

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Katarina BENULIČ

**GENOTIPIZACIJA *Borrelia burgdorferi* sensu lato Z
UPORABO METODE TIPIZACIJE NA OSNOVI
MULTILOKUSNIH ZAPOREDIJ**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Katarina BENULIČ

**GENOTIPIZACIJA *Borrelia burgdorferi* sensu lato Z UPORABO
METODE TIPIZACIJE NA OSNOVI MULTILOKUSNIH ZAPOREDIJ**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**GENOTYPING OF *Borrelia burgdorferi* sensu lato USING
MULTILOCUS SEQUENCE TYPING**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico imenovala prof. dr. Evo Ružič-Sabljić, za somentorico znan. sod. dr. Tjašo Cerar Kišek in za recenzenta prof. dr. Gorazda Avguština.

Mentorica: prof. dr. Eva Ružič-Sabljić

Somentorica: znan. sod. dr. Tjaša Cerar Kišek

Recenzent: prof. dr. Gorazd Avguštin

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Katja SEME

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: prof. dr. Eva RUŽIĆ-SABLJIĆ

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: znan. sod. dr. Tjaša CERAR KIŠEK

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Član: prof. dr. Gorazd AVGUŠTIN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 10. 9. 2015

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Katarina Benulič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Du2
DK UDK 579.61:616.993:577.2.088(043)=163.6
KG *Borrelia burgdorferi/Borrelia afzelii/genotipizacija/MLST/gospodinjski geni/MluI/RFLP/PFGE/sekvenčni tip/klonski kompleks*
AV BENULIČ, Katarina, dipl. mikrobiol. (UN)
SA RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva(mentorica)/CERAR KIŠEK,
Tjaša(somentorica)/AVGUŠTIN, Gorazd(recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI 2015
IN GENOTIPIZACIJA *Borrelia burgdorferi* sensu lato Z UPORABO METODE TIPIZACIJE NA OSNOVI MULTILOKUSNIH ZAPOREDIJ
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)
OP XI, 61 str., 11 pregl., 4 sl., 1 pril., 146 vir.
IJ Sl
JI sl/en
AI Bakterija *B. afzelii* je najpogosteji povzročitelj kožnih oblik lymske borelioze v Evropi, vendar pa metoda *MluI*-LRFP ne ločuje dobro znotraj te vrste. Zanimalo nas je, ali metoda MLST bolje razlikuje znotraj vrste *B. afzelii* kot metoda *MluI*-RFLP in ali lahko z metodo MLST bolje določimo povezavo med borelijskim tipom in klinično sliko bolnikov. Z metodo restrikcije smo izmed 70 izolatov 66 (94,7 %) izolatov uvrstili v *MluI* podtip Mla1, 2 izolata (2,9 %) v podtip Mla2 in po enega (1,4 %) v podtip Mla3 oziroma Mla4. Z metodo na osnovi multiplih lokusov smo izolatom določili 41 različnih sekvenčnih tipov, od katerih jih je bilo 31 novih glede na podatkovno bazo MLST. Borelije smo uvrstili v šest različnih klonskih kompleksov (CC347, CC479, CC71, CC467, CC476, CC557), 21 sekvenčnih tipov pa med »osamelce«. Ugotovili smo, da metoda multilokusnih zaporedij res bolje razlikuje znotraj vrste *B. afzelii* kot metoda polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov. Nakazali smo tudi povezavo med klinično sliko bolnikov, od katerih smo pridobili posamezne izolate in *MluI* podtipi, nismo pa odkrili povezave med klinično sliko bolnikov in dobljenimi sekvenčnimi tipi.

KEY WORD DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2
DC UDC 579.61:616.993:577.2.088(043)=163.6
CG *Borrelia burgdorferi/Borrelia afzelii/genotyping/MLST/housekeeping genes/MluI/RFLP/PFGE/sequence type/clonal complex*
AU BENULIČ, Katarina, dipl. mikrobiol. (UN)
AA RUŽIĆ-SABLJIĆ, Eva(supervisor)/CERAR KIŠEK, Tjaša(co-advisor)/AVGUŠTIN, Gorazd(reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2015
TI GENOTYPING OF *Borrelia burgdorferi* sensu lato USING MULTILOCUS SEQUENCE TYPING
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XI, 61 p., 11 tab., 4 fig., 1 ann., 146 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The bacterium *Borrelia afzelii* is the commonest causative agent of cutaneous manifestations of Lyme borreliosis in Europe. The *MluI*-LRFP method is not optimal for strain typing in *B. afzelii* species. Our study objective was twofold: (1) to investigate whether MLST has greater discriminatory power in *B. afzelii* than *MluI*-LRFP; (2) to explore whether MLST enables us to make correlations between sequence type and clinical manifestations. We studied 70 isolates. Using *MluI*-LRFP 66 isolates (94.7%) were identified as Mla1, 2 (2.9%) as Mla2 and 1 (1.4%) as Mla3 and Mla4 respectively. Using MLST we identified 41 sequence types, 31 of which were newly described according to the *Borrelia burgdorferi* MLST database. The majority of the isolates (49; 70%) were assigned to six clonal complexes (CC347, CC479, CC71, CC467, CC476, CC557), while 21 (30%) were singlettons. This demonstrates the superior discriminatory power of MLST over *MluI*-LRFP in *B. afzelii*. There appeared to be a correlation between clinical manifestations and *MluI* subtypes, but no correlation was shown for MLST sequence types.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORD DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN.....	1
1.2 HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI.....	2
2.1.1 Taksonomija	2
2.1.2 Morfologija	2
2.1.3 Genom	3
2.2 RAZŠIRJENOST POVZROČITELJA IN INCIDENCA BOLEZNI.....	3
2.3 PATOGENEZA	4
2.4 KLINIČNA SLIKA	5
2.5 MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA	7
2.5.1 Mikroskopiranje.....	7
2.5.2 Kultivacija.....	7
2.5.3 Molekularne metode	9
2.5.4 Serološka diagnostika	9
2.6 ZDRAVLJENJE	10
2.7 PREPREČEVANJE	10
2.8 TIPIZACIJSKE METODE	11
2.8.1 Fenotipizacijske metode pri bakterijah rodu <i>Borrelia</i>.....	13
2.8.1.1 Serotipizacija	13
2.8.1.2 Multilokusna encimska elektroforeza.....	14
2. 8. 2 Genotipizacijske metode pri bakterijah rodu <i>Borrelia</i>.....	14

2.8.2.1 Metoda homologije DNK-DNK	14
2.8.2.2 Metoda polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov celotnega genoma	14
2.8.2.3 Metoda naključno pomnožene polimorfne DNK	17
2.8.2.4 Multilokusna analiza tandemskih ponovitev DNK	17
2.8.2.5 Na pomnoževanje vezana restrikcija DNK	18
2.8.2.6 Metode na osnovi sekvenciranja	18
2.8.2.6.1 Sekvenciranje 16S rRNK	19
2.8.2.6.2 Sekvenciranje genov <i>ospC</i> , <i>ospA</i>	19
2.8.2.6.3 Tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij	20
2.8.2.6.4 Sekvenciranje celotnega genoma	22
3 MATERIAL IN METODE	23
3.1 MATERIAL	23
3.1.1 Material za metodo polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov in elektroforezo v utripajočem električnem polju	23
3.1.1.1 Uporabljeni reagenti, material in naprave	23
3.1.2 Material za metodo tipizacije na osnovi multilokusnih zaporedij	24
3.1.2.1 Uporabljeni reagenti, material in naprave	24
3.1.2.2 Programi za analizo	25
3.2 METODE	25
3.2.1 Metoda polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov in elektroforeza v utripajočem električnem polju	25
3.2.1.1 Izolacija DNK iz bakterijske kulture z metodo inkorporacije v gelu	25
3.2.1.2 Rezanje DNK z restrikcijskim encimom <i>MluI</i>	26
3.2.1.3 Elektroforeza v utripajočem električnem polju	26
3.2.2 Metoda tipizacije na osnovi multilokusnih zaporedij	26
3.2.2.1 Pridobivanje DNK iz agaroznih blokcev	26
3.2.2.2 Prva stopnja vgnezdenega oz. polvgnezdenega PCR	27
3.2.2.3 Druga stopnja vgnezdenega oz. polvgnezdenega PCR	29
3.2.2.4 Agarozna gelska elektroforeza	30
3.2.2.5 Čiščenje pridelkov PCR	31
3.2.2.6 Sekvenčna reakcija	31
3.2.3 Analiza rezultatov	32

4 REZULTATI.....	34
5 RAZPRAVA.....	38
5.1 RAZNOLIKOST ZNOTRAJ VRSTE	38
5.2 POVEZAVA MED PODTIPI IN SEKVENČNIMI TIPI.....	41
5.4 POVEZAVA MED SEKVENČNIMI TIPI, KLONSKIMI KOMPLEKSI IN KLINIČNO SLIKO	43
6 SKLEPI	45
7 POVZETEK.....	46
8 VIRI	47
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Občutljivost in specifičnost metod na osnovi verižne reakcije s polimerazo za različne klinične vzorce (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005: 491)	9
Pregl. 2: Restrikcijski vzorci borelijskega genoma, rezanega z restrikcijskim encimom <i>MluI</i> (Ružić-Sabljić in Cerar, 2014)	16
Pregl. 3: Gospodinjski geni in njihovi pridelki, ki se uporabljajo v shemi analize multilokusnih zaporedij za bakterijo <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato (Wang in sod., 2014: 12C.5.12)	21
Pregl. 4: Oligonukleotidni začetniki za borelijske gospodinjske gene za prvo in drugo stopnjo pomnoževanja in velikost pridelka (Aanensen in Spratt, 2005)	27
Pregl. 5: Pogoji za prvo stopnjo pomnoževanja za borelijske gene <i>nifS</i> , <i>clpA</i> , <i>rplB</i> , <i>pyrG</i> , <i>clpX</i> , <i>pepX</i> in <i>uvrA</i>	29
Pregl. 6: Pogoji za prvo stopnjo pomnoževanja za borelijski gen <i>recG</i>	29
Pregl. 7: Pogoji za drugo stopnjo pomnoževanja za borelijske gene <i>nifS</i> , <i>clpA</i> , <i>rplB</i> , <i>pyrG</i> , <i>clpX</i> , <i>pepX</i> in <i>uvrA</i>	30
Pregl. 8: Pogoji za drugo stopnjo pomnoževanja za borelijski gen <i>recG</i>	30
Pregl. 9: Pogoji za sekvenčno reakcijo	32
Pregl. 10: Podtipi vrste <i>Borrelia afzelii</i> in število izolatov, ki smo jim z metodo polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov določili posamezen podtip	34
Pregl. 11: Posamezni klonski kompleksi in sekvenčni tipi, ki spadajo vanje, borelijski podtipi določeni z metodo polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (<i>MluI-LRFP</i>) ter klinična slika pri bolniku iz katerega smo pridobili določen izolat	36

KAZALO SLIK

Sl. 1: Erythema migrans (Gathany, 2007)	6
Sl. 2: Acrodermatitis chronica atrophicans (Stanek in sod., 2012: 466)	6
Sl. 3: Primer gela pri metodi polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov, rezanih z encimom <i>MluI</i>)	34
Sl. 4: Prikaz sorodnosti z izrisom minimalnega vpetega drevesa za izolate bakterije <i>Borrelia afzelii</i> , pridobljene z metodo tipizacije na osnovi multilokusnih zaporedij.....	37

KAZALO PRILOG

Priloga A: Oznake izolatov z določenimi borelijskimi podtipi glede na metodo polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (*MluI-LRFP*), ter z alelnimi številkami in sekvenčnimi tipi (ST) določenimi z metodo tipizacije na osnovi multilokusnih zaporedij.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ΔT_m	sprememba temperature taljenja DNK
CC	klonski kompleks (angl. clonal complex)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
kb	kilobaza
LRFP	različica RFLP, kjer uporabimo encime, ki v genomu redkeje režejo (angl. large restriction fragment pattern)
Mb	megabaza
MKP	modificirano Kelly-Pettenkoferjevo gojišče, namenjeno gojenju borelij
Mla	različica bakterije <i>Borrelia afzelii</i> , določena z metodo RFLP-PFGE
MLEE	encimska elektroforeza na osnovi multiplih lokusov (angl. multi-locus enzyme electrophoresis)
MLST	tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij (angl. multi locus sequence typing)
MLVA	analiza multiplih lokusov za tandemne ponovitve DNK v spremenljivem številu (angl. multiple-locus variable number tandem repeat analysis)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PFGE	elektroforeza v utripajočem električnem polju (angl. pulse-field gel electrophoresis)
RAPD	metoda naključno pomnožene polimorfne DNK (angl. random amplified polymorphic DNA)
RFLP	metoda polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. restriction fragment length polymorphism)
rRNK	ribosomska ribonukleinska kislina
ST	sekvenčni tip (angl. sequence type)
VNTR	tandemska ponavljajoče se sekvence DNK v spremenljivem številu (angl. variable number tandem repeats)

1 UVOD

Lymska borelioza je zoonotska bolezen, pri kateri so vektorji ščitasti klopi rodu *Ixodes* spp. in gostitelji različni vretenčarji. V Sloveniji je incidenčna stopnja lymske borelioze zelo visoka (Sočan, 2011). Najpogosteji povzročitelji človeške lymske borelioze v Evropi so bakterije *Borrelia afzelii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* in *B. spielmanii* (Wang in sod., 2014). Za njihovo razlikovanje uporabljamo različne genotipizacijske metode. Med bolj poznanimi je metoda polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. restriction fragment lenght polymorphism, RFLP) oziroma njena različica LRFP (angl. large restriction fragment pattern), pri kateri z uporabo restrikcijskega encima *MluI* režemo genomsko DNK na večje fragmente, ki jih ločujemo z elektroforezo v utripajočem polju (angl. pulse-field gel electrophoresis, PFGE). S to metodo dobro ločujemo seve znotraj vrst *B. garinii* in *B. burgdorferi* sensu stricto, težavo pa predstavlja *B. afzelii*, ker tipizacija z omenjeno metodo ne omogoča dobrega ločevanja znotraj te vrste (Belfazia in sod., 1993; Ružić-Sabljić in sod., 2008). Razlikovanje znotraj te vrste bi lahko bolje omogočila metoda tipizacije na osnovi multilokusnih zaporedij (angl. multilocus sequence typing, MLST), kjer pomnožimo odseke osmih gospodinjskih genov, jih sekvenciramo in sekvenco primerjamo s podatkovno bazo MLST, prosto dostopno na spletu (Maiden in sod., 1998; Margos in sod., 2008; Aanensen in Spratt, 2005).

1.1 NAMEN

Izolatom, ki smo jih pridobili iz bolnikov s sumom na kožno obliko lymske borelioze, smo žeeli določiti podtip z metodo *MluI*-LRFP. Hkrati smo jih hoteli tipizirati tudi z metodo tipizacije na osnovih multilokusnih zaporedij (MLST), pri kateri smo uporabili osem gospodinjskih genov (*clpA*, *clpX*, *nifS*, *pepX*, *pyrG*, *recG*, *rplB* in *uvrA*), ki smo jih sekvencirali. Naš cilj je bil, da dokažemo, da metoda MLST bolje razlikuje znotraj vrste *B. afzelii*, kot metoda *MluI*-LRFP. Želeli smo tudi ugotoviti ali obstaja povezava med klinično sliko bolnikov in različnimi sekvenčnimi tipi, določenimi z metodo MLST, oziroma podtipi, ki smo jih določili z metodo *MluI*-LRFP.

1.2 HIPOTEZE

Predvidevamo:

- da bomo z uporabo metode MLST lahko ločevali znotraj vrste *B. afzelii*,
- da bomo z metodo MLST bolje razlikovali znotraj vrste *B. afzelii* kot z metodo *MluI*-LRFP,
- da bomo pokazali povezavo med klinično sliko bolnikov in sekvenčnimi tipi, določenimi z metodo MLST,
- da nam bo dala metoda MLST več možnosti za prikaz povezave med klinično sliko in borelijsko različico kakor *MluI*-LRFP.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI

2.1.1 Taksonomija

Trenutno je opisanih več kot 40 vrst v rodu *Borrelia*. Skupina spirohet, ki povzročajo lymsko boreliozo tvori kompleks bakterijskih vrst *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu lato; sensu lato – v širokem pomenu), ki ga sestavlja 20 genospecies, kamor spadajo tudi *B. burgdorferi* sensu stricto (sensu stricto – v ožjem pomenu), *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. spielmanii*, *B. lusitaniae*, *B. bissettii* in *B. valaisiana*, več kot 20 drugih vrst borelij pa povezujejo s povratno mrzlico (Wang in sod., 2014).

Spirohete predstavljajo filogenetsko staro in oddaljeno skupino med prokarionti. Trenutno spadajo v en red *Spirochaetales*, v razredu *Spirochaetia* in deblu *Spirochaetes* phy. nov. V drugi izdaji priročnika Bergey's Manual of Systematic Bacteriology red *Spirochaetales* razdelijo v štiri družine: *Spirochaetaceae*, *Brachyspiraceae*, *Brevinemataceae* in *Leptospiraceae* (Ludwig in sod., 2010).

2.1.2 Morfologija

Kot je značilno za vse spirohete, so borelijske celice vijačne oblike, široke od 0,2 do 0,5 μm in dolge od 10 do 30 μm . Zunanja celična membrana obkroža protoplazemski cilindrični kompleks, ki sestoji iz citoplazme, notranje celične membrane in peptidoglikana. Bički se nahajajo v periplazemskem prostoru med zunanjim celičnim membranom in protoplazemskim cilindrom, kar omogoča celici značilno gibanje (Barbour in Hayes, 1986; Wang in sod., 2014). Na osnovi morfologije je praktično nemogoče razločevati med različnimi vrstami znotraj rodu *Borrelia*, zato je identifikacija in diferenciacija različnih vrst ter sevov odvisna predvsem od njihovih genetskih značilnosti (Wang in sod., 2014).

Borelige imajo pri pogojih *in vitro*, kadar se soočajo z neugodnimi pogoji v okolju, sposobnost preobrazbe iz običajne, gibljive, oblike v neobičajno, ki ji pravimo okrogla telesca (Brorson in Brorson, 1997; Brorson in sod., 2009). Manj avtorjev opisuje prisotnost te oblike tudi v okuženem tkivu (Miklossy in sod., 2008; Gruntar in sod., 2001). Atipične oblike vključujejo oblike gumbkov, formacije v obliki zank in krogov, ciste iz ene ali več spirohet in mase, podobne kolonijam iz številnih cističnih oblik. Ko spirohete, ki so bile izpostavljene različnim stresnim pogojem v okolju, ponovno gojimo v optimalnih pogojih, se preobrazijo nazaj v običajno vijačno obliko (Miklossy in sod., 2008).

2.1.3 Genom

Genom seva B31 bakterije *B. burgdorferi* je sestavljen iz približno 910 kb dolgega linearnega kromosoma in variabilnega števila krožnih in linearnih plazmidov v velikosti od 9 do 62 kb (Fraser in sod., 1997; Wang in sod., 2014). Za razliko od prostoživečih bakterij je genom *B. burgdorferi* sensu lato relativno majhen, kar je verjetno posledica dejstva, da je bakterija obligatni parazit. Bakterija nima prepoznavnega sistema za sintezo nukleotidov, aminokislin, maščobnih kislin in encimskih kofaktorjev, te komponente očitno dobi od gostitelja (Fraser in sod., 1997).

Sevi *B. burgdorferi* sensu lato se med seboj razlikujejo po plazmidnem profilu, saj se plazmidi lahko razlikujejo po številu in velikosti, kar je pomembno za primerjavo in razlikovanje med sevi iste vrste (Xu in Johnson, 1995; Glinšek Biškup in sod., 2011).

Za razvoj molekularnih tipizacijskih metod so uporabili ravno genetske značilnosti borelij, kot so izredno ohranjen vrstni red genov in unikatno organizacijo rRNK (Wang in sod., 2014).

2.2 RAZŠIRJENOST POVZROČITELJA IN INCIDENCA BOLEZNI

Borelije, ki povzročajo lymsko boreliozo, se v naravi ohranjajo preko kompleksnega zoonotskega prenašalnega cikla, ki vključuje ščitaste klope rodu *Ixodes* spp. Klopi prenašajo spirohete med vretenčarskimi gostitelji, kot so ptice in sesalci. Borelijske vrste, ki povzročajo lymsko boreliozo, se razlikujejo po specifičnosti za gostitelja. Specializacija na posameznega gostitelja je pomembna pri boleznih, ki jih prenašajo vektorji. Vrsti *B. garinii* in *B. valaisiana* prenašajo ptice, medtem ko *B. afzelii* povezujejo predvsem z mišmi in voluharicami. *B. burgdorferi* sensu stricto je prilagojena na sesalce ali ptice. Seve *B. burgdorferi* sensu lato lahko tako razdelimo na vsaj tri ekološke skupine: seve prilagojene na majhne sesalce, seve prilagojene na ptice in seve, ki niso specializirani (Kurtenbach in sod., 2002; Vollmer in sod., 2011).

Pet vrst borelij redno najdemo pri ljudeh. Ti povzročitelji človeške lymske borelioze so *B. burgdorferi* sensu stricto v Severni Ameriki in Evropi, *B. garinii*, *B. bavariensis* in *B. afzelii* v Evropi in Aziji, ter *B. spielmanii* v Evropi. Status patogenosti je nejasen pri vrstah, kot so *B. lusitaniae*, *B. bissettii* in *B. valaisiana*, ker jih redko povezujemo z bolniki. Tipizacijski sistemi, ki natančno opredelijo vrste in seve znotraj vrst, so ključni za epidemiološke, klinične in evolucijske študije (Wang in sod., 2014).

