

UNIVERZITET U BEOGRADU  
FARMACEUTSKI FAKULTET



Gorana P. Veinović

**Uticaj uslova kultivisanja na rast,  
razmnožavanje, preživljavanje i  
morfološke odlike vrsta *Borrelia afzelii*,  
*Borrelia garinii* i *Borrelia burgdorferi*  
sensu stricto**

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF PHARMACY



Gorana P. Veinović

**Influence of cultivation conditions on  
growth, reproduction, survival and  
morphology of *Borrelia afzelii*, *Borrelia  
garinii* and *Borrelia burgdorferi sensu  
stricto***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

Doktorska disertacija je urađena na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju Univerziteta u Ljubljani-Medicinskog fakulteta.

**MENTORI:**

---

Prof. dr Jelena Stanković, Univerzitet u Beogradu-  
Farmaceutski fakultet

---

Prof. dr Eva Ružić-Sabljić, Univerzitet u Ljubljani-  
Medicinski fakultet

**ČLANOVI KOMISIJE:**

---

Prof. dr Marina Milenković, Univerzitet u Beogradu-  
Farmaceutski fakultet

---

Prof. dr Biljana Božić, Univerzitet u Beogradu-  
Biološki fakultet

---

Prof. dr Radovan Čekanac, Univerzitet odbrane-  
Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije

Datum odbrane \_\_\_\_\_

*Najsrdčajnije se zahvaljujem svojim profesorčama i mentorčama prof. dr Jeleni Stanković i prof. dr Evi Ružić-Sabljić na ukazanom poverenju, strpljenju, iscrpnim sugestijama i diskusijama tokom eksperimentalnog rada i pisanja teze, kao i na znanju koje su mi nesebično prenele i na svojoj podršci i pomoći u mom naučnom usavršavanju.*

*Zahvaljujem se osoblju Laboratorije za lajmsku boreliozu i leptospirozu Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Univerziteta u Ljubljani-Medicinskog fakulteta na kolegijalnosti i pomoći u eksperimentalnom radu.*

*Veliku zahvalnost dugujem prijateljici i kolegici dr Tjaši Cerar-Kišek na ogromnoj pomoći, korisnim idejama i savetima, i svemu što me naučila.*

*Posebnu, bezgraničnu zahvalnost dugujem mojoj porodici i prijateljima za nesebičnu ljubav, neprocenjivo razumevanje, podršku i strpljenje koje mi pružaju sve ovo vreme.*

Uticaj uslova kultivisanja na rast, razmnožavanje, preživljavanje i morfološke odlike vrsta  
*Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* i *Borrelia burgdorferi* sensu stricto

### Sažetak

Lajmska boreliozna je multisistemska bolest koju karakteriše širok spektar kliničkih manifestacija. U Evropi je primarno prouzrokovana vrstom *B. afzelii* a ređe vrstama *B. garinii* i *B. burgdorferi* sensu stricto. Borelije mogu biti izolovane iz različitog kliničkog materijala kao što su koža, krv i cerebrospinalna tečnost (CST).

Modifikovana Kelly-Pettenkofer-ova (MKP) podloga je jedna od najčešće korišćenih hranljivih podloga za izolaciju i kultivaciju borelija. Prvi cilj ove doktorske disertacije je bio proceniti da li pojedinačne vrste borelija (*B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi* sensu stricto) imaju sposobnost da rastu u MKP podlogama koje su prethodno bile čuvane u frižideru na +4 °C u vremenskom periodu od manje od jednog meseca do 12 meseci, i kako dugotrajno čuvanje podloga može uticati na rast i morfologiju borelija. Rast borelija je procenjen posle 5 dana inkubacije na 33 °C; procenjen je broj borelija/mL, morfologija i pokretljivost. Rezultati su pokazali, da je starost MKP podloga imala statistički značajan uticaj na rast *B. afzelii* ( $P=0,021$ ) i *B. garinii* ( $P=0,004$ ) ali ne i na rast *B. burgdorferi* sensu stricto ( $P=0,204$ ), dok starost podloga nije imala uticaj na morfologiju borelija i njihovu pokretljivost. U ovom radu je pokazano, da hranljive podloge starije od jednog meseca pa sve do 12 meseci, mogu podržati rast borelija.

Optimalna temperatura za rast borelija u *in vitro* uslovima, predstavljena je u širokom rasponu od 30 do 37 °C. Borelije obično rastu na temperaturi 30-34 °C, a ponekad i na 35-37 °C. Drugi cilj ove doktorske disertacije je bio proceniti i uporediti rast trideset jednog različitog soja vrsta *B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi* sensu stricto na pet različitih temperatura (4, 23, 28, 33 i 37 °C) kako bi se procenio uticaj temperature na rast i preživljavanje borelija i definisala optimalna temperatura za njihovu kultivaciju. Rast je definisan kao konačni broj borelija/mL posle 3 dana inkubacije. Sve tri vrste borelija najbolje su rasle na 33 °C, sledele su temperature 37, 28 i 23 °C, dok na 4 °C rast nije detektovan. Na svim temperaturama, rast vrste *B. afzelii* bio je slabiji u poređenju sa druge dve vrste borelija. Nije postojala statistički značajna razlika između rasta *B. garinii* i *B.*

*burgdorferi* sensu stricto na 23 °C ( $P=0,807$ ), 28 °C ( $P=0,123$ ), 33 °C ( $P=0,868$ ) i 37 °C ( $P=0,490$ ).

Prilikom *in vitro* ispitivanja osetljivosti borelija na antimikrobne agense, pojedini sojevi mogu biti manje osetljivi usled njihove stvarne male intrističke osetljivosti ili usled metodoloških faktora. Bujon mikrodilucijska i makrodilucijska metoda antibiograma korišćene su kako bi se odredile minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) i minimalne baktericidne koncentracije (MBK) šest antimikrobnih agenasa (ceftriakson, cefuroksim natrijum, azitromicin, amoksicilin, doksiciklin i amikacin) za devet evropskih humanih izolata *B. burgdorferi* sensu stricto. Za definisanje MIK, period inkubacije iznosio je 72 sata a za definisanje MBK bilo je potrebno 3 i 6 nedelja. Korišćene su MKP podloge sa konačnim inokulumom od  $10^5$  borelija/mL. Na osnovu vrednosti MIK utvrđeno je, da su svi izolati bili osetljivi na sve testirane antibiotike osim na amikacin. Najmanje vrednosti MIK nađene su za cefuroksim natrijum ( $MIK_{90} = 0,063$  mg/L), azitromicin ( $MIK_{90} = 0,22$  mg/L) i ceftriakson ( $MIK_{90} = 0,25$  mg/L), zatim za amoksicilin ( $MIK_{90} = 1$  mg/L) i doksiciklin ( $MIK_{90} = 2$  mg/L); ni jedan soj nije bio osetljiv na amikacin ( $MIK_{90} = 256$  mg/L). Vrednosti MBK posle 3 i 6 nedelja inkubacije određene su za amoksicilin ( $MBK_{90} = 32$  mg/L), doksiciklin ( $MBK_{90} = 32$  mg/L) i amikacin ( $MBK_{90} = 1024$  mg/L) a vrednosti veće od očekivanih (ali nedefinisane) nađene su za azitromicin ( $MBK_{90} > 0,88$  mg/L), cefuroksim natrijum ( $MBK_{90} > 4$  mg/L) i ceftriakson ( $MBK_{90} > 4$  mg/L). Ova treća studija doktorske disertacije je prvi izveštaj o ispitivanju *in vitro* osetljivosti serije evropskih humanih izolata *B. burgdorferi* sensu stricto na antimikrobne agense.

**Ključne reči:** *Borrelia burgdorferi* sensu lato, kultivacija, rast, MKP podloga, temperatura, antimikrobni agensi

**Naučna oblast:** Farmacija

**Uža naučna oblast:** Farmaceutska mikrobiologija

**UDK broj:** 579.24:579.84:57.083.1 (043.3)

Influence of cultivation conditions on growth, reproduction, survival and morphology of  
*Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto

**Abstract**

Lyme borreliosis is a multisystem disorder characterized by a wide spectrum of clinical manifestations. In Europe, it is predominantly caused by *B. afzelii* and less frequently by *B. garinii* and *B. burgdorferi* sensu stricto. *Borrelia* can be isolated from different clinical material, such as skin, blood and cerebrospinal fluid (CSF).

Modified Kelly-Pettenkofer (MKP) medium is one of several media used for isolation and cultivation of *Borrelia*. The first aim of this doctoral dissertation was to assess whether particular *Borrelia* species (*B. afzelii*, *B. garinii* and *B. burgdorferi* sensu stricto) have the ability to grow in MKP medium stored at +4 °C for periods for one month up to one year, and how prolonged storage may influence borrelia growth and morphology. The growth of *Borrelia* was evaluated after 5 days of incubation at 33 °C: cell count per mL, morphology and motility were assessed. The results of the present study showed that the duration of storage of MKP medium had statistically significant influence on growth of *B. afzelii* ( $P=0.021$ ) and *B. garinii* ( $P=0.004$ ) but not on growth of *B. burgdorferi* sensu stricto ( $P=0.204$ ), while duration of storage of the medium had no impact on *Borrelia* morphology and motility. The results of the study indicate that medium stored for more than one and up to 12 months support borrelia growth.

The optimum temperature for growth of *Borrelia in vitro* was presented widely as 30-37 °C. Borreliae are usually grown at 30-34 °C but sometimes at 35 or 37 °C. A second aim of this doctoral dissertation was to evaluate and compare growth of thirty-one different *Borrelia* strains (*B. afzelii*, *B. garinii*, and *B. burgdorferi* sensu stricto) at five different temperatures (4, 23, 28, 33, and 37 °C) in order to find the influence of temperature on borrelia growth and survival and to define the optimal temperature for cultivation of *Borrelia*. For all three *Borrelia* species, the best growth (growth was defined as final number of cells/mL after three days of incubation) was found at 33 °C followed by 37, 28, and 23 °C, while no growth was detected at 4 °C. The growth of *B. afzelii* species was weaker in comparison to the other two species at 23, 28, 33 and 37 °C, respectively. There

was no statistically significant difference between growth of *B. garinii* and *B. burgdorferi* sensu stricto at 23 °C ( $P=0.807$ ), 28 °C ( $P=0.123$ ), 33 °C ( $P=0.868$ ), and 37 °C ( $P=0.490$ ), respectively.

In determination of borrelial susceptibility to antimicrobial agents, intrinsic low susceptibility or methodological factors could result in low *in vitro* susceptibility of individual strains. Broth microdilution and macrodilution assays were used to determine minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum bactericidal concentrations (MBCs) of six antimicrobial agents (ceftriaxone, cefuroxime sodium, azithromycin, amoxicillin, doxycycline and amikacin) for nine European human isolates of *B. burgdorferi* sensu stricto. MKP medium with a final inoculum of  $10^5$  *Borrelia* cells/mL and incubation periods of 72 h and of 3 weeks and 6 weeks were used in the determination of MICs and MBCs, respectively. Observed MICs indicated that all isolates were susceptible to all the tested antimicrobial agents with the exception of amikacin. Cefuroxime sodium ( $MIC_{90} = 0.063$  mg/L), azithromycin ( $MIC_{90} = 0.22$  mg/L) and ceftriaxone ( $MIC_{90} = 0.25$  mg/L) displayed the lowest MICs, followed by amoxicillin ( $MIC_{90} = 1$  mg/L) and doxycycline ( $MIC_{90} = 2$  mg/L); no strain was susceptible to amikacin ( $MIC_{90} = 256$  mg/L). MBCs after incubation for 3 weeks and 6 weeks were determined for amoxicillin ( $MBC_{90} = 32$  mg/L), doxycycline ( $MBC_{90} = 32$  mg/L) and amikacin ( $MBC_{90} = 1024$  mg/L) and were found to be high (but not defined) for azithromycin ( $MBC_{90} > 0.88$  mg/L), cefuroxime sodium ( $MBC_{90} > 4$  mg/L) and ceftriaxone ( $MBC_{90} > 4$  mg/L). This third study of doctoral dissertation is the first report on the antibiotic susceptibility of a series of European human isolates of *B. burgdorferi* sensu stricto.

**Key words:** *Borrelia burgdorferi* sensu lato, cultivation, growth, MKP medium, temperature, antimicrobial agents

**Scientific field:** Pharmacy

**Specific scientific field:** Pharmaceutical Microbiology

**UDC number:** 579.24:579.84:57.083.1 (043.3)



## LISTA SKRAĆENICA

<b>MKP podloga</b>	Modifikovana Kelly-Pettenkofer-ova podloga
<b>BSK podloga</b>	Barbour-Stonner-Kelly-jeva podloga
<b>MIK</b>	Minimalna inhibitorna koncentracija
<b>MBK</b>	Minimalna baktericidna koncentracija
<b>PFGE</b>	Elektroforeza u pulsirajućem električnom polju (eng. Pulsed field gel electrophoresis)
<b>SAD</b>	Sjedinjene Američke Države
<b>CST</b>	Cerebrospinalna tečnost
<b>P25</b>	25-ti percentil
<b>P75</b>	75-ti percentil

## SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
1.1	TAKSONOMIJA BORELIJA .....	2
1.2	STRUKTURA BORELIJA .....	5
1.3	KULTIVACIJA BORELIJA U <i>in vitro</i> USLOVIMA .....	10
1.4	ŽIVOTNI CIKLUS KRPELJA <i>IXODES RICINUS</i> .....	12
1.5	KLINIČKA SLIKA LAJMSKE BORELIOZE .....	14
1.5.1	Kožne manifestacije .....	16
1.5.2	Lajmska neuroborelioza .....	18
1.6	EPIDEMIOLOGIJA.....	19
1.7	MIKROBIOLOŠKA DIJAGNOZA LAJMSKE BORELIOZE .....	21
1.7.1	Direktno dokazivanje <i>B. burgdorferi</i> sensu lato.....	21
1.7.2	Indirektno dokazivanje <i>B. burgdorferi</i> sensu lato.....	23
1.8	LEČENJE LAJMSKE BORELIOZE.....	24
2	HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	27
3	MATERIJAL I METODE .....	29
3.1	Sojevi <i>B. burgdorferi</i> sensu lato .....	29
3.2	Kultivacija i izolacija <i>B. burgdorferi</i> sensu lato iz kože, krvi i likvora .....	30
3.3	Izolacija DNK borelija iz kulture metodom inkorporacije u gelu .....	31
3.4	Identifikacija vrsta borelija pomoću PFGE .....	32
3.5	Priprema MKP podloge.....	33
3.6	Neubauer-ova metoda.....	38
3.6.1	Postupak brojanja.....	39
3.7	Kultivacija borelija u MKP podlogama različite starosti .....	39

3.8	Kultivacija borelija na različitim temperaturama.....	40
3.9	<i>In vitro</i> ispitivanje osetljivosti <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto na antibiotike .....	42
3.9.1	Bujon mikrodilucijska metoda antibiograma i određivanje MIK.....	45
3.9.2	Bujon makrodilucijska metoda antibiograma i određivanje MBK .....	46
3.10	Statistička analiza .....	46
3.10.1	Rast borelija u MKP podlogama različite starosti .....	46
3.10.2	Rast borelija na različitim temperaturama.....	47
4	REZULTATI.....	48
4.1	Uticaj starosti MKP podloga na rast, razmnožavanja, preživljavanje i morfologiju borelija .....	48
4.2	Uticaj temperature na rast, razmnožavanje i preživljavanje borelija .....	51
4.2.1	Analiza deset pojedinačnih sojeva <i>B. afzelii</i> .....	51
4.2.2	Analiza deset pojedinačnih sojeva <i>B. garinii</i> .....	54
4.2.3	Analiza jedanaest pojedinačnih sojeva <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto .....	56
4.2.4	Uticaj temperature na rast, razmnožavanje i preživljavanje <i>B. afzelii</i> .....	58
4.2.5	Ispitivanje povezanosti između početnog i konačnog broja <i>B. afzelii</i> /mL.....	60
4.2.6	Uticaj temperature na rast, razmnožavanje i preživljavanje <i>B. garinii</i> .....	62
4.2.7	Ispitivanje povezanosti između početnog i konačnog broja <i>B. garinii</i> /mL.....	64
4.2.8	Uticaj temperature na rast, razmnožavanje i preživljavanje <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto .....	66
4.2.9	Ispitivanje povezanosti između početnog i konačnog broja <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto/mL .....	68
4.2.10	Poređenje rasta <i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i> i <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto na 4 °C.....	70
4.2.11	Poređenje rasta <i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i> i <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto na 23 °C.....	71
4.2.12	Poređenje rasta <i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i> i <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto na 28 °C.....	72
4.2.13	Poređenje rasta <i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i> i <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto na 33 °C.....	73

4.2.14	Poređenje rasta <i>B. afzelii</i> , <i>B. garinii</i> i <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto na 37 °C.....	75
4.3	Ispitivanje <i>in vitro</i> osetljivosti sojeva vrste <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto na amoksicilin, azitromicin, ceftriakson, cefuroksim, doksiciklin i amikacin .....	77
5	DISKUSIJA.....	81
5.1	Uticaj starosti MKP podloga na rast, razmnožavanja, preživljavanje i morfologiju borelija .....	81
5.2	Uticaj temperature na rast, razmnožavanje i preživljavanje borelija .....	84
5.3	Ispitivanje <i>in vitro</i> osetljivosti sojeva vrste <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto na amoksicilin, azitromicin, ceftriakson, cefuroksim, doksiciklin i amikacin .....	87
6	ZAKLJUČCI .....	95
7	LITERATURA.....	96
8	PRILOG 1 (SPISAK PUBLIKACIJA).....	110
9	BIOGRAFIJA.....	111

## 1. UVOD

Lajmska borelioza je multisistemska bolest prouzrokovana pokretljivom, spiralnom bakterijom iz kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sensu lato-u širokom smislu), koju na ljude prenose krpelji kompleksa *Ixodes* (1, 2).

Kožnu promenu, nazvanu erythema migrans, koja je karakteristična za lajmsku boreliozu, u Evropi je prvi put opisao švedski lekar Arvid Afzelius, 1909. godine (3). Naziv lajmska borelioza (eng. Lyme borreliosis) potiče od imena grada Lajma (eng. Lyme) u saveznoj državi Konektikat (SAD) gde je sredinom 1970-ih primećen neobičan porast obolelih od juvenilnog reumatoidnog artritisa (4) i borelioza od imena roda bakterije koja prouzrokuje oboljenje (1, 2). Burgdorfer i Barbour su 1982. godine prvi put izolovali uzročnika lajmske borelioze iz krpelja *Ixodes scapularis* i identifikovali ga kao nepoznatu spiralnu bakteriju (5). Izolovanu bakteriju su svrstali u nov rod *Borrelia* i nazvali *Borrelia burgdorferi* (6). Pomoću molekularnih analiza, izolovane borelije su se pokazale kao bakterije koje imaju različite fenotipske i genotipske karakteristike, usled čega su svrstane u kompleks *B. burgdorferi* sensu lato, koji obuhvata sve vrste patogene za čoveka (7).

Borelije su bakterije, sposobne da se razmnožavaju u različitim sredinama i na različitim temperaturama: (i) u nenahranjenim krpeljima (temperatura okoline) (ii) u krpeljima koji sisaju krv domaćina (temperatura 30-35 °C) (iii) u koži (temperatura 32-37 °C) ili unutrašnjim organima (temperatura 37-41 °C) homeotermnih životinja (sisari i ptice) (8).

Borelije lajmske borelioze su bakterije veoma zahtevne za kultivaciju, osetljive su na nestandardne uslove i rastu najbolje pod anaerobnim uslovima, pri pH 7,6 na temperaturi 30 do 34 °C (9-11). Borelije za kultivaciju *in vitro* zahtevaju kompleksne hranljive podloge zbog toga što nisu u mogućnosti da sintetišu mnoge gradivne komponente neophodne za rast i razmnožavanje (12). Danas se u rutinskom radu koriste tri vrste tečnih podloga: modifikovana Kelly-Pettenkofer-ova (MKP), Barbour-Stonner-Kelly-jeva (BSK) i komercijalno dostupna BSK-H podloga (13-15). Izolacija borelija iz kliničkog materijala kao i njihova kultivacija je zahtevna i dugotrajna procedura. Kultivacija traje od 9 do 12 nedelja, što je mnogo više vremena nego što je potrebno za kultivaciju mnogih drugih humanih patogenih bakterija (16).

Iako su mnoge *in vitro* studije pokazale, da su borelije iz kompleksa *B. burgdorferi* sensu lato osjetljive na tetracikline, većinu penicilina, mnoge cefalosporine druge i treće generacije, i na makrolide, kao i da su neosetljive na mnoge fluorohinolone, amikacin, rifampicin, i cefalosporine prve generacije (17), osjetljivost pojedinačnih vrsta borelija na antibiotike je određena samo delimično.

Lajmska boreliozna se javlja u Severnoj Americi (od meksičke granice na jugu do južne kanadske provincije na severu), u celoj Evropi, delovima severne Afrike (Magreb) i severnoj Aziji (ruska Sibirija i Daleki istok, Sahalin, Japan, Kina i Koreja). U Severnoj Americi, lajmska boreliozna do sada nije zabeležena u samo nekoliko saveznih država (Aljaska, Arizona, Montana, Nebraska, Novi Meksiko i Vajoming). Postojanje lajmske borelioze u južnoj hemisferi (Srednja i Južna Amerika, subsaharska Afrika, južna Azija, Australija) do danas nije pouzdano potvrđeno (18).

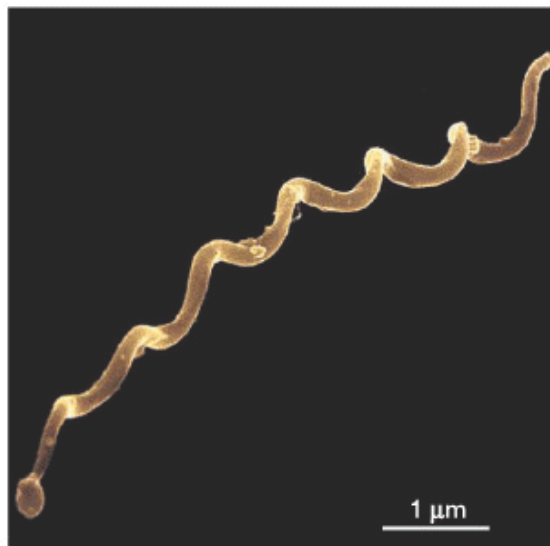
Godišnja incidenca lajmske borelioze se povećava od Severne Evrope ka južnim delovima Centralne Evrope, i kreće se od 69 slučajeva na 100 000 populacije u Švedskoj do 111 slučajeva na 100 000 populacije u Nemačkoj (19). U mnogim zemljama Evrope, incidenca bolesti se povećala u zadnjih nekoliko godina-npr. u Sloveniji, incidenca je bila 258 slučajeva na 100 000 populacije u 2008. godini a naredne godine (2009.) se povećala na 315 slučajeva na 100 000 (20).

U SAD, incidenca se povećala na približno 30 000 slučajeva na 100 000 populacije u toku 2009. godine a 95% svih ovih slučajeva zabeleženo je u svega 12 saveznih država (21).

## 1.1 TAKSONOMIJA BORELIJA

Borelije lajmske borelioze svrstavaju se u red *Spirochaetales*, familiju *Spirochaetaceae*, i rod *Borrelia*. Analiza gena *rrs*, koji kodira 16S rRNK, omogućila je podelu spiroheta unutar reda *Spirochaetales* na familije *Leptospiraceae*, *Brachyspiraceae* i *Spirochaetaceae*. Rod *Brachyspira* pripada familiji *Brachyspiraceae*, rodovi *Borrelia*, *Cristispira*, *Spirochaeta*, *Treponema*, *Brevinema*, i *Spironema* pripadaju familiji *Spirochaetaceae*, a rodovi *Leptonema* i *Leptospira* pripadaju familiji *Leptospiraceae* (22).

U Evropi, infekciju kod ljudi uzrokuju najmanje četiri vrste borelija: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto (sensu stricto-u užem smislu) i *B. spielmanii*, retko *B. bissettii* i *B. lusitaniae* (do sada samo jedan izolat), dok se potencijalnim uzročnikom smatra *B. valaisiana*; za razliku od Evrope gde više vrsta može uzrokovati oboljenje, u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) *B. burgdorferi* sensu stricto je opisana kao jedina vrsta borelija koja može izazvati oboljenje kod ljudi (1, 2, 23-26). Slika 1 prikazuje skening elektronsku mikrografiju (SEM) *B. burgdorferi* sensu lato.



**Slika 1: Skening elektronska mikrografija (SEM) *Borrelia burgdorferi* sensu lato (27)**

Klasifikacija *B. burgdorferi* sensu lato je prikazana u Tabeli 1.

**Tabela 1: Klasifikacija *Borrelia burgdorferi* sensu lato (19)**

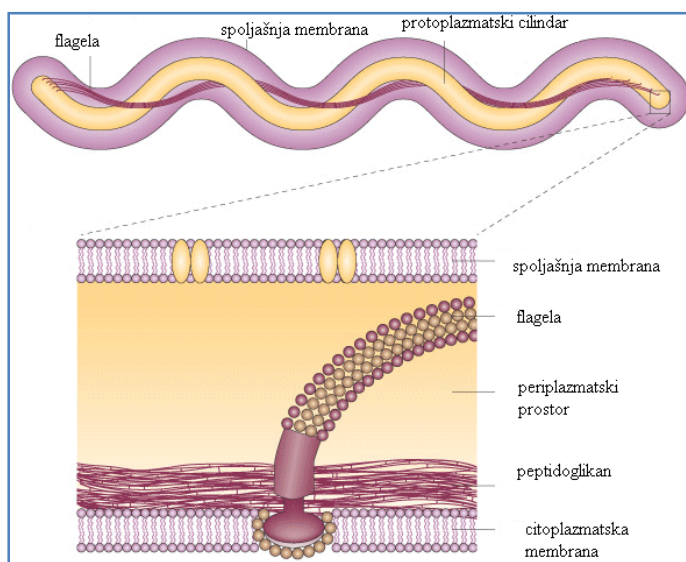
Vrsta	Distribucija	Autor, godina	Referenca
<i>B. afzelii</i> *	Evropa	Canica i saradnici, 1993	Scand J Infect Dis. 25:441-8
<i>B. americana</i>	SAD	Rudenko i saradnici, 2009	J Clin Microbiol. 47:3875-3880
<i>B. andersonii</i>	SAD	Marconi i saradnici, 1995	J Clin Microbiol. 33:2427-34
<i>B. bavariensis</i> *	Evropa	Margos i saradnici, 2009	Appl Environ Microbiol. 75:5410-6.
<i>B. bissettii</i>	Evropa, SAD	Postic i saradnici, 1998	J Clin Microbiol. 36:3497-504
<i>B. burgdorferi</i> *	Evropa, SAD	Baranton i saradnici, 1992	Int J Syst Bacteriol. 42:378-83
<i>B. californiensis</i>	SAD	Postic i saradnici, 1997	Int J Med Microbiol. 297:263-271
<i>B. carolinensis</i>	SAD	Rudenko i saradnici, 2009	J Clin Microbiol. 47:134-141
<i>B. finlandensis</i>	Evropa	Casjens i saradnici, 2011	J Bacteriol. 193(6):1489-90
<i>B. garinii</i> *	Evropa, Azija	Baranton i saradnici, 1992	Int J Syst Bacteriol. 42:378-83
<i>B. kurtenbachii</i>	SAD	Margos i saradnici, 2011	Ticks Tick Borne Dis. 1:151-158
<i>B. lusitaniae</i>	Evropa	Le Fleche i saradnici, 1997	Int J Syst Bacteriol. 47:921-5
<i>B. japonica</i>	Japan	Kawabata i saradnici, 1993	Microbiol Immunol. 37:843-8
<i>B. sinica</i>	Kina	Masuzawa i saradnici, 2001	Int J Syst Evol Microbiol. 51:1817-24
<i>B. spielmanii</i> *	Evropa	Richter i saradnici, 2006	Int J Syst Evol Microbiol. 56:873-81
<i>B. tanukii</i>	Japan	Fukunaga i saradnici, 1996	Microbiol Immunol. 40:877-81
<i>B. turdi</i>	Japan	Fukunaga i saradnici, 1996	Microbiol Immunol. 40:877-81
<i>B. valaisiana</i>	Evropa, Azija	Wang i saradnici, 1997	Int J Syst Bacteriol. 47:926-32
<i>B. yangtze</i>	Azija	Chu i saradnici, 2011	J Bacteriol. 1936:1489-90

\*poznati patogeni



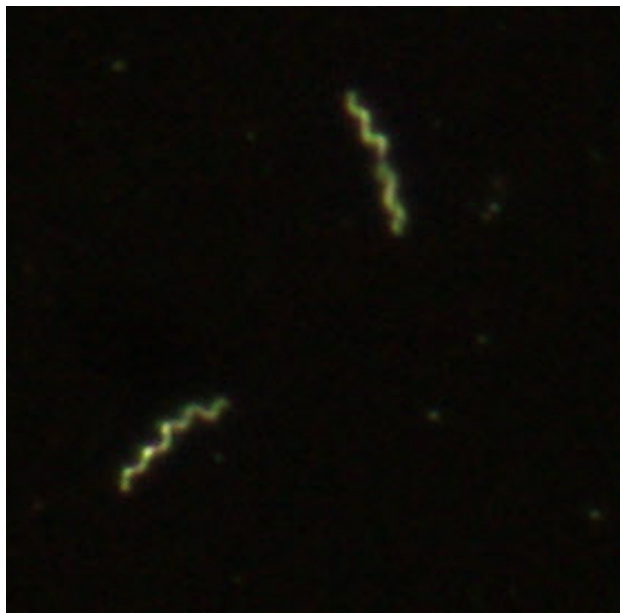
## 1.2 STRUKTURA BORELIJA

Borelije su tanke, pokretljive, spiralne bakterije koje poseduju 7-10 endoflagela smeštenih u periplazmatskom prostoru koji se nalazi između spoljašnje i citoplazmatske membrane. Dužina ćelija se kreće od 5 do 30  $\mu\text{m}$ , širina od 0,2 do 0,5  $\mu\text{m}$  a broj spiralnih navoja varira od 3 do 10 (9, 23). Struktura borelijske ćelije je prikazana na Slici 2.



*Slika 2: Struktura i morfologija Borrelia burgdorferi sensu lato (27)*

Spoljašnja membrana je slična membrani Gram negativnih bakterija i od nje se razlikuje po većem sadržaju proteina i manjoj količini lipopolisaharida a kod nekih sojeva njenu površinu pokriva amorfnu sluz. Glikolipidni antigeni se razlikuju od lipopolisaharidnih, i predstavljaju do 50% svih membranskih lipida borelija. Takav sastav membrane je važan za prilagođavanje i preživljavanje borelija u različitim sredinama i takođe je razlog za teško bojenje borelija po Gramu, a najlakše i najbolje se vide mikroskopiranjem u tamnom polju (9, 23). Slika 3 prikazuje *B. burgdorferi sensu lato* u tamnom polju.



**Slika 3: *Borrelia burgdorferi sensu lato* u tamnom polju (28)**

Spoljašnja membrana borelija je veoma fluidna i sadrži transmembranske i spoljašnje površinske proteine (engl. Outer surface protein) koji su po hemijskoj prirodi lipoproteini. Poznato je 6 Osp proteina: OspA, OspB, OspC, OspD, OspE i OspF (23, 29).

OspA je prisutan kod većine izolata *B. burgdorferi sensu lato*. Do ekspresija gena *ospA* dolazi u crevu krpelja, a vrlo retko pri infekciji domaćina (30). Protein OspA poseduje adhezivne osobine čime je omogućeno vezivanje za epitelne ćelije creva (31). Prilikom hranjenja krpelja na domaćinu, dolazi do porasta temperature u crevu krpelja na 37 °C, što za posledicu ima smanjenje ekspresije gena *ospA* što omogućava borelijama odvajanje od epitelnih ćelija creva i prelazak u pljuvačne žlezde (32, 33). Pojava antitela usmerenih protiv OspA, dešava se u kasnijoj fazi bolesti (34).

OspB je često izražen pri hroničnoj infekciji kod ljudi i vrlo retko ga ispoljavaju borelije prisutne u krpeljima. Ovaj protein takođe poseduje adhezivne osobine kao i protein OspA. Do pojave imunog odgovora protiv OspB dolazi u kasnim fazama bolesti (35).

OspC igra važnu ulogu u prelasku borelija iz creva krpelja u pljuvačne žlezde i dalje u prelasku u domaćina (36). U toku hranjenja krpelja dolazi do povećane ekspresije proteina OspC, dok se ekspresija OspA smanjuje. Ekspresija OspC je u korelaciji sa infektivnošću borelija (37), a kod čoveka dovodi do snažanog imunog odgovora (33, 38).

Protein OspD ima značajnu ulogu u vezivanju za ćelije domaćina i na taj način učestvuje u početku infekcije (39). Proteini OspE i OspF se ispoljavaju u početnoj fazi infekcije (40). OspE deluje kao indirektni inhibitor komplementa, veže se za faktor H, dok uloga OspF nije poznata (33, 39, 40).

Pored Osp antigena, u specifične borelijske antigene spadaju i proteini p83/100, p39 i p18, koji su smešteni u citoplazmi a borelije ih različito ispoljavaju. Njihova uloga se i dalje proučava (9, 23, 29).

