

**Přírodovědecká fakulta
Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích**



**Detekce spirochét lymfské boreliózy v klinických vzorcích
metodami PCR a optimalizace podmínek kultivace borelií ze
vzorků pacientů s příznaky lymfské boreliózy**

Diplomová práce

Bc. Jiří Havran

2011

vedoucí práce: Nataliia Rudenko, PhD.
 Maryna Golovchenko, MSc.
fakultní garant: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.

Diplomová práce

Havran, J., 2011: Detekce spirochét lymfské boreliózy v klinických vzorcích metodami PCR a optimalizace podmínek kultivace borelií ze vzorků pacientů s příznaky lymfské boreliózy. [Detection of Lyme disease spirochetes in clinical samples by PCR-based methods and optimization of conditions borrelia cultivation conditions from samples of patients with LB symptoms. Mgr. Thesis, in Czech] - 34 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.,

Annotation

The samples under investigation were collected in Department of Pediatric Infectious Diseases of the University Hospital (Brno). Group of patients (100) was heterogeneous in terms of symptoms, age and sex. The samples were taken from patients with an LB diagnosis and from those with nonspecific symptoms. Molecular typing of LB spirochetes in clinical samples (104 blood/serum, 89 cerebro-spinal fluid and 1 synovial fluid) became necessary when the general immunological tests gave unclear results. The samples were analyzed using PCR-based and molecular biology techniques that include: nested- and spacer-PCR, specie-specific PCR, sequence, virtual hybridization, *in silico* RFLP analysis, similarity search. Results of conducted analysis confirmed that 51% of samples (98) were positive on *B. burgdorferi* sensu lato. Using above mentioned techniques 6 spirochete species from *B. burgdorferi* sensu lato complex were identified; two of them weren't detected in samples of human origin in Europe yet. Comparative analysis of two media for *Borrelia* cultivation from samples of human origin definitely proved the advantage of using MKP instead of traditionally used BSK-H Complete.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne: 3. 1. 2011
Jiří Havran

.....

Rád bych poděkoval svým školitelkám, Nataše Rudenko a Maryně Golovchenko, za poskytnutí zajímavého tématu, cenné rady a pomoc při zpracování této diplomové práce. Děkuji také profesorovi Liborovi Grubhofferovi za možnost pracovat v laboratoři Molekulární biologie vektorů a parazitů, MUDr. Lence Krbkové, CSc. za poskytnutí vzorků, profesorce Evě Ružic-Sabljić za poskytnutí modifikace média MKP a laboratorních postupů při kultivaci. Tereze Chrudimské a Veronice Dornákové patří mé díky za příjemnou atmosféru v laboratoři.

Svým rodičům bych chtěl poděkovat za jejich podporu a trpělivost při mém studiu.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Původce onemocnění	1
1.2. Přenašeči a hostitelé	2
1.3. Morfologie	3
1.4. Příznaky onemocnění LB	5
1.4.1. Kožní projevy	5
1.4.2. Lymská neuroborelióza	5
1.4.3. Lymská artritida.....	6
1.4.3. Lymská karditida.....	6
1.5. Diagnostika LB	6
1.5.1. Kultivace spirochét	7
1.5.2. Detekce pomocí PCR	8
2. Cíle práce	10
3. Materiály a metodiky	11
3.1. Použité chemikálie, média, kity.....	11
3.2. Izolace genomové DNA z mozkomíšního moku a krve pacientů s diagnózou lymské boreliózy.....	12
3.3. PCR.....	12
3.4. Extrahování PCR produktu.....	15
3.5. Sekvenování.....	15
3.6. Zpracování sekvencí.....	15
3.7. Kultivace borelií v BSK-H médiu.....	16
3.8. Kultivace borelií v MKP médiu.....	17
4. Výsledky	18
5. Diskuze	22
6. Závěr	27
7. Literatura	28

1. Úvod

Lymfská borelióza (též lymeská borelióza) je infekční onemocnění poprvé popsané z městečka Old Lyme ve státě Connecticut v USA doktorem Allenem Steerem v roce 1977. Je to nejčastější onemocnění přenášené klíšťaty na člověka, které je rozšířeno pouze na severní polokouli. Je odhadováno, že se ročně touto chorobou nakazí až 85500 lidí. Nejvíce případů je zaznamenáno v Evropě (65500) (1). Mezi další onemocnění přenášené klíšťaty patří také klíšťová encefalitida (TBE), tularémie, anaplasmóza a rickettsiáza.

1.1. Původce onemocnění

Lymfská borelióza je způsobována gram-negativní bakterií z komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Borrelia burgdorferi* patří do kmene *Spirochaetae*, třídy *Spirochaetes*, řádu *Spirochaetales*, rodu *Borrelia*. Řád *Spirochaetales* obsahuje několik rodů, ale pouze čtyři z nich (*Leptospira*, *Treponema*, *Brachyspira* a *Borrelia*) zahrnují druhy patogenní pro člověka. *Treponema pallidum* je původce pohlavního onemocnění syfilis, *Leptospira interrogans* způsobuje leptospirózu (též Weilova choroba) a *Brachyspira aalborgi* může být zodpovědná za akutní zánět slepého střeva.

Zástupci rodu *Borrelia* jsou charakterizováni striktně parazitickým způsobem životem a dvojhospitelským cyklem, který zahrnuje přenašeče a hostitele.

Rod *Borrelia* můžeme rozdělit do dvou skupin. První skupina zahrnuje bakterie, které vyvolávají návratnou horečku (relapsing fever). Mezi významné zástupce této skupiny patří *B. caucasica*, *B. crocidurae*, *B. duttoni*, *B. graingeri*, *B. hermsii*, *B. hispanica*, *B. latyschewii*, *B. mazzottii*, *B. parkeri*, *B. persica*, *B. recurrentis*, *B. turicatae*, *B. venezuelensis* a *B. miyamotoi*. Tyto borelie jsou přenášeny klíšťáky rodu *Ornithodoros* a lidskou vší (2).

Druhá skupina obsahuje spirochéty komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (vyvolávají lymfskou boreliózu). Tyto borelie jsou přenášeny klíšťaty rodu *Ixodes*. Dnes je známo 18 druhů borelií komplexu sensu lato, z toho 11 vyskytujících se v Eurasii (*B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. garinii*, *B. japonica*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. sinica*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. valaisiana* a *B. yangtze*), 5 vyskytujících se v USA (*B. americana*, *B. andersonii*, *B. californiensis*, *B. carolinensis* a *B. kurtenbachii*) a 2 přítomné jak v Evropě tak v Severní Americe (*B. burgdorferi* sensu stricto a *B. bissettii*) (4,5,6).

Lymfská borelióza je zoonóza. *B. burgdorferi* sensu lato cirkuluje mezi klíšťaty (vektory) a mnoha druhy obratlovců (hostitelé). V přírodě zřejmě existuje spojitost mezi jednotlivými druhy borelií a jejich hostiteli. *B. afzelii* je spojována s hlodavci, zatímco *B. garinii* a *B. valaisiana* s ptáky (3), *B. lusitaniae* s ještěry a *B. burgdorferi* sensu stricto neprokázala žádnou výraznou hostitelskou specificitu.

Vzhledem k lidské vnímavosti na *B. burgdorferi* s.l. a s přihlédnutím k výsledkům nejnovějších studií může být komplex 18 druhů borelií rozdělen do dvou skupin:

- 11 druhů, které nebyly nikdy detekovány v pacientech nebo izolovány z lidí. Tato skupina zahrnuje *B. americana*, *B. andersonii*, *B. bavariensis*, *B. californiensis*, *B. carolinensis*, *B. japonica*, *B. kurtenbahii*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. sinica* a *B. yangtze*.

- 7 druhů s patogenním potenciálem pro člověka. Tato skupina zahrnuje *B. afzelii*, *B. bissetii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii* a *B. valaisiana*. Až do nedávné doby pouze tři druhy byly považovány za původce lymfské boreliózy, tj. *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* a *B. garinii*. Nicméně v poslední době byla detekována DNA *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii* a *B. bissetii* ve vzorcích lidského původu nebo byly z pacientů se symptomy LB izolovány spirochéty samotné.

1.2. Přenašeči a hostitelé

B. burgdorferi s.l. infikuje široké spektrum obratlovců včetně malých savců, ptáků a ještěrů. Klíšťata rodu *Ixodes* přenáší borelie mezi hostiteli a jsou také jediné přírodní agens, přes které byli lidé prokazatelně nakaženi (8). Některé druhy rodu *Ixodes* jsou hostitelsky specifické, zatímco ostatní mohou parazitovat na různých druzích hostitelů. Mezi tyto hostitelsky nespecifické druhy patří *Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus*, *Ixodes scapularis* a *Ixodes pacificus*. Tyto klíšťata jsou nejvýznamnějšími přenašeči borelií a dalších patogenů na člověka po celém světě (9). Jsou začleněna do říše *Animalia*, kmene *Arthropoda*, třídy *Arachnida*, řádu *Ixodida*, čeledi *Ixodidae*, rodu *Ixodes*. Geografické rozšíření těchto čtyř lékařsky významných druhů zahrnuje Evropu (*Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus* – východní Evropa), Asii (*Ixodes persulcatus*) a Severní Ameriku (*Ixodes scapularis* – východní část, *Ixodes pacificus* – západní podřezí) (9).

Klíšťata mají tři vývojová stádia (larva, nymfa, dospělec). Každé z těchto stádií saje na hostiteli jenom jednou. Po nasátí dochází k přeměně do dalšího stádia nebo v případě

dospělé samičky k naklazení vajíček a smrti. Larva saje 2-4 dny, nymfa 4-6 dní a dospělá samička 6-10 dní (3). Během krmení na infikovaném hostiteli se mohou larvy a nymfy infikovat jedním nebo více patogeny, kteří jsou poté přeneseni na dalšího hostitele při příštím krmení (9). Může také dojít k transovariálnímu přenosu borelií na další generaci klíšťat, ale tento způsob přenosu je vzácný a nedostatečný pro udržení populace spirochét v přenašeči a hostiteli (pouze 1 až 3%) (54).