Lymska borelioza se pojavlja od Severne Amerike, preko celotne Evrope, severnih delov Afrike in severnega dela Azije. Obstoј lymske borelioze na južni polobli ni bil nikoli zanesljivo potrjen (Hubálek, 2009).

Incidenca lymske borelioze je povezana s prevalenco in ekologijo vektorja, v Evropi pa regionalno variira (Steere in sod., 2004; Hubálek, 2009). Povprečno število primerov v posamezni državi niha od manj kot 100 do več kot 20.000 na leto glede na podatke, ki so dostopni za med leti 1992 in 2001 (Lindgren in Jaenson, 2006).

Najvišja incidenca lymske borelioze je bila med leti 1992 in 2001 v osrednjem delu Evrope (npr. Slovenija 155/100.000), najnižja pa v Veliki Britaniji (0,7/100.000) in na Irskem (0,6/100.000) (Lindgren in Jaenson, 2006). Prijava primerov lymske borelioze je obvezna samo v nekaterih evropskih državah, zato je prava incidenca bolezni verjetno višja. Enostavno tudi spregledamo bolezenske znake, še posebej, če se značilen izpuščaj sploh ne pojavi, prav tako pa laboratoriji ne uporabljajo vedno primerljivih diagnostičnih testov (Lindgren in Jaenson, 2006).

Po dostopnih podatkih se je v Sloveniji med letoma 1992 in 2011 incidenčna stopnja povečala s 76/100.000 na 273/100.000, kar pomeni povečanje za 247 %. Največ prijav je po pričakovanjih v poletnih mesecih (Sočan, 2011).

V Evropi iz kliničnega materiala najpogosteje izolirajo *B. afzelii*, sledi ji *B. garinii*, medtem ko je *B. burgdorferi* sensu stricto redko izolirana vrsta (Ružić-Sabljić in sod., 2002; Fingerle in sod., 2008; Grygorczuk in sod., 2013).

Erythema migrans, nevroboreliozo in arthritis povzroča v Severni Ameriki *B. burgdorferi* sensu stricto. V Evropi pa je najpogostejši povzročitelj borelijskih kožnih obolenj *B. afzelii*, lymsko nevroboreliozo povzroča najpogosteje *B. garini*, medtem ko z okužbami sklepov povezujejo bakterijo *B. burgdorferi* sensu stricto (Strle in Stanek, 2009; Lünemann in sod., 2001; Picken in sod., 1998; Busch in sod., 1996; Jaulhac in sod., 2000; Ružić-Sabljić in sod., 2002).

2.3 PATOGENEZA

Genom ne kodira prepoznavnih toksinov, bakterija namreč povzroča okužbo s premikanjem skozi tkivo, pritrjevanjem na gostiteljske celice in z izogibanjem imunskemu odzivu (Steere in sod., 2004). Večina poškodb v tkivu nastane zaradi vnetnega odziva gostitelja (Stanek in sod., 2012).

Spirohete lahko preživijo v mirujočem stanju v črevesju nimf kloporod iz rodu *Ixodes* celo jesen, zimo in zgodnjo pomlad, vmes pa izražajo predvsem zunano površinsko beljakovino A (angl. outer surface protein, OspA). Ko se klop spomladi ali v začetku poletja hrani na vretenčarju, se v prebavilih klopa spodbudijo borelije, ki se fenotipsko spremenijo. Spremenijo izražanje številnih borelijskih beljakovin, med drugim se zmanjša produkcija OspA in poveča produkcija OspC, ki je potreben za prenos iz črevesja klopa do

žlez slinavk in naprej v vretenčarskega gostitelja. Ta proces traja nekaj dni. Razmerje med OspA in OspC se ponovno obrne, ko se klop preneha hraniti na gostitelju (Schwan in Piesman, 2000; Steere in sod., 2004; Pal in sod., 2004).

OspA, OspB in OspC so najpomembnejši borelijski antigeni (Wilske in sod., 1988; Dressler in sod., 1993).

OspA je receptor za plazminogen. Borelije vežejo gostiteljski plazminogen in njegove aktivatorje, zaradi česar se plazminogen pretvori v plazmin (Fuchs in sod., 1994). Plazminogen in aktivatorji se nahajajo v krvi, ki jo klop zaužije, kar olajša širjenje bakterije po klopu (Coleman in sod., 1995). Plazmin igra pomembno vlogo tudi pri razgradnji ekstracelularnega matriksa, zaradi česar bakterija lažje prodre skozi endotelij v gostitelju, kar vodi k povečani invazivnosti (Bugge in sod., 1996; Coleman in sod., 1995).

Bakterije lahko z rekombinacijo hitro spremenijo antigenske lastnosti površinskih lipoproteinov znanih kot VlsE (angl. variable major protein-like sequence expressed) s čimer se izogibajo imunskemu odzivu (Zhang in sod., 1997).

Bakterija pri rasti *in vitro* ne potrebuje železa, saj pri tistih metaloproteazah, ki jih najdemo pri bakteriji, namesto železa vključi mangan (Posey in Gherardini, 2000). To mogoče omogoča borelijam, da se izognejo običajni gostiteljevi obrambi, ki vključuje tudi omejevanje železa (Steere in sod., 2004).

2.4 KLINIČNA SLIKA

Klinična slika lymske borelioze se lahko kaže na koži, razširjanje patogena v druga tkiva in organe pa povzroči hujše oblike bolezni živčevja, srca ali sklepov (Stanek in sod., 2012). Najpogostejši klinični znak je erythema migrans, ki je značilna zgodnja oblika bolezni (Ružić-Sabljić in sod., 2002).

Po prenosu borelije lymska borelioza običajno poteka v stadijih. Zgodnja okužba sestoji iz prvega stadija, v katerem se lahko pojavi omejena okužba kože imenovana erythema migrans, ki ji po nekaj dneh ali tednih sledi drugi stadij, v katerem se povzročitelj razširi in povzroči nevrološke motnje ali nepravilnosti na srcu, mesecu ali letu kasneje pa v tretjem stadiju lahko pride do perzistentne okužbe različnih organov npr. acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) in artritisa. Ni nujno, da se pri pacientih pojavijo vsi stadiji, stadiji pa se lahko med seboj tudi prekrivajo (Steere in sod., 1983).

Erythema migrans je najpomembnejši in najpogostejši klinični znak lymske borelioze. Pri pojavu erythema migrans se dneve ali tedne po ugrizu klopa na koži pokaže majhna rdeča makula ali papula. Ko se rdečina povečuje, v sredini običajno nastane čistina, kar daje

videz kroga oziroma prstana (sl. 1) (Steere, 1983; Stanek in Strle, 2003). Multipli erythema migrans predstavlja diseminirano okužbo, saj gre za razsoj borelij iz primarnega erythema migrans (Wormser in sod., 2008; Rojko, 2012a).

Acrodermatitis chronica atrophicans je relativno pogosta kronična kožna manifestacija lymske borelioze. Gre za vztrajajoča rdeča ali modro rdeča lezijo, običajno na ekstenzijskih površinah rok in nog (sl. 2). Lezije se zelo počasi povečujejo, sčasoma postanejo atrofične in vijolične barve (Asbrink in Hovmark, 1988; Stanek in Strle, 2003; Stanek in sod., 2011).



Slika 1: Erythema migrans (Gathany, 2007)



Slika 2: Acrodermatitis chronica atrophicans
(Stanek in sod., 2012: 466)

Borelijski limfocitom je trša modro -rdeča zateklina, najpogosteje na ušesni mečici, ki se običajno pojavi pri otrocih. Gre za reden pojav (Asbrink in Hovmark, 1988; Strle in sod., 1992; Stanek in Strle, 2003).

Lymska nevroborelioza se pri odraslih kaže predvsem kot meningoradikulitis, meningitis in periferna paraliza obraznega živca, redkeje encefalitis, mielitis in zelo redko možganski vaskulitis. Pri otrocih se pojavljata predvsem meningitis in periferna paraliza obraznega živca (Stanek in Strle, 2003; Stanek in sod., 2011).

Lynski karditis je reden pojav, pri katerem najpogosteje pride do motenj v delovanju prevodnega sistema srca, motenj ritma in včasih miokarditisa ali perikarditisa (Steere, 1980; Sigal, 1995; Stanek in sod., 2011).

Za lymski artritis so značilni ponavljajoči se napadi ali vztrajajoče zatekanje sklepov v enem ali več večjih sklepih. Sklepi so boleči, otekanje pa lahko traja nekaj dni ali tednov, včasih pa celo nekaj mesecev. Sama bolezen se običajno ponavlja in lahko traja več let (Steere in sod., 1987; Stanek in Strle, 2003; Stanek in sod., 2011).

2.5 MIKROBIOLOŠKA DIAGNOSTIKA

Za neposredno dokazovanje borelij se v diagnostiki uporablajo štiri pristopi: testi na osnovi mikroskopiranja, detekcija specifičnih borelijskih beljakovin ali nukleinskih kislin in kultivacija (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005).

Mikrobiološka potrditev okužbe je potrebna pri vseh kliničnih oblikah lymske borelioze, razen pri pojavu erythema migrans. Idealno bi povezavo s povzročiteljem dokazali s kultivacijo ali s pomnoževanjem specifičnih odsekov DNK iz lezij na koži, cerebrospinalne tekočine, sklepne tekočine ali krvi, vendar je neposredno dokazovanje najbolj uspešno prav pri zgodnjih kožnih manifestacijah, ki jih običajno identificirajo klinično (Stanek in Strle, 2003; Aguero-Rosenfeld in sod., 2005).

Ker lahko kultivacijo in molekularne metode na osnovi verižne reakcije s polimerazo (angl. polymerase chain reaction, PCR) zadovoljivo izvajajo samo v nekaterih laboratorijih, se v diagnostiki najpogosteje uporablajo testi za dokazovanje protiteles (Stanek in Strle, 2003).

Material za metode dokazovanja moramo odvzeti pod aseptičnimi pogoji, pred protimikrobno terapijo (Wilske in Preac-Mursic, 1993). Telesne tekočine prenašamo brez dodatkov, vzorce biopsij pa moramo prenesti v majhno količino sterilne solne raztopine ali primernega gojišča (Wilske in Preac-Mursic, 1993; Broqui in sod., 2004). Vzorce poskušamo čim hitreje prenesti do laboratorija (v dveh do štirih urah), še prej pa moramo obvestiti laboratorij, da se dogovorimo o podrobnostih samega odvzema in prenosa vzorca (Broqui in sod., 2004).

2.5.1 Mikroskopiranje

Mikroskopiranje je uporabno za vzorce, v katerih lahko pričakujemo visoko koncentracijo borelij, kot so npr. borelijske kulture, ima pa omejeno klinično uporabnost zaradi majhnega števila borelij v kliničnih vzorcih, zato se uporablja predvsem za epidemiološke študije, pri katerih uporabljajo vzorce iz klopoval (Wilske in Preac-Mursic, 1993; Wilske, 2002; Aguero-Rosenfeld in sod., 2005). Borelige težko barvamo in med fiksacijo in barvanjem zlahka izgubijo svoje morfološke značilnosti, zato priporočajo metodo mikroskopiranja v temnem polju (Wilske in Preac-Mursic, 1993).

2.5.2 Kultivacija

Izolacija borelij iz kliničnega materiala je zlati standard pri potrjevanju okužb z borelijami. Kultivacija in izolacija borelij je zahteven postopek z omejeno občutljivostjo, je pa posebej

uporabna v prvih nekaj tednih okužbe, ko so serološki testi še negativni (Berger in sod., 1992; Ružić-Sabljić in sod., 2006).

V rutinski diagnostiki se najpogosteje uporablja tri tekoča gojišča: modificirano Kelly-Pettenkoferjevo gojišče (MKP), gojišče Barbour-Stoenner-Kelly II (BSK-II) in komercialno dostopno gojišče BSK-H (Sigma, ZDA), pri čemer gre za variacije Kellyjevega tekočega gojišča (Barbour 1984; Preac-Mursic in sod., 1986; Aguero-Rosenfeld in sod., 2005). BSK-H je standardizirana različica gojišča BSK (Pollack in sod., 1993). *B. burgdorferi* sensu lato lahko raste tudi na poltrdnem gojišču BSK, kar nam omogoča, da pridobimo posamezne čiste klone (Preac-Mursic in sod., 1991; Aguero-Rosenfeld in sod., 2005).

Genom kodira zelo malo beljakovin z znano biosintetsko aktivnostjo, zato imajo borelije zahtevne prehranske potrebe (Steere in sod., 2004). Običajno mora gojišče vsebovati serum, glukozo, albumin, peptide, aminokisline, vitamine, anorganske soli in snov za zgoščevanje, kot je želatina. Dodajajo se tudi N-acetilglukozamin in dolgoverižne nasičene in nenasičene maščobne kisline (Wang in Schwartz, 2010; Preac-Mursic in sod., 1991; Aguero-Rosenfeld in sod., 2005).

Borelije najbolje rastejo pri anaerobnih ali mikroaerofilnih pogojih pri 30–34 °C (Barbour 1984; Preac-Mursic in Wilske, 1993). Nekateri sevi dobro rastejo tudi pri temperaturah med 35 in 39 °C, pri temperaturah nad 40 °C pa ni rasti ali je rast zmanjšana (Barbour, 1984; Aguero-Rosenfeld in sod., 2005). Generacijski čas, ki je odvisen od dostopnih hranil in pogojev kultivacije, je dolg in se giblje med 7 in 20 urami (Preac-Mursic in Wilske, 1993). Kultivacija traja do devet tednov (Ružić-Sabljić in sod., 2002).

Borelije lahko izoliramo iz različnih kliničnih materialov, kot so koža, kri in cerebrospinalna tekočina (Ružić-Sabljić in sod., 2002). Vzorci biopsije kože so najboljši material za izolacijo *B. burgdorferi* sensu lato, saj lahko borelije izoliramo iz večine nezdravljenih pacientov z zgodnjo in pozno kožno boreliozo (erythema migrans, acrodermatitis chronica atrophicans) (Broqui in sod., 2004).

Uspešnost kultivacije iz kliničnih vzorcev je zelo različna. V povprečju se giblje med 50 in 90 % za vzorce biopsije kože pri pojavu erythema migrans, ter manj kot 10 % za vzorce krvi, cerebrospinalne tekočine in sklepne tekočine (Berger in sod., 1992; Nowakowski in sod., 2001; Maraspin in sod., 2002; Wilske in Preac-Mursic, 1993; Stanek in Strle, 2003; Aguero-Rosenfeld in sod., 2005).

Kultivacija se v rutinski diagnostiki običajno ne uporablja zaradi več razlogov. Eden izmed razlogov je težavno pridobivanje gojišča, ki mora biti stalno enake kakovosti, metoda je tudi draga, časovno zamudna, na pozitivnost kulture vplivajo že najmanjši odmerki

antibiotikov. Verjetno najpomembnejša omejitev je majhna občutljivost kultivacije pri vzorcih iz bolnikov, ki nimajo kožnih, temveč druge oblike bolezni. Diagnoza je ravno pri takih bolnikih najbolj težavna (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005).

2.5.3 Molekularne metode

Pri molekularni diagnostiki borelijskih okužb se uporablja predvsem tehnike na osnovi verižne reakcije s polimerazo (angl. polymerase chain reaction, PCR) (Broqui in sod., 2004; Aguero-Rosenfeld in sod., 2005). Molekularne metode so hitrejše v primerjavi s kultivacijo, kjer je za potrditev negativnega rezultata potrebno vzorce inkubirati do devet tednov (Ružić-Sabljić in sod., 2002). Prav tako lahko v prvih nekaj tednih, ko protiteles proti borelijam še ni in serološki testi še niso zanesljivi, DNK z molekularnimi metodami že zaznamo (Schmidt, 1997). Take metode niso standardizirane in validirane, njihova uporaba pa ni razširjena predvsem zaradi nizke občutljivosti pri vzorcih krvi in cerebrospinalne tekočine (pregl. 1) (Broqui in sod., 2004, Aguero-Rosenfeld in sod., 2005).

Opisali so metode, ki temeljijo na genskih zapisih za OspA in OspB, genih za beljakovine bička ali p66, genih za 16S rRNK in vmesnikih 5S/23S RNK (Broqui in sod., 2004).

Preglednica 1: Občutljivost in specifičnost metod na osnovi verižne reakcije s polimerazo za različne klinične vzorce (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005: 491)

Klinični vzorec	Občutljivost (%)	Specifičnost (%)
Koža - erythema migrans	36–88	98–100
Koža - acrodermatitis chronica atrophicans	54–100	100
Kri	0–100	100
Cerebrospinalna tekočina	12–100	93–100
Sklepna tekočina	42–100	100

2.5.4 Serološka diagnostika

Za serološko testiranje sta primerna vzorca kri in cerebrospinalna tekočina. Nekatere evropske države priporočajo testiranje z encimskoimunskim testom ELISA (angl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay) z izbranim rekombinantnim antigenom, druge pa dvostopenjski pristop, pri katerem najprej izvedejo presejalni test in v primeru pozitivnega rezultata še potrditveni test (Wilske, 2002; EUCLAB, 2013). Kot presejalni test se najpogosteje uporablja ELISA druge ali tretje generacije, ki razlikuje med IgM in IgG protitelesi, ki jo potrdimo z metodo imunskega odtisa. Kot presejalni test se lahko uporabi še metoda posredne imunofluorescence ali hemaglutinacijski testi (Wilske, 2002; EUCLAB, 2008; Broqui in sod., 2004; Aguero-Rosenfeld in sod., 2005).

Pri sumu na nevroboreliozo potrebujemo kri in hkrati še vzorec cerebrospinalne tekočine, da lahko v likvorju določimo število celic, vsebnost beljakovin in sintezo intratekalnega

imunoglobulina, ker pri na novo pridobljeni okužbi lahko dokažemo intratekalna protitelesa (Broqui in sod., 2004; Wilske, 2002; Aguero-Rosenfeld in sod., 2005).

Trenutno so na voljo mnogi komercialni kompleti za detekcijo protiteles proti *B. burgdorferi* sensu lato, ki uporabljajo različne serološke metode in antigene, vendar pa njihova uspešnost ni zadosti preverjena (Broqui in sod., 2004).

Kljub pogosti uporabi seroloških metod za detekcijo borelij, pozitivni serološki test v odsotnosti primernih kliničnih znakov ni dovolj za diagnozo lymske borelioze. Serološka diagnoza je lahko nepopolna zaradi navzkrižne reaktivnosti borelijskih antigenov z antigeni drugih patogenov, zaradi poznegata pojava protiteles ali celo odsotnosti merljivega imunskega odziva v zgodnjih fazah bolezni (Broqui in sod., 2004; Aguero-Rosenfeld in sod., 2005).

2.6 ZDRAVLJENJE

Zdravljenje priporočajo pri vseh stopnjah in oblikah lymske borelioze, čeprav je najbolj uspešno v začetku poteka bolezni (Strle, 1995; Rojko, 2012b). Če bolnik ne kaže značilne klinične slike bolezni, je za določitev zdravljenja potrebna laboratorijska potrditev (Rojko, 2012b). Peroralno antibiotično zdravljenje lahko uporabljam pri večini oblik bolezni, intravensko zdravljenje pa priporočajo pri okužbah osrednjega živčevja in pri težjih oblikah lymskega karditisa (Strle, 1995; Rojko, 2012b).

In vitro študije so pokazale, da so borelije, ki povzročajo lymsko boreliozo, občutljive na tetracikline, večino penicilinov, mnogo cefalosporinov druge in tretje generacije in na makrolide, odporne pa so proti določenim fluorokinolonom, rifampicinu in cefalosporinom prve generacije (Nadelman in sod., 1992; Hunfeld in sod., 2003; Kraizcy in sod., 2001; Wormser in sod., 2006; Stanek in sod., 2012).

Večinoma za zdravljenje priporočajo doksiciklin, amoksicilin in cefuroksim aksetil, za parenteralno uporabo pa je zdravilo izbire ceftriakson (Nadelman in sod., 1992; Wormser in sod., 2006; Stanek in sod., 2012).

2.7 PREPREČEVANJE

Lymsko boreliozo najlažje preprečimo, če preprečimo stik s klopi ter se izogibamo okolju, v katerem se klopi nahajajo. Ker je to pogosto težko, je pomembno, da imamo kožo pokrito z oblačili, ki so svetla, zato da klopa hitreje opazimo, in da uporabljam repelente proti klopom. Dober pregled celotne površine kože, vključno z lasiščem, pripomore k preventivi, saj se po pritrditvi klopa borelije ne prenesejo takoj v gostitelja. Koncentracijo

populacije klopovalci okrog človeških bivališč lahko zmanjšamo z odstranjevanjem odpadnega listja, z namestitvijo lesnih sekancev na področja, kjer se travniki ali zelenice držijo gozda, uporabo akaricidov in izgradnjo ograj, ki preprečujejo dostop srnjadi in jelenjadi (Strle in Stupica, 2012; Stanek in sod., 2012).

Raziskovalci so v 90. letih 20. stoletja potrdili primernost cepiva na osnovi antigena OspA, leta 1998 pa so v ZDA uvedli komercialno dostopno cepivo LYMErix (SmithKline Beecham). Tri doze cepiva so pokazale 76 % učinkovitost proti pojavu lymski bolezni, leta 2002 pa so cepivo prostovoljno umaknili s trga, ker ni bilo komercialno uspešno (Steere in sod., 1998; Lantos, 2013). Cepivo je vsebovalo monovalentni OspA iz enega seva *B. burgdorferi* sensu stricto, OspA v naravi pa so zelo antigensko raznoliki, še posebej v Evropi in Aziji, kjer so tudi borelijski sevi bolj raznoliki, zato cepivo za evropski trg mogoče sploh ne bi bilo primerno (Lantos, 2013).

