov S., Lefterova V., Kantardijev T., Dumler J. S. 2001. High prevalence of granulocytic ehrlichiae and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Bulgaria. Journal of Clinical Microbiology, 39, 1: 4172- 4174
- Cimmino M., Granström M., Gray J. S., Guy E. C., O'Connell S., Stanek G. 1998. European Lyme borreliosis clinical spectrum. Zentralblatt für Bakteriologie, 287: 248-252
- Cinco M., Padovan D., Murgia R., Poldini L., Frusteri L., van de Pol I., Verbeek-De Kruif N., Rijpkema S., Maroli M. 1998. Rate of infection of *Ixodes ricinus* ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* and Group VS116 in an endemic focus of Lyme disease in Italy. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 17: 90-94
- Daniel M., Kolar J., Zeman P., Pavelka K., Sadlo J. 1998. Predictive map of *Ixodes ricinus* high-incidence habitats and a tick-borne encephalitis risk assessment using satellite data. Experimental Applied Acarology, 22: 417-433

- Davidson M. M., Evans R., Ling C. L., Wiseman, A. D., Joss A. W. L., Ho-Yen D. O. 1999. Isolation of *Borrelia burgdorferi* from ticks in the Highlands of Scotland. *Journal of Clinical Microbiology*, 48: 59-65
- De Meeûs T., Lorimier Y., Renaud F. 2004. Lyme borreliosis agents and the genetics and the sex of their vector, *Ixodes ricinus*. *Microbes and Infection*, 6: 299-304
- De Michelis S., Sewell H.-S., Collares-Pereira M., Santos-Reis M., Schouls L. M., Benes V., Holmes E. C., Kurtenbach K. 2000. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from Mainland Portugal. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 6: 2128-2133
- Derdáková M., Beati L., Pet'ko B., Stanko M., Fish D. 2003. Genetic variability within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies established by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the *rrfA-rrlB* intergenic spacer in *Ixodes ricinus* ticks from the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1: 509-516
- De Silva A. M., Fikrig E. 1997. Arthropod- and Host-specific gene expression by *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Investigation*, 99, 3: 377-379
- Eiffer H., Ohlebusch A., Christen H-J., Thomssen R., Spielman A., Matuschka F-R. 1995. Non-differentiation between Lyme disease spirocheates from vector ticks and human cerebrospinal fluids. *Journal of Infectious Diseases*, 171: 474-479
- Eisen L. in Lane R. S. 2002. Vectors of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. V: Lyme borreliosis: Biology, epidemiology and control. Gray J., Kahl O., Lane R. S., Stanek G. (eds.). Wallingford, CABI Pub, 91-115
- Faruki H. 1994. DNA amplification system for *Borrelia burgdorferi*. V: PCR-based diagnostics in infectious disease. Ehrlich G. D., Greenberg S. J. (eds.). Boston, Blackwell: 521-536
- Fernandez J. G., Fernandez M. R., Murillo F. N., Vela M. C. M. 1997. Antigenic and genetic structure of *Borrelia burgdorferi*. *Microbios*, 91: 165-174
- Fingerle V., Hauser U., Liegl G., Petko B., Preac - Mursic V., Wilske B. 1995. Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 7: 1867-1869
- Fingerle V., Liegl G., Munderloh U., Wilske B. 1998. Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks removed from humans. *Medical Microbiology and Immunology*, 187: 121-126