Flagelin je osnovni protein borelijskih flagela i veoma je imunogen antigen koji je odgovoran za nastajanje prvih antitela u toku infekcije. Pošto su neki delovi flagelina slične ili identične strukture kao i kod drugih bakterija koje poseduju flagele (treponema, enterobakterije, bacili), ta antigenska sličnost može biti uzrok lažno negativnih reakcija prilikom izvođenja seroloških testova (41).

Protein VlsE je lipoprotein i prolazi kroz anitgenske varijacije. Većina bolesnika razvije jak imuni odgovor na ovaj lipoprotein (42, 43).

Genom borelija se sastoji iz linearnog hromozoma i različitog broja cirkularnih i linearnih plazmida, a celokupna sekvenca borelijskog genoma prvo je bila određena kod soja B31 *B. burgdorferi* sensu stricto (12). U Tabeli 2 su prikazane karakteristike borelijskog genoma.

**Tabela 2: Karakteristike borelijskog genoma (12)**

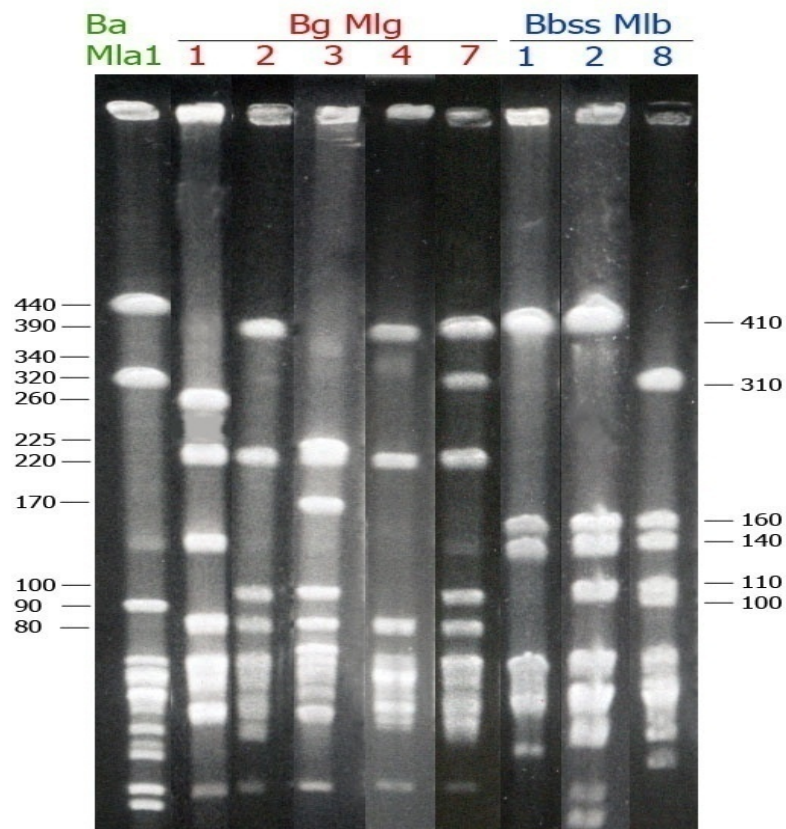
<b>Hromozom</b>	<b>Veličina ( % GC)</b>
Kodirajuće sekvence (93%)	910,725 bp (28,6% GC)
RNKs (0,7%)	
Intergenska sekvenca (6,3%)	
853 kodirajućih sekvenci	
500 (59%) identifikovani	
104 (12%) usklađeni sa hipotetičkim proteinima	
249 (29%) neidentifikovani	
<b>Plazmidi</b>	<b>Veličina (% GC)</b>
cp29	9,386 bp (23,6% GC)
lp17	26,497 bp (26,3% GC)
lp25	16,828 bp (23,1% GC)
lp28-1	24,182 bp (23,3% GC)
lp28-2	26,926 bp (32,3% GC)
lp28-3	29,771 bp (31,5% GC)
lp28-4	28,605 bp (25,1% GC)
lp36	27,329 bp (24,4% GC)
lp38	36,834 bp (26,8% GC)
lp54	38,853 bp (26,1% GC)
	53,590 bp (28,1% GC)
Kodirajuće sekvence (71%)	
Intergenska sekvenca (29%)	
430 kodirajućih sekvenci	
70 (16%) identifikovani	
110 (26%) usklađeni sa hipotetičkim proteinima	
250 (58%) neidentifikovani	
<b>Ribozomalna RNK</b>	<b>Mesto na hromozmu</b>
16S	444581-446118
23S	438590-441508
5 S	438446-438557
23S	435334-438267
5S	435201-435312

Za genom borelija su karakteristični neobično organizovani geni ribozoma. Postoje dve kopije gena 23S (*rrl*) i 5S (*rrf*) koje se tandemski ponavljaju i samo jedna kopija gena 16S (*rrs*) (44, 45).

Neobična organizovanost genoma borelija je istražena restrikcijom analizom u delovima *rrs* gena i intergenskih odsečaka *rrfA-rrlB* i *rrs-rrlA* (7).

Određivanje karakteristika borelijskog genoma je ključno za identifikaciju vrsta borelija. Metode za identifikaciju se baziraju na analizi hromozomske ili plazmidske DNK (npr. rezanje celokupne DNK s različitim restrikcionim enzimima, ili umnožavanje pojedinih delova genoma nakon čega slede hibridizacija, restrikcija ili sekveniranje) (7).

Isecanjem celokupnog borelijskog genoma sa različitim restrikcionim enzimima dobijaju se restrikcioni fragmenti koji se razdvajaju elektroforezom u pulsirajućem električnom polju (engl. Pulsed field gel electrophoresis-PFGE). Na osnovu plazmidskog profila, sojevi *B. burgdorferi* sensu lato se mogu razlikovati: mogu da poseduju različite plazmide, a jednaki plazmidi mogu da se razlikuju po molekularnoj masi. Ta raznolikost omogućava razlikovanje sojeva unutar vrste (7, 46). Restrikcioni fragmenti *B. burgdorferi* sensu lato razdvojeni pomoću PFGE, nakon restrikcije sa *MluI* restrikcionim enzimom prikazani su na Slici 4.



**Slika 4: Restrikcioni fragmenti *Borrelia afzelii* (Ba; soj Mla1), *Borrelia garinii* (Bg; sojevi Mlg1-4 i Mlg7) i *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (Bbss; sojevi Mlb1-2 i Mlb8) razdvojeni elektroforezom u pulsirajućem električnom polju nakon restrikcije celokupnog genoma sa MluI restrikcionim enzimom (46)**

### 1.3 KULTIVACIJA BORELIJA U *in vitro* USLOVIMA

Borelije su mikroaerofilne, biohemijski neaktivne i spororastuće bakterije, koje zahtevaju posebnu pažnju i optimalne uslove za kultivaciju *in vitro*, a rastu najbolje pri pH 7,6 i na temperaturi 30 do 34 °C (9-11). Generacijsko vreme borelija je dugo i kreće se između 7 i 20 sati, a zavisi od raspoloživih hranljivih materija, uslova pod kojima se izvodi kultivacija i sposobnosti prilagođavanja borelija iz biološkog materijala u veštačkim uslovima odnosno na hranljivim podlogama (11).

MKP, BSK i komercijalno dostupna BSK-H podloga su tri vrste tečnih podloga koje se danas koriste u rutinskom laboratorijskom radu i predstavljaju mešavinu aminokiselina,

vitamina, neorganskih soli, goveđih serumskih albumina, N-acetil-D-glukozamina, zečijeg seruma i drugih faktora neophodnih za rast i razmnožavanje borelija (13-15). Ove hranljive podloge omogućavaju rast borelija koje su prisutne u malom polaznom uzorku, a posle prilagođavanja na podloge omogućavaju kraće generacijsko vreme i maksimalnu koncentraciju borelija u kulturi ( $10^8$  do  $10^9$ /ml) (16). Kulture borelija se inkubiraju na temperaturi 30 do 34 °C, pod mikroaerofilnim uslovima, i u vremenskom periodu 9 do 12 nedelja što je mnogo više vremena nego što je potrebno za kultivaciju drugih humanih patogenih bakterija (16, 47, 48).

Kulture je potrebno pregledati jednom nedeljno. Jedna kap tečne bakterijske kulture se nanosi na mikroskopsku pločicu i preko kapi se odmah spušta pokrovna ljušpica, nakon čega se preparat posmatra mikroskopiranjem u tamnom polju.

*B. burgdorferi* sensu lato takođe mogu rasti i na čvrstim podlogama, koje se pripremaju tako da se tečnim podlogama gore opisanim dodaje agaroz, dok inkubacija teče pod anaerobnim ili mikroaerofilnim uslovima (49, 50). Prednost upotrebe čvrstih podloga je mogućnost dobijanja morfološki različitih kolonija između i unutar vrsta *B. burgdorferi* sensu lato. Međutim, do sada su na čvrstim podlogama kultivisane samo one borelije koje su prethodno bile izolovane iz kliničkih materijala u tečnim podlogama i nema podataka o mogućnosti neposredne izolacije borelija iz bolesničkog uzorka na čvrstim podlogama.

Usled nedostatka hranljivih materija bakterije mogu prestati da se kreću i mogu formirati cistične forme (51, 52). Takve cistične forme su sferoplasti (sadrže spoljašnju membranu i delove peptidoglikana) koji su usled oštećenja velikog dela ćelijskog zida i metaboličke neaktivnosti neotporni na dejstvo antibiotika što dovodi do komplikacije toka bolesti (51, 53, 54). Brorson i Brorson (53, 54) su pokazali, da su sferoplasti metabolički aktivni i da se u *in vitro* uslovima pri povoljnim uslovima mogu ponovo transformisati u pokretljive borelije.

Kako bi podloga bila korisna za laboratorijski rad, ona mora da bude stabilna, dostupna, i efikasna u podržavanju rasta svih humanih patogenih sojeva (55). Značajna prepreka u rutinskom radu je kratak rok trajanja podloge kao i njena zahtevna, skupa i precizna priprema i kontrola. S druge strane pravljenje podloge zahteva iskusnog tehničara koji mora

imati dobro znanje iz hemije i biohemije kao i laboratorijskih procedura (56). U Laboratoriji za lajmsku boreliozu i leptospirozu (Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Ljubljani, Slovenija), MKP podloga se pokazala kao jedna od najboljih za rutinski rad (55, 57) i pravi se najmanje jednom mesečno, a tokom sezone krpelja (od juna do septembra) najmanje jednom nedeljno (56). Svaka podloga mora biti napravljena u skladu sa Dobrom laboratorijskom praksom, a svaka nova serija treba da bude testirana na sposobnost da podrži rast borelija. Jednom pripremljena hranljiva podloga, efikasna je samo jedan ograničen vremenski period u kom ima sposobnost da podrži rast i razmnožavanje borelija (56).

#### 1.4 ŽIVOTNI CIKLUS KRPELJA *IXODES RICINUS*

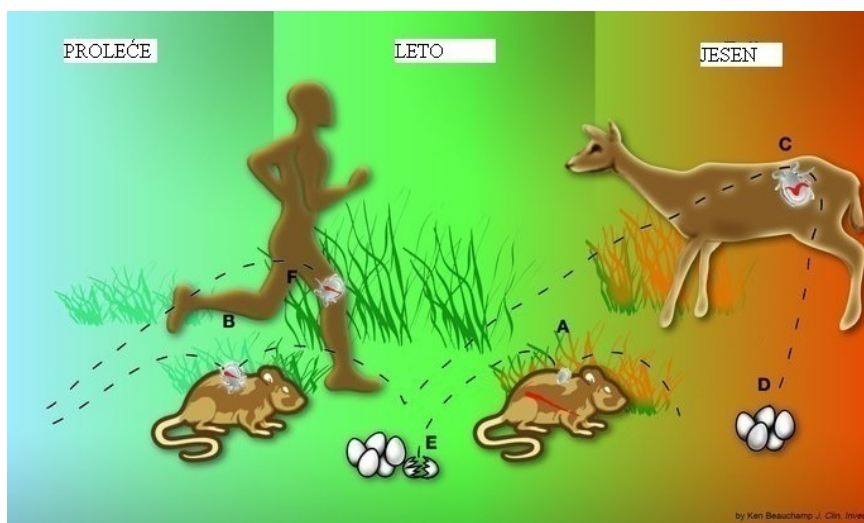
Lajmska boreliozna je multisistemsko oboljenje ljudi i životinja, a najznačajniji prenosioci uzročnika ove bolesti su krpelji. Glavni prenosioci su *I. ricinus* u Evropi, dok su *I. scapularis* (istok) i *I. pacificus* (zapad) zastupljeni u Severnoj Americi (23).

Sve vrste krpelja imaju sličan životni ciklus. *I. ricinus* tokom svog razvojnog ciklusa prolazi kroz četiri faze: jajašce, larva, nimfa i odrasli krpelj. Ženke odlažu jajašca iz kojih se izlažu larve. Larve se hrane 3 do 5 dana na glodarima ili drugim malim šumskim životinjama, nakon čega se odvajaju od domaćina i preko zime se transformišu u nimfe, koje za hranjenje zahtevaju novog domaćina. Novi domaćini su šumske životinje ili čovek koji predstavlja slučajnog domaćina. Nakon hranjenja od 3 do 5 dana, ponovo se odvajaju od domaćina i transformišu u odraslog krpelja. Domaćini odraslog krpelja su veliki sisari, obično veće šumske životinje na kojima se krpelji hrane od 9 do 11 dana. Ženke nakon hranjenja izležu jajašca. Na bilo kom stadijumu razvoja mogući domaćini su i ptice. Životni ciklus krpelja traje obično 2 godine, može i 5 do 6 godina, u zavisnosti od vremenskih uslova i raspoloživosti domaćina (58).

Krpelj najčešće unosi krvni obrok pri temperaturi 23 do 27 °C tokom proleća, početkom leta i početkom jeseni. Krpelj se inficira borelijama prilikom sisanja krvi u toku spirohetemije domaćina. Ako se inficira kao larva, borelije se mogu preneti tokom transformacije u nimfe i posle u odraslog krpelja. Inficirane larve, nimfe i odrasli krpelji mogu prilikom sisanja krvi da prenesu borelije na životinje i/ili čoveka i time prouzrokuju



bolest. Takav prenos borelija se naziva horizontalan. Pored toga, prenos borelija je moguć i na vertikalni način, odnosno inficirana ženka izleže inficirana jajašca iz kojih se izležu inficirane larve. U prirodi je vertikalni prenos redak i nedovoljan za održavanje inficirane populacije u krpeljima i sisarima (11). Tokom hranjenja krpelja na inficiranom domaćinu, spirohete odlaze u lumen creva gde miruju određen vremenski period do sledećeg sisanja krvi kada se počinju razmnožavati i prelaze iz creva u pljuvačne žlezde. Borelije zatim putuju u novog domaćina sa sekretima pljuvačnih žlezda krpelja. Za uspešan prenos borelija u novog domaćina, krpelj se na njemu mora hraniti najmanje 24 sata (59). Nakon unosa borelija u novog domaćina, aktiviraju se geni borelija, koji omogućavaju prilagođavanje borelija na nove uslove okoline (60). Životni ciklus krpelja prikazan je na Slici 5.



**Slika 5: Životni ciklus krpelja; A-larva se hrani na domaćinu u toku kasnog leta; B-nimfa se hrani na domaćinu u toku kasnog proleća i ranog leta; C-odrasli krpelj se hrani na domaćinu tokom jeseni; D-ženka polaže jajašca; E-iz jajašaca se izležu larve naredno leto; F-čoveka mogu da zaraze larva, nimfa i odrasli krpelj (61)**

## 1.5 KLINIČKA SLIKA LAJMSKE BORELIOZE

Lajmska borelioza se manifestuje različitim kliničkim znacima i simptomima. Tok bolesti se može podeliti u tri kliničke faze: rana infekcija se manifestuje kao kožna lezija eritema migrans (erythema migrans) koja se javlja na mestu uboda krpelja (faza 1), sledi rana diseminovana (raširena) infekcija u toku koje mogu biti zahvaćeni nervni sistem, koža, zglobovi i/ili srce (faza 2) i kasna zahvaćenost nervnog sistema, zglobova i kože koja se javlja u toku nekoliko meseci ili godina (faza 3) (1, 2). Poređenje lajmske borelioze u Severnoj Americi i Evropi je prikazano u Tabeli 3.

**Tabela 3: Poređenje lajmske borelioze u Severnoj Americi i Evropi (1, 2)**

Varijabla		Severna Amerika	Evropa
<b>Koža</b>	<b>Akutna faza</b>	Erythema migrans se brže širi, kraće traje, inflamacija je intezivnija; veća mogućnost hematogene diseminacije	Erythema migrans se sporije širi, duže traje, inflamacija je manje izražena; manja mogućnost hematogene diseminacije
	<b>Hronična faza</b>	ACA se retko javlja	ACA
<b>Nervni sistem</b>	<b>Akutna faza</b>	Meningitis, teška glavobolja, blaga ukočenost vrata, manje istaknut radikuloneuritis	Radikularni bol i pleocitoza; manje istaknuta glavobolja i ukočenost vrata
	<b>Hronična faza</b>	Blaga senzorna polineuropatija bez ACA Blaga encefalopatija, kognitivni poremećaji, slaba intratekalna produkcija antitela	Blaga senzorna polineuropatija u delovima zahvaćenim ACA Teški encefalomijelitis, spasticitet, kognitivni poremećaji, značajna intratekalna produkcija antitela
<b>Srce</b>	<b>Akutna faza</b>	AV blok i miokarditis	AV blok i miokarditis
	<b>Hronična faza</b>	Nema podataka	Dilatirana kardiomiopatija
<b>Artritis</b>	<b>Akutna faza</b>	Oligoartritis se često javlja, intezivnija inflamacija zglobova	Oligoartritis se retko javlja, manje intezivna inflamacija zglobova
	<b>Hronična faza</b>	Oko 10% pacijenata sa artritismom je rezistentno na terapiju	Perzistentni artritis se retko javlja
<b>Asimptomatska infekcija</b>		Javlja se u oko 10% pacijenata	Javlja se u više od 10% pacijenata
<b>Pojava antitela</b>		Antitela usmerena na mnoge proteine	Antitela usmerena na nekoliko proteina

ACA= acrodermatitis chronica atrophicans; AV=atrioventrikularni

Od različitih objektivnih kliničkih prezentacija lajmske borelioze u Evropi, erythema migrans je najčešća (17, 62). U ranijim studijama koje su sprovedene na evropskim pacijentima (63) pokazano je, da je 89% pacijenata imalo erythema migrans, 5% je imalo artritis, 3% je imalo rane neurološke manifestacije, 2% je imalo borelijski limfocitom, 1% je imalo acrodermatitis chronica atrophicans, a manje od 1% je imalo srčane manifestacije.

Ni jedan pacijent nije imao kasne neurološke manifestacije lajmske borelioze. Slični podaci o učestalosti kliničkih manifestacija su pokazani i u studijama koje se sprovedene u SAD (64-66) s tim da nisu zabeleženi pacijenti koji su imali borelijski limfocitom i acrodermatitis chronica atrophicans.

*B. afzelii* je uglavnom povezana sa kožnim manifestacijama kao što su erythema migrans i acrodermatitis chronica atrophicans, *B. garinii* sa nervnim manifestacijama (lajmska neuroborelioza), dok je *B. burgdorferi* sensu stricto povezana sa zahvaćenošću zglobova (lajmski artritis) (1, 2, 26, 67).

### **1.5.1 Kožne manifestacije**

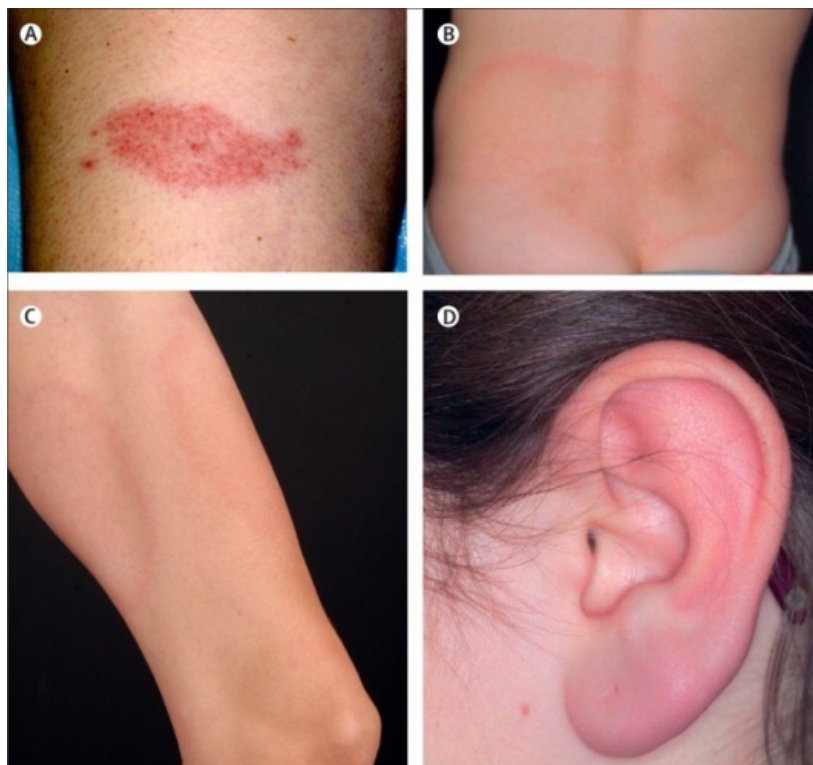
Erythema migrans je karakteristična kožna promena koja se odnosi na rani, lokalizovani oblik lajmske borelioze (1, 2). U Evropi se kao uzročnici oboljenja kod ljudi navode *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, i *B. spielmanii*, retko *B. bissettii* i *B. lusitaniae*, dok je najčešće izolovana vrsta *B. afzelii* (7, 24-26, 47, 62, 68).

Erythema migrans (Slika 6 A-C) je najbolji klinički indikator lajmske borelioze. Javlja se posle nekliko dana ili nedelja na mestu uboda krpelja, a počinje kao mala crvena makula ili papula, koja se postepeno širi spolja i blede u sredini. Nelečene lezije mogu da se prošire i da perzistiraju više nedelja ili meseci i da dostignu veličinu od nekoliko do 100 cm (1).

Od propratnih simptoma mogu da se jave: blag svrab, pečenje i bol na mestu uboda, umor, malaksalost, glavobolja, bolovi u mišićima i zglobovima (69).

Ukoliko iz početnog eritema dođe do hematogene diseminacije borelija, može da nastane multipli erythema migrans (1, 2).

Ređa klinička slika rane, lokalizovane infekcije je borelijski limfocitom (Slika 6 D). Javlja se nekoliko nedelja nakon infekcije i može da perzistira više meseci. To je solitarna, crvenkasto-plava nodula, veličine do nekoliko centimetara, koja nastaje usled guste infiltracije limfocita u koži i potkožinom tkivu i najčešće se javlja na ušnoj školjci i bradavici (1, 2).



**Slika 6: Primeri kožnih manifestacija. (A) Erythema migrans na desnoj butini. (B) Proširena erythema migrans sa bledim centrom na leđima. (C) Erythema migrans na levoj butini. (D) Borelijski limfocitom: crvenkasto-plava nodula na levoj ušnoj školjci (17)**

Klinička slika kasnog oblika lajmske borelioze je acrodermatitis chronica atrophicans (Slika 7 A-C). Javlja se posle nekoliko meseci ili godina nakon primarne infekcije i za razliku od erythema migrans i borelijskog limfocitoma, ne može proći spontano (1).

To je dugotrajna, obično progresivna manifestacija lajmske borelioze, koja se u početku karakteriše crvenim ili crvenkasto-modrim promenama i otokom kože, obično na ekstenzornim površinama ekstremiteta, a kasnije dolazi do atrofije kože i potkožnog tkiva, a moguća je i pojava fibroznih čvorova u koži (70).



*Slika 7: Acrodermatitis chronica atrophicans se obično nalazi na ekstenzornim površinama ekstremiteta: (A) lezije na podlaktici i šaci, (B) plavičasto-crvene lezije na šaci i voštani izgled kože na prstima, (C) lezije na potkolenici i stopalu (17)*

### **1.5.2 Lajmska neuroborelioza**

Lajmska neuroborelioza je bolest centralnog i/ili perifernog nervnog sistema prouzrokovana *B. burgdorferi* sensu lato, i može biti rana ili kasna (71).

U Severnoj Americi, sve manifestacije lajmske borelioze, uključujući i lajmsku neuroboreliozu prouzrokuje *B. burgdorferi* sensu stricto, dok u Evropi lajmsku neuroboreliozu najčešće prouzrokuje *B. garinii*, ređe *B. afzelii*, i retko *B. burgdorferi* sensu stricto (25, 71-73).

Pacijenti sa kliničkom slikom borelijskog meningitisa obično imaju blage simptome a limfocitna pleocitoza je prisutna u cerebrospinalnoj tečnosti (CST) bolesnika (1).

U toku rane lajmske neuroborelioze, mogu biti zahvaćeni motorni nervi, što za posledicu ima pareze koje su obično asimetrične. Najčešće su zahvaćeni facijalni nervi-nastaje unilateralna ili bilateralna periferna facijalna paraliza. Kod pacijenata je prisutna limfocitna pleocitoza, čak i onda kada nema kliničkih simptoma meningitisa (1, 74, 75).

Periferna neuropatija, kao posebna klinička manifestacija lajmske neuroborelioze javlja se veoma retko, mnogo češće se sreće kod pacijenata sa acrodermatitis chronica atrophicans.

Drugi ređi oblici rane lajmske neuroborelioze su encefalitis i mijelitis, a veoma retko se sreće cerebralni vaskulitis (70).

## 1.6 EPIDEMIOLOGIJA

Lajmska borelijoza je najčešća bolest koju prenose krpelji u severnoj hemisferi (1).

Incidenca lajmske borelioze povezana je sa rasprostranjenošću glavnih vektora krpelja. U Evropi je glavni vektor *I. ricinus*, u SAD *I. scapularis*, a u Aziji *I. persulcatus* (18, 61). Vrste borelija i geografska rasprostranjenost krpelja prikazani su u Tabeli 4.

U većini slučajeva najčešća klinička slika-erythema migrans se javlja između juna i avgusta. Sezonska distribucija ekstrakutanih manifestacija je manje izražena usled varijabilnog vremenskog perioda od infekcije do pojave oboljenja koji je obično duži nego za erythema migrans (17). Kliničke manifestacije su iste kod dece i kod odraslih, osim meningopoliradikuloneuritisa i acrodermatitis chronica atrophicans koji se ne javljaju kod dece (kod dece se češće javlja multipli erythema migrans); učestalost različitih kliničkih manifestacija je više varijabilna kod dece različitih starosnih grupa nego kod odraslih (71, 76).

**Tabela 4: Vrste borelija i geografska rasprostranjenost krpelja (1, 61,77)**

Vrsta borelija	Krpelj (glavni vektor)	Lokacija
<i>B. afzelii</i> *	<i>I. ricinus, I. persulcatus</i>	Evropa, Azija
<i>B. bavariensis</i> *	<i>I. ricinus</i>	Evropa
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto*	<i>I. ricinus, I. scapularis, I. pacificus</i>	Evropa, SAD
<i>B. garinii</i> *	<i>I. ricinus, Ixodes persulcatus</i>	Evropa, Azija
<i>B. spielmanii</i> *	<i>I. ricinus</i>	Evropa
<i>B. americana</i>	<i>I. pacificus, I. minor</i>	SAD
<i>B. andersonii</i>	<i>I. dentatus</i>	Istočni deo SAD
<i>B. bissetii</i>	<i>I. spinipalpis, I. pacificus</i>	Zapadni deo SAD
<i>B. californiensis</i>	<i>I. pacificus, I. jellisonii, I. spinipalpis</i>	SAD
<i>B. carolinensis</i>	<i>I. minor</i>	SAD
<i>B. finlandensis</i>	<i>I. ricinus</i>	Evropa
<i>B. kurtenbachii</i>	<i>I. scapularis</i>	Evropa, SAD
<i>B. lusitaniae</i>	<i>I. ricinus</i>	Evropa (uglavnom Portugal)
<i>B. japonica</i>	<i>I. ovatus</i>	Japan
<i>B. sinica</i>	<i>I. persulcatus</i>	Kina
<i>B. tanukii</i>	<i>I. tanukii</i>	Japan
<i>B. turdi</i>	<i>I. turdus</i>	Japan
<i>B. valaisiana</i>	<i>I. ricinus</i>	Centralna Evropa, Irska, Velika Britanija i Azija
<i>B. yangtze</i>	<i>Haemaphysalis longicornis, I. granulatus</i>	Kina

\*poznati patogeni

Na osnovu dostupnih nacionalnih podataka, procenjeno je da prosečan godišnji broj obolelih od lajmske borelioze u Evropi iznosi oko 85 000, dok se u SAD taj broj kreće od 15 000 do 20 000 (2, 78).

Pošto je prijavljivanje obolelih od lajmske borelioze obavezno u samo nekoliko evropskih zemalja, njenu učestalost u Evropi moguće je proceniti samo približno (70). U Evropi je zabeležen porast učestalosti bolesti od zapada ka istoku, sa najvećem učestalošću u zemljama centralne Evrope (npr. Slovenija 155 slučajeva na 100 000 populacije) i najmanjom učestalošću u Velikoj Britaniji (0,7/100 000) i Irskoj (0,6/100 000). Smatra se



da je realna učestalost ove bolesti mnogo veća. U nekim zemljama Evrope, zabeleženo je smanjenje učestalosti bolesti: od juga ka severu u Skandinaviji, i od severa prema jugu u Italiji, Španiji i Grčkoj (78).

## 1.7 MIKROBIOLOŠKA DIJAGNOZA LAJMSKE BORELIOZE

Mikrobiološka dijagnoza lajmske borelioze je potrebna za sve kliničke manifestacije bolesti, osim za kožnu leziju-erythema migrans, koja je karakteristična i najčešća klinička manifestacija rane lajmske borelioze (1). Postoje direktne i indirektne metode za dokazivanje lajmske borelioze.

### 1.7.1 Direktno dokazivanje *B. burgdorferi* sensu lato

Za direktno dokazivanje uzročnika lajmske borelioze, primenjuju se dva različita pristupa: izolacija borelija i dokazivanje DNK borelija (16).

#### **Izolacija borelija**

Borelije se mogu izolovati iz različitog kliničkog materijala kao što su koža, krv, CST, sinovijalna tečnost itd. u toku rane kao i hronične faze lajmske borelioze (11, 47).

Klinički materijal za izolaciju potrebno je uzeti od pacijenta pre antibiotske terapije (79), pod aseptičnim uslovima, u što većoj količini (npr. 2 mL CST; 10mL krvi), inokulisati u hranljivu podlogu odmah nakon uzimanja od pacijenta (11, 16) i transportovati uzeti materijal do laboratorije pri sobnoj temperaturi (80).

Izolacija borelija je najuspešnija iz kože bolesnika u ranoj fazi lajmske borelioze (kod bolesnika sa kliničkom slikom erythema migrans). U Evropi, prosečna uspešnost izolacije borelija iz erythema migrans je  $\geq 40\%$  (16, 55, 81), u SAD je veća od 50%, dok je prosečna uspešnost izolacije borelija u Evropi iz acrodermatitis chronica atrophicans  $\geq 22\%$  (16).

Izolacija borelija iz krvi nelečenih pacijenata u Evropi je manja od 5%. U većini studija, u postupku izolacije borelija korišćen je mali uzorak krvi odnosno plazme volumena  $\leq 1$  mL (16, 82). Uspešnost izolacije iz krvi je niska usled retke diseminacije borelija ili usled nedovoljne količine uzete krvi (16). *B. afzelii* je najčešće izolovana vrsta iz primarne kožne promene erythema migrans u Evropi ali je njena hematogena diseminacija retka (16, 83).

Uspešnost izolacije borelija iz krvi (iz volumena plazme  $\geq 9$  mL) bolesnika u SAD je veća od 40% (16).

Prosečana uspešnost izolacije borelija iz CST bolesnika sa neuroboreliozom iznosi 10% (16).

Izolacija kao i kultivacija borelija iz kliničkog materijala je dugotrajna, zahtevna i skupa metoda koja se odlikuje umerenom osetljivošću (48, 69, 82, 84-86), a samo nekoliko laboratorija je adekvatno opremljeno za izvođenje ove metode.

Često presejavanje borelija može biti uzrok gubitka patogenosti, koji bi mogao biti odraz gubitka plazmida, uključivanja ili isključivanja različitih gena ili mutacije u genskim zapisima za površinske imunogene proteine (87).

Prednost metode je visoka specifičnost, zbog čega se smatra "zlatnim standardom" za potvrđivanje infekcije uzrokovane borelijama, naročito u toku prvih nedelja infekcije kada su serološki testovi neosetljivi (1, 2, 16).

### **Dokazivanje DNK borelija**

DNK borelija se dokazuje pomoću reakcije lančane polimerizacije (engl. polymerase chain reaction, PCR). U odnosu na kultivaciju, koja traje više od 9 nedelja, PCR je mnogo brža metoda koja daje rezultate u toku samo nekoliko dana, ali njen nedostatak je što nije standardizovana (16).

Od ključnog je značaja izbor ciljnog segmenta DNK koji će se umnožavati. U studijama su se upotrebljavale brojne ciljane sekvence: p66, gen za 16S rRNK, gen za flagelin (*fla*), gen za 23S rRNK, intergensku regiju 5S-23S rRNK, geni *recA*, *hbb*, *ospA* i *ospB* kao i mnogi drugi (16, 88).