Večanje števila obolelih, širjenje endemskih področij in nezadostnost preventivnih ukrepov kažejo na potrebo po razvoju novega cepiva, čeprav se pojavljajo pomisleni, saj lymsko boreliozo, če je pravočasno odkrita, razmeroma enostavno zdravimo z antibiotiki (Strle in Stupica, 2012).

2.8 TIPIZACIJSKE METODE

Genetska raznolikost lahko razloži večino fenotipske variabilnosti pri bakterijah npr. geografsko distribucijo, gostiteljsko specifičnost, patogenost in odpornost proti antibiotikom. Ker bakterijski sevi predstavljajo večji izliv človeškemu zdravju zaradi naraščajoče virulence in sposobnosti prenašanja, odpornosti proti antibiotikom, širjenju spektra gostiteljev in možnosti za genetske manipulacije v bioterizmu, je identifikacija bakterij na nivoju sevov izredno pomembna (Li in sod., 2009).

Raznolikost znotraj bakterijske vrste je lahko posledica horizontalnih genskih prenosov, pridobitve ali izgube genov ter rekombinacije in duplikacije (Fraser-Liggett, 2005). Čeprav je idealni način za ugotavljanje genetske raznolikosti sekvenciranje celotnega genoma, ki mu sledi primerjava genomov, ostaja ta metoda draga in zahtevna za izvedbo (Li in sod., 2009).

Sprva so v taksonomiji uporabljali biokemijske in fiziološke lastnosti mikroorganizmov, ki so postale tudi osnova za prvo izdajo priročnika Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, ki je izšel leta 1923 (Sentausa in Fournier, 2013). Dolgo časa je nato v bakterijski sistematiki veljalo, da vrsta vključuje seve, ki imajo pri testiranju z metodo DNK-DNK hibridizacije homologijo, večjo kot 70 %, in ΔT_m 5 °C ali manj (Wayne in sod., 1987; Margos in sod., 2011). Že v osemdesetih letih je z razvojem PCR in sekvenciranja genov za 16S rRNK prišlo do sprememb v taksonomiji prokariontov, leta

2002 pa so uporabo genov za 16S rRNK tudi priporočili kot ključni parameter v taksonomski klasifikaciji, čeprav standard za ločevanje vrst še vedno ostaja podobnost med molekulami DNK (Stackebrandt in sod, 2002; Sentausa in Fournier, 2013). V zadnjih letih raste zanimanje za uporabo drugih genov, ki bi razrešili težave, ki jih sekvenciranje genov za 16S rRNK ne more. Taki so npr. gospodinjski geni (npr. *dnaJ*, *dnaK*, *gyrB*, *recA* in *rpoB*), ki se uporablajo v analizi multilokusnih zaporedij (angl. multilocus sequence analysis, MLSA) (Maiden in sod., 1998; Kämpfer, 2012).

Obstajata dva različna tipizacijska sistema: fenotipizacija in genotipizacija (Li in sod., 2009). Fenotipizacijske metode so tiste, s katerimi določimo pridelek genske ekspresije, da lahko med seboj razlikujemo različne seve (Tenover in sod., 1997). Bakterijski fenotipi, ki jih določajo morfologija kolonij na različnih rastnih medijih, biokemijski testi, serotipizacija, patogenost in odpornost proti antibiotikom, niso dovolj variabilni za diskriminacijo ozko sorodnih sevov. Zato se v zdajšnjih časih uporablja vse več molekularnih genotipizacijskih metod. Genotipiziranje, pri katerem gre za razlikovanje med bakterijskimi sevi na podlagi njihovega genetska zapisa, je postalo zaradi visoke stopnje diskriminacije uporabno orodje za tipizacijo. Genetski profil, ki nastane z določeno genotipizacijsko metodo je lahko unikaten kot prstni odtis (angl. fingerprint), zato genotipiziranju pravimo tudi »DNK fingerprinting« (Li in sod., 2009).

Vsem tipizacijskim sistemom lahko določimo zmožnost tipizacije, ponovljivost, razlikovalno moč, enostavnost izvedbe in enostavnost interpretacije.

- Zmožnost tipizacije se nanaša na možnost tehnike, da pripše določenemu izolatu nedvoumen rezultat oziroma tip.
- Ponovljiva metoda je tista, ki omogoča, da dobimo enak rezultat pri vsaki ponovitvi analize določenega seva.
- Razlikovalna moč se nanaša na sposobnost tehnike, da razlikuje med različnimi izolati, najugodnejše je, da vsakemu izolatu pripše drug tip.
- Enostavnost izvedbe odraža stroške za opremo in reagente, tehnično zapletenost metode in trud, ki ga moramo vložiti, da se naučimo uporabljati metodo.
- Enostavnost interpretacije pa se nanaša na trud in izkušnje, ki so potrebne, da pridobimo uporabne, zanesljive informacije z uporabo določene metode (Tenover in sod., 1997; Li in sod., 2009).

Za nadzor lokalnih izbruuhov bakterijskih okužb so najbolj primerne metode, ki uporabljajo hitro razvijajoče se označevalce, kot so npr. analiza multiplih lokusov za tandemske ponovitve DNK v spremenljivem številu, analiza celotnega genoma z elektroforezo v utripajočem električnem polju (angl. pulse-field gel electrophoresis, PFGE), metoda naključno pomnožene polimorfne DNK in ribotipizacija, ki so zelo diskriminatorne metode, vendar pa je izvedba pogosto zahtevna, potrebne so velike količine čiste DNK,

pogosto pa tudi niso dobro ponovljive med laboratoriji (Fournier in sod., 2004; Li in sod., 2009).

Za dolgoročne epidemiološke študije ali populacijske študije, ki spremljajo spremembe, ki se dogajajo z mikrobnimi populacijami skozi čas, pa je bolj zaželena uporaba ohranjenih in stabilnih označevalcev, kot jih uporabljajo encimska elektroforeza na osnovi multiplih lokusov (angl. multi-locus enzyme electrophoresis, MLEE), tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij (angl. multi locus sequence typing, MLST), PFGE in metode sekvenciranja celotnega genoma (Fournier in sod., 2004; Li in sod., 2009).

2.8.1 Fenotipizacijske metode pri bakterijah rodu *Borrelia*

Konvencionalne bakterijske fenotipske tipizacijske metode, kot so biotipizacija, pri čemer gre za biokemijske teste, določanje profila odpornosti proti antibiotikom in tipizacija bakteriofagov, niso uporabne za rod *Borrelia* zaradi izredne zahtevnosti organizma in nezmožnosti konfluentne rasti na trdnem gojišču (Wang in sod., 2014; Tenover in sod., 1997). Najbolj uporabljena fenotipska metoda za bakterijo *B. burgdorferi* sensu lato je serotipizacija na osnovi beljakovin OspA in OspC (Wang in sod., 1999). Tudi metoda MLEE je uspešna v razlikovanju vrst *B. burgdorferi* sensu lato (Balmelli in Piffaretti, 1996).

2.8.1.1 Serotipizacija

Serotipizacija je metoda, pri kateri uporabljamo protitelesa, da zaznamo različne antigenske determinante na površini bakterijskih celic. Gre za eno od klasičnih metod tipizacije, ki se je za epidemiološke študije uporabljala mnoga leta, še vedno pa ostaja metoda izbire za nekatere bakterijske vrste (Tenover in sod., 1997).

Pri borelijah se OspA uporablja kot antigen za serološko diagnozo in je tarča za razvoj cepiv (Hilton in sod., 1996; Engstrom in sod., 1995; Kramer in sod., 1996; Wressnigg in sod., 2013).

Serotipizacija OspA in OspC omogoča analizo fenotipskih značilnosti na nivoju vrste in podvrste. Uporaba obeh serotipizacijskih sistemov je lahko omejena zaradi odsotnosti OspA in OspC ali spremenjenega izražanja ene ali obeh beljakovin v bakteriji, kakor tudi zaradi zahtevne priprave monoklonskih ali poliklonskih protiteles (Wilske in sod., 1993; Hu in sod., 1992; Stevenson in Barthold, 1994; Wang in sod., 1999).

2.8.1.2 Multilokusna encimska elektroforeza

Multilokusna encimska elektroforeza (angl. multilocus enzyme electrophoresis, MLEE) temelji na polimorfizmu večjega števila genov, ki kodirajo gospodinjske encime in se nahajajo na različnih regijah kromosoma. Bakterijske izolate ločujemo glede na razlike v potovanju encimov na gelski elektroforezi, ki jih zaznamo po specifičnem barvanju (Balmelli in Piffaretti, 1996; Selander in sod., 1986; Wang in sod., 1999). Različni elektromorfi vsakega izmed encimov odražajo različne alele na določenem genskem lokusu, ker je elektrostatski naboj in posledično stopnja potovanja encima med elektroforezo odvisna od njegove aminokislinske sekvene, elektromorfni profili za več encimov, ki jim pravimo elektroforetski tipi, pa odražajo genotip. Tako je metoda MLEE primerno orodje za analizo genetske raznolikosti (Balmelli in Piffaretti, 1996; Selander in sod., 1986). Pri uporabi MLEE za identifikacijo genomske skupin se rezultati ujemajo z rezultati DNK-DNK hibridizacije (Balmelli in Piffaretti, 1996).

Oba načina se sicer pri določanju borelij redko uporabljata zaradi zahtevnosti izvedbe samega postopka ter nizke razlikovalne moči (Wang in sod., 2014).

2.8.2 Genotipizacijske metode pri bakterijah rodu *Borrelia*

Poleg metode DNK-DNK hibridizacije se kot metode genotipizacije uporabljajo tudi restrikcija celotnega genoma ali pomnožkov PCR, analiza naključno pomnožene polimorfne DNK, analiza lokusov z zapisom za tandemske ponovitve, sekvenciranje genov za 16S rRNK, genov *ospC*, *ospA* in *hbb* in celotnega genoma.

2.8.2.1 Metoda homologije DNK-DNK

Analiza homologije DNK-DNK se uporablja kot referenčna metoda za določevanje vrst v rodu *Borrelia* (Baranton in sod., 1992; Wang in sod., 2014). Obstajajo različne metode, ki merijo sorodnost DNK med bakterijami. Primer so hidroksiapatitna metoda, S1 nukleazna metoda, hibridizacijska metoda z membranskim filtrom in renaturacijska metoda, obstajajo pa tudi protokoli za hibridizacijo v mikroploščah (Goris in sod., 1998). Izolati borelij imajo znotraj iste vrste 70–100 % homologijo, izolati različnih vrst pa kažejo samo 30–65 % homologijo (Wang in sod., 2014).

2.8.2.2 Metoda polimorfizma dolžin restriktijskih fragmentov celotnega genoma

Metoda polimorfizma dolžin restriktijskih fragmentov (angl. restriction fragment length polymorphism, RFLP) je bila ena izmed prvih tehnik, ki so se uporabljale za zaznavanje raznolikosti v sekvenci DNK. Razgradnja genomske DNK z restriktijskimi encimi, ki

imajo veliko prepoznavnih mest, ustvari na stotine kratkih restrikcijskih fragmentov, ki jih ločujemo s konvencionalno agarozno gelsko elektroforezo (Li in sod., 2009).

Z uporabo encimov, ki zaznavajo redka prepoznavna mesta za restrikcijo, lahko z metodo elektroforeze v utripajočem polju (angl. pulse-field gel electrophoresis, PFGE) mapiramo celotni bakterijski genom (McClelland in sod., 1987). Taki različici pravimo LRFP (angl. large restriction fragment pattern).

Elektroforeza v utripajočem električnem polju je elektroforetska tehnika, ki se uporablja za ločevanje večjih molekul DNK (10 kb–10 Mb). Pri konstantnem električnem polju DNK molekule, ki so večje od 20 kb, potujejo enako, zato jih med seboj ni mogoče razlikovati. Če periodično spremojamo smer električnega polja pod različnimi koti, lahko ločimo tudi velike molekule (Schwartz in Cantor, 1984; Herschleb in sod., 2007; Li in sod., 2009).

Če bakterijski genom, ki običajno obsega od 2 do 5 Mb, režemo z restrikcijskimi encimi, ki imajo relativno malo prepoznavnih mest, ustvarimo približno od 10 do 30 restrikcijskih fragmentov, velikih med 10 in 800 kb (Tenover in sod., 1997). Manjše število fragmentov omogoča boljšo ločljivost, vzorce pa tudi enostavneje in bolj natančno primerjamo med seboj (Allardet-Servent in sod., 1989; Li in sod., 2009).

Izbira restrikcijskega encima je eden izmed najpomembnejših dejavnikov pri določanju vzorca fragmentov PFGE, ker je cepitveno mesto vsakega restrikcijskega encima edinstveno. Fragmente razločujemo s PFGE tako, da uporabimo posebno posodo, v kateri je agarozni gel nameščen med tri kompleti elektrod, ki tvorijo šesterokotnik okoli gela. Namesto toka v gel v eni smeri, se tok usmeri najprej v smeri enega kompleta elektrod, nato se zamenja na drugi komplet in še na tretji, ter tako pulzira. Tako se DNK premika po gelu in njeno gibanje naprej in nazaj omogoča boljšo ločljivost (Schwartz in Cantor, 1984; Tenover in sod., 1997).

Delovanje encima *MluI*, ki ima manj prepoznavnih mest, na celotni genom, čemur sledi razlikovanje fragmentov s PFGE, je pri borelijah alternativa analizi DNK-DNK homologije, ki omogoča določevanje vrst, prav tako pa lahko določimo tudi raznolikost med sevi iste vrste (Belfazia in sod., 1993; Ružić-Sabljić in sod., 2008).

MluI-LRFP se uporablja za identifikacijo borelij, ki povzročajo lymsko boreliozo, ker dobro loči borelige *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. spielmanii* in druge (Baranton in sod., 1992; Postic in sod., 1994; Wang in sod., 2014). Restrikcijski vzorci, ki pri tej metodi nastanejo, so navedeni v preglednici 2.

Preglednica 2: Restriktijski vzorci borelijskega genoma, rezanega z restriktijskim encimom *MluI* (Ružić-Sabljić in Cerar, 2014)

Borelijski podtip		<i>MluI-LRFP (kb)</i>				
<i>B. afzelii</i>	Mla1	440	320			90
	Mla2	440	350			90
	Mla3	440	350	320		90
	Mla4	470		320		90
<i>B. garinii</i>	Mlg1		260	220	140	80
	Mlg2	390		220	100	80
	Mlg3			225 220 170	100	80
	Mlg4	390		220		80
	Mlg5		260	220	140	100 80
	Mlg6			225 220 170		80
	Mlg7	390	330	220	100	80
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	Mlb1	410		160 140		
	Mlb2	410		160 140	110	
	Mlb3	400			140 130	100
	Mlb4	380			140 130	100
	Mlb5	400			140 130	100 80
	Mlb6	400		160 140	100	
	Mlb7	400			140 110	100
	Mlb8		310	160 140	110	100
	Mlb9		320		140 110	100 90
	Mlb10	410			140 130	100
	Mlb11	410			140	110
	Mlb12			210	140 110	100
	Mlb13		290		140 110	100
	Mlb14		300 290		140 110	100
	Mlb15			210 160 140	100	90
<i>B. spielmanii</i>	Mls1		320	230 210		70
	Mls2		320	230	140	70
<i>B. valaisiana</i>	Mlv1	360	340			90
	Mlv2		340	300		90
<i>B. lusitaniae</i>	Mll1		320 300			100 90
	Mll2		320 300			100

Uporaba te metode za tipizacijo bakterij je zelo razširjena, ker gre za eno izmed najbolj ponovljivih in diskriminatornih metod, tudi interpretacija gela je relativno enostavna (Tenover in sod., 1997; Lindstedt, 2005). Metoda pa ima številne omejitve. Je časovno zamudna, potreben je usposobljen kader in zahteva kvalitetno DNK ter rastočo kulturo bakterij. Med fragmenti skoraj enakih velikosti razlikuje slabo ali pa sploh ne (Li in sod., 2009; Davis in sod., 2003).

2.8.2.3 Metoda naključno pomnožene polimorfne DNK

Razlikovanje med različnimi patogenimi borelijskimi vrstami lahko dosežemo tudi z metodo naključno pomnožene polimorfne DNK (angl. random amplified polymorphic DNA, RAPD) (Welsh in sod., 1992; Foretz in sod., 1997).

Postopek za PCR zahteva matrično DNK, dva oligonukleotidna začetnika, ki nalegata na matrično DNK na mestu, kjer se začne pomnoževanje, in DNK polimerazo, ki je odporna na temperaturo. Običajni PCR potrebuje približno 3 ure, da zaključi 30 ciklov, pri čemer vsak cikel sestavlja: denaturacijska faza, pri kateri s toploto talimo dvoverižno DNK v enoverižno, faza naleganja, v kateri se oligonukleotidni začetniki vežejo na tarčno sekvenco na enoverižni DNK in faza podaljševanja, pri kateri poteka sinteza novih DNK molekul od začetnikov vzdolž enoverižne DNK, s čimer nastaja nova dvoverižna molekula DNK, sestavljena iz ene verige iz prejšnjega cikla in ene na novo sintetizirane verige (Tenover in sod., 1997).

Pri metodi naključno pomnožene polimorfne DNK uporabljam določene kratke oligonukleotidne začetnike, za katere pričakujemo, da bodo nalegali na različne dele genoma. Sekvence med različnimi začetniki pomnožimo, kot rezultat pa dobimo profil pomnožkov, ki je odvisen od sekvence genoma. Metoda je hitra in preprosta, vnaprej nam ni potrebno poznati tarčne sekvence organizma, ki ga preučujemo (Welsh in McClelland, 1990). Omogoča razlikovanje med različnimi borelijskimi vrstami, prav tako pa prepoznavata različice znotraj vrst (Wang in sod., 1998).

2.8.2.4 Multilokusna analiza tandemskih ponovitev DNK

Tandemsko ponavlajoče se sekvene DNK v spremenljivem številu (angl. variable number tandem repeats, VNTR) so tandemsko ponovljene sekvene DNK, ki variirajo v številu kopij in so razširjene po človeškem in bakterijskih genomih (Lupski in Weinstock, 1992; Vergnaud in Denoeud, 2000). V bakterijskih genomih najdemo take tandemsko ponovljene sekvene v genih in v nekodirajočih regijah. Zaradi hitre evolucije so lahko pomembeni vir genetskega polimorfizma, ki ga izkoristimo za tipizacijo (Li in sod., 2009; Fournier in sod., 2004; Lindstedt, 2005).

Število tandemskih ponovitev na lokus se lahko razlikuje tudi med sevi znotraj iste vrste (Li in sod., 2009). Analiza multiplih lokusov za tandemске ponovitve DNK v spremenljivem številu (angl. multiple-locus variable number tandem repeat analysis, MLVA) je genotipizacijska metoda na osnovi PCR, ki temelji na pomnoževanju in analizi številnih lokusov z zapisom za tandemsko ponovljene sekvene, ki se nahajajo na kromosому (Lindstedt, 2005).

Farlow in sod. (2002) so poročali o uspešni uporabi metode MLVA za razlikovanje sevov borelijskih izolatov.

Čeprav je metoda MLVA hitra, enostavna, poceni in ponovljiva z veliko ločljivostjo, se lokusi za tandemске sekvene DNK najverjetneje razvijajo prehitro, da bi nam podali zanesljive filogenetske odnose med ozko sorodnimi sevi (Li in sod., 2009).

2.8.2.5 Na pomnoževanje vezana restrikcija DNK

Metoda pomnoževanja z verižno reakcijo s polimerazo, ki ji sledi restrikcija z metodo polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. polymerase chain reaction – restriction length polymorphism, PCR-RFLP) vključuje restrikcijo določenega lokusa, ki ga pomnožimo s PCR (Li in sod., 2009). Za *B. burgdorferi* sensu lato so razvili dve različni PCR-RFLP tipizacijski metodi, ki temeljita na rRNK. Tarča so vmesniki *rrs-rrlA* med geni za 16S in 23S rRNK ali vmesniki *rrfA-rrlB* med geni za 5S in 23S rRNK (Postic in sod., 1994; Masuzawa in sod., 2001; Liveris in sod., 1995; Ranka in sod., 2004). Pri obeh metodah pomnoževanju s PCR sledi obdelava z restrikcijskimi endonukleazami in razločevanje fragmentov z gelsko elektroforezo (Wang in sod., 2014).

Z vzorci, ki nastanejo zaradi polimorfizma zaradi rezanja nukleaze *MseI* pri vmesnikih *rrs-rrlA*, lahko dobro identificiramo borelije lyske borelioze (Postic in sod., 1994).

Pristop z metodo PCR-RFLP je relativno enostaven, hiter in dobro razlikuje med borelijami predvsem na nivoju vrst, omogoča pa tudi razlikovanje med različicami znotraj ene vrste (Wang in sod., 2014, Postic in sod., 1994).

2.8.2.6 Metode na osnovi sekvenciranja

Sekvenca DNK je originalna genetska informacija organizma in se lahko neposredno uporablja za diferenciacijo in filogenetsko analizo bakterijskih sevov. Gen-Bank je največja podatkovna baza sekvenc DNK, ki hrani ogromne količine genomskeh sekven, prav tako pa tudi sekvenc določenih lokusov (Li in sod., 2009).

Trenutno obstajata dve glavni strategiji sekvenciranja: tradicionalna metoda po Sangerju in novejše pirosekvenciranje (Li in sod., 2009).

Pri metodi po Sangerju sekvenciramo enoverižno matrično DNK, tako da uporabimo DNK polimerazo, ki sintetizira polinukleotidne fragmente različnih dolžin, ker uporabi dideoksinukleotide, ki prekinejo podaljševanje verige (Sanger in sod., 1977). V primerjavi s pirosekvenciranjem je ta metoda dražja in zahteva večje količine DNK (Li in sod., 2009).

Pirosekvenciranje temelji na detekciji pirofosfata, ki se sprosti po vgraditvi nukleotida v nastajajočo verigo DNK (Nyrén, 1987). Metoda je učinkovitejša in cenejša kot Sangerjeva (Li in sod., 2009).