- Fingerle V., Rauser S., Hammer B., Kahl O., Heimerl C., Schulte - Spechtel U., Gern L., Wilske B. 2002. Dynamics of dissemination and outer surface protein expression of different European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains in artificially infected *Ixodes ricinus* nymphs. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 4: 1456-1463
- Fraenkel C.-J., Garpmo U., Berglund J. 2002. Determination of novel *Borrelia* genospecies in Swedish *Ixodes ricinus* ticks. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 9: 3308-3312
- Fraser C. M., Casjens S., Huang W. M., Sutton G. G., Clayton R., Lathigra R., White O., Ketchum K. A., Dodson R., Hickey E. K., Gwinn M., Dougherty B., Tomb J.-F., Fleischmann R. D., Richardson D., Peterson J., Kerlavage A. R., Quackenbush J., Salzberg S., Hanson M., van Vugt R., Palmer N., Adams M. D., Gocayne J., Weidman J., Utterback T., Watthey L., McDonald L., Artiach P., Bowman C., Gerland S., Fujii C., Cotton M. D., Horst K., Roberts K., Hatch B., Smith H. O., Venter J. C. 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, 390: 580-586
- Fuchs H., Wallich R., Simon M. M., Kramer M. D. 1994. The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 12594-12598
- Funa A., Šavs T., Škrgat S. 1996. Kako dolgo imajo bolniki z erythema migrans prisesane klope? *Medicinski Razgledi*, 35: 297-307
- Gray J. S., 1991. The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. *Reviews in Medical and Veterinary Entomology*, 79: 323-333
- Gruntar I. 2000. Proučevanje antigenske zgradbe cističnih oblik *Borrelie garinii*. *Medicinski Razgledi*, 39, 4: 19-23
- Higgins J. A , Azad A, F. 1995. Use of polymerase chain reaction to detect bacteria in arthropods: A review. *Journal of Medical Entomology*, 32, 3: 213-222
- Humair P.-F., Gern L. 2000. The wild hidden face of Lyme borreliosis in Europe. *Microbes and Infection*, 2: 915-922
- Jenkins A., Kristiansen B.-E., Allum A.-G., Aakre R. K., Strand L., Kleveland E. J., van de Pol I., Schouls L. 2001. *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia* spp. in *Ixodes* ticks from southern Norway. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 10: 3666-3671
- Johnson R. C., Schmid G. P., Hyde F. W., Steingerwalt A. G., Brenner D. J. 1984. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiological agent of Lyme disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34: 496-497
- Junntila J., Peltomaa M., Soini H., Marjamäki M., Viljanen M. K. 1999. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in urban recreational areas of Helsinki. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 5: 1361-1365

- Kampen H., Rötzel D. C., Kurtenbach K., Maier W. A., Seitz H. M. 2004. Substantial rise in the prevalence of Lyme borreliosis spirochetes in a region of Western Germany over a 10-year period. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3:1576-1582
- Kirstein F., Rijpkema S., Molkenboer M., Gray J. S. 1997. Local variations in the distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomospecies in *Ixodes ricinus* ticks. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3: 1102-1106
- Kobryn K., Chaconas G. 2002. ResT, a telomere resolvase encoded by the Lyme disease spirochete. *Molecular Cell*, 9: 195-201
- Korenberg E. I. 1994. Comparative ecology and epidemiology of Lyme disease and tick-borne encephalitis in the former Soviet Union. *Parasitology Today*, 10: 157-160
- Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 249 str.
- Kurtenbach K., Schäfer S. M., de Michelis S., Etti S., Sewell H.-S. 2002. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the vertebrate host V: Lyme borreliosis: Biology, epidemiology and control. Gray J., Kahl O., Lane R. S., Stanek G. (eds.). Wallingford, CABI Pub, 117-148
- Lane R. S. 1994. Competence of ticks as vectors of microbial agents with an emphasis on *Borrelia burgdorferi*. V: Ecological dynamics of tick-borne zoonoses. Sonenshine D. E., Mather T. N. (eds.). Oxford, Oxford University Press, 45-67
- Lam T. T., Nguyen T-P. K., Montgomery R. R., Kantor F. S., Fikrig E., Flavell R. A. 1994. Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *Infection and Immunity*, 62: 290-298
- Lesničar J. 1981. Erythema migrans po klo povem vbodu. *Zdravstveni vestnik*, 50: 305-305
- Logar J. 1999. Klopi in pršice (Acarina). V: Parazitologija v medicini. Logar J. (ur.). Ljubljana, DZS: 157-159
- Lottmann H., Wilske B., Herrmann H. 1996. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from *Ixodes ricinus* in Mecklenburg-Vorpommern, Germany. *Medical Microbiology and Immunology*, 184: 181-184
- Madigan M.T., Martinko J. M., Parker J. 2000. Brock biology of microorganisms. 9<sup>th</sup> ed. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall: 991 str.
- Maraspin - Čarman V., Cimperman J., Lotrič - Furlan S., Pleterski - Rigler D., Strle F. 2000. Erythema migrans v nosečnosti. V: Ljumska borelioza 2000. Zbornik predavanj 2. slovenskega posvetovanja o ljumski boreliozi, Ljubljana, 17-18 nov. 2000. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za ljumsko boreliozo: 127-132

