

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Analýza imunogenních vlastností
rekombinantních antigenů spirochety
*Borrelia burgdorferi***

Diplomová práce

Bc. Michaela Sopko

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

Vedoucí práce: Mgr. Michal Křupka, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu navazujícího magisterského studia pod vedením Mgr. Michala Křupky, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala panu Mgr. Michalu Křupkovi, Ph.D. za cenné rady, trpělivost a čas, který mi věnoval při psaní této diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat celému kolektivu Ústavu imunologie LF UPOL za příjemné pracovní prostředí. Děkuji také pracovníkům Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně za přípravu vakcín použitých v experimentální části této diplomové práce. Tato práce byla podpořena vnitřním grantem UP IGA_LF_2015_009.

Souhrn

Ve své diplomové práci jsem se zabývala izolací a purifikací rekombinantního antigenu OspA spirochety *Borrelia burgdorferi* a vyhodnocením protilátkové odpovědi po experimentální vakcinaci laboratorních myší.

V teoretické části jsem se věnovala popisu onemocnění zvaného lymeská borelióza, a to mikrobiologii etiologické agens *B. burgdorferi* a jejím Osp antigenům, patogenezí, příznakům, diagnostice, prevenci, léčbě a epidemiologii. Zmínila jsem i problematiku vývoje vakcín proti tomuto onemocnění. V další části rešerše jsem popsala přípravu a izolaci rekombinantních proteinů, a to především pomocí His-tagu. Poslední část teoretického úvodu jsem věnovala tématu přítomnosti endotoxinu v roztocích rekombinantních proteinů a jeho odstranění.

V praktické části jsem se zabírala izolací a purifikací rekombinantního proteinu OspA pomocí HisPur Ni-NTA a Ni-NTA agarózy, zakoncentrováním roztoku proteinu a odstraněním endotoxinu. Po vakcinaci experimentálních myší jsem provedla vyhodnocení protilátkové odpovědi pomocí ELISA testů. Celkem bylo vakcinováno sedm skupin experimentálních myší po pěti jedincích. Každá skupina byla imunizována jiným druhem vakcíny, a to vakcínou skládající se z volného OspA v roztoku, OspA navázaného na lipozomy, OspA navázaného na lipozomy s adjuvans MT02, OspA navázaného na lipozomy s MT03, OspA navázaného na lipozomy s MT05, OspA navázaného na lipozomy s MT06 a OspA navázaného na lipozomy s MT07.

Celkově nejvyššími hodnotami koncentrace stanovovaných imunoglobulinů se vyznačovala skupina experimentálních myší očkováná rekombinantním anigenem OspA navázaným na lipozomy s MT06.

Summary

In my diploma thesis, I have focused on isolation and purification of the recombinant antigen OspA of *Borrelia burgdorferi* spirochete and with assessment of antibody response after experimental vaccination of laboratory mice.

In the theoretical part, I have focused on describing an illness called Lyme disease, namely microbiology of the etiological *B. burgdorferi* agent and its Osp antigens, pathogenesis, symptoms, diagnostics, prevention, treatment and epidemiology. I have also included the issues connected to developing vaccines against this illness. In the next part of my research, I have described preparation and isolation of recombinant proteins, especially using His-tag. I have dedicated the last part of the theoretical introduction to the topic of endotoxin in recombinant protein solution and of its removal.

In the practical part, I have focused on the isolation and purification of the recombinant OspA protein using HisPur Ni-NTA and Ni-NTA agarose, on concentrating the protein solution and removing the endotoxin. After the vaccination of the experimental mice, I have performed an assessment of the antibody response using ELISA tests. In total, seven groups of five individuals of experimental mice was vaccinated. Each group was immunized with a different type of vaccine, these being a vaccine composed of a free OspA in a solution, OspA bound on liposomes, OspA bound on liposomes with MT02 adjuvant, OspA bound to liposomes with MT03, OspA bound on liposomes with MT05, OspA bound on liposomes with MT06 and OspA bound on liposomes with MT07.

In total, the highest values of determined iminoglobulines concentration appeared with the group of mice vaccinated by the OspA recombinant antigen bound to liposomes with MT06.

Obsah

1. Úvod	7
2. Cíle práce	8
3. Literární přehled	9
3.1 Lymfská borelióza.....	9
3.1.1 <i>Borrelia burgdorferi</i>	9
3.1.1.1 Osp antigeny	14
3.1.2 Patogeneze a příznaky	15
3.1.3 Diagnostika	19
3.1.4 Prevence a léčba.....	21
3.1.5 Epidemiologie	23
3.1.6 Vakcíny proti lymfské borelióze	25
3.2 Rekombinantní proteiny	29
3.2.1 His-tag.....	30
3.2.2 Endotoxin a jeho odstranění	30
4. Materiál a přístrojové vybavení	32
4.1 Biologický materiál.....	32
4.2 Použité chemikálie.....	32
4.3 Použité protilátky	33
4.4 Použité roztoky	34
4.5 Laboratorní přístroje	40
4.6 Spotřební materiál.....	41
5. Metodika	42
5.1 Izolace a purifikace rekombinantního antigenu OspA	42
5.2 SDS-PAGE – příprava gelu a vzorků, vlastní elektroforetická separace a vizualizace výsledků	43
5.3 Dialýza	44
5.4 Zakoncentrování roztoku proteinu.....	44
5.5 Měření koncentrace proteinu BCA metodou	45
5.6 Zjištění přítomnosti a odstranění endotoxinu	45
5.7 Vakcinace experimentálních myší, odběry krve a získání séra	46
5.8 ELISA test.....	47
6. Výsledky	50
7. Diskuze	59
8. Závěr	62
9. Seznam použitých zkratk	64
10. Seznam literatury	67

1. Úvod

Lymfská borelióza je onemocnění způsobené spirochetami druhového komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Jedná se o nejčastěji se vyskytující chorobu přenášenou členovci. V humánní medicíně dosud není k dispozici žádná vakcína, která by poskytla dostatečnou ochranu proti lymfské borelióze. Jedinou možnou prevencí dosud zůstává vyhnout se kontaktu s přenašečem *B. burgdorferi*, klíštětem.

Ve své diplomové práci se budu zabývat izolací a purifikací rekombinantního antigenu OspA, který je antigenem *B. burgdorferi*. Následně budu vyhodnocovat imunitní odpovědi po vakcinaci experimentálních myší tímto rekombinantním antigenem OspA. Výsledky experimentální části této diplomové práce by měly pomoci odhalit nejvhodnější složení vakcíny, která by v budoucnosti mohla být využita pro imunizaci ve veterinární, nebo také v humánní medicíně.

2. Cíle práce

- Shromáždění dostupných literárních zdrojů
- Zpracování rešerše na dané téma
- Izolace a purifikace rekombinantního antigenu OspA spirochety *Borrelia burgdorferi* pomocí chromatografických metod
- Vyhodnocení protilátkové odpovědi po vakcinaci experimentálních myší

3. Literární přehled

3.1 Lymská borelióza

Lymská borelióza je nejčastěji se vyskytující nemoc, kterou přenášejí členovci, v rámci Evropy a Spojených států amerických. Typické příznaky této choroby byly poprvé popsány již na konci 19. století (Křupka *et al.*, 2011).

Steere *et al.* (1978) popisují výskyt lymské artritidy, tehdy nového zánětlivého onemocnění kloubů, vyskytující se na jihovýchodě státu Connecticut nejméně od roku 1972. Epidemiologickou analýzou bylo zjištěno, že většina pacientů žila v hustě zalesněných oblastech a nejvíce nových případů bylo zaznamenáno během léta a časného podzimu, což je v korelaci s výskytem klíšťat. U 25 % pacientů se před nástupem artritidy objevila kožní léze *erythema chronicum migrans*, která byla v Evropě již dříve dávána do souvislosti s kousnutím klíštěte. Steere *et al.* (1978) sledovali pacienty, u kterých se objevila lymská artritida, *erythema chornicum migrans* nebo oba příznaky najednou. U těchto pacientů pozorovali také další příznaky, a to malátnost, únavu, zimnici, horečku bolesti hlavy nebo ztuhlý krk. Někteří z pacientů si také vzpomněli na kousnutí klíštěte před objevením příznaků. Byla vyslovena hypotéza, že všechny příznaky jsou projevy jedné nemoci, která je přenášena klíšťaty, a to především druhem *Ixodes scapularis* (Steere *et al.* 1978).

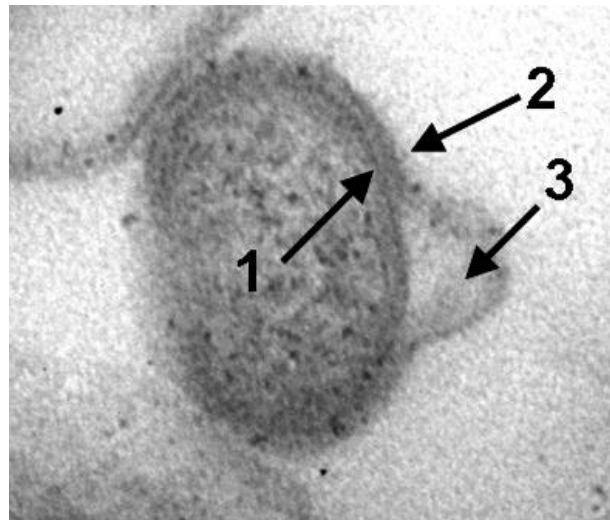
K objevu etiologické agens lymské boreliózy došlo až na počátku 80. let 20. století, kdy Burgorfer *et al.*, (1982) izolovali spirochety vázající imunoglobuliny pacientů zotavujících se z tohoto onemocnění. Zároveň pozorovali vývoj kožní léze připomínající *erythemu chronicum migrans* u králíků, na nichž byla infikovaná klíšťata *Ixodes dammini* krmena.

3.1.1 *Borrelia burgdorferi*

Rod *Borrelia* náleží do kmene spirochety (Spirochaetes). Podle stavby buněčné stěny se jedná o gramnegativní bakterie (Sedláček, 2007). Všechny rody kmene spirochety sdílejí typické morfologické vlastnosti, a to vícevrstevný vnější plášť nebo vnější membránu, protoplazmatický válec skládající se z peptidoglykanové vrstvy, cytoplazmy a cytoplazmatické membrány, a periplazmatické bičíky, které jsou umístěny mezi vnějším pláštěm a protoplazmatickým válcem (viz Obrázek č. 1) (Johnson *et al.*,

1984). Dalšími pro člověka patogenními spirochetami jsou bakterie rodu *Leptospira*, a to *L. interrogans* způsobující leptospirózu a *Treponema*, konkrétně *T. pallidum*, etiologická agens syfilidy (Nester *et al.*, 1995).

Obrázek č. 1: Řez spirochetou *Borrelia burgdorferi* zobrazený pomocí transmisní elektronové mikroskopie. 1: vnitřní membrána, 2: vnější membrána, 3: periplazmatický prostor s bičíky (foto: Radko Novotný, LF UPOL, archiv školitele).



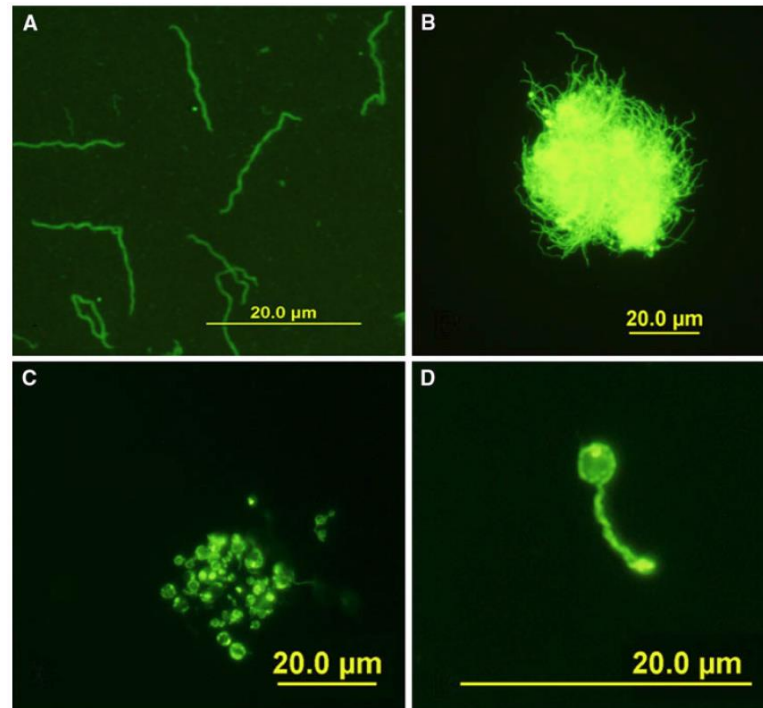
Komplex *Borrelia burgdorferi sensu lato* je skupina bakterií čítající 18 druhů. Většina druhů borelií se vyskytuje pouze na daném území. Pro 11 druhů, a to *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. garinii*, *B. japonica*, *B. lusitaniae*, *B. sinica*, *B. spielmanii*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. valaisiana* a *B. yangtze*, je typickým výskytem pouze Evropa anebo Asie. U druhů *B. americana*, *B. andersonii*, *B. californiensis*, *B. carolinensis* a *B. kurtenbachii* se předpokládá výskyt pouze na území Spojených států amerických, avšak *B. carolinensis* se spolu s *B. bissettii* a *B. burgdorferi sensu stricto* vyskytuje nejen v USA, ale také v Evropě. Z celkového počtu 18 druhů borelií je člověk běžně infikován třemi druhy způsobujícími lymskou boreliózu, a to *B. burgdorferi s. s.*, *B. afzelii* a *B. garinii*. Donedávna se mělo za to, že v USA způsobuje lymskou boreliózu pouze *B. burgdorferi s. s.* (Rudenko *et al.*, 2011), avšak v poslední době zde byly objeveny další druhy *B. burgdorferi s. l.* způsobující toto onemocnění, a to *B. mayonii* (Pritt *et al.*, 2016) a druh podobný *B. bissettii* (Rudenko *et al.* 2016).

Buňky borelií se vyznačují tenkým spirálovitým tvarem o délce 4 – 30 μm a šířce 0,2 μm . Na buňce se nachází 4 – 15 závitů vzdálených od sebe 2 μm . Typickým znakem zástupců komplexu *B. burgdorferi s. l.* je 5 – 12 bičíků umožňujících pohyb, který vzniká natahováním a smršťováním těla nebo rotací kolem podélné osy. Bičíky se vypínají z bazálních disků v cytoplazmatické membráně, nacházejí se pod vnější

buněčnou stěnou a obtáčí tělo borelie po celé jeho délce (Hulínská, 2013a). *Borrelia burgdorferi* je schopná se pohybovat jak v málo viskózních, tak ve vysoce viskózních médiích gelovité konzistence, která zastavují pohyb většiny bakterií. Během pohybu dochází k asymetrickému pohybu dvou skupin bičíků. To znamená, že jedna skupina bičíků se pohybuje po směru hodinových ručiček, zatímco druhá skupina proti směru hodinových ručiček (Charon *et al.*, 2009). Největší změřená hodnota rychlosti borelie byla naměřena v plazmě hepatizované lidské krve obohacené o krevní destičky, na kterých se borelie pohybovala. Rychlost byla stanovena na 2800 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Malawista *et de Boisfleury Chevance*, 2008).

B. burgdorferi se ve tkáních může vyskytovat také ve formě cyst (viz Obrázek č. 2). Přeměna helikální formy na cystickou byla *in vitro* pozorována jako reakce na přítomnost antibiotik, změny pH, přebytek metabolitů, stárnutí nebo přítomnost protilátek (Brorson *et Brorson*, 1998). Mezi další atypické formy spirochet borelií patří struktury ve tvaru prstence nebo smyčky, váčky a masy podobné koloniím (viz Obrázek č. 2) (Miklossy *et al.*, 2008). Cysty borelií mají sníženou metabolickou aktivitu, čímž dochází k možné rezistenci vůči antibiotikům. Účinnost některých antibiotik totiž vyžaduje aktivní metabolismus bakterie, jelikož antibiotika cílí na procesy tvorby proteinů nebo složek buněčné stěny a svým působením je inhibují. Tento fakt může vysvětlovat, proč je lymfská borelióza u některých pacientů špatně léčitelná a vedl k také k teorii, že díky tomu může být infekce dočasně nečinná a může dojít k reaktivaci onemocnění po léčbě antibiotiky (Brorson *et Brorson*, 1997). Zpětná přeměna z cystické formy do formy helikální byla prokázána jak *in vitro*, tak *in vivo* (Miklossy *et al.*, 2008).

Obrázek č. 2: Morfologické formy *Borrelia burgdorferi* barvené karboxyfluoresceinsukcinimydylesterem a zobrazené ve fluorescenčním mikroskopu. A: helikální forma, B: struktura podobná koloniím, C: cystická forma, D: přechod mezi cystickou a helikální formou (foto: Michal Křupka).



Genom *Borrelia burgdorferi* kmene B31 (nominotypický kmen) je tvořen lineárním chromozomem o délce 910 725 párů bází, 12 lineárními a 9 cirkulárními plazmidy, což představuje dosud největší popsáný počet extrachromozomálních molekul DNA ze všech bakterií. Celková délka extrachromozomální DNA je 610 694 párů bází (Casjens *et al.*, 2000). Na lineárním chromozomu se nachází celkem 853 čtecích rámců, které obsahují geny kódující základní sadu proteinů nutných k replikaci DNA, transkripci a translaci, proteiny významné pro transport rozpuštěných látek a proteiny pro kontrolu a regulaci energetického metabolismu (Fraser *et al.*, 1997).

Většina genů nesených na plazmidech patří do jedné ze 161 paralogních genových rodin a 107 těchto genových rodin obsahuje alespoň jeden gen nesený na plazmidu. Více než 90 % plazmidových genů je specifických pouze pro rod *Borrelia*, což naznačuje, že jejich produkty jsou zodpovědné za specializované funkce. V genomu se nachází také 167 pseudogenů. Takto velké množství mutačně poškozených genů je u bakterií velice neobvyklé. Mezi plazmidy dochází k přestavbám, což vede ke značnému zvyšování variability (Casjens *et al.*, 2000). Plazmidy obsahují geny kódující povrchové antigeny (Osp antigeny), které jsou nezbytné pro infekci hostitele. Vlivem opakované

infekce nebo působení antibiotik může docházet ke ztrátě krátkých plazmidů, a tím pádem i Osp antigenů. Důležitou částí plazmidů borelií jsou mezidruhově i vnitrodruhově rozdílné regulační geny (Bdr geny), jejichž produkty jsou uloženy v cytoplasmě a není možné je ovlivnit antibiotiky ani protilátkami (Hulínská, 2013a).

Přítomnost všech genů kódujících důležité proteiny pro glykolýzu v genomu značí, že jako primární zdroj energie je využívána glukóza. Glykolýzou může projít ale také glycerol, glukosamin, maltóza nebo fruktóza. Vzhledem k malé velikosti genomu spirochety *Borrelia burgdorferi* však nejsou tyto bakterie schopné syntetizovat aminokyseliny, mastné kyseliny, enzymové kofaktory a nukleotidy (Fraser *et al.*, 1997). Z tohoto důvodu je borelie nutně *in vitro* kultivovat v médiu s dostatkem těchto látek. Ke kultivaci *in vitro* se proto používá tzv. Barbour-Stoener-Kellyho médium obsahující mimo jiné také inaktivované králičí sérum. Optimální teplota kultivace *in vitro* se pohybuje mezi 30 a 37 °C. Při teplotě 39 °C dochází ke zpomalování růstu borelií a při teplotě vyšší než 40 °C se růst úplně zastavuje a borelie nejsou schopné se dále dělit, a to ani, když se následně teplota opět sníží (Barbour, 1984). Garon *et al.* (1989) uvádějí, že generační doba růstu *in vitro* je 12 – 20 hodin, kdežto Hulínská (2013a) upřesňuje tuto dobu na 12 – 14 hodin *in vitro* a 6 – 12 hodin *in vivo*.

Hlavním přenašečem *B. burgdorferi* v Evropě je klíště *Ixodes ricinus* (Brouqui *et al.*, 2004), ve Spojených státech amerických je jako primární přenašeč označováno klíště *Ixodes scapularis* (Fišerová *et al.*, 2008). Spirochety borelií byly také nalezeny u hmyzu sajícího krev, a to především u komárů rodu *Aedes* (Sanogo *et al.*, 2000). Larvy a nymfy klíšťat parazitují převážně na malých hlodavcích a ptácích, dospělá klíšťata se živí krví větších savců, jako jsou jeleni, divoké i domácí šelmy. Doba sání klíšťat je poměrně dlouhá, několik dnů až týden (Brouqui *et al.*, 2004). Spirochety borelií se dostávají do trávicího traktu, hlavně střeva larev klíšťat při sání krve nakažených hlodavců. Ve střevech klíštěte probíhá vývoj a růst spirochet. Následně se spirochety přesouvají do slinných žláz klíštěte, odkud jsou spolu se slinami přenášeny do hostitele (Fišerová *et al.*, 2008). Klíčovým faktorem úspěšného přenosu borelií z vektoru do hostitele, je využití farmakologických schopností slin klíštěte, mezi které patří například ovládnutí hemostázy, zánětlivé a imunitní odpovědi hostitele (Nuttall, 1999). Během svého endozootického cyklu se musí borelie přizpůsobit velmi rozdílným prostředím, a to jak zažívacímu traktu klíštěte a jeho hemolymfě, tak krvi a různým pevným tkáním hostitele. Pro úspěšnou infekci hostitele je nutné vyhnout se imunitnímu systému hostitele, mít schopnost pronikat tkáněmi a případně na tkáňové struktury adherovat.