Pomoću PCR metode, mogu se analizirati uzorci biopsije kože bolesnika, krv, CST i sinovijalna tečnost bolesnika s različitim kliničkim slikama borelijske infekcije.

U Evropi, osetljivost PCR metode za detekciju DNK *B. burgdorferi* sensu lato u uzorku kože kreće se u rasponu 36-88% za erythema migrans, i u rasponu 54-100% za

acrodermatitis chronica atrophicans, dok je u SAD taj raspon 59-67% za erythema migrans (16).

Osetljivost PCR metode za detekciju DNK *B. burgdorferi* sensu lato u uzorku krvi i CST pacijenata sa lajmskom boreliozom je daleko niža, i u slučaju uzorka krvi iznosi 10% i 23% za uzorak CST (16).

Do razlika u osetljivosti dolazi usled upotrebe različitih ciljnih sekvenci za umnožavanje, dizajna same reakcije i veličine uzorka (26).

### **1.7.2 Indirektno dokazivanje *B. burgdorferi* sensu lato**

Indirektne metode za dokazivanje borelijske infekcije obuhvataju serološke testove pomoću kojih se dokazuju antitela specifična za borelije u serumu, likvoru ili sinovijalnoj tečnosti.

Infekcija borelijama izaziva kod bolesnika specifičan imuni odgovor stvaranjem specifičnih antitela klase IgM i IgG na različite antigene. Imuni odgovor je spor pa se IgM antitela pojavljaju između treće i šeste nedelje nakon infekcije, dok se antitela IgG klase pojavljaju kasnije, između prvog i trećeg meseca (11).

IgM i IgG antitela mogu se odrediti testovima indirektno imunofluorescencije (IFT), enzimskim imunotestovima (ELISA), imunoblot testom (Western blot), ili testovima hemaglutinacije. Nedostatci seroloških testova su nestandardizacija, kao i razlike u specifičnosti i osetljivosti pojedinih testova (11, 16).

**IFT test** kao antigen upotrebljava laboratorijski uzgojene borelije fiksirane na staklene pločice. Antitela iz uzorka se vežu sa antigenom i formiraju primarni kompleks na koji se posle ispiranja vežu sekundarna antitela (IgG ili IgM) koja su obeležena sa fluorohromom. Fluorohrom apsorbuju svetlost određene talasne dužine i emituju svetlost druge talasne dužine i na taj način su kompleksi vidljivi pod fluorescentnim mikroskopom. Nedostatak testa je subjektivnost pri tumačenju rezultata (89).

**ELISA test** je najčešće korišćen test za detekciju specifičnih antitela. Kao antigen mogu da se koriste solubilne ćelije borelija, prečišćeni proteini (npr. flagelin) ili rekombinantni antigeni kao što su p39, VlsE i drugi (16).

Za **imunoblot test**, koriste se rekombinantni antigeni borelija: p100, p39, p18, p41, OspA, OspB, OspC i VlsE. Ovaj test se odlikuje visokom specifičnošću (do 95%) i visokom osetljivošću (35, 90).

## 1.8 LEČENJE LAJMSKE BORELIOZE

Borelije lajmske borelioze su bakterije osetljive na antibiotike, i kod većine pacijenata terapija je uspešna uz primenu preporučenih antibiotika (91-93). U lečenju lajmske borelioze se koriste antibiotici koji su se prethodno pokazali efikasnim protiv borelija u *in vitro* studijama. Iako su *in vitro* studije pokazale, da su borelije lajmske borelioze osetljive na nekoliko antibiotika uključujući amoksicilin, azitromicin, ceftriakson, cefuroksim, doksiciklin, penicilin G, itd. (94-99), do danas je spektar antibiotika na koje su borelije zaista osetljive, definisan samo delimično.

*In vitro* testiranje osetljivosti *B. burgdorferi* sensu lato na antibiotike uvek je bilo ograničeno usled 1) malog broja izolata na raspolaganju u pojedinim studijama, 2) retkog izvođenja testa na sojevima neposredno izolovanih od pacijenata koji su rezistentni na terapiju i/ili 3) zbog toga što sama metodologija nije standardizovana. Neke *in vitro* studije navode postojanje razlike između pojedinih vrsta borelija u osetljivosti na antibiotike (96, 98, 100-102) kao i postojanje različitog efekta antibiotika na različite sojeve unutar iste vrste (102), dok neke druge studije negiraju postojanje razlika između vrsta (103).

Iako u većini slučajeva erythema migrans spontano nestaje, oralna antibiotska terapija se preporučuje kako bi se sprečila diseminacija i razvoj kasnijih komplikacija (Tabela 5). Doksiciklin, amoksicilin, fenoksimetilpenicilin i cefuroksim acetil su visoko efikasni antibiotici i koriste se kao prva linija lekova u terapiji različitih kliničkih manifestacija lajmske borelioze. Makrolidi, kao što je azitromicin su manje efikasni nego oralni antibiotici prve linije i primenjuju se kao druga linija lekova u terapiji lajmske borelioze (17, 92). Parenteralna antibiotska terapija je preporučena za lečenje kasne lajmske neuroborelioze. Preferirani antibiotik je ceftriakson jer prolazi krvno-moždanu barijeru i ima dugo poluvreme eliminacije, usled čega je moguća njegova primena jednom dnevno. Alternativni izbor za parenteralnu terapiju su cefotaksim i intravenski penicilin (17).

Uprkos antibiotskoj terapiji, kod nekih pacijenata se razvija hronična infekcija usled sposobnosti borelija da perzistiraju u latentnom stanju, a perzistencija borelija može se potvrditi njihovom izolacijom iz kliničkog materijala nakon antibiotske terapije (104), dok je kod nekih drugih pacijenata terapija uspešna tek nakon ponovljenog ili produženog davanja antibiotika (2).

Primena antibiotika je korisna u svim fazama lajmske borelioze i za sve kliničke manifestacije iako je najefikasnije u toku rane faze bolesti. Najefektivniji antibiotik i optimalna doza, kao i najoptimalnije trajanje terapije još uvek nisu precizno utvrđeni za mnoge kliničke manifestacije bolesti (93). Preporučena terapija za sve faze lajmske borelioze (rana lokalizovana, rana diseminovana i kasna faza lajmske borelioze) prikazana je u Tabeli 5.

**Tabela 5: Preporučena terapija kod pacijenta sa lajmskom boreliozom (17)**

		<b>Aplikacija</b>	<b>Trajanje</b>	<b>Komentar</b>
<b>Rana lokalizovana i rana diseminovana lajmska borelioz</b>	Erythema migrans	Oralna†‡	14 dana	10-dnevna terapija sa doksiciklinom je efikasna u SAD ali ne i sa drugim antibioticima.
	Meningitis/radikulopatija	Parenteralna§/doksiciklin‡	14 dana	Evropske studije pokazuju da je oralna terapija doksiciklinom efikasna kao i parenteralna.
	Zahvaćenost kranijalnih nerava	Oralna†‡	14 dana	Ograničeni dokazi o efikasnosti oralnih antibiotika u terapiji kranijalne neuropatije.
	Srčana oboljenja	Oralna†‡/parenteralna§	14 dana	Ograničeni dokazi o terapiji.
	Borelijski limfocitom	Oralna†‡	14 dana	Malo je dostupnih informacija o terapiji. Koristi se isti pristup kao i u terapiji erythema migrans. Nije zabeležen u Severnoj Americi.
<b>Kasna lajmska borelioz</b>	Artritis bez neuroloških oboljenja	Oralna	28 dana	Kod pacijenata se istovremeno primenjuju i NSAIL.
	Rekurentni artritis posle jedne doze oralne terapije	Oralna/parenteralna§	28 dana oralno ili 14-28 dana parenteralno	Parenteralna terapija kada pacijenti ne reaguju na oralnu.
	Antibiotik-refraktorni artritis	Simptomatska terapija¶	Po potrebi	Antibiotik-refraktorni lajmski artritis je definisan kao perzistentni sinovitis najmanje 2 meseca nakon završetka intravenske terapije sa ceftriaksonom
	Oboljenje centralnog/perifernog nervnog sistema	Parenteralna§	14-28 dana	Nema studija koje porede 14-dnevnu i 28-dnevnu terapiju.
	Acrodermatitis chronica atrophicans	Oralna	21-28 dana	Nema studija koje porede 21-dnevnu i 28-dnevnu terapiju. Retko se javlja u Severnoj Americi.

†Preferirana oralna terapija: doksiciklin (odrasli-100 mg dva puta dnevno; deca  $\geq 8$  godina starosti -4 mg/kg na dan podeljeno u dve doze dnevno [maksimalna doza=100 mg dva puta dnevno]); amoksicilin (odrasli-500 mg tri puta dnevno; deca-50 mg/kg na dan podeljeno u tri doze dnevno [maksimalna doza=500 mg tri puta dnevno]); fenoksimetilpenicilin (odrasli-500–1000 mg tri puta dnevno; deca-100 mg/kg na dan podeljeno u tri doze dnevno [maksimalna doza =1000 mg tri puta dnevno]); cefuroksim aksetil (odrasli-500 mg dva puta dnevno; deca-30 mg/kg na dan podeljeno u dve doze dnevno [maksimalna doza 500 mg dva puta dnevno]). Alternativna oralna terapija (za pacijente kod kojih se ne mogu primeniti doksiciklin, amoksicilin, fenoksimetilpenicilin, i cefuroksim acetil); azitromicin (odrasli-500 mg jednom dnevno; deca-10 mg/kg na dan [maksimalna doza =500 mg dnevno])-lek ima dugo poluvreme eliminacije iz organizma usled čega terapija traje kraće. ‡Primena doksiciklina je kontraindikovana kod dece mlađe od 8 godina, u trudnoći i tokom dojenja. §Preferirana parenteralna terapija: ceftriakson (odrasli-2 g intravenski jednom dnevno; deca-50-70 mg/kg na dan intravenski [maksimalna doza=2 g intravenski na dan]). Alternativa parenteralna terapija kod pacijenata sa normalnom renalnom funkcijom: cefotaksim (odrasli 2g svakih 8 sati intravenski); deca-150-200 mg/kg dnevno podeljeno u tri-četiri doze na dan intravenski [maksimalna doza=6 g na dan]); penicillin G (odrasli-18-24 miliona jedinica intravenski na dan podeljeno u šest dnevnih doza; deca-250 000-400 000 U/kg na dan podeljeno u šest dnevnih doza intravenski [maksimalna doza=18-24 miliona jedinica na dan]). ¶Simptomatska terapija podrazumeva primenu nesteroidnih antiinflamatornih lekova.

## 2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Pretpostavljamo, da MKP podloge koje se pod adekvatnim uslovima čuvaju više od jednog meseca, nemaju statistički značajan uticaj na rast i morfologiju borelija.
2. Pretpostavljamo, da niske (4 °C) i visoke (37 °C) temperature imaju statistički značajan uticaj na rast borelija dok temperature 23, 28 i 33 °C nemaju.
3. Pretpostavljamo, da je vrsta *B. burgdorferi* sensu stricto, *in vitro* osetljiva na testirane antibiotike koji se koriste u terapiji lajmske borelioze.

Cilj doktorske disertacije je bio *in vitro* proceniti i utvrditi uticaj različitih parametara na rast, razmnožavanje, preživljavanje i morfološke karakteristike tri patogene vrste borelija:

1. Proceniti i uporediti rast kao i morfologiju i pokretljivost tri različite vrste borelija (*B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi* sensu stricto) tokom kultivacije u MKP podlogama koje su čuvane pod adekvatnim uslovima (u firžideru na +4 °C) različit vremenski period (manje od 1 meseca do 12 meseci); odnosno, proceniti da li podloge starije od jednog meseca mogu obezbediti adekvatne uslove za kultivaciju borelija kako bi se olakšao rutinski laboratorijski rad smanjenjem učestalosti pravljenja podloga.
2. Proceniti i uporediti rast različitih sojeva vrsta *B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi* sensu stricto na pet različitih temperatura (4, 23, 28, 33 i 37 °C) i definisati najoptimalniju temperaturu za kultivaciju borelija.
3. Odrediti *in vitro* osetljivost evropskih sojeva vrste *B. burgdorferi* sensu stricto izolovanih iz humanog materijala u Sloveniji na najčešće korišćene antibiotike u

terapiji lajmske borelioze uz korišćenje produženog perioda inkubacije i strožijih kriterijuma u odnosu na ranije opisane za definisanje minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBK) testiranih antibiotika.



### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1 Sojevi *B. burgdorferi* sensu lato

U ovaj rad je uključen ukupno trideset jedan soj *B. burgdorferi* sensu lato (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto) koji su nasumično izabrani iz kolekcije sojeva Laboratorije za lajmsku boreliozu i leptospirozu (Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Ljubljani, Slovenija). Sojevi *B. burgdorferi* sensu lato (*B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi* sensu stricto) koji su korišćeni u istraživanju i vrsta humanog materijala iz koga su izolovani prikazani su u Tabeli 6.

**Tabela 6: Sojevi *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* i *Borrelia burgdorferi* sensu stricto koji su bili nasumično uključeni u istraživanje i vrsta humanog materijala iz koga su izolovani**

<i>B. afzelii</i>		<i>B. garinii</i>		<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto**	
Soj	Uzorak	Soj	Uzorak	Soj	Uzorak
(1) 2588/03*	krv	(1) 531/08	CST	(1) 2249/07*	koža
(2) 884/09	CST	(2) 553/08	CST	(2) 851/97	koža
(3) 941/08	koža	(3) 892/08	CST	(3) 953/03	krv
(4) 819/08	koža	(4) 932/09	CST	(4) 2092/06	krv
(5) 2498/08	CST	(5) 13745/05	CST	(5) 2093/06	koža
(6) 1131/08	koža	(6) 468/08	koža	(6) 1442/99	CST
(7) 1539/08	koža	(7) 1459/09*	CST	(7) 1506/08	koža
(8) 1170/09	krv	(8) 1881/08	koža	(8) 2130/06	koža
(9) 2357/08	koža	(9) 1291/06	koža	(9) 2213/06	koža
(10) 999/09	koža	(10) 2507/06	koža	(10) 1963/06	koža
				(11) 2157/06	koža

CST=cerebrospinalna tečnost

Svi sojevi su korišćeni za testiranje rasta borelija na različitim temperaturama. \*Sojevi koji su korišćeni za testiranje rasta borelija u MKP podlogama različite starosti.\*\*Sojevi *B. burgdorferi* sensu stricto koji su pored ostalog korišćeni i za testiranje *in vitro* osetljivosti borelija na antibiotike označeni su na sledeći način: koža 1 (soj 2157/06), koža 2 (soj 2213/06), koža 3 (soj 2249/07), koža 4 (1506/08), koža 5 (2130/06), koža 6 (851/97), CST (1442/99), krv 1 (2092/06), krv 2 (953/03).

### **3.2 Kultivacija i izolacija *B. burgdorferi* sensu lato iz kože, krvi i likvora**

Uzimanje uzoraka (koža, krv i likvor) od pacijenata, izvršeno je na Klinici za infektivne bolesti i grozničava stanja (Klinički centar Ljubljana, Slovenija) pre antibiotske terapije i pod aseptičnim uslovima. Svi uzeti uzorci obrađeni su u Laboratoriji za lajmsku boreliozu i leptospirozu (Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Ljubljani, Slovenija).

Biopsija kože je izvršena iz tipičnih lezija-erythema migrans, nakon njene dezinfekcije sa 70% alkoholom i davanja lokalne anestezije sa 2% ksilokainom. Uzorci kože su odmah inokulisani u MKP podloge i transportovani na sobnoj temperaturi u roku 24 sata do laboratorije (47).

Postupkom lumbalne punkcije, dobijeni su uzorci likvora (približno 1 mL) od pacijenata sa izraženim simptomima od strane centralnog nervnog sistema. Likvori su odmah nakon uzimanja inokulisani u MKP podloge i transportovani na sobnoj temperaturi u roku 24 sata do laboratorije (47, 73).

Pacijentima je izvađena krv iz kubitalne vene (5 mL), a uzorci su pri pacijentima stavljeni u sterilne epruvete sa antikoagulansom (natrijum citrat) i transportovani na sobnoj temperaturi do laboratorije, najkasnije u roku 24 sata. Krv sa antikoagulansom, centrifugirana je 5 minuta pri 800 obrtaja u minuti (obr/min), a po 1 mL supernatanta-plazme inokulisan je u više epruveta sa MKP podlogom (47).

Svi inokulisani uzorci inkubirani su na 33 °C; pri čemu inkubacija uzorka kože i likvora traje 9 nedelja a krvi 12 nedelja (47, 48, 73).

Potreban je dnevni pregled epruveta sa MKP podlogama u koje su inokulisani uzorci. Kada dođe do promena boje podloge iz crvenu u žutu, uzima se jedna kap iz epruvete i preparat se posmatra miroskopiranjem u tamnom polju. Promena boje podloge može da znači da je došlo do rasta borelija, kontaminacije ili promene pH vrednosti podloge. U slučaju kontaminacije ili promene pH vrednosti podloge potrebno je brzo reagovati jer borelije u takvim podlogama mogu brzo da liziraju.

Na svakih 7 do 10 dana vrši se subkultivacija, tako što se 1/4 stare podloge inokuliše u 3/4 nove sveže podloge. Približno dvadesetog i četrdesetog dana kultivacije, podloge se centrifugiraju (12 000 obr/min, 20 min, 22 °C). Nakon centrifugiranja odlije se supernatant a jedna kapljica sedimenta se posmatra mikroskopiranjem u tamnom polju nakon čega se sediment presejava u svežu podlogu. Posle 9 odnosno 12 nedelja inkubacije, podloge se ponovo centrifugiraju (12 000 obr/min, 20 min, 22 °C). Nakon centrifugiranja, supernatant se odlije, a jedna kapljica sedimenta se posmatra mikroskopiranjem u tamnom polju. Ako se u tamnom polju ne detektuju pokretljive borelije, to znači da je kultura negativna, i uzorak se odbacuje. U slučaju, da se u tamnom polju detektuju pokretljive borelije, zaključak je da je izolacija bila uspešna, odnosno da se radi o pozitivnoj kulturi. Borelije se kultivišu još neko vreme dok se ne dobije koncentracija od 20 do 30 borelija u vidnom polju. Nakon toga se pravi suspenzija, koja se sastoji od 2/3 podloge sa borelijama i 1/3 15% glicerola u brucela bujonu, i uzorak se skladišti na -80 do -70 °C za duži vremenski period.

### **3.3 Izolacija DNK borelija iz kulture metodom inkorporacije u gelu**

DNK borelija se izoluje iz kulture borelija koja je izrasla iz kliničkog materijala. DNK se izoluje metodom inkorporacije u gelu.

Pozitivna kultura kliničkog uzorka presejava se u 10 epruveta sa MKP podlogama. Subkulture se pregledaju mikroskopiranjem u tamnom polju prilikom čega se određuje broj i pokretljivost borelija. Takođe je važno da kulture budu čiste, odnosno da nisu kontaminirane. Podloge se združuju i centrifugiraju, a sediment se ispira sa TN puferom (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 1 M NaCl). Koncentracija borelija u uzorku se određuje spektrofotometrijski ( $A_{595} = 1$ ), i kada dostigne odgovarajuću vrednost, uzorak borelija se dobro pomeša sa jednakom količinom 2% agaroze koja ima nisku tačku topljenja, i dobijena mešavina se sipa u odgovarajuće kalupe. Kalupi se stavljaju u frižider dok se kockice ne stvrđnu, nakon čega se kockice izvade i stavljaju u pufer za lizu (1 M NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 8; 0,1 M EDTA; 0,5% Brij 58; 0,2% deoksiholat; 0,5% N-lauroilsarkozin; ribonukleaza 10 µg/mL; lizozim 1 mg/mL) i inkubiraju na šejkeru (80-100 obr/min) 24 sata na 37 °C. Kockice se jednom ispiraju sa TE puferom (10 mM Tris pH 8; 10 mM EDTA), stavljaju u pufer za digestiju (20 mM Tris-HCl pH 8,5; 466 mM EDTA;

1% N-lauroilsarkozin; 0,5 mg/mL proteinaza K) i inkubiraju na šejkeru (80-100 obr/min) 72 sata na 50 °C. Kockice se pet puta po jedan sat ispiraju sa TE puferom, nakon čega se ostavljaju u TE puferu na 4 °C do izvođenja elektroforeze. Prethodno opisani postupak je značajan jer se na kraju dobijuju kockice u kojima se nalazi čista borelijska DNK (47).

### **3.4 Identifikacija vrsta borelija pomoću PFGE**

Identifikacija sojeva borelija na nivou vrste izvodi se pomoću PFGE, nakon restrikcije celokupnog borelijskog genoma sa *MluI* restrikcionim enzimom (46).

Dobijeni restrikcioni fragmenti razdvajaju se elektroforezom u pulsirajućem električnom polju. Marker 50-1000 kb, koristi se za određivanje molekularne veličine restrikcionih DNK fragmenata Elektroforeza teče na 1% agaroznom gelu u 0,5 x TBE puferu (0,89 M Tris; 0,89 M borna kiselina; 0,02 M EDTA) (46). Uslovi elektroforeze su:

- pulsirajuće električno polje : 1 – 40 s
- jačina toka : 6 V/cm
- ugao: 120 °
- temperatura: 14 °C

Nakon završetka elektroforeze, gel se boji 20 min sa etidijum bromidom (0,5 µg/mL), ispirira se sa destilovanom vodom, gleda se pod UV-transluminatorom i dokumentuje sa polaroidnom kamerom. Pojedine vrste borelija i razlike unutar vrste koje se određuju na osnovu veličine fragmenata, prikazani su na Slici 4 i u Tabeli 7.

**Tabela 7: Restrikcioni fragmenti (engl. Large restriction fragment patterns – LRFP) borelijskog genoma, nakon restrikcije sa MluI restrikcionim enzimom (46)**

Vrsta		MluI- LRFP (kb)					
<i>B. afzelii</i>	Mla1	<b>440</b>	320			<b>90</b>	
	Mla2	<b>440</b>	350			<b>90</b>	
	Mla3	<b>440</b>	350	320		<b>90</b>	
<i>B. garinii</i>	Mlg1	260		<b>220</b>	140		<b>80</b>
	Mlg2	390		<b>220</b>	100		<b>80</b>
	Mlg3	225		<b>220</b>	170		100 <b>80</b>
	Mlg4	390		<b>220</b>	<b>80</b>		
	Mlg5	260		<b>220</b>	140		100 <b>80</b>
	Mlg6	225		<b>220</b>	170		<b>80</b>
	Mlg7	390	330		<b>220</b>	100	
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	Mlb1	410			160		<b>140</b>
	Mlb2	410			160		<b>140</b> 110
	Mlb8	310			160		<b>140</b> 110 100
	Mlb15	210		160	<b>140</b>	100 90	

### 3.5 Priprema MKP podloge

Svaka hranljiva podloga mora da zadovolji sledeće kriterijume 1) da sadrži sve potrebne materije za razvoj mikroorganizma koji se kultiviše 2) da bude sterilna 3) da ima određenu pH vrednost 4) da bude prozirna i bistra kako bi mogli da se prate rast i razmnožavanje bakterija i uoče eventualne promene koje mogu biti posledica njihove metaboličke aktivnosti ili kontaminacije sa drugim bakterijama.

Osnovna podloga (1 L) napravljena je na sledeći način: u menzuru zapremine 1L odmereno je 750 mL destilovane vode koja je prenešena u staklenu laboratorijsku posudu-okruglu tikvicu zapremine 1L u koju se nakon odmeravanja dodati sledeći sastojci: 3 g neopeptona, 6 g HEPES-a (N-2-hidroksietil-piperazin-N'-2-etan sulfonska kiselina), 0,7 g limunske kiseline, 3 g glukoze, 0,8 g piruvične kiseline, 0,4 g N-acetil-D-glukozamina i 2 g natrijum bikarbonata. Rastvaranje sastojaka u vodi izvršeno je mešanjem pomoću magnetne mešalice sve dok rastvor nije postao bistar (približno 1 sat). Nakon rastvaranja, dodato je 100 mL CMRL-1066 medijuma bez L- glutamina (56). Sastav CMRL-1066 (10x) prikazan je u Tabeli 8.

**Tabela 8: Sastojci (mg/L) CRML-1066 bez L-glutamina [GIBCO® CMRL Medium-1066 (10X), Paisley, United Kingdom] (105)**

Sastojak	Koncentracija (mg/L)	Sastojak	Koncentracija (mg/L)
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	2000	Holesterol	2
KCl	4000	Holin hlorid	5
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	2000	Folna kiselina	0,1
NaCl	6799	i-Inozitol	0,5
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1580	Nikotinska kiselina	0,25
		Niacinamid	0,25
		Para -amino benzoeva kiselina	0,5
L-alanin	250	Piridoksin hidrohlorid	0,25
L-arginin hidrohlorid	700	Riboflavin	0,1
L-aspartična kiselina	300	Tiamin hidrohlorid	0,01
L-cistein	1998,8	Kokarboksilaza	10
L-cistin	200	Koenzim A	25
L-glutaminska kiselina	750	2'-deoksiadenozin	100
L-valin	250	2'-deoksicitidin	100
Glicin	500	2'-deoksiguanozin	100
L-histidin x HCl x H <sub>2</sub> O	200	Uridin-5'-trifosfat (UTP)	10
Hidroksi L-prolin	100	Tween 80®	50
L-izoleucin	200	NAD (Nikotinamid adenin dinukleotid)	70
L-leucin	600	FAD (flavin adenin dinukleotid)	10
L-lizin hidrohlorid	700	D-glukoza (dekstroza)	10000
L-metionin	150	Glutation	-
L-fenilalanin	250	5-metil-deoksicitidin	1
L-prolin	400	Fenol crveno	200
L-serin	250	Na-acetat x 3H <sub>2</sub> O	830
L-treonin	300	Na-glukuronat x H <sub>2</sub> O	40
L-triptofan	100	Timidin	100
L-tirozin	400	NADP (Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat)	10
Askorbinska kiselina	500		
Biotin	0,1		
D-Ca-pantotenat	0,01		

Pomoću pH-metra izmerena je pH vrednost rastvora a dodavanjem 5M NaOH podešena je pH vrednost na 7,6 nakon čega je rastvor dopunjen sa destilovanom vodom do 1L.

Za sterilizaciju osnovne podloge (1L), primenjena je tehnika membranske filtracije-rastvor je filtriran kroz filter čija veličina pora iznosi 0,22 µm.

Jednom napravljena osnovna podloga može se čuvati 3 meseca na temperaturi  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pre pravljenja kompletne MKP podloge, osnovna podlogu prenetu je u frižider na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  kako bi se polako otopila.

Kako bi se sprečio rizik od kontaminacije, kompletne MKP podloge su pravljenje pod aseptičnim uslovima u komori sa laminiranim protokom vazduha i uz primenu sterilnog laboratorijskog pribora i posuđa.

Za pravljenje kompletne MKP podloge, u osnovnu podlogu zapremine 1 L, dodati su sledeći sastojci: 200 mL želatine (autoklavirana na  $115\text{ }^{\circ}\text{C}/15\text{min}$ ), 72 mL zečijeg seruma (inaktiviran na  $56\text{ }^{\circ}\text{C}/30\text{ min}$ ) i 35 mL goveđeg serumskog albumina. Sastojci u količinama koje su potrebne za pravljenje kompletne MKP podloge i proizvođači sastojaka prikazani su u Tabeli 9.



**Tabela 9: Sastojci u količinama koje su potrebne za pravljenje kompletne tečne modifikovane Kelly-Pettenkofer-ove podloge i proizvođači sastojaka (15, 57)**

Sastojci	Proizvođač	Količina
Osnovna podloga		
Destilovana voda	Institut za mikrobiologiju i imunologiju*	900 mL
Neopepton	BD, Heidelberg, Germany	3 g
HEPES	Sigma Aldrich, Seelze, Germany	6 g
Limunska kiselina	Merck, Darmstadt, Germany	0,7 g
D- glukoza (dekstroza)	BD Difco, Heidelberg, Germany	3 g
Piruvična kiselina	Sigma Aldrich, Seelze, Germany	0,8 g
N-acetil-D-glukozamin	Sigma Aldrich, Seelze, Germany	0,4 g
Natrijum bikarbonat	Sigma Aldrich, Seelze, Germany	2 g
CMRL-1066	Gibco, Paisley, United Kingdom	100 mL
Sastojci za pravljenje kompletne MKP podloge		
7% želatina	Merck, Darmstadt, Germany	200 mL
Zečiji serum	Gibco, Paisley, United Kingdom	72 mL
35% goveđi serumski albumin	Sigma Aldrich, Seelze, Germany	35 mL

\*Medicinski fakultet, Univerzitet u Ljubljani, Slovenija

Napravljena kompletna MKP podloga je razdeljena u sterilne epruvete zapemine 7 mL koje su provučene kroz plamen plinskog plamenika i na kraju zatvorene sterilnim gumenim čepovima. Prilikom podele podloga u epruvete, primenjena je tehnika membranske filtracije; rastvor je filtriran kroz 0,22 µm filter a proces je urađen u komori sa laminiranim protokom vazduha.

Svaka nova serija MKP podloga, testirana je na sterilnost, tako što su se epruvete sa sveže napravljenim podlogama ostavljale 24 sata u termostatu na 33 °C. U slučaju kontaminacije MKP podloga, epruvete su odstranjene. U sterilnim podlogama, kontrolisan je rast borelija tako što je u pojedinačne podloge inokulisan po jedan soj svake vrste borelija (*B. afzelii*, *B.*

*garinii* i *B. burgdorferi sensu stricto*). Nakon inokulacije, epruvete su inkubirane na 33 °C u vremekom periodu 3 do 5 dana. Nakon inkubacije, uzimala se po jedna kap kulture i posmatrala mikroskopiranjem u tamnom polju kako bi se procenilo da li određena serija MKP podloga na adekvatan način podržava rast i razmnožavanje borelija. Svaki korak u postupku pripreme MKP podloga bio je zapisan.

Jednom napravljena MKP podloga može da se koristi jedan mesec od dana kada je napravljena, ako se prethodno čuva u frižideru na temperaturi 4 °C.

U ovom radu, kontinuirano su pravljene sveže MKP podloge kako bi se obezbedile dovoljne količine borelija za eksperimentalni rad.

### **3.6 Neubauer-ova metoda**

Za određivanje broja borelija/mL, korišćena je Neubauer-ova komora za brojanje (engl. Neubauer improved counting chamber) proizvođača BRAND GMBH & CO KG, Wertheim, Nemačka. Komora se sastoji od debelog predmetnog stakla na kome su urezana 4 žljeba a između kojih se nalaze 3 polja. Srednje polje je tako izbrušeno da je za 0,1 mm niže od bočnih polja. Ono je podeljeno na dva dela jednim poprečnim žljebom. U oba dela srednjeg polja urezana je mrežica za brojanje ćelija. Mrežica se sastoji od kvadrata, a vidljiva je samo pod mikroskopom. Postoji 9 velikih kvadrata, a površina svakog od njih iznosi 1 mm<sup>2</sup>. Veliki kvadrati su u uglovima podeljeni na 16 manjih kvadrata. Centralni veliki kvadrat je podeljen na 25 manjih kvadrata, a površina svakog od njih je 0,04 mm<sup>2</sup>. Svaki manji kvadrat podeljen je na 16 malih kvadrata površine 0,0025 mm<sup>2</sup>. Dubina komore je 0,1 mm.

### 3.6.1 Postupak brojanja

Broj borelija/mL izračunat je pomoću sledeće formule:

$$\text{Broj ćelija} \times 10^3/\text{mL} = \text{izbrojane ćelije} / A (\text{mm}^2) \times D (\text{mm}) \quad (1)$$

gde A predstavlja površinu polja (5 grupa kvadrata) što je ekvivalentno 0,2 mm<sup>2</sup>, a D predstavlja dubina polja (dubina Neubauer-ove komore) što je ekvivalentno 0,1 mm.

Na pola površine Neubauer-ove komore za brojanje, prvo se stavljalo pokrovno staklo i nakon toga 10 µL uzorka. Nakon stavljanja uzorka, pokrovno staklo se guralo kako bi se prekrila cela površina komore i na taj način sprečila mogućnost da se naprave mehurići vazduha. Tečnost se kapilarnim putem raspoređivala unutar komore i nakon toga uzorak je bio spreman za mikroskopiranje u tamnom polju pod ukupnim uvećanjem 400x. Ćelije su se brojale u 5 manjih kvadrata (od ukupno 25), površina svakog od njih je 0,04 mm<sup>2</sup>, a njihova ukupna površina iznosi 0,2 mm<sup>2</sup>. Množenjem ukupne površine kvadrata (0,2 mm<sup>2</sup>) u kojima je određen broj ćelija, sa dubinom komore 0,1 mm, dobijen je koeficijent 0,02 mm<sup>3</sup>. Broj izbrojanih ćelija je podeljen sa koeficijentom 0,02 mm<sup>3</sup> i dobijen je broj ćelija/mm<sup>3</sup>; odnosno pošto je jedan mm<sup>3</sup> ekvivalentan jednom µL, dobijen je broj ćelija/µL. Kako se 1000 µL nalazi u jednom mL, konačni broj ćelija je izražen kao broj ćelija x 10<sup>3</sup>/mL.

### 3.7 Kultivacija borelija u MKP podlogama različite starosti

Tokom proteklih godinu dana, 2 do 4 puta mesečno, pravljene su MKP podloge, koje su bile sortirane i čuvane u frižideru na +4 °C.

Za svaki soj posebno, korišćeno je 32 MKP podloge različite starosti: po jedna MKP podloga stara manje od jednog meseca, 1 mesec i 12 meseci, po dve podloge stare 2, 3, 8, 9 i 11 meseci, 3 podloge stare 7 meseci i po 4 podloge stare 4, 5, 6, i 10 meseci.