Účinná persistence borelií v endemických oblastech vyžaduje přítomnost rezervoárových hostitelů. V současné době bylo v Evropě identifikováno několik tuctů hostitelů klíšťat, kteří slouží jako rezervoároví hostitelé pro *B. burgdorferi* sensu lato. Mezi takové patří několik druhů myší, hrabošů, potkanů, rejsků, ježků, ještěrů, zpěvných, hrabavých a mořských ptáků (3).

1.3. Morfologie

Borelie jsou spirochéty a jako takové mají společné strukturální znaky s ostatními spirochétami. Buňky jsou šroubovitě tvarované a pohyblivé (tři druhy pohybu). Vnější buněčná membrána obklopuje protoplazmatický cylindrický komplex skládající se z cytoplazmy, vnitřní membrány a peptidoglykanu.

Morfologicky je *B. burgdorferi* nepravidelně stočená spirochéta o délce 10 – 40 μm a šířce 0,2 – 0,3 μm . *In vitro* se objevuje v několika formách např. nestejněsměrně stočená, zkroucená, propletená jedna přes druhou, často je nalezena v agregované formě (7). Nejcharakterističtější vlastností borelií je přítomnost periplazmatických bičíků. Bičíky, které jsou stavbou podobné ostatním bakteriálním bičíkům, se nenachází na povrchu buňky, ale v periplazmatickém prostoru mezi vnější buněčnou membránou a protoplazmatickým válcem. Tyto periplazmatické bičíky jsou vloženy na terminálním konci protoplazmatického válce (13). Je jich 7 – 14 na každém konci bakterie. Raritou je *B. sinica*, u které jsou pouze 2 - 4 bičíky, což může být důvod pro její nepohyblivost. Bičík se skládá hlavně ze dvou proteinů – menšího FlaA (38 kDa) a většího FlaB (41 kDa). Cílená inaktivace FlaB indukuje ztrátu pohyblivosti a tyčinkovité formy u těchto mutantů. Tvar borelií je formován bičíky, které jsou stočené kolem protoplazmatického válce, ale na rozdíl od jiných bakterií nemá buněčná stěna aktivní roli v určování tvaru buňky. Složení buněčného povrchu je podobné gram-negativním bakteriím s některými rozdíly. Jsou jimi absence lipopolysacharidu a hojnost lipoproteinů

ve vnější buněčné membráně. Jako hlavní lipidové složky membrán byli identifikovány dva fosfolipidy (fosfatidylcholin a fosfatidylglycerol) a dva atypické glykolipidy (14).

Další důležitou buněčnou složkou borelií jsou vnější povrchové proteiny (Osp). Byly charakterizovány jako lipoproteiny OspA, OspB, OspC, OspD, OspE, OspF (19). Změna v syntéze Osps je primární strategie, kterou se borelie vyhýbají hostitelskému imunitnímu systému a přizpůsobují se různým hostitelským prostředím. Početné studie prokázaly, že *B. burgdorferi* selektivně exprimuje specifické Osps v různých fázích jejího životního cyklu a v konkrétních orgánech. Například exprese OspA a OspB se okamžitě spustí, když spirochéty vstupují do přenašeče a přebývají v něm. Během přenosu z přenašeče do hostitele se snižuje exprese OspA a OspB a zvyšuje se exprese proteinů, jako jsou OspC, DbpA a BBK32 (18). OspC je faktorem virulence potřebné pro počáteční fázi infekce u savců. K indukci exprese OspC dochází u spirochét ještě v přenašeči, ale při kolonizaci klíštěte nebo migraci do slinných žláz nehraje OspC žádnou roli.

Spirochéty rodu *Borrelia* jsou jedinečné mezi bakteriemi v tom, že mají genom rozprostřen do lineárního chromozómu o délce 911 kb s průměrným obsahem G+C 28,6 % a celkem 21 plazmidů (9 kruhových o velikosti 9 – 32 kb a 12 lineárních o velikosti 5 - 56 kb). Chromozóm nese 853 předpokládaných otevřených čtecích rámců. Z nich biologická role byla stanovena u 59% a nové geny představují 28%. Chromozomální geny kódují proteiny nezbytné pro replikaci, transkripci, translaci, energetický metabolismus, reparaci DNA, homologní rekombinaci, reakci na tepelný šok a chemotaktické faktory kódující geny (15,16). Asi 8% genomu borelií je věnováno produkci lipoproteinů vystavených na vnějším povrchu. Plazmidy kódují 535 genů a 90% z nich nemá žádnou podobnost s geny mimo rod *Borrelia*, což naznačuje jejich specializovanou funkci, týkající se přizpůsobení spirochét různým hostitelům (17).

1.4. Příznaky onemocnění LB

Infekce *B. burgdorferi* s. l. může mít za následek kožní, neurologické, srdeční a muskuloskeletární poruchy. Základní klinické spektrum nemoci si je celosvětově podobné, ačkoli existují rozdíly v klinických projevech v Evropě a Severní Americe. Takovéto rozdíly jsou připisovány rozdílným druhům borelií, které způsobují onemocnění na obou kontinentech (7). Nemoc samotnou můžeme rozdělit do tří stádií podle doby, která uběhla od nakažení, a podle charakteristických projevů onemocnění v daných stádiích:

- Stádium I (dny až týdny po kousnutí klíštěte): migrující erytém na místě infekce.
- Stádium II (týdny až šest měsíců po kousnutí klíštěte): meningoradikuloneuritida, meningitida, obrna lícního nervu, mozková arteriitida, četné erytémy, boreliový lymfocytom, iritida, myalgie, perikarditida.
- Stádium III (déle než šest měsíců po kousnutí klíštěte): encefalitida, encefalomyelitida, mozková arteriitida, polyneuropatie, artritida, chronická atrofická akrodermatitida

1.4.1. Kožní projevy

Nejčastějším projevem lymeské boreliózy je migrující erytém (EM) na kůži, který se vyvíjí v místě přichycení klíštěte, ale může se objevit i na jiných částech těla. Běžně začíná jako červená makula nebo papula a zvětšuje se během několika dnů až týdnů. EM je obvykle oválného tvaru a měří více než 5 centimetrů v průměru (11). V tomto stádiu nemoci mohou být pacienti asymptomatictí nebo se objeví příznaky podobné chřipce, jako je bolest hlavy, svalů a horečka. Tyto příznaky jsou běžnější v USA (7). Mezi méně časté kožní projevy patří boreliový lymfocytom vyskytující se v druhém stádiu nemoci u dětí na ušním lalůčku a u dospělých v oblasti prsní bradavky, nosu a pažích (12). Chronická atrofická akrodermatitida (ACA), která na rozdíl od EM a lymfocytomu spontánně nezmizí, je kožním projevem ve třetím stádiu onemocnění. ACA je nejčastěji lokalizována na okrajových částech těla (10).

1.4.2. Lymeská neuroborelióza

Lymeská neuroborelióza je postižení centrálních a periferních nervových systémů, způsobené infekcí *B. burgdorferi* s.l.. V Evropě je nejčastěji způsobena druhem *B. garinii*, méně často *B. afzelii*, vzácně *B. burgdorferi* s.s. a zcela výjimečně dalšími druhy, jako je *B.*

valaisiana či *B. bissettii*. Neuroboreliózu dělíme na časnou a pozdní. Časná fáze se může projevit periferní obrnou lícního nervu, meningoradikuloneuritidou, meningitidou. U dospělých pacientů v Evropě začíná časná fáze neuroboreliózy postupně zvětšující se bolestí, způsobenou radikuloneuritidou, později doprovázenou ochrnutím a dalšími neurologickými příznaky. U dětí je radikuloneuritida vzácná. Zato meningitida a periferní obrna lícního nervu jsou u nich častější než u dospělých. Pozdní fáze se projevuje periferní neuritidou spojenou s ACA, encefalitidou či encefalomyelitidou.

1.4.3. Lymská artritida

Lymská artritida je zánětlivé onemocnění kloubů. Jedná se převážně o monoartikulární nebo polyartikulární formu artritidy. Obvykle zahrnuje střídavý zánět jednoho nebo více kloubů a je často předcházena střídavou migrující bolestí kloubů. Převážně jsou postihovány velké klouby, z nichž nejvíce bývá zasaženo koleno. Lymská artritida se objevuje jak u dětí, tak u dospělých a v Severní Americe je běžnější než v Evropě.

1.4.4. Lymská karditida

Lymská karditida je relativně vzácný projev boreliózy v Evropě v porovnání s výskytem v Severní Americe. Často je doprovázena dalšími příznaky, jako je EM nebo neurologické poruchy. Jejimi symptomy jsou závratě, bušení srdce nebo synkopa, způsobené poruchami vytváření intrakardiálního impulsu nebo vedení impulsu. Typický nález je atrioventrikulární blok různé závažnosti (12).

1.5. Diagnostika LB

Diagnóza lymské boreliózy je obvykle založena na přítomnosti symptomů a příznaků nemoci (EM, lymfocytom, artritida, obrna lícního nervu, atd.). Pro diagnostiku všech klinických projevů, s výjimkou EM, jsou nezbytné mikrobiologické nálezy. Byla vyvinuta řada laboratorních technik pro přímou detekci *B. burgdorferi* sensu lato. Tyto testy poskytují důkaz o přítomnosti spirochét nebo jejich složek, jako jsou DNA nebo proteiny, v přenašečích, přirozených hostitelích nebo pacientech (7). U pacientů s podezřením na lymskou boreliózu se běžně používá sérologické vyšetření. Nečastější metodou pro průkaz specifických antiboreliových protilátek je ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Tato metoda

slouží k průkazu a kvantitativnímu stanovení IgG a IgM protilátek proti *B. burgdorferi* v lidském séru. Titry IgG jsou obecně nízké během prvních týdnů nemoci. Svého maxima pak dosáhnou v průběhu tří až šesti týdnů od propuknutí nemoci (20). To je možná příčina toho, proč se protilátky proti *B. burgdorferi* nacházejí u méně než 50% pacientů s EM, zatímco u pacientů s neurologickými problémy je to 90%. Sérologie může být také negativní v rané fázi infekce, zejména pokud byla brzy zahájena léčba antibiotiky (12). Mezi další používané metody pro průkaz antiboreliových protilátek patří ELFA (enzyme-linked fluorescent assay), Western blot, imunochomatografie a dot blot (7).