Většina těchto mechanismů je spojena s přísně regulovanou expresí a funkcí povrchových lipoproteinů (Křupka *et al.*, 2011).

3.1.1.1 Osp antigeny

Důležitou součástí těla bakterie *Borrelia burgdorferi s. l.* jsou povrchové proteiny Osp (*outer surface protein*). Celkem existuje 6 druhů Osp antigenů, a to OspA, OspB, OspC, OspD, OspE a OspF (Hulínská, 2013a). Vnější proteinové antigeny včetně Osp proteinů jsou lipoproteiny, jejichž struktura přímo souvisí s imunogenními vlastnostmi (Brandt *et al.*, 1990).

K imunodominantním proteinům *B. burgdorferi* patří kromě flagelinu proteiny OspA a OspB. Geny pro tyto dva proteiny se nacházejí na jednom plazmidu a jsou exprimovány ze stejného operonu (Fikrig *et al.*, 1992). OspA je 31kDa monomerní protein ukotvený v membráně prostřednictvím lipidovaného cysteinového zbytku na N-terminálním konci proteinu (Huang *et al.*, 1998). OspA se v Evropě vyskytuje v 7 sérotypech. Sérotyp 1 patří *B. burgdorferi s. s.*, sérotyp 2 *B. afzelii* a sérotypy 3 – 7 *B. garinii* (Wilske *et al.*, 1993a). Koordinace exprese Osp antigenů má zásadní vliv na patogenní strategii borelií (Seemanapalli *et al.*, 2010). OspA se exprimuje především v době, kdy se spirochety nacházejí ve střevě nenakrmeného klíštěte, a to především proto, že umožňuje adhezi k epiteliálním buňkám střev klíštěte díky receptoru pro OspA, TROSPA, nacházejícím se na povrchu těchto buněk (Pal *et al.*, 2004). Exprese proteinů OspA a OspB je pozitivně regulována sigma faktorem RpoD. Negativní regulaci exprese OspA a OspB zajišťuje potom sigma faktor RpoS, na kterém je závislá exprese proteinu OspC (Caimano *et al.*, 2005). OspC je vysoce polymorfní protein o velikosti 22 – 23 kDa (Wang *et al.*, 1999), který umožňuje přechod spirochet ze střev do slinných žláz klíštěte (Ohnishi *et al.*, 2001) díky tomu, že váže plasminogen přítomný v krvi savce (Steere *et al.*, 2004). Exprese OspC se dramaticky zvyšuje v reakci na příjem potravy klíštěte, čímž se připravuje na infekci hostitele. Vysoká exprese OspC je také pozorována v časných stádiích infekce savce. Jelikož je OspC nejen silným imunogenem, ale také účinným cílem imunitního systému savců, je na začátku specifické humorální odpovědi hostitele jeho exprese utlumena (Seemanapalli *et al.*, 2010). Přepnutí v expresi OspA a OspC je indukováno teplotou. OspA je exprimován při teplotě 24 °C, kdežto OspC při teplotě 32 – 37 °C, tedy když klíště přijímá krev a lymfu hostitele (Wang *et al.*, 1999).

U spirochet kultivovaných *in vitro* je exprese OspA antigenu spuštěna. Jejím zastavením může docházet k narušení integrity vnější vrstvy lipoproteinů, což může ohrozit přežití borelie. V těle savce je antigen OspA fenotypicky potlačen z důvodu vyhnutí se imunitnímu systému hostitele, což borelii umožní přetrvat v těle hostitele. Vzhledem ke své vysoké imunogenitě je OspA schopen vyvolat silnou specifickou humorální imunitní odpověď již v nízkých koncentracích. Pokud se v savčích tkáních nacházejí protilátky proti antigenu OspA a krev s těmito protilátkami se dostane do kontaktu s OspA ve střevě klíštěte, dojde ke zvýšené expresi OspA patogenem, čímž se borelie stává velice senzitivní vůči savčím protilátkám. To může vést k přerušení endozootického cyklu a vymýcení borelií (Xu *et al.*, 2010).

3.1.2 Patogeneze a příznaky

Lymfskou boreliózu způsobují minimálně tři druhy komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato*, a to *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* a *B. afzelii*. Každý z těchto druhů je spojen s různými manifestacemi onemocnění (Brouqui *et al.*, 2004). Zatímco *B. burgdorferi s. s.* je nejčastěji spojena s artritidou, *B. garinii* způsobuje neuroboreliózu a pro *B. afzelii* je typickým příznakem chronické onemocnění kůže zvané *acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA) (Lünemann *et al.*, 2001). Kožní léze zvaná *erythema migrans* (EM) je spojena se všemi třemi druhy (Brouqui *et al.*, 2004).

Lymfská borelióza má 3 stádia, přičemž u různých pacientů se nemusí vyskytovat příznaky všech fází. Je možné také zaznamenat různé projevy onemocnění v různých částech světa. Jedná se především o rozdíl mezi příznaky pozorované v USA od těch v Evropě a Asii (Steere *et al.*, 2004).

První stádium

Prvním stádiem lymfské boreliózy je lokální infekce kůže, která se projevuje pomalu se rozšiřující *erythemou migrans* (viz Obrázek č. 2). Tato kožní léze se objevuje u cca 70 – 80 procent pacientů po 3 – 32 dnech od kousnutí klíštětem (Steere *et al.*, 2004). K dalším příznakům první fáze onemocnění patří projevy podobné chřipce, a to horečka, únava, bolest hlavy, svalů a kloubů. Dále se může objevit ztuhlá šíje nebo obrna lícního nervu (Smith *et al.*, 2002). Kožní léze EM se skládá z perivaskulárního infiltrátu lymfocytů, makrofágů, dendritických buněk a malého množství plazmatických buněk (Müllegger *et al.*, 2000).

Obrázek č. 3: *Erythema migrans* na pravém zadním nadloktí v místě předchozího kousnutí klíštětem (foto: James Gathany, Wikipedia Commons).



První linií obrany hostitele může být lýza spirochet zprostředkovaná komplementem (Steere *et al.*, 2004). Spirochetální lipoproteiny také aktivují makrofágy, což vede k produkci prozánětlivých cytokinů, jako jsou TNF- α a IL-1 β . Výsledkem aktivace makrofágů je degradace spirochet (Müllegger *et al.*, 2000). Boreliemi stimulované mononukleární buňky periferní krve produkují Th1 prozánětlivé cytokiny, a to především IFN- γ a IL-4 (Glickstein *et al.*, 2003). Během několika dnů po vzniku nemoci je možné u většiny pacientů detekovat IgM protilátky proti OspC a flagelinu B (Vaz *et al.*, 2001).

Navzdory silné imunitní odpovědi ale může infekce přetrvávat. Virulentní faktory, jako je snížení exprese OspC a rekombinací zprostředkovaná změna antigenních vlastností povrchového lipoproteinu VlsE (*Vmp-like sequence protein Expressed*, neboli *Variable major protein E*), umožňují boreliím vyhnout se imunitnímu systému a pokračovat v infekci hostitele (Stanek *et al.*, 2012).

Druhé stádium

Druhé stádium nemoci nastává týdny až měsíce po počáteční infekci. Dochází k systémovému šíření. Projevem infekce v kardiovaskulárním systému mohou být arytmie různých forem, kterých si ale pacient nemusí všimnout. Většina těchto forem arytmií je naštěstí pouze přechodná. Spirochety lze v této fázi v menším množství získat také ze vzorků myokardu, svalu, kosti, sleziny, jater, mozkových plen a mozku (Duray *et Steere*, 1988). Možné klinické projevy zahrnují také sekundární prstencovité kožní léze, akutní lymfocytární meningitidu, kraniální neuropatii, zánět míšního kořene a

periferního nervu, silné migrující bolesti kloubů, šlach, svalů a kostí a vzácně také oční komplikace. (Steere *et al.*, 2004).

Šíření spirochet je umožněno jejich interakcí s proteiny hostitele. Příkladem je schopnost interakce borelií s aktivačním systémem plasminogenu díky expresi endogenních aktivátorů plasminogenu a vazbou plasminogenu prostřednictvím receptorů na povrchu borelií (Coleman *et al.*, 1997). Dále se mohou prostřednictvím povrchových DbpA a DbpB (*decorin-binding protein*) lipoproteinů, vázat na proteoglykan decorin, který je spojen s kolagenovými vlákny (Guo *et al.*, 1998), díky proteinu BBK32 se borelie mohou vázat k fibronektinu (Probert *et Johnson*, 1998), protein p66, který se nachází na povrchu borelií, se váže na řetězec β_3 integrinů hostitelských buněk (Coburn *et al.*, 1999), a pomocí proteinu Bgp (*Borrelia GAG-binding protein*) jsou borelie schopny se vázat na glykosaminoglykany heparinu a erytrocytů (Parveen *et al.*, 2000).

U pacientů s neuroboreliózou byla v mozkomíšním moku zjištěna zvýšená produkce interferonu IFN- γ a následně také interleukinu IL-4 (Widhe *et al.*, 2004). V průběhu několika měsíců až let se postupně vyvíjí specifická imunitní odpověď, a to především proti cca 10 proteinům borelie. K těmto proteinům patří OspA, OspB, OspC, flageliny a *heat-shock* proteiny (Dressler *et al.*, 1993).

Třetí stádium

Třetím stádiem je infekce spojená s dlouhodobými příznaky. Tím jsou myšleny projevy nemoci přetrvávající delší dobu než 6 měsíců. Typickými příznaky této fáze je chronická neuroborelióza, kožní léze *acrodermatitis chronica atrophicans*, zánět míšních kořenů, obrna lícního nervu a další chronické obrny, které často doprovází parestézie (poruchy cití, jako je např. mravenčení, píchání, svědění nebo pálení kůže), celková bolest a bolest hlavy, kognitivní dysfunkce, lehké psychiatrické projevy a únava (Widhe *et al.*, 2004). Objevuje se také chronická artritida, pro kterou je typické střídání období klidu a bolesti. Nejčastěji je postiženo koleno, dále pak rameno nebo zápěstí. Jen vzácně se artritida projeví u více než tří kloubů současně. Lymfská artritida se projevuje různým stupněm synovitidy (zánět synoviální membrány kloubu). V postiženém kloubu dochází ke shlukování lymfocytů, plazmatických buněk, makrofágů a žírných buněk. V případě neurálního postižení lze pozorovat infiltrát lymfocytů a plazmatických buněk podél nervu (Duray *et Steere*, 1988).

Pro chronickou artritidu je typický výskyt IgG protilátek, a to proti OspA a OspB a platí, že čím je imunitní odpověď silnější, tím bývá artritida závažnější a déle trvá (Akin *et al.*, 1999). U pacientů s ACA byla zjištěna přítomnost interferonu IFN- γ , oproti pacientům s EM zde ale nebyl nalezen interleukin IL-4 (Widhe *et al.*, 2004).

Postboreliový syndrom

Postboreliový syndrom představuje stav pacienta po prodělané lymfské borelióze, kdy již není možné prokázat přítomnost spirochet borelií ve vzorcích krve ani mozkomíšního moku, ale nadále trvají některé z příznaků, jako je například chronická bolest podobná bolesti u pacientů s osteoartrózou, duševní potíže srovnatelné s depresí a snížené kognitivní funkce. V této fázi je účinnost antibiotik prakticky srovnatelná s účinností placeba (Klempner *et al.*, 2001). Klinicky lze postboreliový syndrom srovnávat s únavovým syndromem, fibromyalgickým syndromem a dalšími stavy po onemocněních, která nemusejí být infekčního původu (Pícha, 2013).

U těchto stavů se předpokládá podíl autoimunitních reakcí spuštěných aktivací imunitního systému po infekci. Již v roce 1993 byla pozorována zvýšená hladina protilátek proti proteinům OspA a OspB a zároveň zvýšený výskyt antigenů HLA-DR4 a HLA-DR2 u pacientů s chronickou artritidou nereagující na léčbu (Kalish *et al.*, 1993). Specifické HLA molekuly jsou spojeny s různými autoimunitními nemocemi (Drouin *et al.*, 2008a). Bylo také zjištěno, že molekula HLA-DRB1*0401 váže OspA v místě mezi 163. – 175. aminokyselinou. Molekula HLA-DRB1*0401 však také interaguje s hLFA-1 antigenem (*human lymphocyte function-associated antigen 1*), který by mohl sloužit jako autoantigen, a to v pozici 330. – 342. aminokyseliny, což poukazuje na vysokou homologii mezi těmito proteiny (Steele *et al.*, 2003). Dalšími proteiny vykazujícími homologii s OspA v úseku 163. – 175. aminokyseliny jsou MAWD-BP (protein, který může být zapojen do buněčné signální dráhy) s osmi stejnými aminokyselinami v úseku 276 – 288 aminokyselin a T-span7 (povrchový buněčný glykoprotein, který zprostředkovává přenos signálu) se šesti stejnými aminokyselinami v úseku 60 – 68 aminokyselin. Antigen hLFA-1 má pouze pět stejných aminokyselin jako OspA (Drouin *et al.*, 2008b). Další teorií poukazující na příspěvek autoimunitní odpovědi na příznacích postboreliového syndromu je přetrvávající přítomnost prozánětlivých chemokinů a cytokinů, především CXCL9 a IFN- γ , v synoviální tekutině i po ukončení léčby a negativních průkazech o přítomnosti borelií (Shin *et al.*, 2007).

3.1.3 Diagnostika

Vzhledem k tomu, že je lymská borelióza multisystémové onemocnění, existuje několik metod stanovení diagnózy. S tím souvisí také rozmanitost testovaných vzorků tkání a tělesných tekutin. K nejvíce používaným diagnostickým metodám patří sérologické metody využívající vzorek séra pacienta. Pokud pacient vykazuje příznaky neuroboreliózy, je vhodné testování podrobit také mozkomíšní mok, v případě artritidy potom synoviální tekutinu. Borelie mohou být také izolovány z kůže v případě výskytu EM nebo ACA, případně také ze vzorků dalších orgánů, jako je srdce nebo mozek (Brouqui *et al.*, 2004).

Nepřímé metody

V současné době se k diagnostice lymské boreliózy využívají hlavně nepřímé metody, a to především stanovení imunoglobulinů specifických IgG a IgM nejprve pomocí ELISA testu. V případě positivity se následně přítomnost protilátek potvrzuje Western Blotem. Antigeny pro tyto metody lze získat ze sonifikovaných spirochet nebo lze použít rekombinantní antigeny (Wilske, 2003).

K antigenům vyvolávajícím specifickou imunitní odpověď patří OspA, OspB, OspC, flagelární proteiny a proteiny tepelného šoku o velikosti 58, 66 a 74 kDa (Dressler *et al.*, 1993). Flagelární protein FlaB vyvolává silnou imunitní odpověď již na začátku infekce, avšak při jeho využití v diagnostice jsou problémem jeho zkřížené reakce s antigeny jiných bakterií a jeho určité epitopy jsou také křížově reaktivní s některými lidskými antigeny nacházejícími se v nervové tkáni, myokardu nebo synoviu (Luft *et al.*, 1992). Antigen OspC je velmi variabilní; celkem bylo identifikováno 21 hlavních variant. 4 z těchto variant (značené A, B, I, K) jsou většinou zodpovědné za imunitní odpověď u pacientů s lymskou boreliózou (Seinost *et al.*, 1999). Mapováním vnějšího epitopu OspC byla odhalena konzervovaná sekvence 10 aminokyselin, která je zodpovědná za vazbu IgM imunoglobulinů, čehož je využíváno v diagnostice (Mathiesen *et al.*, 1998). Velmi imunogenní a zároveň velmi variabilní je protein VlsE, který kromě variabilních oblastí obsahuje vysoce konzervovanou oblast skládající se z 26 aminokyselin zvanou IR6, která váže protilátky IgG i IgM. Proto je tato oblast proteinu VlsE také využívána při diagnostice sérologickými metodami. K dalším imunogenním proteinům patří BmpA, DbpA, které

jsou v rámci *B. burgdorferi* s. l. také variabilní, což může limitovat jejich využití v diagnostických metodách (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

Díky využívání rekombinantních proteinů v průkazu sérových protilátek je citlivost sérologických metod přibližně 20 – 50 % v první, 70 – 90 % ve druhé a 100 % ve třetí fázi onemocnění (Wilske *et al.*, 2007).

Přímé metody

K přímé detekci *B. burgdorferi* lze použít několik metod, a to mikroskopické pozorování spirochet, identifikaci specifických antigenů, kultivaci spirochet nebo molekulární metody (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005).

Pomocí mikroskopie lze vizualizovat spirochety *B. burgdorferi* v infikovaných tkáních jak vektoru, tak hostitele. Mikroskopické pozorování je umožněno nespecifickým nebo imunochemickým barvením spirochet, mikroskopií v temném poli nebo vizualizací pomocí elektronové mikroskopie (Wang *et al.*, 2010). Mikroskopické pozorování borelií v tělních tekutinách nebo tkáních je ale obtížné z důvodu malého množství jednotlivě se vyskytujících spirochet a různorodé délky a morfologie. Pro barvení je možné použít imunohistochemickou metodu s barvivem Giemsa, fluorochromy, mezi které patří například akridinová oranž, metody barvení stříbrem (například metoda Warthin-Starry) nebo imunocytochemické metody se zapojením monoklonálních nebo polyklonálních protilátek. Některá barviva, jako je třeba anilin, poskytují při použití na barvení borelií v tkáních příliš vysoké pozadí, proto jsou vhodná spíše pro barvení spirochet nacházejících se v biologických tekutinách, a to především v synoviální, perikardiální nebo pleurální tekutině, mozkomíšním moku a moči (Aberer *et Durray*, 1991).

Detekci antigenů lze provést dvěma způsoby, a to pomocí ELISA testu, který již byl použit při detekci antigenů v mozkomíšním moku u pacientů s neuroboreliózou a v moči u pacientů s EM, nebo reverzního Western blotu. Tyto metody jsou ovšem používány velice zřídka, jelikož mají nízkou senzitivitu, specifitu a nejsou příliš reprodukovatelné (Wang *et al.*, 2010).

Vhodnými vzorky pro kultivaci borelií a molekulární metodu PCR (*polymerase chain reaction*) jsou především vzorky získané biopsií z kůže. Výsledky při použití vzorků tělních tekutin nejsou obecně dobré, výjimku tvoří pouze použití synoviální tekutiny při použití PCR (Wilske, 2003), některé zdroje, jako například Aberer *et al.* (2007) doporučují detekci v moči. Kultivace borelií je však náročná a má nízkou

citlivost. Je jí ale možné použít v případech, kdy se i přes negativní sérologický náález vyskytuje jeden nebo více příznaků naznačující onemocnění lymfskou boreliózou, jako je například atypická *erythema migrans*, podezření na akutní neuroboreliózu nebo lymfskou boreliózu u pacientů trpících sníženou imunitou (Wilske, 2003).

Pro detekci borelií je možné použít různé druhy polymerázové řetězové reakce, a to buď konvenční nebo *nested* PCR v případě, kdy jsou získány pouze kvalitativní výsledky, nebo kompetitivní a *real-time* PCR, kdy jsou výsledky kvantitativní. Pro průkaz spirochet není nutné volit kvantitativní PCR, i když v dnešní době je již možná automatizace této metody (Agüero-Rosenfeld *et al.*, 2005). Výsledky PCR jsou závislé na počáteční koncentraci nukleové kyseliny spirochet přítomných v původním vzorku. V případě odebrání vzorku kůže s kožní lézí EM je výtěžnost reakce vysoká, avšak pouze v období lokalizované infekce. Nejdůležitější je správná volba amplifikovaného lokusu, který musí být geneticky stabilní. Jelikož se v USA vyskytuje převážně jeden sérotyp antigenů OspA a OspB, je možné cílit PCR na lokusy kódující tyto proteiny. V Evropě je ale využití genů pro tyto antigeny nevhodná z důvodu výskytu více sérotypů (OspA se v Evropě vyskytuje v 7 různých variantách). V minulosti došlo také k amplifikaci lokusů kódujících flagelin, ale následnou analýzou bylo zjištěno, že tyto geny jsou konzervativní nejen u druhů komplexu *B. burgdorferi s. l.*, ale i u dalších druhů spirochet (Schmidt, 1997). Jako vhodný templát byl nalezen úsek v blízkosti 5' konce 23S rRNA, který má stejnou sekvenci u všech druhů *B. burgdorferi s. l.*, ale jinou u ostatních borelií (Schwartz *et al.*, 1992). Dalším kritickým bodem PCR je správná volba primerů. Je mimo jiné důležité, aby byly primery schopné amplifikovat všechny druhy *B. burgdorferi s. l.*, byly specifické a nenasadaly na DNA pocházející z jiných patogenů (Schmidt, 1997).

K molekulárním metodám patří také DNA hybridizace, pomocí které lze detekovat nukleovou kyselinu pomocí značené próby komplementární k dané nukleové kyselině. Ke značení prób se využívá avidin nebo radioaktivní izotopy. Předpokladem této metody je znalost sekvence DNA a izolace nukleové kyseliny (Hulínská, 2013b).