- Marconi R. T., Samuel D. S., Garon C. F. 1993. Transcriptional analyses and mapping of the OspC gene in Lyme disease spirochetes. *Journal of Bacteriology*, 175, 4: 926-932
- Masuzawa T., Kharitonov I. G., Kadosaka T., Hashimoto N., Kudeken M., Takada N., Kaneda K., Imai Y. 2005. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated in Moscow province – a sympatric region for *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 294: 455-464
- Misonne M.-C., van Impe G., Hoet P. P. 1998. Genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in Belgium. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 11: 3352-3354
- Morozova O. V., Dobrotvorsky A. K., Livanova N. N., Tkachev S. E., Bakhvalova V. N., Beklemishev A. B., Cabello F. C. 2002. PCR detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, tick-borne encephalitis virus, and the human granulocytic erlichiosis agent in *Ixodes persulcatus* ticks from western Siberia, Russia. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 10: 3802-3804
- Nadelman R. B., Wormser G. P. 1998. Lyme borreliosis. *Lancet*, 352: 557-565
- Norris S. J., Carter C. J., Howell J. K., Barbour A. G. 1992. Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infection and Immunity*, 60: 4662-4672
- O'Connell S., Granström M., Gray J. S., Stanek G. 1998. Epidemiology of European Lyme borreliosis. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 287, 3: 229-240
- Olsen I., Paster B. J., Dewhurst F. E. 2000. Taxonomy of spirochetes. *Anaerobe*, 6: 39-57
- Pal U., Fikrig E. 2003. Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the vector and vertebrate host. *Microbes and Infection*, 5: 659-666
- Paster B. J., Dewhurst F. E., Weisburg W. G., Tordoff L. A., Fraser G. J., Hespell R. B., Stanton T. B., Zablen L., Mandelco L., Woese C. R. 1991. Phylogenetic analysis of the spirochetes. *Journal of Bacteriology*, 173, 19: 6101-6109
- Persing D. H. 1993a. In vitro nucleic acid amplification techniques. V: Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. Persing D. H., Smith T. F., Tenover F. C., White T. J. (eds.). Washington D. C., American Society for Microbiology, 51-87
- Persing D. H. 1993b. Target selection and optimization of amplification reactions. V: Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. Persing D. H., Smith T. F., Tenover F. C., White T. J. (eds.). Washington D. C., American Society for Microbiology, 88-103

Picken M. M., Picken R. N., Han D., Cheng Y., Strle F. 1996. Single-tube nested polymerase chain reaction assay based on flagellin gene sequences for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 15, 6: 489-498

Picken R. N., Cheng Y., Strle F., Cimperman J., Maraspin V., Lotrič-Furlan S., Ružić-Sabljić E., Han D., Nelson J. A., Picken M. M., Trenholme G. M. 1996a. Molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from Slovenia revealing significant differences between tick and human isolates. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 15, 4: 313-323

Picken R. N., Cheng Y., Strle F., Picken M. M. 1996b. Patient isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities of strain 25015. Journal of Infectious Diseases, 174, 5: 1112-1115

Poland G. A., Jacobson R. M. 2001. The prevention of Lyme disease with vaccine. Vaccine, 19: 2303-2308

Preac - Mursic V., Wilske B., Schierz G. 1986. European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks: culture conditions and antibiotic susceptibility. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, A263, 1-2: 112-118

Preac - Mursic V., Wanner G., Reinhardt S., Wilske B., Busch U., Marget W. 1996. Formation and cultivation of *Borrelia burgdorferi* spheroplast-L-form variants. Infection, 24, 3: 218-226

Protocol: Purification of total DNA from animal tissues. 2004. V: DNeasy tissue handbook. Hilden, Qiagen: 18- 20

Randolph S. E., Green R. M., Hoodless A. N., Peacey M. F. 2002. An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. International Journal of Parasitology, 32: 979-989

Rauter C., Oehme R., Diterich I., Engele M., Hartung T. 2002. Distribution of clinically relevant *Borrelia* genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, Real-time PCR. Journal of Clinical Microbiology, 40, 1: 36-43

Rijpkema S. G. T. , Molkenboer M. J. C. H. , Schouls L. M. , Jongejan F. , Schellekens J. F. P. 1995. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. Journal of Clinical Microbiology, 33, 12: 3091-3095

