

CERTIFIKOVANÁ METODA

Detekce spirochét z komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato* v environmentálních vzorcích

Metodika byla vypracována, jako výstup výzkumného projektu QK1920258 „Šíření klíšťat a klíšťaty přenášených onemocnění: nová a opomíjená rizika pro domácí a hospodářská zvířata a člověka” v rámci Programu aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství za období 2017-2025, ZEMĚ.

Autoři:

MSc. Natalie Rudenko, PhD.

MSc. Maryna Golovchenko

Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.

Oponenti:

RNDr. Helena Langhansová, Ph.D., Přírodovědecká fakulta JU, České Budějovice

Mgr. Adam Norek, PhD., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

MVDr. Vladimír Brychta, Ministerstvo zemědělství, Praha

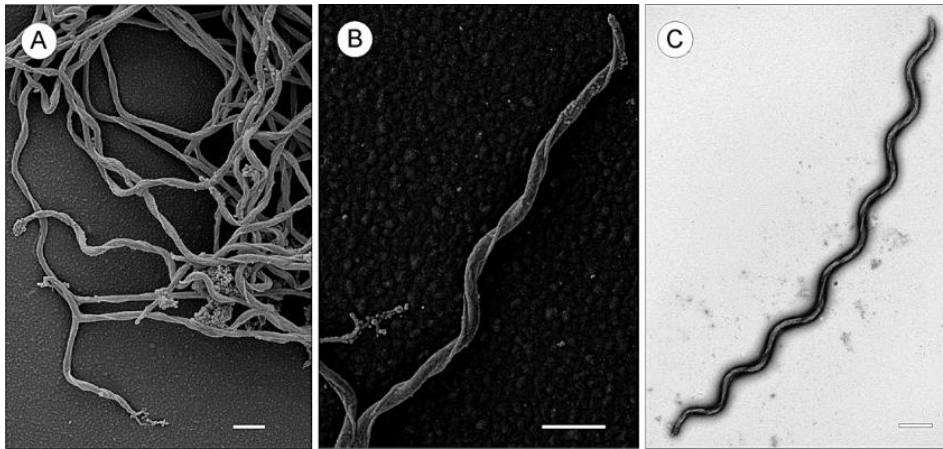
České Budějovice, říjen, 2020

Obsah

Úvod.....	3
Hlavní cíl	5
Popis metody	5
Citlivost navržené metody PCR.....	7
Analýza citlivosti PCR na purifikované DNA borelie (ředicí test).....	7
Analýza citlivosti PCR ve vzorcích obsahujících purifikovanou bakteriální DNA s/bez přítomnosti necílové DNA (spike sample)	8
Závěr	9
Doporučení.....	10
Porovnání originality metody	10
Popis uplatnění metodiky	10
Ekonomické aspekty	11
Seznam použité související literatury	12
Seznam publikací, které předcházely metodice	13
Jména oponentů a názvy jejich organizací.....	13
Dedikace	13

Úvod

Spirochěty z komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato jsou gramnegativní bakterie rozšířené na severní polokouli. Některé druhy z tohoto komplexu patří mezi původce lidské lymfské boreliózy (LB). Borelie jsou vysoce specializované patogenní bakterie cirkulující mezi hostiteli (obratlovci) a vektory (klíšťata). Spirochěty se přenášejí na obratlovce, včetně lidí, v průběhu sání klíštěte spolu s jeho slinami. Sliny obsahují koktejl imunomodulačních molekul. Za hostitele klíšťat a potenciální rezervoárové hostitele spirochét LB bylo v Evropě označeno více než 240 druhů zvířat. Taková rozmanitost hostitelů může přispívat k rozšíření klíšťat, k intenzivní kolonizaci nových oblastí a k založení nových enzootických ložisek LB (Gern, 2008). Vzhledem k současné distribuci, rozmanitosti a invazivnosti druhů borelií v Evropě a k vzrůstajícímu překryvu oblastí výskytu člověka, divokých, domácích zvířat a spirochét, se významně zvyšuje riziko nákazy LB.