3.1.4 Prevence a léčba

Nejlepší prevencí je vyvarovat se kontaktu s klíšťaty. V případě pohybu na území s výskytem klíšťat je vhodné nosit ochranný oděv, používat repelentní přípravky, zkontrolovat pokožku celého těla po možném kontaktu s klíšťaty a případně rychle

odstranit přisáté klíště (Wormser *et al.*, 2000). K přenosu spirochet z klíštěte dochází mezi 24 – 72 hodinami od přisátí, tudíž odstranění během prvních 24 hodin může ve většině případů zabránit přenosu infekce (Steere *et al.*, 2004). Nadelman *et al.* (2001) testovali, zda jedna dávka 200 mg doxycyklinu po kousnutí klíštětem *Ixodes scapularis* dokáže zabránit rozvoji lymfské boreliózy. Dle jejich výsledků měla profylaxe doxycyklinem 87% účinnost. Výsledek je ale nutné interpretovat opatrně, protože testování proběhlo na relativně malém vzorku pacientů.

Spirochety borelií jsou citlivé na široké spektrum antibiotik. V praxi se nejvíce osvědčily betalaktamové a tetracyklinové preparáty. Antibiotická léčba je nutná nejméně po dobu 2 týdnů, a to kvůli dlouhé generační době borelií (Křupka *et al.*, 2014). U pacientů s *erythema migrans*, a to jak v první fázi, tak na začátku druhé fáze onemocnění, je doporučeno podávat doxycyklin nebo amoxicilin (Dattwyler *et al.*, 1997). Doxycyklin je však nevhodný pro děti do 8 let a pro těhotné a kojící ženy. U dětí je doporučeno podávat amoxicilin. V případě, že pacient nemůže užívat doxycyklin ani amoxicilin (například z důvodu nesnášenlivosti), je vhodnou náhradou antibiotikum cefuroxim axetil, které je podstatně dražší než předchozí dva léky (Wormser *et al.*, 2000). Užívání tohoto antibiotika není však oproti doxycyklinu věkově omezeno a je obecně lépe snášen bez vedlejších účinků (Luger *et al.*, 1995). U pacientů nesnášejících uvedená antibiotika lze podávat některé z makrolidových antibiotik, jako jsou azitromycin a klaritromycin (Křupka *et al.*, 2014). Není vhodné užívat cefalosporiny první generace, které jsou v této fázi lymfské boreliózy neúčinné. Ceftriaxon je užíván intravenózně, ale pouze u dospělých pacientů s akutními neurologickými příznaky, jako je meningitida nebo postižení kořenového nervu. Alternativou u pacientů s těmito příznaky je infuzní podávání cefotaximu nebo penicilinu. Intravenózní podání těchto dvou antibiotik je indikováno také u dětí s akutními neurologickými projevy. U pacientů s perikarditidou nebo bloádou atrioventrikulárního bloku je nutná hospitalizace a nepřetržité sledování během antibiotické léčby, která může být podávána jak orálně, tak intravenózně, která bývá obecně preferována. V případě pokročilé arytmie může být nutné dočasné voperování kardiostimulátoru. V případě výskytu artritidy je opět vhodné podávat doxycyklin, amoxicilin nebo cefuroxim axetil po dobu 28 dní v případě, že nedošlo k vývoji neurologických příznaků. U pacientů s neurologickými projevy a artritidou je vhodné užívat ceftriaxon (Wormser *et al.*, 2006). Léčba ceftriaxonem je účinná i u pacientů s chronickou lymfskou boreliózou po neúspěšné terapii penicilinem. Výhodami ceftriaxonu je dlouhý poločas rozpadu, čímž je dosaženo jeho vysoké

hladiny v krvi po dlouhou dobu a snadný průnik do centrálního nervového systému (Dattwyler *et al.*, 1987).

Protože je léčba antibiotiky chronické lymfské boreliózy dlouhodobá, zajímají se někteří autoři, zda není dlouhodobé podávání antibiotik škodlivé. Sticker (2007) se domnívá, že dlouhodobější antibiotická léčba může být v případě chronické lymfské boreliózy prospěšná, jiní autoři, jako Ettestad *et al.* (1995) upozorňují na to, že dlouhodobé užívání antibiotika ceftriaxonu může vyvolat žlučové problémy.

3.1.5 Epidemiologie

Pro patogena je důležité množství rezervoárů, kterými jsou v případě *B. burgdorferi* v Evropě hlodavci čeledi myšovití (Muridae) a veverkovití (Sciuridae), hmyzožravci z čeledi rejskovití (Soricidae) a ježkovití (Erinaceidae), zástupci čeledi zajícovití (Leporidae) a několik čeledí ptáků včetně těch, kteří tráví zimu v teplých krajích (Lingren *et Jaenson*, 2006). Na drobných savcích sají především larvy, případně nymfy klíšťat, kdežto středně velcí a velcí savci jsou hostiteli všech vývojových stádií. Velcí savci, jako koně, hovězí dobytek a divoká zvěř, například srnci, nejsou rezervoárem infekce, ale jsou důležití pro přenos borelií, protože umožňují nakrmení velkého množství samic klíšťat, což přispívá k jejich množení (Jaenson *et Tälleklint*, 1999).

Geografické rozšíření *B. burgdorferi s. l.* koreluje s výskytem klíšťat, která jsou jejím vektorem. V Evropě je hlavním přenašečem klíště *I. ricinus*, jehož distribuce se v pobřežních oblastech východně od Baltského moře a části střední Evropy překrývá s výskytem *I. persulcatus* (Lingren *et Jaenson*, 2006). Hranice výskytu klíšťat *I. ricinus* týkající se nadmořské výšky se vzhledem ke klimatickým podmínkám mění. Zatímco do roku 1990 se předpokládalo, že tento druh klíšťat nemůže založit stabilní populaci v nadmořské výšce vyšší než 700 metrů nad mořem (m n. m.), v roce 2001 došlo ke zjištění, že se tato klíšťata v České republice vyskytují ve výšce až do 1100 m n. m., čímž se riziko nakažení značně zvyšuje (Daniel *et al.*, 2003). V oblasti italských Alp byla tato hranice stanovena na 1300 m n. m. (Rizzoli *et al.*, 2002). Výskyt klíšťat je také závislý na sezónních podmínkách, přičemž nejvíce rozhodující jsou teploty v zimě. Mírné zimy s málo dny, kdy je teplota pod -12 °C, jsou spojeny s výskytem většího množství klíšťat (Lingren *et al.*, 2000). Nejvyšší výskyt lymfské boreliózy je pozorován

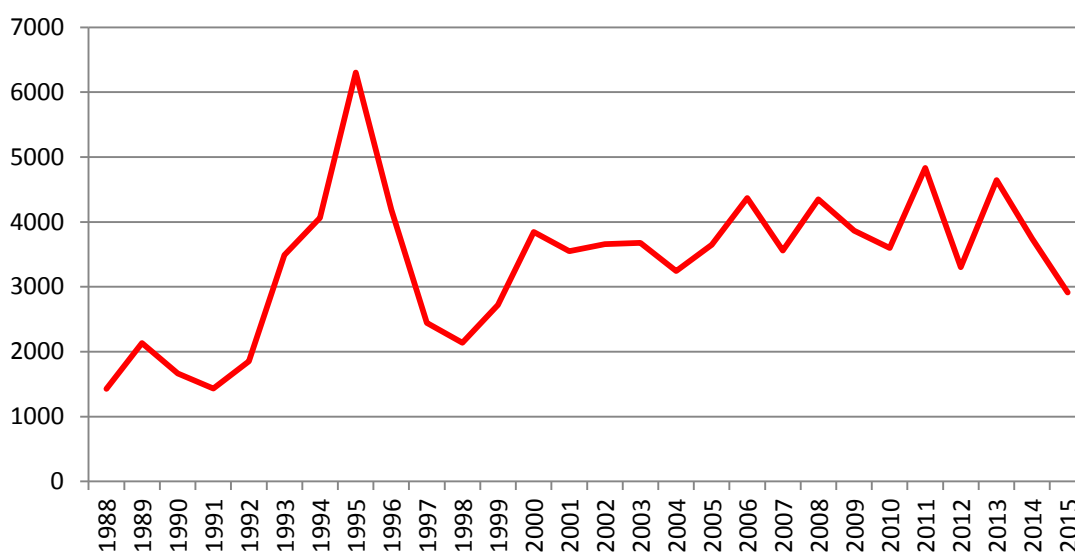
v Rakousku, České republice, Německu, Slovinsku, Švédsku a severských pobaltských státech (Lingren *et* Jaenson, 2006).

Nákazou *B. burgorferi* jsou nejvíce ohroženi lidé, kteří žijí anebo pracují v endemických oblastech výskytu klíšťat, a to především lesní dělníci, myslivci, hajní, zemědělci a vojáci pracující v terénu (Santino *et al.*, 1997). Sezónní aktivita klíšťat se v závislosti na geografickém území liší. V České republice začíná aktivita klíšťat v březnu nebo dubnu v závislosti na teplotě vzduchu (Žáková, 2000). Během sezónní aktivity klíšťat nezáleží na denní době, jelikož klíšťata mohou být aktivní nejen ve dne, ale i v noci (Mejlon, 1997).

Situace v České republice

V České republice se počet nakažených sleduje od roku 1988 (viz Graf č. 1). Od roku 1992 došlo k výraznému nárůstu nově infikovaných s vrcholem v roce 1995. Následně došlo opět k poklesu nakažených a stagnaci trendu na počátku nového tisíciletí. Od roku 2006 počet nakažených kolísá mezi 4834 hlášených nálezů, což odpovídá 46,1 případů na 100 000 obyvatel, v roce 2011, a 3304 nálezů, tedy 31,4 případů na 100 000 obyvatel, v roce 2012. V roce 2014 bylo nahlášeno 3743 onemocnění, což odpovídá 35,6 nově nakažených na 100 000 obyvatel (Kříž *et* Gašpárek, 2015).

Graf č. 1: Počet hlášených případů nákazy lymfskou boreliózou v České republice v letech 1988 – 2015 (podle Janovská, 2013 a systému Epidat).



Největší nemocnost byla v roce 2014 zaznamenána ve Zlínském kraji a na Vysočině, nejmenší potom v Praze, Moravskoslezském a Plzeňském kraji (Kříž *et* Gašpárek, 2015).

Nejvíce nových případů nakažení bylo v letech 2002 – 2014 zaznamenáno v červenci, ale nová onemocnění byla hlášena i během zimních měsíců, což může být dáno dlouhou inkubační dobou nebo prodlevou mezi infekcí a objevem prvních příznaků, jako jsou až neurologické nebo kloubní potíže. Dalším důvodem může být zvýšený pobyt v endemických obastech i během podzimu díky příznivému počasí (Kříž *et* Beneš, 2014; Kříž *et* Gašpárek, 2015)

Z hlediska věku pacientů jsou zaznamenány dvě skupiny, u kterých bývá nejvíce nakažených, a to malé děti s maximem nemocných ve věku 5 – 9 let, a dospělí ve věku 50 – 74 let. Ve věkových skupinách do cca 30 let je výskyt lymfské boreliózy stejný jak u mužů, tak u žen, avšak se zvyšujícím se věkem bývají více nemocné ženy. Maximum onemocnění bylo v roce 2014 zaznamenáno mezi 60. – 64. rokem u žen a 55. – 59. rokem u mužů (Kříž *et* Gašpárek, 2015).

Nejčastějším příznakem lymfské boreliózy byla v letech 2002 – 2011 *erythema migrans* (68,7 % případů), poté lymfská neuroborelióza (17,9 % případů) a lymfská artritida (11,4 % případů) (Kříž *et* Gašpárek, 2015).

3.1.6 Vakcíny proti lymfské borelióze

První vakcíny se začaly vyvíjet již v 80. letech 20. století, tedy několik let po objevu infekční agens lymfské boreliózy. K vakcinaci byly použity inaktivované spirochety borelií, které u křečků syrských (*Mesocricetus auratus*) vyvolávaly tvorbu protilátek v závislosti na dávce borelií. Odolnost vůči infekci se ale snížila již po 90 dnech od vakcinace (Johnson *et al.*, 1986).

Vakcíny založené na rekombinantních Osp antigenech

Na začátku devadesátých let se výzkum vakcín zaměřil na povrchové antigeny borelií. Bylo jisté, že rekombinantní antigen OspA, ať už ve Freundově adjuvans nebo ve formě intraperitoneálních injekcí živých *Escherichia coli* exprimujících tento antigen, dokáže vyvolat u pokusných myší imunitu vůči lymfské borelióze (Fikrig *et al.*, 1990). Fikrig *et al.*, (1991) také provedli první pokusy s orální vakcinací živými *E. coli* exprimujícími OspA. Tento způsob vakcinace je méně imunogenní než injekční podání,

avšak dokázal myši ochránit před nákazou. V roce 1992 bylo zjištěno, že pokud infikované klíště saje na hostiteli imunizovaném OspA antigenem, spirochety jsou zničeny ještě ve střevě klíštěte a nedochází k jejich přechodu do slinných žláz a následně do hostitele (Fikrig *et al.*, 1992a). Další antigen patřící ke kandidátům pro vývoj vakcíny byl objeven v roce 1992. Jedná se o protein C (později přejmenovaný na OspC), který byl testován na pískomilech následně napadaných boreliemi s vysokou expresí OspC a nízkou expresí OspA (Preac-Mursic *et al.*, 1992). Fikrig *et al.*, (1992b) také popisují, že imunitní odpověď na rekombinantní protein OspB byla schopna uchránit testované myši proti středně virulentním kmenům *B. burgdorferi s. s.* Vzhledem k tomu, že se OspA a OspB antigeny vyskytují v několika sérotypech, je nutné, aby se případná účinná vakcína skládala ze směsi OspA nebo OspB proteinů, která by pokryla heterogenitu v rámci celého komplexu *B. burgdorferi s. l.*, jelikož imunizace jedním sérotypem OspA nebo OspB může plně ochránit hostitele pouze před boreliemi exprimující daný sérotyp těchto proteinů. Proti spirochetám s jinými sérotypy těchto antigenů není imunitní ochrana úplná nebo žádná (Schaible *et al.*, 1993). Stejná situace nastává u antigenu OspC (Wilske *et al.*, 1993b).

V roce 1998 byla americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) schválena první humánní vakcína proti lymské borelióze s názvem LYMERix vyvinutá SmithKline Beecham Biologicals (nyní GlaxoSmithKline), která se skládala z rekombinantního OspA antigenu *B. burgdorferi s. s.* s adjuvans a byla určena pro věkovou skupinu 15 – 70 let (Sigal, 1999). Účinnost této vakcíny byla 75 % po třech injekcích (Steere *et al.*, 1998). Během prvního roku na trhu vydělal LYMERix 40 milionů dolarů, avšak v roce 2002 byl z trhu stažen kvůli nízkému prodeji způsobenému vysokou cenou a soudními spory ohledně nežádoucích účinků. FDA žádný důkaz o tom, že je vakcína nebezpečná, nenalezla (Hitt, 2002). Další vakcínou, která došla do fáze klinického testování, je vakcína ImuLyme vyvinutá Pasteur Merieux Connaught obsahující jeden sérotyp rekombinantního proteinu OspA bez adjuvans (Sigal, 1999). Účinnost vakcíny byla 92 % po dvou dávkách, kdy druhá dávka byla podána po 12 měsících od první dávky, a to minimálně po dobu jednoho roku (Sigal *et al.*, 1998). Tato vakcína se ale nikdy nedostala na trh (Křupka *et al.*, 2011).

Vzhledem k neúspěšnosti LYMERixu byly další studie zaměřeny na vývoj vakcín s co nejnižším rizikem vedlejších účinků, a to například pomocí zkrácení rekombinantního proteinu OspA tak, aby neobsahoval autoreaktivní epitop aminokyselin 169 – 173, nebo nahrazením tohoto epitopu jinou, bezpečnou, sekvencí

aminokyselin (Křupka *et al.*, 2011). Bockenstedt *et al.* (1996) definovali, že epitop antigenu OspA pro T buňky leží mezi aminokyselinami 179 a 193 na jeho karboxylovém konci a urychluje produkci anti-OspA imunoglobulinů IgG po infekci. Ding *et al.* (2000) proto navrhovali, aby se vývoj vakcíny soustředil na použití C-konce rekombinantního OspA. Při použití zkráceného proteinu OspA vyvstal ovšem problém s účinností, což vysvětluje fakt, že odstraněná část z N-konce je podstatná pro správnou konformaci epitopů u C-konce. Řešením bylo zavedení tří mutací do zkráceného OspA, což vedlo ke stabilizaci jeho konformace. Účinnost vakcíny skládající se z těchto mutovaných fragmentů OspA byla velmi vysoká (Koide *et al.*, 2005). Willet *et al.*, (2004) také testovali OspA se změnou tří aminokyselin v autoreaktivním epitopu. Výsledkem bylo, že OspA se změněným autoreaktivním epitopem měl stejnou účinnost jako původní antigen. Basford *et al.* (2004) také uvádí, že vedlejší účinky týkající se poškození kloubů by mohly mít spojitost s lipidací antigenu OspA, na což by měla být upřena pozornost v případě velkých dávek vakcinačních dávek lipidovaných OspA antigenů nebo při použití DNA vakcín.

Dalším kandidátem pro výrobu vakcíny proti lymbské borelióze je antigen OspC. Problémem použití antigenu OspC je však jeho výrazná variabilita v rámci komplexu *B. burgdorferi s. l.*, protože vakcinace konkrétním sérotypem OspC ochrání hostitele pouze před boreliemi exprimující tento sérotyp, nikoliv však proti boreliím exprimující jiný sérotyp OspC (Probert *et al.*, 1997). Gilmore *et al.* (1996) prokázal, že také v případě OspC je za vznikem ochranné imunitní odpovědi zodpovědný epitop v dané konformaci. V případě použití denaturovaného OspC nebyly laboratorní myši chráněny před infekcí. Obdobně jako u antigenu OspA se místo pro vazbu imunoglobulinů u OspC vyskytuje na karboxylovém konci. Rozhodující úlohu má 50 aminokyselin na tomto konci (Jobe *et al.*, 2003). Úsek aminokyselin 168 – 210 nazývaný helix 5 obsahuje na svém konci konzervovaný úsek 20 aminokyselin. Dalším důležitým epitopem, co se vazby imunoglobulinů týče, je oblast aminokyselin 136 – 150 označovaný jako smyčka 5. Pokud se ukáže, že jsou tyto epitopy trvale antigenní také u lidí, jsou více než vhodnými kandidáty na vývoj vakcíny (Earnhart *et al.*, 2005).

Vzhledem k vysoké heterogenitě antigenu OspC byly snahy také o vakcíny obsahující epitopy několika sérotypů OspC. První taková vakcína byla složena z epitopů sérotypů A, B, K a D. Séra myší očkovaných touto vakcínou zabila borelie *in vitro* za přítomnosti králičího komplementu. *In vivo* nebyla vakcína testována (Earnhart *et*

Marconi, 2007a). Další chimérickou vakcínou byl konstrukt osmi sérotypů OspC, a to E, N, I, C, A, B, K a D (Earnhart *et al.* Marconi, 2007b).

Další přístupy k vývoji vakcín

Dalším proteinem, který by mohl být využit k přípravě vakcíny, je DbpA. Spolu s DbpA byl testován také protein DbpB. Ukázalo se však, že DbpB je méně citlivý vůči protilátkám, nebo je *in vivo* exprimován méně než DbpA. Imunitní ochrana v případě DbpA by mohla přesahovat ochranu OspA. Oba tyto proteiny by mohly mít také synergickou funkci při použití v jedné vakcíně (Hanson *et al.*, 1998). Hagman *et al.* (2000) však uvádí, že vakcinace proteinem DbpA neochránila testované myši před infekcí po přísátí klíštěte obsahujícího borelie. Brown *et al.* (2005) testovali vakcínu složenou z DbpA, BBK32 a OspC. Výsledky vakcinace naznačují, že tato kombinovaná vakcína může být účinnější než jedno a dvousložkové vakcíny a poměr jednotlivých složek významně ovlivňuje účinnost vakcíny. Pro přesné pochopení vlivu jednotlivých komponent při vakcinaci a následnou imunitní ochranu je nutné provést další studie.

Ochrannou imunitní reakci poskytuje také vakcinace proteiny P35 a P37 (Fikrig *et al.*, 1997), Oms66 (Exner *et al.*, 2000) a VraA (Labandeira-Rey *et al.*, 2001). Pro získání přesnějších informací o jejich ochraně před infekcí však bude nutné provést další studie.

Kromě proteinových antigenů má borelie i antigeny se strukturou glykolipidu. Hlavním glykolipidovým antigenem je cholesteryl 6-O-acyl- β -D-galaktopyranosid (ACGal). Vyskytuje se jak u *B. burgdorferi s. s.*, tak u *B. garinii* a *B. afzelii*. Je často rozpoznáván protilátkami v pozdním stádiu lymské boreliózy. Antigenní vlastnosti ACGal byly potvrzeny také v případě jeho umělé syntézy, což znamená, že by po připojení na nosný protein mohl vyvolávat tvorbu ochranné imunitní odpovědi (Stübs *et al.*, 2010).

Ochranu vůči lymské borelióze by mohly poskytovat také DNA vakcíny obsahující nukleovou kyselinu kódující OspA, OspC nebo jejich fúzní protein. Nejlepší výsledek dávala vakcína obsahující DNA sekvenci právě pro fúzní protein OspA a OspC. *In vivo* však došlo k produkci ochranných protilátek pouze proti OspA, proto je nutné provést další analýzy plazmidových DNA konstruktů zahrnující nejen všechny sérotypy OspA a OspC, ale třeba i další Osp antigeny (Wallich *et al.*, 2001).

Drtivá většina vakcín cílí na bakteriální toxiny nebo jiné bakteriální antigeny. Dai *et al.* (2009) však popisuje přístup, kdy se vakcína zaměřuje na protein vektoru.