Sekvenciranje zelo polimorfnih regij, kot so geni za 16S rRNK, je hitro in poceni, je pa omejeno s kratkimi odčitki (25–250 bp), majhnim številom vzorcev, ki jih lahko obdelujemo hkrati in težjim sestavljanjem sekvenc (Jonasson in sod., 2002; Li in sod., 2009).

2.8.2.6.1 Sekvenciranje 16S rRNK

Molekula 16S rRNK je zelo ohranjena in posledično zelo zanesljiva za določanje taksonomskih odnosov na nivoju vrst. Variacije nukleotidov znotraj številnih operonov rRNK v enem genomu in možnost, da geni za 16S rRNK izhajajo iz horizontalnih genskih prenosov, lahko preoblikujejo razmerja med taksoni (Sentausa in Fournier, 2013; Zhi in sod., 2012). Geni za 16S rRNK so preveč ohranjeni, da bi bili uporabni za tipizacijo sevov, zato so najbolj primerni za identifikacijo bakterijskih vrst (Li in sod., 2009; le Fleche in sod., 1997).

2.8.2.6.2 Sekvenciranje genov *ospC*, *ospA*

Nekatere manj ohranjene gene, še posebej tiste, ki so pod pozitivnim selekcijskim pritiskom, pogosto uporablajo za identifikacijo vrst in v redkih primerih tudi za tipizacijo bakterijskih sevov. Večina takih genov kodira površinske beljakovine ali virulenčne dejavnike (Li in sod., 2009).

Tipizacija na osnovi pomnoževanja in sekvenciranja beljakovine OspC se uporablja za preučevanje trenutne genetske raznolikosti borelijskih sevov v vzorcih iz okolja, kot so npr. okužene nimfe, tkivo okuženih miši, ali pa v humanih vzorcih (Wormser in sod., 2008; Wang in sod., 2002; Wang in sod., 2014). Ker pa je raznolikost sekvenc velika in lahko prihaja do rekombinacij med aleli *ospC*, te metode ne moremo uporabljati za filogenetske analize (Wang in sod., 2014).

Geni za *ospA* omogočajo tipizacijo, katere rezultati so skladni s serološkimi metodami za zaznavo OspA (Will in sod., 1995; Wilske in sod., 1993).

Cai in sod. (2002) so predlagali izboljšavo tipizacije tako, da bi sekvencirali gene za virulenčne dejavnike v kombinaciji s sekvencami gospodinjskih genov in/ali genov za odgovor na stres ali pa regij z malo ali brez seleksijskega pritiska (npr. vmesniki). Tako so Margos in sod. (2009) sekvencirali gospodinjske gene (*clpA*, *clpX*, *nifS*, *pepX*, *pyrG*, *recG*, *rplB* in *uvrA*), vmesnike 5S-23S ter gene za OspA in OspC, s čimer so potrdili, da so analize multilokusnih sekvenc na osnovi gospodinjskih genov primerne za evolucijske študije borelij, ki povzročajo lymsko boreliozo.

2.8.2.6.3 Tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij

Maiden in sod. so leta 1998 ugotavljali, da lahko z molekularnimi tipizacijskimi metodami določimo, ali izolati, ki jih pridobimo iz lokaliziranega izbruha bolezni, spadajo pod isti ali drug sev (lokalna epidemiologija) ter ali so sevi, ki povzročajo bolezen v določenem geografskem področju povezani s tistimi, ki jih izoliramo po svetu (globalna epidemiologija). V vsakem primeru mora imeti metoda določanja veliko razlikovalno moč, tako da imajo izolati, ki jim pripišemo enak tip, zelo verjetno nedavnega skupnega prednika.

Fenotipska metoda MLEE uporablja variacije, ki se zelo počasi kopičijo v populaciji in za katere je verjetno, da so selektivno nevtralne. Čeprav lahko znotraj populacije identificiramo majhno število alelov, lahko visoko stopnjo razlikovanja dosežemo z analizo številnih lokusov (Maiden in sod., 1998).

Maiden in sod. (1998) so prilagodili metodo MLEE, tako da so določili alele neposredno iz sekvenc notranjih fragmentov gospodinjskih genov, namesto da bi primerjali elektroforetsko potovanje encimov, ki jih ti geni kodirajo. Novo metodo so poimenovali tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij (angl. multi-locus sequence typing, MLST), edinstveno kombinacijo alelov pa so definirali kot sekvenčni tip (Maiden in sod., 1998). Skupku identičnih genotipov, torej enakih sekvenčnih tipov, pravimo kloni, zelo sorodne genotipe pa uvrščamo v klonske komplekse (Spratt, 1999). Klonski kompleksi sestavljajo sekvenčni tipi, ki si z vsaj še enim drugim sekvenčnim tipom delijo vsaj šest alelov. »Osamelci« ne spadajo v noben klonski kompleks, saj se od kateregakoli drugega sekvenčnega tipa razlikujejo vsaj v treh aleilih (Hanincova in sod., 2013; Gatewood Hoen in sod., 2009).

Sprememba metode je prinesla velike prednosti. Z metodo MLST lahko hitreje kot pri MLEE zaznamo variacije v bakterijski populaciji. Podatke o sekvencah lažje primerjamo

med laboratoriji, tako da podatke shranjujemo v eni centralni podatkovni bazi, do katere lahko dostopamo preko medmrežja (Maiden in sod., 1998).

MLST je tudi metoda z veliko razlikovalno močjo. Iz pogostosti pojavljanja kateregakoli posameznega alela lahko izračunamo pričakovano pogostost alelnega profila v populaciji. Prednost MLST je tudi točnost in prenosljivost podatkov o sekvencah, ker lahko katerikoli sev hitro in nedvoumno primerjamo s sevi v bazi, prosto dostopni na spletu (Feil in Spratt, 2001).

MLST ima svoje pomanjkljivosti. Alejom pripisujemo številke, ki ne predstavljajo dejanske sekvence gena, tako da si podobnosti in sorodnosti med geni težko predstavljamo (Clarke, 2002). Uporaba zelo ohranjeni gospodinjskih genov je pogosto otežena, ko gre za zaznavanje variabilnosti ozko sorodnih sevov. Sekvenciranje genov je tudi relativno drago (Li in sod., 2009).

Nedvoumen sistem za genotipizacijo je ključen za karakterizacijo epidemioloških in ekoloških vzorcev in za razumevanje evolucijskih procesov, ki so oblikovali mikrobnou populacijo. Številne študije so že uporabile sistem določanja multilokusnih zaporedij za karakterizacijo borelij, ki povzročajo lymsko boreliozo, vendar pa so izhajali iz shem, ki so bile razvite za druge mikrobne patogene. Kombinirali so lokuse iz različnih kategorij, kot so hipervariabilni geni, ki kodirajo površinske beljakovine, ohranjene gospodinjske gene ali nekodirajoče lokuse (Margos in sod., 2008).

Margos in sod. (2008) so razvili shemo MLST za *B. burgdorferi* sensu lato, da bi omogočili evolucijske in epidemiološke analize ter analize populacijske genetike. Izbrali so osem gospodinjskih genov, in sicer *clpA*, *clpX*, *nifS*, *pepX*, *pyrG*, *recG*, *rplB* in *uvrA*. Gospodinjski geni in njihovi pridelki so prikazani v preglednici 3.

Preglednica 3: Gospodinjski geni in njihovi pridelki, ki se uporabljajo v shemi analize multilokusnih zaporedij za bakterijo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Wang in sod., 2014: 12C.5.12)

Št. gena	lokus	Opis pridelka gena
BB0369	<i>clpA</i>	Proteaza Clp, podenota A
BB0612	<i>clpX</i>	Proteaza Clp, podenota X
BB0084	<i>nifS</i>	Aminotransferaza
BB0627	<i>pepX</i>	Dipeptidil aminopeptidaza
BB0575	<i>pyrG</i>	Citidin trifosfat sintaza
BB0581	<i>recG</i>	DNK rekombinaza
BB0481	<i>rplB</i>	ribosomalni protein 50 S
BB0837	<i>uvrA</i>	Eksonukleaza ABC, podenota A

Dokazali so, da je z metodo MLST mogoče nedvoumno genotipizirati vzorce *B. burgdorferi* sensu lato, da je mogoče ugotavljati evolucijske povezave med bakterijskimi populacijami, ugotoviti geografsko strukturo populacij in tipizirati okužbo neposredno iz

klopor ali gostiteljev, ne da bi bilo prej potrebno bakterije gojiti (Margos in sod., 2008). MLST omogoča zaznavo razlik v patogenosti in diseminaciji določenih sevov *B. burgdorferi* sensu lato (Wang in sod., 2014).

Z vgnezdenim ali polvgnezdenim PCR, pri čemer v drugi stopnji pomnoževanja izberemo oligonukleotidne začetnike, ki nalegajo v sekvenco znotraj pomnožkov prve stopnje (Mullis in sod., 1986), so pomnožili gospodinjske gene, čemur je sledilo sekvenciranje izbranih genov. Glede na podatkovno bazo MLST, ki je dostopna preko strežnikov Imperial College v Londonu, so sekvenci genov pripisali alelno številko (Margos in sod., 2008). Pri vsakem sevu alelna številka lokusa oziraoma kombinacija alelnih števil posameznih genov določa alelni profil seva. Alelni profil pa določa sekvenčni tip, ki tako definira sev (Margos in sod., 2011; Aanensen in Spratt, 2005).

Do dne 2. 4. 2015 je bilo v podatkovni bazi na spletni strani MLST 631 različnih sekvenčnih tipov (MLST, 2015).

2.8.2.6.4 Sekvenciranje celotnega genoma

Za sekvenciranje genoma se trenutno uporablja obe tehniki, pirosekvenciranje in metoda po Sangerju (Li in sod., 2009). Čeprav so se tehnike sekvenciranja izboljšale odkar so določili prvi bakterijski genom leta 1995 (Fleischmann in sod., 1995) in genom *B. burgdorferi* seva B31 leta 1997 (Fraser in sod., 1997), sekvenciranje ostaja predrago in preveč zamudno, da bi se uporabljalo v rutinski genotipizaciji (Li in sod., 2009). Z napredkom in zmanjševanjem stroškov na platformah za sekvenciranje celotnega genoma naslednje generacije, pa se vseeno povečuje verjetnost, da bo dostopnih več genomskeh sekvenc borelij in da bo tako analiza postala novo orodje za primerjavo znotraj in med vrstami borelij (Wang in sod., 2014).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

Vir vseh 70 borelijskih sevov so bili bolniki, ki so bili diagnosticirani s kožno obliko lymske borelioze (erythema migrans, acrodermatitis chronica atrophicans) in so jim biopsijo kože opravili na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana med letoma 1994 in 2013. Biopsijo kože so opravili po predhodni dezinfekciji s 70-odstotnim alkoholom in ob lokalni anesteziji z 2-odstotnim ksilokainom. Košček kože so nacepili v modificirano Kelly-Pettenkoferjevo (MKP) gojišče. Vzorci so bili preneseni v Laboratorij za diagnostiko lymske borelioze in leptospiroz, kjer so jih gojili pri 33 °C do devet tednov (Ružić-Sabljić in sod., 2002).

3.1.1 Material za metodo polimorfizma dolžin restriktijskih fragmentov in elektroforezo v utripajočem električnem polju

3.1.1.1 Uporabljeni reagenti, material in naprave

- Gojišče MKP,
- pufer TN (10 mM Tris HCl pH 7,6; 1 M NaCl),
- agarosa UltraPure™ LMP Agarose (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ZDA),
- pufer za lizo (1 M NaCl; 20 mM Tris HCl pH 8,0; 0,1 M EDTA; 0,5-odstoten Brij 58; 0,2-odstoten deoksiholat; 0,5-odstotni N-laurilsarkozin; RNAza 10 µg/ml; lizocim 1 mg/ml),
- pufer TE (10 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA),
- pufer za razgradnjo (20 mM Tris HCl pH 8,5; 466 mM EDTA; 1-odstotni N-laurilsarkozin; 0,5 mg/ml proteinaze K),
- pufer, specifičen za encim *MluI*,
- encim *MluI* (25 E/ml),
- agarosa Pulse Field Certified Agarose (Bio-rad, ZDA),
- pufer TBE (0,89 M Tris; 0,89 M borova kislina; 0,02 M EDTA),
- etidijev bromid (0,5 µg/ml),

- epruvete,
- mikrocentrifugirke, plastične epruvete,
- kalibrirane pipete in nastavki za pipete,
- objektna in krovna stekla,
- modelčki za izdelavo agaroznih blokcev,
- plastični modeli za izdelavo gela za elektroforezo in glavnički,
- plastična banjica,

- inkubator,
- mikroskop,
- centrifuga,
- spektrofotometer,
- termostresalnik,
- mikrovalovna pečica,
- elektroforezni sistem CHEF-DR® III Pulsed Field Electrophoresis Systems (Bio-Rad Technologies, ZDA),
- UV-transluminator,
- Gel Doc™ XR fotodokumentacijski sistem (Bio-Rad Technologies, ZDA).

3.1.2 Material za metodo tipizacije na osnovi multilokusnih zaporedij

3.1.2.1 Uporabljeni reagenti, material in naprave

- Destilirana voda,
- oligonukleotidni začetniki koncentracije 50 µM, navedeni v preglednici 4 (TIB MolBiol, Nemčija),
- polimeraza HotStarTaq Plus DNA Polymerase (5 E/µl, Qiagen, Nemčija),
- pufer TAE (Tris, acetat, EDTA),
- barvilo SYBR® Safe DNA Gel Stain (10 x, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, ZDA),
- agarosa: Agarose, For routine use (Sigma-Aldrich, ZDA),
- pufer za PCR 10 x CoralLoad (Qiagen, Nemčija),
- eksonukleaza I (20 E/µl, Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, ZDA),
- termosenzitivna alkalna fosfataza FastAP™ (1 E/µl, Thermo Scientific, Thermo Fisher Scientific, ZDA),
- sekvenčni pufer Big Dye® Terminator v3.1 5 x Sequencing Buffer (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, ZDA),
- sekvenčni terminator BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (BDT, Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, ZDA),
- voda Nuclease-free water (Qiagen, Nemčija),
- komplet BigDye X Terminator® Purification Kit (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, ZDA),

- kalibrirane pipete in nastavki za pipete,
- multikanalna pipeta,
- mikrocentrifugirke,
- cepilna zanka,
- mikrotitrski plošče (8x12) MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, ZDA),

- samolepilna folija,
- kadičke, glavnički in plastični model za elektroforezo,
- parafilm,
- vrtinčno mešalo Vibromix 10 (Tehtnica, Domel, Slovenija),
- vrtinčno mešalo MixMate® (Eppendorf, Nemčija),
- centrifuga MiniSpin® (Eppendorf, Nemčija),
- centrifuga Centrifuge 5430 (Eppendorf, Nemčija),
- naprava za PCR: PCR Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, ZDA),
- naprava za PCR T3 Thermocycler (Biometra, Nemčija),
- sekvenator Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific, ZDA).

3.1.2.2 Programi za analizo

- CLC Main Workbench 6.3.1, MLST Module (CLC Bio, Qiagen, Danska),
- Microsoft Excel (Microsoft, ZDA),
- BioNumerics 7.1. (Applied Maths, Belgija).

3.2 METODE

3.2.1 Metoda polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov in elektroforeza v utripajočem električnem polju

3.2.1.1 Izolacija DNK iz bakterijske kulture z metodo inkorporacije v gelu

Borelijsko kulturo, ki je zrasla iz prej nacepljenega materiala, smo precepili v 10 epruvet gojišča MKP in jo ponovno gojili pri 33 °C. Da so bakterije zrastle, smo videli po spremembri barve gojišča iz rdeče v rumeno. Kapljico gojišča smo kanili na objektno stekelce in pripravili preparat, ki smo ga opazovali v temnem polju. Nato smo za okvirno predstavo prešteli število bakterij v nekaj temnih poljih. Da je prišlo do kontaminacije so nakazale epruvete, pri katerih je bilo gojišče motno. Za potrditev kontaminacije smo pod mikroskopom v temnem polju preverili, ali so prisotne samo značilne spiralne oblike spirohet oziroma ali opazimo še kakšne druge oblike bakterij (npr. koki, bacili). Epruvete, ki so bile morebiti kontaminirane, smo odstranili, preostala gojišča pa združili in centrifugirali. Sediment smo sprali s pufrom TN, koncentracijo borelij smo v vzorcu določali spektrofotometrično, in sicer dokler ni dosegla željene vrednosti ($OD_{595} = 1,0$). Pripravili smo 2-odstotno agarozo UltraPure™ LMP Agarose s pufrom TN. Vzorec smo zmešali z enako količino 2-odstotne agaroze in nalili v modelčke za izdelavo agaroznih

blokcev, ki smo jih postavili v hladilnik. Ko so se blokci strdili, smo jih dali v plastične epruvete s 50 ml pufra za lizo in inkubirali na stresalniku 24 h pri temperaturi 37 °C. Nato smo jih sprali s pufrom TE, jih dali v pufer za razgradnjo in inkubirali na stresalniku 72 h pri 50 °C. Blokce smo petkrat po 1 h spirali s pufrom TE in jih nato v plastičnih epruvetah v pufru TE tudi shranili pri 4 °C (Ružić-Sabljić in sod., 2002).

3.2.1.2 Rezanje DNK z restriktičnim encimom *MluI*

Agarozno kocko, v katero je bila vklopljena DNA, smo z manjšim cedilom ločili od pufra TE, v katerem je bila shranjena, jo prenesli v mikrocentrifugirko in prelili z 190 µl vode in 10 µl 10x koncentriranega pufra, specifičnega za encim, ter jo inkubirali 1 h pri sobni temperaturi. Pufer smo odstranili in dodali 190 µl vode in 10 µl 1x koncentriranega pufra ter 2,5 µl encima *MluI*, nato pa inkubirali preko noči pri 37 °C. Pufer z encimom smo odstranili, blokec prelili s pufrom TE ter shranili pri 4 °C.

3.2.1.3 Elektroforeza v utripajočem električnem polju

Za elektroforezo smo najprej pripravili 1-odstotni agarozni gel, tako da smo 2 g agaroze Pulse Field Certified Agarose zmešali s 190 ml vode in 10 ml 10 x pufra TBE. Mešanico smo segrevali v mikrovalovni pečici, dokler se ni zbistrla ter jo nato 20 min hladili, preden smo jo nalili v model, na katerega smo že prej namestili glavnice. Ko se je gel strdil, smo v vsako luknjico vstavili po eno kockico z *MluI* razrezane celotne DNA in označevalce velikosti, nato pa gel položili v 0,5 x pufer TBE. Elektroforeza je potekala v utripajočem električnem polju 1–40 s, pri jakosti polja 6 V/cm, kotu 120°, 24 h pri 14 °C.

Po koncu elektroforeze smo gel v posebni banjici prelili z etidijevim bromidom in ga pustili 20 min, preden smo ga pogledali pod UV-transluminatorjem in dokumentirali s fotodokumentačnim sistemom. Borelijsko vrsto in različico znotraj vrste smo opredelili glede na velikost odsekov, zbranih v preglednici 2.

3.2.2 Metoda tipizacije na osnovi multilokusnih zaporedij

3.2.2.1 Pridobivanje DNA iz agaroznih blokcev

Vzorce že izolirane DNA, vstavljeni v agarozne blokce, smo imeli spravljene v hladilniku v mikrocentrifugirkah v pufru TE pri 4 °C.

Za pripravo vzorcev smo po en agarozni blokec, ki je vseboval DNA, prenesli v novo mikrocentrifugirko, v katero smo že prej dodali 300 µl destilirane vode. Mikrocentrifugirke smo označili z referenčnimi številkami, priimkom pacienta in mestom izvirne epruvete v

hladilniku, da bi zagotovili njihovo sledljivost. Mikrocentrifugirke z vzorci smo na termostresalniku stresali in segrevali pri 95 °C približno 30 min, da so se agarozni blokci raztopili. Tako pripravljene vzorce smo lahko takoj uporabili za delo ali pa smo jih do nadaljnje hrани v zamrzovalniku pri temperaturi – 20 °C.

3.2.2.2 Prva stopnja vgnezdenega oz. polvgnezdenega PCR

Za prvo stopnjo vgnezdenega oz. polvgnezdenega PCR smo pripravili osem novih mikrocentrifugirk za reakcijsko mešanico in sicer za vsak posamezen gen, ki smo ga hoteli analizirati. V reakcijski mešanici za posamezen gen so bile naslednje sestavine (količine za en vzorec):

- Voda: 7,0 µl,
- HotStarTaq Plus Master Mix Kit, 2 x, 12,5 µl,
- ustrezni oligonukleotidni začetnik: 0,25 µl smernega in 0,25 µl protismernega (pregl. 4).