Morfologie spirochét *Borrelia burgdorferi* zobrazená v SEM JEOL 7400F při 4 kV (A, B) a TEM JEOL 1010 80 kV (C). Měřítko - 1 μ m.

Rudenko N., Golovchenko M., Vancová M., Clark K., Grubhoffer L., Oliver J.H. Jr. (2016) Isolation of live *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochetes from patients with undefined disorders and symptoms not typical for Lyme diseases. *Clinical Microbiology and Infection* 22: 267.e9-267.e15.

Dnes je na celém světě pojmenováno/známo 22 druhů spirochét z komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.). Nicméně, nové druhy a kmeny jsou nadále popisovány, takže současný počet uznaných druhů pravděpodobně není konečný (Rudenko et al., 2011).

Podle schopnosti borelií infikovat člověka lze 22 druhů spirochét komplexu *B. burgdorferi* s.l. rozdělit do dvou skupin:

- 12 druhů, které dosud nebyly detekovány ani izolovány z lidských vzorků, ale byly detekovány nebo izolovány ze vzorků hostitelů (obratlovců) nebo vektorů (klíšťat): *B. americana*, *B. andersonii*, *B. californiensis*, *B. carolinensis*, *B. chilensis*, *B. finlandensis*, *B. japonica*, *B. lanei*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. sinica* a *B. yangtzensis*.

- 10 druhů s patogenním potenciálem, které byly zjištěny ve všech třídách analyzovaných obratlovců a u více druhů klíšťat. Tyto druhy byly také detekovány nebo izolovány z lidských vzorků: *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. burgdorferi* ss, *B. garinii*, *B. kurtenbachii*, *B. lusitaniae*, *B. mayonii*, *B. spielmanii* a *B. valaisiana*.

V Evropě jsou za převážnou většinu případů onemocnění lidí LB odpovědní *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii* a *B. bavariensis* (Stanek a Strle, 2018). Jiné druhy borelie jako *B. bissettii*, *B. spielmanii*, *B. kurtenbachii*, *B. valaisiana* nebo *B. lusitaniae* mohou být také spojeny s infekcí u člověka (Rudenko et al., 2008; Rudenko et al., 2011, Golovchenko et al., 2016, Rudenko et al., 2016, Stanek a Reiter, 2011). Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) je v Evropě nejrozšířenějším vektorem, parazitujícím na obratlovcích včetně člověka (Gern, 2008).

Pro detekci a identifikaci spirochét LB ze vzorků odebraných v přírodě a v klinických vzorcích byly vyvinuty a použity různé molekulární metody (Rudenko et al., 2009c). Molekulární metody jsou založené na PCR a používají se pro (a) identifikaci a typizaci druhů spirochét v pevných a tekutých vzorcích odebraných v přírodě (tkáně obratlovců, klíšťata) a v klinických vzorcích nebo v kultivovaných izolátech; b) pro detekce ko-infekcí různými druhy borelií z *B. burgdorferi* s.l. komplexu, c) pro potvrzení klinické diagnózy při podezření na LB u lidí. Za experimentálních podmínek je citlivost PCR velmi vysoká a lze detekovat i DNA pouze jedné kopie genu. Citlivé metody molekulární typizace nevyžadují velké množství materiálu ani kultivaci spirochét, a hrají tedy stále významnější roli v detekci různých genotypů patogenních bakterií. Vzhledem k vysoké heterogenitě spirochét LB a složité struktuře genomu borelie je genetická stabilita nejdůležitějším faktorem při výběru správného cíle pro amplifikaci.

Na rozdíl od jiných bakteriálních a virových onemocnění je v případě infekce spirochétami LB počet organismů v klinických a environmentálních vzorcích zdá být extrémně nízký. I když v infikovaných klíšťatech může být až 4500 spirochét, počet genomů v tkáních hostitelů nebo v klinických vzorcích od infikovaných pacientů je obecně nižší než 50 / ml (viz. Rudenko et al., 2009c). Příprava vzorků předcházející PCR vykazuje odlišnou efektivitu a významně ovlivňuje výsledky následného testu. V závislosti na odebraném vzorku byly vyvinuty různé postupy pro optimalizaci amplifikace DNA z *B. burgdorferi* s.l. Citlivost PCR může být negativně ovlivněna degradací DNA borelií během transportu, skladování a zpracování vzorku. Citlivost PCR může být také snížena ztrátami

během přípravy DNA, přítomností cizí DNA (zejména hostitelské DNA) nebo kontaminací inhibičními látkami, které mohou být přítomny v různých klinických vzorcích (krev, moč, synoviální tekutina a mozkomíšní mok).