Jedná se o protein Salp15 nacházející se ve slinách klíštěte. K tomuto proteinu se borelie váží během přenosu z vektoru do hostitele. Ukázalo se, že myši vakcinované antisérem Salp15 byly chráněné před nákazou a toto antisérum také výrazně zvyšuje ochrannou imunitní reakci protilátek vůči antigenům borelie, jako jsou OspA a OspC.

Vakcíny na trhu

Na trhu zatím není žádná vakcína pro humánní medicínu, avšak v oblasti veterinární medicíny je možné se setkat s několika komerčně dostupnými preparáty. Mezi vakcíny obsahující inaktivované borelie dostupné pro psy je Merilym od firmy Merial (dostupná v Německu), LymeVax od firmy Fort Dodge a Galaxy Lyme od Shering Plough (dostupné v USA), a Biocan B a Borrelym 3 od firmy Bioveta (dostupné v České republice). Kromě těchto vakcín je na trhu také Recombitek od Merial (v USA) založený na rekombinantním antigenu OspA a ProLyme od Intervet (také v USA) obsahující OspA purifikovaný od buněčných komponent borelií. Tyto vakcíny však chrání očkované psy pouze před úzkým spektrem kmenů a je nutné časté přeočkování (Křupka *et al.*, 2011).

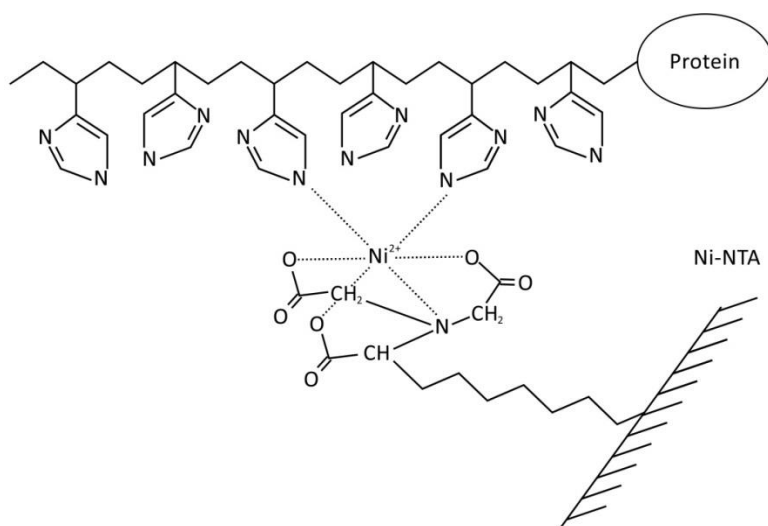
3.2 Rekombinantní proteiny

Pokud chtějí vědci v dnešní době pracovat s čistým proteinem, získávají ho často v jeho rekombinantní formě. Příprava rekombinantního proteinu spočívá v klonování genu daného proteinu do expresního vektoru a jeho transformace do buněčného systému, který je schopen daný protein exprimovat. Dalšími kroky jsou izolace a purifikace proteinu (Rosano *et Ceccarelli*, 2014). Při volbě expresního systému je nutné zvážit několik faktorů, mezi které patří charakteristiky buněčného růstu, úroveň exprese proteinu, postranlační modifikace, biologická aktivita proteinu a finanční náklady (Makrides, 1996). Velmi často se pro expresi rekombinantních proteinů využívají bakterie *Escherichia coli*. Jejich výhodou je jednoduchá a levná kultivace, znalost jejich genetiky a velký počet kompatibilních expresních vektorů (Sorensen *et Mortensen*, 2005). Při purifikaci rekombinantních proteinů se využívá afinitních purifikačních tagů, a to nejčastěji His-tagu (Stevens, 2002).

3.2.1 His-tag

His-tag je řetězec nukleotidů přidaný za sekvenci kódující daný protein, který kóduje šest za sebou jdoucích histidinových zbytků. Tyto histidiny mají afinitu k nikelnatým, měďnatým, kobaltnatým a zinečnatým iontům, čehož se využívá při purifikaci rekombinantního proteinu za použití afinitní chelatační chromatografie. Při této chromatografii se protein váže na matici prostřednictvím interakce s kovovými ionty. K eluci se následně používá roztok chloridu amonného, glycin, histidin, imidazol, EDTA nebo roztok s vysokou koncentrací konkurenčních kovových iontů (Hengen 1995). Jako matrice se používá například kyselina nitrilotrioctová (NTA) s nikelnatými ionty, které váže prostřednictvím tří karboxylových skupin a jednoho atomu dusíku (viz Obrázek č. 4) (Hainfeld *et al.*, 1999).

Obrázek č. 4: Schéma interakce His-tagu s Ni-NTA (podle Rowinska-Zyrek *et al.*, 2013).



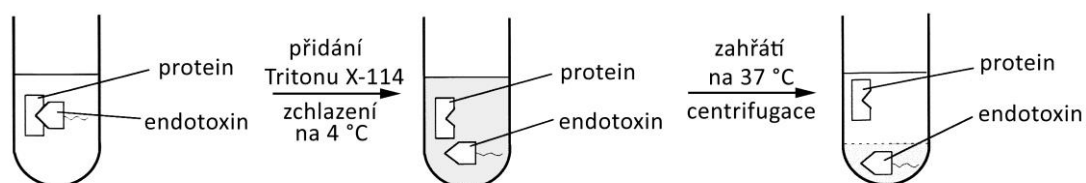
3.2.2 Endotoxin a jeho odstranění

Endotoxin je lipopolysacharid (LPS) přítomný v buněčné stěně většiny gramnegativních bakterií, mezi které patří také *E. coli* – nejčastěji využívané bakterie k přípravě rekombinantních proteinů. V případě, že se endotoxin dostane do krevního oběhu savce, může dojít k zánětu a septickému šoku, a to díky produkci a systémovému uvolňování zánětlivých mediátorů LPS responzivních buněk. Před imunizací laboratorních zvířat je proto nutné endotoxin z roztoku rekombinantního proteinu připraveného expresí v *E. coli* eliminovat, a to na co nejnížší úroveň. Mezi používané

postupy odstranění endotoxinu patří iontoměničová chromatografie, polymyxin B a histidin afinitní chromatografie a fázová separace za použití detergentu Tritonu X-114 (Liu *et al.*, 1997).

Odstraňování endotoxinu z roztoku rekombinantního proteinu pomocí Tritonu X-114 spočívá v disociaci endotoxinu z proteinu a následného jednoduchého oddělení fází, kdy se v jedné (horní) fázi nachází protein a ve druhé (dolní) endotoxin s Tritonem X-114 (viz Obrázek č. 5). Postup zahrnuje přidání Tritonu X-114 do roztoku rekombinantního proteinu, následné zchlazení roztoku na 4 °C, kdy dochází k disociaci endotoxinu z proteinu, zahřátí na 37 °C a oddělení vzniklých fází centrifugací. Pro odstranění co největšího množství endotoxinu je nutné provést několik cyklů odstranění, přičemž ztráty rekombinantního proteinu se pohybují kolem 2 % v každém cyklu (Aida *et Pabst*, 1990).

Obrázek č. 5: Schéma postupu odstranění endotoxinu z roztoku rekombinantního proteinu pomocí fázové separace za použití Tritonu X-114 (podle Liu *et al.*, 1997).



4. Materiál a přístrojové vybavení

4.1 Biologický materiál

Bakterie *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformované plazmidem pET200 (Invitrogen) s vloženou sekvencí antigenu OspA *Borrelia burgdorferi sensu stricto* kmene B31. Pro vakcinaci byly použity experimentální myši kmene BALB/c.

4.2 Použité chemikálie

- 2-merkatpoethanol (Merck Millipore)
- Albuminový standard (Thermo Scientific)
- Aprotinin (Serva)
- Apyrogenní LAL voda (Associates of Cape Cod, Inc.)
- Bromfenolová modř (Serva)
- Coomassie Brilliant Blue G450 (Serva)
- Deionizovaná voda
- Dezinfekce Dettol (Reckitt Benckiser)
- Dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Penta s.r.o.)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, s.r.o.)
- Docecylsírán sodný (SDS) (Merck Millipore)
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného (Penta s.r.o.)
- Ethanol (VWR International)
- Fenylmethylsulfonylfluorid (Serva)
- Glycerol (Sigma-Aldrich)
- Glycin (Serva)
- HisPur Ni-NTA agaróza (Thermo Scientific)
- Hovězí sérový albumin (Merck Millipore)
- Hydroxid sodný (Penta s.r.o.)
- Chlorid draselný (Lach-Ner, s.r.o.)
- Chlorid sodný (Serva)
- Imidazol (Sigma-Aldrich)
- Izopropanol (Lach-Ner, s.r.o.)

- Kyselina citronová (Sigma-Aldrich)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Serva)
- Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, s.r.o.)
- Kyselina octová (Lach-Ner, s.r.o.)
- Kyselina sírová (Lach-Ner, s.r.o.)
- LB médium (PanReac AppliChem)
- Leupeptin (Serva)
- Lysozym (Serva)
- Lyzát z amébocytů ostrorepa Pyrotell (Associates of Cape Cod, Inc.)
- Methanol (Sigma-Aldrich)
- N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Serva)
- n-butanol (Lach-Ner, s.r.o.)
- Ni-NTA agaróza (QIAGEN)
- Odstředěné sušené mléko (PML Protein.Mléko.Laktóza, a.s.)
- Peroxid vodíku (Sigma-Aldrich)
- Peroxodisíran amonný (APS) (PanReac AppliChem)
- Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific)
- Proteinový standard 10 – 250 kDa (Bio-Rad)
- Roztok akrylamidu a bisakrylamidu 37,5:1 (30 % w/v) (Serva)
- Tablety o-fenylendiamin dihydrochloridu (OPD) (Sigma-Aldrich)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris) báze (Serva)
- Triton X-100 (Koch-Light Limited)
- Triton X-114 (Sigma-Aldrich)
- Tween 20 (Serva)

4.3 Použité protilátky

- HRP konjugovaná protilátka Goat anti-Mouse IgG1 (MP Biomedicals)
- HRP konjugovaná protilátka Goat anti-Mouse IgG2a (Bethyl Laboratories, Inc)
- HRP konjugovaná protilátka Goat anti-Mouse IgG2b (Bethyl Laboratories, Inc)
- HRP konjugovaná protilátka Goat anti-Mouse IgG3 (Bethyl Laboratories, Inc)
- Protilátka Anti-Mouse Polyvalent Immunoglobulins (G, A, M) (Sigma-Aldrich)

4.4 Použité roztoky

- **LB médium:**
 - 20 g práškového LB média
 - rozpustit v 1 l deionizované vody
- **Pracovní roztok 1x PBS:**
 - 900 ml deionizované vody
 - 100 ml zásobního roztoku 10x PBS
- **Zásobní roztok 10x PBS:**
 - 240 g chloridu sodného
 - 6g chloridu draselného
 - 40,08 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného
 - 6 g dihydrogenfosforečnanu draselného
 - rozpustit ve 3 l deionizované vody
- **Nativní lyzační pufr:**
 - 0,780 g dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného
 - 1,754 g chloridu sodného
 - 0,068 g imidazolu
 - rozpustit v 80 ml deionizované vody
 - upravit pH na 8
 - doplnit deionizovanou vodou na 100 ml
 - před použitím přidat:
 - 200 µl fenylmethylsulfonylfluoridu v ethanolu
 - 40 µl roztoku leupeptinu
 - 52,5 µl roztoku aprotininu
 - 100 µl Tritonu X-100
 - 0,05 g lysozymu
 - 100 µl roztoku EDTA

- **Roztok EDTA**
29,224 g EDTA
rozpustit v 800 ml deionizované vody
upravit pH na 8
doplnit deionizovanou vodou na 1 l
- **Fenylmethylsulfonylfluorid v ethanolu**
11,14 g fenylmethylsulfonylfluoridu
rozpustit v 250 ml ethanolu
- **Roztok leupeptinu**
1 g leupeptinu
rozpustit v 1 ml deionizované vody
- **Roztok aprotininu**
1 g aprotininu
rozpustit v 1 ml deionizované vody
- **Suspenze HisPur Ni-NTA agarózy:**
50 ml HisPur Ni-NTA agarózy
50 ml 25% ethanolu
- **Suspenze Ni-NTA agarózy**
50 ml Ni-NTA agarózy
50 ml 25% roztoku ethanolu
- **25% roztok ethanolu**
74 ml deinoizované vody
26 ml 96% ethanolu
- **Nativní promývací pufr:**
0,780 g dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného
1,754 g chloridu sodného
0,136 g imidazolu
rozpustit v 80 ml deionizované vody
upravit pH na 8
doplnit deionizovanou vodou na 100 ml

před použitím přidat:

200 μ l fenylmethylsulfonylfluoridu v ethanolu

40 μ l roztoku leupeptinu

52,5 μ l roztoku aprotininu

- **Nativní eluční pufr:**

0,780 g dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného

1,754 g chloridu sodného

3,400 g imidazolu

rozpustit v 80 ml deionizované vody

upravit pH na 8

doplnit deionizovanou vodou na 100 ml

před použitím přidat:

200 μ l fenylmethylsulfonylfluoridu v ethanolu

40 μ l roztoku leupeptinu

52,5 μ l roztoku aprotininu

- **Polyakrylamidový 12% dělicí gel:**

6 ml roztoku akrylamidu a bisakrylamidu 37,5:1 (30 % w/v)

3,75 ml 4x Tris pufru, pH 8,8

5,25 ml deionizované vody

75 μ l 10% APS

15 μ l TEMED

- **Polyakrylamidový 4% zaostřovací gel:**

1,3 ml roztoku akrylamidu a bisakrylamidu 37,5:1 (30 % w/v)

2,5 ml 4x Tris pufru, pH 6,8

6,2 ml deionizované vody

50 μ l 10% APS

10 μ l TEMED

- **4x Tris pufr, pH 8,8**
 - 45,5 g Tris
 - 1 g SDS
 - rozpustit ve 150 ml deionizované vody
 - upravit pH na 8,8
 - doplnit deionizovanou vodou na 250 ml

- **4x Tris pufr, pH 6,8**
 - 15,125 g Tris
 - 1 g SDS
 - rozpustit ve 150 ml deionizované vody
 - upravit pH na 6,8
 - doplnit deionizovanou vodou na 250 ml

- **Roztok 10% APS**
 - 0,1 g APS
 - rozpustit v 1 ml deionizované vody

- **Nanášecí pufr pro elektroforézu:**
 - 0,755 g Tris
 - 7,95 ml glycerolu
 - 2,3 g SDS
 - 5 ml 2-merkaptoethanolu
 - obarvit bromfenolovou modří
 - rozpustit v 37,5 ml deionizované vody
 - upravit pH na 6,8
 - doplnit deionizovanou vodou na 50 ml

- **1x SDS elektrodový pufr:**
 - 1600 ml deionizované vody
 - 400 ml zásobního roztoku 5x SDS elektrodového pufru

- **Zásobní roztok 5x SDS elektrodového pufru:**
 - 15,1 g Tris
 - 72 g glycinu
 - 5 g SDS
 - rozpustit v 1 l deionizované vody

- **Fixační roztok:**
 - 650 ml deionizované vody
 - 250 ml izopropanolu
 - 100 ml 99% kyseliny octové
- **Barvicí roztok:**
 - 200 ml deionizované vody
 - 250 ml ethanolu
 - 50 ml 99% kyseliny octové
 - 0,5 g Coomassie Brilliant Blue G450
- **Odbarvovací roztok:**
 - 880 ml deionizované vody
 - 50 ml methanolu
 - 70 ml 99% kyseliny octové
- **Pracovní roztok 1x Tris pufri:**
 - 900 ml deionizované vody
 - 100 ml zásobního roztoku 10x Tris pufri
- **Zásobní roztok 10x Tris pufri:**
 - 270 g chloridu sodného
 - 181,71 g Tris
 - rozpustit ve 2,5 l deionizované vody
 - upravit pH na 7,5
 - doplnit deionizovanou vodou na 3 l
- **Roztok lyzátu z amébcytů ostrorepa**
 - veškerý obsah 5ml lahvičky s lyofilizovaným lyzátem z amébcytů ostrorepa rozpustit v 5 ml apyrogenní LAL vody
- **Roztok PBS s Tweenem 20:**
 - 900 ml deionizované vody
 - 100 ml zásobního roztoku 10x PBS
 - 0,5 ml Tweenu 20

- **Roztok 5% mléka v PBS s Tweenem 20:**
 - 450 ml deionizované vody
 - 50 ml zásobního roztoku 10x PBS
 - 250 µl Tweenu 20
 - 25 g odstředěného sušeného mléka

- **Roztok 1% albuminu v PBS s Tweenem 20:**
 - 450 ml deionizované vody
 - 50 ml zásobního roztoku 10x PBS
 - 250 µl Tweenu 20
 - 5 g hovězího sérového albuminu

- **Reakční roztok OPD:**
 - 20 ml OPD pufru
 - 20 µl peroxidu vodíku
 - 1 tableta OPD

- **OPD pufr:**
 - 18,4 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu disodného
 - 5,1 g kyseliny citronové
 - rozpustit v 800 ml deionizované vody
 - upravit pH na 5
 - doplnit deionizovanou vodou na 1 l

- **1M kyselina sírová:**
 - 472 ml deionizované vody
 - 28 ml 96% kyseliny sírové

- **1M kyselina chlorovodíková**
 - 459 ml deionizované vody
 - 41 ml 35% kyseliny chlorovodíkové

- **1M hydroxid sodný**
 - 20 g hydroxidu sodného
 - rozpustit v 350 ml deionizované vody
 - doplnit deionizovanou vodou na 500 ml

4.5 Laboratorní přístroje

- Běžná stolní lampa s infračervenou žárovkou
- Běžné počítačové vybavení
- Blokový termostat SBH130D (Stuart)
- Centrifuga CR 312 (Jouan)
- Centrifuga KR 25i (Jouan)
- Centrifuga MIKRO 22R (Hettich)
- Drtič ledu IC20 (Waring)
- Elektroforetický zdroj PowerPac Universal (Bio-rad)
- ELISA spektrofotometr Epoch (BioTek)
- Homogenizátor ULTRA-TURRAX T25 (IKA)
- Chladnička CNSI 3033 (Liebherr)
- Laboratorní váhy 1,25 – 500 g (Chirana)
- Laboratorní váhy EMB 200-2 (Kern)
- Magnetická míchačka Big squid white (IKA)
- Mikropipeta Finnpipeette 1 – 5 ml (Thermo scientific)
- Mikropipeta Finnpipeette F1 0,2 – 2 μ l (Thermo Scientific)
- Mikropipeta Finnpipeette F1 100 – 1000 μ l (Thermo Scientific)
- Mikropipeta Finnpipeette F1 2 – 20 μ l (Thermo Scientific)
- Mikropipeta Finnpipeette F1 20 – 200 μ l (Thermo Scientific)
- Mikropipeta Finnpipeette F2 30 – 300 μ l (dvanáctikanálová) (Thermo Scientific)
- Minicentrifuga MPW-15 (MPW Med Instruments)
- Mraznička G 1231 (Liebherr)
- pH metr 3310 (JENWAY)
- Promývačka ELx405 (BioTek)
- Sestava na přípravu gelů a elektroforetická komůrka Protean 3 (Bio-rad)
- Skleněná chromatografická kolona 10 x 1,5 cm (Bio-rad)
- Sonikátor UP200S (Hielscher)
- Třepačka KS 130 basic (IKA)
- Třepačka rolovací SRT6D (Stuart)
- Vyhřívaná třepačka RPN 2510 (Amersham)

- Výrobek deionizované vody AQUAL 29 XL (Merci)
- Výrobek ledu CB 316 (Brema)

4.6 Spotřební materiál

- Apyrogenní špičky 1000 μ l (Associates of Cape Cod, Inc.)
- Apyrogenní špičky 250 μ l (Associates of Cape Cod, Inc.)
- Apyrogenní zkumavky Pyrotube-D (Associates of Cape Cod, Inc.)
- Apyrogenní zkumavky Pyrotube-S (Associates of Cape Cod, Inc.)
- Centrifugační filtr Amicon Ultra-15 Cut-Off 10 kDa (Merck Millipore)
- Dialyzační komůrka D-Tube Dialyzer Mega 20 ml, Cut-Off 6 – 8 kDa (Thermo Scientific)
- Špičky bílé 20 μ l
- Špičky bílé 5 ml
- Špičky modré 1000 μ l
- Špičky žluté 200 μ l
- Zkumavky centrifugační typu Falcon 15 ml
- Zkumavky centrifugační typu Falcon 50 ml

5. Metodika

5.1 Izolace a purifikace rekombinantního antigenu OspA

1. Transformované indukované bakterie *E. coli* kultivované v LB médiu byly centrifugovány při 10 000 rpm a teplotě 4 °C po dobu 15 min a supernatant byl odebrán k následné dekontaminaci a likvidaci. Pelet byl rozsuspendován v roztoku 1x PBS.
2. Bakterie *E. coli* v pracovním roztoku 1x PBS byly znovu centrifugovány při 10 000 rpm a teplotě 4 °C po dobu 15 min a supernatant byl vylit. Pelet byl důkladně rozsuspendován v nativním lyzačním pufru (na 1 g peletu 10 ml lyzačního pufru) pomocí homogenizéru. Následně byl lyzát umístěn na rolovací třepačku do chladové místnosti na dobu 30 min.
3. Lyzát byl 12x sonikován po dobu 15 s s pauzami trvajících 1 – 2 min. Při pauzách mezi sonikacemi byl lyzát umístěn na ledu. Po sonikaci byl lyzát centrifugován při 9000 rpm a teplotě 4 °C po dobu 10 min. Supernatant byl odlit do čisté zkumavky a pelet byl rozpuštěn v roztoku 1x PBS (na 1 g peletu 10 ml PBS) a uchován pro další analýzu.
4. K supernatantu lyzátu byla přidána suspenze HisPur Ni-NTA nebo Ni-NTA agarózy (1 ml roztoku agarózy na 10 ml supernatantu) a tato směs byla umístěna na 20 min na rolovací třepačku do chladové místnosti (4 °C).
5. Prázdňá chromatografická kolona byla svorkami upevněna na chemický stojan a byla ekvilibrována pomocí 10 ml deionizované vody.
6. Lyzát byl nanesen na chromatografickou kolonu a po protečení kolonou bylo odebráno 5 ml protečeného lyzátu pro další analýzu. Následně byla kolona 2x promyta 150 ml nativního promývacího pufru. Po každém z promytí bylo odebráno 5 ml pro další analýzu. K eluci rekombinantního proteinu OspA byl použit nativní elučňí pufr. Celkem bylo sebráno šest frakcí po 5 ml.