Iako smo želeli da za svaki soj imamo po 4 podloge svake starosti, zbog potrebe rutinskog rada to nismo mogli da obezbedimo.

U istraživanje je uključen po jedan soj borelija koji su nasumično izabrani: soj 2588/03 *B. afzelii* (izolovan iz krvi) soj 1459/09 *B. garinii* (izolovan iz likvora) i soj 2249/07 *B. burgdorferi* sensu stricto (izolovan iz kože). Izabrani sojevi su prikazani u Tabeli 6.

Pre izvođenja eksperimenta, sojevi borelija koji su bili smrznuti u 15% glicerolu u brucela bujonu na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , otopljeni su na sobnoj temperaturi, inokulisani u sveže MKP podloge (epruvete od 7 mL) i inkubirani u termostatu na temperaturi  $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Iz epruveta se svaki dan uzimala po jedna kap i mikroskopiranjem u tamnom polju pratio se i procenjivao broj borelija, njihova morfologija i pokretljivost. Borelije su se razmnožavale do postizanja konačne gustine od  $10^6$  bakterija/mL. Nakon što je pomoću Neubaur-ove komore za brojanje određena početna koncentracija sojeva ( $13 \times 10^6$  ćelija/mL za *B. afzelii*,  $9 \times 10^6$  ćelija/mL za *B. garinii* i  $18 \times 10^6$  ćelija/mL za *B. burgdorferi* sensu stricto) iz epruveta su uzete identične količine (10  $\mu\text{L}$ ) i presejane u epruvete od 7 mL sa MKP podlogama različite starosti. Nakon inokulacije, u MKP podlogama su bile sledeće početne koncentracije: oko  $1,8 \times 10^4$  ćelija/mL za *B. afzelii*,  $1,2 \times 10^4$  ćelija/mL za *B. garinii* i  $2,5 \times 10^4$  ćelija/mL za *B. burgdorferi* sensu stricto. Broj borelija po mL određen je metodom brojanja. Epruvete su inkubirane 5 dana na  $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ , nakon čega je pomoću Neubauer-ove komore za brojanje u kombinaciji sa mikroskopiranjem u tamnom polju određen broj borelija/mL, njihova pokretljivost i morfologija.

Postupak presejavanja i uzimanja količine od 10  $\mu\text{L}$  iz epruveta za Neubauer-ovu komoru, izvršeno je u komori sa laminirnim protokom vazduha i uz upotrebu sterilnog laboratorijskog pribora, kako bi se sprečio rizik od kontaminacije.

### **3.8 Kultivacija borelija na različitim temperaturama**

U istraživanje je uključeno ukupno trideset jedan soj *B. burgdorferi* sensu lato. Sojevi su nasumično izabrani: 10 različitih sojeva *B. afzelii* (6 izolovanih iz kože, 2 iz krvi i 2 iz likvora), 10 različitih sojeva *B. garinii* (4 izolovana iz kože i 6 izolovanih iz likvora) i 11 različitih sojeva *B. burgdorferi* sensu stricto (8 izolovanih iz kože, 2 iz krvi i jedan iz likvora). Izabrani sojevi su prikazani u Tabeli 6.

Kulture različitih sojeva borelija su bile smrznute u 15% glicerolu u brucela bujonu na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nakon odmrzavanja na sobnoj temperaturi, svaki soj posebno presejan je u sveže MKP

podloge (epruvete od 7 mL) koje su inkubirane u termostatu na temperaturi 33 °C. Iz epruveta se svaki dan uzimala po jedna kap i posmatrala mikroskopiranjem u tamnom polju, kako bi se proverio i ocenio broj borelija, njihova morfologija i pokretljivost. Pomoću Neubauer-ove komore za brojanje u kombinaciji sa mikroskopiranjem u tamnom polju, određen je broj borelija/mL i procenjena je njihova morfologija i pokretljivost.

Nakon što je u svakoj pojedinačnoj epruveti određen broj borelija/mL, i procenjena njihova morfologija i pokretljivost, iz svake epruvete sa različitim sojem, uzete su identične količine (50 µL) iste koncentracije borelija i inokulisane u pet novih epruveta sa svežim MKP podlogama (7 mL) u kojima je određen početni broj borelija/mL pomoću Neubauer-ove komore za brojanje u kombinaciji sa mikroskopiranjem u tamnom polju. Epruvete su inkubirane na 5 različitih temperatura: prva epruveta je inkubirana u frižideru na 4 °C, druga na 23 °C (sobna temperatura, epruveta je bila zaštićena od sunčeve svetlosti), treća u termostatu na 28 °C, četvrta u termostatu na 33 °C i peta takođe u termostatu na 37 °C. Sve epruvete inkubirane su u istom vremenskom periodu od 3 dana, nakon čega je u svakoj epruveti posebno određen konačni broj borelija/mL pomoću Neubauer-ove komore za brojanje u kombinaciji sa mikroskopiranjem u tamnom polju. Ovaj postupak je izveden za svaki soj posebno, i za svaki soj je ponovljen 10 puta.

Za kultivaciju borelija na različitim temperaturama, korišćene su manje i veće početne koncentracije, čiji je ukupan raspon bio:  $1 \times 10^5 - 2,5 \times 10^7$  ćelija/mL za *B. afzelii*,  $3 \times 10^5 - 5 \times 10^7$  ćelija/mL za *B. garinii* i  $9,5 \times 10^5 - 4,8 \times 10^7$  ćelija/mL za *B. burgdorferi* sensu stricto. Nakon inokulacije ponovo je određen broj ćelija/mL (početni broj ćelija/mL) čiji je ukupan raspon bio:  $7,14 \times 10^2 - 1,79 \times 10^5$  za *B. afzelii*,  $2,14 \times 10^3 - 3,57 \times 10^5$  za *B. garinii* i  $6,79 \times 10^3 - 3,43 \times 10^5$  za *B. burgdorferi* sensu stricto.

Presejavanje različitih sojeva borelija i uzimanje iz epruveta za Neubauer-ovu komoru, izvršeno je u komori sa laminirnim protokom vazduha i uz upotrebu sterilnog laboratorijskog pribora, kako bi se sprečio rizik od kontaminacije.

### **3.9 *In vitro* ispitivanje osetljivosti *B. burgdorferi* sensu stricto na antibiotike**

Ispitana je *in vitro* osetljivost devet kliničkih izolata *B. burgdorferi* sensu stricto: 2157/06 (koža 1), 2213/06 (koža 2), 2249/07 (koža 3), 1506/08 (koža 4), 2130/06 (koža 5), 851/97 (koža 6), 2092/06 (krv 1), 953/03 (krv 2) i 1442/99 (CST) na šest različitih antibiotika (Tabela 6). Svi sojevi su bili izolovani od bolesnika pre antibiotske terapije. U istraživanje su uključeni antibiotici koji se primenjuju u terapiji lajmske borelioze (2, 91, 93), kao i amikacin koji se u dosadašnjim studijama pokazao neefikasnim protiv borelija (94, 98).

U ispitivanje su uključeni sledeći antibiotici: cefriakson (Lendacin®, Lek, Ljubljana, Slovenia), cefuroksim natrijum (Zinacef®, GlaxoSmithKline, Ljubljana, Slovenia), azitromicin (Azithromycin, Sigma-Aldrich, Micro+Polo D.O.O., Maribor, Slovenia), amikacin, doksiciklin i amoksicilin (Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu). Svi antibiotici su dobijeni u obliku praška koji su rastvoreni i pripremljeni prema upustvima proizvođača.

Na osnovu podataka iz dostupne literature (94-101, 103, 106) određen je opseg koncentracija antibiotika, odnosno u okviru svakog opsega postojao je niz od 10 dvostrukih razblaženja. Opsezi koncentracija antibiotika i koncentracije antibiotika u testiranim kulturama prikazani su u Tabeli 10.

**Tabela 10: Opsezi koncentracija antibiotika i koncentracije antibiotika u testiranim kulturama, izabrani na osnovu podataka iz literature (94-101, 103, 106) za testiranje in vitro osetljivosti *Borrelia burgdorferi sensu stricto* na antibiotike**

<b>Amoksisilin 0,125 – 64 mg/mL</b>									
0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
<b>Azitromicin 0,0017 – 0,88 mg/mL</b>									
0,0017	0,0035	0,0069	0,0138	0,027	0,055	0,11	0,22	0,44	0,88
<b>Doksiciklin 0,125 – 64 mg/mL</b>									
0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
<b>Cefuroksim 0,063 – 32 mg/mL</b>									
0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32
<b>Ceftriakson 0,016 – 8 mg/mL</b>									
0,016	0,032	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
<b>Amikacin 4 – 2048 mg/mL</b>									
4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048

Kako bi konačne koncentracije antibiotika u kulturi odgovarale zahtevanim koncentracijama, pri izračunu za pravljenje konačnih rastvora antibiotika uzeta je u obzir konačna zapremina kulture nakon dodatka antibiotika: 200 µL kulture + 10 µL rastvora antibiotika=210 µL. Koncentracije antibiotika u konačnim rastvorima izračunate su pomoću sledeće formule :

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad (2)$$

gde  $C_1$  predstavlja koncentraciju rastvora antibiotika a  $C_2$  konačnu, zahtevanu koncentraciju antibiotika nakon dodavanja u kulturu;  $V_1$  predstavlja zapreminu rastvora antibiotika a  $V_2$  konačnu zapreminu kulture nakon dodavanja rastvora antibiotika (210 µL).

Izračunate koncentracije antibiotika u konačnim rastvorima prikazane su u Tabeli 11.

**Tabela 11: Koncentracije antibiotika u konačnim rastvorima koje su izračunate i napravljene**

<b>Amoksisilin 0,125 – 64 mg/mL</b>									
2,625	5,25	10,5	21	42	84	168	336	672	1344
<b>Azitromicin 0,0017 – 0,88 mg/mL</b>									
0,036	0,074	0,145	0,290	0,578	1,155	2,310	4,620	9,240	18,480
<b>Doksiciklin 0,125 – 64 mg/mL</b>									
2,625	5,25	10,5	21	42	84	168	336	672	1344
<b>Cefuroksim 0,063 – 32 mg/mL</b>									
1,313	2,625	5,25	10,5	21	42	84	168	336	672
<b>Ceftriakson 0,016 – 8 mg/mL</b>									
0,338	0,656	1,313	2,625	5,25	10,5	21	42	84	168
<b>Amikacin 4 – 2048 mg/mL</b>									
84	168	336	672	1344	2688	5376	10752	21504	43008

S obzirom, da su se u seriji rastvora svakog pojedinačnog antibiotika, zahtevane koncentracije povećavale sa faktorom 2, serije rastućih koncentracija antibiotika napravljene su razblaživanjem većih koncentracija na polovinu, počevši od najveće koncentracije pojedinačnog antibiotika.

Kao rastvarač za sve antibiotike, upotrebljena je prečišćena voda, osim za azitromicin koji je rastvoren u 0,1 M fosfatnom puferu. Za pravljenje serija dvostrukih razblaženja antibiotika koji su dodati u kulture, upotrebljena je prečišćena voda.

Napravljeni rastvori sterilisani su tehnikom membranske filtracije (korišćeni su filtri sa porama 0,22  $\mu\text{m}$ ) i razdeljeni su u sterilne fiole zapremine 1,5 mL, označeni su i čuvani u zamrzivaču na -20 °C. Pre izvođenja eksperimenta, fiole su izvađene iz zamrzivača i ostavljene na sobnoj temperaturi kako bi se rastvori antibiotika otopili (107).

Postupak rastvaranja antibiotika prema uputstvima proizvođača, pravljenje serija dvostrukih razblaženja i razdeljivanje napravljenih rastvora u fiole, urađeni su pod aseptičnim uslovima, u komori sa laminiranim protokom vazduha i uz upotrebu sterilnog laboratorijskog pribora kako bi se sprečio rizik od kontaminacije.



Za određivanje MIK antibiotika korišćena je bujon mikrodilucijska metoda antibiograma odnosno bujon makrodilucijska metoda antibiograma za određivanje MBK (94, 96, 97, 99, 106, 107).

### **3.9.1 Bujon mikrodilucijska metoda antibiograma i određivanje MIK**

Za određivanje MIK, korišćene su sterilne plastične mikrotitracione ploče sa 96 bazena (8 redova i 12 kolona), proizvođača BRAND GMBH & CO KG, Nemačka. Kompletno testiranje sprovedeno je pod aspetičnim uslovima u komori sa laminiranim protokom vazduha i uz korišćenje sterilnog laboratorijskog pribora, kako bi se sprečio rizik od kontaminacije.

Prva kolona je služila kao negativna kontrola; svaki bazen prve kolone punio se sa 200  $\mu$ L MKP podloge. U sve ostale kolone, dodato je po 200  $\mu$ L kulture ispitivanog soja *B. burgdorferi* sensu stricto, čija je konačna gustina bila  $10^5$  ćelija/mL. Druga kolona je bila pozitivna kontrola, samo kultura bez antibiotika. Od treće do dvanaeste kolone dodato je po 10  $\mu$ L rastvora antibiotika u opadajućim koncentracijama-od najveće do najmanje; odnosno u trećoj koloni se nalazila najveća a u dvanaestoj koloni najmanja koncentracija antibiotika.

Mikrotitracione ploče zatvorene su sa plastičnim poklopcem, stavljene u Gas-Pak posudu u koju je prethodno stavljen komercijalni anaerobni generator kako bi se obezbedili anaerobni uslovi, i anaerobni indikator (BD, Heidelberg, Germany). Anaerobni generator predstavlja vreću za stvaranje gasova koja sadrži neorganski ugljenik, aktivni ugalj, askorbinsku kiselinu i vodu. Za vreme inkubacije, anaerobni generator brzo smanjuje koncentraciju kiseonika u Gas-Pak posudi (u roku 2 sata stvara se anaerobna atmosfera sa manje od 1% kiseonika) a u isto vreme neorganski ugljenik stvara ugljen-dioksid. Nakon što su u Gas-Pak posudu stavljene mikrotitracione ploče, anaerobni generator i anaerobni indikator, posuda je zatvorena i inkubirana u termostatu 72 sata na 33 °C. Indikator je potvrdio postojanje anaerobnih uslova. Nakon inkubacije, iz svakog bazena posebno uzeta je po jedna kap, i preparati su posmatrani mikroskopiranjem u tamnom polju (400x) kako bi se odredilo prisustvo borelija i njihova pokretljivost, u poređenju sa pozitivnom kontrolom. Za određivanje broja borelija/mL korišćena je Neubauer-ova komora za brojanje u kombinaciji sa mikroskopiranjem u tamnom polju.

Svaki antibiotik posebno ispitan je za svaki pojedinačni soj *B. burgdorferi* sensu stricto, pri čemu je za jedan antibiotik korišćeno 3-4 reda mikrotitracionih ploča.

MIK je definisana kao najniža koncentraciju antibiotika, pri kojoj borelije nisu bile pokretljive ili su bile vrlo slabo pokretljive, a njihov broj je bio smanjen (94, 99). Određene su koncentracije antibiotika koje su potrebne za inhibiciju 50% sojeva (MIK<sub>50</sub>) i koncentracije koje su potrebne za inhibiciju 90% sojeva (MIK<sub>90</sub>). Pošto u literaturi ne postoje podaci za prelomne tačke (engl. breakpoint) MIK antibiotika za *Borrelia* spp. korišćene su vrednosti prelomnih tačaka za MIK u skladu sa CLSI (108) kako bi se definisala osetljivost naših sojeva *B. burgdorferi* sensu stricto na testirane antibiotike.

### **3.9.2 Bujon makrodilucijska metoda antibiograma i određivanje MBK**

Za određivanje MBK, uzeto je po 20 µL iz sledećih pet bazena od MIK u kojima su se nalazile veće koncentracije antibiotika i preneto u epruvete (7 mL) u kojima su se nalazile sveže napravljene MKP podloge. Epruvete su inkubirane tri nedelje na 33 °C. Nakon inkubacije, epruvete smo dobro protresli, iz svake epruvete uzeta je po jedna kap, i preparat je posmatran mikroskopiranjem u tamnom polju kako bi se detektovale borelije. Epruvete koje su bile negativne na borelije, inkubirane su još tri nedelje na 33 °C i nakon toga ponovljen je postupak za detektovanje borelija. MBK je definisana kao najniža koncentracija antibiotika pri kojoj se borelije nisu mogle detektovati u 50-100 vidnih polja pri ukupnom uvećanju 400x (94, 98).

### **3.10 Statistička analiza**

Svi rezultati su analizirani upotrebom statističkog softvera SigmaPlot 11,0 (Systat. Software Inc., Richmond, CA, USA) i predstavljeni grafički; nivo značajnosti za sve statističke testove je bio  $P < 0,05$ . Za kreiranje grafika takođe je korišćen i MS Excel 2007.

#### **3.10.1 Rast borelija u MKP podlogama različite starosti**

Za svaki soj posebno (*B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi* sensu stricto) korišćeno je 1-4 MKP podloge svake starosti. Za utvrđivanje statistički značajne razlike između broja ćelija/mL unutar MKP podloga svake starosti, korišćen je t- test za jedan uzorak.

Za ispitivanje povezanosti između starosti podloga i rasta borelija posle pet dana inkubacije na 33 °C korišćen je Spearman-ov koeficijent korelacije ( $\rho$ ). Jednostruka linearna regresija sprovedena je kako bi se ocenio uticaj vremena čuvanja podloga na rast borelija.

### **3.10.2 Rast borelija na različitim temperaturama**

Za poređenje rasta sojeva unutar tri testirane vrste (*B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi* sensu stricto), za poređenje rasta svake vrste posebno na pet različitih temperatura (4, 23, 28, 33 i 37 °C) kao i za poređenje rasta različitih vrsta borelija na istim temperaturama posle tri dana inkubacije, korišćeni su neparametrijski testovi: Kruskal-Wallis-ov i Mann-Whitney-ev test.

Za ispitivanje povezanosti između početnog i konačnog broja borelija/mL (rast je definisan kao konačni broj ćelija/mL) posle pet dana inkubacije na pet različitih temperatura korišćen je Spearman-ov koeficijent korelacije ( $\rho$ ).

## 4. REZULTATI

Rezultati su dobijeni testiranjem ukupno trideset jednog različitog soja *B. burgdorferi* sensu lato iz tri različite studije.

### 4.1 Uticaj starosti MKP podloga na rast, razmnožavanja, preživljavanje i morfologiju borelija

U svakoj epruveti posebno, određen je broj borelija/mL (posle pet dana inkubacije na 33 °C) za svaki mesec i za svaki soj borelija. Razlika između broja borelija/mL unutar MKP podloga svake starosti, utvrđena je primenom t-testa za jedan uzorak. Razlika između broja borelija/mL nije određena u podlogama starosti <1, 1 i 12 meseci jer je postajala samo jedna epruveta za svaki soj posebno (Tabela 12).

**Tabela12: Razlike između broja ćelija/mL (*Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia burgdorferi sensu stricto*) unutar modifikovanih Kelly-Pettenkofer-ovih podloga različite starosti**

Starost podloga (meseci)	Broj epruveta*	<i>B. afzelii</i> t-test <i>P</i> vrednost	<i>B. garinii</i> t-test <i>P</i> vrednost	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i> t-test <i>P</i> vrednost
12	1	-	-	-
11	2	0,321	0,090	0,192
10	4	0,063	0,152	<b>0,020</b>
9	2	0,138	< 0,001	0,126
8	2	0,464	0,126	0,282
7	3	0,086	0,089	0,112
6	4	<b>0,005</b>	0,064	<b>0,028</b>
5	4	<b>0,019</b>	<b>0,018</b>	<b>0,041</b>
4	4	<b>0,018</b>	<b>0,025</b>	<b>0,037</b>
3	2	0,070	<b>0,012</b>	0,136
2	2	0,066	0,070	0,395
1	1	-	-	-
<1	1	-	-	-

\*Razlika između broja ćelija/mL unutar MKP podloga svake starosti utvrđena je primenom t- testa za jedan uzorak. Za podloge koje su bile stare manje od jednog meseca, jedan i dvanaest meseci, nije korišćen t-test jer je na raspolaganju postojala samo po jedna epruveta za svaki soj posebno.

Primenom t-testa utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između broja *B. afzelii*/mL unutar podloga starosti 4, 5 i 6 meseci, između broja *B. garinii*/mL unutar podloga starosti 3, 4 i 5 meseci, i između broja *B. burgdorferi sensu stricto*/mL unutar podloga starosti 4, 5, 6 i 10 meseci ( $P < 0,05$ ), nakon čega je izračunata medijana broja ćelija/mL u svakoj od podloga navedene starosti. Unutar podloga ostalih starosti, utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika između broja borelija/mL ( $P > 0,05$ ), nakon čega je izračunata aritmetička sredina broja ćelija/mL u svakoj podlozi posebno.

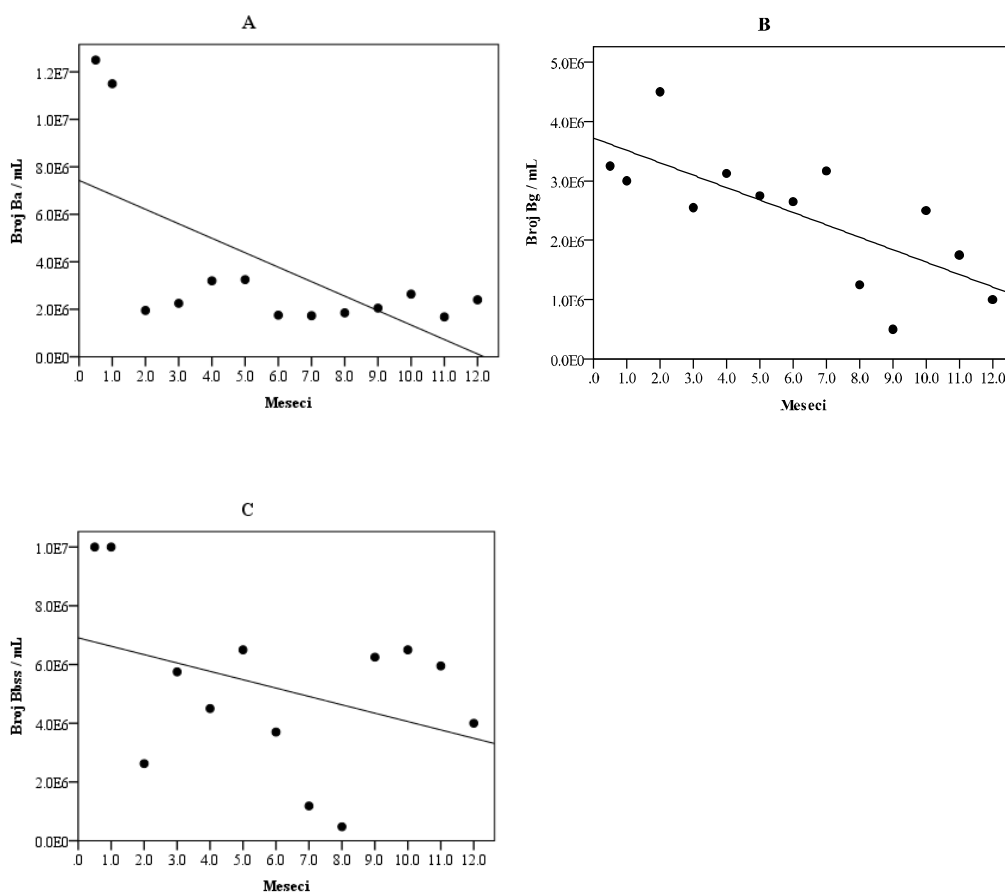
Vrednosti: broj borelija/mL u podlogama starosti <1, 1 i 12 meseci, kao i aritmetičke sredine ili medijane broja borelija/mL (zavisno od  $P$  vrednosti) u podlogama ostalih starosti, korišćene su za dva statistička testa koja su usledila: Spearman-ov koeficijent korelacije ( $\rho$ ) i jednostruka linearna regresija.

MKP podloge različite starosti (manje od jednog meseca do 12 meseci) imale su uticaj na rast i razmnožavanje borelija. Sa starošću podloga, broj sve tri vrste borelija se smanjivao. Za sve tri vrste borelija, najbolji rast (rast je definisan kao broj ćelija/mL) ustanovljen je u sveže pripremljenim MKP podlogama (MKP podloge koje su bile stare manje od jednog meseca), dok je najslabiji rast procenjen u podlogama koje su bile stare 12 meseci. Utvrđena je statistički značajna negativna povezanost između vremena čuvanja podloga i rasta *B. afzelii* ( $\rho = -0,511$ ;  $P = 0,047$ ), kao i između vremena čuvanja podloga i rasta *B. garinii* ( $\rho = -0,786$ ;  $P = 0,001$ ); negativna povezanost je takođe utvrđena između vremena čuvanja podloga i rasta *B. burgdorferi sensu stricto*, ali nije bila statistički značajna ( $\rho = 0,275$ ;  $P = 0,362$ ).

Rezultati linearne regresije su pokazali, da je postojao statistički značajan negativni uticaj vremena čuvanja podloga na rast *B. afzelii* ( $F = 7,26$ ;  $P = 0,021$ ) i *B. garinii* ( $F = 13,25$ ;  $P = 0,004$ ), ali ne i na rast *B. burgdorferi sensu stricto* ( $F = 1,822$ ;  $P = 0,204$ ). Sa vremenom čuvanja podloga objašnjeno je 34,3% [prilagođeni koeficijent determinacije ( $R^2$ ) 0,343] rasta *B. afzelii*, 50,5% ( $R^2$  0,505) rasta *B. garinii*, i 6,4% ( $R^2$  0,064) rasta *B. burgdorferi sensu stricto*.

Rezultati su prikazani na Slici 8 A-C.

Starost MKP podloga nije uticala na morfologiju i pokretljivost borelija. Sve tri vrste borelija, koje su kultivisane 5 dana na 33° C u MKP podlogama različite starosti, bile su pokretljive, male i spiralne.



**Slika 8 A-C: Rast (broj ćelija /mL) tri različite vrste borelija u modifikovanim Kelly-Pettenkoferovim podlogama koje su bile stare manje od jednog meseca do 12 meseci; A: *Borrelia afzelii* (Ba); B: *Borrelia garinii* (Bg); C: *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (Bbss)**

## **4.2 Uticaj temperature na rast, razmnožavanje i preživljavanje borelija**

Ispitan je rast deset sojeva *B. afzelii*, deset sojeva *B. garinii* i jedanaest sojeva *B. burgdorferi* sensu stricto na pet različitih temperatura.

### **4.2.1 Analiza deset pojedinačnih sojeva *B. afzelii***

Da bi se utvrdilo da li je 33 °C najoptimalnija temperatura za rast svakog pojedinačnog soja *B. afzelii* (sojevi su označeni od 1-10 i prikazani u Tabeli 6) korišćeni su Kruskal-Wallis-ov i Mann-Whitney-ev test (nivo značajnosti  $P < 0,05$ ).

Kruskal-Wallis-ov test je za svaki pojedinačni soj *B. afzelii* pokazao, da postoji statistički značajna razlika u vrednostima medijana, odnosno za svaki pojedinačni soj utvrđeno je, da postoji statistički značajna razlika između rasta na pet različitih temperatura (4, 23, 28, 33 i 37 °C). Rezultati su prikazani kao medijana, 25-ti percentil (P25) i 75-ti percentil (P75) (Tabela 13). Za sojeve 2-10, najveće vrednosti medijana utvrđene su na 33 °C, a za soj 1 najveća vrednost medijane utvrđena je na 37 °C. Mann-Whitney-ev test je za sojeve 2-7 i soj 10 pokazao, da postoji statistički značajna razlika između rasta na: 33 i 4 °C, 33 i 23 °C, 33 i 28 °C kao i između rasta na 33 i 37 °C (sve  $P$  vrednosti su bile  $< 0,05$ ). Za 7/10 sojeva *B. afzelii* (sojevi 2-7 i soj 10) najoptimalnija temperatura za rast posle tri dana inkubacije je bila 33 °C.

**Tabela 13: Konačni broj ćelija/mL deset pojedinačnih sojeva *Borrelia afzelii* na pet različitim temperatura (4, 23, 28, 33 i 37 °C)**

<b>Rast (konačni broj <i>B. afzelii</i>/mL) medijana (P25-P75)*</b>						
<b>Soj</b>	<b>4 °C</b>	<b>23 °C</b>	<b>28 °C</b>	<b>33 °C</b>	<b>37 °C</b>	<b>P</b>
1	0 (0-0)	75000 (50000-150000)	500000 (275000- 612500)	2000000 (1025000-2275000)	2950000 (800000-6450000)	< 0,001
2	0 (0-12500)	0 (0-0)	25000 (0-62500)	300000 (87500-425000)	100000 (50000-100000)	< 0,001
3	0 (0-0)	0 (0-0)	50000 (0-100000)	500000 (200000-700000)	0 (0-0)	< 0,001
4	0 (0-0)	0 (0-12500)	0 (0-50000)	100000 (37500-500000)	0 (0-0)	< 0,001
5	0 (0-100000)	50000 (0-100000)	75000 (0-162500)	450000 (200000-950000)	100000 (37500-325000)	< 0,001
6	0 (0-0)	50000 (37500-87500)	75000 (0-212500)	450000 (100000-1025000)	0 (0-100000)	< 0,001
7	0 (0-0)	0 (0-50000)	0 (0-50000)	150000 (50000-200000)	0 (0-100000)	0,003
8	0 (0-0)	50000 (0-62500)	0 (0-50000)	200000 (25000-325000)	100000 (0-312500)	0,002
9	0 (0-0)	25000 (0-125000)	25000 (0-62500)	450000 (137500-650000)	375000 (100000-512500)	< 0,001
10	0 (0-0)	50000 (50000-50000)	100000 (50000-100000)	500000 (87500-500000)	100000 (50000-112500)	< 0,001

Sojevi za koje je najoptimalnija temperatura za rast posle tri dana inkubacije bila 33 °C, označeni su zatamljeno. \*P25= 25-ti percentil P75=75-ti percentil. Vrednosti P25 i P75 su prikazane u zagradi i označene kao P25-P75. Prvi broj u zagradi predstavlja P25 a drugi broj u zagradi predstavlja P75. Vrednost medijane je prikazana iznad pomenute zagrade.

Vrednosti Mann-Whitney-evog testa za sojeve 1, 8 i 9 *B. afzelii* na 33 i 37 °C, prikazane su u Tabeli 14. Mann-Whitney-ev test je pokazao, da ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima medijana, odnosno, ne postoji statistički značajna razlika između rasta na 33 i 37 °C za sledeće sojeve *B. afzelii*: soj 1 ( $P=0,571$ ), soj 8 ( $P=0,710$ ) i soj 9 ( $P=0,760$ ).



Za 3/10 sojeva *B. afzelii* (sojevi 1, 8 i 9) utvrđeno je, da su posle tri dana inkubacije podjednako dobro rasli na temperaturama 33 i 37 °C.

**Tabela 14: Sojevi *Borrelia burgdorferi sensu lato* koji su podjednako dobro rasli posle tri dana inkubacije na 33 i 37 °C**

<b>Rast (konačni broj ćelija/mL) medijana (P25-P75)*</b>			
<i>B. afzelii</i>	33 °C	37°C	<i>P</i>
<b>Soj 1</b>	2000000 (1025000-2275000)	2950000 (800000-6450000)	0,571
<b>Soj 8</b>	200000 (25000-325000)	100000 (0-312500)	0,710
<b>Soj 9</b>	450000 (137500-650000)	375000 (100000-512500)	0,760
<i>B. garinii</i>			
<b>Soj 4</b>	2400000 (425000-4500000)	2100000 (1250000-3500000)	0,929
<b>Soj 5</b>	1600000 (625000-1900000)	500000 (337500-2950000)	0,426
<b>Soj 6</b>	425000 (300000-825000)	350000 (200000-800000)	0,447
<b>Soj 8</b>	825000 (100000-1075000)	950000 (375000-1875000)	0,197
<b>Soj 10</b>	800000 (250000-1275000)	1000000 (162500-2200000)	0,819
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>			
<b>Soj 2</b>	400000 (175000-525000)	1000000 (325000-1212500)	0,079
<b>Soj 7</b>	1050000 (450000-1712500)	500000 ( 275000-1675000)	0,309
<b>Soj 9</b>	400000 (200000-1087500)	225000 (50000-1087500)	0,323
<b>Soj 10</b>	550000 (250000-887500)	1000000 (87500-2150000)	0,448
<b>Soj 11</b>	525000 (362500-1125000)	350000 (100000-1650000)	0,622

\*P25=25-ti percentil P75=75-ti percentil. Vrednosti P25 i P75 su prikazane u zagradi i označene kao P25-P75. Prvi broj u zagradi predstavlja P25 a drugi broj u zagradi predstavlja P75. Vrednost medijane je prikazana iznad pomenute zagrade.

#### 4.2.2 Analiza deset pojedinačnih sojeva *B. garinii*

Da bi se utvrdilo da li je 33 °C bila najoptimalnija temperatura za rast svakog pojedinačnog soja *B. garinii* (sojevi su označeni od 1-10 i prikazani u Tabeli 6) korišćeni su Kruskal-Wallis-ov i Mann-Whitney-ev test (nivo značajnosti  $P < 0,05$ ).