Hlavní cíl

Hlavním cílem bylo vytvořit citlivou a specifickou PCR metodu pro spolehlivou detekci širokého spektra druhů spirochét z komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato v vzorcích odebraných z přírody za možné přítomnosti inhibitorů PCR reakce nebo významného přebytku necílové DNA.

Popis metody

Vyvinutá laboratorní technologie zahrnuje stejnou metodu přečištění celkové DNA jak z tekutých (sérum, plazma, mozkomíšní mok) tak i z pevných vzorků (klíšťata nebo tkáně obratlovců). Porovnání dostupných komerčních souprav vedlo k výběru izolační soupravy DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Německo) jako nejlepší z hlediska kvality a množství purifikované DNA. Genom spirochét z komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato tvoří lineární chromozom a dále lineární a cirkulární plazmidy (až 21 plazmidů) různých velikostí. Použití soupravy DNeasy Blood and Tissue zajišťuje kompletní vyčištění všech složek genomu spirochét, chromozomální a plazmidové DNA, které jsou významné při detekci spirochét.

Navrhovaná metoda zahrnuje amplifikaci genu umístěného na chromozomu a kódujícího 41 kDa flagelinový protein (flagelin B) spirochét LB. Informace získané ze sekvence amplifikovaného fragmentu genu pro flagelin lze použít v několika následujících aplikacích, které poskytnou významné množství dat z jediného amplikonu. Analýza významného počtu sekvencí genu pro flagelin dostupných v GenBank odhalila vysoké hodnoty jejich podobnosti v rámci druhu LB spirochét, zatímco mezi různými druhy byla zjištěna významná variabilita těchto sekvencí. Sekvence genu fla B jasně rozlišuje spirochéty LB od ostatních známých skupin spirochét (spirochéty vyvolávající návratnou horečku, *B. miyamotoi* nebo *B. lonestari*). Dodatečná analýza polymorfismu délky restričních fragmentů (RFLP) flagelinové sekvence dále umožňuje diferenciaci různých druhů spirochét z celého komplexu. Případně je možná i fylogenetická analýza založená na získané sekvenci genu pro flagelin, která odhaluje příbuznost a vztahy mezi blízkými a vzdálenými kmeny stejného druhu borelie a může být použita pro analýzy původu kmene / druhu, nebo pro „vystopování“ distribuce druhů spirochét spolu s migrací hostitelů (Rudenko et al., 2009a, Rudenko et al., 2009b, Rudenko et al., 2013).

Navrhovaný protokol zahrnuje optimalizovanou, dvou krokovou standardně používanou PCR. „Spacer“ PCR s genově specifickými primery, původně použitými Clarkem a kol. (Clark a kol., 2005), byla prováděna za podmínek, které byly navrženy autory této metody a které byly potvrzeny jako optimální. HotStarTaq Plus Master Mix (Qiagen, Německo) byl použit pro amplifikaci dle protokolu od výrobce. HotStarTaq Plus Master Mix je hotová směs DNA polymerázy HotStarTaq Plus, QIAGEN PCR pufru, MgCl₂ a dNTP. Pipetování je omezeno na minimum, což snižuje možnost chyb a kontaminace a zároveň zajišťuje zvýšenou rychlost, reprodukovatelnost a jednoduchost celé reakce. Reakci lze snadno a rychle provést i při pokojové teplotě za využití master-mix směsi, kdy se do každé zkumavky PCR přidá 10 µl master-mix směsi HotStarTaq Plus a následně se přidá 10 µl primerů a templátové DNA zředěné ve vodě bez RNázy (tato voda je dodávána spolu se soupravou).