5.2 SDS-PAGE – příprava gelu a vzorků, vlastní elektroforetická separace a vizualizace výsledků

1. Malé i velké sklo se spacersy silnými 0,75 mm bylo omyto lihem a obě skla byla správně umístěna do sestavy pro přípravu gelů. Pro ověření správné těsnosti skel byla mezi skla napipetována voda, která byla následně vylita a skla byla osušena filtračním papírem. Mezi skla byl napipetován 12% polyakrylamidový dělicí gel do výšky cca 6 cm. Povrch dělicího gelu byl srovnán n-butanolem nasyceným deionizovanou vodou. Polymerace dělicího gelu probíhala cca 20 min. Po ztuhnutí dělicího gelu byl vylit n-butanol a vršek gelu byl vysušen filtračním papírem. Následně byl na dělicí gel napipetován 4% polyakrylamidový zaostřovací gel až po okraj malého skla a umístěn hřebínek. Polymerace zaostřovacího gelu trvala cca 20 min.
2. Ze vzorků rozsuspendovaného peletu, lyzátu po protečení kolonou, prvního promytí kolony, druhého promytí kolony a jednotlivých elučních frakcí bylo do jednotlivých mikrozkušavek odebráno 20 μ l. Ke vzorkům bylo přidáno 20 μ l SDS nanášecího pufru. Mikrozkušavky byly poté vloženy do blokového termostatu vyhřátého na 97 °C, kde byl jejich obsah denaturován po dobu 15 min.
3. Ztuhlý gel byl umístěn do elektroforetické komůrky a zalit SDS elektrodoým pufrém. Hřebínek byl opatrně vyjmut a vzniklé jamky byly propláchnuty SDS elektrodoým pufrém.
4. Do první jamky bylo nanášeno 8 μ l nanášecího pufru, do druhé jamky 2 μ l proteinového standardu a do dalších jamek po 8 μ l každého ze vzorků. Do poslední jamky bylo nanášeno 8 μ l nanášecího pufru.
5. Elektroforéza byla elektrodami připojena k elektroforetickému zdroji. Elektroforetická separace trvala 1 h při napětí 150 V.
6. Po uplynutí doby elektroforetické separace byl zdroj vypnut, elektroforetická komůrka byla odpojena od zdroje a elektrodoý pufr byl vylit. Skla s gelem byla vyjmuta z komůrky a oddělena pomocí umělohmotné špachtle. Zaostřovací gel byl odstraněn.

7. Dělicí gel byl přenesen do fixačního roztoku. Fixace probíhala 15 – 20 min na třepače. Následně byl fixační roztok vylit a gel byl zalit barvicím roztokem. Barvení probíhalo cca 30 min. Po obarvení gelu byl barvicí roztok slit zpátky a gel byl zalit odbarvovacím roztokem. Odbarvování probíhalo přes noc. Odbarvovací roztok byl v průběhu odbarvování několikrát vyměněn.
8. Gel byl vyfotografován nebo oskenován.

5.3 Dialýza

1. Dialyzační komůrka byla před dialýzou namočena. Následně do ní byl napipetován roztok proteinu OspA. Komůrka byla umístěna do plováku a kádinky s 2 l pracovního roztoku 1x Tris pufru. Do kádinky bylo umístěno magnetické míchadlo a dialýza probíhala na magnetické míchače v chladové místnosti (4 °C) přes noc. Druhý den byl vyměněn pracovní roztok 1x Tris pufru a dialýza pokračovala další 2 h.
2. Po ukončení dialýzy byl roztok z dialyzační komůrky přepipetován do čisté zkumavky.

5.4 Zakoncentrování roztoku proteinu

1. Do horní části centrifugačního filtru byla napipetována voda. Následovala centrifugace po dobu 10 min při 3000 rpm a teplotě 4 °C a vylití permeátu.
2. Část roztoku proteinu byla napipetována do horní části centrifugačního filtru a centrifugován 5 min při 3000 rpm a teplotě 4°C. Po centrifugaci byl vylit permeát.
3. Krok č. 2 byl ještě 2x opakován, lišila se jen doba centrifugace, která byla při prvním opakování 3,5 min a při druhém opakování 2,5 min. Následně byl zakoncentrovaný roztok proteinu odebrán z horní části centrifugačního filtru do čisté zkumavky.

5.5 Měření koncentrace proteinu BCA metodou

1. Standardy A až I o koncentraci 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 a 0 $\mu\text{g/ml}$ (blank) byly pipetovány po 25 μl do jamek mikrotitrační destičky. Jako standard A sloužil čistý albuminový standard, standardem I byla deionizovaná voda. Do dvou sousedních jamek bylo nanášeno 25 μl měřeného proteinu. Do jamek se standardy i se vzorkem bylo napipetováno 200 μl BCA reakčního činidla a mikrotitrační destička byla uložena na cca 30 min do 37 °C.
2. Absorbance při 562 nm byla měřena pomocí ELISA spektrofotometru a zaznamenána programem Gen5. Data byla exportována do programu Microsoft Excel, kde byl sestaven graf závislosti absorbance na koncentraci proteinu. Díky rovnici přímky kalibrační křivky byla vypočítána koncentrace měřeného proteinu.

5.6 Zjištění přítomnosti a odstranění endotoxinu

1. Při odstraňování a pro test přítomnosti endotoxinu je nutné používat laboratorní pomůcky i chemikálie zbavené endotoxinu (certifikováno výrobcem – Associates of Cape Cod, Inc.).
2. Pro odstranění endotoxinu bylo do zkumavky obsahující roztok proteinu OspA napipetováno 50 μl Tritonu X-114. Zkumavka byla umístěna na rolovací třepačku do chladové místnosti na dobu 30 min. Poté probíhala 15min inkubace při 37 °C a následně centrifugace při 4000 rpm a pokojové teplotě po dobu 10 min. Po centrifugaci byla horní vodná fáze odebrána do čisté zkumavky.
3. Krok č. 2 byl opakován ještě dvakrát.
4. Poté byl krok č. 2 zopakován ještě jednou, ovšem již bez přídavku Tritonu X-114.
5. Ve skleněných zkumavkách s označením D byla připravena ředící řada roztoku proteinu OspA, a to tak, že první zkumavka obsahovala 160 μl vody a 40 μl roztoku proteinu (ředění 5x), druhá zkumavka 180 μl vody a 20 μl roztoku proteinu (ředění 10x), třetí 190 μl vody a 10 μl roztoku proteinu (ředění 20x),

čtvrtá 196 µl vody a 4 µl roztoku proteinu (ředění 50x) a pátá 198 µl vody a 2 µl roztoku proteinu (ředění 100x).

6. Do skleněných zkumavek s označením S bylo napipetováno po 100 µl vzorků z ředící řady proteinu. Jako negativní kontrola bylo použito 100 µl apyrogenní vody a jako pozitivní kontrola sloužilo 100 µl pracovního roztoku 1x PBS puftru. Do všech zkumavek bylo napipetováno 100 µl roztoku lyzátu z améboctů ostrorepa, obsah zkumavek byl promíchán a inkubace probíhala přesně 1 h při 37 °C. Ihned po inkubaci byly zkumavky otočeny o 180 °, aby bylo možné zjistit výsledek testu.

5.7 Vakcinace experimentálních myší, odběry krve a získání séra

1. Vakcíny s rekombinantním antigenem OspA byly připraveny na Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně. Experimenty na laboratorních zvířatech byly schváleny etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a manipulace se zvířaty byla vždy prováděna osobou způsobilou dle § 15d odst. 3 zákona č. 246/1992 Sb.
2. Před vakcinací byla provedena elektroforetická separace vzorku jednotlivých vakcín. Postup elektroforetické separace viz 5.2 SDS-PAGE – příprava gelu a vzorků, vlastní elektroforetická separace a vizualizace výsledků.
3. Celkem bylo vakcinováno 35 experimentálních myší kmene BALB/c rozdělených do 7 skupin po 5 jedincích. Různé skupiny myší byly očkovány vakcínami s různým složením (viz Tabulka č. 1). Každá z experimentálních myší byla označena náušnicí s číslem. Následně jim byla vydezinfikována kůže na břicho a injekční stříkačkou jim do kůže bylo aplikováno 100 µl očkovací látky.

Tabulka č. 1: Složení vakcín pro jednotlivé skupiny myší.

Skupina č.	Složení vakcíny
1	volný OspA
2	OspA vázaný na lipozomech
3	OspA vázaný na lipozomech s MT02

Tabulka č. 1: Pokračování.

4	OspA vázaný na lipozomech s MT03
5	OspA vázaný na lipozomech s MT05
6	OspA vázaný na lipozomech s MT06
7	OspA vázaný na lipozomech s MT07

4. Odběr krve byl proveden po 3 týdnech. Myši byly nahřáty pod zdrojem infračerveného záření. Každá z myší byla imobilizována a byl vydezinfikován její ocas. Pro odběr krve byla naříznuta laterální žíla ocasu myši a krev byla pomocí kapiláry odebrána do mikrozskumavky s číslem myši. Každé myši bylo odebráno cca 0,2 ml krve.
5. Krev byla krátce stočena na stolní centrifuze a umístěna na noc do chladové místnosti. Druhý den byla krev centrifugována 15 min při 6000 rpm a 4 °C. Po centrifugaci byla odebrána séra. Z každého vzorku krve bylo odebráno alespoň 20 µl séra. Následně byla séra zamražena.
6. Druhá vakcinace probíhala den po prvním odběru krve. Průběh vakcinace byl stejný jako v bodě č. 2 s tím rozdílem, že nebylo již nutné myši označovat náušnicí s číslem. Druhý odběr krve a získání séra probíhal stejně jako v bodech č. 3 až 5.

5.8 ELISA test

1. Do všech jamek mikrotitračních destiček bylo napipetováno 100 µl roztoku rekombinantního proteinu OspA o koncentraci 2 µg/ml. Následně byly mikrotitrační destičky přes noc umístěny do chladové místnosti.
2. Jamky mikrotitračních destiček byly 3x promyty pracovním roztokem PBS pufru. Do všech jamek bylo následně napipetováno 300 µl 5% mléka v PBS s Tweenem 20. Blokování probíhalo 2 h při pokojové teplotě. Po uplynutí této doby bylo mléko vyklepnuto z jamek a jamky byly 2x promyty roztokem PBS s Tweenem 20.
3. Jednotlivá myší séra získaná z prvního odběru krve byla naředěna roztokem 1% albuminu v PBS s Tweenem 20 v poměru 1:250. Myší séra získaná

z druhého odběru byla naředěna v poměru 1:500. Ředění použitého standardu záviselo na typu protilátek stanovovaných testem (viz Tabulka č. 2).

4. Do jamek mikrotitračních destiček bylo napipetováno 100 µl 1% albuminu v PBS s Tweenem 20. Následně bylo do jamky A2 napipetováno 100 µl standardu, obsah jamky byl promíchán a 100 µl roztoku bylo přeneseno do jamky A3. Tento postup ředění byl opakován, dokud nebylo dosaženo jamky A11, ze které bylo 100 µl roztoku odpipetováno.
5. Vzorky séra byly ve dvou opakováních nanášeny v množství 100 µl do jamek B2 až B11. Obsah těchto jamek byl promíchán a 100 µl roztoku bylo přeneseno do jamek C2 až C11. Tento postup ředění byl opakován, dokud nebylo dosaženo jamek G2 až G11. Z těchto jamek bylo 100 µl roztoku odpipetováno. Inkubace probíhala do druhého dne v chladové místnosti.
6. Jamky mikrotitračních destiček byly 5x promyty PBS s Tweenem 20. Sekundární protilátka byla naředěna roztokem 1% albuminu v PBS s Tweenem 20 v závislosti na stanovovaných protilátkách v séru (viz Tabulka č. 2). Do všech jamek bylo napipetováno 100 µl sekundární protilátky. Inkubace probíhala 1,5 h při pokojové teplotě.

Tabulka č. 2: Přehled ELISA testů, ředění standardu a sekundární protilátky v závislosti na jednotlivých testech.

Test číslo	Stanovované protilátky / pořadí odběru	Ředění standardu	Ředění sekundární protilátky
1	polyvalentní Ig / 1.	1:1000	1:10 000
2	polyvalentní Ig / 2.	1:500	1:10 000
3	IgG1 / 2.	1:500	1:20 000
4	IgG2a / 2.	1:250	1:10 000
5	IgG2b / 2.	1:250	1:10 000

7. Jamky mikrotitračních destiček byly 5x promyty PBS s Tweenem 20. Do všech jamek bylo napipetováno 100 µl reakčního roztoku OPD. Inkubace probíhala

podle vývoje žlutého zbarvení 2 – 20 min. Reakce byla zastavena 100 μ l 1M kyseliny sírové na jamku.

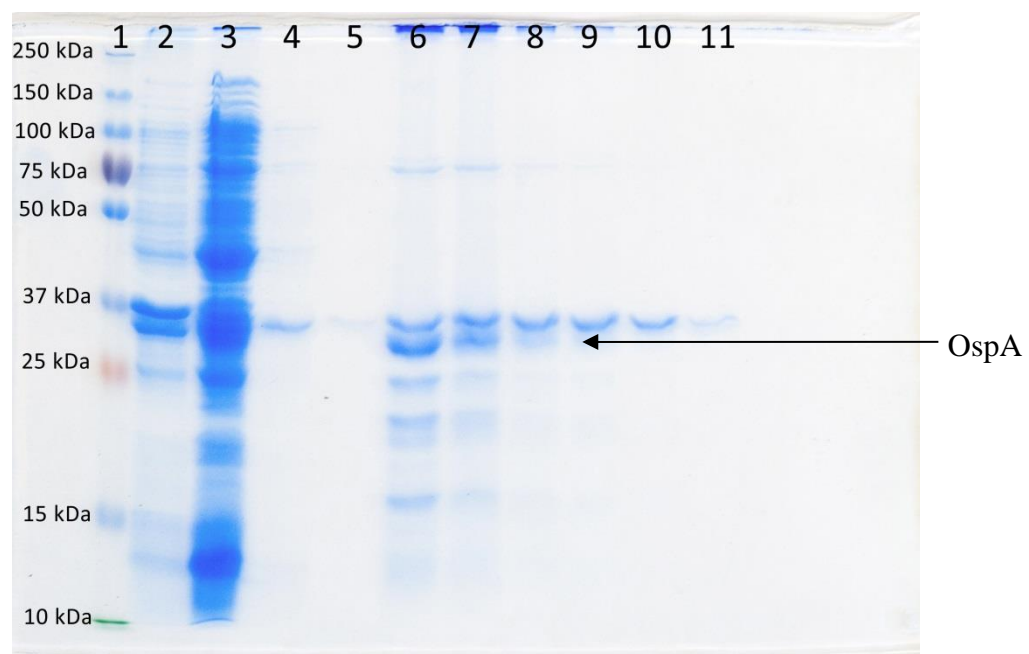
8. Absorbance při 492 nm byla měřena pomocí ELISA spektrofotometru a zaznamenána programem Gem5. Data byla exportována do programu Microsoft Excel.

6. Výsledky

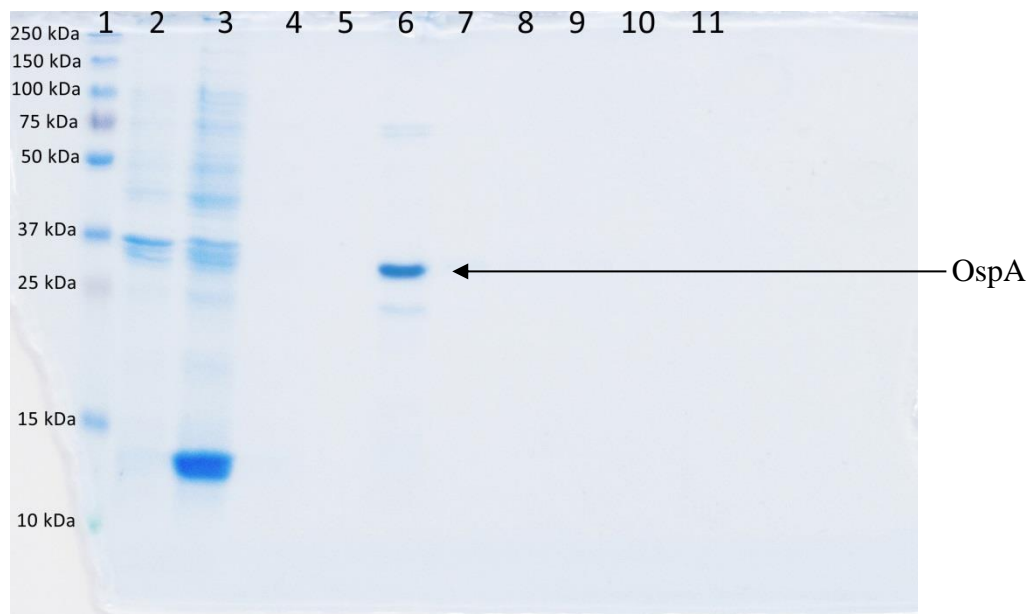
V experimentální části své diplomové práce jsem provedla izolaci a purifikaci rekombinantního antigenu OspA spirochety *Borrelia burgdorferi sensu stricto* kmene B31 a vyhodnotila jeho imunogenní vlastnosti po vakcinaci experimentálních myši kmene BALB/c.

Purifikace byla provedena pomocí HisPur Ni-NTA a Ni-NTA agarózy. V případě použití HisPur Ni-NTA obsahoval roztok proteinu OspA vysoké množství kontaminací, a to jak v první, tak ve druhé až čtvrté eluční frakci (viz Obrázek č. 6). Při použití Ni-NTA agarózy byl výsledkem purifikace téměř čistý roztok proteinu OspA, a to v první eluční frakci (viz Obrázek č. 7). Dále jsem proto pracovala pouze s roztokem proteinu OspA izolovaným a purifikovaným pomocí Ni-NTA agarózy. Izolaci a purifikaci jsem provedla celkem třikrát a získané roztoky byly spojeny v jeden, který jsem dialyzovala a zakoncentrovala. Koncentrace OspA byla následně stanovena na 0,5 mg/ml.

Obrázek č. 6: Elektroforetogram výsledku izolace a purifikace OspA za použití HisPur Ni-NTA agarózy. V první jamce je nanesen standard molekulové hmotnosti 10 – 250 kDa (Biorad), ve druhé jamce vzorek rozsuspendovaného peletu, ve třetí vzorek lyzátu po protečení kolonou, ve čtvrté vzorek roztoku po prvním promytí kolony, v páté vzorek roztoku po druhém promytí kolony, v šesté až jedenácté potom vzorky jednotlivých elučních frakcí.



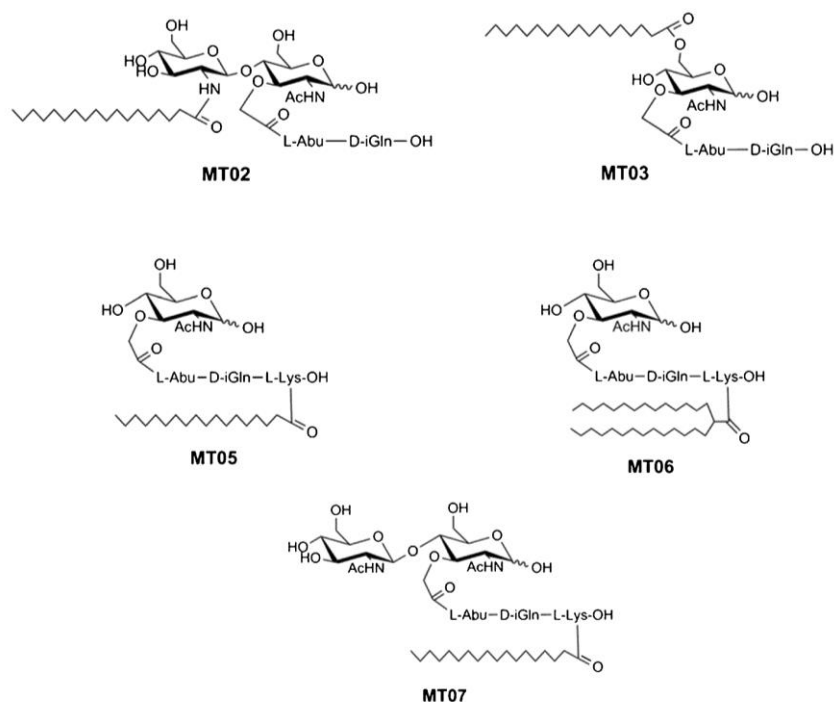
Obrázek č. 7: Elektroforetogram výsledku izolace a purifikace OspA za použití Ni-NTA agarózy. V první jamce je nanesen standard molekulové hmotnosti 10 – 250 kDa (Biorad), ve druhé jamce vzorek rozsuspendovaného peletu, ve třetí vzorek lyzátu po protečení kolonou, ve čtvrté vzorek roztoku po prvním promytí kolony, v páté vzorek roztoku po druhém promytí kolony, v šesté až jedenácté potom vzorky jednotlivých elučních frakcí.