Preglednica 4: Oligonukleotidni začetniki za borelijske gospodinjske gene za prvo in drugo stopnjo pomnoževanja in velikost pridelka iz podatkovne baze MLST (Aanensen in Spratt, 2005)

Gen	Vrsta oligonukleotidnega začetnika	Ime začetnika	Nukleotidna sekvenca začetnika (5'→3')	Velikost pridelka (bp)
<i>nifS</i> (BB0084)				719
1. stopnja				
Smerni		<i>nifF1</i>	ATGGATTCAAACAAATAAAAAG	
Protismerni		<i>nifSR1049</i>	GATATTATTGAATTCTTTAAG	
2. stopnja				
Smerni		<i>nifF1</i>	ATGGATTCAAACAAATAAAAAG	
Protismerni		<i>nifR719</i>	GTTGGAGCAAGCATTATG	
<i>clpA</i> (BB0369)				849
1. stopnja				
Smerni		<i>clpAF1237</i>	AAAGATAGATTCTTCCAGAC	
Protismerni		<i>clpAR2218</i>	GAATTCATCTATTAAAGCTTTC	
2. stopnja				
Smerni		<i>clpAF1255</i>	GACAAAGCTTTGATATTTAG	
Protismerni		<i>clpAR2104</i>	CAAAAAAAACATCAAATTCTATCTC	
<i>rplB</i> (BB0481)				720
1. stopnja				
Smerni		<i>rplF2</i>	TGGGTATTAAGACTTATAAGC	
Protismerni		<i>rplR760</i>	GCTGTCCCCAAGGAGACA	
2. stopnja				
Smerni		<i>rplF40</i>	CGCTATAAGACGACTTATC	
Protismerni		<i>rplR760</i>	GCTGTCCCCAAGGAGACA	

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 4: Oligonukleotidni začetniki za borelijske gospodinjske gene za prvo in drugo stopnjo pomnoževanja in velikost pridelka iz podatkovne baze MLST (Aanensen in Spratt, 2005)

Gen	Vrsta oligonukleotidnega začetnika	Ime začetnika	Nukleotidna sekvenca začetnika (5'→3')	Velikost pridelka (bp)
<i>pyrG</i> (BB0575)				706
1. stopnja				
Smerni		<i>pyrF391</i>	GATTGCAAGTTCTGAGAATA	
Protismerni		<i>pyrR1190</i>	CAAACATTACGAGCAAATTC	
2. stopnja				
Smerni		<i>pyrF448</i>	GATATGGAAAATATTITATTATTG	
Protismerni		<i>pyrR1154</i>	AAACCAAGACAAATTCCAAG	
<i>clpX</i> (BB0612)				721
1. stopnja				
Smerni		<i>clpXF391</i>	GCTGCAGAGATGAATGTGCC	
Protismerni		<i>clpXR1273</i>	GATTGATTCATATAACTCTTG	
2. stopnja				
Smerni		<i>clpXF403</i>	AATGTGCCATTGCAATAGC	
Protismerni		<i>clpXR1124</i>	TTAAGAAGACCCTCTAAAATAG	
<i>pepX</i> (BB0627)				666
1. stopnja				
Smerni		<i>pepXF362</i>	ACAGAGACTTAAGCTTAGCAG	
Protismerni		<i>pepXR1172</i>	GTTCCAATGTCAATAGTTTC	
2. stopnja				
Smerni		<i>pepXF449</i>	TTATTCCAAACCTTGCAATCC	
Protismerni		<i>pepXR1115</i>	TGTGCCTGAAGAACATTG	
<i>uvrA</i> (BB0837)				677
1. stopnja				
Smerni		<i>uvrF1408</i>	GAAATTTAAAGGAAATTAAAAGTAG	
Protismerni		<i>uvrR2318</i>	CAAGGAACAAAAACATCTGG	
2. stopnja				
Smerni		<i>uvrF1434</i>	GCTTAAATTTAATTGATGTTGG	
Protismerni		<i>uvrR2111</i>	CCTATTGGTTTGATTTATTG	
<i>recG</i> (BB0581)				741
1. stopnja				
Smerni		<i>recF890</i>	CCCTTGTGCGCTTGCTTTC	
Protismerni		<i>recR1694</i>	GAAAGTCCAAACGCTCAG	
2. stopnja				
Smerni		<i>recF917</i>	CTTTAATTGAAGCTGGATATC	
Protismerni		<i>recR1658</i>	CAAGTTGCATTGGACAATC	

Reakcijsko mešanico smo zmešali na vrtinčnem mešalu in približno 15 s centrifugirali, da so se morebitne kapljice na stenah epruvete posedle.

V mikrotitrsko ploščo (8x12) smo po vrsticah odpipetirali po 20 µl reakcijske mešanice za ustrezni gen. Od vrstice A navzdol so si geni oziroma mešanice za določen gen sledile tako: *nifS*, *clpA*, *rplB*, *gyrA*, *clpX*, *pepX* ter *uvrA*. Zadnja vrstica (H) je ostala prazna, saj smo mešanice za gen *recG* odpipetirali v označenih 12 mikrocentrifugirk za PCR.

V pripravljeni mikrotitrski ploščici smo po stolpcih v mikrotitrski plošči, ki so ustreznati določenemu vzorcu, dodajali 5 µl DNA iz epruvet, ki smo jih 30 min pred uporabo greli v termostresalniku in nato pred uporabo sproti mešali na vrtinčnem mešalu. Prav tako smo po 5 µl vzorcev dodali v mikrocentrifugirke za PCR. Ploščo smo dobro preleplili z samolepilno folijo, da nam med pomnoževanjem zaradi segrevanja vzorci ne bi hlapeli.

Pripravljeni mikrotitrski ploščo smo prenesli v napravo za PCR Veriti® 96-Well Thermal Cycler, kjer je potekala prva stopnja pomnoževanja pri pogojih, navedenih v preglednici 5.

Preglednica 5: Pogoji za prvo stopnjo pomnoževanja za borelijske gene *nifS*, *clpA*, *rplB*, *pyrG*, *clpX*, *pepX* in *uvrA*

	Temperatura	Čas	Opomba
	95 °C	5 min	
	95 °C	30 s	
8 ciklov	55–48 °C	30 s	1 °C/cikel
	72 °C	30 s	
	95 °C	30 s	
20 ciklov	48 °C	30 s	
	72 °C	30 s	
	72 °C	5 min	
	10 °C	≈	

Mikrocentrifugirke za PCR smo prenesli v napravo T3 Thermocycler, kjer je prva stopnja potekala pri pogojih, navedenih v preglednici 6.

Preglednica 6: Pogoji za prvo stopnjo pomnoževanja za borelijski gen *recG*

	Temperatura	Čas
	95 °C	10 min
	95 °C	30 s
30 ciklov	55 °C	30 s
	72 °C	30 s
	72 °C	5 min
	10 °C	≈

3.2.2.3 Druga stopnja vgnezdenega oz. polvgnezdenega PCR

Za drugo stopnjo pomnoževanja smo po prej omenjenem postopku pripravili nove reakcijske mešanice, le da smo tokrat uporabili oligonukleotidne začetnike za drugo stopnjo (pregl. 4).

Po končani reakciji prve stopnje smo z mikrotitrsko ploščo z vzorci z multikanalno pipeto odpipetirali 5 µl vzorca, ki smo ga prenesli v mikrotitrsko ploščo oziroma v mikrocentrifugirke za PCR v primeru gena *recG*, ki je vsebovala reakcijske mešanice za drugo stopnjo. Pripravljeno ploščo smo prenesli v napravo za PCR Veriti® 96-Well Thermal Cycler, kjer je potekala druga stopnja pomnoževanja pri pogojih navedenih v preglednici 7.

Preglednica 7: Pogoji za drugo stopnjo pomnoževanja za borelijske gene *nifS*, *clpA*, *rplB*, *pyrG*, *clpX*, *pepX* in *uvrA*

Temperatura	Čas
95 °C	5 min
95 °C	30 s
35 ciklov	50 °C 72 °C
	30 s 30 s
72 °C	5 min
10 °C	≈

Mikrocentrifugirke za PCR smo prenesli v napravo T3 Thermocycler, kjer je reakcija potekala pri pogojih navedenih v preglednici 8.

Preglednica 8: Pogoji za drugo stopnjo pomnoževanja za borelijski gen *recG*

Temperatura	Čas
95 °C	5 min
95 °C	30 s
30 ciklov	55 °C 72 °C
	30 s 30 s
72 °C	5 min
10 °C	≈

3.2.2.4 Agarozna gelska elektroforeza

Po zaključeni drugi stopnji pomnoževanja smo prikazali pridelke z gelsko elektroforezo tako, da smo na kadičko za vlivanje agaroznega elektroforeznega gela namestili glavnice. Za pripravo 1-odstotnega agaroznega gela smo 1,5 g agaroze (Agarose, For Routine Use) dodali v 150 ml pufra TAE. Mešanico smo segrevali v mikrovalovni pečici, ko se je agarosa stopila, smo dodali 15 µl barvila SYBR® Safe DNA Gel Stain ter še enkrat dobro premešali. Vsebino smo nalili v kadičko in ko se je gel strdil, odstranili glavnice in kadičko postavili v banjico z 1x koncentriranim pufrom TAE.

Na odrezane trakove parafilma smo nanesli po 3 µl pufra za PCR 10x CoralLoad in v vsako kapljico dodali po 10 µl posameznega pridelka ter premešali s pipeto. Po 13 µl posameznega pridelka, zmešanega s pufrom, smo dodali v posamezno jamico na agaroznem elektroforeznem gelu. Elektroforeza je nato potekala 20 min pri napetosti 120 V.

Gel smo prenesli v fotodokumentacijski sistem, kjer smo preverili uspešnost pomnoževanja.

Po 5 µl vsakega vzorca z mikrotitrsko ploščo in iz mikrocentrifugirke za PCR smo prenesli v dve novi mikrotitrski plošči, eno za smerne začetne oligonukleotide, drugo pa za protismerne.

3.2.2.5 Čiščenje pridelkov PCR

Sledilo je čiščenje pridelkov PCR z encimoma eksonukleazo I in termosenzitivno alkalno fosfatazo FastAP™. V novo mikrocentrifugirko smo dodali 0,5 µl *ExoI* in 1,0 µl FastAP™ za vsak vzorec, kar je za vse vzorce za obe mikrotitrski plošči znašalo 288 µl mešanice. Nato smo jo premešali na vrtinčnem mešalu. Vsakemu vzorcu smo dodali po 1,5 µl restrikcijske mešanice.

Obe mikrotitrski plošči z vzorci in dodanimi encimi smo prenesli v napravo za PCR Veriti® 96-Well Thermal Cycler in po protokolu proizvajalca izvedli program, ki je potekal 15 min pri temperaturi 37 °C in 15 min pri temperaturi 85 °C.

3.2.2.6 Sekvenčna reakcija

Po končanem programu smo očiščenim vzorcem dodali začetne oligonukleotide za sekvenčno reakcijo, sekvenčni puffer, sekvenčni terminator in vodo brez nukleaz.

Za vsak vzorec DNK v posamezni luknjici v obeh mikrotitrskih ploščah smo potrebovali:

- 3 µl sekvenčnega pufra,
- 2 µl sekvenčnega terminatorja,
- 1,3 µl oligonukleotidnih začetnikov, ki so bili enaki kot začetniki, uporabljeni v drugi stopnji vgnezdenega PCR,
- 8,7 µl vode Nuclease-free water.

Obe mikrotitrski plošči smo prenesli v napravo za PCR Veriti® 96-Well Thermal Cycler, kjer je potekla sekvenčna reakcija pri pogojih, navedenih v preglednici 9.

Preglednica 9: Pogoji za sekvenčno reakcijo

Temperatura	Čas
96 °C	1 min
96 °C	10 s
25 ciklov	50 °C 60 °C
	5 s 4 min
	4 °C
	≈

S kompletom BigDye X Terminator® Purification Kit smo po protokolu odstranili terminatorje BigDye, ki se niso vgradili, in soli. Komplet vsebuje raztopino SAM™, ki ojača delovanje raztopine XTerminator® Solution in stabilizira reakcijo, ter raztopino XTerminator® Solution, ki odstrani terminatorje, ki se niso vgradili in odvečne soli.

Obe raztopini smo premešali in v kadičko nalili 17,28 ml raztopine SAM™ in 3,84 ml raztopine XTerminator®, kar je pomenilo, da na eno luknjico v mikrotitrski plošči pride 90 µl raztopine SAM™ in 20 µl raztopine XTerminator®. Z multikanalno pipeto smo nato premešali raztopino v kadički in odpipetirali po 110 µl mešanice v vsako izmed luknjic v obeh mikrotitrskih ploščah.

Vsako izmed plošč smo nato dobro zalepili s samolepilno folijo in jo prenesli v vrtinčno mešalo MixMate®, kjer smo ju mešali 30 min pri 2000 vrt./min. Po stresanju smo plošči prenesli v centrifugo Centrifuge 5430, kjer smo ju centrifugirali 2 min pri 1000 vrt./min.

S plošč smo odstranili folijo in ju namestili v sekvenator Genetic Analyzer 3500. Uporabili smo program StdSeq_BDX_50_POP7, pri čemer avtomatiziran sistem v osmih kapilarah omogoča ločevanje vzorcev s kapilarno elektroforezo in sekvenciranje s fluorescenco na osnovi metode po Sangerju.

3.2.3 Analiza rezultatov

Dobljene sekvence smo uvozili v program CLC Main Workbench 6.3.1, MLST Module. Program je povezan s podatkovno bazo MLST, ki jo ureja Imperial College London, s katero tudi primerja naše sekvence. Sekvence smo lahko v programu tudi ročno popravljali, v primeru, da je imel program težave z določanjem določenega nukleotida, tako da smo primerjali obe verigi DNK in se odločili, kateri nukleotid je verjetnejši. V primeru, da so bile enake sekvence že v podatkovni bazi MLST, smo dobili izpisane alelne številke in če je bila kombinacija alelnih številk že v bazi tudi sekvenčni tip. V primeru, da smo določili nov alel, smo postopek pomnoževanja in sekvenciranja. Če se je alel res izkazal za novega, smo sekvence poslali skrbnici strani MLST (Gabriele Margos), ki je sekvenco dodala v bazo in ji pripisala naslednjo prosto alelno številko. Poleg same

sekvence smo za vsak vzorec v tabeli v programu Microsoft Excel morali poslati še našo referenčno številko, podatke o tem, kdo ga je sekvenciral, kdo je skrbnik podatkovne baze, iz katere države in katere regije je vzorec, za katero bakterijsko vrsto gre glede na rezultate metode polimorfizma dolžin restriktivskih fragmentov, tip vzorca (npr. koža), leto pridobitve vzorca, ime pošiljatelja podatkov, kdo je pridobil vzorce in točno zemljepisno dolžino in širino. Na enak način smo poslali tudi morebitno novo kombinacijo alelnih števil in pridobili nov sekvenčni tip.

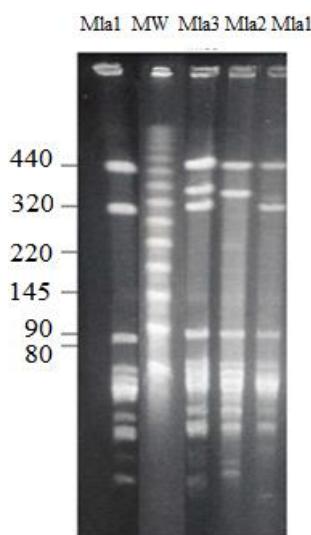
Podatke o sekvenčnih tipih in alelnih številkah smo uredili v novi datoteki v programu Microsoft Excel, to pa smo nato uvozili v program BioNumerics 7.1. Vse naše vzorce smo zbrali in s pomočjo programa izrisali minimalno vpeto drevo.

4 REZULTATI

Z metodo *MluI*-LRFP smo 70 borelijskim izolatom določili vrsto (sl. 3). Izmed 70 bolnikov jih je 63 imelo erythema migrans, 5 acrodermatitis chronica atrophicans, 2 bolnika sta imela multipli erythema migrans. Vse izolate smo identificirali kot *B. afzelii*, določili smo vse štiri podtipe: Mla1, Mla2, Mla3 in Mla4. Koliko izolatov spada v posamezen podtip je navedeno v preglednici 10, podtipu Mla1 jih je pripadalo 94,3 %. Nekatere podtipe smo povezali samo z določeno klinično sliko. Podtipa Mla2 in Mla4 sta pri bolnikih vedno povzročila acrodermatitis chronica atrophicans, podtip Mla3 pa vedno multipli erythema migrans, vendar je bilo število izolatov pri teh podtipih majhno. Izolati, ki smo jim določili podtip Mla1, so lahko povzročili različne klinične slike.

Preglednica 10: Podtipi vrste *Borrelia afzelii* in število izolatov, ki smo jim z metodo polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov določili posamezen podtip

Borelijska vrsta	Vsi izolati	Mla1	Mla2	Mla3	Mla4
<i>Borrelia afzelii</i>	70 (100,0 %)	66 (94,3 %)	2 (2,9 %)	1 (1,4 %)	1 (1,4 %)



Slika 3: Primer gela pri metodi polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov, rezanih z encimom *MluI*. Levo so označene velikosti fragmentov v kb, nad sliko pa dobljeni podtipi bakterije *Borrelia afzelii* (Mla1, Mla2, Mla3) in označevalec velikosti (MW).

Z metodo MLST smo določili alelne številke in sekvenčne tipe za posamezne izolate. Podrobni rezultati obeh metod so prikazani v prilogi A.

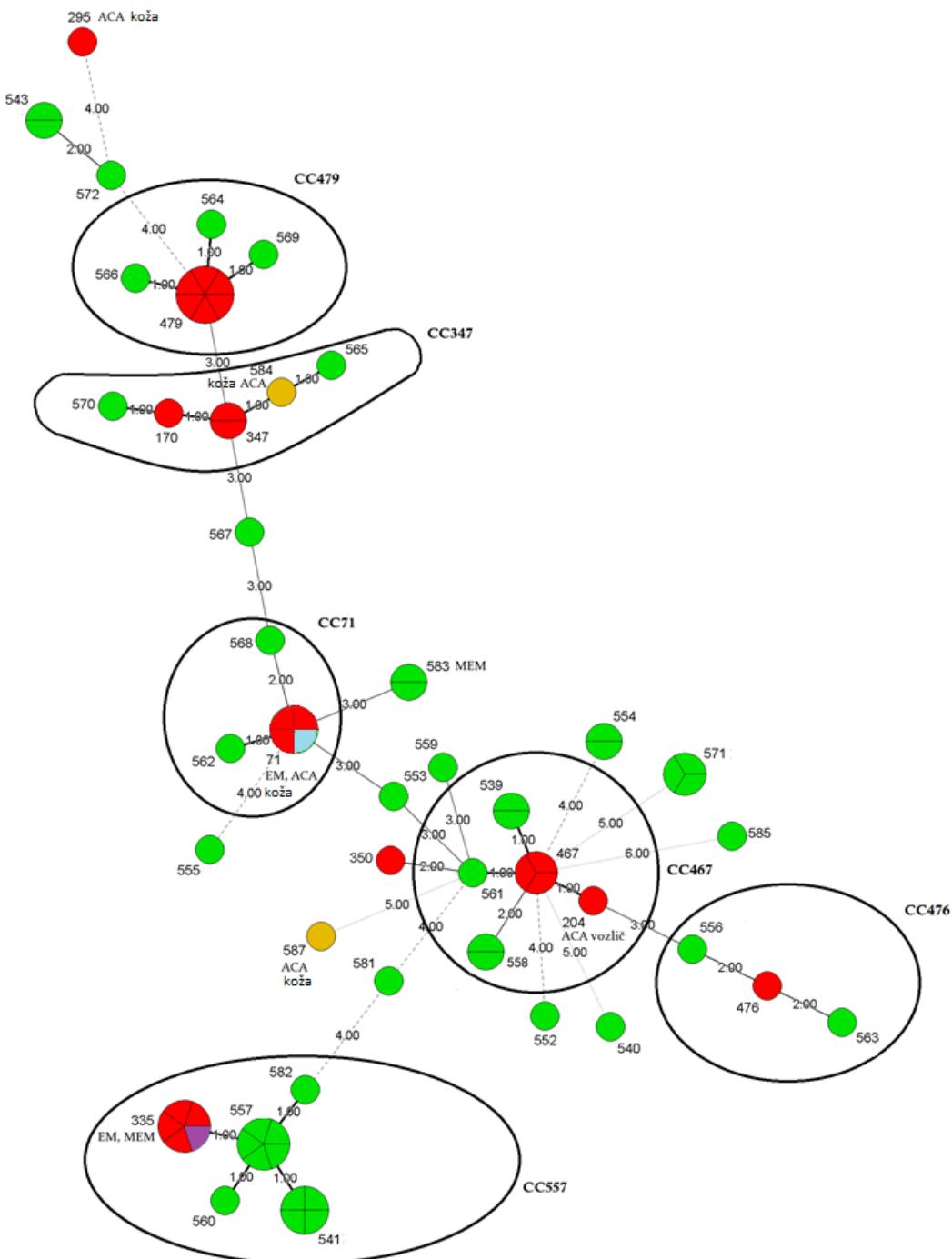
Na osnovi dobljenih alelnih številk in sekvenčnih tipov naših izolatov smo izrisali minimalno vpeto drevo, ki prikazuje sorodnost dobljenih sekvenčnih tipov, prav tako smo določili klonske komplekse (sl. 4). Določili smo šest klonskih kompleksov in 21

»osamelcev« (pregl. 11, sl. 4). Klonske komplekse in sekvenčne tipe smo primerjali s podtipi določenimi z metodo LRFP-*MluI* in s klinično sliko bolnika iz katerega je bil določen izolat izoliran (pregl. 11). Posamezne klonske komplekse (CC347, CC71, CC467, CC557) smo povezali z več kot eno klinično sliko. Niti nekateri izolati, ki imajo enak sekvenčni tip (npr. 71, 335, 583), niso pri bolnikih povzročali enake klinične slike (pregl. 11). Sekvenčni tipi, ki povzročajo enako klinično sliko, glede na izris minimalnega vpetega drevesa niso nujno sorodni (sl. 4)

Iz slike 4 je razvidno, da lahko z metodo MLST prikažemo večjo raznolikost izolatov v primerjavi z metodo tipizacije LRFP-*MluI*.