1.5.1. Kultivace spirochét

Borrelia burgdorferi byla poprvé kultivována z klíštěte *Ixodes scapularis* (dříve *Ixodes dammini*) pomocí modifikovaného Kellyho média, které bylo původně vyvinuto pro růst borelií, způsobujících návratnou horečku. Toto modifikované médium bylo určeno jako Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) médium a bylo následně použito pro kultivaci borelií z pacientů s lymskou boreliózou. V současné době se pro kultivaci spirochét z různých biologických zdrojů používají různě modifikovaná média (BSK II, BSK-H, MKP). Tato média jsou schopná lépe podporovat růst a dělení spirochét, pokud jde o izolaci a pomnožení z nízkého titru inokula, kratší generační dobu spirochét a maximální koncentraci spirochét v kultuře ($\sim 10^8$ - 10^9 /ml). Prakticky všechna tato média obsahují N-acetylglukosamin, kvasinkový extrakt, aminokyseliny, vitamíny, nukleotidy a sérum. Mezi jednotlivými variantami médií BSK existují rozdíly v přítomnosti několika dalších složek (21,7).

Kultury v tekutém médiu jsou běžně inkubovány při 30-34°C za mikroaerofilních podmínek. Generační doba spirochét je dlouhá. Pohybuje se mezi 7-20 hodinami nebo i více během log fáze růstu. Detekce růstu se provádí periodickým pozorováním vzorků kultury pomocí mikroskopie v temném poli nebo fluorescenční mikroskopie.

B. burgdorferi *sensu lato* může být kultivovaná z různých tkání a tělních tekutin pacientů (kůže, mozkomíšní mok, kloubní tekutina, sérum, plazma atd.). Přestože borelie dobře rostou za laboratorních podmínek, je obtížné je izolovat a pomnožit z klinických vzorků (22). Nejvhodnějším klinickým materiálem pro kultivaci borelií se jeví biopsie kůže z místa, kde se objevila EM nebo ACA. Úspěšnost se v těchto případech pohybuje okolo 40% a více (v případech neléčených pacientů). Biopsie kůže je ale invazní technika, která se používá vzácně

v běžné diagnostice. Kultivace borelií z tělních tekutin je pomalá a neefektivní, protože je při ní potřeba co největší množství vzorku (např. 10 ml krve či 2 ml mozkomíšního moku). Odebrání takového objemu je např. u dětských pacientů problematické (7).

1.5.2. Detekce pomocí PCR

PCR diagnostika infekčních onemocnění byla zaměřena především k detekci patogenů, pro které konvenční diagnostické metody jsou buď málo citlivé, nebo pomalé. Mezi takové onemocnění patří právě lymská borelióza, protože na rozdíl od ostatních bakteriálních a virových chorob je počet patogenů v klinických vzorcích velmi nízký. Přestože v infikovaných klíšťatech může být až 4500 spirochét, jejich četnost v moči nebo krevní plazmě je obecně menší než 50 borelií na ml a vzácně překoná 5000 na ml. V mozkomíšním moku může být jejich počet dokonce ještě nižší (23).

Byly vyvinuty různé molekulární a biochemické metody pro detekci a identifikaci borelií v klinických vzorcích. Mezi tyto metody patří konvenční PCR, nested PCR, RFLP (restriction fragment length polymorphism), real time PCR, MLSA (multilocus sequence analysis), RLB (reverse-line blotting) a další. Metody založené na PCR jsou používány pro potvrzení diagnózy u pacientů s podezřením na lymskou boreliózu, identifikaci a typizaci druhů spirochét z klinických vzorků či kultivovaných izolátů a zjištění ko-infekcí druhů v rámci *B. burgdorferi* s.l. (24). Vzhledem k vysoké heterogenitě *B. burgdorferi* je hlavním hlediskem, které se uplatňuje při výběru cíle pro amplifikaci, genetická stabilita. Ztráta nebo změna cílové sekvence může vést ke ztrátě reaktivity. Pro diagnostiku lymské boreliózy pomocí PCR musí být pozornost věnována také testování specifčnosti. Zatímco geneticky příbuzné patogeny (např. *Borrelia hermsii*) by neměly při testu reagovat, všechny DNA podtypy *B. burgdorferi* s.l. (patogenní či nepatogenní pro člověka) by měly být detekovány až na teoretické hranici jednoho organismu (23). Genomické lokusy borelie, které jsou v současnosti používány v laboratořích jako templáty pro PCR analýzu k detekci *B. burgdorferi* s.l., zahrnují OspA, OspC, flagelin, p66, 16S rRNA, hbb, 5S-23S 'intergenic spacer', 16S-23S 'internal transcribed region', recA a řada dalších lokalizovaných jak na chromozomu, tak i na plasmidech (www.ncbi.nlm.nih.gov). I přes velký počet cílových lokusů pro detekci spirochét lymské boreliózy v klinických vzorcích, úspěch PCR je opravdu závislý na výběru správného cíle pro specifický klinický vzorek (tkáň nebo tělní tekutiny) a

stádium nemoci. Například citlivost amplifikace genu p66 u vzorků pocházejících od pacientů s ACA je dvakrát vyšší v porovnání s 23S rRNA genové amplifikace (25). Cílení genu OspA ze vzorků biopsie pacientů s ACA je citlivější než cílení 5S-23S 'intergenic spacer region' (26).

Sekvenční analýza DNA některých vysoce konzervovaných genů (16S rRNA, OspA, flagelin) je užitečná pro studium evoluční historie a druhové identifikace v rámci *B. burgdorferi* s.l. Gen flagelin kóduje endoflagelární protein (flaB), který je typický pro spirochéty. Jeho rozmanitost je cenná pro rozlišování druhů borelií. Lokalizace genu flagelin na megabázi lineárního chromozómu je konzervativní v rámci rodu *Borrelia*. Podle fylogenetické analýzy, založené na genové sekvenci flagelinu, můžou být borelie, způsobující návratnou horečku, odděleny od těch, které jsou zodpovědné za lymfskou boreliózu. Různé druhy *B. burgdorferi* s.l. mohou také být rozlišovány od sebe navzájem (27). Druhově specifické primery (GI, GII a GIII) založené na genové sekvenci OspA jsou používány pro zjišťování infekce patogenních druhů *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garini* a *B. afzelii* (29).

Citlivost PCR z klinických vzorků může být snížena degradací DNA *B. burgdorferi* s.l. během transportu, skladování nebo zpracování (7). Může být také ovlivněna ztrátami během izolace DNA přítomností cizí DNA nebo kontaminací interferujících či inhibičních látek (zvláště hostitelských) (23).

2. Cíle práce

- Literární studie k problematice detekce spirochét borelií v lidských vzorcích a její kultivaci.
- Ověření metod PCR, nested PCR, genotypizace pomocí PCR (PCR se specifickými primery), RFLP, Reverse Line Blotting a sekvenování.
- Interpretace výsledků a zkušenosti se zvolenými metodami s konečným cílem optimalizace rychlé a spolehlivé PCR metody k detekci borelií v lidských vzorcích, identifikace druhů borelií a analýza asociace specifických klinických projevů lymfské boreliózy u člověka s různými druhy borelií.
- Vypracování optimálních podmínek kultivace spirochét z různých vzorků, zejména z krve, mozkomíšního moku, kloubních tekutin a kůže s použitím různých kultivačních médií.

3. Materiál a metodika

Klinický materiál byl odebrán od 100 dětských pacientů (43 dívek a 57 chlapců, věk 3-19 let) na Klinice dětských infekčních nemocí Masarykovy univerzity a zahrnoval krev, mozkomíšni mok a kloubní punktát.

3.1. Použité chemikálie, média a kity

Název roztoku	Složení
50x TAE pufr	200 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA
1x TAE pufr	50x TAE pufr 50x zředěný v dd H ₂ O
Agaróza	1% agaróza (Serva) pro DNA ELFO v 1x TAE pufru
marker - GeneRuler™ 100 bp (Fermentas)	100 - 3000 bp
5x Loading dye (DNA)	20% Ficoll, 10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mg/ml Orange G, 500x SYBR Green
dd H ₂ O	Destilovaná deionizovaná voda

Média pro kultivaci bakterií

Název roztoku	Složení
BSK-H complete medium (Sigma)	BSK-H COMPLETE MEDIUM with Sodium Bicarbonate Product No. B 8291
MKP medium	modifikované médium poskytnuté profesorkou Ružić-Sabljić (Univerzita Ljublaň, Slovinsko)
Antibiotika pro Borrelia 100x (Sigma)	2 mg phosphomycin (fosfomycin), 5 mg rifampicin a 250 µg amphotericin B na ml v 20% DMSO

Použité soupravy (Kity)

Použitá metoda	Název
Izolace genomové DNA	Dneasy [®] Tissue Kit (Qiagen)
Sekvenace DNA	Využití služeb servisní laboratoře genomiky PřF JU a BC AV ČR
Čištění PCR produktu z gelu	DNA Gel Extraction Kit (MILLIPORE)

3.2. Izolace genomové DNA z mozkomíšního moku a krve pacientů s diagnózou lymské boreliózy

Izolace genomové DNA byla provedena pomocí kitu DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen) pro gram-negativní bakterie podle návodu výrobce, co nejdříve po příchodu vzorků do laboratoře:

1. Vzorky mozkomíšního moku byly centrifugovány při 12 000x g/ 15 min.
2. Supernatant byl odstraněn tak, aby zbylo 50 µl na dně mikrozkušavky.
3. K tomuto objemu bylo přidáno 200 µl pufru PBS.
4. Následovalo přidání 180 µl pufru ATL a 20 µl proteinázy K.
5. Směs byla krátce vortexována a inkubována při 56 °C, dokud nebyly buňky zlyzovány.