První krok PCR (spacer PCR)

PCR reakce (20 µl):

10 µl HotStarTaq Plus Master Mix (Qiagen)
1 µl primeru Flagellin out 1 (10µM)
1 µl primeru Flagellin out 2 (10µM)
3 µl genomové DNA
5 µl ddH₂O bez DNAzy

Primery pro první krok (spacer PCR)

Flagellin out 1 (5'- AARGAATTGGCAGTTCAATC-3 '), kde R je buď A nebo G.
Flagellin out 2 (5'-GCATTTTCWATTTTAGCAAGTGATG-3 '), kde W je buď A nebo T.

Podmínky PCR (spacer PCR):

- 1) počáteční denaturace 95 °C - 5 minut
- 2) 35 cyklů [denaturace 95 °C po dobu 30 sekund; nasedání primerů 52 °C po dobu 30 sekund; elongace 72 °C po dobu 30 sekund]
- 3) závěrečná elongace 72 °C po dobu 10 minut následovaná + 4 °C na dobu neurčitou.

„Spacer“ amplicon flaB je 497bp dlouhý fragment genu kódujícího flagelin borelie.

Druhý krok PCR (nested PCR)

PCR reakce (20 µl):

10 µl HotStarTaq Plus Master Mix (Qiagen)

1 µl primeru Flagellin inn 1 (10µM)
 1 µl primeru Flagellin inn 2 (10µM)
 5 µl spacer PCR produktu (z první reakce)
 3 µl H₂O bez DNázy

Primery pro druhý krok (nested PCR)

Flagellin inn 1 (5'-ACATATTCAGATGCAGACAGAGGGTTCTA-3 ')
 Flagellin inn 2 (5'-GAAGGTGCTGTAGCAGGTGCTGGCTGT-3 ')

Podmínky PCR (nested PCR):

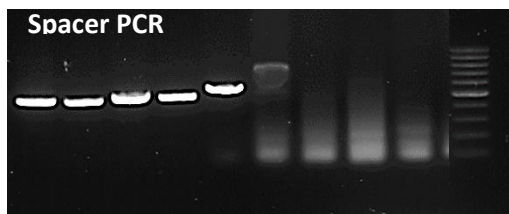
- 1) počáteční denaturace 95 °C - 5 minut
- 2) 25 cyklů [denaturace 95 °C po dobu 30 sekund; nasedání primerů 55 °C po dobu 30 sekund; elongace 72 °C po dobu 30 sekund]
- 3) závěrečná elongace 72 °C po dobu 10 minut následovaná + 4 °C na dobu neurčitou.

„Nested“ amplicon *flaB* je 389bp dlouhý fragment genu kódujícího flagelin borelie.

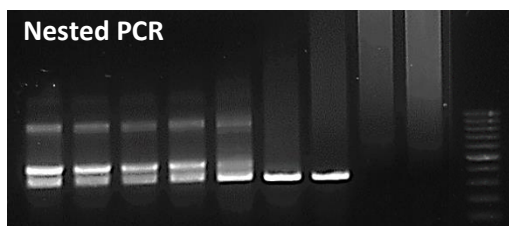
Citlivost navržené metody PCR

Analýza citlivosti PCR na purifikované DNA borelie (ředicí test).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 M



1* 2* 3* 4* 5* 6* 7* 8 9 M

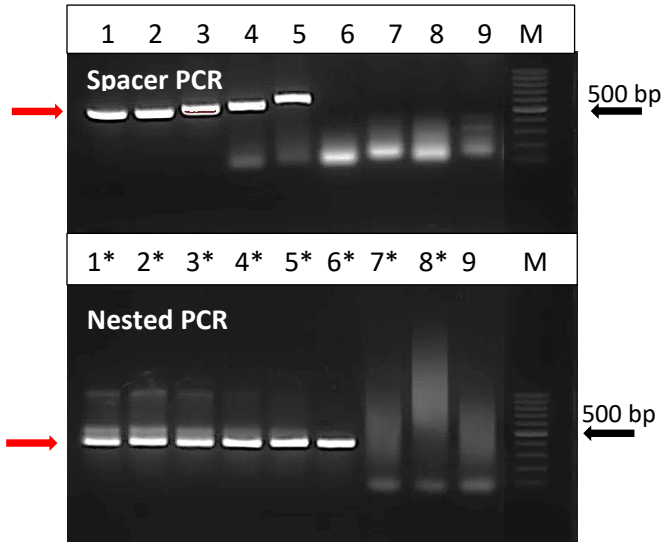


Spacer *flaB* PCR: 1- 60 ng; 2- 6 ng; 3- 600 pg;
 4-60 pg; 5- 6 pg; 6- 600 fg; 7- 60 fg; 8- 6 fg;
 9 -0.6 fg.