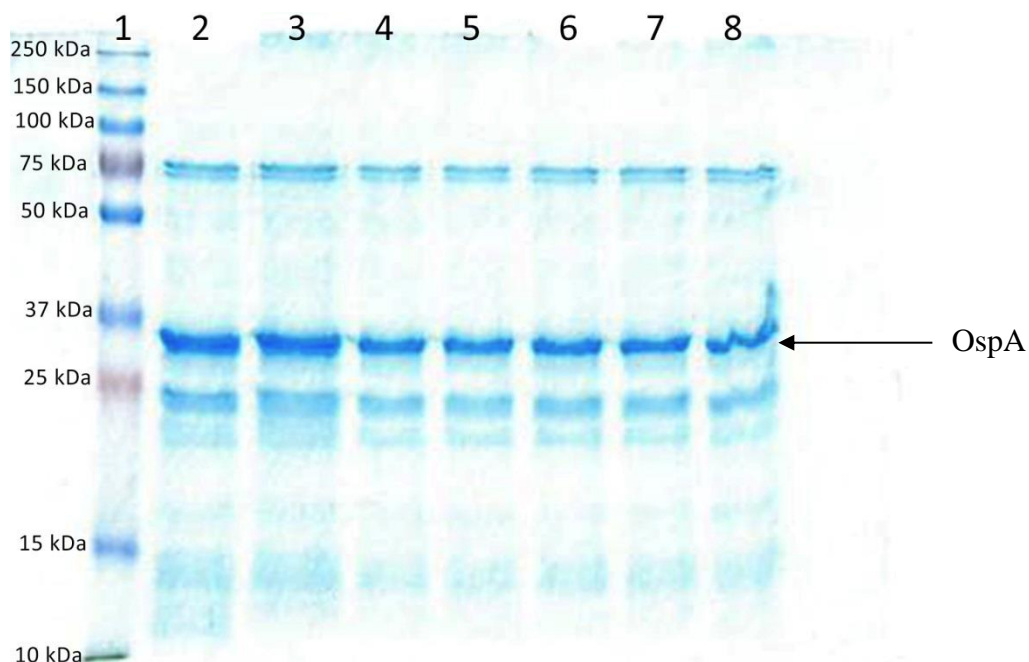
Po odstraňování endotoxinu jsem provedla test na jeho přítomnost v roztoku proteinu OspA. Citlivost testu byla 0,25 EU (*endotoxin unit*). Endotoxin byl detekován při ředění 5x, v roztocích ředěných 10x, 20x, 50x a 100x jeho přítomnost zjištěna nebyla. Tento výsledek znamená, že množství endotoxinu v roztoku proteinu OspA se pohybuje mezi 1,25 a 2,5 EU. Tato hodnota je přijatelná pro přípravu vakcín.

Vakcíny byly připraveny na Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně. Celkem bylo připraveno 7 druhů vakcín, a to vakcína skládající se z volného OspA v roztoku, OspA navázaného na lipozomy, OspA navázaného na lipozomy s MT02, OspA navázaného na lipozomy s MT03, OspA navázaného na lipozomy s MT05, OspA navázaného na lipozomy s MT06 a OspA navázaného na lipozomy s MT07. Látky označené MT02 – MT07 představují lipofilní deriváty muramyl dipeptidu (MDP) a působí jako adjuvans (Mašek *et al.*, 2011). Struktury těchto látek jsou zobrazeny na Obrázku č. 8. Přítomnost proteinu OspA v každé z vakcín byla potvrzena pomocí elektroforetické separace (viz Obrázek č. 9).

Obrázek č. 8: Struktury lipofilních derivátů muramyl dipeptidu MT02, MT03, MT05, MT06 a MT07 (převzato z Turánek Knötigová *et al.*, 2015)



Obrázek č. 9: Elektroforetogram připravených vakcín proteinu OspA. V první jamce je nanesen standard molekulové hmotnosti 10 – 250 kDa (Biorad), ve druhé jamce vzorek vakcíny volného OspA v roztoku, ve třetí vzorek vakcíny OspA navázaného na lipozomy, ve čtvrté OspA navázaného na lipozomy s MT02, v páté OspA navázaného na lipozomy s MT03, v šesté OspA navázaného na lipozomy s MT05, v sedmé OspA navázaného na lipozomy s MT06 a v osmé OspA navázaného na lipozomy s MT07.

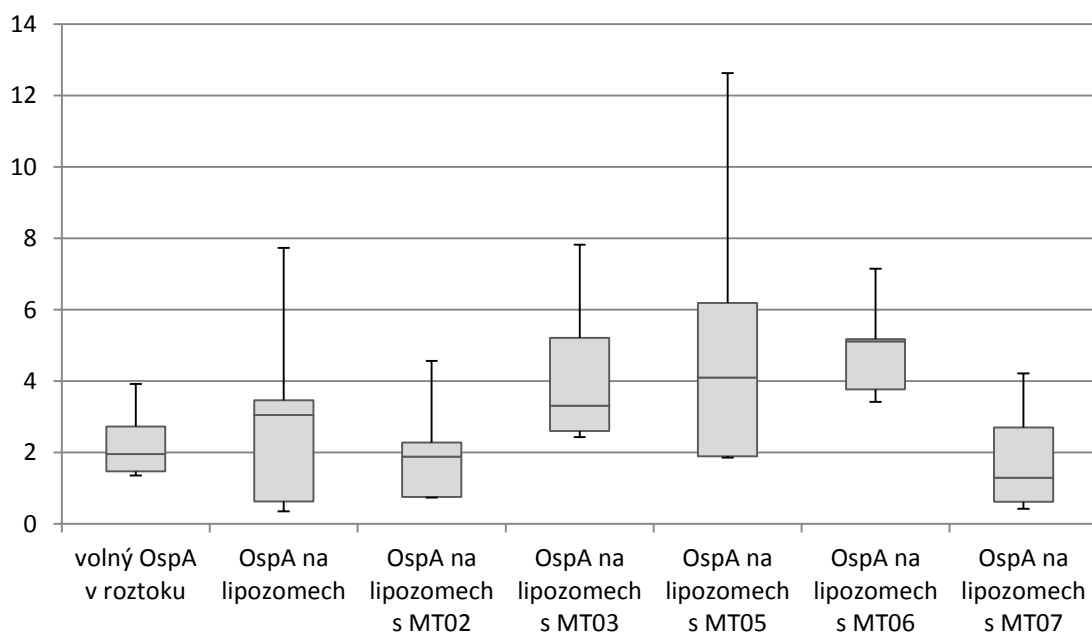


Po vakcinaci, odběru krve a získání sér celkem 35 myší (v 7 skupinách po 5 myších) jsem hodnotila přítomnost protilátek proti OspA v sérech jednotlivých myší, a to polyvalentní imunoglobuliny třídy G, A a M po prvním i druhém odběru, imunoglobuliny třídy G podřidy 1 (IgG1), IgG2a a IgG2b po druhém odběru. Imunoglobuliny IgG1 jsou produkovány díky spolupráci B lymfocytů s Th2 lymfocyty (pomocné T lymfocyty spojené s protilátkovou odpovědí) (Liu *et al.*, 2004), zatímco IgG2a a IgG2b jsou produkovány díky spolupráci B lymfocytů s Th1 lymfocyty (pomocné T lymfocyty spojené s cytotoxickou a buněčnou imunitní odpovědí) a aktivují komplement, tudíž jsou slibnými efekty ochranné imunity namířené proti boreliím, které jsou na aktivaci komplementu senzitivní (Křupka *et al.*, 2012).

Výsledky ELISA testů byly vztahovány na reaktivitu standardu, kterým bylo dobře reagující sérum z předchozích experimentů Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Hodnota relativní koncentrace standardu byla stanovena na 100 jednotek. Tento postup umožnil srovnání hodnot vzorků z různých ELISA desek, případně hodnot získaných při opakování testu, což je jinak vzhledem k relativní povaze výsledků ELISA testů problematické. Hodnoty relativní koncentrace protilátek ve vzorcích byly spočítány ze dvou opakování jednoho ředění v lineární oblasti grafu závislosti absorbance na koncentraci protilátky při měření na ELISA spektrofotometru. Z hodnot relativních koncentrací pro každou myš byl v každém testu vypočítán průměr, který byl zanesen do krabicového grafu (viz Graf č. 2 – 6).

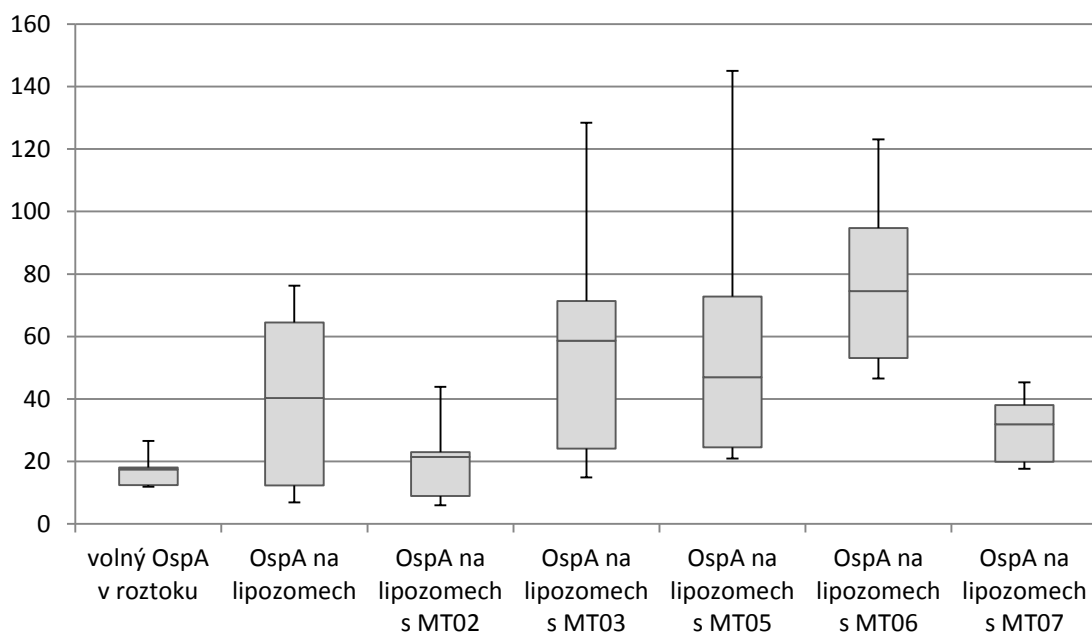
Nejvyšší koncentrace **celkových imunoglobulinů** (IgG, IgA a IgM) **po první vakcinaci** rekombinantním antigenem OspA byla zjištěna u skupiny experimentálních myší vakcinovaných OspA na lipozomech s adjuvans MT06 (5,115 jednotek relativní koncentrace – viz Graf č. 2). Druhou nejvyšší hodnotou mediánu (4,103 jednotek relativní koncentrace) jsem zaznamenala u skupiny vakcinované OspA na lipozomech s MT05, třetí nejvyšší hodnotu mediánu (3,315 jednotek relativní koncentrace) měla potom skupina vakcinovaná OspA na lipozomech s MT03. Nejnižší hodnotu mediánu jsem naopak zaznamenala u skupiny vakcinované OspA na lipozomech s MT07 (1,294 jednotek relativní koncentrace). Nízká hodnota mediánu byla také u skupin vakcinovaných OspA na lipozomech s MT02 (1,888 jednotek relativní koncentrace) a volným OspA v roztoku (1,954 jednotek relativní koncentrace). Hodnota mediánu koncentrací u skupiny vakcinované OspA na lipozomech bez adjuvans byla po první vakcinaci 3,056 jednotek relativní koncentrace).

Graf č. 2: Hodnoty relativních koncentrací polyvalentních imunoglobulinů tříd G, A a M po první vakcinaci rekombinantním proteinem OspA.



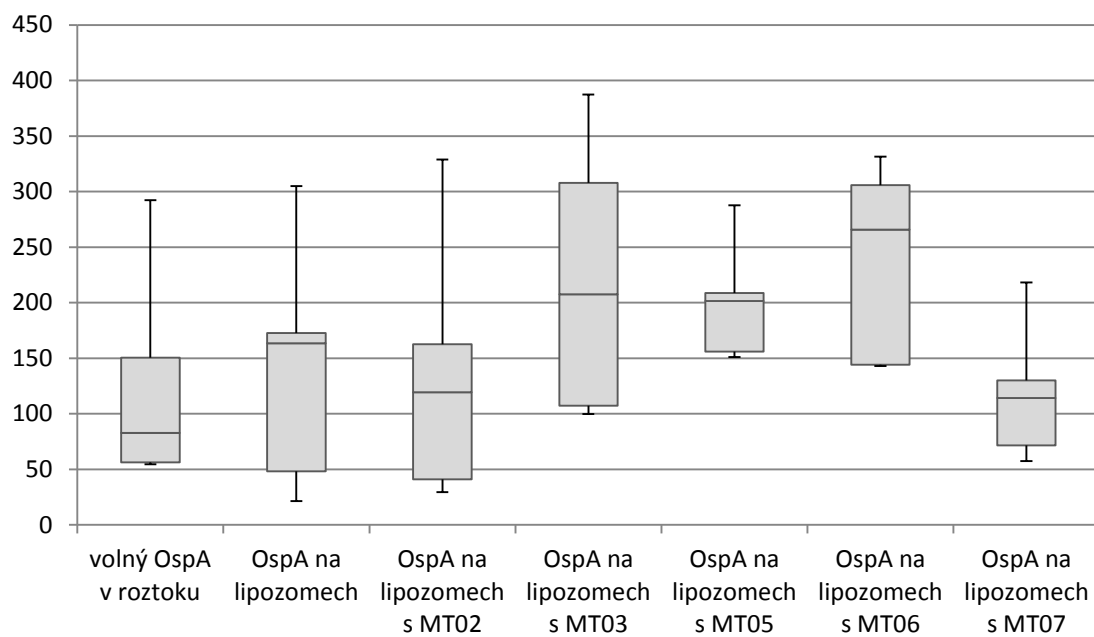
V případě odběru **po druhé vakcinaci** jsem nejvyšší koncentraci **celkových imunoglobulinů** (IgG, IgA a IgM) zjistila opět u skupiny vakcinované OspA na lipozomech s MT06 (74,527 jednotek relativní koncentrace – viz Graf č. 3). Druhou nejvyšší hodnotu jsem mediánu pozorovala u skupiny vakcinované OspA na lipozomech s MT03 (58,672 jednotek relativní koncentrace), třetí nejvyšší hodnota byla zjištěna u skupiny vakcinované OspA na lipozomech s MT05 (46,961 jednotek relativní koncentrace). Nejnižší hodnota mediánu koncentrací těchto imunoglobulinů byla pozorována u skupiny vakcinované volným OspA v roztoku (17,436 jednotek relativní koncentrace). Nízké hodnoty vykazovaly také skupiny vakcinované OspA na lipozomech s MT02 (21,460 jednotek relativní koncentrace) a OspA na lipozomech s MT07 (31,899 jednotek relativní koncentrace). Hodnota mediánu koncentrací u skupiny vakcinované OspA na lipozomech bez adjuvans byla 40,344 jednotek relativní koncentrace).

Graf č. 3: Hodnoty relativních koncentrací polyvalentních imunoglobulinů tříd G, A a M po druhé vakcinaci rekombinantním proteinem OspA.



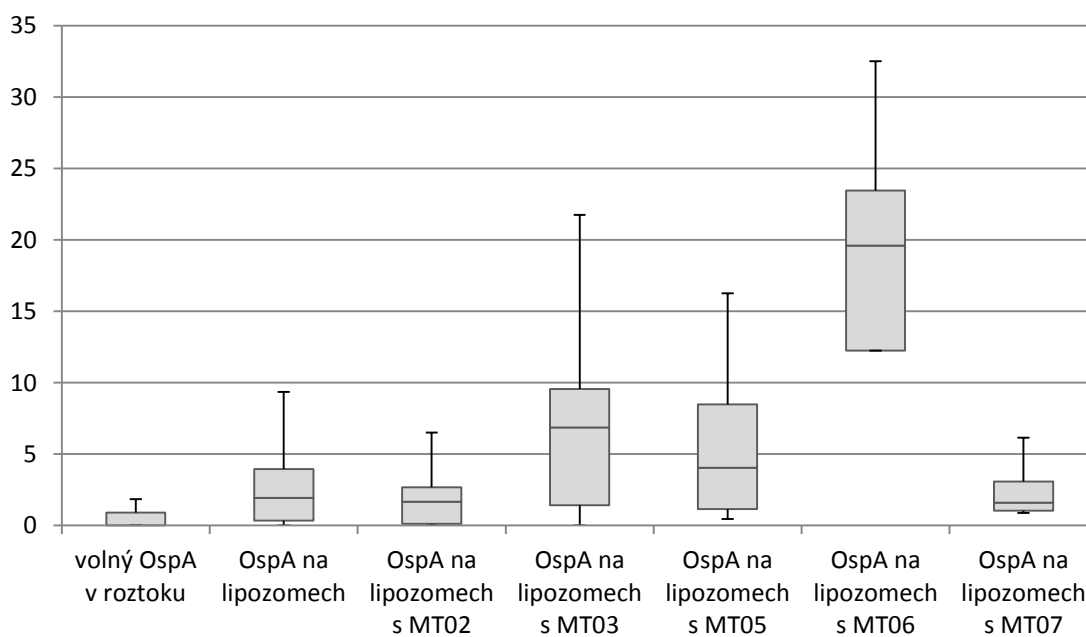
V případě **imunoglobulinů třídy G podtřídy 1 (IgG1)** po druhé vakcinaci byla nejvyšší hodnota mediánu koncentrací zaznamenána taktéž u skupiny vakcinované OspA na lipozomech s MT06 (265,701 jednotek relativní koncentrace – viz Graf č. 4). Druhou nejvyšší hodnotu jsem zjistila u skupiny vakcinované OspA na lipozomech s MT03 (207,662 jednotek relativní koncentrace), třetí nejvyšší hodnotu potom u skupiny vakcinované OspA na lipozomech s MT05 (201,461 jednotek relativní koncentrace). Nejnižší hodnotu mediánu koncentrací IgG1 měla skupina vakcinovaná volným OspA v roztoku (82,920 jednotek relativní koncentrace). Nízké hodnoty v rámci IgG1 jsem pozorovala také u skupiny vakcinované OspA na lipozomech s MT07 (114,131 jednotek relativní koncentrace) a OspA na lipozomech s MT02 (119,532 jednotek relativní koncentrace). Hodnota mediánu u skupiny vakcinované OspA na lipozomech bez adjuvans byla 163,510 jednotek relativní koncentrace.

Graf č. 4: Hodnoty relativních koncentrací imunoglobulinů třídy G podtřídy 1 (IgG1) po druhé vakcinaci rekombinantním proteinem OspA.



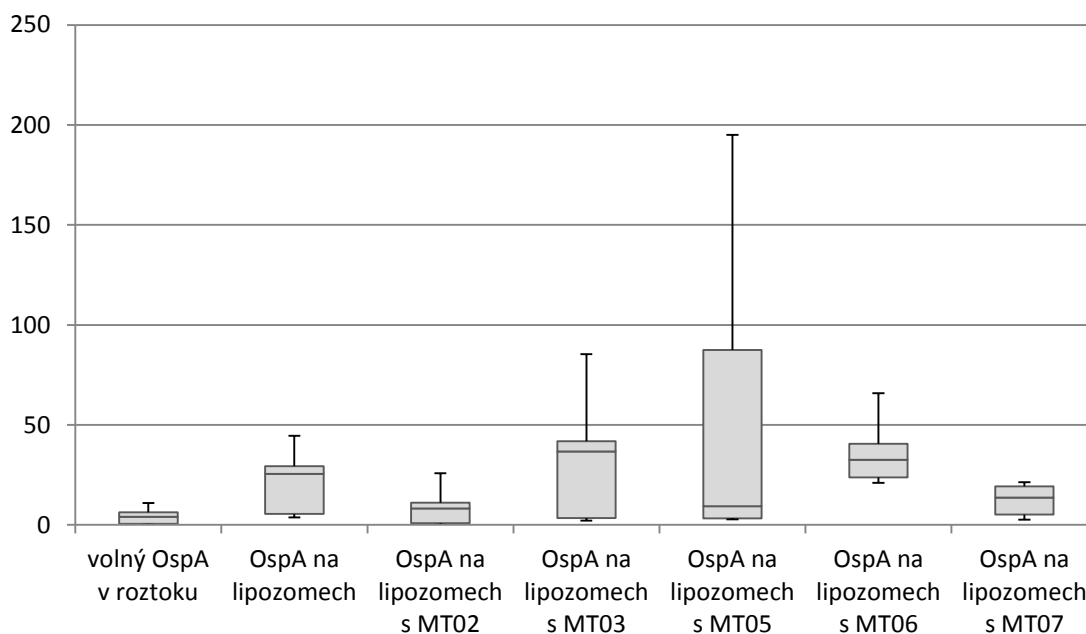
Nejvyšší hodnota mediánu koncentrací **imunoglobulinů třídy G podtřídy 2a** (IgG2a) po druhé vakcinaci byla opět pozorována u skupiny vakcinované OspA na lipozomech s MT06 (19,600 jednotek relativní koncentrace – viz Graf č. 5). Druhou nejvyšší hodnotu mediánu jsem zjistila u skupiny vakcinované OspA na lipozomech s MT03 (6,860 jednotek relativní koncentrace) a třetí nejvyšší u skupiny vakcinované OspA na lipozomech s MT05 (4,049 jednotek relativní koncentrace). Nejnižší hodnota byla opět u skupiny vakcinované volným OspA v roztoku, u které se blížila nule. Další nízké hodnoty jsem zjistila u skupiny vakcinované OspA na lipozomech s MT07 (1,595 jednotek relativní koncentrace) a OspA na lipozomech s MT02 (1,663 jednotek relativní koncentrace). Hodnota mediánu u skupiny vakcinované OspA na lipozomech bez adjuvans byla 1,947 jednotek relativní koncentrace.