Kruskal-Wallis-ov test je za svaki pojedinačni soj *B. garinii* pokazao, da postoji statistički značajna razlika u vrednostima medijana, odnosno za svaki pojedinačni soj utvrđeno je, da postoji statistički značajna razlika između rasta na pet različitih temperatura (4, 23, 28, 33 i 37 °C). Rezultati su prikazani kao medijana, P25 i P75 (Tabela 15).

Za sojeve 1-7 i soj 9, najveće vrednosti medijana utvrđene su na 33 °C, a za sojeve 8 i 10 najveće vrednosti medijana utvrđene su na 37 °C. Mann-Whitney-ev test je za sojeve 1-3, 7 i 9 pokazao, da postoji statistički značajna razlika između rasta na: 33 i 4 °C, 33 i 23 °C, 33 i 28 °C kao i između rasta na 33 i 37 °C (sve  $P$  vrednosti su bile  $< 0,05$ ). Za 5/10 sojeva *B. garinii* (sojevi 1-3, 7 i 9) najoptimalnija temperatura za rast posle tri dana inkubacije je bila 33 °C.

**Tabela 15: Konačni broj ćelija/mL deset pojedinačnih sojeva *Borrelia garinii* na pet različitim temperatura (4, 23, 28, 33 i 37 °C)**

<b>Rast (konačni broj <i>B. garinii</i>/mL) medijana (P25-P75)*</b>						
<b>Soj</b>	<b>4 °C</b>	<b>23 °C</b>	<b>28 °C</b>	<b>33 °C</b>	<b>37 °C</b>	<b>P</b>
1	0 (0-0)	50000 (0-187500)	100000 (0-100000)	1200000 (700000-2175000)	100000 (0-525000)	< 0,001
2	0 (0-0)	50000 (0-100000)	0 (0-100000)	775000 (300000-2250000)	0 0-37500)	< 0,001
3	0 (0-0)	25000 (0-100000)	100000 (0-237500)	1250000 (650000-3100000)	0 (0-200000)	< 0,001
4	0 (0-50000)	75000 (0-162500)	75000 (0-362500)	2400000 (425000-4500000)	2100000 1250000-3500000)	< 0,001
5	0 (0-50000)	75000 (0-162500)	175000 (50000-275000)	1600000 (625000-1900000)	500000 (337500-2950000)	< 0,001
6	0 (0-100000)	0 (0-100000)	100000 (0-125000)	425000 (300000-825000)	350000 (200000-800000)	< 0,001
7	0 (0-62500)	50000 (0-162500)	100000 (0-150000)	550000 (462500-2425000)	250000 (175000-1112500)	< 0,001
8	0 (0-0)	50000 (0-137500)	100000 (37500-162500)	825000 (100000-1075000)	950000 (375000-1875000)	< 0,001
9	0 (0-0)	50000 (0-137500)	150000 (87500-400000)	1150000 (450000-3050000)	400000 (100000-1050000)	< 0,001
10	0 (0-12500)	50000 (0-187500)	75000 (50000-200000)	800000 (250000-1275000)	1000000 (162500-2200000)	< 0,001

Sojevi za koje je najoptimalnija temperatura za rast posle tri dana inkubacije bila 33 °C, označeni su zatamljeno. \*P25= 25-ti percentil P75=75-ti percentil. Vrednosti P25 i P75 su prikazane u zagradi i označene kao P25-P75. Prvi broj u zagradi predstavlja P25 a drugi broj u zagradi predstavlja P75. Vrednost medijane je prikazana iznad pomenute zagrade.

Vrednosti Mann-Whitney-evog testa za sojeve 4-6, 8 i 10 *B. garinii* na 33 i 37 °C su prikazane u Tabeli 14. Mann-Whitney-ev test je pokazao, da ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima medijana, odnosno, ne postoji statistički značajna razlika između rasta na 33 i 37 °C za sledeće sojeve *B. garinii*: soj 4 ( $P=0,929$ ), soj 5 ( $P=0,426$ ), soj 6 ( $P=0,447$ ), soj 8 ( $P=0,197$ ) i soj 10 ( $P=0,819$ ). Za 5/10 sojeva *B. garinii* (sojevi 4-6, 8 i 10) utvrđeno je, da su posle tri dana inkubacije podjednako dobro rasli na temperaturama 33 i 37 °C.

#### 4.2.3 Analiza jedanaest pojedinačnih sojeva *B. burgdorferi* sensu stricto

Da bi se utvrdilo da li je 33 °C najoptimalnija temperatura za rast svakog pojedinačnog soja *B. burgdorferi* sensu stricto (sojevi su označeni od 1-11 i prikazani u Tabeli 6) korišćeni su Kruskal-Wallis-ov i Mann-Whitney-ev test (nivo značajnosti  $P < 0,05$ ).

Kruskal-Wallis-ov test je za svaki pojedinačni soj *B. burgdorferi* sensu stricto pokazao, da postoji statistički značajna razlika u vrednostima medijana, odnosno za svaki pojedinačni soj utvrđeno je, da postoji statistički značajna razlika između rasta na pet različitih temperatura (4, 23, 28, 33 i 37 °C). Rezultati su prikazani kao medijana, P25 i P75 (Tabela 16).

Za sojeve 1,3-8 i 11, najveće vrednosti medijana utvrđene su na 33 °C, a za sojeve 2, 9 i 10 najveće vrednosti medijana utvrđene su na 37 °C. Mann-Whitney-ev test je za sojeve 1, 3-6 i 8 pokazao, da postoji statistički značajna razlika između rasta na: 33 i 4 °C, 33 i 23 °C, 33 i 28 °C kao i između rasta na 33 i 37 °C (sve  $P$  vrednosti su bile  $< 0,05$ ). Za 6/11 sojeva *B. burgdorferi* sensu stricto (sojevi 1, 3-6, i 8) najoptimalnija temperatura za rast posle tri dana inkubacije je bila 33 °C.

**Tabela 16: Konačni broj ćelija/mL jedanaest pojedinačnih sojeva *Borrelia burgdorferi* sensu stricto na pet različitim temperatura (4, 23, 28, 33 i 37 °C)**

<b>Rast (konačni broj <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto/mL) medijana (P25-P75)*</b>						
<b>Soj</b>	<b>4 °C</b>	<b>23 °C</b>	<b>28 °C</b>	<b>33 °C</b>	<b>37 °C</b>	<b>P</b>
1	0 (0-12500)	100000 (37500-250000)	450000 (250000-562500)	1600000 (975000-7162500)	875000 (362500-1775000)	< 0,001
2	0 (0-0)	50000 (0-112500)	100000 (87500-125000)	400000 (175000-525000)	1000000 (325000-1212500)	< 0,001
3	0 (0-0)	0 (0-50000)	50000 (0-300000)	1000000 (300000-6000000)	500000 (0-600000)	< 0,001
4	0 (0-0)	50000 (0-100000)	225000 (100000-1550000)	2750000 (1362500-4400000)	500000 (400000-750000)	< 0,001
5	0 (0-0)	50000 (0-112500)	150000 (50000-412500)	1000000 (650000-1600000)	300000 (225000-537500)	< 0,001
6	0 (0-0)	0 (0-150000)	50000 (0-50000)	1025000 (200000-4000000)	300000 (100000-1875000)	< 0,001
7	0 (0-12500)	50000 (0-212500)	0 (0-262500)	1050000 (450000-1712500)	500000 (275000-1675000)	< 0,001
8	0 (0-12500)	75000 (37500-250000)	100000 (37500-212500)	1000000 (500000-1700000)	400000 (275000-1100000)	< 0,001
9	0 (0-12500)	25000 (0-100000)	0 (0-62500)	400000 (200000-1087500)	225000 (50000-1087500)	< 0,001
10	0 (0-50000)	75000 (0-162500)	150000 (0-325000)	550000 (250000-887500)	1000000 (87500-2150000)	< 0,001
11	0 (0-62500)	50000 (0-125000)	175000 (100000-225000)	525000 (362500-1125000)	350000 (100000-1650000)	< 0,001

Sojevi za koje je najoptimalnija temperatura za rast posle tri dana inkubacije bila 33 °C, označeni su zatamljeno. \*P25= 25-ti percentil P75=75-ti percentil. Vrednosti P25 i P75 su prikazane u zagradi i označene kao P25-P75. Prvi broj u zagradi predstavlja P25 a drugi broj u zagradi predstavlja P75. Vrednost medijane je prikazana iznad pomenute zagrade.

Vrednosti Mann-Whitney-evog testa za sojeve 2, 7, 9-11 *B. burgdorferi* sensu stricto na 33 i 37 °C su prikazane u Tabeli 14. Mann-Whitney-ev test je pokazao, da ne postoji statistički značajna razlika u vrednostima medijana, odnosno, ne postoji statistički značajna razlika između rasta na 33 i 37 °C za sledeće sojeve *B. burgdorferi* sensu stricto: soj 2 ( $P=0,079$ ), soj 7 ( $P=0,309$ ), soj 9 ( $P=0,323$ ), soj 10 ( $P=0,448$ ) i soj 11 ( $P=0,622$ ).

Za 5/11 sojeva *B. burgdorferi* sensu stricto (sojevi 2, 7, 9-11) utvrđeno je, da su posle tri dana inkubacije podjednako dobro rasli na temperaturama 33 i 37 °C.

#### 4.2.4 Uticaj temperature na rast, razmnožavanje i preživljavanje *B. afzelii*

Za testiranje razlike između rasta (rast je definisan kao konačni broj ćelija/mL) *B. afzelii* posle tri dana inkubacije na pet različitih temperatura (4, 23, 28, 33 i 37 °C) korišćen je Kruskal-Wallis-ov test (nivo značajnosti  $P < 0,05$ ); rezultati su prikazani kao medijana, P25 i P75 (Tabela 17) i predstavljeni grafički na Slici 9.

**Tabela 17: Rast (konačni broj ćelija/mL) *Borrelia afzelii* posle tri dana inkubacije na pet različitih temperatura (4, 23, 28, 33 i 37 °C)**

Rast (konačni broj ćelija/mL) <i>B. afzelii</i>					
	Temperatura (°C)				
	4	23	28	33	37
<b>Medijana</b>	0	25000	50000	300000	100000
<b>P25</b>	0	0	0	100000	0
<b>P75</b>	0	50000	100000	500000	300000

P25=25-ti percentil P75=75-ti percentil

Kruskal-Wallis-ov test je pokazao, da postoji statistički značajna razlika u vrednostima medijana, odnosno postoji statistički značajna razlika između rasta *B. afzelii* na pet različitih temperatura (4, 23, 28, 33 i 37 °C) ( $P < 0,001$ ). Na osnovu vrednosti medijana najbolji rast *B. afzelii*, odnosno najveći konačni broj ćelija/mL ustanovljen je na 33 °C (medijana 300 000 ćelija/mL); zatim na 37 °C (medijana 100 000 ćelija/mL) i 28 °C (medijana 50 000 ćelija/mL) dok je najslabiji rast *B. afzelii*, odnosno najmanji konačni broj ćelija/mL ustanovljen na 23 °C (medijana 25 000 ćelija/mL) i na 4 °C (medijana 0 ćelija/mL) (Tabela 17; Slika 9).



*Slika 9: Rast (konačni broj ćelija/mL) Borrelia afzelii [medijana, 25-ti percentil (P25) i 75-ti percentil (P75)] posle tri dana inkubacije na 4, 23, 28, 33 i 37 °C*

Za testiranje razlike između rasta *B. afzelii* na dve različite temperature, korišćen je Mann-Whitney-ev test; nivo značajnosti  $P < 0,05$ . Mann-Whitney-ev test je pokazao, da postoji statistički značajna razlika u vrednostima medijana, odnosno postoji statistički značajna razlika između rasta *B. afzelii* na dve različite temperature. Rezultati Mann-Whitney-evog testa su prikazani u Tabeli 18.

**Tabela 18: Rast (konačni broj ćelija/mL) *Borrelia afzelii* posle tri dana inkubacije na 4, 23, 28, 33 i 37 °C**

Poređenje		Rast (konačni broj <i>B. afzelii</i> /mL)	Mann-Whitney-ev test
Temperatura (°C)		Medijana (P25-P75)	P vrednost
4	23	0 (0-0) 25000 (0-50000)	< 0,001
4	28	0 (0-0) 50000 (0-100000)	< 0,001
4	33	0 (0-0) 300000 (100000-500000)	< 0,001
4	37	0 (0-0) 100000 (0-300000)	< 0,001
23	28	25000 (0-50000) 50000 (0-100000)	0,025
23	33	25000 (0-50000) 300000 (100000-500000)	< 0,001
23	37	25000 (0-50000) 100000 (0-300000)	< 0,001
28	33	50000 (0-100000) 400000 (100000-500000)	< 0,001
28	37	50000 (0-100000) 100000 (0-300000)	0,031
33	37	300000 (100000-500000) 100000 (0-300000)	< 0,001

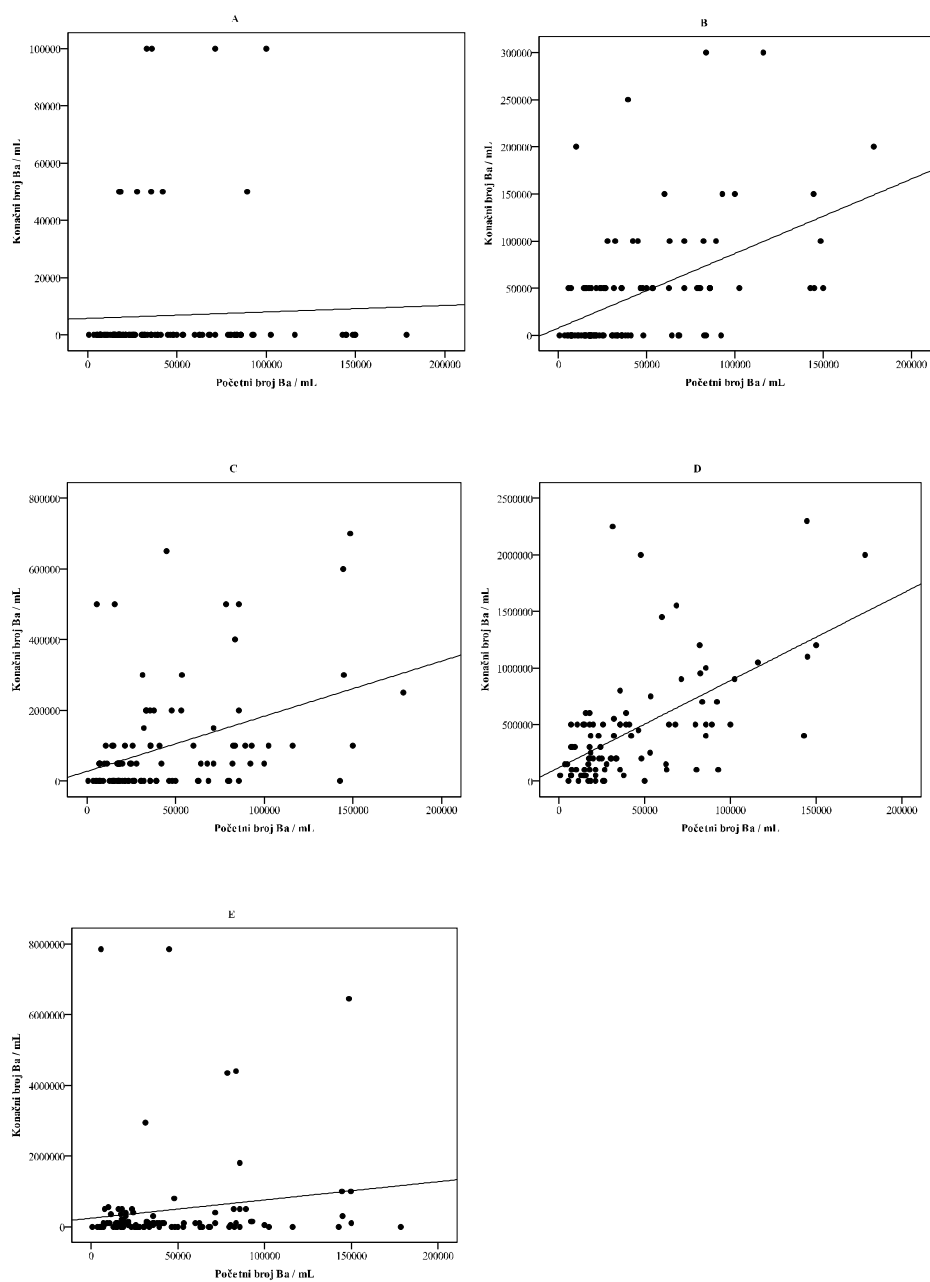
P25=25-ti percentil P75=75-ti percentil

#### 4.2.5 Ispitivanje povezanosti između početnog i konačnog broja *B. afzelii*/mL

Pomoću Spearman-ovog koeficijenta korelacije ( $\rho$ ) ispitana je povezanost između početnog broja *B. afzelii*/mL i rasta (rast je definisan kao konačni broj ćelija/mL posle tri dana inkubacije). Utvrđena je statistički značajna pozitivna povezanost na 23 °C ( $\rho$  0,514;  $P < 0,001$ ), na 28 °C ( $\rho$  0,381;  $P < 0,001$ ), na 33 °C ( $\rho$  0,551;  $P < 0,001$ ) i na 37 °C ( $\rho$  0,110;  $P = 0,019$ ). Povezanost na 4 °C je bila pozitivna ( $\rho$  0,105) ali nije bila



statistički značajna ( $P=0,291$ ). Rezultati Spearman-ove korelacije su predstavljeni grafički i prikazani na Slici 10 A-E.



**Slika 10 A-E: Spearman-ova korelacija između početnog i konačnog broja *Borrelia afzelii*/mL na pet različitih temperatura; A: 4 °C; B: 23 °C; C: 28 °C; D: 33 °C; E: 37 °C**

#### 4.2.6 Uticaj temperature na rast, razmnožavanje i preživljavanje *B. garinii*

Za testiranje razlike između rasta (rast je definisan kao konačni broj ćelija/mL) *B. garinii* posle tri dana inkubacije na pet različitih temperatura (4, 23, 28, 33 i 37 °C) korišćen je Kruskal-Wallis-ov test (nivo značajnosti  $P < 0,05$ ); rezultati su prikazani kao medijana, P25 i P75 (Tabela 19) i predstavljeni grafički na Slici 11.

**Tabela 19: Rast (konačni broj ćelija/mL) *Borrelia garinii* posle tri dana inkubacije na pet različitih temperatura (4, 23, 28, 33 i 37 °C)**

Rast (konačni broj ćelija/mL) <i>B. garinii</i>					
	Temperatura (°C)				
	4	23	28	33	37
<b>Medijana</b>	0	50000	100000	1000000	350000
<b>P25</b>	0	0	0	375000	100000
<b>P75</b>	0	100000	200000	2000000	1500000

P25=25-ti percentil P75=75-ti percentil

Kruskal-Wallis-ov test je pokazao, da postoji statistički značajna razlika u vrednostima medijana, odnosno postoji statistički značajna razlika između rasta *B. garinii* na pet različitih temperatura (4, 23, 28, 33 i 37 °C) ( $P < 0,001$ ). Na osnovu vrednosti medijana najbolji rast *B. garinii*, odnosno najveći konačni broj ćelija/mL ustanovljen je na 33 °C (medijana 1 000 000 ćelija/mL), zatim na 37 °C (medijana 350 000 ćelija/mL) i 28 °C (medijana 100 000 ćelija/mL) dok je najslabiji rast *B. garinii*, odnosno najmanji konačni broj ćelija/mL ustanovljen na 23 °C (medijana 50 000 ćelija/mL) i na 4 °C (medijana 0 ćelija/mL) (Tabela 19; Slika 11).



***Slika 11: Rast (konačni broj ćelija/mL) Borrelia garinii [medijana, 25-ti percentil (P25) i 75-ti percentil (P75)] posle tri dana inkubacije na 4, 23, 28, 33 i 37 °C***

Za testiranje razlike između rasta *B. garinii* na dve različite temperature, korišćen je Mann-Whitney-ev test; nivo značajnosti  $P < 0,05$ . Mann-Whitney-ev test je pokazao, da postoji statistički značajna razlika u vrednostima medijana, odnosno postoji statistički značajna razlika između rasta *B. garinii* na dve različite temperature. Rezultati Mann-Whitney-evog testa su prikazani u Tabeli 20.

**Tabela 20: Rast (konačni broj ćelija/mL) *Borrelia garinii* posle tri dana inkubacije na 4, 23, 28, 33 i 37 °C**

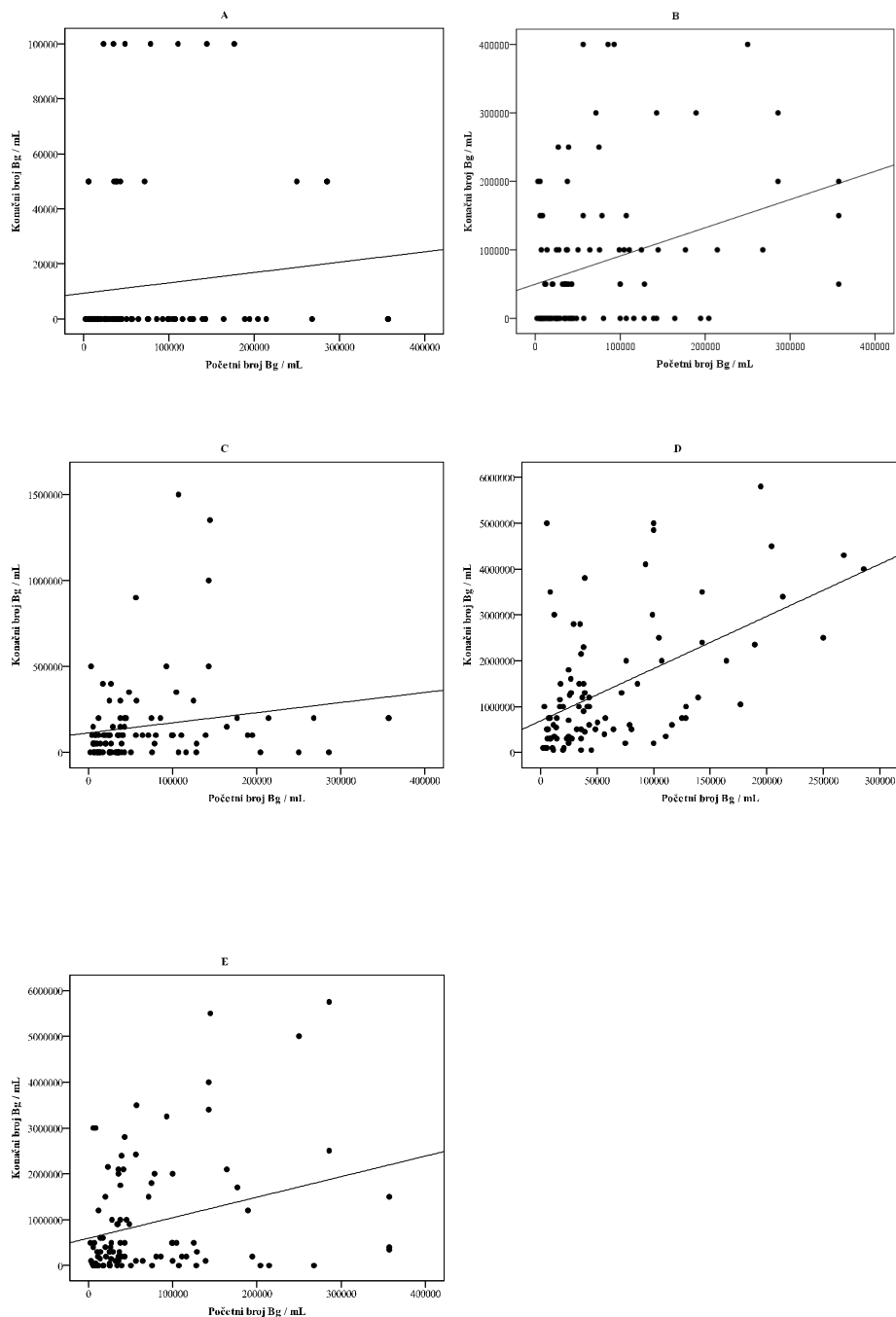
Poređenje		Rast (konačni broj <i>B. garinii</i> /mL)	Mann-Whitney-ev test
Temperatura (°C)		Medijana (P25-P75)	P vrednost
4	23	0 (0-0) 50000 (0-100000)	< 0,001
4	28	0 (0-0) 100000 (0-200000)	< 0,001
4	33	0 (0-0) 1000000 (375000-2000000)	< 0,001
4	37	0 (0-0) 350000 (100000-1500000)	< 0,001
23	28	50000 (0-100000) 100000 (0-200000)	0,013
23	33	50000 (0-100000) 1000000 (375000-2000000)	< 0,001
23	37	50000 (0-100000) 350000 (100000-1500000)	< 0,001
28	33	100000 (0-200000) 1000000 (375000-2000000)	< 0,001
28	37	100000 (0-200000) 350000 (100000-1500000)	< 0,001
33	37	1000000 (375000-2000000) 350000 (100000-1500000)	< 0,001

P25=25-ti percentil P75=75-ti percentil

#### 4.2.7 Ispitivanje povezanosti između početnog i konačnog broja *B. garinii*/mL

Pomoću Spearman-ovog koeficijenta korelacije ( $\rho$ ) ispitana je povezanost između početnog broja *B. garinii*/mL i rasta (rast je definisan kao konačni broj ćelija/mL posle tri dana inkubacije). Utvrđena je statistički značajna pozitivna povezanost na 23 °C ( $\rho$  0,329;  $P=0,001$ ), na 28 °C ( $\rho$  0,294;  $P=0,003$ ), na 33 °C ( $\rho$  0,454;  $P<0,001$ ) i na 37 °C

(rho 0,269;  $P=0,007$ ). Povezanost na 4 °C je bila pozitivna (rho 0,154) ali nije bila statistički značajna ( $P=0,127$ ). Rezultati Spearman-ove korelacije su predstavljeni grafički i prikazani na Slici 12 A-E.



**Slika 12 A-E: Spearman-ova korelacija između početnog i konačnog broja *Borrelia garinii*/mL na pet različitih temperatura; A: 4 °C; B: 23 °; C: 28 °C; D: 33 °C; E: 37 °**

#### 4.2.8 Uticaj temperature na rast, razmnožavanje i preživljavanje *B. burgdorferi sensu stricto*

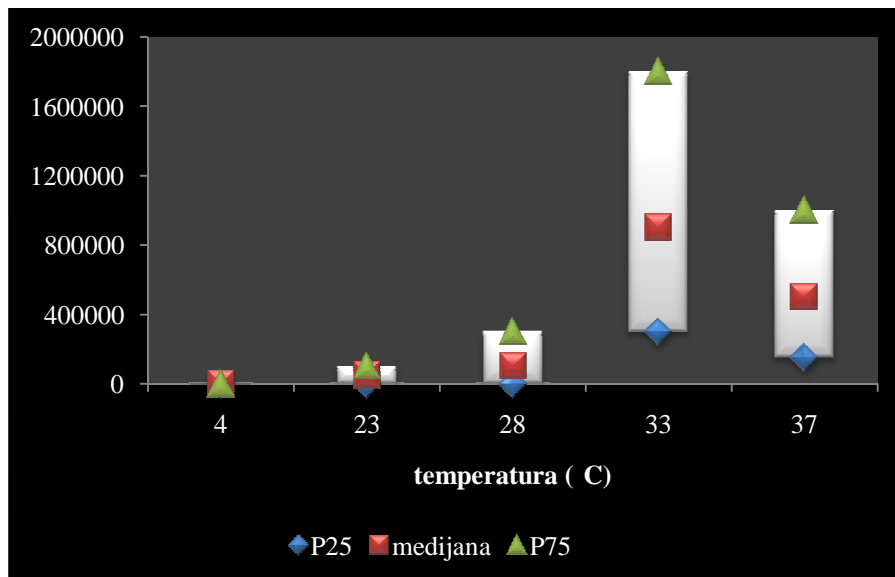
Za testiranje razlike između rasta (rast je definisan kao konačni broj ćelija/mL) *B. burgdorferi sensu stricto* posle tri dana inkubacije na pet različitih temperatura (4, 23, 28, 33 i 37 °C) korišćen je Kruskal-Wallis-ov test (nivo značajnosti  $P < 0,05$ ); rezultati su prikazani kao medijana, P25 i P75 (Tabela 21) i predstavljeni grafički na Slici 13.

**Tabela 21: Rast (konačni broj ćelija/mL) *Borrelia burgdorferi sensu stricto* posle tri dana inkubacije na pet različitih temperatura (4, 23, 28, 33 i 37 °C)**

Rast (konačni broj ćelija/mL) <i>B. burgdorferi sensu stricto</i>					
	Temperatura (°C)				
	4	23	28	33	37
Medijana	0	50000	100000	900000	500000
P25	0	0	0	300000	150000
P75	0	100000	300000	1800000	1000000

P25=25-ti percentil P75=75-ti percentil

Kruskal-Wallis-ov test je pokazao, da postoji statistički značajna razlika u vrednostima medijana, odnosno postoji statistički značajna razlika između rasta *B. burgdorferi sensu stricto* na pet različitih temperatura (4, 23, 28, 33 i 37 °C) ( $P < 0,001$ ). Na osnovu vrednosti medijana najbolji rast *B. burgdorferi sensu stricto*, odnosno najveći konačni broj ćelija/mL ustanovljen je na 33 °C (medijana 900 000 ćelija/mL); zatim na 37 °C (medijana 500 000 ćelija/mL) i 28 °C (medijana 100 000 ćelija/mL) dok je najslabiji rast *B. burgdorferi sensu stricto*, odnosno najmanji konačni broj ćelija/mL ustanovljen na 23 °C (medijana 50 000 ćelija/mL) i na 4 °C (medijana 0 ćelija/mL) (Tabela 21; Slika 13).



**Slika 13: Rast (konačni broj ćelija/mL) *Borrelia burgdorferi sensu stricto* [medijana, 25-ti percentil (P25) i 75-ti percentil (P75)] posle tri dana inkubacije na 4, 23, 28, 33 i 37 °C**

Za testiranje razlike između rasta *B. burgdorferi sensu stricto* na dve različite temperature, korišćen je Mann-Whitney-ev test; nivo značajnosti  $P < 0,05$ . Mann-Whitney-ev test je pokazao da postoji statistički značajna razlika u vrednostima medijana, odnosno postoji statistički značajna razlika između rasta *B. burgdorferi sensu stricto* na dve različite temperature. Rezultati Mann-Whitney-evog testa su prikazani u Tabeli 22.

**Tabela 22: Rast (konačni broj ćelija/mL) *Borrelia burgdorferi* sensu stricto posle tri dana inkubacije na 4, 23, 28, 33 i 37 °C**

Poređenje	Rast (konačni broj <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto/mL)	Mann-Whitney-ev test
Temperatura (°C)	Medijana (P25-P75)	P vrednost
4	0 (0-0)	< 0,001
23	50000 (0-100000)	
4	0 (0-0)	< 0,001
28	100000 (0-300000)	
4	0 (0-0)	< 0,001
33	900000 (300000-1800000)	
4	0 (0-0)	< 0,001
37	500000 (150000-1000000)	
23	50000 (0-100000)	< 0,001
28	100000 (0-300000)	
23	50000 (0-100000)	< 0,001
33	900000 (300000-1800000)	
23	50000 (0-100000)	< 0,001
37	500000 (150000-1000000)	
28	100000 (0-300000)	< 0,001
33	900000 (300000-1800000)	
28	100000 (0-300000)	< 0,001
37	500000 (150000-1000000)	
33	900000 (300000-1800000)	< 0,001
37	500000 (150000-1000000)	

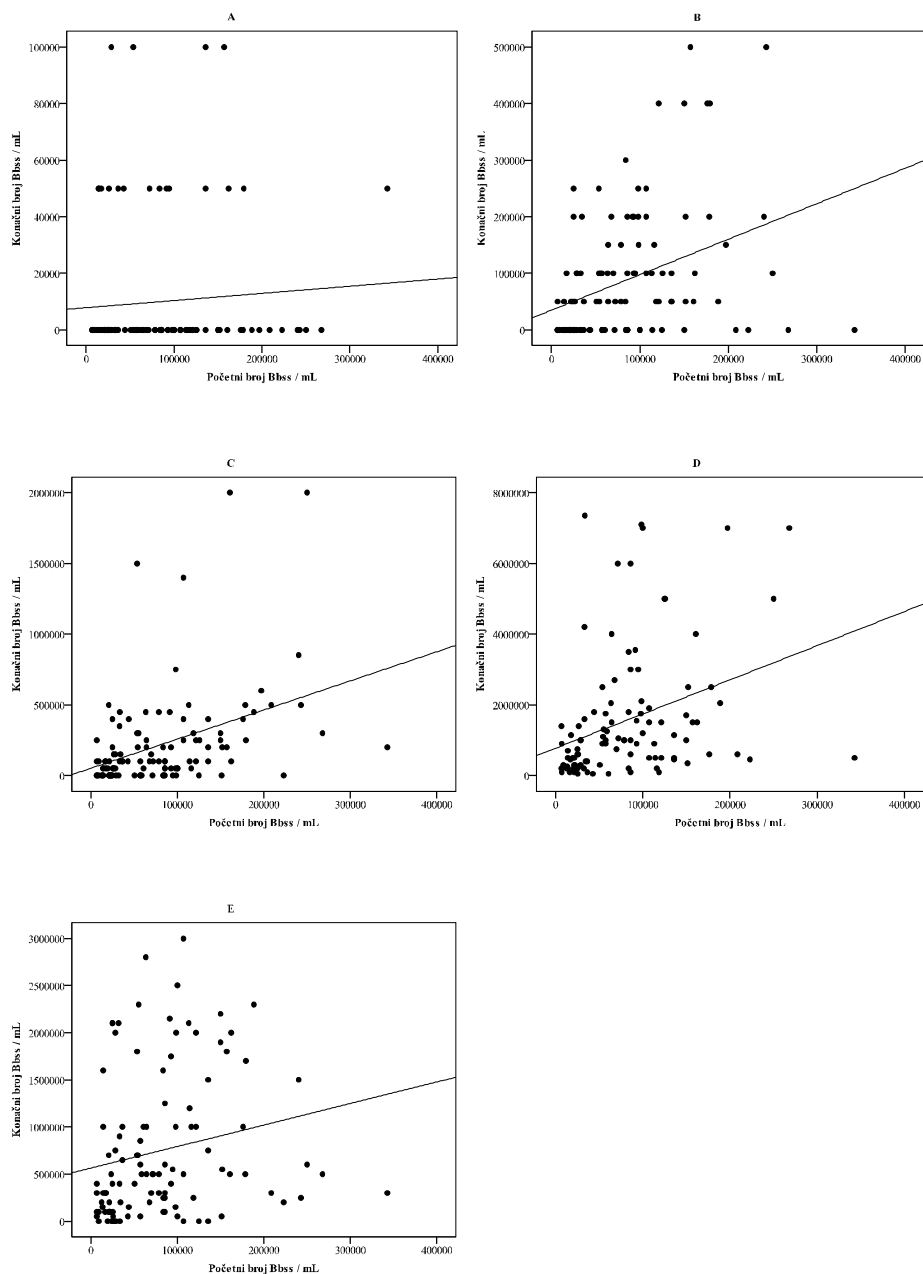
P25=25-ti percentil P75=75-ti percentil

#### **4.2.9 Ispitivanje povezanosti između početnog i konačnog broja *B. burgdorferi* sensu stricto/mL**

Pomoću Spearman-ovog koeficijenta korelacije ( $\rho$ ) ispitana je povezanost između početnog broja *B. burgdorferi* sensu stricto /mL i rasta (rast je definisan kao konačni broj ćelija/mL posle tri dana inkubacije). Utvrđena je statistički značajna pozitivna povezanost na 23 °C ( $\rho$  0,434;  $P < 0,001$ ), na 28 °C ( $\rho$  0,446;  $P < 0,001$ ), na 33 °C ( $\rho$  0,460;



$P < 0,001$ ) i na 37 °C ( $\rho = 0,330$ ;  $P < 0,001$ ). Povezanost na 4 °C je bila pozitivna ( $\rho = 0,052$ ) ali nije bila statistički značajna ( $P = 0,585$ ). Rezultati Spearman-ove korelacije su predstavljeni grafički i prikazani na Slici 14 A-E.