Dolní gel: Nested *flaB* PCR **s 5 µl** spacerového ampliconu jako templátu.

Nested PCR potvrzuje přítomnost DNA borelie ve vzorku, kde bylo přítomno 60 fg začátečního templátu (jamky 7 a 7*)

V případě použití 5 µl spacerového produktu jako templátu pro nested PCR, je možné potvrdit přítomnost DNA borelie ve vzorku, kde bylo přítomno 60 fg výchozího templátu a které bylo pod úrovní vizuální detekce po jednokrokové amplifikaci (jamky 7 a 7*). Použití 5 µl spacerového ampliconu v nested PCR zvyšuje citlivost reakce stokrát.



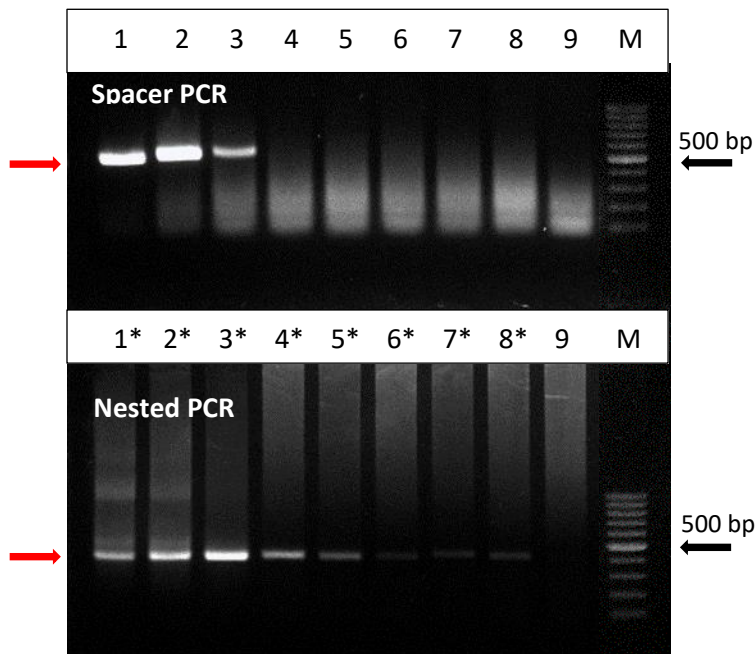
Spacer *flaB* PCR: 1- 60 ng; 2- 6 ng; 3- 600 pg;
4- 60 pg; 5- 6 pg; 6- 600 fg; 7- 60 fg; 8- 6 fg;
9- 0.6 fg.

Dolní gel: Nested *flaB* PCR **s 1 μ l** spacerového
amplikonu jako templátu.

Nested PCR potvrzuje přítomnost DNA borélie
ve vzorku, kde bylo přítomno 600 fg začátečního
templátu (jamky 6 a 6 *)

V případě použití 1 μ l spacerového produktu jako templátu v nested PCR, druhá (nested) PCR potvrzuje přítomnost DNA borélie ve vzorku, kde bylo přítomno 6 pg výchozího templátu a které bylo pod úrovní vizuální detekce po jedнокrokové amplifikaci (jamky 6 a 6 *). Použití 1 μ l spacerového amplikonu v nested PCR zvyšuje citlivost reakce 10 krát.

Analýza citlivosti PCR ve vzorcích obsahujících purifikovanou bakteriální DNA s/bez přítomnosti necílové DNA (spike sample)



Spacer *flaB* PCR na uměle vytvořeném vzorku.
DNA borelie: 1- 60 ng; 2- 6 ng; 3- 600 pg;
4- 60 pg; 5- 6 pg; 6- 600 fg; 7- 60 fg; 8- 6 fg; 9-
0,6 fg. Každá reakce obsahovala dalších 500 ng
necílové DNA (inhibitor).