Graf č. 5: Hodnoty relativních koncentrací imunoglobulinů třídy G podtřídy 2a (IgG2a) po druhé vakcinaci rekombinantním proteinem OspA.



Posledním testem bylo stanovení relativní **koncentrace imunoglobulinů třídy G podtřídy 2b (IgG2b)** po druhé vakcinaci. Nejvyšší hodnotu jsem zaznamenala u skupiny vakcinované OspA na lipozomech s MT03 (36,701 jednotek relativní koncentrace – viz Graf č. 6). Druhá nejvyšší hodnota byla nalezena u skupiny vakcinované OspA na lipozomech s MT06 (32,642 jednotek relativní koncentrace) a třetí u skupiny vakcinované OspA na lipozomech bez adjuvans (25,520 jednotek relativní koncentrace). Nejnižší hodnotu mediánu koncentrací IgG2b jsem pozorovala u skupiny vakcinované volným OspA v roztoku (4,082 jednotek relativní koncentrace). Další nízké hodnoty vykazovaly také skupiny vakcinované OspA na lipozomech s MT02 (8,287 jednotek relativní koncentrace) a OspA na lipozomech s MT05 (9,431 jednotek relativní koncentrace). Hodnota mediánu koncentrací u skupiny vakcinované OspA na lipozomech s MT07 byla 13,633 jednotek relativní koncentrace.

Graf č. 6: Hodnoty relativních koncentrací imunoglobulinů třídy G podtřídy 2b (IgG2b) po druhé vakcinaci rekombinantním proteinem OspA.



7. Diskuze

V experimentální části své diplomové práce jsem se zabývala izolací a purifikací rekombinantního antigenu OspA spirochety *Borrelia burgdorferi sensu stricto* kmene B31 a jeho imunogenními vlastnostmi po vakcinaci experimentálních myší kmene BALB/c.

K vakcinaci bylo použito celkem sedm druhů vakcín, a to vakcína skládající se z volného OspA v roztoku, OspA navázaného na lipozomy, OspA navázaného na lipozomy s MT02, OspA navázaného na lipozomy s MT03, OspA navázaného na lipozomy s MT05, OspA navázaného na lipozomy s MT06 a OspA navázaného na lipozomy s MT07. Vyhodnocení protilátkové odpovědi probíhalo pomocí ELISA testů. Aby mohly být výsledky jednotlivých testů srovnány mezi sebou, byl použit standard, kterým bylo dobře reagující sérum z předchozích experimentů. Standardu byla přiřazena hodnota 100 jednotek relativní koncentrace.

V případě stanovení koncentrace celkových imunoglobulinů (IgG, IgA a IgM) byly provedeny dva testy, a to po první a po druhé vakcinaci. Po první vakcinaci se hodnoty mediánů jednotlivých skupin experimentálních myší pohybovaly v rozmezí 1,294 – 5,115 jednotek relativní koncentrace. Po druhé vakcinaci hodnoty mediánů u všech skupin vzrostly na 17,436 – 74,527 jednotek relativní koncentrace. V obou případech jsem nejvyšší hodnotu mediánu koncentrací celkových imunoglobulinů pozorovala u skupiny vakcinované rekombinantním proteinem OspA navázaným na lipozomy s adjuvans MT06. Skupina vakcinovaná OspA na lipozomech s MT06 vykazovala nejvyšší hodnotu mediánu koncentrací také v případě IgG1, v rámci kterých se hodnoty mediánů koncentrací pohybovaly v rozmezí 82,920 – 265,701 jednotek relativní koncentrace, a IgG2a, kde jsem zaznamenala rozptyl hodnot od nuly do 19,600 jednotek relativní koncentrace. Nejvyšší hodnotu mediánu koncentrací IgG2b jsem zjistila u skupiny vakcinované OspA na lipozomech s MT03. Zde se hodnoty mediánů pohybovaly od 4,082 do 36,701 jednotek relativní koncentrace. Ve všech testech kromě polyvalentních imunoglobulinů po první vakcinaci, kde nejnižší hodnotu mediánu měla skupina vakcinovaná OspA na lipozomech s MT07, vykazovala nejnižší hodnoty skupina vakcinovaná volným OspA v roztoku.

V rámci jednotlivých skupin jsem pozorovala poměrně vysokou variabilitu výsledků, která může být způsobena nejen koncentrací, ale také afinitou protilátek.

Srovnáním výsledků všech testů jsem zjistila, že celkově nejvyššími hodnotami mediánů koncentrací se vyznačuje skupina vakcinovaná OspA na lipozomech s adjuvans MT06. Dalšími skupinami poskytujícími vyšší hodnoty mediánů koncentrací než skupina vakcinovaná OspA na lipozomech bez adjuvans jsou skupiny vakcinované OspA na lipozomech s MT03 a OspA na lipozomech s MT05. Experimentální myši vakcinované OspA na lipozomech s MT02 a OspA na lipozomech s MT07 se celkově vyznačují nižšími hodnotami mediánů koncentrací než skupina vakcinovaná OspA na lipozomech bez adjuvans. Celkové nejnižší hodnoty mediánů koncentrací jsem zaznamenala u skupiny vakcinované pouze volným OspA v roztoku, což odpovídá předpokladům, jelikož samotné lipozomy také působí jako adjuvans (Mašek *et al.*, 2011).

Všechny druhy použitých adjuvans (MT02, MT03, MT05, MT06 a MT07) byly dosud testovány společně pouze jednou, a to při vakcinaci experimentálních myši rekombinantním antigenem Hsp90 kvasinky *Candida albicans* (Turánek Knötigová *et al.*, 2015). V literatuře je možné také najít testy pro některá jednotlivá adjuvans nebo jejich dvojici.

V roce 2011 bylo testováno adjuvans MT03, a to při vakcinaci experimentálních myši rekombinantním antigenem Hsp90 kvasinky *Candida albicans*. Výsledkem této studie byl fakt, že vakcinace rekombinantním antigenem Hsp90 navázaným na lipozomy s MT03 po druhé dávce indukuje produkci specifických imunoglobulinů, a to v přibližně stejné koncentraci jako vakcinace rekombinantním antigenem Hsp90 v kombinaci s kompletním nebo nekompletním Freudovým adjuvans. Vakcinace Hsp90 na lipozomech s MT03 také vedla ke specifické produkci IFN- γ , což poukazuje na to, že je MT03 schopen vyvolat specifickou imunitní odpověď se zapojením Th1 lymfocytů. Ačkoli byla produkce IFN- γ při vakcinaci Hsp90 s kompletním Freudovým adjuvans silnější než v případě Hsp90 na lipozomech s MT03, při použití kompletního Freudova adjuvans došlo k zánětu a nekróze kůže v místě vpichu. Při použití MT03 nebyly zjištěny žádné vedlejší účinky (Mašek *et al.*, 2011).

Dalšími testovanými adjuvans ze skupiny lipofilních derivátů muramyl dipeptidu byla MT05 a MT06. Tato adjuvans byla použita při vakcinaci experimentálních myši rekombinantním antigenem OspC *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. Jako pozitivní kontroly sloužily vakcíny obsahující rekombinantní OspC s kompletním Freudovým adjuvans a OspC s hydroxidem hlinitým. U skupin myši

imunizovaných OspC na lipozomech s MT05 a OspC na lipozomech s MT06 byla pozorována nižší koncentrace IgG než v případě použití hydroxidu hlinitého a kompletního Freudova adjuvans, v případě stanovení IgG1 byla však koncentrace u skupin vakcinovaných OspC s hydroxidem hlinitým, OspC na lipozomech s MT05 a OspC na lipozomech s MT06 srovnatelná. Koncentrace IgG2a dosáhla nejvyšší hodnoty při použití OspC na lipozomech s MT06 a druhé nejvyšší hodnoty při použití OspC na lipozomech s MT05. V případě IgG2b byly výsledky podobné, avšak s tím rozdílem, že koncentrace při použití OspC s hydroxidem hlinitým se vyrovnala koncentraci při použití OspC na lipozomech s MT05. V této studii byly stanovovány také hodnoty koncentrace IgG3 a IgM. V obou případech byla nejvyšší hodnota zaznamenána u skupiny vakcinované OspC na lipozomech s MT05. Ani v této studii nebyly zjištěny žádné nežádoucí účinky adjuvans MT05 a MT06 (Křupka *et al.*, 2012).

Jak již bylo řečeno výše, všechna adjuvans testovaná v této diplomové práci byla společně studována pouze jednou, a to při vakcinaci experimentálních myší rekombinantním antigenem Hsp90 kvasinky *Candida albicans*. Kromě MT02, MT03, MT05, MT06 a MT07 byla použita také adjuvans MT01, MT04 a MT08. Jako pozitivní kontroly sloužily skupiny vakcinované rekombinantním antigenem Hsp90 s kompletním Freudovým adjuvans a Hsp90 s hydroxidem hlinitým. Z testovaných derivátů muramyl dipeptidu bylo dosaženo nejsilnější protilátkové odpovědi v případě použití MT03, slabší odpovědi poskytla adjuvans MT07, MT06 a MT05. Imunitní odpověď na ostatní adjuvans byla srovnatelná s použitím volného Hsp90 v roztoku nebo Hsp90 navázaného na lipozomy. MT02, MT04 a MT01 měla dokonce potenciál potlačovat tvorbu celkových imunoglobulinů. Adjuvans MT03, MT07 a v menší míře MT06, MT05 a MT02 vyvolaly tvorbu imunoglobulinů IgG2a a IgG2b spojené s Th1 protilátkovou odpovědí. Tvorba IgG1 byla nejvíce indukována také adjuvans MT03 a MT07, v menší míře potom MT06 a MT05. Jako i v předchozích uvedených studiích nebyly ani v této práci zjištěny jakékoliv vedlejší účinky lipofilních derivátů muramyl dipeptidu (Turánek Knotigová *et al.*, 2015).

8. Závěr

V experimentální části této diplomové práce jsem se zabývala izolací a purifikací rekombinantního antigenu OspA pomocí HisPur Ni-NTA a Ni-NTA agarózy. Protein byl izolován z bakterií *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformovaných plazmidem pET200 s vloženou sekvencí antigenu OspA *Borrelia burgdorferi sensu stricto* kmene B31. Většího výtěžku bez kontaminací jsem dosáhla při použití Ni-NTA agarózy. Z roztoku rekombinantního proteinu OspA byl pomocí Tritonu X-114 odstraněn endotoxin.

Vakcíny obsahující izolovaný rekombinantní protein OspA byly připraveny na Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně. Celkem bylo připraveno sedm druhů vakcín, a to vakcína obsahující pouze volný OspA v roztoku, OspA navázaný na lipozomy, OspA navázaný na lipozomy s MT02, OspA navázaný na lipozomy s MT03, OspA navázaný na lipozomy s MT05, OspA navázaný na lipozomy s MT06 a OspA navázaný na lipozomy s MT07. Vakcinováno bylo celkem 35 myší rozdělených do 7 skupin po 5 jedincích.

Celkem proběhly dvě vakcinace, přičemž první odběr a druhá vakcinace byla provedena po třech týdnech od vakcinace první. Druhý odběr proběhl opět po třech týdnech po druhé vakcinaci.

V následných ELISA testech byly stanovovány polyvalentní imunoglobuliny tříd G, A a M, a to po první a druhé vakcinaci, dále imunoglobuliny třídy G podtřídy 1 (IgG1), imunoglobuliny třídy G podtřídy 2a (IgG2a) a imunoglobuliny třídy G podtřídy 2b (IgGb) po druhé vakcinaci. V případě polyvalentních imunoglobulinů po prvním i druhém odběru, IgG1 a IgG2a dosáhla nejvyšší koncentrace skupina imunizovaná vakcínou obsahující adjuvans MT06, nižší hodnoty potom vykazovaly skupiny s adjuvans MT03 a MT05. V případě IgG2b obsahovala nejvyšší koncentraci imunoglobulinů skupina vakcinovaná OspA na lipozomech s MT03, nižší hodnoty byly zaznamenány u skupin s MT06 a OspA navázaným na lipozomy bez dalšího adjuvans. Nejnižších hodnot koncentrace imunoglobulinů ve všech případech, kromě polyvalentních imunoglobulinů po prvním odběru, dosáhla skupina vakcinovaná volným antigenem OspA v roztoku. V případě polyvalentních imunoglobulinů po první vakcinaci se jednalo o skupinu s MT07. Skupiny imunizované vakcínou obsahující MT07 a MT02 poskytovaly celkově nižší koncentraci imunoglobulinů než skupina vakcinovaná OspA na lipozomech bez dalšího adjuvans.

Nejlepších výsledků bylo celkově dosaženo vakcinací rekombinantního antigenu OspA navázaným na lipozomech s MT06, případně MT03. Tato adjuvans by mohla být v budoucnosti využita pro vývoj vakcíny proti lymbské borelióze ve veterinární, případně humánní medicíně.

9. Seznam použitých zkratek

- ACA..... *acrodermatitis chronica atrophicans*
- ACGal..... cholesteryl 6-O-acyl- β -D-galaktopyranozid
- APS..... peroxodisíran amonný
- BBK32..... fibronektin vázající protein (*fibronectin-binding protein*)
- Bdr..... *Borrelia direct repeat*
- Bgp..... *Borrelia GAG-binding protein*
- BmpA..... povrchový antigen *B. burgorferi* s. l. vážící laminin
- CXCL9..... *chemokine ligand 9*
- DbpA, B decorin vázající protein A a B (*decorin-binding protein A, B*)
- DNA..... deoxyribonukleová kyselina (*deoxyribonucleic acid*)
- EDTA..... kyselina ethylendiamintetraoctová
- ELISA..... *enzyme-linked immunosorbent assay*
- EM..... *erythema migrans*
- EU..... *endotoxin unit*
- FDA..... *U. S. Food and Drug Administration*
- FlaB..... flagelin B
- HLA..... *human leucocyte antigens*
- HLA-DR2..... HLA molekula II. třídy
- HLA-DR4..... HLA molekula II. třídy
- HLA-DRB1*0401 alela kódující HLA-DR4
- hLFA-1..... *human lymphocyte function-associated antigen 1*
- HRP..... křenová peroxidáza (*horseradish peroxidase*)
- Hsp90..... protein tepelného šoku o velikosti 90 kDa (*heat shock protein 90*)
- IFN- γ interferon gamma
- IgA..... imunoglobuliny třídy A
- IgG..... imunoglobuliny třídy G
- IgG1..... imunoglobuliny třídy G podtřídy 1
- IgG2a..... imunoglobuliny třídy G podtřídy 2a
- IgG2b..... imunoglobuliny třídy G podtřídy 2b

- IgM imunoglobuliny třídy M
- IL-1 β interleukin 1 beta
- IL-4 interleukin 4
- IR6 *invariable region 6* proteinu VIsE
- LAL voda apyrogenní voda pro test na přítomnost endotoxinu
- LB médium Luria-Bertani médium (syn. *Lysogeny broth*)
- LPS lipopolysacharid
- MAWD *mitogen-activated protein kinase activator with WD40 repeats*
- MAWD-BP *MAWD-binding protein*
- MDP muramyl dipeptid
- MT01 – MT08 lipofilní deriváty MDP
- n. m. nad mořem
- NTA kyselina nitrilotrioctová
- Oms66 druhý název pro protein p66
- OPD o-fenylendiamin dihydrochlorid
- Osp povrchový protein (*outer surface protein*)
- OspA, B, C, D, E, F.. povrchové antigeny *B. burgorferi s. l.*
- P35 protein *B. burgorferi s. l.* o velikosti 35 kDa
- P37 protein *B. burgorferi s. l.* o velikosti 37 kDa
- p66 povrchový antigen *B. burgorferi s. l.* o velikosti 66 kDa
- PBS fosfátový pufr (*phosphate buffered saline*)
- PCR polymerázová řetězová reakce (*polymerase chain reaction*)
- rpm otáčky za minutu (*revolutions per minute*)
- RpoD regulační sigma faktor
- RpoS regulační sigma faktor
- rRNA ribozomální ribonukleová kyselina (*ribosomal ribonucleic acid*)
- s. l. *sensu lato* (v širším pojetí)
- s. s. *sensu sricto* (v užším pojetí)
- Salp15 protein nacházející se ve slinách klíšťat

- SDS docecylsíran sodný
- SDS-PAGE elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS
- TEMED N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
- Th1 pomocné T lymfocyty 1 (*T helper lymphocytes 1*)
- Th2 pomocné T lymfocyty 2 (*T helper lymphocytes 2*)
- TNF- α tumor nekrotizující faktor alfa (*tumor necrosis factor alpha*)
- Tris trishydroxymethylaminomethan
- TROSPA receptor klíštěte pro OspA (*tick receptor for OspA*)
- T-span7 tetraspanin 7
- VlsE *Vmp-like sequence protein Expressed* neboli *Variable major protein E*
- VraA *Virulent strain-associated repetitive antigen A*
- WD40 strukturní motiv cca 40 aminokyselin končící dipeptidem tryptofanu a kyselinou asparagovou

10. Seznam literatury

- Aberer E, Bergmann AR, Derler A-M, Schmidt B (2007): Course of *Borrelia burgdorferi* DNA Shedding in Urine after Treatment. *Acta Dermato-Venereologica* 87, 39 – 42.
- Aberer E, Duray PH (1991): Morphology of *Borrelia burgdorferi*: Structural Patterns of Cultured Borreliae in Relation to Staining Methods. *Journal of Clinical Microbiology* 29, 764 – 772.
- Agüero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP (2005): Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clinical Microbiology Reviews* 18, 484 – 509.
- Aida Y, Pabst MJ (1990): Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *Journal of Immunological Methods* 132, 191 – 195.
- Akin E, McHugh GL, Flavell RA, Fikrig E, Steere AC (1999): The Immunoglobulin (IgG) Antibody Response to OspA and OspB Correlates with Severe and Prolonged Lyme Arthritis and the IgG Response to P35 Correlates with Mild and Brief Arthritis. *Infection and Immunity* 67, 173 – 181.
- Barbour AG (1984): Isolation and Cultivation of Lyme Disease Spirochetes. *The Yale Journal of Biology And Medicine* 57, 521 – 525.
- Basford S, Dunn J, Mihatsch M (2004): Outer Surface Lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* Vary in Their Ability to Induce Joint Injury. *Arthritis & Rheumatism* 50, 2360 – 2369.
- Bockenstedt LK, Fikrig E, Barthold SW, Flavell RA, Kantor FS (1996): Identification of a *Borrelia burgdorferi* OspA T Cell Epitope That Promotes Anti-OspA IgG in Mice. *The Journal of Immunology* 157, 5496 – 5502.
- Brandt ME, Riley BS, Radolf JD, Norgard MV (1990): Immunogenic integral Membrane Proteins of *Borrelia burgdorferi* Are Lipoproteins. *Infection and Immunity* 58, 983 – 991.
- Brorson O, Brorson SH (1997): Transformation of cyst Forms of *Borrelia burgdorferi* to Normal, Mobile Spirochetes. *Infection* 25, 240 – 246.

- Brorson O, Brorson SH (1998): A rapid method for generating cystic forms of *Borrelia burgdorferi*, and their reversal to mobile spirochetes. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 106, 1131 – 1141.
- Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles RJ, Bjoërsdorff A, Blanco JR, Caruso G, Cinco M, Fournier PE, Francavilla E, Jensenius M, Kazar J, Laferl H, Lakos A, Lotric Furlan S, Maurin M, Oteo JA, Parola P, Perez-Eid C, Peter O, Postic D, Raoult D, Tellez A, Tselentis Y, Wilske B (2004): Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 10, 1108 – 1132.
- Brown EL, Kim JH, Reisenbichler ES, Höök M (2005): Multicomponent Lyme vaccine: Three is not a crowd. *Vaccine* 23, 3687 – 3696.
- Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes S, Benach JL, Grunwaldt E, David JP (1982): Lyme Disease – A Tick-Borne Spirochetosis? *Science* 216, 1317 – 1319.
- Caimano MJ, Eggers CH, Gonzales CA, Radolf JD (2005): Alternate Sigma Factor RpoS Is required for the In Vivo-Specific Repression of *Borrelia burgdorferi* Plasmid lp54-Borne ospA and lp6.6 Genes. *Journal of Bacteriology* 187, 7845 – 7852.
- Casjens S, Palmer N, van Vugt R, Huang WM, Stevenson B, Rosa P, Lathigra R, Sutton G, Peterson J, Dodson RJ, Haft D, Hickey E, Gwinn M, White O, Fraser CM (2000): A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology* 35, 490 – 516.
- Coburn J, Chege W, Magoun L, Bodary SC, Leong M (1999): Characterization of a candidate *Borrelia burgdorferi* β_3 -chain integrin ligand identified using a phage display library. *Molecular Microbiology* 34, 926 – 940.
- Coleman JL, Gebbia JA, Piesman J, Degen JL, Bugge T, Benach JL (1997): Plasminogen Is Required for Efficient Dissemination of *B. burgdorferi* in Tick and for Enhancement of Spirochetemia in Mice. *Cell* 89, 1111 – 1119.
- Dai J, Wang P, Adusumilli S, Booth CJ, Narasimhan S, Anguita J, Fikrig E (2009): Antibodies against a Tick Protein, Salp15, Protect Mice from the Lyme Disease Agent. *Cell Host & Microbe* 6, 482 – 492.