Během inkubace byly vzorky 2x – 3x vortexovány.

6. Bylo přidáno 200 µl pufru AL, vortexováno, přidáno 200 µl ethanolu (96%) a znovu vortexováno.
7. Celý objem byl přepipetován do kolony (DNeasy Mini Spin Column) a centrifugován při 8000x g/ 1 min.
8. Kolona byla promyta a) 500 µl pufru AW1, b) 500 µl pufru AW2.
9. DNA byla eluována 100 µl dd H₂O a uschována v ledničce při 4 °C.

Vzorky krve (750 µl) byly centrifugovány při 100x g/ 15 min. Vrchní část obsahující sérum byla přepipetována do nové 1,5 ml zkumavky. 20 µl proteinázy K a 200 µl pufru AL bylo přidáno a následně byla celá směs vortexována a inkubována při 56 °C, dokud nebyly buňky zlyzovány. Další postup byl stejný jako při zpracování vzorků z mozkomíšního moku popsany v předchozím odstavci.

3.3. PCR

Izolovaná totální genomová DNA ze vzorků pacientů byla testována na přítomnost DNA spirochét pomocí specifických primerů pro *B. burgdorferi* sensu lato a to: FlaB (gen pro flagelin), OspC (gen pro vnější membránový protein C), 5S-23S 'intergenic region' (rrf-rrl - intergenic spacer region) a p66. Pozitivní vzorky byly následně kontrolovány pomocí druhově

specifických primerů odvozených z konzervativních sekvencí lokalizovaných na genu kódujícím OspA: GI (*B. burgdorferi* sensu stricto), GII (*B. garinii*) a GIII (*B. afzelii*) pro zjištění druhové specifčnosti. Amplifikační reakce probíhala v 0.2 ml tenkostěnné zkumavce v přístroji Mastercycler (Eppendorf). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA různých druhů borelií. Negativní kontrola obsahovala místo DNA stejný objem dd H₂O.

Příprava reakční směsi:

5x kompl. pufr	4 µl
25 mM MgCl ₂	2 µl
10 mM DNTPs	1 µl
Tag polymerasa (5 jednotek/µl)	0,5 µl
1mM Primer-forward	1 µl
1mM Primer-reverse	1 µl
DNA	1-2 µl
dd H ₂ O	do 20 µl

Použité specifické primery:

***Borrelia burgdorferi* sensu lato**

FlaB (forward): 5'-AARGAATTGGCAGTTCAATC-3'

FlaB (reverse): 5'-GCATTTTCWATTTTGTAGCAAGTGATG-3'

Velikost PCR produktu: 497 bp (28)

OspC (forward): 5'-AAAGAATACATTAAGTGCGATATT-3'

OspC (reverse): 5'-GGGCTTGTAAGCTCTTAACTG-3'

Velikost PCR produktu: 600 bp (34)

5S (rrf): 5'-CTGCGAGTTCGCGGGAGA-3'

23S (rrl): 5'-TCCTAGGCATTCACCATA-3'

Velikost PCR produktu: 247-257 bp (41)

p66 (forward): 5'-CGAAGATACTAAATCTGT

p66 (reverse): 5'-GCTGCTTTTGAGATGTGTCC

Velikost PCR produktu: 315 bp (28)

Borrelia burgdorferi sensu stricto

GI (forward): 5'-AACAAAGACGGCAAGTACGATCTAATT-3'

GI (reverse): 5'-TTACAGTAATTGTTAAAGTTGAAGTGCC-3'

Velikost PCR produktu: 544 bp (29)

Borrelia garinii

GII (forward): 5'-TGATAAAAACAACGGTTCTGGAAC-3'

GII (reverse): 5'-GTAAC TTTCAATGTTGTTTTGCCG-3'

Velikost PCR produktu: 345 bp (29)

Borrelia afzelii

GIII (forward): 5'-TAAAGACAAAACATCAACAGATGAAATG-3'

GIII (reverse): 5'-TTCCAATGTTACTTTATCATTAGCTACTT-3'

Velikost PCR produktu: 190 bp (29)

PCR byla prováděna na cycleru (Eppendorf) v tomto programu.

		teplota	čas
Denaturace DNA		95 °C	5 min
Denaturace DNA	40 cyklů	95 °C	30 sek
Nasedání primerů		52 - 56 °C	30 sek
Polymerace		72 °C	1 min
		72 °C	20 min

Teplota nasedání primerů se lišila podle jednotlivých primerů :

p66	50 °C
FlaB	52 °C
OspC	52 °C
5S23S	54 °C
GI	54 °C
GII	56 °C
GIII	54 °C

Výsledky reakce byly ověřeny na 1% agarózovém gelu v 1x TAE pufri, kdy k 20 µl PCR reakce byly přidány 4 µl vzorkového pufri (5x). Jako marker byl použit 100 bp GeneRuler (MBI Fermentas). Pozitivní PCR produkty ve správné velikosti byly vyříznuty z gelu a buď hned zpracovány nebo zmrazeny na -20 °C pro pozdější použití.

3.4. Extrahování PCR produktu

PCR produkt byl extrahován z gelu pomocí kitu DNA Gel Extraction Kit (MILLIPORE) bez použití jakýchkoliv chemikálií. Vyříznutý gel obsahující PCR produkt byl vložen do gelového rozprašovače, ve kterém se gel při centrifugaci (5000x g/10 min) promění ve jemnou suspenzi, která je zachycována na filtru. DNA projde přes mikropórovou membránu a je zachycována v mikrozkuhavce. Takto extrahovaná DNA byla použita pro sekvenaci nebo ligaci.

3.5. Sekvenování

Na sekvenační reakci bylo použito 7 µl purifikovaného PCR produktu a 0,5 µl příslušného specifického primeru (forward nebo reverse). Vzorky byly sekvenované v laboratoři genomiky (BC AV ČR).

3.6. Zpracování sekvencí

Sekvence jednotlivých genů byly kontrolovány v programu Chromas. Následně byly obě části (forward a reverse) spojeny v programu SeqMan (DNASTAR) a uloženy v EditSeq

(DNASTAR). Takto upravené nukleotidové sekvence byly analyzovány pomocí programu BLAST pro vyhledání homologie z databáze genových sekvencí (GenBank®).

Polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP) představuje rozdíly ve velikosti DNA fragmentů určitého genomového lokusu odlišných druhů borelií po štěpení stejnými restričními endonukleázami. Restriční endonukleázy nebo restriktázy jsou proteiny, které štípou DNA na krátké specifické konzervativní sekvence, zvané restriční místa. Poté, co fragment amplifikované DNA byl rozštěpen na části restriktázou, můžeme srovnávat fragmenty pomocí gelové elektroforézy, která rozdělí DNA fragmenty podle jejich velikosti. Pokud ovšem již máme sekvenci DNA, můžeme využít jeden z mnoha volně přístupných programů, které nám virtuálně rozštěpí danou sekvenci pomocí zvolených enzymů.

‘Restriction mapper’ (RM) je internetový program, který zjišťuje restriční endonukleázové štípání v sekvenci DNA. Podporuje lineární a kruhovou DNA a poskytuje několik způsobů, jak třídit a filtrovat produkt. Také poskytuje virtuální obsah funkcí, které simulují paralelní přehled sekvence s enzymy dle výběru. RM je Perl skript, který zpřístupňuje MySQL databázi restričních enzymů, která obsahuje asi 3000 známých restriktáz.

Předchozí výzkum Jaulhac a kol. (42) nabídl sadu oligonukleotidových sond, která je schopná rozlišit sedm různých druhů borelií na základě analýzy genu pro flagelin spirochét komplexu *B. burgdorferi* s.l.. I když výsledky zmíněného studia představují optimalizované podmínky pro provedení klasické reverse-line blot hybridizace na nylonové membráně, význam určených oligonukleotidových sond ve virtuální hybridizaci nelze přehlédnout. Námi byla provedena analýza všech amplifikovaných fragmentů genu flagelin z klinických vzorků s použitím určených oligonukleotidových sond v SeqMan nebo MegAlign modulech programu DNASTAR (virtuální hybridizace).

3.7. Kultivace borelií v médiu BSK-H

Spirochéty *B. burgdorferi* sensu lato byly kultivovány *in vitro* v kompletním médiu BSK-H (52). Kultivace probíhala v 5 ml nebo 15 ml zkumavkách, kdy k médiu bylo přidáno 250 µl mozkomíšního moku nebo 1 ml krve. Antibiotika, která jsou letální pro většinu bakterií kromě *Spirochetales*, byla použita především u první pasáže. Pokud v další pasážích neexistovalo podezření na kontaminaci, antibiotika již nebyla přidávána. Borelie byly

inkubovány při 33 °C za mikroaerofilních podmínek. Další pasáže se prováděly po 7 – 10 dnech u pozitivních vzorků. Poté byly překultivovány (1 ml) do nového média (3 – 5 ml). Kontrola přítomnosti spirochét byla prováděna mikroskopií v temném poli. Když nebyly borelie zjištěny při mikroskopii, byla kultura ponechána v původním stavu 7 – 8 týdnů a poté vyhodnocena jako negativní. Veškerá práce s boreliemi probíhala za sterilních podmínek.