Dolní gel: Nested *FlaB* PCR **s 5 μ l** spacerového
amplikonu jako templátu.

Nested PCR potvrzuje přítomnost DNA borélie
ve vzorku, kde bylo přítomno 6 fg začátečního
templátu (jamky 8 a 8 *)

Při přípravě amplifikační reakce, 500 ng necílové DNA (inhibitoru), což v našem případě bylo průměrné množství celkové DNA z 1 nenasátého dospělého klíštěte *I. ricinus*, bylo přidáno ke každé PCR s ředící řadou DNA borelií (od 60 ng / reakce do 0,6 fg / reakce). Výsledkem PCR reakce vzorků v přítomnosti inhibitoru byla amplifikace fragmentu genu kódujícího flagelin v případě, že koncentrace čisté boreliové DNA v reakci (před přidáním necílové DNA) dosahovala 600 pg.

Čtyřnásobné naředění amplikonu spacerové reakce obohacené inhibitorem a její následné použití jako templátu v nested PCR, zvýšilo citlivost PCR 10^5 krát, což vedlo k amplifikaci fla B specifického amplikonu v reakci s 6 fg počáteční DNA a které bylo pod úrovní vizuální detekce po jedнокrokové amplifikaci (jamky 8 a 8 *).

Výsledky potvrzují, že přítomnost necílové DNA v množství přibližně 125 ng na reakci neinhibuje amplifikaci PCR za použití specifických primerů pro flaB při daných PCR podmínkách.

Závěr

Podle databáze GenBank jsme provedli analýzu zvolených PCR primerů specifických pro flaB borelie a zjistili 100% identitu těchto sekvencí mezi druhy spirochét z komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato, které jsou v této veřejné databázi dostupné.

In silico analýza zvolených primerů zaměřených na gen kódující protein flagellin B potvrdila jejich specifitu vůči sekvencím spirochét pouze z komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Kontrolní reakce byly provedeny s použitím DNA spirochét vyvolávajících návratnou horečku (*Borrelia miyamotoi*), které by mohly rovněž být přítomny v klíštětech. Tato PCR nevedla k amplifikaci žádného fragmentu DNA, což potvrzuje výsledky *in silico* analýzy.

Hmotnost 1 genomu LB spirochety odpovídá přibližně 2 fg DNA. Spacer PCR se zvolenými primery za navrhovaných podmínek vedla k pozitivní amplifikaci fragmentu genu pro flagelin v reakci s templátem už od 6 pg bakteriální DNA .

Výsledky nested PCR potvrdily, že zavedená metoda za daných podmínek umožňuje detekovat přítomnost už **3 spirochét (přibližně 6 fg DNA borelie)** ve vzorku, a to i za přítomnosti nadměrného množství necílové DNA klíštěte.

Přítomnost necílové DNA ve vzorku v množství přibližně 125 ng na reakci a nižším, neinhibuje amplifikaci fragmentu specifického pro flaB, což činí tento protokol vhodným pro analýzy různých typů vzorků odebraných jak z hostitelů tak vektorů a pro spolehlivou detekci širokého spektra druhů spirochét z komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Doporučení

Pro detekci spirochét komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato pomocí navrženého PCR protokolu s primery pro gen kódující flagelin B protein spirochét, je výrazně doporučeno použití dvoukrokové PCR (spacer a nested).

- a) první krok (spacer) umožňuje zvýšení množství DNA hledaného patogenu, které by mohlo být přítomno ve vzorku (vzorcích) v malém množství, a které by mohlo být pod úrovní vizuální detekce i po jedнокrokové amplifikaci;

- b) druhý krok (nested) zvyšuje citlivost detekční techniky, zejména ředěním necílové DNA a použitím již amplifikované cílové sekvence (specifické) jako templátu.