**Slika 14 A-E: Spearman-ova korelacija između početnog i konačnog broja *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (Bbss/mL na 5 različitim temperatura; A: 4 °C; B: 23 °C; C: 28 °C; D: 33 °C; E: 37 °C**

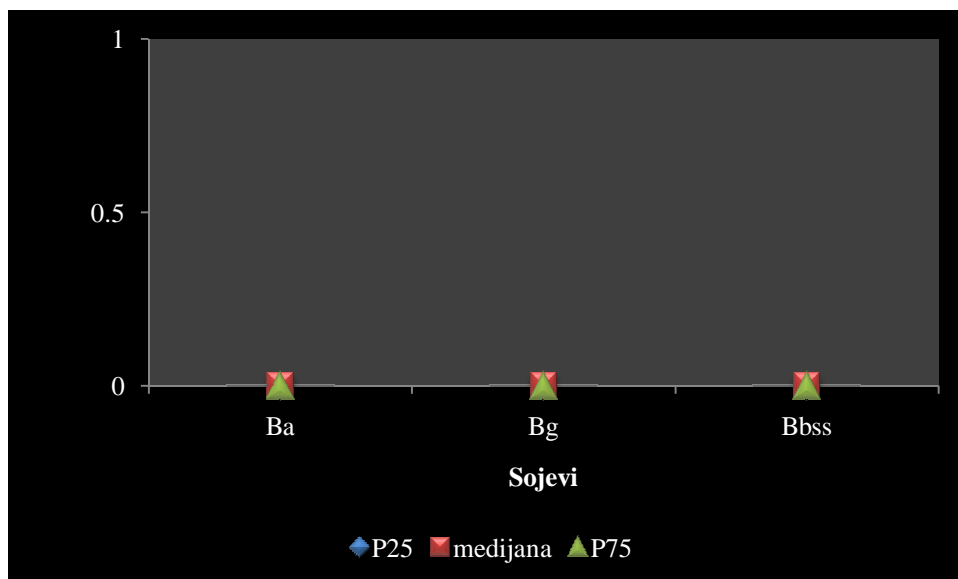
#### 4.2.10 Poređenje rasta *B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi sensu stricto* na 4 °C

Za testiranje razlike između rasta *B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi sensu stricto* na 4 °C korišćen je Kruskal-Wallis-ov test (nivo značajnosti  $P < 0,05$ ); rezultati su prikazani kao medijana, P25 i P75 (Tabela 23) i predstavljeni grafički (Slika 15). Kruskal-Wallis-ov test je pokazao, da ne postoji statistički značajna razlika između rasta tri vrste borelija na 4 °C ( $P = 0,263$ ).

**Tabela 23: Poređenje rasta (konačni broj ćelija/mL) *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* i *Borrelia burgdorferi sensu stricto* posle tri dana inkubacije na pet različitih temperatura (4, 23, 28, 33 i 37 °C) (Kruskal-Wallis-ov test)**

Temperatura (°C)	Rast (konačni broj ćelija/mL)	Medijana (P25-P75)	P vrednost
4	<i>B. afzelii</i>	0 (0-0)	0,263
	<i>B. garinii</i>	0 (0-0)	
	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	0 (0-0)	
23	<i>B. afzelii</i>	25000 (0-50000)	0,021
	<i>B. garinii</i>	50000 (0-100000)	
	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	50000 (0-100000)	
28	<i>B. afzelii</i>	50000 (0-100000)	< 0,001
	<i>B. garinii</i>	100000 (0-200000)	
	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	100000 (0-300000)	
33	<i>B. afzelii</i>	300000 (100000-500000)	< 0,001
	<i>B. garinii</i>	1000000 (375000-2000000)	
	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	900000 (300000-1800000)	
37	<i>B. afzelii</i>	100000 (0-300000)	< 0,001
	<i>B. garinii</i>	350000 (100000-1500000)	
	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	500000 (150000-1000000)	

P25=25-ti percentil P75=75-ti percenti

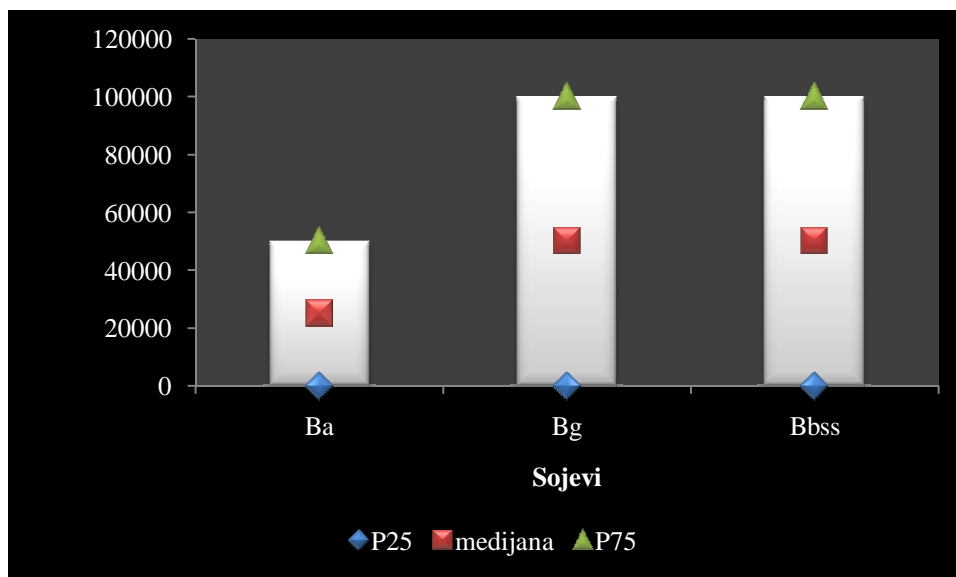


**Slika 15: Poređenje rasta (konačni broj ćelija/mL) *Borrelia afzelii* (Ba), *Borrelia garinii* (Bg) i *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (Bbss) [medijana, 25-ti percentil (P25) i 75-ti percentil (P75)] posle tri dana inkubacije na 4 °C**

#### **4.2.11 Poređenje rasta *B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi sensu stricto* na 23 °C**

Za testiranje razlike između rasta *B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi sensu stricto* na 23 °C korišćen je Kruskal-Wallis-ov test (nivo značajnosti  $P < 0,05$ ); rezultati su prikazani kao medijana, P25 i P75 (Tabela 23) i predstavljeni grafički (Slika 16).

Kruskal-Wallis-ov test je pokazao, da postoji statistički značajna razlika između rasta tri vrste borelija na 23 °C ( $P = 0,021$ ). Na osnovu vrednosti medijana najbolji rast, odnosno najveći konačni broj ćelija/mL posle tri dana inkubacije na 23 °C ustanovljen je za *B. garinii* (medijana 50 000 ćelija/mL) i *B. burgdorferi sensu stricto* (medijana 50 000 ćelija/mL) a najslabiji rast ustanovljen je za *B. afzelii* (medijana 25 000 ćelija/mL) (Tabela 23, Slika 16).



**Slika 16: Poređenje rasta (konačni broj ćelija/mL) *Borrelia afzelii* (Ba), *Borrelia garinii* (Bg) i *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (Bbss) [medijana, 25-ti percentil (P25) i 75-ti percentil (P75)] posle tri dana inkubacije na 23 °C**

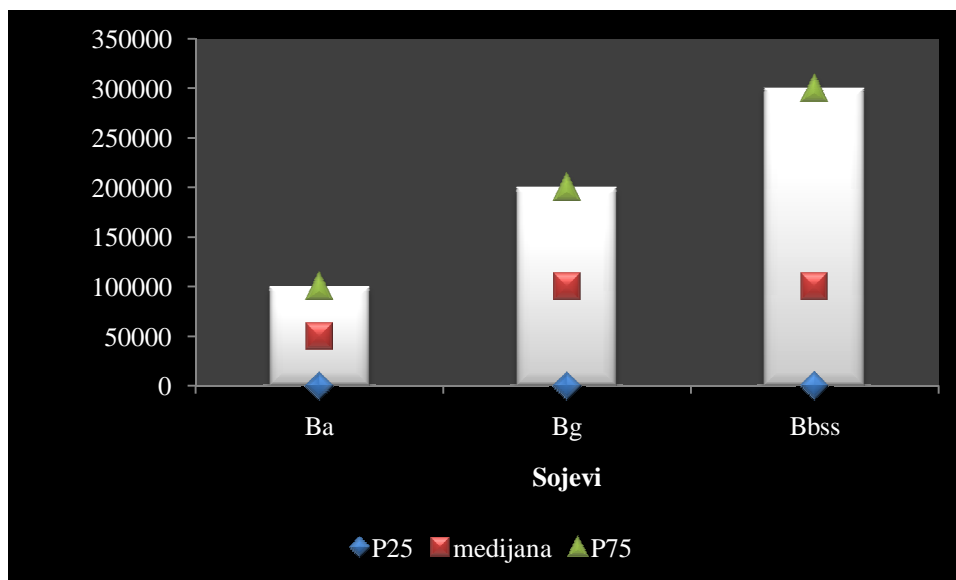
Mann-Whitney-ev test je pokazao, da na 23 °C postoji statistički značajna razlika u vrednostima medijana, odnosno postoji statistički značajna razlika između rasta *B. afzelii* i *B. garinii* ( $P=0,023$ ) kao i između rasta *B. afzelii* i *B. burgdorferi sensu stricto* ( $P=0,001$ ), dok razlika između rasta *B. garinii* i *B. burgdorferi sensu stricto* nije statistički značajna ( $P=0,807$ ) (Tabela 24).

#### **4.2.12 Poređenje rasta *B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi sensu stricto* na 28 °C**

Za testiranje razlike između rasta *B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi sensu stricto* na 28 °C korišćen je Kruskal-Wallis-ov test (nivo značajnosti  $P<0,05$ ); rezultati su prikazani kao medijana, P25 i P75 (Tabela 23) i predstavljeni grafički (Slika 17).

Kruskal-Wallis-ov test je pokazao, da postoji statistički značajna razlika između rasta tri vrste borelija na 28 °C ( $P<0,001$ ). Na osnovu vrednosti medijana najbolji rast, odnosno najveći konačni broj ćelija/mL posle tri dana inkubacije na 28 °C ustanovljen je za *B. garinii* (medijana 100 000 ćelija/mL) i *B. burgdorferi sensu stricto* (medijana 100 000

ćelija/mL) a najslabiji rast ustanovljen je za *B. afzelii* (medijana 50 000 ćelija/mL) (Tabela 23, Slika 17).



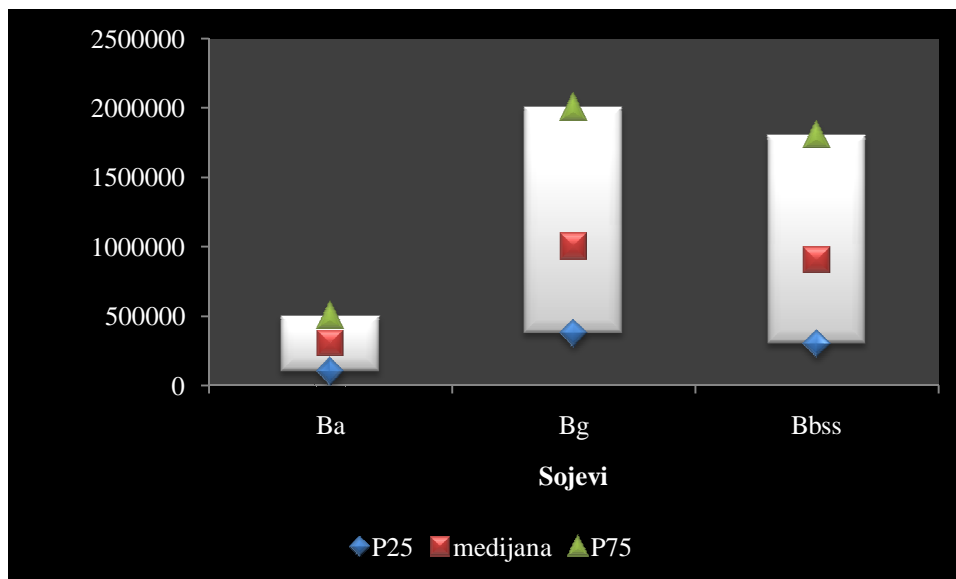
**Slika 17:** Poređenje rasta (konačni broj ćelija/mL) *Borrelia afzelii* (Ba), *Borrelia garinii* (Bg) i *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (Bbss) [medijana, 25-ti percentil (P25) i 75-ti percentil (P75)] posle tri dana inkubacije na 28 °C

Mann-Whitney-ev test je pokazao, da na 28 °C postoji statistički značajna razlika u vrednostima medijana, odnosno postoji statistički značajna razlika između rasta *B. afzelii* i *B. garinii* ( $P=0,014$ ) kao i između rasta *B. afzelii* i *B. burgdorferi sensu stricto* ( $P<0,001$ ), dok razlika između rasta *B. garinii* i *B. burgdorferi sensu stricto* nije statistički značajna ( $P=0,123$ ) (Tabela 24).

#### 4.2.13 Poređenje rasta *B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi sensu stricto* na 33 °C

Za testiranje razlike između rasta *B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi sensu stricto* na 33 °C korišćen je Kruskal-Wallis-ov test (nivo značajnosti  $P<0,05$ ); rezultati su prikazani kao medijana, P25 i P75 (Tabela 23 ) i predstavljeni grafički (Slika 18).

Kruskal-Wallis-ov test je pokazao, da postoji statistički značajna razlika između rasta tri vrste borelija na 33 °C ( $P < 0,001$ ). Na osnovu vrednosti medijana najbolji rast, odnosno najveći konačni broj ćelija/mL posle tri dana inkubacije na 33 °C ustanovljen je za *B. garinii* (medijana 1 000 000 ćelija/mL), zatim za *B. burgdorferi sensu stricto* (medijana 900 000 ćelija/mL) i na kraju za *B. afzelii* (medijana 300 000 ćelija/mL) (Tabela 23, Slika 18).



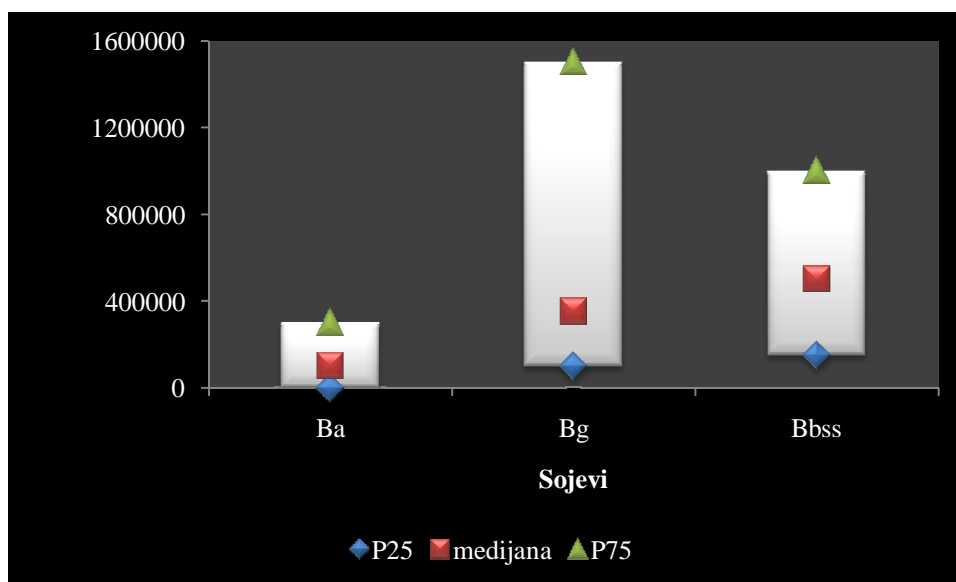
**Slika 18: Poređenje rasta (konačni broj ćelija/mL) *Borrelia afzelii* (Ba), *Borrelia garinii* (Bg) i *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (Bbss) [medijana, 25-ti percentil (P25) i 75-ti percentil (P75)] posle tri dana inkubacije na 33 °C**

Mann-Whitney-ev test je pokazao, da na 33 °C postoji statistički značajna razlika u vrednostima medijana, odnosno postoji statistički značajna razlika između rasta *B. afzelii* i *B. garinii* ( $P < 0,001$ ) kao i između rasta *B. afzelii* i *B. burgdorferi sensu stricto* ( $P < 0,001$ ), dok razlika između rasta *B. garinii* i *B. burgdorferi sensu stricto* nije statistički značajna ( $P = 0,868$ ) (Tabela 24).

#### 4.2.14 Poređenje rasta *B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi* sensu stricto na 37 °C

Za testiranje razlike između rasta *B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi* sensu stricto na 37 °C korišćen je Kruskal-Wallis-ov test (nivo značajnosti  $P < 0,05$ ); rezultati su prikazani kao medijana, P25 i P75 (Tabela 23) i predstavljeni grafički (Slika 19).

Kruskal-Wallis-ov test je pokazao, da postoji statistički značajna razlika između rasta tri vrste borelija na 37 °C ( $P < 0,001$ ). Na osnovu vrednosti medijana najbolji rast, odnosno najveći konačni broj ćelija/mL posle tri dana inkubacije na 37 °C ustanovljen je za *B. burgdorferi* sensu stricto (medijana 500 000 ćelija/mL), zatim za *B. garinii* (medijana 350 000 ćelija/mL) i na kraju za *B. afzelii* (medijana 100 000 ćelija/mL) (Tabela 23, Slika 19).



**Slika 19:** Poređenje rasta (konačni broj ćelija/mL) *Borrelia afzelii* (Ba), *Borrelia garinii* (Bg) i *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (Bbss) [medijana, 25-ti percentil (P25) i 75-ti percentil (P75)] posle tri dana inkubacije na 37 °C

Mann-Whitney-ev test je pokazao, da na 37 °C postoji statistički značajna razlika u vrednostima medijana, odnosno postoji statistički značajna razlika između rasta *B. afzelii* i *B. garinii* ( $P < 0,001$ ) kao i između rasta *B. afzelii* i *B. burgdorferi* sensu stricto ( $P < 0,001$ ),

dok razlika između rasta *B. garinii* i *B. burgdorferi* sensu stricto nije statistički značajna ( $P=0,490$ ) (Tabela 24).

**Tabela 24: Poređenje rasta (konačni broj ćelija/mL) *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* i *Borrelia burgdorferi* sensu stricto posle tri dana inkubacije na pet različitih temperatura (Mann-Whitney-ev test)**

Temperatura (°C)	Rast (konačni broj ćelija/mL)	Medijana (P25-P75)	Mann-Whitney-ev test
			<i>P</i> vrednost
23	<i>B. afzelii</i>	25000 (0-50000)	0,023
	<i>B. garinii</i>	50000 (0-100000)	
	<i>B. afzelii</i>	25000 (0-50000)	0,011
	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	50000 (0-100000)	
28	<i>B. garinii</i>	50000 (0-100000)	0,807
	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	50000 (0-100000)	
	<i>B. afzelii</i>	50000 (0-100000)	0,014
	<i>B. garinii</i>	100000 (0-200000)	
33	<i>B. afzelii</i>	50000 (0-100000)	< 0,001
	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	100000 (0-300000)	
	<i>B. garinii</i>	100000 (0-200000)	0,123
	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	100000 (0-300000)	
37	<i>B. afzelii</i>	300000 (100000-500000)	< 0,001
	<i>B. garinii</i>	1000000 (375000-2000000)	
	<i>B. afzelii</i>	300000 (100000-500000)	< 0,001
	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	900000 (300000-1800000)	
37	<i>B. garinii</i>	1000000 (375000-2000000)	0,868
	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	900000 (300000-1800000)	
	<i>B. afzelii</i>	100000 (0-300000)	< 0,001
	<i>B. garinii</i>	350000 (100000-1500000)	
37	<i>B. afzelii</i>	100000 (0-300000)	< 0,001
	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	500000 (150000-1000000)	
	<i>B. garinii</i>	350000 (100000-1500000)	0,490
	<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	500000 (150000-1000000)	

P25=25-ti percentil P75=75-ti percentil



### 4.3 Ispitivanje *in vitro* osetljivosti sojeva vrste *B. burgdorferi* sensu stricto na amoksicilin, azitromicin, ceftriakson, cefuroksim, doksiciklin i amikacin

U ispitivanje *in vitro* osetljivosti borelija na šest antibiotika, uključeno je devet izolata *B. burgdorferi* sensu stricto. Izolati su prikazani u Tabeli 6. Svi izolati su bili osetljivi na sve antibiotike dok je amikacin očekivano bio neefikasan. Za svaki antibiotik posebno, MIK je definisana kao najveća MIK vrednost od ukupno 3-4 ponovljena testiranja; u MIK raspon su uključene sve 4 vrednosti MIK (od najmanje do najveće) (Tabela 25). Ukupan MIK raspon za pojedinačne antibiotike, kao i MIK<sub>50</sub> i MIK<sub>90</sub> za sve testirane sojeve prikazani su u Tabeli 26.

**Tabela 25: Vrednosti MIK i raspon MIK šest antibiotika za pojedinačne *Borrelia burgdorferi* sensu stricto izolate (koža 1-6; cerebrospinalna tečnost-CST; krv 1-2); MIK u mg/L**

Izolat	Amoksicilin MIK (raspon)	Azitromicin MIK (raspon)	Ceftriakson MIK (raspon)	Cefuroksim MIK (raspon)	Doksiciklin MIK (raspon)	Amikacin MIK (raspon)
Koža 1	2	0,22 (0,027-0,22)	0,25 (0,063-0,25)	0,125 (0,063-0,125)	2 (0,5-2)	512 (32-512)
Koža 2	1 (0,125-1)	0,22 (0,11-0,22)	0,063 (0,031-0,063)	0,125 (0,063-0,125)	0,125	512 (128-512)
Koža 3	2 (1-2)	0,22 (0,11-0,22)	0,25 (0,125-0,25)	0,063	2 (1-2)	256
Koža 4	0,25 (0,125-0,25)	0,11	0,125 (0,063-0,125)	0,25 (0,125-0,25)	2	32
Koža 5	1 (0,25-1)	0,22 (0,11-0,22)	0,063 (0,031-0,063)	0,063	1 (0,25-1)	256 (64-256)
Koža 6	1	0,22 (0,11-0,22)	0,063	0,063	2 (1-2)	128 (64-128)
CST	1 (0,125-1)	0,11 (0,055-0,11)	0,125 (0,031-0,125)	0,125 (0,063-0,125)	1 (0,125-1)	512 (64-512)
Krv 1	2 (1-2)	0,22 (0,11-0,22)	0,063 (0,031-0,063)	0,063	0,5 (0,25-0,5)	256
Krv 2	0,5 (0,25-0,5)	0,22 (0,11-0,22)	0,031	0,063	0,25	256

**Tabela 26: MIK (mg/L) šest testiranih antibiotika protiv devet izolata *Borrelia burgdorferi* sensu stricto predstavljene su kao ukupan raspon, MIK<sub>50</sub> i MIK<sub>90</sub>**

Antibiotik	MIK raspon mg/L	MIK <sub>50</sub> mg/L	MIK <sub>90</sub> mg/L	Prelomna tačka*
Amoksisicilin	0,125-2	1	2	≤ 4
Azitromicin	0,027-0,22	0,11	0,22	≤ 2
Ceftriakson	0,031-0,25	0,063	0,125	≤ 8
Cefuroksim	0,063-0,25	0,063	0,125	≤ 8
Doksiciklin	0,125-2	0,5	2	≤ 4
Amikacin	32-512	128	256	≤ 16

\*Prelomna tačka (107)

U Tabeli 27 prikazane su MBK antibiotika za pojedinačne sojeve *B. burgdorferi* sensu stricto posle tri i šest nedelja inkubacije. Većina sojeva je bila sposobna rasti pri svim izabranim koncentracijama većim od MIK za pojedinačne antibiotike, uključujući i najveće primenjivane koncentracije; usled toga, konačne vrednosti MBK nisu određene i kod tih sojeva MBK su označene kao nedefinisane MBK sa simbolom ">" (veće od).

Različite vrednosti MBK posle tri i šest nedelja inkubacije pronađene su za amoksisicilin (izolat krv 1), ceftriakson (izolat koža 5), cefuroksim (izolat koža 4), doksiciklin (izolat koža 5) i amikacin (izolati koža 4) kao što je i prikazano u Tabeli 27.

U pogledu na citirane prelemone tačke (engl. breakpoint) MIK (Tabela 26), vrednosti MBK ukazuju, da ni jedan izolat nije bio osetljiv na amikacin (> 16 mg/L); izolati (koža 5, koža 6 i CST) su bili osetljivi na amoksisicilin (≤ 4mg/L) dok je izolat krv 1 bio osetljiv na amoksisicilin posle 3 nedelje (≤ 4mg/L) ali ne i posle 6 nedelja inkubacije (> 4 mg/L); izolati (koža 1, koža 3, koža 5, koža 6, CST i krv 1) su bili osetljivi na ceftriakson (≤ 8mg/L); izolati (koža 3, koža 5, koža 6, CST, krv 1 i krv 2) su bili osetljivi na cefuroksim (≤ 8mg/L) dok je izolat koža 4 bio osetljiv na cefuroksim posle 3 nedelje (≤ 8mg/L) ali ne i posle 6 nedelja inkubacije (> 8 mg/L); izolati (koža 6 i CST) su bili osetljivi na doksiciklin (≤ 4mg/L) dok je izolat koža 5 bio osetljiv na doksiciklin posle 3 nedelje (≤ 4mg/L) ali ne i posle 6 nedelja inkubacije (> 4 mg/L) (Tabela 27).

**Tabela 27: MBK (mg/L) šest antibiotika određene posle tri (3 n) i šest (6 n) nedelja inkubacije za pojedinačne izolate *Borrelia burgdorferi sensu stricto*: koža 1-6; cerebrospinalna tečnost-CST; krv 1-2**

Izolat	Amoksicilin		Azitromicin		Ceftriakson		Cefuroksim		Doksiciklin		Amikacin	
	3n	6n	3n	6n	3n	6n	3n	6n	3n	6n	3n	6n
Koža 1	ND*, >64	ND, >64	ND, >0,88	ND, >0,88	8	8	ND, >4	ND, >4	64	64	1024	1024
Koža 2	ND, >32	ND, >32	ND, >0,88	ND, >0,88	ND, >2	ND, >2	ND, >4	ND, >4	ND, >4	ND, >4	1024	1024
Koža 3	16	16	ND, >0,88	ND, >0,88	4	4	2	2	32	32	512	512
Koža 4	ND, >8	ND, >8	ND, >0,88	ND, >0,88	ND, >4	ND, >4	8	ND, >8	32	32	256	512
Koža 5	2	2	ND, >0,88	ND, >0,88	0,25	0,5	0,5	0,5	2	ND, >32	512	512
Koža 6	2	2	ND, >0,88	ND, >0,88	0,25	0,25	0,125	0,125	4	4	256	256
CST	4	4	ND, >0,88	ND, >0,88	0,5	0,5	2	2	4	4	1024	1024
Krv 1	4	8	ND, >0,88	ND, >0,88	0,25	0,25	0,5	0,5	ND, >16	ND, >16	512	512
Krv 2	16	16	ND, >0,88	ND, >0,88	ND, >1	ND, >1	1	1	ND, >8	ND, >8	512	512

\*Oznaka "nedefinisano" (ND) odnosi se na MBK koje nije bilo moguće tačno utvrditi jer je raspon koncentracija testiranih antibiotika neočekivano bio nedovoljan.

Grupisani rezultati MBK antibiotika koji su određeni posle 3 i 6 nedelja inkubacije za sve testirane sojeve prikazani su u Tabeli 28. Poređenjem MBK raspona dobijenih posle šest nedelja inkubacije sa onim koji su dobijeni posle tri nedelje inkubacije ustanovljene su razlike za cefuroksim i doksiciklin. Nažalost, nije bilo moguće odrediti MBK većine antibiotika zbog toga što su borelije rasle pri većini testiranih koncentracija. Azitromicin

nije pokazao baktericidni efekat pri koncentraciji 0,88 mg/L, dok su amoksisilin i doksiciklin pokazali baktericidni efekat samo pri visokim koncentracijama ( $\geq 2$  mg/L).

**Tabela 28: MBK (mg/L) antibiotika za devet izolata *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, određene nakon tri i šest nedelja inkubacije**

Antibiotik	MBK raspon (mg/L)		MBK <sub>50</sub> (mg/L)		MBK <sub>90</sub> (mg/L)		Prelomna tačka**
	3 nedelje	6 nedelja	3 nedelje	6 nedelja	3 nedelje	6 nedelja	
Amoksisilin	2 – ND*, >64	2 – ND, >64	ND, >8	ND, >8	ND, >32	ND, >32	$\leq 4$
Azitromicin	ND, >0,88	ND, >0,88	ND, >0,88	ND, >0,88	ND, >0,88	ND, >0,88	$\leq 2$
Ceftriakson	0,25 - 8	0,25 - 8	ND, >1	ND, >1	ND, >4	ND, >4	$\leq 8$
Cefuroksim	0,125 - 8	0,125 – ND, >8	2	2	ND, >4	ND>4	$\leq 8$
Doksiciklin	2 - 64	4 - 64	ND, >8	ND, >16	32	ND, >32	$\leq 4$
Amikacin	256 - 1024	256 - 1024	512	512	1024	1024	$\leq 16$

\*Oznaka “nedefinisano“ (ND) odnosi se na MBK koje nije bilo moguće tačno utvrditi jer je raspon koncentracija testiranih antibiotika neočekivano bio nedovoljan. \*\*Prelomna tačka (107)

## 5. DISKUSIJA

U ovoj doktorskoj disertaciji, ispitivali smo uticaj različitih faktora (vreme čuvanja hranljivih podloga, temperatura, antibiotici) na *in vitro* rast, razmnožavanje, preživljavanje i morfološke odlike borelija.

### 5.1 Uticaj starosti MKP podloga na rast, razmnožavanja, preživljavanje i morfologiju borelija

Iako je objavljeno nekoliko studija o hranljivim podlogama za kultivaciju borelija, do danas nisu izvođene studije o tome koliki vremenski period se može čuvati jednom napravljena podloga, osim studije Pollack-a i saradnika (14) koji su objavili podatke o standardizaciji komercijalne BSK-H podloge. Mi smo želeli proceniti uticaj MKP podloga (koje su čuvane različit vremenski period) na rast borelija kako bismo olakšali rutinski laboratorijski rad smanjenjem učestalosti pravljenja podloga. Osim toga, želeli smo testirati rast borelija u MKP podlogama koje su pethodno čuvane isključivo na +4 °C, kako bismo procenili, da li je takva temperatura adekvatna za dugotrajno čuvanje podloga i da li se takve podloge mogu koristiti za kultivaciju borelija.