Preglednica 11: Posamezni klonski kompleksi in sekvenčni tipi, ki spadajo vanje, borelijski podtipi določeni z metodo polimorfizma dolžin restriktijskih fragmentov (*MluI-LRFP*) ter klinična slika pri bolniku iz katerega smo pridobili določen izolat. Oznake klonskih kompleksov so zapisane s črkama CC (angl. clonal complex), čemur sledi oznaka sekvenčnega tipa izolata v kompleksu, številke pa predstavljajo število izolatov s posameznim sekvenčnim tipom. Kadar je za sekvenčni tip določenih več različnih *MluI-LRFP* podtipov oziroma kliničnih slik, je s številko navedeno število izolatov posameznega podtipa oziroma izolatov z določeno klinično sliko. Kadar številke ni, imajo vsi izolati enak podtip oziroma klinično sliko. Krajšava EM predstavlja erythema migrans, ACA pa acrodermatitis chronica atrophicans.

Oznaka klonskega kompleksa in število izolatov s posameznim sekvenčnim tipom	Sekvenčni tip	<i>MluI-LRFP</i>	Klinična slika
CC347	2	347	BaMla1
	1	170	BaMla1
	1	570	BaMla1
	1	584	BaMla2
	1	565	BaMla1
CC479	6	479	BaMla1
	1	566	BaMla1
	1	564	BaMla1
	1	569	BaMla1
CC71	4	71	{ 3 BaMla1 1 BaMla4
	1	562	BaMla1
	1	568	BaMla1
CC467	3	467	BaMla1
	2	558	BaMla1
	1	561	BaMla1
	2	539	BaMla1
	1	204	BaMla1
CC476	1	476	BaMla1
	1	556	BaMla1
	1	563	BaMla1
CC557	5	557	BaMla1
	5	335	{ 4 BaMla1 1 BaMla3
	1	582	BaMla1
	4	541	BaMla1
	1	560	BaMla1
	1	295	BaMla1
»osamelci«	2	543	BaMla1
	1	572	BaMla1
	1	567	BaMla1
	1	555	BaMla1
	2	583	2 BaMla1
	1	559	BaMla1
	1	553	BaMla1
	1	350	BaMla1
	1	587	BaMla2
	1	581	BaMla1
	1	552	BaMla1
	1	540	BaMla1
	2	554	BaMla1
	3	571	BaMla1
	1	585	BaMla1



Slika 4: Prikaz sorodnosti z izrisom minimalnega vpetega drevesa za izolate bakterije *Borrelia afzelii*, pridobljene z metodo tipizacije na osnovi multilokusnih zaporedij. Vsak krog ponazarja sekvenčni tip, velikost in črte v krogu pa število izolatov uvrščenih v sekvenčni tip. Poleg krovov so označeni sekvenčni tipi, na povezovalnih črtah pa število razlik v alelih med posameznimi izolati. Poleg označenih sekvenčnih tipov je navedena klinična slika bolnika v primeru, da gre za multipli erythema migrans (MEM) ali acrodermatitis chronica atrophicans (ACA). Erythema migrans (EM) je pripisan, kadar je pri enem sekvenčnem tipu možnih več kliničnih slik. Kjer zraven označenega sekvenčnega tipa ni navedeno nič, je bila klinična slika bolnika erythema migrans. Z rdečo barvo so označeni že znani sekvenčni tipi, z zeleno pa novi sekvenčni tipi. Z rumeno barvo sta označena z metodo restrikcije določena podtipa Mla2, z vijolično podtip Mla3 in z modro podtip Mla4. S črnimi elipsami so označeni klonski kompleksi, katerim je pripisana označka klonskega kompleksa.

5 RAZPRAVA

Za diagnostiko borelijske okužbe so na voljo številne metode, katerih namen je posredno ali neposredno dokazati prisotnosti bakterije *B. burgdorferi* sensu lato. Pri kliničnih, epidemioloških in populacijskih študijah pa običajno razlikujemo znotraj vrst in določamo podtipe. Za tipizacijo borelij se uporablajo fenotipizacijske metode, kot so serotipizacija na osnovi beljakovin OspA in OspC, ter metoda multilokusne encimske elektroforeze (Wang in sod., 1999; Balmelli in Piffaretti, 1996). Genotipizacijske metode, ki so v uporabi, so metoda polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov celotnega genoma v kombinaciji z elektroforezo v utripajočem polju (RFLP-PFGE), analiza lokusov z zapisom za tandemske ponovitve DNK in sekvenciranje (npr. MLST) (Fournier in sod., 2004; Li in sod., 2009).

Ovrednotiti smo žeeli genotipizacijsko metodo MLST, ki smo jo tudi primerjali z metodo RFLP-PFGE, ki je za tipizacijo bakterij zelo uveljavljena.

Metoda elektroforeze v utripajočem polju v kombinaciji z restrikcijo celotnega genoma je uspešna za tipizacijo večine vrst kompleksa *B. burgdorferi* sensu lato, restrikcijska endonukleaza *MluI* pa je pogosto encim izbire (Belfazia in sod., 1993; Ružić-Sabljić in sod., 2008). Taki različici metode RFLP-PFGE pravimo *MluI-LRFP*. S to metodo lahko pri vsaki od vrst kompleksa *B. burgdorferi* sensu lato določimo od dve (*B. lusitanie*, *B. valaisiana*, *B. spielmanii*) do petnajst različic (*B. burgdorferi* sensu stricto). Zadnji podatki kažejo, da lahko *B. afzelii* razdelimo na štiri različice, in sicer Mla1, Mla2, Mla3 in Mla4 (Ružić-Sabljić in Cerar, 2014). RFLP-PFGE je zelo razširjena tipizacijska metoda, ker gre za eno izmed najbolj ponovljivih metod, ki ima običajno dobro razlikovalno moč, tudi interpretacija je dokaj enostavna (Tenover in sod., 1997; Lindstedt, 2005).

Metodo MLST so za borelike razvili šele leta 2008, zato da bi omogočili evolucijske in epidemiološke analize, izbrali so osem gospodinjskih genov. Ker pri tej metodi določimo za vsako vrsto mnogo bakterijskih različic, je tudi lažje ugotavljati evolucijske povezave med bakterijskimi populacijami in geografsko strukturo populacij (Margos in sod., 2008). Metoda ima veliko razlikovalno moč, seve lahko hitro in enostavno primerjamo s podatkovno bazo dostopno na spletu, je pa relativno draga (Feil in Spratt, 2001; Li in sod., 2009).

5.1 RAZNOLIKOST ZNOTRAJ VRSTE

Metoda PFGE se je za študije borelij lymske borelioze največ uporabljala v devetdesetih letih 20. stoletja in na prelomu tisočletja. Takrat je izšlo nekaj objav avtorjev o uporabi metode predvsem z namenom diferenciacije med vrstami kompleksa *B. burgdorferi* sensu

lato in povezavo med klinično sliko in posamezno vrsto (Belfaiza in sod., 1993; Busch in sod., 1996; Picken in sod., 1998; Ružić-Sabljić in sod., 2002). Vsi avtorji so ugotavliali, da metoda občasno omogoča tudi razlikovanje znotraj posamezne vrste, vendar zataji pri razlikovanju sevov *B. afzelii*, kjer so vedno določili podtip Mla1. Samo Busch in sod. (1996) so ugotavliali, da je mogoče, da se pojavljajo razlike tudi znotraj vrste *B. afzelii*, dokler leta 2008 Ružić-Sabljić in sod. niso opisali izolatov Mla2 in Mla3. Podtip Mla1 je še vedno dominanten podtip, ki se pojavlja pri večini izolatov vrste *B. afzelii* (Belfaiza in sod., 1993; Picken in sod., 1998, Ružić-Sabljić in sod., 2002; Ružić-Sabljić in sod., 2008). Zaradi tega smo tudi mi pričakovali, da bomo določili predvsem podtip Mla1.

Vir vseh 70 borelijskih sevov so bili bolniki z diagnozo kožne oblike lymske borelioze, ki so jim opravili biopsijo kože na Kliniki za infekcijske bolezni in vročinska stanja v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana med letoma 1994 in 2013. Iz bakterijske kulture smo z metodo inkorporacije v gelu izolirali DNK, ki smo jo rezali z restriktionskim encimom *MluI*. Dobljene restriktionske vzorce smo primerjali z znanimi restriktionskimi vzorci borelijskega genoma klinično pomembnih vrst, ki so zbrani v preglednici 2.

Izmed 70 sevov smo določili 66 podtipov *B. afzelii* Mla1, kar pomeni, da smo 94,7 % vseh izolatov uvrstili v podtip Mla1, kar se sklada z našimi pričakovanji. Dva seva oziroma 2,9 % vseh izolatov smo uvrstili v podtip Mla2 in po en sev (1,4 %) v podtip Mla3 oziroma Mla4 (pregl. 10).

V naših vzorcih smo določili vse štiri podtipe *B. afzelii*, ki je bila tudi edina vrsta iz kompleksa, ki smo jo zaznali, kar se sklada s podatki iz Evrope, kjer je ravno *B. afzelii* najpogosteje izolirana vrsta iz kliničnega materiala (Ružić-Sabljić in sod., 2002).

Da smo dokazali samo *B. afzelii* prav tako ni presenetljivo, saj so bili naši vzorci povečini vzorci biopsij kože, *B. afzelii* pa je v Evropi najpogostejši povzročitelj kožnih borelijskih obolenj (Strle in Stanek, 2009).

Omenjena metoda diferenciacije je bolj enostavna od metode MLST, vendar pa jo uporabljam le redki laboratoriji. Metoda ni dostopna vsem laboratorijem, ker je za izvedbo potrebna bakterijska kultura, gojenje borelij pa je zahteven postopek (Olive in Bean, 1999). Velika omejitev kultivacije je majhna občutljivost pri vzorcih iz bolnikov, ki nimajo kožnih oblik bolezni, težavna je priprava gojišča, ki mora biti stalno enake kakovosti in metoda je časovno zamudna, saj moramo vzorce inkubirati do devet tednov (Aguero-Rosenfeld in sod., 2005; Ružić-Sabljić in sod., 2002). Metoda je lahko še dodatno zamudna, če imamo opravka z velikim številom vzorcev, saj interpretacija rezultatov terja kar nekaj časa (Olive in Bean, 1999).

Odkar so leta 2008 razvili shemo MLST za borelije, so sicer objavili kar nekaj raziskovalnih člankov o uporabi te metode (Margos in sod., 2008; Vitorino in sod., 2008; Hoen in sod., 2009; Margos in sod., 2009; Margos in sod., 2010; Ogden in sod., 2011; Muchacheva in Kovalev, 2013; Margos in sod., 2014). Avtorji so raziskovali predvsem genetsko raznolikost in filogenetske povezave med in znotraj borelijskih vrst, preučevali so tudi geografsko razporeditev posameznih genotipov (Margos in sod., 2008; Vitorino in sod., 2008; Hoen in sod., 2009; Ogden in sod., 2011; Vollmer in sod., 2011; Muchacheva in Kovalev, 2013; Margos in sod., 2014). Opisali so tudi dve novi borelijski vrsti (Margos in sod., 2009; Margos in sod., 2010).

Z metodo MLST smo iz izolirane DNK z vgnezdenim PCR pomnožili osem gospodinjskih genov, ki smo jih sekvencirali, vsaki sekvenci pa pripisali alelno številko. Iz kombinacij vseh osmih alelnih številk smo določili sekvenčne tipe (angl. sequence type, ST). Iz naših rezultatov lahko potrdimo, da metoda MLST dobro razlikuje znotraj vrste *B. afzelii*, saj smo določili 41 različnih ST, od katerih jih je bilo 31 na novo odkritih glede na podatkovno bazo MLST (Aanensen in Spratt, 2005) (sl. 4).

V primerjavi z metodo *MluI*-LRFP, pri kateri smo vrsto razdelili na štiri podtipe, smo z metodo MLST, pri kateri smo dobili 41 ST, bolje razlikovali znotraj vrste *B. afzelii*. Ker je metoda namenjena razlikovanju znotraj vrst, smo pričakovali, da bomo pokazali veliko raznolikost znotraj naših izolatov *B. afzelii*.

Da je bilo 31 ST najdenih prvič ni presenetljivo, saj smo vse naše izolate opredelili kot *B. afzelii*, katere gostitelj so v naravi predvsem glodavci. Vollmer in sod. (2011) so predvidevali, da vrsta gostitelja in njegova migracija določata geografsko razširjenost borelij. S pticami povezani vrsti *B. valaisiana* in *B. garinii* glede na analizo multilokusnih zaporedij kažeta prostorsko mešanje ST med državami, *B. afzelii* pa kaže diferenciacijo v populacijah znotraj štirih držav, ki so jih preučevali (Velika Britanija, Francija, Latvija, Nemčija). Glodavci ostajajo tekom življenja na bolj ali manj omejenem področju, tako da bi lahko v primeru naših izolatov šlo za geografsko omejene genotipe, ki jih drugje ne najdemo prav pogosto, zato jih pred tem še niso določili.

V Evropi so v Nemčiji določili že 180 različnih ST, kar je tudi največ, v Angliji 114 različnih ST in v Latviji 81 različnih ST, v preostalih državah pa 60 ali manj (MLST, 2015). V nam najbližjima Avstriji in Italiji so določili 19 oziroma 29 različnih ST. Vendar uporaba metode MLST za genotipizacijo borelij ni tako zelo razširjena, čeprav je bolj razširjena od metode *MluI*-RFLP, tako da bi bilo mogoče tudi, da so naši ST na novo določeni, ker jih zaradi manj pogoste uporabe metode ni prej določil še nihče drug.

Metoda je laboratorijem bolj dostopna kot metoda *MluI*-RFLP s stališča enostavnosti izvedbe, saj ne potrebujemo borelijske kulture, pomnoževanje in sekvenciranje potekata

avtomatizirano, vendar so reagenti dražji, naprave za pomnoževanje in določanje sekvenc pa zahtevajo velik denarni vložek.

5.2 POVEZAVA MED PODTIPI IN SEKVENČNIMI TIPI

Glede na podatke iz nekaterih prejšnjih študij (Hanincova in sod., 2013; Gatewood Hoen in sod., 2009) smo se odločili, da bomo v posamezen klonski kompleks uvrstili ST, ki so si z drugimi ST identični v vsaj šestih izmed osmih alelov. Izmed 70 izolatov smo jih 49 uvrstili v različne klonske komplekse, 21 pa opredelili kot »osamelce«. Določili smo šest klonskih kompleksov, in sicer CC71, CC347, CC557, CC479, CC467 in CC476 (pregl. 11).

Klonski kompleks CC557, s skupnim številom 16 izolatov, predstavlja klonski kompleks z največ izolati (sl. 4). Gre tudi za klonski kompleks, ki smo mu določili največ ST, v katere spadajo vsaj štirje izolati. V ST 557 in 335 smo uvrstili po pet izolatov, v ST 541 pa štiri. To bi lahko nakazovalo na to, da je klonski kompleks CC557 najpogosteje zastopan kompleks v Sloveniji. Za potrditev te domneve bi potrebovali večji vzorec izolatov. Prav tako moramo upoštevati, da so bili naši sevi naključno izbrani samo iz bolnikov s kožnimi oblikami lymske borelioze, tako da bi za nadaljnje raziskovanje potrebovali seve izolirane iz drugih kužnin bolnikov z različnimi kliničnimi slikami bolezni (npr. krvi in cerebrospinalne tekočine), vključiti pa bi morali tudi seve izolirane iz klopov in malih sesalcev.

Največ izolatov (21) se ni uvrstilo v noben klonski kompleks (sl. 4). Določili smo jim 16 različnih ST. Veliko število »osamelcev« ne pomeni, da so ti ST genotipsko tako zelo oddaljeni od vseh preostalih ST, ampak samo da z našim delom najverjetnejše nismo zajeli njim sorodnih ST, s katerimi bi jih lahko uvrstili v nove klonske komplekse. Ponovno se nakazuje potreba po večjemu številu preučevanih izolatov.

Čeprav smo potrdili, da metoda MLST bolje razlikuje znotraj vrste *B. afzelii*, bi lahko pričakovali, da bodo rezultati obeh metod vseeno skladni, ugotovili pa smo, da povezave med ST in *MluI*-LRFP podtipi ni. Znotraj posameznih klonskih kompleksov smo določili več različnih podtipov. V klonski kompleks CC347 smo uvrstili podtipa Mla1 in Mla2, čeprav pri dveh različnih ST. V klonskem kompleksu CC557 smo določili podtipa Mla1 in Mla3 (sl. 4). V tem primeru so imeli izolati z enakim ST določene različne podtipe, saj smo štiri izolate iz ST 335 opredelili kot podtip Mla1, en izolat iz ST 335 pa kot Mla3. Prav tako smo v CC71 pri ST 71 določili enemu izolatu podtip Mla4, ostalim trem pa Mla1 (sl. 4). Torej ne samo, da metoda MLST bolje razlikuje znotraj vrste, temveč razlikovanje temelji na drugačnih kriterijih, saj gre za sekvence osmih gospodinjskih genov v primerjavi z restrikcijo celotnega genoma z encimom *MluI* in potovanjem restrikcijskih fragmentov, kar se kaže v razvrstitvi izolatov, ki se ne skladata. Podtipe Mla2 smo uvrstili v različne

klonske komplekse oziroma med »osamelce«, prav tako pa smo podtipa Mla3 in Mla4 uvrstili celo v enak ST, kot nekatere izolate s podtipom Mla1.

5.3 POVEZAVA MED PODTIPI IN KLINIČNO SLIKO

Podtip Mla1 je najpogosteji podtip *B. afzelii*. Podtipa Mla2 in Mla3 sta redka podtipa. Podtip Mla2 so izolirali iz kože bolnikov z acrodermatitis chronica atrophicans, podtip Mla3 pa iz kože bolnikov z multiplimi erythema migrans (Ružić-Sabljić in sod., 2008). Mla4 zaenkrat še ni opisan, izoliran je bil le iz vzorca kožne biopsije bolnika z acrodermatitis chronica atrophicans v Sloveniji.

Med vzorci smo imeli pet različnih izolatov, ki so pri bolnikih povzročali acrodermatitis chronica atrophicans (pregl. 11). Pri dveh od teh petih izolatov smo kot podtip, pridobljen z *MluI-LRFP* določili Mla2, kar sta bila tudi edina izmed vseh 70 vzorcev s podtipom Mla2. Ker gre za iste vzorce, kot so bili uporabljeni v raziskavi Ružić-Sabljić in sod. (2008), novih izolatov s podtipom Mla2 nismo določili.

Dva izolata, ki sta pri bolnikih prav tako povzročala acrodermatitis chronica atrophicans smo uvrstili v podtip Mla1, enega pa v podtip Mla4.

Pri bolnikih z acrodermatitis chronica atrophicans, ki je kronična oblika bolezni, smo torej pri treh izolatih izmed petih določili redka podtipa (Mla2, Mla3). Možno je, da bi dolga perzistanca borelij v koži privredla do pojava redkih podtipov. Praktično vsi bolniki s to obliko bolezni imajo visok titer protiteles, kar pomeni, da bi okolje z močnim pritiskom zaradi gostiteljevega imunskega odziva lahko privredlo do sprememb v genomu borelij (Stanek in Strle, 2003).

Pri dveh bolnikih se je erythema migrans hkrati pojavil na več mestih na koži, čemur pravimo multipli erythema migrans. Enemu izolatu smo določili podtip Mla1, drugemu pa podtip Mla3. Izolat s podtipom Mla3 ni nov primer podtipa Mla3, saj je bil vzorec isti kot v prejšnji raziskavi, v kateri so opisali podtip Mla3 (Ružić-Sabljić in sod. 2008).

Glede na naše rezultate se nakazuje, da podtip Mla2 najdemo samo pri bolnikih s klinično sliko acrodermatitis chronica atrophicans in podtip Mla3 samo pri bolniki z multiplim erythema migrans. Pri bolnikih, pri katerih se pojavi klinična slika acrodermatitis chronica atrophicans izoliramo podtipe Mla1, Mla2 in Mla4, pri bolnikih z multiplim erythema migrans pa podtipe Mla1 in Mla3. Čeprav smo nakazali povezavo med podtipi, določenimi z metodo *MluI-LRFP* in klinično sliko, je bilo število izolatov redkeje izoliranih podtipov, kot so Mla2, Mla3 in Mla4 premajhno, da bi povezavo lahko potrdili.

5.4 POVEZAVA MED SEKVENČNIMI TIPI, KLONSKIMI KOMPLEKSI IN KLINIČNO SLIKO

Že v prejšnjih študijah so ugotavljali, da se lahko borelijski klonski kompleksi razlikujejo v specifičnosti do gostitelja in stopnji patogenosti za človeka, vendar so take študije izvajali predvsem na klonskih kompleksih, ki so temeljili na beljakovini OspC (Qui in sod., 2008). Hanincova in sodelavci (2013) pa so z metodo MLST na kliničnih izolatih *B. burgdorferi* sensu stricto preučevali strukturo populacije in ocenjevali genetsko raznolikost izolatov. Povezave med genotipom, pridobljenim z MLST, in nagnjenostjo k povzročitvi človeške okužbe kot take niso zaznali, so pa opazili značilno povezavo med določenimi klonskimi kompleksi in vrsto okužbe, ki je bila lahko lokalizirana ali diseminirana. Uporabljeni vzorci so bili vzorci erythema migrans kot primer lokalizirane okužbe in vzorci krvi kot primer diseminirane okužbe.

Mi smo multipli erythema migrans obravnavali kot zgodnjo diseminirano okužbo, saj gre za razsoj borelij iz primarnega erythema migrans, prav tako bi kot diseminirano obliko lahko opredelili acrodermatitis chronica atrophicans (Wormser in sod., 2008; Rojko, 2012a; Hofhuis in sod., 2015).

Izmed naših šestih klonskih kompleksov je bila samo v CC476 in CC479 klinična slika pacientov pri vseh izolatih v kompleksu enaka, ker so imeli vsi bolniki erythema migrans (pregl. 11). V klonskih kompleksih CC71, CC347 in CC467 so bili vzorci iz bolnikov, ki so imeli erythema migrans ali acrodermatitis chronica atrophicans, v CC557 pa so bili vzorci iz bolnikov z erythema migrans ali multiplim erythema migrans.