3.8. Kultivace borelií v médiu MKP

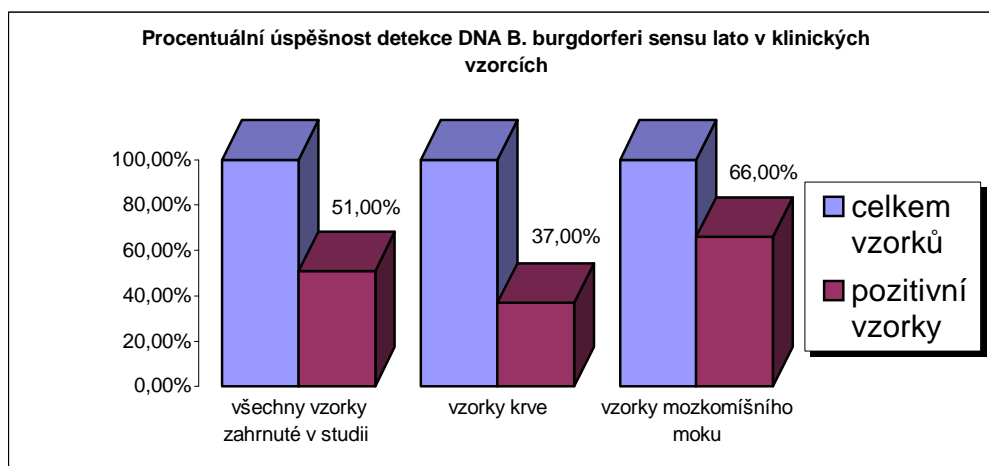
Kultivace spirochét v médiu MKP (modifikované Kelly-Pettenkofer) (53) (obsahující 7% želatinu, králičí sérum a 35% BSA) probíhalo ve skleněných zkumavkách při 33 °C za mikroaerofilních podmínek. Vzorky krve byly nejprve stočeny při 100x g/ 15 min, aby se oddělila plasma od krevních buněk. Plasma byla poté inokulována do připraveného média. Vzorky mozkomíšního moku byly inokulovány bez jakýchkoli úprav. Kultury byly kontrolovány po deseti dnech mikroskopií v temném poli. V případě, kdy byl pozorován bakteriální růst, byly kultury pasážovány ($\frac{1}{4}$ staré kultury do $\frac{3}{4}$ čerstvého média). Pokud ani po devíti týdnech nebyla pozorována či prokázána (pomocí PCR) přítomnost spirochét, byla kultura vyhodnocena jako negativní.

4. Výsledky

Z Kliniky dětských infekčních nemocí Masarykovy univerzity (společné pracoviště s Fakultní nemocnicí Brno) bylo zasláno celkem 194 vzorků odebraných od 100 dětských pacientů s příznaky lymfské boreliózy, u kterých nebylo možno s jistotou určit jejich pozitivitu pomocí klasických vyšetřovacích metod (ELISA a Western blot), běžně používaných ve zdravotnických zařízeních. Z celkového počtu bylo 104 vzorků krve, 89 vzorků mozkomíšního moku a 1 vzorek kloubního punktátu. Izolovaná genomová DNA byla testována na přítomnost boreliové DNA pomocí PCR primerů specifických pro *Borrelia burgdorferi* sensu lato komplex (5S-23S IGS). Druhá identita borelií v pozitivních vzorcích byla prokázána po sekvenování a analýze různých genomových lokusů spirochéty, amplifikovaných pomocí dalších PCR primerů, klasicky používaných pro tyto účely (FlaB, OspC, 5S-23S IGS, p66, GI, GII a GIII). Analýza sekvencí genomových úseků borelií byla provedena s použitím modulů EditSeq, SeqMan a MegAline programu DNASTAR. Vyhledávání homologie v dostupných databázích bylo provedeno s použitím programu blastn, blastp a blastx, které jsou součástí 'Basic Local Alignment Search Tools National Center of Biotechnology Information' (NCBI, NIH, Bethesda, MD, USA). RFLP patern vybraných genomových úseků (5S-23S IGS a flagelin gen) byl určen *in silico* s použitím programu 'Restriction Mapper 3' (<http://restrictionmapper.org/>). Virtuální hybridizace vybraných sekvencí (5S-23S IGS a flagelin gen) z DNA sondy, dříve popsané pro odlišné druhy borelií, byla provedena s použitím SeqMan a MegAlign modulu programu DNASTAR.

Ze všech testovaných vzorků bylo 98 (51 %) pozitivních na přítomnost DNA *Borrelia burgdorferi* sensu lato. DNA borelií byla detekována u 58 (66%) vzorků z mozkomíšního moku, 39 (37%) vzorků krve (viz. graf 1) a jednoho (100%) vzorku kloubního punktátu.

Výsledky testování vzorků na přítomnost DNA *Borrelia burgdorferi* sensu lato jsou představeny v následujícím grafu.



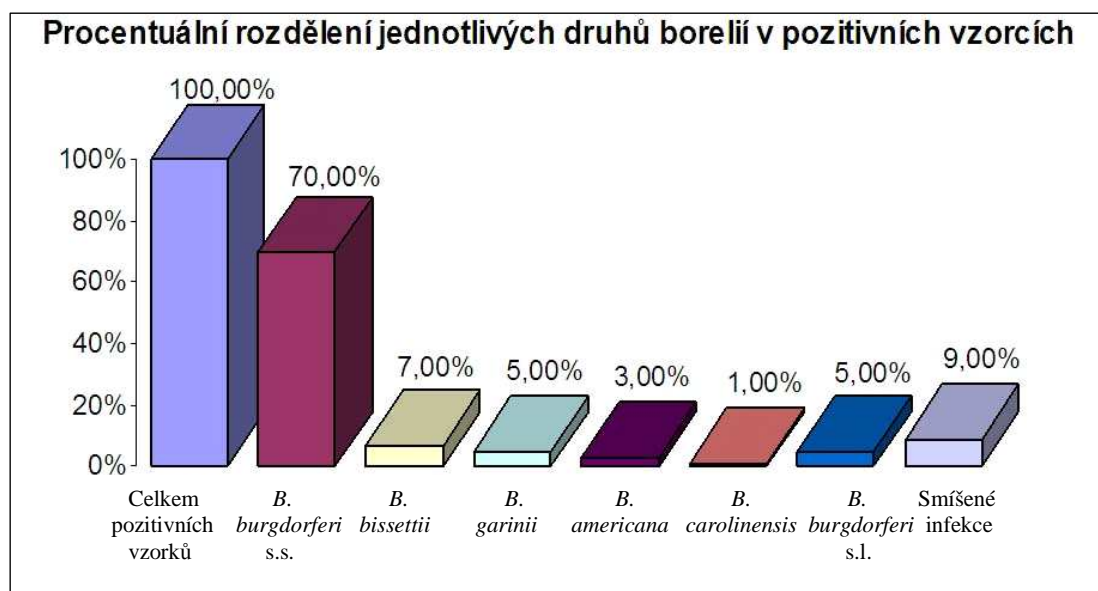
Skupina pacientů (100) se skládala z 43 dívek a 57 chlapců ve věku od 3 do 19 let. Z celkového počtu pacientů, kterým byly odebrány vzorky pro molekulární analýzu, byla prokázána přítomnost DNA borelií u 64 z nich, ať už byla potvrzena pozitivita ze vzorku krve, mozkomíšního moku nebo obou. Z tohoto počtu byla DNA borelií detekována u 8 (12%) pacientů jen ze vzorků krve, u 25 (39%) pacientů jen ze vzorků mozkomíšního moku a u 30 (47%) pacientů z obou dvou vzorků. Zbývající jeden pacient byl pozitivní na přítomnost DNA borelií ze vzorku kloubního punktátu.

Ve většině případů jsme obdrželi od každého pacienta jeden vzorek krve a jeden vzorek mozkomíšního moku. U osmi pacientů (3x dívka, 5x chlapec) byly vzorky zasílány opakovaně (2x mozkomíšní mok a 2x krev), od dvou pacientů (dívka a chlapec) jsme dostali po 3 vzorcích (2x krev a 1x mozkomíšní mok nebo naopak) a od dvaceti čtyř pacientů jsme dostali jen jeden vzorek (5x mozkomíšní mok a 19x krev). Mezi klinické příznaky, které se projevovaly u pacientů, patřila EM (erythema migrans), neuroborelióza, lymská artritida, artralgie, obrna lícního nervu a lymfocytární meningitida.

Následná analýza druhové příslušnosti spirochét v pozitivních vzorcích pomocí dříve zmíněných programů prokázala následující:

Celkem bylo identifikováno šest druhů borelií, z nichž největší zastoupení patří *B. burgdorferi* sensu stricto (70%). *B. bissetii* byla zaznamenána v 7%, *B. garinii* v 5%, *B. americana* ve 3% a *B. carolinensis* v 1% vzorků. U 5% pozitivních vzorků nebyla prokázána druhová příslušnost. Smíšené infekce byly přítomny v 9 % vzorků odebraných u třech dívek a šesti chlapců (viz. graf 2). U druhu *B. burgdorferi* sensu stricto byla detekována přítomnost dvou kmenů - amerického (US) a evropského (EU), přičemž ve většině případů (72%) se jednalo o podobnost sekvencí identifikovaných u pacientů se sekvencemi *B. burgdorferi* sensu stricto evropského kmenu. Přítomnost sekvencí podobných s *B. burgdorferi* sensu stricto amerického kmene byla prokázána u pěti dívek a devíti chlapců.

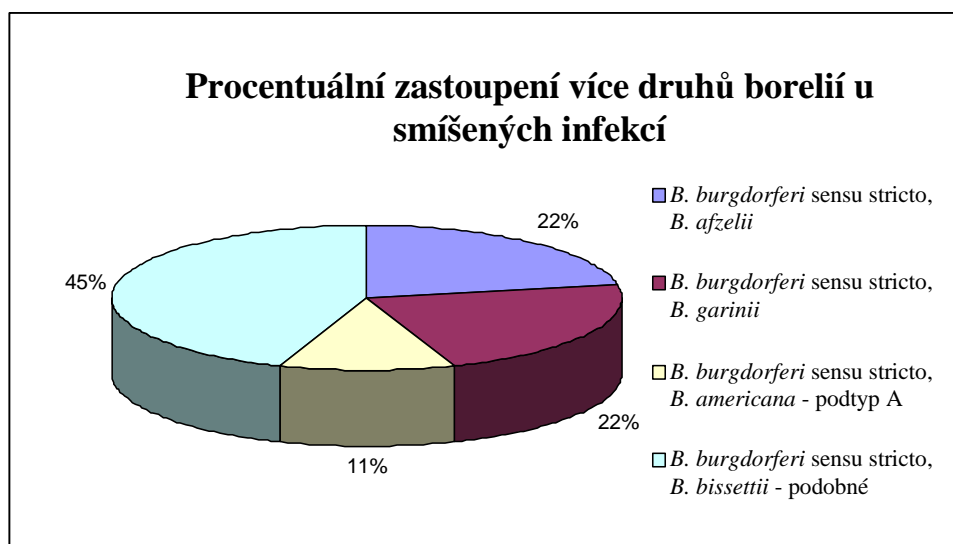
Graf 2



*V grafu nejsou zaneseny jednotlivé druhy přítomné u smíšených vzorků.