Borelije za kultivaciju *in vitro* zahtevaju kompleksne hranljive podloge, zbog toga što nisu u mogućnosti da sintetišu aminokiseline, nukleozide, nukleotide, masne kiseline, i mnoge druge gradivne komponente neophodne za rast i razmnožavanje (12). Tokom vremena, različite hranljive podloge su se upotrebljavale za kultivaciju borelija, a danas se u rutinskom radu koriste tri vrste tečnih podloga: MKP, BSK i komercijalno dostupna BSK-H podloga (13-15). Iako je većina sastojaka ovih podloga ista npr. CMRL kao izvor aminokiselina, vitamina, koenzima A, folne kiseline, NAD, i drugih faktora; neorganske soli; N-acetil-D-glukozamin kao prekursor sinteze ćelijskog zida bakterija; piruvična kiselina; citratna kiselina; HEPES; neopepton-kompleksna smeša polipeptida, peptida i aminokiselina, koji se dobijaju enzimskom razgradnjom proteina (tripsinom, pepsinom) i rastvorljivi su u vodi; govedji serumski albumin; zečiji serum itd., određeni sastojci se razlikuju u pogledu koncentracije, porekla (različiti proizvođači) i načina pripremanja. Tako na primer BSK-H podloga ne sadrži želatinu za razliku od BSK-II i MKP podloga; MKP podloga ne sadrži ekstrakt kvasca a sadrži 7,2% toplotom inaktivisan zečiji serum u

odnosu na BSK-II i BSK-H podloge koje sadrže ekstrakt kvasca i 6% neaktivisan zečiji serum; MKP podloga sadrži manju koncentraciju glukoze (3%) u poređenju sa BSK-II (5%) i BSK-H (6%) podlogama (13-15, 55).

Poreklo i kvalitet proteina podloge kao što su albumini mogu značajno da utiču na rast borelija u *in vitro* uslovima (14, 109).

Tako su Callister i saradnici (109) pokazali, da goveđi serumski albumin (frakcija V), koji vodi poreklo od različitih proizvođača, može značajno da utiče na sposobnost BSK podloge da podrži rast borelija. Kako bi podržale rast borelija, nakon 3 nedelje inkubacije, na temperaturi 32 °C, jedne BSK podloge (u zavisnosti od porekla goveđeg serumskog albumina koji sadrže) zahtevale su inokulum od < 2 borelije/mL, dok su druge BSK podloge zahtevale inokulum od  $2 \times 10^2$  borelija/mL i  $2 \times 10^5$  borelija/mL. Slično Pollac i saradnici (14) su pokazali, da poreklo i kvalitet proteina u podlogama kao što su albumini kao i specifična priprema zečijeg seruma značajno utiču na rast borelija, odnosno ako podloge imaju zečiji serum koji sadrži antispirehetalni imunoglobulin G, redukuvaće ili onemogućiti rast borelija.

Mnogi drugi faktori, pored sastojaka podloge mogu uticati na rast borelija *in vitro* i na ishod kultivacije kao što su: pH podloge, temperatura inkubacije, kontaminati, broj borelija u uzorku, veličina uzorka, kapacitet pojedinih sojeva borelija da rastu, sposobnost prilagođavanja pojedinih sojeva borelija *in vitro* uslovima, prethodna terapija pacijenta, lokalni anestetici koji se koriste prilikom biopsije kože, temperatura pri kojoj se transportuje uzorak u kom su prisutne borelije itd. (8, 13, 48, 55, 57, 80, 84, 110, 111).

Pravilno čuvanje hranljive podloge nakon njene pripreme je ključno za njenu efikasnost. Pollack i saradnici (14) su pokazali, da jednom pripremljena BSK-H podloga ima sposobnost da obezbedi dovoljno hranljivih sastojaka neophodnih za rast i razmnožavanje borelija ako se prethodno čuva na temperaturi od -80 do -20 °C u vremenskom periodu od 8 meseci. BSK-H podloge koje se čuvaju na temperaturi od -80 do -20 °C mogu da podrže rast malog inokuluma do povećanja njegove gustine do  $10^8$  ćelija/mL u toku 3 nedelje inkubacije na 37 °C, dok podloge koje se prethodno čuvaju na 4 °C zahtevaju produžen period inkubacije do 10 nedelja kako bi se borelije mogle detektovati.

Sve MKP podloge koje smo čuvali u frižideru na +4 °C tokom vremenskog perioda od manje od jednog meseca pa sve do 12 meseci, podržale su rast borelija/mL (1,2 do 2,5 x 10<sup>4</sup>/mL) što se manifestovalo povećanjem broja ćelija/mL nakon pet dana inkubacije na 33 °C (Slika 8 A-C). Vremenski period čuvanja podloga je negativno uticao na *in vitro* rast borelija ali je uticaj bio statistički značajan samo za *B. afzelii* i *B. garinii* ali ne i za *B. burgdorferi* sensu stricto jer su te borelije rasle i u podlogama koje su bile stare 12 meseci.

Raznolikost u biologiji borelija je takođe značajna i opisana je u nekoliko različitih studija. Naime, *B. burgdorferi* sensu stricto je opisana kao virulentnija i agresivnija vrsta borelija u poređenju sa vrstama *B. afzelii* i *B. garinii* (57, 83, 112). Strle i saradnici (83) su poredili pacijente u Evropi i SAD koji su imali potvrđene dijagnoze erythema migrans i pokazali, da je *B. burgdorferi* sensu stricto (izolovana od pacijenata u SAD) mnogo virulentnija od *B. afzelii* (izolovana od pacijenata u Sloveniji). U SAD erythema migrans se brže širi, kraće traje i povezana je sa intenzivnijom inflamacijom i znakovima koji često ukazuju na diseminaciju borelija za razliku od erythema migrans u Evropi koja se sporije širi, duže traje i mogućnost diseminacije je manje učestala. Slično, Strle i saradnici (112) su poredili pacijente sa potvrđenim dijagnozama erythema migrans koje su uzrokovale *B. burgdorferi* sensu stricto u SAD i *B. garinii* u Sloveniji. Pokazano je, da pacijenti u Sloveniji sa erythema migrans razvijaju veće lezije za razliku od pacijenata u SAD, ali sistemski simptomi se češće javljaju kod pacijenata u SAD nego kod pacijenata u Sloveniji. Pomenuta studija je takođe ukazala na učestaliju diseminaciju *B. burgdorferi* sensu stricto u odnosu na *B. garinii*. Pored toga, *B. burgdorferi* sensu stricto indukuje normalne makrofage da sekretuju više nivoa hemokina i citokina nego *B. afzelii* i *B. garinii*, ukazujući, da *B. burgdorferi* sensu stricto indukuje jači inflamatorni odgovor u makrofagama nego druge dve vrste borelija (113).

Ružić-Sabljić i Strle (57) su poredili rast *B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi* sensu stricto u dve različite podloge (MKP i BSK-II) i ustanovili, da se u miksturi dve vrste, *B. burgdorferi* sensu stricto ponaša kao najagresivnija vrsta koja ima tendenciju za bolji i brži rast, sledila je *B. garinii*, i na kraju *B. afzelii*.

Iako naša studija o uticaju MKP podloga različite starosti na rast borelija, donekle potvrđuje dosadašnje zaključke o biološkoj raznovrsnosti borelija, želimo da naglasimo, da

je studija sprovedena na ograničenom broju sojeva (samo po jedan soj *B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi* sensu stricto). Studija je ipak pokazala, da nekoliko meseci stare podloge koje se čuvaju na +4 °C, podržavaju rast borelija.

## **5.2 Uticaj temperature na rast, razmnožavanje i preživljavanje borelija**

Dosadašnje studije o uticaju temperature na rast, razmnožavanje i preživljavanje borelija, izvođene su na relativno malom, ograničenom broju izolovanih vrsta borelija, i teško da neka predstavlja standard za pojedinu vrstu. Iako je optimalna temperatura za *in vitro* rast borelija predstavljena u širokom rasponu od 30 do 37 °C (13) borelije se najčešće kultivuju na temperaturi 30 do 34 °C (11).

Ranije je opisano, da pojedini sojevi borelija mogu dobro rasti i na temperaturi 35 do 39 °C (8, 13, 114), dok na temperaturi iznad 39 °C dolazi do smanjenja ili inhibicije rasta borelija (13, 115). Do sada je 39 °C opisana kao najveća temperatura pri kojoj je detektovano razmnožavanje pojedinih sojeva vrsta *B. burgdorferi* sensu stricto i *B. afzelii*, dok na temperaturi  $\geq 40$  °C rast nije detektovan (13, 115). Generalno, borelije mnogo bolje tolerišu niske (4 °C) nego viske temperature (37 do 42 °C) (11).

Testirajući veći broj sojeva različitih vrsta *B. burgdorferi* sensu lato, posle tri dana inkubacije na pet različitih temperatura (4, 23, 28, 33 i 37 °C), utvrdili smo sledeće: najoptimalniju temperaturu za kultivaciju borelija, postojanje razlike između rasta tri patogene vrste borelija (*B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi* sensu stricto) na svakoj pojedinačnoj temperaturi i postojanje razlike u rastu između sojeva unutar vrste.

Unutar svake testirane vrste, definisali smo najoptimalnije temperature za rast svakoga soja posebno. Za 7/10 testiranih sojeva *B. afzelii*, 5/10 sojeva *B. garinii* i 6/11 sojeva *B. burgdorferi* sensu stricto, utvrđeno je da su najbolje rasli na 33 °C, (Tabele 13 i 15-16), dok je za 3/10 sojeva *B. afzelii*, 5/10 sojeva *B. garinii* i 5/11 sojeva *B. burgdorferi* sensu stricto utvrđeno da su podjednako dobro rasli na 33 °C i na 37 °C (Tabela 14).

Uzimajući u obzir ukupno 10 različitih sojeva *B. afzelii*, 10 različitih sojeva *B. garinii* i 11 različitih sojeva *B. burgdorferi* sensu stricto, u našoj studiji smo pokazali, da je 33 °C bila najoptimalnija temperatura za rast sve tri testirane vrste borelija, sledele su temperature 37,



28 i 23 °C, dok na temperaturi 4 °C nismo detektovali rast borelija (Slike 9, 11 i 13, Tabele 17, 19, 21). Pored toga, za svaku pojedinačanu vrstu smo utvrdili, da postoji značajna razlika između rasta na dve testirane temperature (Tabele 18, 20, 22).

Hubálek i saradnici (8) su testirali rast po jednog soja unutar tri patogene vrste borelija: soj BR75 *B. afzelii*, soj BR14 *B. garinii*, i soj B31 *B. burgdorferi* sensu stricto u BSK-H podlogama, na 5 različitih temperatura (20, 28, 33, 37 i 41 °C) u vremenskom periodu od 48 dana, a rast borelija su proveravali nakon 4, 8, 16 i 48 dana inkubacije. Kao najoptimalnije temperature bile su definisane sledeće: 33 °C za rast *B. burgdorferi* sensu stricto, 35 °C za rast *B. afzelii* i 37 °C za rast za *B. garinii*. Rezultati naše studije koja je sprovedena na ukupno trideset jednom soju *B. burgdorferi* sensu lato, u suprotnosti su sa studijom koju su sprovedeli Hubálek i saradnici (8) koji su testirali samo po jedan soj tri patogene vrste borelija, i ukazuju, da je 33 °C bila najoptimalnija temperatura ne samo za rast *B. burgdorferi* sensu stricto (Slika 13, Tabela 21) nego i za rast *B. afzelii* (Slika 9, Tabela 17) i *B. garinii* (Slika 11, Tabela 19).

Heroldová i saradnici (114) su testirali rast jednog soja (B31) vrste *B. burgdorferi* sensu stricto u BSK-H podlozi na 7 različitih temperatura (20, 25, 28, 30, 33, 35 i 37 °C) u vremenskom periodu od 9 dana. Autori su kao najoptimalniju temperatura za rast *B. burgdorferi* sensu stricto definisali 33 °C, a dobar rast uočen je i na 28, 30, 35 i 37 °C, što je u saglasnosti sa našim rezultatima baziranim na ispitivanju ukupno 11 različitih sojeva *B. burgdorferi* sensu stricto-najoptimalnija temperatura za rast je bila 33 °C, a dobar rast uočen je i na 37 ° (Slika 13).

Sposobnost nekih sojeva borelija da podjednako dobro rastu na 33 i 37 ° ukazuje na biološku raznovrsnost borelija, a naše istraživanje sprovedeno na većem broju različitih sojeva *B. burgdorferi* sensu lato generalno ukazuje, da je najoptimalnija temperatura za rast borelija bila 33 °C (Slike 9, 11 i 13).

Prethodno smo naveli, da je *B. burgdorferi* sensu stricto u ranijim studijama opisana kao agresivnija i virulentnija vrsta u odnosu na *B. afzelii* i *B. garinii* (83, 112, 113) kao i da ima tendenciju za bolji i brži rast, sledila je *B. garinii* i na kraju *B. afzelii* (57). U našoj studiji definisali smo temperaturu kao glavni parametar kako bismo poredili rast borelija u *in vitro*

uslovima. Pokazali smo, da vrste *B. garinii* i *B. burgdorferi* sensu stricto imaju istu tendenciju za rast na temperaturama 23, 28, 33 i 37 °C, odnosno na osnovu vrednosti medijana je procenjeno, da ne postoji razlika između rasta *B. garinii* i *B. burgdorferi* sensu stricto, dok je *B. afzelii* slabije rasla u poređenju sa vrstama *B. garinii* i *B. burgdorferi* sensu stricto na istim temperaturama, odnosno postojala je značajna razlika između rasta *B. afzelii* i *B. garinii* kao i između rasta *B. afzelii* i *B. burgdorferi* sensu stricto (Slike 16-19, Tabele 23-24). Ni za jednu od tri testirane vrste borelija rast nije bio detektovan na 4 °C (Slika 15, Tabele 23-24), što je bilo i očekivano.

Temperatura predstavlja važan faktor za kultivaciju borelija u *in vitro* uslovima, ali isto tako je važna i temperatura pri kojoj se klinički materijal transportuje od pacijenta do laboratorije-sobna temperatura se pokazala kao najoptimalnija za transport kliničkog materijala inficiranog borelijama, u vremenskom periodu od jednog do 11 dana (80, 116), dok se temperatura 5 °C pokazala kao neprimerena (80).

Nakon tri dana inkubacije, pokazali smo, da su borelije najbolje rasle i razmnožavale se na 33 °C, dobro na 37 °C, slabije na 28 °C i najslabije na 23 °C dok na temperaturi 4 °C nismo detektovali njihov rast (Slike 9, 11 i 13). Pošto su sve tri vrste borelija preživele na 23, 28, 33 i 37 °C, možemo da pretpostavimo, da ako bi se uzorak inficiran borelijama čuvao na tim temperaturama u vremenskom periodu od tri dana do transporta u laboratoriju ili se pod istim uslovima transportovao do laboratorije, to se ne bi negativno odrazilo na preživljavanje borelija u uzorku i na njihovu izolaciju i kultivaciju, što ne možemo reći za 4 °C budući da na toj temperaturi nismo detektovali rast borelija.

Za uspešnu kultivaciju borelija veoma je značajan broj borelija u uzorku (16, 55) a uspešnost izolacije borelija kreće se od 20 do 90% (najčešće oko 50%) iz kože bolesnika sa erythema migrans (55, 69, 117), a iz krvi i likvora manje od 10% (73, 82) sa izuzetkom nekih studija (48, 117). U našoj studiji smo pokazali, da postoji značajna povezanost između početnog i konačnog broja borelija/mL (za svaku od tri testirane vrste-*B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi* sensu stricto) odnosno što je početni broj borelija bio veći njihov rast (rast je definisan kao konačni broj borelija/mL) je bio bolji posle tri dana inkubacije na 23, 28, 33 i 37 °C (Slike 10 B-E, 12 B-E, 14 B-E). Početni broj borelija/mL nije uticao na rast *B. afzelii* ( $P=0,291$ ), *B. garinii* ( $P=0,127$ ) i *B. burgdorferi* sensu stricto ( $P=0,586$ ) na 4

°C (Slike 10 A, 12 A, 14 A). Naši rezultati-odnos početnog i konačnog broja borelija/mL, ukazuju, da će kultivacija biti uspešnija ako je početni broj bakterija u uzorku veći.

### **5.3 Ispitivanje *in vitro* osetljivosti sojeva vrste *B. burgdorferi* sensu stricto na amoksicilin, azitromicin, ceftriakson, cefuroksim, doksiciklin i amikacin**

Odredili smo osetljivost devet sojeva vrste *B. burgdorferi* sensu stricto izolovanih od pacijenata u Sloveniji (pre početka antibiotske terapije) na amoksicilin, azitromicin, ceftriakson, cefuroksim natrijum, doksiciklin i amikacin (Tabela 25). Svi navedni antibiotici, osim amikacina, primenjuju se u terapiji lajmske borelioze u Sloveniji (93), koji se u dosadašnjim *in vitro* studijama pokazao neefikasnim protiv borelija (15, 94, 98). Iako postoji nekoliko studija o *in vitro* osetljivosti *B. burgdorferi* sensu lato na antimikrobne agense (94, 96, 98, 100, 101, 103) uključujući i američke izolate *B. burgdorferi* sensu stricto (95, 97, 99, 118-121), naša studija je prva koja se odnosi na ispitivanje *in vitro* osetljivosti evropskih humanih izolata *B. burgdorferi* sensu stricto.

Rezultati prethodnih studija o *in vitro* osetljivosti *B. burgdorferi* sensu lato ukazuju na širok raspon MIK i MBK antibiotika. Na primer vrednosti MIK za amoksicilin variraju od  $\leq 0,03$  mg/L do 4 mg/L, MBK od  $\leq 0,03$  mg/L do  $> 16$  mg/L; za ceftriakson od  $\leq 0,01$  mg/L do 4 mg/L (MIK) i od 0,006 mg/L do 4 mg/L (MBK); za doksiciklin od 0,06 mg/L do 4 mg/L (MIK) i od 0,4 mg/L do 32 mg/L (MBK); za azitromicin od 0,003 mg/L do 0,06 mg/L (MIK) i od 0,004 mg/L do 4 mg/L (MBK) (94, 96-101, 103, 106). Iako bi tako širok raspon vrednosti MIK i MBK mogao da ukaže na različitu osetljivost testiranih sojeva, rezultati gore navedenih studija su teški za međusobno poređenje kao i za poređenje sa našim rezultatima usled postojanja metodoloških razlika. U prethodnim studijama korišćena je bujon mikrodilucijska i bujon makrodilucijska metoda u različitim podlogama (MKP, BSK, BSK-H) sa inokulumima različitih koncentracija ( $10^4$ - $10^7$ /mL) i različitog perioda inkubacije (3-7 dana za MIK i 1-6 nedelja na MBK) a korišćeni su i različiti kriterijumi krajnjeg vrednovanja (pokretljivost borelija, broj borelija, promena boje podloge).

Određivanje vrednosti MIK značajno je uslovljeno gustom inokulumu i načinom očitavanja rezultata (mikroskopsko i makroskopsko određivanje vrednosti MIK) (106). Boerner i saradnici (106) su pokazali, da su razlike između vrednosti MIK koje su dobijene

testiranjem  $10^6$  nasuprot  $10^7$  spiroheta/mL prosečno 1,2 koraka razblaženja za makroskopsku a samo 0,2 koraka razblaženja za mikroskopsku metodu, i da je tako veliko slaganje vrednosti MIK koje su procenjene mikroskopskom metodom, posledica standardizacije metode brojanja. Korišćenjem inokuluma  $10^6$  ćelija/mL, vrednosti MIK određene makroskopski bile su značajno niže od onih određenih mikroskopski, zato što je inokulum od  $10^6$  ćelija/mL bio suviše mali da indukuje bilo kakvu promenu boje i formiranje sedimenta dok se rast borelija mogao detektovati mikroskopski. S druge strane, kada se koristi inokulum od  $10^7$  ćelija/mL, 75,9% vrednosti MIK je identičano kako za makroskopsku tako i za mikroskopsku metodu.

Dok su razlike u rezultatima dobijenim makroskopskim očitavanjem rezultata mnogo veće nego one dobijene mikroskopskim ocenjivanjem (106), brojanje i posmatranje borelija pod mikroskopom je zahtevan, dugotrajan (naročito onda kada postoji veliki broj uzoraka koji se istovremeno proverava u cilju standardizacije metode) i subjektivan pristup, koji može biti jedan od glavnih prepreka za precizno određivanje vrednosti MIK i MBK i samim tim i jedan od najočiglednijih metodoloških razloga za različite rezultate koji su dobijeni u različitim studijama.

Kako bi se prevazišli metodološki problemi, Hunfeld i saradnici (100) su razvili kolorimetrijsku mikrodilucijsku metodu za ispitivanje *in vitro* osetljivosti *B. burgdorferi* sensu lato na antimikrobne agense. To je standardizovan test baziran na promeni boje (javlja se u prisustvu fenol crvenog) i rezultat je akumulacije metaboličkih kiselina koje nastaju usled aktivnog metabolizma spiroheta posle 72 sata inkubacije. Rast borelija se detektuje pomoću softvera koji meri smanjenje apsorbancije. U ovoj metodi, rast uzoraka i kontrola se mere u svakom bazenu na osnovu smanjenja apsorbancije ( $A_{562/630}$ ) posle 72 sata ( $E_{72}$ ) u poređenju sa početnom apsorbancijom ( $E_{t0}$ ). U matematičkom smislu, ako se apsorbancija u toku 72 sata smanji 5% ili više u poređenju sa početnom apsorbancijom, bazen se smatra pozitivan za rast borelija ( $E_{72} < E_0$  minus 5%). MIK se određuje kao najmanja koncentracija antimikrobnog agensa pri kojoj se ne detektuje značajna promena boje. Kolorimetrijski *in vitro* test osetljivosti je korišćen u nekoliko studija (98, 101). Prednosti opisane metode su pouzdanost, reproduktivnost i pogodnost za istovremeno

testiranje velikog broja izolata i antibiotika (100), a nedostaci su cena i nedostupnost drugim laboratorijama.

Mi smo koristili bujon mikrodilucijsku i makrodilucijsku metodu antibiograma, koje uključuju opšte principe koji se odnose na ispitivanje drugih bakterija (107). Gustina inokuluma je bilo  $10^5$  ćelija/mL, korišćena podloga je bila MKP, a vreme kultivacije je bilo 3 dana za određivanje MIK i 6 nedelja za određivanje MBK. Prisustvo ili odsustvo živih borelija i broj ćelija/mL odredili smo brojanjem pomoću Neubauer-ove komore za brojanje u kombinaciji sa mikroskopiranjem u tamnom polju (94).

Vrednosti MIK za amoksisilin, ceftriakson, cefuroksim i doksiciklin (Tabele 25-26) određene u našoj studiji, bile su unutar raspona prethodno publikovanih rezultata (94, 96-99, 101, 103, 106, 118), dok su vrednosti MIK za azitromicin (raspon MIK iz prethodnih studija je od 0,027-0,22 mg/L) bile prosečno 2x (dva koncentracijska koraka) veće nego one koje su publikovane za *B. burgdorferi* sensu lato, uključujući i američke sojeve *B. burgdorferi* sensu stricto (94, 96-98, 103, 119, 121). Pošto je naša studija prva koja se bavila ispitivanjem *in vitro* osetljivosti većeg broja evropskih sojeva vrste *B. burgdorferi* sensu stricto na antibiotike, nismo bili u mogućnosti naše rezultate uporediti sa vrednostima za druge evropske sojeve ove vrste.

Neslaganje naših vrednosti MIK za azitromicin sa prethodno publikovanim rezultatima za ovaj antibiotik, može biti zbog toga što su naši sojevi *B. burgdorferi* sensu stricto zaista drugačije osetljivi ili neosetljivi ili zbog toga što naša metodologija nije standardizovana. U svakom slučaju MIK raspon za azitromicin je bio prosečno jedan koncentracijski korak niži nego preporučeni MIK raspon za referentni soj-zahtevni mikroorganizam (*Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619) koji je objavio "Clinical Laboratory Standards Institute" (108). Pored toga, naši rezultati za MIK (Tabela 26), uključujući i one za azitromicin, bile su u skladu sa preporučenim vrednostima za druge bakterije (107), i u pogledu na takve kriterijume svi sojevi *B. burgdorferi* sensu stricto koji su analizirani u našoj studiji bili su osetljivi na testirane antibiotike (osim na amikacin).

Vrednosti MBK, određene u našoj studiji bile su visoke ali u skladu sa prethodno publikovanim rezultatima (94, 98, 101).

Za određivanje MBK, uzimali smo količinu (standardnih 10%) iz bazena u kome je određena vrednost MIK kao iz još 5 bazena u kojima su se nalazile rastuće koncentracije antibiotika, i uzete količine smo inokulisali u sveže MKP podloge. U skladu na opšte shvatanje, da su vrednosti MBK oko 2 puta veće od MIK (107, 108), prepostavili smo, da isto važi i za *B. burgdorferi* sensu stricto, odnosno, da će naše vrednosti MBK biti oko 2-3 puta veće od MIK. Međutim, nakon tri i šest nedelja inkubacije neke vrednosti MBK su bile 5 i više puta iznad odgovarajućih MIK, tako da nismo bili u mogućnosti precizno odrediti takve vrednosti MBK zato što su opsezi koncentracija antibiotika neočekivano bili mali.

Vrednosti MBK nađene u našoj studiji ukazuju, da nekoliko sojeva *B. burgdorferi* sensu stricto nije bilo osetljivo na antibiotike (Tabele 27-28). Naši rezultati su u suprotnosti sa kliničkim podacima o uspešnosti lečenja lajmske borelioze sa amoksicilinom, azitromicinom, cefuroksimom, ceftriaksonom i doksiciklinom (122, 123), i potvrđuju prethodne zaključke da *in vitro* aktivnost antibiotika nije uvek u korelaciji sa kliničkim iskustvom (124, 125). Nakon 3 nedelja inkubacije 4/9 sojeva je bilo osetljivo na amoksicilin a nakon 6 nedelja 3/9 ( $\leq 4$  mg/L); odgovarajući odnos za doksiciklin je bio 3/9 sojeva posle 3 i 2/9 sojeva posle 6 nedelja inkubacije (Tabela 27). Nakon 3 i 6 nedelja inkubacije 6/9 sojeva je bilo osetljivo na ceftriakson; 7/9 sojeva je bilo osetljivo na cefuroksim posle 3 a 6/9 sojeva posle 6 nedelja inkubacije (Tabela 27). Za mnoge antibiotike nismo bili u mogućnosti precizno odrediti MBK, zbog toga što je opseg koncentracija antibiotika neočekivano bio mali i takve MBK smo označili kao nedefinisane (ND) a ispred vrednosti MBK stavili smo simbol ">".

Pored stvarne neosetljivosti bakterija na antibiotike, postoji i nekoliko potencijalnih (neisključivih) objašnjenja za visoke vrednosti MBK, kao što su bakteriostatski efekat antibiotika, hemijska nestabilnost i/ili vezanje antibakterijskih agenasa za sastojke podloge (npr. za proteine), sposobnost borelija da se transformišu u L forme ili da postoje u latentnoj fazi kada su izložene antibioticima *in vitro*, kao i određivanje MBK kada se borelije nalaze u stacionarnoj fazi rasta.

Bakteriostatski efekat doksiciklina mogao bi biti jedan od razloga za visoke vrednosti MBK u našoj studiji, kao i u prethodnim studijama u kojima je testirana osetljivost *Borrelia* na antibiotike, osim *B. burgdorferi* sensu stricto (94, 96, 101).

Opadanje *in vitro* aktivnosti antimikrobnih agenasa mogla bi biti posledica njihove hemijske nestabilnosti (15, 120). Niska *in vitro* osetljivost *B. burgdorferi* sensu stricto na amoksicilin u našoj studiji, mogla bi se objasniti činjenicom, da su rastvori penicilina generalno nestabilni i da koncentracija antibiotika opada tokom produženog perioda inkubacije usled nestabilnosti  $\beta$ -laktamskog prstena.

Dever i saradnici (97) su pokazali, da koncentracija  $\beta$ -laktamskih antibiotika opada tokom inkubacije na 34 °C u BSK-II podlozi. Autori su pokazali, da je nivo penicilina G bio značajno smanjen treći (preostalo je 17% inicijalne koncentracije) i sedmi dan inkubacije (preostalo je manje od 2% inicijalne koncentracije), a posle 7 dana inkubacije, koncentracija penicilina G se nije mogla detektovati. Autori su takođe pokazali, da se tokom inkubacije smanjivala koncentracija ceftriaksona, ali za razliku od penicilina G, ceftriakson se mogao detektovati posle 7 dana inkubacije (ostalo je 47% inicijalne koncentracije). Kersten i saradnici (126) su takođe pokazali, da je penicilin G nestabilan lek tokom inkubacije, a da je doksiciklin prilično stabilan. Naime, autori su pokazali, da je koncentracija penicilina G bila smanjena za oko 20% tokom 24 sata inkubacije, više od 60% inicijalne koncentracije moglo se detektovati drugi dan inkubacije a 50 odnosno 20% inicijalne koncentracije moglo se detektovati posle 3 dana inkubacije. S druge strane, posle 2 dana inkubacije, detektovano je više od 80% inicijalne koncentracije doksiciklina, a treći dan inkubacije moglo se detektovati između 64 i 76% inicijalne koncentracije leka, ukazujući, da je doksiciklin prilično stabilan lek tokom inkubacije.

S druge strane neke studije navode, da je efikasnost penicilina i ceftriaksona *in vitro* i *in vivo* temperaturno zavisna (115). Osetljivost borelija na peniciline i ceftriakson *in vitro* raste kada se temperatura inkubacije povećava sa 36 na 38 °C, ukazujući, da bi povećanje telesne temperature pacijenata bilo korisno tokom antibiotske terapije lajmske borelioze.

Kako bi obezbedili konstantnu i odgovarajuću koncentraciju antimikrobnih agenasa tokom produženog perioda inkubacije, Stiernstedt i saradnici (127) razvili su metodu dijalize za

određivanje vrednosti MIK i MBK. Autori su testirali *in vitro* osetljivost borelija na benzilpenicilin, tako što su suspenziju borelija ogradili u zapečaćenim vrećicama dijaliznih membrana i stavili ih u epruvete sa BSK podlogama sa odgovarajućim serijama dvostrukih razblaženja antibiotika i u kontrolne BSK podloge. Vrećice za dijalizu prenosili su svaki dan u toku šest dana u nove epruvete sa BSK podlogama i svežim antibioticima, a vrednosti MIK su određene sedmi dan. Međutim, ova metoda nije našla širu primenu usled toga što je teška za standardizaciju.

Veoma je važan i način na koji se pripremaju i čuvaju rastvori antibiotika pre izvođenja antibiograma. Murray i saradnici (107) navode, da fiole sa antimikrobnim agensima trebaju biti čvrsto zatvorene i čuvane na temperaturi od 4 do 8 °C kako bi se minimiziralo njihovo isparavanje i kvarenje. Rastvore većine antimikrobnih agensa treba iskoristiti najkasnije u roku pet dana od dana njihovog pripremanja a rastvori  $\beta$ -laktamskih antibiotika su generalno previše nestabilni za duže čuvanje u konačnoj koncentraciji.

Neke studije su ukazale na interakciju između sastojaka podloge i antimikrobnih agenasa (97, 106, 128). Proteini kao što su albumini mogu se vezati za antibiotike i posledično smanjiti njihovu efikasnost. Schmidt i saradnici (129) su objavili, da je vezivanje ceftriaksona za albumine govedjeg seruma značajno manje nego vezivanje ovog antibiotika za serumske albumine ili humanu plazmu. Budući da borelije zahtevaju podlogu obogaćenu sa albuminima govedjeg seruma, takav mehanizam bi takođe mogao biti zastupljen u našoj studiji i biti odgovoran za smanjenu efikasnost antibiotika. Da bi se pravilno procenio značaj ovoga mehanizma, potrebna je detaljna i precizna analiza afiniteta antimikrobnih agenasa za serumski albumin i/ili proteine zečijeg seruma prisutnih u podlogama.

Boerner i saradnici (106) su pokazali, da interakcija između BSK-II podloge i penicilna G, dovodi do smanjena njegove efikasnosti za 85,8% nakon 72 sata inkubacije na 34 °C, kao i da se koncentracija drugih penicilina (mezlocilin i piperacilin) značajno smanjuje tokom inkubacije. S druge strane, aktivnost doksiciklina i eritromicina protiv *Borrelia* spp. se povećava kada se testiraju u BSK podlozi.

U našoj studiji, ukupno tri izolata su bila osetljiva na antibiotike posle 3 ali ne i posle 6 nedelja inkubacije (Tabela 27)- izolat koža 4 je preživeo visoke koncentracije cefuroksima i



rastao posle 6 nedelja (MBK > 8 mg/L ) ali ne i posle 3 nedelje inkubacije; slično, izolat koža 5 je preživeo visoke koncentracije doksiciklina i rastao posle 6 nedelja (MBK > 4 mg/L ) ali ne i posle 3 nedelje inkubacije. Izolat krv 1 je bio osetljiv na amoksicilin posle 3 nedelje ali ne i posle 6 nedelja inkubacije (MBK > 4 mg/L).

Naši rezultati bi se mogli objasniti prethodno opisanim mehanizmom (vezanje antibiotika za albumine goveđeg seruma i/ili hemijskom nestabilnošću  $\beta$ -laktamskog prstena što za posledicu ima smanjenje koncentracije cefalosporina tokom produženog perioda inkubacije), ili sa sposobnošću borelija da *in vitro* prežive visoke koncentracije antibiotika u njihovom okruženju transformišući se u cistične forme (sferične oblike, sferoplaste, L-oblike) (51).