V nekaterih klonskih kompleksih so se celo znotraj istega ST klinične slike bolnikov, iz katerih smo izolate pridobili, razlikovale. V ST 71 smo uvrstili tri izolate iz vzorcev kože z erythema migrans in enega iz vzorca acrodermatitis chronica atrophicans, v ST 335 in 583 pa izolate iz erythema migrans in multiplega erythema migrans. Da so v istem kompleksu sevi pridobljeni iz bolnikov z erythema migrans in multiplim erythema migrans ni nenavadno, ker gre pri multiplem erythema migrans za razsoj borelij. Prav tako ni nenavadno, da so v istem kompleksu sevi iz bolnikov z erythema migrans in acrodermatitis chronica atrophicans, saj gre pri acrodermatitis chronica atrophicans za perzistenco borelij v koži po pojavu erythema migrans.

Izolate, ki so povzročali multipli erythema migrans ali acrodermatitis chronica atrophicans (diseminirani okužbi), smo uvrstili v različne klonske komplekse, tako da se naši rezultati ne ujemajo s starejšimi študijami in povezave med klonskimi kompleksi ter klinično sliko nismo mogli pokazati. Imeli smo premalo izolatov, ki smo jih po letih naključno izbirali, hkrati pa smo izbrali samo vzorce iz bolnikov z okužbami kože. Za ugotavljanje povezave bi ponovno potrebovali veliko večji in reprezentativni vzorec, ki bi vključeval izolate iz

bolnikov z vsemi kliničnimi slikami, kar predstavlja odprto področje za nadaljnje raziskave.

Naša domneva, ki smo jo postavili na osnovi rezultatov *MluI*-RFLP, in pravi, da bi perzistanca borelij v koži privedla do redkih podtipov, se ne sklada z rezultati metode MLST, kjer smo izolate, ki so povzročali acrodermatitis chronica atrophicans, uvrstili v tri različne klonske komplekse in dva izolata med »osamelce«, bi bilo pa vsekakor potrebno analizirati veliko več izolatov iz bolnikov s kroničnimi okužbami.

6 SKLEPI

- Metoda MLST omogoča dobro razlikovanje znotraj vrste *B. afzelii*, kar smo dokazali z 41 določenimi sekvenčnimi tipi.
- Metoda MLST omogoča boljše razlikovanje znotraj vrste *B. afzelii* kot metoda *MluI-LRFP*, kar smo dokazali s tem, da smo z metodo MLST določili 41 različnih sekvenčnih tipov, z metodo *MluI-LRFP* pa 4 različne podtipe.
- Povezave med klinično sliko bolnikov in sekvenčnimi tipi nismo mogli dokazati, saj so bili izolati, ki so povzročali acrodermatitis chronica atrophicans ali multipli erythema migrans, razvrščeni v različne klonske komplekse in različne sekvenčne tipe, prav tako so nekateri izolati znotraj istih sekvenčnih tipov povzročali različne klinične slike.
- Povezavo med klinično sliko bolnikov in podtipi, ki smo jih določili z metodo *MluI-LRFP*, smo nakazali, ker so naši izolati, določeni kot podtip Mla2 in Mla4, vedno povzročili acrodermatitis chronica atrophicans, izolat podtipa Mla3 pa multipli erythema migrans, vendar je nismo mogli potrditi, ker je bilo naše število izolatov zelo majhno, prav tako so acrodermatitis chronica atrophicans in erythema migrans lahko povzročili izolati, ki smo jim določili podtip Mla1. Metoda MLST torej ni omogočila bolj natančnega dokaza vzročne povezave med sekvenčnim tipom in klinično sliko kot metoda *MluI-LRFP*.

7 POVZETEK

Lymsko boreliozo, ki je v Sloveniji endemska, v Evropi povzročajo bakterije *B. afzelii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* in *B. spielmanii*. Najpogosteje iz bolnikov izolirajo *B. afzelii*, ki je tudi najpogostejši povzročitelj kožnih oblik lymske borelioze. Za razlikovanje borelij se uporablja metoda polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov, ki pa v primerjavi z metodo tipizacije na osnovi multilokusnih zaporedij slabše razlikuje znotraj vrste *B. afzelii*.

Zanimalo nas je, ali tipizacija na osnovi multilokusnih zaporedij res bolje razlikuje znotraj vrste *B. afzelii* kot metoda restrikcije celotnega genoma, želeli smo tudi pokazati povezavo med podtipi, ki jih pridobimo z metodo restrikcije, in sekvenčnimi tipi, ki jih pridobimo s tipizacijo na osnovi multilokusnih zaporedij ter klinično sliko bolnikov, iz katerih smo izolate pridobili.

Pri metodi restrikcije smo z uporabo restrikcijskega encima *MluI* rezali genomsko DNK na večje fragmente, ki smo jih ločevali z elektroforezo v utripajočem polju. Pri tipizaciji na osnovi multiplih lokusov pa smo pomnoževali in sekvencirali osem gospodinjskih genov, sekvenco smo nato primerjali z bazo podatkov MLST, ki je dostopna na spletu. Tako smo za vsak gen pridobili alelno številko, s kombinacijo vseh osmih alelnih številk smo določili sekvenčni tip.

Z metodo restrikcije smo izmed 70 izolatov 66 (94,7 %) uvrstili v podtip Mla1, 2 izolata (2,9 %) v podtip Mla2 in po enega (1,4 %) v podtip Mla3 oziroma Mla4. Z metodo na osnovi multiplih lokusov smo izolatom določili 41 različnih sekvenčnih tipov, od tega je bilo 31 novih glede na podatkovno bazo MLST, ki je dostopna na spletu. Borelige smo uvrstili v šest različnih klonskih kompleksov (CC347, CC479, CC71, CC467, CC476, CC557), 21 sekvenčnih tipov pa med »osamelce«.

Ugotovili smo, da metoda multilokusnih zaporedij res bolje razlikuje znotraj vrste *B. afzelii* kot metoda polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov. Nakazali smo povezavo med klinično sliko bolnikov, od katerih smo pridobili posamezne izolate, in podtipi, določenimi z metodo restrikcije. Nismo odkrili povezave med klinično sliko bolnikov in dobljenimi sekvenčnimi tipi, prav tako nismo odkrili skladnosti med podtipi, določenimi z metodo restrikcije in sekvenčnimi tipi, določenimi z MLST.

8 VIRI

- Aanensen D. M., Spratt B. G. 2005. The multilocus sequence typing network: mlst.net. Nucleic Acids Research, 33: W728-733, doi: 10.1093/nar/gki415: 6 str.
- Aguero-Rosenfeld M. E., Wang G., Schwartz I., Wormser G. P. 2005. Diagnosis of Lyme borreliosis. Clinical Microbiology Reviews, 18, 3: 484–509
- Allardet-Servent A., Bouziges N., Carles-Nurit M. J., Bourg G., Gouby A., Ramuz M. 1989. Use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases for DNA analysis in epidemiological investigations of nosocomial bacterial infections. Journal of Clinical Microbiology, 27, 9: 2057–2061
- Asbrink E., Hovmark A. 1988. Early and late cutaneous manifestations in *Ixodes*-borne borreliosis (erythema migrans borreliosis, Lyme borreliosis). Annals of the New York Academy of Science, 539: 4–15
- Balmelli T., Piffareti J. C. 1996. Analysis of the genetic polymorphism of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by multilocus enzyme electrophoresis. International Journal of Systematic Bacteriology, 46, 1: 167–172
- Baranton G., Postic D., Saint Girons I., Boerlin P., Piffaretti J. C., Assous M., Grimont P. A. 1992. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. International Journal of Systematic Bacteriology, 42, 3: 378–383
- Barbour A. G. 1984. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. Yale Journal of Biology and Medicine, 57, 4: 521–525
- Barbour A. G., Hayes S. F. 1986. Biology of *Borrelia* species. Microbiological Reviews, 50, 4: 381–400
- Belfaiza J., Postic D., Bellenger E., Baranton G., Girons I. S. 1993. Genomic fingerprinting of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by pulsed-field gel electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology, 31, 11: 2873–2877
- Berger B. W., Johnson R. C., Kodner C., Coleman L. 1992. Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from erythema migrans lesions and perilesional skin. Journal of Clinical Microbiology, 30, 2: 359–361

- Brorson Ø., Brorson S. H., Scythes J., MacAllister J., Wier A., Margulis L. 2009. Destruction of spirochete *Borrelia burgdorferi* round-body propagules (RBs) by the antibiotic tigecycline. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 44: 18656–18661
- Brorson Ø., Brorson S. H. 1997. Transformation of cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to normal, mobile spirochetes. *Infection*, 25, 4: 240–246
- Brouqui P., Bacellar F., Baranton G., Birtles R. J., Bjoërsdorff A., Blanco J. R., Caruso G., Cinco M., Fournier P. E., Francavilla E., Jensenius M., Kazar J., Laferl H., Lakos A., Lotric Furlan S., Maurin M., Oteo J. A., Parola P., Perez-Eid C., Peter O., Postic D., Raoult D., Tellez A., Tsellentis Y., Wilske B. 2004. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 12: 1108–1132
- Bugge T. H., Kombrinck K. W., Flick M. J., Daugherty C. C., Danton M. J., Degen J. L. 1996. Loss of fibrinogen rescues mice from the pleiotropic effects of plasminogen deficiency. *Cell*, 87, 4: 709–719
- Busch U., Hizo-Teufel C., Boehmer R., Fingerle V., Nitschko H., Wilske B., Preac-Mursic V. 1996. Three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, and *B. garinii*) identified from cerebrospinal fluid isolates by pulsed-field gel electrophoresis and PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 5: 1072–1078
- Cai S., Kabuki D. Y., Kuaye A. Y., Cargioli T. G., Chung M. S., Nielsen R., Wiedmann M. 2002. Rational design of DNA sequence-based strategies for subtyping *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 9: 3319–3325
- Clarke S. C. 2002. Nucleotide sequence-based typing of bacteria and the impact of automation. *Bioassays*, 24, 9: 858–862
- Coleman J. L., Sellati T. J., Testa J. E., Kew R. R., Furie M. B., Benach J. L. 1995. *Borrelia burgdorferi* binds plasminogen, resulting in enhanced penetration of endothelial monolayers. *Infection and Immunity*, 63, 7: 2478–2484
- Davis M. A., Hancock D. D., Besser T. E., Call D. R. 2003. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 1843–1849
- Dressler F., Whalen J. A., Reinhardt B. N., Steere A. C. 1993. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *Journal of Infectious Diseases*, 167, 2: 392–400

- Engstrom S. M., Shoop E., Johnson R. C. 1995. Immunoblot interpretation criteria for serodiagnosis of early Lyme disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 33, 2: 419–427
- EUCALB. 2008. Diagnosis: Laboratory methods: Serology: Tests in use. V: European Concerted Action on Lyme Borreliosis. Gray J. (ed.). Wien, EUCALB: 2 str.
http://meduni09.edis.at/eucalb/cms_15/index.php?option=com_content&view=article&id=38:serology-tests-in-use&catid=62:diagnosis-serology&Itemid=69 (12.3.2015)
- EUCALB. 2013. Diagnosis: Laboratory methods: Serology: Diagnostic guidelines. V: European Concerted Action on Lyme Borreliosis. Gray J. (ed.). Wien, EUCALB: 2 str.
http://meduni09.edis.at/eucalb/cms_15/index.php?option=com_content&view=article&id=41:serology-diagnostic-guidelines&catid=62:diagnosis-serology&Itemid=72 (12.3.2015)
- Farlow J., Postic D., Smith K. L., Jay Z., Baranton G., Keim P. 2002. Strain typing of *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, and *Borrelia garinii* by using multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 12: 4612–4618
- Feil E. J., Spratt B. G. 2001. Recombination and the population structures of bacterial pathogens. *Annual Review of Microbiology*, 55: 561–590
- Fingerle V., Schulte-Spechtel U.C., Ružić-Sabljić E., Leonhard S., Hofmann H., Weber K., Pfister K., Strle F., Wilske B. 2008. Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. *International Journal of Medical Microbiology*, 298, 3–4: 279–290
- Fleischmann R. D., Adams M. D., White O., Clayton R. A., Kirkness E. F., Kerlavage A. R., Bult C. J., Tomb J. F., Dougherty B. A., Merrick J. M., McKenney K. Sutton G., FitzHugh W., Fields C., Gocayne J. D., Scott J., Shirley R., Liu L. I., Glodek A., Kelley J. M., Weidman J. F., Phillips C. A., Spriggs T., Hedblom E., Cotton M. D., Utterback T. R., Hanna M. C., Nguyen D. T., Saudek D. M., Brandon R. C., Fine L. D., Fritchman J. L., Fuhrmann J. L., Geoghagen N. S. M., Gnehm C. L., McDonald L. A., Small K. V., Fraser C. M., Smith H. O., Venter J. C. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269, 5223: 496–512
- Foretz M., Postic D., Baranton G. 1997. Phylogenetic analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Systematic Microbiology*, 47, 1: 11–18

Fournier P. E., Zhu Y., Ogata H., Raoult D. 2004. Use of highly variable intergenic spacer sequences for multispacер typing of *Rickettsia conorii* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 12: 5757–5766

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., Garland 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 spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, 390, 6660: 580–586

Fraser-Liggett C. M. 2005. Insights on biology and evolution from microbial genome sequencing. *Genome Research*, 15, 12: 1603–1610

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 Science of the United States of America*, 91: 12594–12598

Gatewood Hoen A., Margos G., Bent S. J., Diuk-Wasser M. A., Barbour A., Kurtenbach K., Fish D. F. 2009. Phylogeography of *Borrelia burgdorferi* in the eastern United States reflects multiple independent Lyme disease emergence events. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 35: 15013–15018

Gathany J. 2007. Erythema migrans: ID#:9875. Atlanta, Public Health Image Library, Centers for Disease Control and Prevention: 1 str.
http://phil.cdc.gov/PHIL_Images/9874/9874_lores.jpg (20.6.2015)

Glinšek Biškup U., Strle F., Ružić-Sabljić E. 2011. Loss of plasmids of *Borrelia burgdorferi* sensu lato during prolonged *in vitro* cultivation, *Plasmid*. 66, 1: 1–6

Goris J., Suzuki K., De Vos P., Nakase T., Kersters K. 1998. Evaluation of a microplate DNA - DNA hybridization method compared with the initial renaturation method. *Canadian Journal of Microbiology*, 44, 12: 1148–1153

Gruntar I., Malovrh T., Murgia R., Cinco M. 2001. Conversion of *Borrelia garinii* cystic forms to motile spirochetes *in vivo*. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 109: 383–388

- Grygorczuk S., Péter O., Kondrusik M., Moniuszko A., Zajkowska J., Dunaj J., Żukiewicz-Sobczak W., Pancewicz S. 2013. Assessment of the frequency of different *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in patients with Lyme borreliosis from north-east Poland by studying preferential serologic response and DNA isolates. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 20, 1: 21–29
- Hanincova K., Mukherjee P., Ogden N. H., Margos G., Wormser G. P., Reed K. D., Meece J. K., Vandermause M. F., Schwartz I. 2013. Multilocus sequence typing of *Borrelia burgdorferi* suggests existence of lineages with differential pathogenic properties in humans. PLoS One, 8, 9: e73066, doi: 10.1371/journal.pone.0073066: 11 str.
- Harvey S. P., Minter J. M. 2005. Ribotyping of *Burkholderia mallei* isolates. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 44, 1: 91–97
- Herschleb J., Ananiev G., Schwartz D. C. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis. Nature Protocols, 2, 3: 677–684
- Hilton E., Devoti J., Sood S. 1996. Recommendation to include OspA and OspB in the new immunoblotting criteria for serodiagnosis of Lyme disease. Journal of Clinical Microbiology, 34, 6: 1353–1354
- Hofhuis A., Harms M., Bennema S., van den Wijngaard C. C., van Pelt W. 2015. Physician reported incidence of early and late Lyme borreliosis, Parasite Vectors, 8: 161, doi:10.1186/s13071-015-0777-6: 8 str.
- Hu C. M., Gern L., Aeschlimann A. 1992. Changes in the protein profile and antigenicity of different *Borrelia burgdorferi* strains after reintroduction to *Ixodes ricinus* ticks. Parasite Immunology, 14, 4: 415–427
- Hubálek Z. 2009. Epidemiology of Lyme borreliosis. Current Problems in Dermatology, 37: 31–50
- Hunfeld K. P., Rödel R., Wichelhaus T. A. 2003. *In vitro* activity of eight oral cephalosporins against *Borrelia burgdorferi*. International Journal of Antimicrobial Agents, 21, 4: 313–318
- Jaulhac B., Heller R., Limbach F. X., Hansmann Y., Lipsker D., Monteil H., Sibilia J., Piémont Y. 2000. Direct molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in synovial samples from patients with lyme arthritis. Journal of Clinical Microbiology, 38, 5: 1895–1900

Jonasson J., Olofsson M., Monstein H. J. 2002. Classification, identification and subtyping of bacteria based on pyrosequencing and signature matching of 16S rDNA fragments, *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 110: 263–272

Kämpfer P. 2012. Systematics of prokaryotes: the state of the art. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101: 3–11

Kraiczy P., Weigand J., Wichelhaus T. A., Heisig P., Backes H., Schäfer V., Acker G., Brade V., Hunfeld K. P. 2001. *In vitro* activities of fluoroquinolones against the spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 9: 2486–2494

Kramer M. D., Wallich R., Simon M. M. 1996. The outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi*: a vaccine candidate and bioactive mediator. *Infection*, 24, 2: 190–194

Lantos P. M. 2013. Lyme disease vaccination: are we ready to try again? *Lancet Infectious Diseases*, 13, 8: 643–644

Le Fleche A., Postic D., Girardet K., Peter O., Baranton G. 1997. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *International Journal of Systematic Microbiology*, 47, 4: 921–925

Li W., Raoult D., Fournier P. E. 2009. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiology Reviews*, 33, 5: 892–916

Lindgren E., Jaenson T. G. T. 2006. Lyme borreliosis in Europe influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. Copenhagen, WHO: 35 str.

http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0006/96819/E89522.pdf (29.11.2014)

Lindstedt B. A. 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis*, 26: 2567–2582

Liveris D., Gazumyan A., Schwartz I. 1995. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 3: 589–595

Ludwig W., Euzéby J., Whitman W. 2010. Taxonomic outlines of the phyla *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes (Mollicutes)*, *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and

Planctomycetes. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 4. Krieg N. R., Ludwig W., Whitman W., Hedlund B. P., Paster B. J., Staley J. T., Ward N., Brown D., Parte A. (eds.). 2nd ed. New York, Springer: 20–24

Lünemann J. D., Zarmas S., Priem S., Franz J., Zschenderlein R., Aberer E., Klein R., Schouls L., Burmester G. R., Krause A. 2001. Rapid typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in specimens from patients with different manifestations of Lyme borreliosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 3: 1130–1133

Lupski J. R., Weinstock G. M. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of Bacteriology*, 174, 14: 4525–4529

Maiden M. C., Bygraves J. A., Feil E., Morelli G., Russell J. E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D. A., Feavers I. M., Achtman M., Spratt B. G. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 95, 6: 3140–3145

Maraspin V., Cimperman J., Lotric-Furlan S., Ruzić-Sabljić E., Jurca T., Strle F. 2002. Cerebrospinal fluid findings in adult patients with multiple erythema migrans. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 114, 13-14: 505–509

Margos G., Gatewood A. G., Aanensen D. M., Hanincová K., Terekhova D., Vollmer S. A., Cornet M., Piesman J., Donaghy M., Bormane A., Hurn M. A., Feil E. J., Fish D., Casjens S., Wormser G. P., Schwartz I., Kurtenbach K. 2008. MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 105, 25: 8730–8735

Margos G., Vollmer S. A., Cornet M., Garnier M., Fingerle V., Wilske B., Bormane A., Vitorino L., Collares-Pereira M., Drancourt M., Kurtenbach K. 2009. A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 16: 5410–5416

Margos G., Vollmer S. A., Ogden N. H., Fish D. 2011. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 7: 1545–1563

Margos G., Hojgaard A., Lane R. S., Cornet M., Fingerle V., Rudenko N., Ogden N., Aanensen D. M., Fish D., Piesman J. 2010. Multilocus sequence analysis of *Borrelia*

bissettii strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. Ticks and Tick-Borne Diseases, 1, 4: 151–158

Masuzawa T., Takada N., Kudeken M., Fukui T., Yano Y., Ishiguro F., Kawamura Y., Imai Y., Ezaki T. 2001. *Borrelia sinica* sp. nov., a lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51, 5: 1817–1824

McClelland M., Jones R. Patel Y., Nelson M. 1987. Restriction endonucleases for pulsed field mapping of bacterial genomes. Nucleic Acids Research, 15, 15: 5985–6005

Miklossy M., Kasas S., Zurn A. D., Sherman McCall S., Yu S., McGeer P. L. 2008. Persisting atypical and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and local inflammation in Lyme neuroborreliosis. Journal of Neuroinflammation, 5: 40, doi:10.1186/1742-2094-5-40: 18 str.

MLST. 2015. MLST: DATABASES: *B. Burgdorferi*: MLST-MAPS. London, Imperial College: baza podatkov
<http://borrelia.mlst.net/earth/maps/> (2. 4. 2015)

Mukhacheva T. A., Kovalev S. Y. 2013. Multilocus sequence analysis of *Borrelia burgdorferi* s.l. in Russia. Ticks and Tick-Borne Diseases, 4, 4: 275–279

Mullis K., Falona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 51, 1: 263–273.