Ružić - Sabljić E., Pipan C., Strle F., Cimperman J., Botta G. A. 1992. Detection of *Borrelia burgdorferi* by the polymerase chain reaction using different primer pairs. Alpe Adria Microbiology Journal, 3, 1: 153-161

Ružić - Sabljić E., Strle F., Cimperman J. 1993. The *Ixodes ricinus* tick as a vector of *Borrelia burgdorferi* in Slovenia. European Journal of Epidemiology, 9, 4: 396-400

Ružić - Sabljić E. 2000. Mikrobiološka diagnostika borelijskih okužb. V: Lymska borelioza 2000. Zbornik predavanj 2. slovenskega posvetovanja o lymski boreliozi, Ljubljana, 17-18 nov. 2000. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za lymsko boreliozo: 155-160

Ružić - Sabljić E., Strle F., Cimperman J., Maraspin - Čarman V., Lotrič - Furlan S., Pleterski Rigler D. 2000. Characterisation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from patients with skin manifestations of lyme borreliosis residing in Slovenia. Journal of Medical Microbiology, 49: 47-53

Ružić - Sabljić E. 2002. Borelige. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur). Ljubljana, Medicinski Razgledi: 293-302

Saint Girons I., Norris S. J., Goebel U. B., Meyer J., Walker E. M., Zuerner R. 1992. Genome structure of spirochetes. Research in Microbiology, 143: 615-621

Sadzine A., Barbour A. G. 1996. Experimental immunization against Lyme borreliosis with recombinant Osp proteins: an overview. Infection, 24, 2: 195-202

Schmidt B. L. 1997. PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. Clinical Microbiology Reviews, 10, 1: 185-201

Schouls L. M., van de Pol I., Rijpkema S. G. T., Schot C. S. 1999. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. Journal of Clinical Microbiology, 37, 7: 2215-2222

Schwan T. G., Burgdorfer W., Garon C. F. 1988. Changes in infectivity and plasmid profile of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, as a result of in vitro cultivation. Infection and Immunity, 56, 8: 1831-1836

Schwartz I., Varde S., Nadelman R. B., Womser G. P., Fish D. 1997. Inhibition of efficient polymerase chain reaction amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in blood-fed ticks. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 56, 3: 339-342

Seiler K. P., Weis J. J. 1996. Immunity to Lyme disease: protection, pathology and persistence. Current Opinion in Immunology, 8: 503-509

Stafford III K. C., Cartter M. L., Magnarelli L. A., Ertel S.-H., Mshar P.A. 1998. Temporal correlation between tick abundance and prevalence of ticks infected with *Borrelia burgdorferi* and increasing incidence of Lyme disease. Journal of Clinical Microbiology, 36, 5: 1240-1244

- Stanek G., Burger I., Hirsch A., Wewalka G., Radda A. 1986. *Borrelia* transfer by ticks during their life cycle. Studies on laboratory animals. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene, A263, 1-2: 29-33
- Stanek G., Strle F. 2003. Lyme borreliosis. Lancet, 362: 1639-1647
- Steere A. C., Malawista S. E., Snydman D. R., Shope R. E., Andiman W. A., Ross M. R., Steele F. M. 1977. Lyme arthritis. An epidemic of oligoarthritis in children and adults in three Connecticut communities. Arthritis and Rheumatism, 20: 7-17
- Steere A. C. 1989. Medical progress. Lyme disease. New England Journal of Medicine, 321, 9: 586-596
- Strle F. 1991. Kakšna je možnost, da po vbodu klopa dobimo lymsko boreliozo? Zdravstveni Vestnik, 60: 140-141
- Strle F., Cheng Y., Nelson J. A., Picken M. M., Bouseman J. K., Picken R. N. 1995a. Infection rate of *Ixodes ricinus* ticks with *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in Slovenia. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 14, 11: 994-1001
- Strle F., Maraspin - Čarman V., Furlan - Lotrič S., Ružič - Sabljić E., Pleterski - Rigler D., Cimperman J. 1995b. Epidemiološke značilnosti lymske borelioze v Sloveniji. Zdravstveni Vestnik, 64: 145-150
- Strle F. 1999. Lyme borreliosis in Slovenia. Zentralblatt für Bakteriologie, 289, 5-7: 643-652
- Strle F. 2000a. Patogeneza Lymske borelioze - klinični vidiki. V: Lymska borelioza 2000. Zbornik predavanj 2. slovenskega posvetovanja o lymski boreliozi, Ljubljana, 17-18 nov. 2000. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za lymsko boreliozo: 47-50
- Strle F. 2000b. Klinična slika Lymske borelioze - uvod. V: Lymska borelioza 2000. Zbornik predavanj 2. slovenskega posvetovanja o lymski boreliozi, Ljubljana, 17-18 nov. 2000. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za lymsko boreliozo: 53-55
- Strle F. 2001. Antibiotic treatment of Lyme borreliosis: our experiences. Acta Dermatovenerologica Alpina, Panonica, et Adriatica, 10, 4: 162-166
- Szczepanski A., Benach J. L. 1991. Lyme borreliosis: Host response to *Borrelia burgdorferi*. Microbiological Reviews, 55, 1: 21-34
- Tovornik D. 1970. Ekosistemi arbovirusnih infekcij v Sloveniji in v nekaterih drugih predelih Jugoslavije. Razprave XIII/I. Ljubljana, Slovenska akademija znanosti in umetnosti: 81 str.