Sposobnost borelija da se transformišu u cistične oblike, može im omogućiti zaštitu od antimikrobnih agenasa, preživljavanje u nepovoljnim uslovima i ponovni rast pod povoljnim uslovima (npr. mogu ponovo početi rasti posle šeste ali ne i posle treće nedelje inkubacije). Postoji i nekoliko drugih objašnjenja, uključujući mogućnost da bakterije ne rastu ili ne umiru u prisustvu antimikrobnih agenasa (130, 131)-borelije imaju sposobnost da perzistiraju u latentnoj fazi u prisustvu antibiotika i ponovo se pojavljuju nakon eliminicije antibiotika. Opisano je i da preživljavaju u humanim ćelijama *in vitro* u prisustvu antibiotika u njihovom okruženju (132). Ako je to validno, takva hipoteza je ograničena na *in vitro* okruženje.

Faza rasta bakterija takođe utiče na MBK rezultate. Antimikrobni agensi imaju najveći baktericidni efekat kada se bakterije nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta. Na primer,  $\beta$ -laktamski antibiotici imaju baktericidni efekat samo kada se bakterije nalaze u fazi razmnožavanja, dok na bakterije koje nisu u fazi razmnožavanja ispoljavaju bakteriostatski efekat. Značaj faze rasta bakterija u određivanju MBK opisali su još pre više od tri decenije Kim i Anthony (133). Autori su pokazali, da su vrednosti MBK testiranih antibiotika bile značajno više u stacionarnoj fazi rasta nego u logaritamskoj fazi rasta bakterija. Wiuff i saradnici (134) su opisali fenotipsku toleranciju i kreirali matematički model ukazujući, da će tokom deobe bakterija jedan deo ćerki ćelija biti manje osetljiv na antimikrobne agense nego naivne ćelije i da će takva subpopulacija biti odgovorna za toleranciju na antibiotike.

Oni su ukazali, da se varijacije u osetljivosti mogu objasniti razlikama u fazama rasta bakterija za vreme izloženosti antimikrobnim agensima (134).

## 6. ZAKLJUČCI

Možemo da zaključimo:

1. MKP podloge različite starosti (koje smo čuvali u vremenskom periodu od manje od jednog meseca pa sve do 12 meseci pre njihove upotrebe) nisu uticale na pokretljivost i morfologiju borelija, ali su imale uticaj na *in vitro* rast. Uticaj je bio najviše izražen na rast *B. afzelii* dok na rast *B. burgdorferi* sensu stricto nije bio statistički značajan. Naša studija pokazuje, da MKP podloge koje se prethodno čuvaju na +4 °C u vremenskom periodu do jedne godine, mogu neznatno da utiču na smanjenje broja ćelija/mL ali su ipak sposobne da obezbede adekvatne uslove za kultivaciju. Budući, da se podloge starije od jednog meseca mogu upotrebljavati za kultivaciju, učestalost pravljenja hranljivih podloga biće smanjena a rutinski laboratorijski rad biće olakšan.
2. Temperatura 33 °C je bila najoptimalnija za rast *B. afzelii*, *B. garinii* i *B. burgdorferi* sensu stricto u *in vitro* uslovima, a pojedini sojevi borelija mogli su podjednako dobro da rastu na 37 °C kao i na 33 °C. Sve tri vrste borelija su slabije rasle na temperaturama 23 i 28 °C, dok na temperaturi 4 °C nismo uočili njihov rast.
3. Početni broj borelija je važan za uspešnu kultivaciju, odnosno ako bi broj borelija u početnom uzorku bio veći, onda bi postojala i veća uspešnost izolacije i kultivacije borelija u *in vitro* uslovima dok bi detaljne studije o transportu uzorka inficiranog borelijama na više različitih temperatura bile korisne.
4. Interpretacija rezultata antibiograma je prilično složena. U pogledu na vrednosti MIK koje su određene u našoj studiji, slovenački izolati *B. burgdorferi* sensu stricto su bili osetljivi na antimikrobne agense koji se koriste kao preporučeni antibiotici (lekovi prve linije) u terapiji lajmske borelioze, dok su vrednosti MBK bile visoke. U budućnosti, standardizacija ispitivanja *in vitro* osetljivosti *Borrelia* spp. na antimikrobne agense, bila bi korisna.

## 7. LITERATURA

1. Stanek G, Strle F. Lyme borreliosis. *Lancet*. 2003;362:1639-47.
2. Steere AC. Lyme disease. *N Engl J Med*. 2001;345:115-25.
3. Belaich S. Lyme disease. *Presse Med*. 1995;24:81-7.
4. Steere AC, Malawista SE, Hardin JA, Ruddy S, Askenase W, Andiman WA. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. *Ann Intern Med*. 1977;86:685-98.
5. Steere AC. Lyme disease. *N Engl J Med*. 1989;321:586-96.
6. Johnson RC. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiological agent of Lyme disease. *Int J Syst Bacteriol*. 1984;34:496-7.
7. Wang G, van Dam AP, Schwartz I, Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12:633-53.
8. Hubálek Z, Halouzka J, Heroldová M. Growth temperature ranges of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. *J Med Microbiol*. 1998;47:929-32.
9. Barbour AG, Hayes SF. Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev*. 1986;50:381-400.
10. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Willkins Comp, Baltimore; 1994. 787 p.
11. Weber K, Burgdorfer W. *Aspects of Lyme borreliosis*. Springer-Verlag, Berlin; 1993. 384 p.
12. Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Weidman J, Utterback T, Wathley L, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Garland S, Fuji C, Cotton MD, Horst K, Roberts K, Hatch B, Smith

- HO, Venter JC. Genomic sequence of Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. Nature. 1997;390:580-6.
13. Barbour AG. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. Yale J Biol Med. 1984;57:521-5.
14. Pollack RJ, Telford SR 3rd, Spielman A. Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. J Clin Microbiol. 1993;31:1251-5.
15. Preac-Mursic V, Wilske B, Schierz G. European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks: culture conditions and antibiotic susceptibility. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A. 1986;263:112-8.
16. Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of lyme borreliosis. Clin Microbiol Rev. 2005;18:484-509.
17. Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. Lancet. 2012;379:461-73.
18. Hubálek Z. Epidemiology of lyme borreliosis. Curr Probl Dermatol. 2009;37:31-50.
19. EUCALB; European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis. URL <http://www.eucalb.com/> (accessed May 15, 2010).
20. Lindgren E, Jaenson TG. Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures, [http://www.euro.who.int/InformationSources/Publications/Catalogue/20061219\\_1](http://www.euro.who.int/InformationSources/Publications/Catalogue/20061219_1) WHO Regional Office for Europe 2006: ISBN: 9289022914 (IV).
21. CDC, Division of Vector-borne Infectious Diseases. Lyme Disease. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/lyme/index.htm> (accessed Nov 28, 2010).
22. Paster BJ, Dewhirst FE. Phylogenetic foundation of spirochetes. J Mol Microbiol Biotechnol. 2000;2:341-4.
23. Gray JS, Kahl O, Lane RS, Stanek G. Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control. CABI Publishing, New York; 2002. 368 p.

24. Collares-Pereira M, Couceiro S, Franca I, Kurtenbach K, Schäfer SM, Vitorino L, Gonçalves L, Baptista S, Vieira ML, Cunha C. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J Clin Microbiol.* 2004;42:1316-8.
25. Fingerle V, Schulte-Spechtel UC, Ružić-Sabljić E, Leonhard S, Hofmann H, Weber K, Pfister K, Strle F, Wilske B. Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int J Med Microbiol.* 2008;298:279-90.
26. Rijpkema SG, Tazelaar DJ, Molkenboer MJ, Noordhoek GT, Plantinga G, Schouls LM, Schellekens JF. 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.* 1997;3:109-116.
27. Rosa PA, Tilly K, Stewart PE. The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3:129-43.
28. IMI-Institut za mikrobiologiju i imunologiju, 2010. *Borrelia burgdorferi* sensu lato u tamnom polju. Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Ljubljani, Slovenija.
29. Wilske B, Preac-Mursic V, Schierz G, Kuhbeck R, Barbour AG, Kraner M. Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;539:126-43.
30. Wilske B, Barbour AG, Bergström S, Burman N, Restrepo BI, Rosa PA, Schwan T, Soutschek E, Wallich R. Antigenic variation and strain heterogeneity in *Borrelia* spp. *Res Microbiol.* 1992;143:583-96.
31. Fingerle V, Laux H, Munderloh UG, Schulte-Spechtel U, Wilske B. Differential expression of outer surface proteins A and C by individual *Borrelia burgdorferi* in different genospecies. *Med Microbiol Immunol.* 2000;189:59-66.
32. Pal U, de Silva AM, Montgomery RR, Fish D, Anguita J, Anderson JF, Lobet Y, Fikring E. Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. *J Clin Invest.* 2000;106:561-9.

33. Pal U, Fikrig E. Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in vector and vertebrate host. *Microbes Infect.* 2003;5:659-66.
34. Wilske B, Busch U, Fingerle V, Jauris-Heipke S, Preac-Mursic V, Rössler D, Will G. Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for *Borrelia* vaccine development. *Infection.* 1996;24:208-12.
35. Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC. Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J Infect Dis.* 1993;167:392-400.
36. Fingerle V, Hauser U, Liegl G, Petko B, Preac-Mursic V, Wilske B. Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *J Clin Microbiol.* 1995;33:1867-9.
37. Masuzawa T, Kurita T, Kawabata H, Yanagihara Y. Relationship between infectivity and OspC expression in Lyme disease *Borrelia*. *FEMS Microbiol Lett.* 1994;123:319-24.
38. Golightly MG. Laboratory considerations in the diagnosis and management of Lyme borreliosis. *Am J Clin Pathol.* 1993;99:168-74.
39. Norris SJ, Carter CJ, Howell JK, Barbour AG. Low-passage-associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infect Immun.* 1992;60:4662-72.
40. Lam TT, Nguyen TK, Montgomery RM, Kantor FS, Fikrig E, Flavell RA. Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *Infect Immun.* 1994;62:290-8.
41. Robinson JM, Pilot-Matias TJ, Pratt SD, Patel CB, Bevirt TS, Hunt JC. Analysis of the humoral response to the flagelin protein of *Borrelia burgdorferi*: cloning of regions capable of differentiating Lyme disease from syphilis. *J Clin Microbiol.* 1993;31:629-35.
42. Zhang JR, Hardham JM, Barbour AG, Norris SJ. Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP – like sequence cassettes. *Cell.* 1997;89:275-85.

43. Ting Liang F, Nowling JM, Philip MT. Cryptic and exposed invariable regions of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi* sl. J Bacteriol. 2000;182:3597-601.
44. Schwartz JJ, Gazumyan A, Schwartz I. rRNA gene organization in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. J Bacteriol. 1992;174:3757-65.
45. Davidson BE, MacDougall J, Saint Girons I. Physical map of the linear chromosome of the bacterium *Borrelia burgdorferi* 212, a causative agent of Lyme disease, and localization of rRNA genes. J Bacteriol. 1992;174:3766-74.
46. Ružić-Sabljić E, Zore A, Strle F. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates by pulsed-field gel electrophoresis after *Mlu*I restriction of genomic DNA. Res Microbiol. 2008;159:441-8.
47. Ružić-Sabljić E, Maraspin V, Lotrič-Furlan S, Jurca T, Logar M, Pikelj-Pečnik A, Strle F. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from human material in Slovenia. Wien Klin Wochenschr. 2002;114:544-50.
48. Wormser GP, Bittker S, Cooper D, Nowakowski J, Nadelman RB, Pavia C. Comparison of the yields of blood cultures using serum or plasma from patients with early Lyme disease. J Clin Microbiol. 2000;38:1648-50.
49. De Martino SJ, Sordet C, Piémont Y, Ruzic-Sabljić E, Thaddée Vetter M, Monteil H, Sibilia J, Jaulhac B. Enhanced culture of *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* strains on a solid BSK-based medium in anaerobic conditions. Res Microbiol. 2006;157:726-9.
50. Preac-Mursic V, Wilske B, Reinhardt S. Culture of *Borrelia burgdorferi* on six solid media. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1991;10:1076-9.
51. Preac-Mursic V, Wanner G, Reinhardt S, Wilske B, Busch U, Margret W. Formation and cultivation of *Borrelia burgdorferi* spheroplast-L form variants. Infection. 1996;24:218-26.
52. Alban PS, Johnson PW, Nelson DR. Serum-starvation-induced changes in protein synthesis and morphology of *Borrelia burgdorferi*. Microbiology. 2000;146:119-27.



53. Brorson O, Brorson SH. Transformation of cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to normal, mobile spirochetes. *Infection*. 1997; 25:240-6.
54. Brorson O, Brorson SH. In vitro conversion of *Borrelia burgdorferi* to cystic forms in spinal fluid and, transformation to mobile spirochetes by incubation in BSK-H medium. *Infection*. 1998;26:144-50.
55. Ružič-Sabljić E, Lotrič-Furlan S, Maraspin V, Cimperman J, Logar M, Jurca T, Strle F. Comparison of isolation rate of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in MKP and BSK-II medium. *Int J Med Microbiol*. 2006;296:267-73.
56. Veinović G, Cerar T, Strle F, Ružič-Sabljić E. Influence of MKP medium stored for prolonged periods on growth and morphology of *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *APMIS*. 2013; DOI: 10.1111/apm.12129.
57. Ružič-Sabljić E, Strle F. Comparison of growth of *Borrelia afzelii*, *B. garinii*, and *B. burgdorferi* sensu stricto in MKP and BSK-II medium. *Int J Med Microbiol*. 2004;294:407-12.
58. Stanek G, Burger I, Hirschl A, Wewalka G, Radda A. *Borrelia* transfer by ticks during their life cycle. Studies on laboratory animals. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*. 1986;263:29-33.
59. Piesman J, Maupin GO, Campos EG, Happ CM. Duration of adult female *Ixodes dammini* attachment and transmission of *Borrelia burgdorferi*, with description of a needle aspiration isolation method. *J Infect Dis*. 1991;163:895-7.
60. De Silva AM, Fikrig E. Arthropod – and host – specific gen expression by *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *J Clin Invest*. 1997;99:377-9.
61. Steere AC, Coburn J, Glickstein L. The emergence of Lyme disease. *J Clin Invest*. 2004;113:1093-101.
62. Strle F. Lyme borreliosis in Slovenia. *Zentralbl Bakteriol*. 1999;289:643-52.

63. Huppertz HI, Bohme M, Standaert SM, Karch H, Plotkin SA. Incidence of Lyme borreliosis in the Wurzburg region of Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:697-703.
64. Steere AC, Sikand VK, Meurice F, Parenti DL, Fikrig E, Schoen RT, Nowakowski J, Schmid CH, Laukamp S, Buscarino C, Krause DS. Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group. *N Engl J Med*. 1998;339:209–15.
65. Sigal LH, Zahradnik JM, Lavin P, Patella SJ, Bryant G, Haselby R, Hilton E, Kunkel M, Adler-Klein D, Doherty T, Evans J, Molloy PJ, Seidner AL, Sabetta JR, Simon HJ, Klempner MS, Mays J, Marks D, Malawista SE. A vaccine consisting of recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A to prevent Lyme disease. Recombinant Outer-Surface Protein A Lyme Disease Vaccine Study Consortium. *N Engl J Med*. 1998;339:21–2.
66. Aucott J, Morrison C, Munoz B, Rowe PC, Schwarzwald A, West SK. Diagnostic challenges of early Lyme disease: lessons from a community case series. *BMC Infect Dis*. 2009;9:79.
67. van Dam AP, Kuiper H, Vos K, Widjojokusumo A, de Jongh BM, Spanjaard L, Ramselaar AC, Kramer MD, Jankert J. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestation of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis*. 1993;17:708-17.
68. Maraspin V, Ružić-Sabljić E, Strle F. Lyme borreliosis caused by *Borrelia spielmanii*. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:1177.
69. Strle F, Nelson JA, Ružić-Sabljić E, Cimperman J, Maraspin V, Lotrič-Furlan S, Cheng Y, Picken MM, Trenholme GM, Picken RN. European Lyme borreliosis: 231 culture-confirmed cases involving patients with erythema migrans. *Clin Infect Dis*. 1996;23:61-5.
70. Stanek G, Fingerle V, Hunfeld KP, Jaulhac B, Kaiser R, Krause A, Kristoferitsch W, O'Connell S, Ornstein K, Strle F, Gray J. Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:69-79.

71. Strle F, Stanek G. Clinical manifestations and diagnosis of Lyme borreliosis. *Curr Probl Dermatol.* 2009;37:51-110.
72. Ryffel K, Péter O, Rutti B, Suard A, Dayer E. Scored antibody reactivity determined by immunoblotting shows an association between clinical manifestations and presence of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, and *B. valaisiana* in humans. *J Clin Microbiol.* 1999;37:4086-92.
73. Strle F, Ružić-Sabljić E, Cimperman J, Lotric-Furlan S, Maraspin V. Comparison of findings for patients with *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* isolated from cerebrospinal fluid. *Clin Infect Dis.* 2006;43:704-10.
74. Lotrič-Furlan S, Cimperman J, Maraspin V, Ružić-Sabljić E, Logar M, Jurca T, Strle F. Lyme borreliosis and peripheral facial palsy. *Wien Klin Wochenschr.* 1999;111:970-5.
75. Kristoferitsch W. Neurological manifestations of Lyme borreliosis: clinical definition and differential diagnosis. *Scand J Infect Dis.* 1991;77:64-73.
76. Bacon RM, Kugeler KJ, Mead PS. Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for Lyme disease-United States, 1992–2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2008;57:1-9.
77. Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH Jr. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis.* 2011;2:123-8.
78. Menne B, Ebi KL. Climate change and adaptation strategies for human health. Steinkopff, Darmstadt; 2006. 449 p.
79. Nadelman RB, Nowakowski J, Forseter G, Bittker S, Cooper D, Goldberg N, McKenna D, Wormser GP. Failure to isolate *Borrelia burgdorferi* after antimicrobial therapy in culture-documented Lyme borreliosis associated with erythema migrans: report of a prospective study. *Am J Med.* 1993;94:583-8.

80. Campbell GL, Piesman J, Mitchell PD, Quan TJ, Reed KD, Dennis DT. An evaluation of media for transport of tissues infected with *Borrelia burgdorferi*. *Am J Clin Pathol*. 1994;101:154-6.
81. Carlsson SA, Granlund H, Jansson C, Nyman D, Wahlberg P. Characteristics of erythema migrans in *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii* infections. *Scand J Infect Dis*. 2003;35:31-3.
82. Maraspin V, Ružić-Sabljić, E, Cimperman J, Lotrič-Furlan S, Jurca T, Picken RN, Strle F. Isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from blood of patients with erythema migrans. *Infection*. 2001;29:65-70.
83. Strle F, Nadelman RB, Cimperman J, Nowakowski J, Picken RN, Schwartz I, Maraspin V, Agüero-Rosenfeld ME, Varde S, Lotrič-Furlan S, Wormser GP. Comparison of culture-confirmed erythema migrans caused by *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in New York State and by *Borrelia afzelii* in Slovenia. *Ann Intern Med*. 1999;130:32-6.
84. Kollars TM, Kollars PG, Oliver JH, Masters EJ, Miles D. Effects of two commonly used anesthetics on the in vitro growth of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia garinii*. *J Spirochet Tick-borne Dis*. 1997;4:21-3.
85. Nadelman RB, Nowakowski J, Forseter G, Goldberg NS, Bittker S, Cooper D, Agüero-Rosenfeld M, Wormser GP. The clinical spectrum of early Lyme borreliosis in patients with culture-confirmed erythema migrans. *Am J Med*. 1996;100:502-8.
86. Picken MM, Picken RN, Han D, Cheng Y, Ružić-Sabljić E, Cimperman J, Maraspin V, Lotrič-Furlan S, Strle F. A two year prospective study to compare culture and polymerase chain reaction amplification for the detection and diagnosis of Lyme borreliosis. *Mol Pathol*. 1997;50:186-93.
87. Marconi RT, Samuels DS, Garon CF. Transcriptional analysis and mapping of the ospC gene in Lyme disease spirochetes. *J Bacteriol*. 1993;175:926-32.
88. Schmidt BL. PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10:185-201.

89. Ružić-Sabljić E, Maraspin V, Cimperman J, Lotrič-Furlan S, Strle F. Evaluation of immunofluorescence test (IFT) and immuno (western) blot (WB) test in patient with erythema migrans. *Wien Klin Wochenschr.* 2002;114:586-90.
90. Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;49:13-21.
91. Girschick HJ, Morbach H, Tappe D. Treatment of Lyme borreliosis. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:258.
92. Wormser GP, Nadelman RB, Dattwyler RJ, Dennis DZ, Shapiro ED, Steere AC, Rish TJ, Rahn DW, Coyle PK, Persing DH, Fish D, Luft BJ. Practice guidelines for the treatment of Lyme disease. *Clin Infect Dis.* 2000;31:S1-14.
93. Strle F. Principles of the diagnosis and antibiotic treatment of Lyme borreliosis. *Wien Klin Wochenschr.* 1999;111:911-5.
94. Ružić-Sabljić E, Podreka T, Maraspin V, Strle F. Susceptibility of *Borrelia afzelii* strains to antimicrobial agents. *Int J Antimicrob Agents.* 2005;25:474-8.
95. Johnson RC, Kodner CB, Jurkovich PJ, Collins JJ. Comparative *in vitro* and *in vivo* susceptibilities of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* to cefuroxime and other antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34:2133-6.
96. Sicklinger M, Wienecke R, Neubert U. *In vitro* susceptibility testing of four antibiotics against *Borrelia burgdorferi*: a comparison of results for the three genospecies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1791-3.
97. Dever LL, Jorgensen JH, Barbour AG. *In vitro* antimicrobial susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi*: A microdilution MIC method and time-kill studies. *J Clin Microbiol.* 1992;30:2692-7.
98. Hunfeld KP, Kraiczy P, Wichelhaus TA, Schäfer V, Brade V. Colorimetric *in vitro* susceptibility testing penicillins, cephalosporins, macrolides, streptogramins, tetracyclines,

and aminoglycosides against *Borrelia burgdorferi* isolates. *Int J Antimicrob Agents*. 2000;15:11-7.

99. Levin JM, Nelson JA, Segreti J, Harrison B, Benson CA, Strle F. *In vitro* susceptibility of *Borrelia burgdorferi* to 11 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37:1444-6.

100. Hunfeld KP, Kraiczy P, Wichelhaus TA, Schäfer V, Brade V. New colorimetric microdilution method for in vitro susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi* against antimicrobial substances. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000;19:27-32.

101. Morgenstern K, Baljer G, Norris DE, Kraiczy P, Hanssen-Hübert C, Hunfeld KP. *In vitro* susceptibility of *Borrelia spielmanii* to antimicrobial agents commonly used for treatment of Lyme disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53:1281-4.

102. Preac- Mursic V, Marget W, Busch U, Pleterki-Riegler D, Hagel S. Kill kinetics of *Borrelia burgdorferi* and bacterial findings in relation to the treatment of Lyme borreliosis. *Infection*. 1996;24:9-16.

103. Baradaran-Dilmaghani R, Stanek G. *In vitro* susceptibility of thirty *Borrelia* strains from various sources against eight antimicrobial chemotherapeutics. *Infection*. 1996;24:60-3.

104. Maraspin V, Ružić-Sabljić E, Strle F, Cimperman J, Jereb M, Preac-Mursic V. Persistence of *Borrelia burgdorferi* after treatment with antibiotics. *Alpe Adria Microbiol J*. 1995;3:211-6.

105. [Invitrogen™ | Life Technologies](http://www.lifetechnologies.com/rs/en/home/technical-resources/media-formulation.213.html).

<http://www.lifetechnologies.com/rs/en/home/technical-resources/media-formulation.213.html> (accessed July 20, 2013)

106. Boerner J, Failing K, Wittenbrink MM. *In vitro* antimicrobial susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi*: Influence of test conditions on minimal inhibitory concentration (MIC) values. *Zentralbl Bakteriol*. 1995;283:49-60.

107. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH. Manual of clinical microbiology. American Society of Microbiology Press, Washington; 2003. 2113 p.
108. CLSI. 2010. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement, M100-S20.
109. Callister SM, Case KL, Agger WA, Schell RF, Johnson RC, Ellingson JL. Effects of bovine serum albumin on the ability of Barbour-Stoenner-Kelly medium to detect *Borrelia burgdorferi*. J Clin Microbiol. 1990;28:363-5.
110. Jobe DA, Callister SM, Schell RF. Recovery of *Borrelia burgdorferi* by filtration. J Clin Microbiol. 1993;31:1896-8.
111. Yang X, Popova TG, Goldberg MS, Norgard MV. Influence of cultivation media on genetic regulatory patterns in *Borrelia burgdorferi*. Infect Immun. 2001;69:4159-63.
112. Strle F, Ružić-Sabljić E, Logar M, Maraspin V, Lotrič-Furlan S, Cimperman J, Ogrinc K, Stupica D, Nadelman RB, Nowakowski J, Wormser GP. Comparison of erythema migrans caused by *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia garinii*. Vector Borne Zoonotic Dis. 2011;11:1253-8.
113. Strle K, Drouin EE, Shen S, Khoury JE, McHugh G, Ružić-Sabljić E, Strle F, Steere AC. *Borrelia burgdorferi* stimulates macrophages to secrete higher levels of cytokines and chemokines than *Borrelia afzelii* or *Borrelia garinii*. J Infect Dis. 2009;200:1936-43.
114. Heroldová M, Němec M, Hubálek Z. Growth parameters of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto at various temperatures. Zentralbl Bakteriol. 1998;288:451-5.
115. Reisinger E, Wendelin I, Gasser R, Halwachs G, Wilders-Truschnig M, Krejs G. Antibiotics and increased temperature against *Borrelia burgdorferi* *in vitro*. Scand J Infect Dis. 1996;28:155-7.
116. Berger BW, Johnson RC, Kodner C, Coleman L. Cultivation of *Borrelia burgdorferi* from erythema migrans lesions and perilesional skin. J Clin Microbiol. 1992;30:359-61.

117. Nowakowski J, Schwartz I, Liveris D, Wang G, Eguero-Rosenfeld ME, Girao G, McKenna D, Nadelman RB, Cavaliere F, Wormser GP. Laboratory diagnostic techniques for patients with early Lyme disease associated with erythema migrans: a comparison of different techniques. *Clin Infect Dis*. 2001;33:2023-7.
118. Agger WA, Callister SM, Jobe DA. *In vitro* susceptibilities of *Borrelia burgdorferi* to five oral cephalosporins and ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36:1788-90.
119. Dever LL, Jorgensen JH, Barbour AG. Comparative *in vitro* activities of clarithromycin, azithromycin, and erythromycin against *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37:1704-6.
120. Dever LL, Torigian CV, Barbour AG. *In vitro* activities of the everninomicin SCH 27899 and other newer antimicrobial agents against *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrobial Agents Chemother*. 1999;43:1773-5.
121. Johnson RC, Kodner C, Russell M, Girard D. *In-vitro* and *in-vivo* susceptibility of *Borrelia burgdorferi* to azithromycin. *J Antimicrob Chemother*. 1990;Suppl A:33-8.
122. Strle F, Ružić-Sabljić E, Cimperman J. Erythema migrans: Comparison of treatment with azithromycin, doxycycline and phenoxymethyl penicillin. *J Antimicrob Chemother*. 1992;30:543-50.
123. Luft BJ, Dattwyler RJ, Johnson RC, Luger SW, Bosler EM, Rahn DW, Masters EJ, Grunwaldt E, Gadgil SD. Azithromycin compared with amoxicillin in the treatment of erythema migrans. A double-blind, randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*. 1996;124:785-91.
124. Hassler D, Zöller L, Haude M, Hufnagel HD, Heinrich F, Sonntag HG. Cefotaxime versus penicillin in the late stage of Lyme disease-prospective, randomized therapeutic study. *Infection*. 1990;18:16-20.
125. Luft BJ, Gorevic PD, Halperin JJ, Volkman DJ, Dattwyler RJ. A perspective on the treatment of Lyme borreliosis. *Rev Infect Dis*. 1989;Suppl 6:S1518-25.



126. Kersten, A, Poitschek C, Rauch S, Aberer E. Effects of penicillin, ceftriaxone, and doxycycline on morphology of *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:1127-33.
127. Stiernstedt SH, Tadesse T, Wretling B. Dialysis culture for determination of MIC and MBC of benzylpenicillin against *Borrelia burgdorferi*. *APMIS*. 1999;107:380-382.
128. Reisinger E, Wendelin I, Gasser R. Inactivation of diaminopyrimidines and sulfonamides in Barbour-Stoenner-Kelly medium for isolation of *Borrelia burgdorferi*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1995;14:732-3.
129. Schmidt S, Röck K, Sahre M, Burkhardt O, Brunner M, Lobmeyer MT, Derendorf H. Effect of protein binding on the pharmacological activity of highly bound antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:3994-4000.
130. Pascual A, Martinez-Martinez L, Clavijo MJ, Garcia-Perea MD, Perea EJ. Comparison of three methods for determining in vitro susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolates to imipenem. *J Antimicrob Chemotherapy*. 1997;40:742-3.
131. Levin BR, Udekwu KI. Population Dynamics of Antibiotic Treatment: a Mathematical Model and Hypotheses for Time-Kill and Continuous-Culture Experiments. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:3414-26.
132. Brouqui P, Badiaga S, Raoult D. Eucaryotic cells protect *Borrelia burgdorferi* from the action of penicillin and ceftriaxone but non from the action of doxycycline and erythromycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40:1552-4.
133. Kim KS, Anthony BF. Importance of bacterial growth phase in determining minimal bactericidal concentrations of penicillin and methicillin. *Antimicrob Agents Chemother*. 1981;19:1075-7.
134. Wiuff C, Zappala RM, Regoes RR, Garner KN, Baquero F, Levin BR. Phenotypic tolerance: antibiotic enrichment of noninherited resistance in bacteria populations. *Antimicrobial Agents Chemother*. 2005;49:1483-94.

## 8. PRILOG 1 (SPISAK PUBLIKACIJA)

Rezultati doktorske disertacije publikovani su u vidu **3 rada u međunarodnim časopisima**, od toga **jedan rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21)**, **jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22)** i **jedan rad u međunarodnom časopisu (M23)** kao i u vidu **jednog saopštenja** na međunarodnom naučnom skupu štampano u izvodu (M34).

1. **Veinović G**, Cerar T, Strle F, Lotrič-Furlan S, Maraspin V, Cimperman J, Ružić-Sabljić E (2013): *In vitro* susceptibility of European human *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strains to antimicrobial agents. International Journal of Antimicrobial Agents, 41 (3): 288– 291.(M21)
2. **Veinović G**, Cerar T, Strle F, Ružić-Sabljić E (2013): Influence of MKP medium stored for prolonged periods on growth and morphology of *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. APMIS, Jun 12. doi: **10.1111/apm.12129** (M22)
3. **Gorana Veinovic**, Brankica Filipic and Jelena Stankovic (2013): Isolation, cultivation, and in vitro susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: a review. Archives of Biological Sciences, 65(2): 533-547. (M23)

**Saopštenje na međunarodnom naučnom skupu štampano u izvodu (M34):**

1. **Veinović G**, Cerar T, Strle F, Ružić-Sabljić E, Comparison of growth of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto at different temperature. 12<sup>th</sup> International Conference on Lyme borreliosis and other tick-borne diseases, Ljubljana, Slovenia, 2013.

## **9. BIOGRAFIJA**

Gorana Veinović je rođena 22.03.1981. godine u Prijedoru, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Farmaceutsku fakultet u Beogradu, smer diplomirani farmaceut, upisala je školske 2000/01 i diplomirala u martu 2008. godine.

Pripravnički staž u trajanju od jedne godine, obavila je u Apotekarskoj ustanovi Beograd (apoteka „Palilula“) i na Vojnomedicinskoj akademiji. Položila je državni ispit u Ministarstvu zdravlja Republike Srbije 2009. godine.

Doktorske studije, modul Farmaceutska mikrobiologija, upisala je školske 2008/09. godine. Stipendista BASILEUS-a na Univerzitetu u Ljubljani bila je školske 2009/10. godine (Laboratorija za lajmsku boreliozu i leptospirozu, Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Ljubljani). U istoj laboratoriji je boravila i školske 2010/11. godine u cilju naučno-stručnog usavršavanja.

Gorana Veinović do sada je objavila tri rada u međunarodnim časopisima, od toga jedan rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22) i jedan rad u međunarodnom časopisu (M23) kao i jedno saopštenje na međunarodnom naučnom skupu štampano u izvodu (M34).

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Горана Веиновић

број индекса 7/08

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Утицај услова култивисања на раст, размножавање, преживљавање и морфолошке одлике врста *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* и *Borrelia burgdorferi sensu stricto*“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 16.10.2013.

Горана Веиновић

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Горана Веиновић

Број индекса 7/08

Студијски програм Фармацеутска микробиологија

Наслов рада „Утицај услова култивисања на раст, размножавање, преживљавање и морфолошке одлике врста *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* и *Borrelia burgdorferi sensu stricto*“

Ментор проф.др Јелена Станковић и проф.др Ева Ружић-Сабљић

Потписани/а Горана Веиновић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 16.10.2013.

Горана Веиновић

### Прилог 3

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Утицај услова култивисања на раст, размножавање, преживљавање и морфолошке одлике врста *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* и *Borrelia burgdorferi sensu stricto*“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 16.10.2013.

Јорана Бенитоент