Počáteční ředění DNA purifikovaného vzorku NENÍ doporučeno. Je známo, že množství DNA patogenu v vyšetřovaném vzorku bývá v případě infekce LB spirochétou velice nízké. Počáteční ředění purifikované celkové DNA vzorku může snížit toto stopové množství cílové DNA na hladinu nižší než jakou je možné detekovat pomocí standardní PCR.

Porovnání originality metody

Použití jednotného protokolu pro purifikaci genomové DNA z environmentálních vzorků zkracuje čas potřebný pro přípravu vzorků. Souprava DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Německo) nebyla nikdy předtím použita k purifikaci genomové DNA z tvrdých klíšťat. V rámci optimalizace protokolu pro čištění genomové DNA z klíšťat jsme navrhli nový počáteční krok: inkubaci nakrájených klíšťat v roztoku Pufu 1 a proteinázy K při 56°C přes noc. Po tomto přidaném kroku byl použit standardní protokol od výrobce.

Použití spacer a nested PCR zvyšuje citlivost detekce spirochetální DNA v přítomnosti významného přebytku necílového templátu, který inhibuje reakci. Pro snížení negativního účinku způsobeného přebytkem necílového templátu jsme použili desetinné ředění vzorků. Pro zvýšení citlivosti jsme použili takzvanou 2 krokovou PCR. Zmenšili jsme počet amplifikačních cyklů, abychom snížili možnou nespecifickou amplifikaci. Po mnoha zkouškách tohoto protokolu můžeme potvrdit spolehlivost a citlivost zavedené metody.

Popis uplatnění metodiky

Navrhovaná metoda detekce spirochét z komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato je vyvinuta pro analýzu celkové DNA purifikované z tvrdých klíšťat (Ixodidae), séra a nebo pevných zvířecích tkání (stejně jako i vzorků lidského původu) ve všech výzkumných, lékařských, veterinárních, zemědělských či jiných laboratořích se základním vybavením. Tato metoda je navržena tak, aby zajistila spolehlivou detekci spirochét lymfské boreliózy

v tekutých a pevných živočišných tkáních a v klíšťatech. Následné sekvenování amplifikovaných fragmentů (pokud je taková analýza vyžadována) umožňuje přesnou identifikaci druhů spirochét z komplexu *B. burgdorferi* sensu lato bez dalšího metodologického zapojení. Nabízená PCR v konvenčním provedení eliminuje potřebu použití drahého laboratorního vybavení (Real time PCR cycler) a může ji provádět kdokoli, kdo ovládá základní protokoly PCR. Navrhovaný protokol umožňuje jak analýzu studovaných vzorků s jednoduchou detekcí „pozitivní / negativní“, tak je schopen poskytnout i rozsáhlá vědecká data bez použití dalších laboratorních metod (*in silico* analýzy).

Ekonomické aspekty

Zavedení nabízeného protokolu v jakékoli laboratoři se základním vybavením a personálem, který ovládá základní metody molekulární biologie. Pro jeho implementaci nevyžaduje žádné další investice. Protokol lze snadno přizpůsobit materiálu, se kterým pracuje testovací laboratoř a kapacitě jejích zaměstnanců. Pro výpočet průměrné ceny analýzy 1 vzorku jsme vycházeli z cen stanovených pro rok 2020 dodavatelskými společnostmi.

Základní analýza

Izolace DNA (DNasy blood and tissue kit, kat. Č. 69506 Qiagen) - 75 Kč

PCR mastermix (HotStarTaq Plus Master Mix Kit, kat. Č. 203645, Qiagen) - 15 Kč

Spotřební materiál (plast, agaróza, pufr) - 50 Kč

Základní analýza - cena celkem: 140 Kč/vzorek

Rozšířená analýza (volitelně)

Izolace amplikonu z agarózy (odstředivé filtrační jednotky Ultrafree-DA kat. Č. 42600, MERCK) - 60 Kč

Sekvenování - 100 Kč (SeqMe s.r.o.)

Rozšířená analýza - cena celkem: 300 Kč/vzorek

Seznam použité související literatury

Clark, K., A. Hendricks, and D. Burge. 2005. Molecular identification and analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lizards in the southeastern United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:2616–2625.