- Wallich R., Moter S. E., Simon M. M., Ebnet K., Heiberger A., Kramer M. D. 1990. The *Borrelia burgdorferi* flagellum-associated 41-kilodalton antigen (flagellin): molecular cloning, expression, and amplification of the gene. *Infection and Immunity*, 58, 6: 1711-1719
- Wang G., van Dam A. P., Schwartz I., Dankert J. 1999. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 4: 633-653
- Wang G., Liveris D., Brei B., Wu H., Falco R. C., Fish D., Schwartz I. 2003. Real-time PCR for simultaneous and quantification of *Borrelia burgdorferi* in field-collected *Ixodes scapularis* ticks from the northeastern United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 8: 4561-4565
- Will G., Jauris - Heipke S., Schwab E., Busch U., Rößler D., Soutcshek E., Wilske B., Preac - Mursic V. 1995. Sequence analysis of *ospA* genes shows homogeneity within *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* strains but reveals major subgrups within the *Borrelia garinii* species. *Medical Microbiology and Immunology*, 184: 73-80
- Wilske B., Luft B., Schubach W. H., Zumstein G., Jauris S., Preac - Mursic V., Kramer M. D. 1992. Molecular analysis of outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi* for conserved and variable antibody binding domains. *Medical Microbiology and Immunology*, 181: 191-207
- Wilske B., Preac - Mursic V., Goebel U. B., Graf B., Jauris S., Soutschek E., Schwab E., Zumstein G. 1993. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 2: 340-350
- Wilske B., Pfister H.-W. 1995. Lyme borreliosis research. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 8: 137-144
- Wilske B. 2003. Diagnosis of Lyme boreliosis in Europe. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, 3, 4: 215-227
- Wittenbrink M. M., Thiele D., Krauss H. 1994. Comparison of dark-field microscopy, culture, and polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Borrelia burgdorferi* in field-collected *Ixodes ricinus* ticks. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 281: 183-91
- Wormser G. P. 1996. Lyme disease vaccine. *Infection*, 24, 2: 203-207
- Xu Y., Johnson R. C. 1995. Analysis and comparison of plasmid profiles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 10: 2679-2685

Xu Y., Kodner C., Coleman L., Johnson R. C. 1996. Correlation of plasmids with infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto type strain B31. Infection and Immunity, 64, 9: 3870-3876

Zore A. 1998. Dokazovanje bakterije *Borrelia burgdorferi* sensu lato v gostiteljih in prenašalcih z verižno reakcijo s polimerazo. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 22-23.

Zore A., Trilar T., Prosenc K., Ružić - Sabljić E., Avšič - Županc T. 2000. Okuženost klopo in malih sesalcev z bakterijami *Borrelia burgdorferi* sensu lato v Sloveniji. V: Lymska borelioza 2000. Zbornik predavanj 2. slovenskega posvetovanja o lymski boreliozi, Ljubljana, 17-18 nov. 2000. Strle F. (ur.). Ljubljana, Društvo za lymsko boreliozo: 27-33