Mezi 9% ko-infekcí byly identifikovány celkem čtyři typy smíšených vzorků. Skoro v polovině případů byla prokázána přítomnost *B. burgdorferi* sensu stricto a *B. bissetii* (45%). Ve dvou případech byla zaznamenána ko-infekce *B. burgdorferi* sensu stricto a *B. afzelii* (22%) a v dalších dvou přítomnost DNA *B. burgdorferi* sensu stricto a *B. garinii* (22%). V jednom případě (11%) byla zaznamenána smíšená infekce *B. burgdorferi* sensu stricto s *B. americana*. Ve všech případech ko-infekcí vykazovala *B. burgdorferi* sensu stricto podobnost ke kmeni EU. Evropské kmeny *B. burgdorferi* sensu stricto, se kterými byla

prokázána homologie s našimi vzorky na úrovni proteinu (flagelin), pocházely z Ruska (BAB19648), Srbska a Černé Hory (BAD38985), Turecka (BAC16533), Polska (AND52363, ACK75974, AAY41413, AAY41413) a České republiky (ACI49678, ACI49677).



Padesát dva vzorků (alespoň 250 μ l mozkomíšního moku nebo 1 ml krve) bylo použito ke kultivaci spirochét v médiu BSK-H. I po opakovaných pokusech (kontrola se prováděla mikroskopií v temném poli každý týden) nebyla prokázána přítomnost živých spirochét v kulturách, přestože byla detekována DNA borelií pomocí PCR.

Šest vzorků bylo použito ke kultivaci spirochét v médiu MKP (modifikované Kelly-Pettenkofer). Při kontrole po 2 týdnech ve 2 vzorcích, pocházejících z mozkomíšního moku, byla zaznamenána přítomnost malého množství živých spirochét. Kultury byly ponechány pro další růst.

5. Diskuse

Detekce spirochét lymské boreliózy z tělních tekutin (krev, mozkomíšní mok, kloubní punktát) metodami PCR je ovlivněna různými faktory, jako je nízký počet bakterií v tělní tekutině (50 borelií na ml), přechodná spirochetémie, ztráty během izolace DNA nebo kontaminace inhibičními faktory. Citlivost PCR reakce u jednotlivých tělních tekutin se liší, což bylo prokázáno i v této studii, kdy byla DNA *B. burgdorferi* sensu lato detekována u 66% vzorků mozkomíšního moku, 37% vzorků krve a v jediném dodaném vzorku kloubního punktátu (100%). Průměrná úspěšnost prokázání borelie v kloubním punktátu je 83% u amerických studií a 66% u evropských (7). V případě krevních vzorků a mozkomíšního moku byla námi prokázána vyšší citlivost PCR, než jaká je uváděna ve studii Agüero-Rosenfeldové a kolegů, kdy se průměrná senzitivita pohybuje okolo 38% u mozkomíšního moku a 14% u krve (plasma, sérum) (7). Vysvětlení může být v tom, že i přes velký počet cílových genů pro detekci spirochét lymské boreliózy v klinických vzorcích, úspěch PCR je opravdu závislý na výběru správného cíle pro specifický klinický vzorek (biopsie, tkáň nebo tělní tekutiny) a stádium nemoci. Například citlivost PCR genu p66 u vzorků, pocházejících od pacientů s ACA, je dvakrát vyšší v porovnání s 23S rRNA genové amplifikace (25). Použití kombinace několika sad PCR primerů pro amplifikaci různých genomových lokusů borelie z jednoho vzorku vždy zvětšuje možnost prokázání přítomnosti spirochétové DNA v něm. Když vzorky 36 pacientů byly analyzované pomocí PCR s výše zmíněnými primery jednotlivě, pozitivita odpovídala 79% a 73%, podle pořadí. Použitím obou sad primerů se zvýšil počet pozitivních vzorků na 88% (25). Studium jiné skupiny také potvrdilo důležitost správného výběru cíle pro PCR. Cílení genu *OspA* ze vzorků biopsie pacientů s ACA je citlivější než cílení 5S-23S IGS (*rrf-rrl*) intergenic spacer region (26). Citlivost PCR při použití různých klinických vzorků se liší také. Biopsie byla jednoznačně prokázána jako nejlepší klinický vzorek jak pro PCR, tak i pro kultivaci borelií (25).

Analýza druhové příslušnosti spirochét v našem případě ukázala, že nejčastějším druhem borelie v pozitivních vzorcích je *B. burgdorferi* sensu stricto (70%). Tyto vzorky jsou 100% identické na úrovni proteinů, ne však na úrovni nukleotidů. Genetická vnitrodruhová diverzita borelií byla prokázána dříve jak v přírodních, tak i v klinických vzorcích (40). V sekvencích, amplifikovaných z celkové DNA pacientů v naší studii, byly všechny nukleotidové záměny "tiché", kdy záměna nukleotidu nezmění kódování proteinu. *Borrelia*

burgdorferi sensu stricto je velice divergentní druh, což potvrzuje studie Schutzer a kol. (30), kteří osekvenovali celé genomy (WGS) třinácti izolátů *B. burgdorferi*. Výsledky potvrdily identifikaci nejméně devíti nových typů plazmidů, které nejsou přítomny u kmene B31 (první osekvenovaný genom před více než desetiletím). Hodně plazmidů podstoupilo značnou změnu uspořádání u různých kmenů. Navzdory původním předpokladům, že genetické změny nastanou pouze pomalejšími bodovými mutacemi, počáteční WGS srovnání čtyř kmenů ukázalo častější a rychleji podstupující horizontální záměny genetické informace. Genetická diverzita je charakteristická nejenom pro *B. burgdorferi* sensu stricto, ale i pro další druhy borelií jako jsou *B. bissetii*, *B. afzelii* nebo *B. garinii*. *B. garinii* je v poslední době považována za nejvíce divergovaný druh spirochét komplexu *B. burgdorferi* sensu lato a to díky tomu její vazbě na ptačí hostitele (41).

Geografické rozšíření *B. burgdorferi* sensu stricto zahrnuje jak Severní Ameriku, tak Evropu. *B. burgdorferi* sensu stricto byla také izolována na Taiwanu (31). V Evropě je oblast jejího rozšíření především v západních zemích, ale rozsah výskytu sahá až k hranicím mezi Evropou a Asií, což je dáno geografickým rozšířením klíštěte *Ixodes ricinus*, hlavního vektora tohoto druhu borelie v Evropě (32, 33). Ačkoli některé evropské izoláty *B. burgdorferi* sensu stricto jsou velmi blízké těm ze Severní Ameriky, polymorfismus tohoto druhu je mnohem větší v Severní Americe a pouze několik alel je endemických v Evropě. Tyto vlastnosti naznačují, že *B. burgdorferi* sensu stricto byla v nedávné době importována ze Severní Ameriky do Evropy (33). Tímto může být vysvětlena přítomnost jak evropských, tak amerických kmenů *B. burgdorferi* sensu stricto ve zkoumaných vzorcích. Opačné výsledky jsou však uváděny ve studii Margos a kol. (51), kde pomocí MLST (multilocus sequence typing) odhalili, že severoamerické a evropské populace *B. burgdorferi* sensu stricto odpovídají geneticky rozdílným populacím. Tato studie také naznačuje, že *B. burgdorferi* sensu stricto je spíše původní v Evropě než v Severní Americe.

V jednom vzorku pacienta z naší skupiny byla detekována DNA borelie, která byla 100% identická americkému druhu *B. carolinensis*. Tento výsledek by se mohl zdát nedůvěryhodný, kdyby nebyl potvrzen opakovanou amplifikací a sekvenováním 5S-23S IGS, p66 a genu kódujícího flagelin, a také nedávnou publikací skupiny francouzských vědců, kteří při analýze 572 klíšťat *I. ricinus* nasbíraných v lesích západní Francie objevili v jednom z nich přítomnost DNA 100% identické 5S-23S IGS *B. carolinensis*. Toto je první a zatím

jediný případ detekce DNA *B. carolinensis* v *Ixodes ricinus* v Evropě. (35). Do naší studie tento druh nebyl izolován nebo detekován u lidí. Přítomnost DNA 100% identické *B. carolinensis* byla prokázána v mozkomíšním moku pacientky.

U čtyřech vzorků ze tří pacientů byla zaznamenána DNA *B. americana* (podtyp A), jenž byla nedávno izolována a popsána v USA (4). Tento druh nebyl nikdy izolován ani detekován v Evropě nebo dokonce u lidí. Ale bylo prokázáno, že *B. americana* je vázána na ptačí hostitele, což tím pádem výrazně zvyšuje možnost jejího rozšíření ve Spojených státech amerických a také přenos do Evropy, který byl prokázán a potvrzen u *B. burgdorferi* sensu stricto. Nedávná studie Margos a kol. (43) prokázala, že *B. americana* je přítomna stejně jako *B. burgdorferi* sensu stricto a *B. bissettii* jak na východě, jihovýchodě a jihu USA tak i na dalekém západě kontinentu. Vyhledávání sekvencí podobných nebo identických *B. americana*, amplifikované ze vzorku českých pacientů, prokázalo přítomnost v databázích (GenBank) větší skupiny vysoce podobných sekvencí, které byly detekovány ve vzorcích amerických pacientů s příznaky lymfské boreliózy ze 13 států USA. Tato nepublikovaná data (36) založená na genových sekvencích genu pro flagelin, izolovaných v USA z lidských vzorků, naznačují, že by *B. americana* mohla být dalším druhem, který je teoreticky schopný vyvolat lymfskou boreliózu jak ve Spojených státech amerických, tak i v Evropě.