Gern, L., 2008. *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the agent of Lyme borreliosis: life in the wilds. *Parasite* 15, 244-247.

Gern, L., Rouvinez, E., Toutoungi, L.N., and Godfroid, E. (1997). Transmission cycles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato involving *Ixodes ricinus* and/or *I. hexagonus* ticks and the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*, in suburban and urban areas in Switzerland. *Folia Parasitol (Praha)* 44, 309–314.

Golovchenko M., Vancová M., Clark K., Oliver J.H. Jr., Grubhoffer L., Rudenko N. (2016) A divergent spirochete strain isolated from a resident of the southeastern United States was identified by multilocus sequence typing as *Borrelia bissettii*. *Parasites & Vectors* 9: 68. DOI: 10.1186/s13071-016-1353-4

Rudenko N, Golovchenko M, Vancova M, Clark K, Grubhoffer L, Oliver JH, Jr. Isolation of live *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochetes from patients with undefined disorders and symptoms not typical for Lyme diseases. *Clin Microbiol Infect* (2016) 22, e9-267. e9-15.

Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L., Oliver J.H. Jr. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. 2011, *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2(3):123-128.

Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L., Oliver J.H., Jr. *Borrelia carolinensis* sp nov., a New (14th) Member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from the South-eastern region of the United States. 2009a, *Journal of Clinical Microbiology*, 47(1): 134-141.

Rudenko N., Golovchenko M., Hönig V., Mallátová N., Krbková L., Mikulášek P., Fedorova N., Belfiore N.M., Grubhoffer L., Lane R.S., Oliver J.H. Jr. (2013) Detection of *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto ospC Alleles Associated with Human Lyme Borreliosis Worldwide in Non-Human-Biting Tick *Ixodes affinis* and Rodent Hosts in Southeastern United States. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 1444-1453.

Rudenko N., Golovchenko M., Lin T., Gao L., Grubhoffer L., Oliver J.H., Jr. Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, *Borrelia americana* sp nov. 2009b, *Journal of Clinical Microbiology*, 47(12):3875-3880.

Rudenko N., Golovchenko M., Mokráček A., Piskunová N., Ruzek D., Mallatová N., Grubhoffer L. Detection of *Borrelia bissettii* in cardiac valve tissue of a patient with endocarditis and aortic valve stenosis in the Czech Republic. 2008, *Journal of Clinical Microbiology*, 46(10):3540-3543

Rudenko N., Golovchenko M., Oliver Jr. J.H., Grubhoffer L. 2009c. BORRELIA-Chapter 23. In: Dongyou Liu (Ed.), *Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens*. Taylor & Francis CRC Press. pp. 1155-1168.

Stanek, G., and Reiter, M. (2011). The expanding Lyme Borrelia complex--clinical significance of genomic species? Clin. Microbiol. Infect. 17, 487–493.

Stanek, G., and Strle, F. (2018). Lyme borreliosis—from tick bite to diagnosis and treatment. FEMS Microbiol Rev 42, 233–258.

Seznam publikaci, které předcházely metodice

K. Majerová, V. Hönig, Houda M., P. Papežík, M. Fonville, H. Sprong, N. Rudenko, M. Golovchenko, B. Černá Bolfíková, P. Hulva, D. Růžek, L. Hofmannová, J. Votýpka, D. Modrý. 2020. „Hedgehogs, squirrels and blackbirds as sentinel hosts for active surveillance of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in urban and rural environments“, *Microorganisms* 2020, 8(12), 1908; <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121908>

Jmena oponentů a názvy jejich organizací

RNDr. Helena Langhansová, Ph.D.,

Přírodovědecká fakulta JU, Branišovská 31, 37005, České Budějovice, Česká republika

Mgr. Adam Norek, PhD.,

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 296/70, 621 00 Brno, Česká republika

MVDr. Vladimír Brychta,

Ministerstvo zemědělství, Těšnov 65/17, 110 00, Praha 1, Česká republika

Dedikace

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu za podpory Ministerstva Zemědělství číslo QK1920258 s názvem „Šíření klíšťat a klíšťaty přenášených onemocnění: nová a opomíjená rizika pro domácí a hospodářská zvířata a člověka“.