Nadelman R. B., Luger S. W., Frank E., Wisniewski M., Collins J. J., Wormser G. P. 1992. Comparison of cefuroxime axetil and doxycycline in the treatment of early Lyme disease. Annals of Internal Medicine, 117, 4: 273–280

Noppa L., Burman N., Sadziene A., Barbour A. G., Bergström S. 1995. Expression of the flagellin gene in *Borrelia* is controlled by an alternative sigma factor. Microbiology, 141, 1: 85–93

Nowakowski J., Schwartz I., Liveris D., Wang G., Aguero-Rosenfeld M. E., Girao G., McKenna D., Nadelman R. B., Cavaliere L. F., Wormser G. P. 2001. Laboratory diagnostic techniques for patients with early Lyme disease associated with erythema migrans: a comparison of different techniques. Clinical Infectious Diseases, 33, 12: 2023–2027

- Nyrén P. 1987. Enzymatic method for continuous monitoring of DNA polymerase activity. *Analytical Biochemistry*, 167: 235–238
- Ogden N. H., Margos G., Aanensen D. M., Drebot M. A., Feil E. J., Hanincová K., Schwartz I., Tyler S., Lindsay L. R. 2011. Investigation of genotypes of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes scapularis* ticks collected during surveillance in Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 10: 3244–3254
- Olive D. M., Bean P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 6: 1661–1669
- Pal U., Yang X., Chen M., Bockenstedt L. K., Anderson J. F., Flavell R. A., Norgard M. V., Fikrig E. 2004. OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *Journal of Clinical Investigation*, 113, 2: 220–230
- Picken R. N., Strle F., Picken M. M., Ružić-Sabljić E., Maraspin V., Lotrič-Furlan S., Cimperman J. 1998. Identification of three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, and *B. afzelii*) among isolates from acrodermatitis chronica atrophicans lesions. *Journal of Investigative Dermatology*, 110: 211–214
- Pollack R. J., Telford S.R., Spielman A. 1993. Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 5: 1251–1255
- Posey J. E., Gherardini F. C. 2000. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science*, 288, 5471: 1651–1653
- Postic D., Assous M. V., Grimont P. A. D., Baranton G. 1994. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of *rrf* (5S)-*rrl* (23s) intergenic spacer amplicons. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 4: 743–752
- Preac-Mursic V., Wilske B. 1993. Biology of *Borrelia burgdorferi*. V: Aspects of Lyme borreliosis. Weber K., Burgdorfer W. (eds.). 1st ed. Berlin, Springer: 44–58
- Preac-Mursic V., Wilske B., Reinhardt S. 1991. Culture of *Borrelia burgdorferi* on six solid media. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10, 12: 1076–1079
- 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. Series A, Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology and Parasitology, 263, 1–2: 112–118

Qiu W. G., Bruno J. F., McCaig W. D., Xu Y., Livey I., Schriefer M. E., Luft B. J. 2008. Wide distribution of a high-virulence *Borrelia burgdorferi* clone in Europe and North America. Emerging Infectious Diseases, 14, 7:1097–1104

Ranka R., Bormane A., Salmina K., Baumanis V. 2004. Identification of three clinically relevant *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of 16S-23S ribosomal DNA spacer amplicons. Journal of Clinical Microbiology, 42, 4: 1444–1449

Rojko T. 2012a. Multipli erythema migrans. V: Lymska borelioza 2012. Maraspin Čarman V., Strle F. (ur.). Ljubljana, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Združenje za infektologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu: 54–58

Rojko T. 2012b. Pristopi k zdravljenju lymske borelioze. V: Lymska borelioza 2012. Maraspin Čarman V., Strle F. (ur.). Ljubljana, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Združenje za infektologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu: 193–203

Ružić-Sabljić E., Lotrič-Furlan S., Maraspin V., Cimperman J., Logar M., Jurca T., Strle F. 2006. Comparison of isolation rate of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in MKP and BSK-II medium. International Journal of Medical Microbiology, 296, Suppl. 1: 267–273

Ružić-Sabljić E., Cerar T. 2014. Restriktijski vzroci borelijskega genoma, rezanega z restriktijskim encimom *MluI*. Ljubljana, Inštitut za Mikrobiologijo in Imunologijo (osebni vir, marec 2014)

Ružić-Sabljić E., Maraspin V., Lotric-Furlan S., Jurca T., Logar M., Pikelj-Pecnik A., Strle F. 2002. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from human material in Slovenia. Wiener Klinische Wochenschrift, 114, 13–14: 544–550

Ružić-Sabljić E., Zore A., Strle F. 2008. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates by pulsed-field gel electrophoresis after *MluI* restriction of genomic DNA. Research in Microbiology, 159, 6: 441–448

- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 74, 12: 5463–5467
- Schmidt B. L. 1997. PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. Clinical Microbiology Reviews, 10, 1: 185–201
- Schwan T. G., Piesman J. 2000. Temporal changes in outer surface proteins A and C of the lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. Journal of Clinical Microbiology, 38, 1: 382–388
- Schwartz D. C., Cantor C. R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell, 37, 1: 67–75
- Selander R. K., Caugant D. A., Ochman H., Musser J. M., Gilmour M. N., Whittam T. S. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Applied and Environmental Microbiology, 51, 5: 873–884
- Sentausa E., Fournier P. E. 2013. Advantages and limitations of genomics in prokaryotic taxonomy. Clinical Microbiology and Infection, 19, 9: 790–795
- Sigal L. H. 1995. Early disseminated Lyme disease: cardiac manifestations. American Journal of Medicine, 98, 4A: 25S–28S
- Sočan M. 2011. Epidemiologija prijavljenih primerov lymske borelioze v Sloveniji. V: Lymska borelioza 2012. Maraspin Čarman V., Strle F. (ur.). Ljubljana, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Združenje za infektologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu: 25–36
- Southern E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of Molecular Biology, 98, 3: 503–517
- Spratt B. G. 1999. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. Current Opinion in Microbiology, 2, 3: 312–316
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G. M., Grimont P. A., Kämpfer P., Maiden M. C., Nesme X., Rosselló-Mora R., Swings J., Trüper H. G., Vauterin L., Ward A. C., Whitman W. B. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52, 3: 1043–1047

Stanek G., Fingerle V., Hunfeld K. P., Jaulhac B., Kaiser R., Krause A., Kristoferitsch W., O'Connell S., Ornstein K., Strle F., Gray J. 2011. Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 17, 1: 69–79

Stanek G., Strle F. 2003. Lyme borreliosis. *Lancet*, 362, 9396: 1639–1647

Stanek G., Wormser G. P., Gray J., Strle F. 2012. Lyme borreliosis. *Lancet*, 379, 9814: 461–473

Steere A. C., Bartenhagen N. H., Craft J. E., Hutchinson G. J., Newman J. H., Rahn D. W., Sigal L. H., Spieler P. N., Stenn K. S., Malawista S. E. 1983. The early clinical manifestations of Lyme disease. *Annals of Internal Medicine*, 99, 1: 76–82

Steere A. C., Batsford W. P., Weinberg M., Alexander J., Berger H. J., Wolfson S., Malawista S. E. 1980. Lyme carditis: cardiac abnormalities of Lyme disease. *Annals of Internal Medicine*, 93, 1: 8–16

Steere A. C., Coburn J., Glickstein L. 2004. The emergence of Lyme disease. *Journal of Clinical Investigation*, 113, 8: 1093–1101

Steere A. C., Schoen R. T., Taylor E. 1987. The clinical evolution of Lyme arthritis. *Annals of Internal Medicine*, 107, 5: 725–731

Steere A. C., Sikand V. K., Meurice F., Parenti D. L., Fikrig E., Schoen R. T., Nowakowski J., Schmid C. H., Laukamp S., Buscarino C., Krause D. S. 1998. Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group. *New England Journal of Medicine*, 339, 4: 209–215

Stevenson B., Barthold S. W. 1994. Expression and sequence of outer surface protein C among North American isolates of *Borrelia burgdorferi*. *FEMS Microbiology Letters*, 124, 3: 367–372

Strle F. 1995. Zdravljenje Ljumske borelioze z antibiotiki. *Medicinski razgledi*, 34: 501–509

Strle F., Pleterski-Rigler D., Stanek G., Pejovnik-Pustinek A., Ružić-Sabljić E., Cimperman J. 1992. Solitary borrelial lymphocytoma: report of 36 cases. *Infection*, 20, 4: 201–206

- Strle F., Stanek G. 2009. Clinical manifestations and diagnosis of Lyme borreliosis. *Current Problems in Dermatology*, 37: 51–110
- Strle F., Stupica D. 2012. Preprečevanje lymske borelioze. Cepivo proti lymski boreliozi. V: Lymska borelioza 2012. Maraspin Čarman V., Strle F. (ur.). Ljubljana, Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Združenje za infektologijo pri Slovenskem zdravniškem društvu: 211–218
- Stull T. L., LiPuma J. J., Edlind T. D. 1988. A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria: ribosomal RNA. *Journal of Infectious Diseases*, 157, 2: 280–286
- Tenover F. C., Arbeit R. D., Goering R. V. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 18, 6: 426–439
- Vergnaud G., Denoeud F. 2000. Minisatellites: mutability and genome architecture. *Genome Research*, 10, 7: 899–907
- Vitorino L. R., Margos G., Feil E. J., Collares-Pereira M., Zé-Zé L., Kurtenbach K. 2008. Fine-scale phylogeographic structure of *Borrelia lusitaniae* revealed by multilocus sequence typing. *PLoS One*, 3, 12: e4002, doi: 10.1371/journal.pone.0004002: 13 str.
- Vollmer S. A., Bormane A., Dinnis R. E., Seelig F., Dobson A. D., Aanensen D. M., James M. C., Donaghy M., Randolph S. E., Feil E. J., Kurtenbach K., Margos G. 2011. Host migration impacts on the phylogeography of Lyme borreliosis spirochaete species in Europe. *Environmental Microbiology*, 13, 1: 184–192
- Wang G., Liveris D., Mukherjee P., Jungnick S., Margos G., Schwartz I. 2014. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi*. *Current Protocols in Microbiology*, 34:12C.5.1–12C.5.31, doi: 10.1002/9780471729259.mc12c05s34: 31 str.
- Wang G., Schwartz I. 2010. Genus II. *Borrelia*. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 4. Krieg N. R., Ludwig W., Whitman W., Hedlund B. P., Paster B. J., Staley J. T., Ward N., Brown D., Parte A. (eds.). 2nd ed. New York, Springer: 484–498
- 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., Ojaimi C., Wu H., Saksenberg V., Iyer R., Liveris D., McClain S. A., Wormser G. P., Schwartz I. 2002. Disease severity in a murine model of Lyme borreliosis is associated with the genotype of the infecting *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strain. *Journal of Infectious Diseases*, 186, 6: 782–791
- Wang G., van Dam A. P., Spanjaard L., Dankert J. 1998. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36, 3: 768–776
- Wayne L. G., Brenner D. J., Colwell R. R., Grimont P. A. D., Kandler O., Krichevsky M. I., Moore L. H., Moore W. E. C., Murray R. G. E., Stackebrandt E., Starr M. P., Truper H. G. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37, 4: 463–464
- Welsh J., McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18, 24: 7213–7218
- Welsh J., Pretzman C., Postic D., Saint Girons I., Baranton G., McClelland M. 1992. Genomic fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction resolves *Borrelia burgdorferi* into three distinct phyletic groups. *International Journal of Systematic Microbiology*, 42, 3: 370–377
- Will G., Jauris-Heipke S., Schwab E., Busch U., Rössler D., Soutschek 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 subgroups within the *Borrelia garinii* species. *Medical Microbiology and Immunology*, 184, 2: 73–80
- Wilske B. 2002. Microbiological diagnosis in Lyme borreliosis. *International Journal of Medical Microbiology*, 291, Suppl. 33: 114–119
- Wilske B., Preac-Mursic V. 1993. Microbiological diagnosis of Lyme borreliosis. V: Aspects of Lyme Borreliosis. Weber K., Burgdorfer W. (eds.). 1st ed. Berlin, Springer: 267–299
- Wilske B., Preac-Mursic V., Göbel 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

- Wormser G. P., Dattwyler R. J., Shapiro E. D., Halperin J. J., Steere A. C., Klempner M. S., Krause P. J., Bakken J. S., Strle F., Stanek G., Bockenstedt L., Fish D., Dumler J. S., Nadelman R. B. 2006. The clinical assessment, treatment, and prevention of lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 43, 9: 1089–1134
- Wormser G. P., Brisson D., Liveris D., Hanincová K., Sandigursky S., Nowakowski J., Nadelman R. B., Ludin S., Schwartz I. 2008. *Borrelia burgdorferi* genotype predicts the capacity for hematogenous dissemination during early Lyme disease. *Journal of Infectious Diseases*, 198, 9: 1358–1364
- Wressnigg N., Pöllabauer E. M., Aichinger G., Portsmouth D., Löw-Baselli A., Fritsch S., Livey I., Crowe B. A., Schwendinger M., Brühl P., Pilz A., Dvorak T., Singer J., Firth C., Luft B., Schmitt B., Zeitlinger M., Müller M., Kollaritsch H., Paulke-Korinek M., Esen M., Kremsner P. G., Ehrlich H. J., Barrett P. N. 2013. Safety and immunogenicity of a novel multivalent OspA vaccine against Lyme borreliosis in healthy adults: a double-blind, randomised, dose-escalation phase 1/2 trial. *Lancet Infectious Diseases*, 13, 8: 680–689
- 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
- Zhang J. R., Hardham J. M., Barbour A. G., Norris S. J. 1997. Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. *Cell*, 89: 275–285
- Zhi X. Y., Zhao W., Li W. J., Zhao G. P. 2012. Prokaryotic systematics in the genomics era. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101, 1: 21–34

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila mentorici prof. dr. Evi Ružić-Sabljić za vso prijaznost, usmerjanje in strokovne nasvete, ki so mi lajšali pot do magistrskega dela.

Posebno zahvalo moram izreči tudi somentorici znan. sod. dr. Tjaši Cerar Kišek za izredno potrpežljivost, energijo in pomoč, ki mi jo je nudila tako tekom praktičnega dela, kakor tudi med pisanjem same naloge. Hvala tudi Ivi Kovačič in ostalim na IMI, ki so mi pomagali in popestrili marsikateri dan.

Zahvala gre še Juriju in moji družini za vso moralno podporo in spodbude, ki sem jih bila deležna od začetka do konca študija.

Nikakor pa nisem pozabila na Matejo in ostale kolegice, s katerimi smo se prebijale skozi mnoge lepe, pa tudi nekatere težje trenutke na naši poti k strokovni izobrazbi in ki smo jih s skupnimi močmi uspele vse prebroditi.

PRILOGE

Priloga A: Oznake izolatov z določenimi borelijskimi podtipi glede na metodo polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (*MluI*-LRFP), ter z alelnimi številkami in sekvenčnimi tipi (ST) določenimi z metodo tipizacije na osnovi multilokusnih zaporedij. EM - erythema migrans, ACA - acrodermatitis chronica atrophicans, MEM - multipli erythema migrans.

Izolat	Klinična slika	<i>MluI</i> - podtip	<i>clpA</i>	<i>clpX</i>	<i>nifS</i>	<i>pepX</i>	<i>pyrG</i>	<i>recG</i>	<i>rplB</i>	<i>uvrA</i>	ST
AM 1017/12	EM	BaMla1	109	94	23	32	21	29	99	28	582
AT 1064/12	EM	BaMla1	36	24	23	32	21	92	140	28	581
BM 1296/12	EM	BaMla1	36	24	23	49	25	32	23	29	583
BO 1202/12	EM	BaMla1	131	82	24	88	92	27	23	28	571
BR 1959/13	EM	BaMla1	39	24	24	31	22	29	23	29	479
BM 201/13	ACA vozlič	BaMla1	109	24	23	89	22	27	23	28	204
CB 1230/12	EM	BaMla1	36	24	25	31	116	27	23	156	543
CJ 1305/02	EM	BaMla1	109	94	23	34	24	29	99	28	541
COH 1004/12	MEM	BaMla1	36	24	23	49	25	32	23	29	583
ČV 1580/99	EM	BaMla1	35	24	24	30	21	27	23	41	540
ČA 1757/13	EM	BaMla1	109	24	23	31	23	30	23	30	554
ČD 2875/13	EM	BaMla1	131	82	24	88	92	27	23	28	571
DP 1907/13	EM	BaMla1	36	24	23	87	92	27	23	29	553
DM 173/97	EM	BaMla1	109	24	24	85	90	91	24	30	563
DM 1698/97	EM	BaMla1	36	24	23	29	20	28	23	29	71
DP 1764/98	EM	BaMla1	114	24	24	31	22	92	23	28	347
DA 1235/06	EM	BaMla1	39	24	24	31	22	29	23	29	479
DA 941/08	EM	BaMla1	109	24	23	31	23	30	23	30	554
DM 1174/00	EM	BaMla1	109	24	23	89	96	27	23	28	467
DM 1206/12	EM	BaMla1	109	24	23	89	96	27	23	28	467
DP 10169/05	EM	BaMla1	36	24	25	31	116	27	23	156	543
DT 1899/12	EM	BaMla1	109	24	24	85	22	91	24	29	476
DŽ 2172/06	EM	BaMla1	36	24	23	86	166	29	24	29	555
DM 1938/06	EM	BaMla1	36	24	23	89	22	30	23	28	350
EL 767/04	EM	BaMla1	39	24	24	31	22	110	23	29	569
EJ 194/94	EM	BaMla1	36	24	23	29	20	28	23	29	71
EG 11280/05	EM	BaMla1	109	94	24	34	21	29	99	28	335
EJ 1791/97	EM	BaMla1	36	24	23	29	20	28	23	29	71
ES 1416/97	EM	BaMla1	109	94	23	34	21	29	99	28	557
EJ 2197/09	EM	BaMla1	131	82	24	88	92	27	23	28	571
ET 1593/00	EM	BaMla1	109	94	23	34	21	29	99	28	557
EA 1017/03	EM	BaMla1	109	94	24	34	21	29	99	28	335
EE 1186/98	EM	BaMla1	39	24	24	31	22	29	23	29	479
FJ 168/97	EM	BaMla1	39	24	24	31	22	29	140	29	566

se nadaljuje

Nadaljevanje priloge A: Oznake izolatov z določenimi borelijskimi podtipi glede na metodo polimorfizma dolžin restriktivskih fragmentov (*MluI*-LRFP), ter z alelnimi številkami in sekvenčnimi tipi (ST) določenimi z metodo tipizacije na osnovi multilokusnih zaporedij. EM - erythema migrans, ACA - acrodermatitis chronica atrophicans, MEM - multipli erythema migrans.

Izolat	Klinična slika	<i>MluI</i> - podtip	<i>clpA</i>	<i>clpX</i>	<i>nifS</i>	<i>pepX</i>	<i>pyrG</i>	<i>recG</i>	<i>rplB</i>	<i>uvrA</i>	ST
FM 1371/06	EM	BaMla1	36	24	25	31	116	29	23	28	572
FI 2546/06	EM	BaMla1	36	24	23	29	20	30	23	29	562
FJ 891/97	EM	BaMla1	109	94	23	34	21	29	99	28	557
FA 1059/06	EM	BaMla1	39	24	22	35	96	27	23	156	552
FM 2349/00	EM	BaMla1	114	24	23	89	96	27	23	28	539
FV 1674/97	EM	BaMla1	109	94	24	34	21	29	99	28	335
FM 1592/04	EM	BaMla1	37	24	24	31	98	92	23	28	570
FV 1610/09	EM	BaMla1	39	24	24	31	22	29	23	29	479
GA 1205/99	EM	BaMla1	51	24	23	86	96	27	23	28	558
GS 977/00	EM	BaMla1	36	94	23	34	21	29	99	28	560
GV 2418/13	EM	BaMla1	51	24	23	86	96	27	23	28	558
GA 2492/00	EM	BaMla1	37	24	24	31	22	92	23	28	170
GB 1618/95	EM	BaMla1	109	24	23	85	22	91	23	29	556
GE 1487/98	EM	BaMla1	114	24	24	31	22	92	23	28	347
GT 397/95	EM	BaMla1	39	24	24	31	98	29	23	29	564
GA 1079/97	EM	BaMla1	114	24	24	31	22	169	143	28	565
GF 713/99	EM	BaMla1	109	94	23	34	21	29	99	28	557
GŠ 947/98	EM	BaMla1	114	24	23	89	96	27	23	28	539
GM 2452/00	EM	BaMla1	36	24	23	86	20	27	22	28	559
GJ 2647/11	ACA	BaMla1	38	24	25	32	24	29	24	28	295
GF 950/00	EM	BaMla1	36	24	23	89	96	27	23	28	561
GB 1492/98	EM	BaMla1	36	24	24	31	20	92	23	159	567
GM 1093/97	EM	BaMla1	39	24	24	31	22	29	23	29	479
GZ 2038/00	EM	BaMla1	36	24	24	85	20	28	23	29	568
KS 1799/10	EM	BaMla1	109	94	23	34	24	29	99	28	541
KG 2424/09	EM	BaMla1	109	94	23	34	24	29	99	28	541
KM 885/98	MEM	BaMla3	109	94	24	34	21	29	99	28	335
MV 214/00	ACA	BaMla2	36	150	24	35	117	172	23	28	587
MP 1805/13	EM	BaMla1	39	24	24	31	22	29	23	29	479
NJ 2515/13	EM	BaMla1	109	24	23	89	96	27	23	28	467
PŠ 1793/01	ACA	BaMla2	114	24	24	31	22	169	23	28	584
PA 3398/09	ACA	BaMla4	36	24	23	29	20	28	23	29	71
ŠI 2029/09	EM	BaMla1	109	94	23	34	24	29	99	28	541
TM 1781/13	EM	BaMla1	109	94	23	34	21	29	99	28	557
ŽD 2322/13	EM	BaMla1	35	23	22	32	20	52	23	28	585