Celkem v jedenácti vzorcích z deseti pacientů byla detekována DNA *B. bissettii*. V dřívější studiích (37, 38, 39) byla potvrzena přítomnost DNA této borelie v klinických vzorcích lidí z několika evropských států, které pocházely z lymfocytomu, srdeční chlopně a séra, i když se *B. bissettii* do nedávné doby nepovažovala za patogenní druh pro člověka.

Výsledky předchozích studií, prováděných v naší laboratoři, ukázaly zajímavou distribuci různých druhů borelií ve vzorcích séra, které byly odebrány v několika jihočeských nemocnicích. Největší prevalence byla zjištěna pro *B. afzelii* (43%), následována případy se smíšenou infekcí (24%), *B. garinii* (15%), *B. burgdorferi* sensu stricto (11%). Sedm procent vzorků prokázalo přítomnost spirochét odlišných od *B. afzelii*, *B. garinii* a *B. burgdorferi* ss (24). Téměř totožné výsledky byly zveřejněny v roce 2008 italskou skupinou vědců. Jejich analýza (založená na PCR) vzorků sér pacientů s příznaky lymfské boreliózy ukázala, že z PCR pozitivních vzorků bylo 50% pozitivních na *B. afzelii*, 18% na *B. garinii* a 23% představovalo smíšené infekce. Devět procent vzorků nebylo druhově identifikováno (44). Tyto údaje podporují skutečnost, že evropští pacienti byli infikováni druhem *B. burgdorferi* s.l., které jsou

odlišné od tradičně uznávaných druhů způsobujících lymfskou boreliózu. Česká republika je oblastí, kde je lymfská borelióza endemická. Nedávné klinické průzkumy ukázaly, že u 65% pacientů se objevila kožní léze (způsobována *B. afzelii*), 12% trpělo neuroboreliózou (*B. garinii*) a 9% mělo potíže s kosterním svalstvem (*B. burgdorferi* s.s.) (55). Tato pozorování jsou v souladu se zprávami z okolních států (Slovenska a Německa) (45, 46) a s výsledky k výskytu různých druhů borelií v klíšťatech *I. ricinus* v Evropě (59,2%, 21,1% a 10,5% podle výše uvedeného pořadí druhů borelií) (47). Nicméně vždy existuje skupina pacientů, u nichž se klinické příznaky nebo sérologická odpověď značně liší. Početná byla skupina klíšťat, u kterých nebylo možné druhově identifikovat borelie(48). Přesná laboratorní diagnostika lymfské boreliózy naráží na problémy spojené s mezidruhovými a zejména vnitrodruhovými rozdíly původců lymfské boreliózy.

Výsledky prevalence borelií v lidských vzorcích, které jsou uváděny v této práci, se významně liší od předchozích publikací. Hlavní výskyt geneticky různorodého druhu *B. burgdorferi* sensu stricto v analyzované skupině není překvapující. Analyzované vzorky byly odebrány z pacientů v jihovýchodní části České republiky, ležící na křižovatce starých obchodních cest, které spojovaly severní a jižní civilizace v Evropě po celá staletí. Pacienti infikovaní *B. garinii* a *B. afzelii* byli diagnostikováni klasickými metodami (ELISA a Western-blot). Bohužel neznáme přibližný poměr mezi celkovým počtem vzorků, vzorků určených jako pozitivní klinickými technikami a těch, které jsme obdrželi pro laboratorní analýzu. Soubor analyzovaných vzorků představuje pouze ty vzorky, které v důsledku jistých omezení klinických diagnostických technik byly definovány jako „negativní“ nebo „nejasné“. Tato skupina nepředstavuje skutečnou prevalenci druhů borelií v České republice ani v moravské části. Ale znovu prokazuje, že PCR a další molekulární techniky jsou účinné diagnostické nástroje, které nemohou být přehlíženy nebo podceňovány.

Kultivační techniky jsou široce rozšířenou metodou izolace spirochét z klinických vzorků, která umožňuje spolehlivý průkaz původce onemocnění. Postup je ale pomalý, pracově náročný, nákladný a má nízkou citlivost. Úspěšnost kultivace závisí na různých faktorech, jako jsou pH, teplota, kontaminace, typ tkáně nebo tělní tekutiny a v neposlední řadě i použitá kultivační média.

Kultivace *B. burgdorferi* sensu lato zahrnuje inkubování vzorků v médiu BSK nebo jeho modifikacích (BSK-H, MKP, BSK II) a detekování přítomnosti charakteristických

spirochét mikroskopii v temném poli či fluorescenční mikroskopii. V našem případě probíhala kultivace borelií v kompletním médiu BSK-H a MKP, kdy v médiu MKP bylo kultivováno jen posledních šest dodaných vzorků. Srovnání úspěšnosti izolace *B. burgdorferi* sensu lato ve dvou různých médiích (BSK-H a MKP) ve studii Ružić-Sabljić a kol. (49) odhalilo výhody média MKP nad BSK-H. V každém z těchto dvou médií bylo kultivováno 232 kožních vzorků, kdy vzorek kožní biopsie byl rozříznutý na dvě části. Každá část byla inokulována do jednoho média. Kultivace probíhala při 33 °C po dobu devíti týdnů. Růst borelií byl zjištěn u 22,8% vzorků média BSK-H a 43,5% média MKP. Vyšší míra kontaminace byla zjištěna u média BSK-H (29,3%) oproti 10% média MKP. Z tohoto srovnání vyplývá, že pro budoucí kultivaci spirochét lymfské boreliózy je výhodnější používat médium MKP. Rozdíl mezi kultivací v médiu BSK-H a MKP spočívá např. v tom, že médium MKP obsahuje želatinu a kultivace probíhá ve skleněných zkumavkách.

Dalším z faktorů, které jsou důležité pro kultivaci spirochét, je teplota, jak bylo prokázáno ve studii Vejnović a kol. (50). Zde porovnávali růst *B. burgdorferi* sensu stricto v médiu MKP při pěti různých teplotách (33 °C, 37 °C, 28 °C, 4 °C a pokojová teplota). Kultury *B. burgdorferi* sensu stricto rostly při všech teplotách kromě 4 °C. Nejlepší růst byl zaznamenán při 33 °C, horší při 37 °C, 28 °C a pokojové teplotě. Spirochéty se také lišily morfologicky, např. při 33 °C byly pohyblivé, malé a spirálovité, zatímco při pokojové teplotě byly dlouhé a velmi pomalé při pohybu. Toto zjištění může být důležité pro optimalizaci podmínek pro transport vzorků do vyšetřující laboratoře.

6. Závěr

Z celkového počtu 194 vzorků odebraných ze 100 pacientů, u kterých nebylo možno s jistotou určit jejich pozitivitu pomocí klasických vyšetřovacích metod (ELISA a Western blot) jich bylo vyhodnoceno 51% jako pozitivní na přítomnost DNA *B. burgdorferi* sensu lato s použitím metod PCR. Při následné analýze druhové příslušnosti byla detekována DNA šesti známých druhů borelií (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. bissettii*, *B. americana*, *B. carolinensis*). Největší zastoupení bylo zaznamenáno u *B. burgdorferi* sensu stricto, která byla přítomna v 70% vzorků. Analýza také ukázala přítomnost dvou odlišných variant *B. burgdorferi* sensu stricto (Severní Amerika/Evropa). V 9% pozitivních vzorků byla detekována smíšená infekce dvěma druhy borelií. V této studii je popsán průkaz DNA spirochéty *B. carolinensis* ve vzorku z člověka a současně druhý případ výskytu tohoto druhu v Evropě. Druh *B. americana* byl nalezen v Evropě vůbec poprvé a je to nejspíše teprve druhý nález v klinickém materiálu z člověka. Kultivace spirochét lymfské boreliózy ze vzorků krve a mozkomíšního moku byla v médiu BSK-H vyhodnocena jako neúspěšná, zatímco kultivace v médiu MKP byla u dvou klinických vzorků úspěšná, ačkoli počet spirochét byl po dvou týdnech kultivace malý.

V této studii bylo potvrzeno, že použití metod PCR jako spolehlivých, specifických a rychlých technik detekce DNA *B. burgdorferi* sensu lato buď samostatně nebo ve spojení s klasickými vyšetřovacími metodami (ELISA a Western blot) by mělo výrazně zlepšit diagnostiku lymfské boreliózy a podstatně snížit sporné a nejednoznačné výsledky.

7. Literatura

1. **Hubálek Z (2009):** Epidemiology of Lyme borreliosis. *Curr Probl Dermatol* 37: 31-50
2. **Fensfeld O (1965):** *Borreliae*, human relapsing fever and parasite-vector-host relationships. *Bacteriol Rev* 29: 46-74
3. **Gern L (2009):** Life cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and transmission to humans. *Curr Probl Dermatol* 37: 18-30
4. **Rudenko N, Golovchenko M, Lin T, Gao L, Grubhoffer L, Oliver JH (2009):** Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, *Borrelia americana* sp. nov. *J Clin Microbiol.* 47: 3875-3880
5. **Margos G, Vollmer SA, Cornet M, Garnier M, Fingerle V, Bormane A, Vitorino L, Collares-Pereira M, Drancourt M, Kurtenbach K (2009):** A new Borrelial species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Appl Environ Microbiol.* 76:5410-5416
6. **Chu ChY, Liu W, Jiang BG, Wang DM, Jiang WJ, Zhao QM, Zhang PH, Wang ZX, Tang GP, Yang H, Cao WC (2008):** Novel genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks in southwestern China. *J Clin Microbiol* 46: 3130-3133
7. **Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP (2005):** Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev* 18: 484-509
8. **Tilly K, Rosa PA, Stewart PE (2008):** Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infect Dis Clin North Am* 22: 217-234
9. **Swanson SJ, Neitzel D, Reed KD, Belongia EA (2006):** Coinfections acquired from *Ixodes* tick. *Clin Microbiol Rev* 19: 708-727

- 10 **Strle F, Stanek G (2009)**: Clinical manifestation and diagnosis of Lyme borreliosis. *Curr Probl Dermatol* 37: 51-110
- 11 **(2009)**: Lyme disease in Canada: Q & A for paediatricians. *Paediatr child health* 14: 103-108
- 12 **Nau R, Christen HJ, Eiffert H (2009)**: Lyme disease - current state of knowledge. *Dtsch Arztebl Int.* 106: 72-82
- 13 **Barbour AG, Hayes SF (1986)**: Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev* 50: 381-400
- 14 **Krupka M, Raska M, Belakova J, Horynova M, Novotny R, Weigl E (2007)**: Biological aspects of lyme disease spirochetes: unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 151: 175-186
- 15 **Casjens S, Palmer N, van Vugt R, Huang WM, Stevenson B, Rosa P, Lathigra R, Sutton G, Peterson J, Dodson RJ, Haft D, Hickey E, Gwinn M, White O, Fraser CM (2000)**: A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol* 35: 490-516
- 16 **Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R (1997)**: Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390: 580-586
- 17 **de Silva AM, Tyson KR, Pal U (2009)**: Molecular characterization of the tick-*Borrelia* interface. *Front Biosci* 14: 3051-3063
- 18 **Neelakanta G, Li X, Pal U, Liu X, Beck DS, DePonte K, Fish D, Kantor FS, Fikrig E (2007)**: Outer surface protein B is critical for *Borrelia burgdorferi* adherence and survival within *Ixodes* ticks. *PLoS Pathog* 3: e33

- 19 **Lam TT, Nguyen TPKN, Montgomery RR, Kantor FS, Fikrig E, Flavell RA (1994):** Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. Infect Immun 62: 290-298
- 20 **Vojdani A, Hebroni F, Raphael Y, Erde J, Raxlen B (2007):** Novel diagnosis of Lyme disease: potential for CAM intervention. Evid Based Complement Alternat Med 6: 283-295
- 21 **Wang G, Iyer R, Bittker S, Cooper D, Small J, Wormser GP, Schwartz I (2004):** Variations in Barbour-Stoenner-Kelly culture medium modulate infectivity and pathogenicity of *Borrelia burgdorferi* clinical isolates. Infect Immun 72: 6702-6706
- 22 <http://ibmi.mf.uni-lj.si/acta-apa/acta-apa-01-4/ruzic-sablji.html>
- 23 **Schmidt BL (1997):** PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infection. Clin Microbiol Rev 10: 185-201
- 24 **Rudenko N, Golovchenko M, Nemeč J, Volkaert J, Mallatova N, Grubhoffer L (2005):** Improved method of detection and molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in clinical samples by polymerase chain reaction without DNA purification. Folia Microbiol (Praha) 50: 31-39
- 25 **Brettschneider S, Bruckauer H, Klugbauer N, Hofmann H (1998):** Diagnostic value of PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy and urine samples from patients with skin borreliosis. J Clin Microbiol. 36: 2658-2665
- 26 **Rijpkema SG, Tazelaar DJ, Molkenboer MJ, Noordhoek GT, Plantinga G, Schouls LM, Schellekens JF (1997):** Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with

- erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clin Microbiol Infect* 3: 109-116
- 27 **Fukunaga M, Okada K, Nakao M, Konishi T, Sato Y (1996):** Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequence and its application for molecular typing of lyme disease *Borreliae*. *Int J Syst Bacteriol* 46: 898-905
- 28 **Clark K, Hendricks A, Burge D (2005):** Molecular identification and analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lizards in southeastern United States. *Appl Environ Microbiol* 71: 2616-2625
- 29 **Demaerschack I, Messaoud AB, de Kesel M, Hoyois B, Lobet Y, Hoet P, Bigaignon G, Bollen A, Godfroid E (1995):** Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of lyme disease patients. *J Clin Microbiol* 33: 602-608
- 30 **Schutzer SE, Fraser-Liggett CM, Casjens SR, Qui WG, Dunn JJ, Mongodin EF, Luft BJ (2010):** Whole genome sequences of thirteen isolates of *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol*
- 31 **Shih CM, Chao LL (2002):** An OspA-based genospecies identification of Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) isolated in Taiwan. *Am J Trop Med Hyg* 66: 611-615
- 32 **Wang G, van Dam AP, Schwartz I, Dankert J (1999):** Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 12: 633-653
- 33 **Baranton G, de Martino SJ (2009):** *Borrelia burgdorferi* sensu lato diversity and its influence on pathogenicity in humans. *Curr Probl Dermatol* 37: 1-17

- 34 **Bunikis J, Tsao J, Garpmo U, Berglund J, Fish D, Barbour AG (2004):** Typing of *Borrelia relapsing fever* group strains. *Emerg Infect Dis* 10: 1661-1664
- 35 **Cotté V, Bonnet S, Cote M, Vayssier-Taussat M (2010):** Prevalence of five pathogenic agents in questing *Ixodes ricinus* ticks from western France. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10: 723-730
- 36 **Clark K, Threlkeld C, Leydet B, Phillips P, Watsky A:** Lyme *Borrelia* infecting humans in the United States – nepublikovaná data
- 37 **Strle F, Picken RN, Cheng Y, Cimperman J, Maraspin V (1997):** Clinical findings for patients with Lyme borreliosis caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities to strain 25015. *Clin Infect Dis* 25: 273-280
- 38 **Rudenko N, Golovchenko M, Mokráček A, Piskunová N, Ruzek D, Mallatová N, Grubhoffer L. (2008):** Detection of *Borrelia bissettii* in cardiac valve tissue of a patient with endocarditis and aortic valve stenosis in the Czech Republic. *J Clin Microbiol.* 46: 3540-3543
- 39 **Rudenko N, Golovchenko M, Ruzek D, Piskunova N, Mallátová N, Grubhoffer L (2009):** Molecular detection of *Borrelia bissettii* DNA in serum samples from patients in the Czech Republic with suspected borreliosis. *FEMS Microbiol Lett* 292: 274-281
- 40 **Anderson JM, Norris DE (2006):** Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in *Peromyscus leucopus*, the primary reservoir of Lyme disease in a region of endemicity in southern Maryland. *Appl Environ Microbiol* 72: 5331-5341
- 41 **Poctic D, Assous MV, Grimont PA, Baranton G (1994):** Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. *Int J Syst Bacteriol* 44: 743-752

- 42 **Jaulhac B, Heller R, Limbach FX, Hansmann Y, Lipsker D, Monteil H, Sibia J, Piémont Y (2000):** Direct molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in synovial samples from patients with lyme arthritis. J Clin Microbiol. 38: 1895-1900
- 43 **Margos G, Hojgaard A, Lane RS, Cornet M, Fingerle V, Rudenko N, Ogden N, Aanensen DM, Fish D, Piesman J (2010):** Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissettii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. Ticks Tick Borne Dis 1: 151-158
- 44 **Santino I, Berlutti F, Pantanella F, Sessa R, del Piano M (2008):** Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA by PCR in serum of patients with clinical symptoms of Lyme borreliosis. FEMS Microbiol Lett 283: 30-35
- 45 **Gern L, Hu CM, Kocianova E, Vyrostekova V, Rehacek J (1999):** Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. Eur J Epidemiol 15: 665-669
- 46 **Kurtenbach K, De Michelis S, Sewell HS, Etti S, Schäfer SM, Hails R, Collares-Pereira M, Santos-Reis M, Hanincová K, Labuda M, Bormane A, Donaghy M (2001):** Distinct combinations of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies found in individual questing ticks from Europe. Appl Environ Microbiol 67: 4926-4929
- 47 **Derdáková M, Beati L, Pet'ko B, Stanko M, Fish D (2003):** Genetic variability within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies established by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the rrfA-rrlB intergenic spacer in *Ixodes ricinus* tick from the Czech Republic. Appl Environ Microbiol 69: 509-516
- 48 **Strle F, Picken RN, Cheng Y, Cimperman J, Maraspin V, Lotric-Furlan S, Ruzic-Sabljić E, Picken MM (1997):** Clinical findings for patients with Lyme borreliosis caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities to strain 25015. Clin Infect Dis 25: 273-280

- 49 **Ružić-Sabljić E, Marespin V, Cimperman J, Strle F, Lotrič-Furlan S, Stupica D, Cerar T (2010):** Comparison of isolation rate of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in two different culture media. 12th International Conference on Lyme borreliosis and other tick-borne diseases, September 26-29, Ljubljana, Slovenia, Abstracts P28: 51-52
- 50 **Veinović G, Cerar T, Strle F, Ružić-Sabljić E (2010):** Comparison of growth *Borrelia burgdorferi* sensu stricto at different temperature. 12th International Conference on Lyme borreliosis and other tick-borne diseases, September 26-29, Ljubljana, Slovenia, Abstracts P30: 53
- 51 **Margos G, Gatewood AG, Aanensen DM, Hanincová K, Terekhova D, Vollmer SA, Cornet M, Piesman J, Donaghy M, Bormane A, Hurn MA, Feil EJ, Fish D, Casjens S, Wormser GP, Schwartz I, Kurtenbach K (2008):** MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggest a European origin of *Borrelia burgdorferi*. Proc Natl Acad Sci USA 105: 8730-8735
- 52 **Pollack RJ, Telford SR 3rd, Spielman A (1993):** Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. J Clin Microbiol 31: 1251-1255
- 53 **Preac-Mursic V, Wilske B, Schierz G (1986):** European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks culture conditions and antibiotic susceptibility. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A 263: 112-118
- 54 **Schoeler GB, Lane RS (1993):** Efficiency of transovarial transmission of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in western blacklegged tick, *Ixodes pacificus* (*Acari: Ixodidae*). J Med Entomol 30: 80-86
- 55 **D. Janovská, B. Macková, M. Vondrová, D. Hulínská (2001):** Tick-Borne Infect. Dis. Other Zoonoses, Abstracts P19