- Daniel M, Danielová V, Kříž B, Jirsa A, Nožička J (2003): Shift of the Tick *Ixodes ricinus* and Tick-Borne Encephalitis to Higher Altitudes in Central Europe. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 22, 327 – 328.
- Dattwyler RJ, Halperin JJ, Pas H, Luft BJ (1987): Ceftriaxone as Effective Therapy in Refractory Lyme Disease. *The Journal of Infectious Diseases* 155, 1322 – 1325.
- Dattwyler RJ, Luft BJ, Kunkel MJ Finkel MF, Wormser GP, Rush TJ, Grunwaldt E, Agger WA, Franklin M, Oswald D, Cockey L, Maladorno D (1997): Ceftriaxone compared with doxycykline for the treatment of acute disseminated Lyme disease. *The New England Journal of Medicine* 337, 289 – 294.
- Ding W, Huang X, Yang X, Dunn JJ, Luft BJ, Koide S, Lawson CL (2000): Structural Identification of a Key Protective B-cell Epitope in Lyme Disease Antigen OspA. *Journal of Molecular Biology* 302, 1153 – 1164.
- Dressler F, Whalen JA, Reinhardt B, Steere AC (1993): Western Blotting in the Serodiagnosis of Lyme Disease. *The Journal of Infectious Diseases* 167, 392 – 400.
- Dressler F, Whalen JA, Reinhardt BN, Steere AC (1993): Western Blotting in the Serodiagnosis of Lyme Disease. *The Journal of Infectious Diseases* 167, 392 – 400.
- Drouin EE, Glickstein L, Kwok WW, Nepom GT, Steere AC (2008a): Searching for borrelial T cell epitopes associated with antibiotic-refractory Lyme arthritis. *Molecular Immunology* 45, 2323 – 2332.
- Drouin EE, Glickstein L, Kwok WW, Nepom GT, Steere AC (2008b): Human homologues of a *Borrelia* T cell epitope associated with antibiotic-refractory Lyme arthritis. *Molecular Immunology* 45, 180 – 189.
- Duray PH, Steere AC (1988): Clinical Pathologic Correlation of Lyme Disease by Stage. *Annals New York Academy of Sciences* 539, 65 – 79.
- Earnhart CG, Buckles EL, Dumler JS, Marconi RT (2005): Demonstration of OspC Type Diversity in Invasive Human Lyme Disease Isolates and

Identification of Previously Uncharacterized Epitopes That Define the Specificity of the OspC Murine Antibody Response. *Infection and Immunity* 73, 7869 – 7877.

- Earnhart CG, Marconi RT (2007a): Development of an OspC-based tetravalent, recombinant, chimeric vaccinogen that elicits bactericidal antibody against diverse Lyme disease spirochete strains. *Vaccine* 25, 466 – 480.
- Earnhart CG, Marconi RT (2007b): An Octavalent Lyme Disease Vaccine Induces Antibodies That Recognize All Incorporated OspC Type-Specific Sequences. *Human Vaccines* 3, 281 – 289.
- Ettestad PJ, Campbell GL, Welbel SF, Genese CA, Spitalny KC, Marchetti CM, Dennis DT (1995): Biliary Complications in the Treatment of Unsubstantiated Lyme Disease. *The Journal of Infectious Diseases* 171, 356 – 361.
- Exner MM, Wu X, Blanco DR, Miller JN, Lovett MA (2000): Protection Elicited by Native Outer Membrane Protein Oms66 (p66) against Host-Adapted *Borrelia burgdorferi*: Conformational Nature of Bactericidal Epitopes. *Infection and Immunity* 68, 2647 – 2654.
- Fikrig E, Barthold SW, Kantor FS, Flavell RA (1990): Protection of Mice Against the Lyme Disease Agent by Immunizing with Recombinant OspA. *Science* 250, 553 – 556.
- Fikrig E, Barthold SW, Kantor FS, Flavell RA (1991): Protection of Mice from Lyme Borreliosis by Oral Vaccination with *Escherichia coli* Expressing OspA. *The Journal of Infectious Diseases* 164, 1224 – 1227.
- Fikrig E, Barthold SW, Marcantonio N, Deponete K, Kantor FS, Flavell RA (1992): Roles of OspA, OspB and Flagellin in Protective Immunity to Lyme Boreliosis in Laboratory Mice. *Infection and Immunity* 60, 657 – 661.
- Fikrig E, Barthold SW, Marcantonio N, Deponete K, Kantor FS, Flavell RA (1992a): Roles of Ospa, OspB, and Flagellin in Protective Immunity to Lyme Borreliosis in Laboratory Mice. *Infection and Immunity* 60, 657 – 661.
- Fikrig E, Barthold SW, Sun W, Feng W, Telford SR, Flavell RA (1997): *Borrelia burgdorferi* P35 and P37 Proteins, Expressed *In Vivo*, Elicit Protective Immunity. *Immunity* 6, 531 – 539.

- Fikrig E, Telford SR, Barthold SW, Kantor FS, Spielman A, Flavell A (1992b): Elimination of *Borrelia burgdorferi* from vector ticks feeding on OspA-immunized mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 5418 – 5421.
- Fišerová L, Černá K, Horká H, Kopecký J (2008): Two ways of experimental infection of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: ixodidae) with spirochetes of *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex. *Folia Parasitologica* 55, 150 – 154.
- Fraser CM, Casjens S, Huang WM, Sutton G, 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 Ch, Garland S, Fujil C, Cotton MD, Horst K, Roberts K, Hatch B, Smith HO, Venter JC (1997): Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390, 580 – 586.
- Garon CF, Dorward DW, Corwin MD (1989): Structural features of *Borrelia burgdorferi* – the Lyme disease spirochete: Silver staining for nucleic acids. *Scanning Microscopy Supplement* 3, 109 – 115.
- Gilmore RD, Kappel KJ, Dolan MC, Burkot TR, Johnson BJB (1996): Outer Surface Protein C (OspC), but Not P39, Is a Protective Immunogen against a Tick-Transmitted *Borrelia burgdorferi* Challenge: Evidence for a Conformational Protective Epitope in OspC. *Infection and Immunity* 64, 2234 – 2239.
- Glickstein L, Moore B, Bledsoe T, Damle N, Sikand V, Steere AC (2003): Inflammatory Cytokine Production Predominates in Early Lyme Disease in Patients with Erythema Migrans. *Infection and Immunity* 71, 6051 – 6053.
- Guo BP, Brown EL, Dorward DW, Rosenberg LC, Höök M (1998): Decorin-binding adhesins from *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology* 30, 711 – 723.
- Hagman KE, Yang X, Wikel SK, Schoeler GB, Caimano MJ, Radolf JD, Norgard MV (2000): Decorin-Binding Protein A (DbpA) of *Borrelia*

burgdorferi Is Not Protective When Immunized Mice Are Challenged via Tick Infestation and Correlates with the Lack of DbpA Expression by *B. burgdorferi* in Ticks. *Infection and Immunity* 68, 4759 – 4764.

- Hainfeld JF, Liu W, Halsey CMR, Freimuth P, Powell RD (1999): Ni-NTA-Gold Clusters Target His-Tagged Proteins. *Journal of Structural Biology* 127, 185 – 198.
- Hanson MS, Cassatt DR, Guo BP, Patel NK, McCarthy MP, Dorward DW, Höök M (1998): Active and Passive Immunity against *Borrelia burgdorferi* Decorin Binding Protein A (DbpA) Protects against Infection. *Infection and Immunity* 66, 2143 – 2153.
- Hengen PN (1999): Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*. *Trends in Biochemical Sciences* 20, 285 – 286.
- Hitt E (2002): Poor sales trigger vaccine withdrawal. *Nature Medicine* 8, 311 – 312.
- Huang X., Yang X, Luft BJ, Koide S (1998): NMR Identification of Epitopes of Lyme Disease Antigen OspA to Monoclonal Antibodies. *Journal of Molecular Biology* 281, 61 – 67.
- Hulínská D (2013a): Mikrobiologie. In: Bartůněk P, Bojar M, Calda P, Diblík P, Hergocogová J, Hoza J, Hulínská D, Janovská D, Pícha D, Valešová M: Lymeská borelióza. Grada Publishing, a.s., Praha.
- Hulínská D (2013b): Laboratorní diagnostika. In: Bartůněk P, Bojar M, Calda P, Diblík P, Hergocogová J, Hoza J, Hulínská D, Janovská D, Pícha D, Valešová M: Lymeská borelióza. Grada Publishing, a.s., Praha.
- Charon NW, Goldstein SF, Marko M, Hsieh C, Gebhardt LL, Motaleb MA, Wolgemuth CW, Limberger RJ, Rowe N (2009): The Flat-Ribbon Configuration of the Periplasmic Flagella of *Borrelia burgdorferi* and Its Relationship to Motility and Morphology. *Journal of Bacteriology* 191, 600 – 6007).
- Jaenson TGT, Tälleklint L (1999): The reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. In: Needham G, Mitchell R, Horn DJ, Welbourn WC: Acarology IX. Ohio Biological Survey, Columbus.

- Janovská D (2013): Epidemiologická situace v České republice. In: Bartůněk P, Bojar M, Calda P, Diblík P, Hergocogová J, Hoza J, Hulínská D, Janovská D, Pícha D, Valešová M: Lymeská borelióza. Grada Publishing, a.s., Praha
- Jobe DA, Lovrich SD, Schell RF, Callister SM (2003): C-Terminal Region of Outer Surface Protein C Binds Borreliacidal Antibodies in Sera from Patients with Lyme Disease. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10, 573 – 578.
- Johnson RC, Hyde FW, Rumpel CM (1984): Taxonomy of the Lyme Disease Spirochetes. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 57, 529 – 537.
- Johnson RC, Konder C, Russel M (1986): Active Immunization of Hamsters against Experimental Infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 54, 897 – 898.
- Kalish RA, Leong JM, Steere AC (1993): Association of Treatment-Resistant Chronic Lyme Arthritis with HLA-DR4 and Antibody Reactivity to OspA and OspB of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 61, 2774 – 2779.
- Klempner WS, Hu LT, Evans J, Schmid C, Johnson GM, Trevino RP, Norton D, Levy L, Wall D, McCall J, Kosinski M, Weinstein A (2001): Two controlled trials of antibiotic treatment in patients with persistent symptoms and history of Lyme disease. *The New England Journal of Medicine* 345, 85 – 92.
- Koide S, Yang X, Huang X, Dunn JJ, Luft BJ (2005): Structure-based Design of a Second-generation Lyme Disease Vaccine Based on a C-terminal Fragment of *Borrelia burgdorferi* OspA. *Journal of Molecular Biology* 350, 290 – 299.
- Kříž B, Beneš Č. (2014): Lymeská borelióza – epidemiologická data do roku 2013. Navštíveno dne 13.3.2016 na [www. szu.cz](http://www.szu.cz).
- Kříž B, Gašpárek M (2015): Lymeská borelióza – epidemiologická data za rok 2014. Navštíveno dne 13.3.2016 na www. szu.cz.
- Křupka M, Mašek J, Bartheldyová E, Turánek Knötigová P, Plocková J, Korvasová Z, Škrabalová M, Koudelka Š, Kulich P, Zachová K, Czemeková L, Strouhal O, Horynová M, Šebela M, Miller AD, Ledvina M, Turánek J (2012): Enhancement of immune response towards non-lipidized *Borrelia burgdorferi* recombinant OspC antigen by binding onto the surface of metallochelating

nanoliposomes with entrapped lipophilic derivatives of norAbuMDP. *Journal of Controlled Release* 160, 374 – 381.

- Křupka M, Strojil J, Raška M (2014): Současné možnosti diagnostiky, léčby a prevence lymeské boreliózy. *Praktické lékařnictvo* 4, 79 – 82.
- Křupka M, Zachová K, Weigl E, Raška M (2011): Prevention of Lyme Disease: Promising Research or Sisyphean Task? *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 59, 261 – 275.
- Labandeira-Rey M, Baker EA, Skare JT (2001): VraA (BBI16) Protein of *Borrelia burgdorferi* Is a Surface-Exposed Antigen with a Repetitive Motif That Confers Partial Protection against Experimental Lyme Borreliosis. *Infection and Immunity* 69, 1409 – 1419.
- Lindgren E, Jaenson TGT (2006): Lyme Borreliosis in Europe: Influences of Climate and Climate Change, Epidemiology, Ecology and Adaptation Measures. In Menne B, Ebi KL: Climate Change and Adaptation Strategies for Human Health. Springer, Darmstadt & WHO, Geneva.
- Lindgren E, Tälleklint L, Polfeldt T (2000): Impact of Climatic Change on the Northern Latitude Limit and Population Density of the Disease-Transmitting European Tick *Ixodes ricinus*. *Environmental Health Perspectives* 108, 119 – 123.
- Liu N, Montgomery RR, Barthold SW, Bockenstedt LK (2004): Myeloid Differentiation Antigen 88 Deficiency Impairs Pathogen Clearance but Does Not Alter Inflammation in *Borrelia burgdorferi*-Infected Mice. *Infection and Immunity* 72, 3195 – 3203.
- Liu S, Tobias R, McClure S, Styba G, Shi Q, Jackowski G (1997): Removal of Endotoxin from Recombinant Protein Preparations. *Clinical Biochemistry* 30, 455 – 463.
- Luft BJ, Steinman CR, Neimark HC, Muralidhar B, Rush T, Finkel MF, Kunkel M, Dattwyler RJ (1992): Invasion of the Central Nervous System by *Borrelia burgdorferi* in Acute Disseminated Infection. *The Journal of the American Medical Association* 267, 1364 – 1367.

- Luger SW, Paparone P, Wormser GP, Nadelman RH, Grunwaldt E, Gomez G, Wisniewski M, Collins JJ (1995): Comparison of Cefuroxime Axetil and Doxycycline in Treatment of Patients with Early Lyme Disease Associated with Erythema Migrans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39, 661 – 667.
- Lünemann JD, Zarmas S, Priem S, Franz J, Zschenderlein R, Aberer E, Klein R, Schouls L, Burmester GR, Krause A (2001): Rapid Typing of *Borrelia burgorferi* Sensu Lato Species in Specimens from Patients with Different Manifestations of Lyme Borreliosis. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 1130 – 1133.
- Makrides SC (1996): Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* 60, 512 – 538.
- Malawista SE, de Boisfleury Chevance A (2008): Clocking the Lyme Spirochete. *PLoS One* 3(2):e1633.
- Mašek J, Brtheldyová E, Turánek Knötigová P, Škrabalová M, Korvasová Z, Plocková J, Koudelka Š, Škodová P, Kulich P, Křupka M, Zachová K, Czerneková L, Horynová M, Kratochvílová I, Miller AD, Zýka D, Michálek J, Vrbková J, Šebela M, Ledvina M, Raška M, Turánek J (2011): Metallochelating liposomes with associated lipophilised norAbuMDP as biocompatible platform for construction of vaccines with recombinant His-tagged antigens: Preparation, structural study and immune response towards rHsp90. *Journal of Controlled Release* 151, 193 – 201.
- Mathiesen MJ, Holm A, Christiansen M, Blom J, Hansen K, Ostergaard S, Theisen M (1998): The Dominant Epitope of *Borrelia garinii* Outer Surface Protein C Recognized by Sera from Patients with Neuroborreliosis Has a Surface-Exposed Conserved Structural Motif. *Infection and Immunity* 66, 4073 – 4079.
- Mejlon HA (1997): Diel activity of *Ixodes ricinus* Acari: Ixodidae at two locations near Stockholm, Sweden. *Experimental & Applied Acarology* 21, 247 – 255.

- Miklossy J, Kasas S, Zurn AD, McCall S, Yu S, McGeer PL (2008): Persisting atypical and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and local inflammation in Lyme neuroborreliosis. *Journal of Neuroinflammation* 5:40, 1176 – 1194.
- Müllegger RR, McHugh G, Ruthazer R, Binder B, Kerl H, Steere AC (2000): Differential Expression of Cytokine mRNA in Skin Specimens from Patients with Erythema Migrans or Arodermatitis Chronica Atrophicans. *The Journal of Investigative Dermatology* 115, 1115 – 1123.
- Nadelman RB, Nowakowski J, Fish D, Falco RC, Freeman K, McKenna D, Welch P, Marcus R, Agüero-Rosenfeld ME, Dennis DT, Wormser GP (2001): Prophylaxis with single-dose doxycykline for the prevention of Lyme disease after an *Ixodes scapularis* tick bite. *The New England Journal of Medicine* 345, 79 – 84.
- Nester EW, Roberts CE, Nester MT (1995): Microbiology: a human perspective. Wm. C. Brown Communication, Inc., Dubuque.
- Nuttall PA (1999): Pathogen-tick-host Interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE Virus. *Zentralblatt für Bakteriologie* 289, 492 – 505.
- Ohnishi J, Piesman J, de Silva AM (2001): Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 670 – 675.
- Pal U, Li X, Wang T, Montgomery RR, Ramamoorthi N, de Silva AM, Bao F, Yang X, Pypaert M, Pradhan D, Kantor FS, Telford S, Anderson JF, Fikrig E (2004): TROSPA, an *Ixodes scapularis* Receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell* 119, 457 – 468.
- Parveen N, Leong JM (2000): Identification of a candida glycosaminoglycan-binding adhesin of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology* 35, 1220 – 1234.
- Pícha D (2013): Patogeneze. In: Bartůněk P, Bojar M, Calda P, Diblík P, Hergocogová J, Hoza J, Hulínská D, Janovská D, Pícha D, Valešová M: Lymecká borelióza. Grada Publishing, a.s., Praha.
- Preac-Mursic V, Wilske B, Jauris S, Will G, Reinhardt S, Lehnert G, Patsouris E, Mehraein P, Soutschek E, Klockmann U (1992): Active immunization with

pC protein of *Borrelia burgdorferi* protects gerbils against *B. burgdorferi* infection. *Infection* 20, 342 – 349.

- Pritt BS, Mead PS, Johnson DKH, Neitzel DF, Respicio-Kingry LB, Davis JP, Schiffman E, Sloan LM, Schriefer ME, Replogle AJ, Paskewitz SM, Ray JA, Bjork J, Steward CR, Deedon A, Lee X, Kingry LK, Miller TK, Feist MA, Theel ES, Patel R, Irish CL, Petersen JM (2016): Identification of a novel pathogenic *Borrelia* species causing Lyme borreliosis with unusually high spirochaetemia: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*. Publikováno online 5.2.2016 na [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00464-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00464-8).
- Probert WS, Craford M, Cadiz RB, LeFebvre RB (1997): Immunization with Outer Surface Protein (Osp) A, but Not OspC, Provides Cross-Protection Mice Challenged with North American Isolates of *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of Infectious Diseases* 175, 400 – 405.
- Probert WS, Johnson BJ (1998): Identification of a 47kDa fibronectin-binding protein expressed by *Borrelia burgdorferi* isolate B31. *Molecular Microbiology* 30, 1003 – 1015.
- Rizzoli A, Merler S, Furnlanello C, Genchi C (2002): Geographical Information Systems and Bootstrap Aggregation (Bagging) of Tree-Based Classifiers for Lyme Disease Risk Prediction in Trentino, Italian Alps. *Journal of Medical Entomology* 39, 485–492.
- Rosano GL, Ceccarelli EA (2014): Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* 5, 7 – 23.
- Rowinska-Zyrek M, Witkowska D, Potocki S, Remelli M, Kozłowski H (2013): His-rich sequences – is plagiarism from nature a good idea? *New Journal of Chemistry* 37, 58 – 70.
- Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH Jr (2011): Updates on *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex with respect to public health. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2 (2011) 123– 128.
- Rudenko N, Golovchenko M, Vancova M, Clark K, Grubhoffer L, Oliver JH (2016): Isolation of live *Borrelia burgdorferi sensu lato* spirochaetes from

patients with undefined disorders and symptoms not typical for Lyme borreliosis. *Clinical Microbiology and Infection* 22, 267.e9 – 267.e15.

- Sanogo YO, Reipert S, Halouzka J, Hubálek Z, Nĕmec M (2000): Isolation and Morphological Characterization of Mosquito Spirochetes from a Lyme Disease Endemic Area. *Annals New York Academy of Sciences* 916, 672 – 675.
- Santino I, Dastoli F, Sessa R, Del Piano M (1997): Geographical Incidence of Infection with *Borrelia burgdorferi* in Europe. *Panminerva Medica* 39, 208 – 214.
- Sedláček I (2007): Taxonomie prokaryot. Masarykova univerzita, Brno.
- Seemanapalli SV, Xu Q, McShan K, Liang FT (2010): Outer Surface Protein C Is a Dissemination-Facilitating Factor of *Borrelia burgdorferi* during Mammalian Infection. *PLoS ONE* 5: e15830.
- Seinost G, Dykhuizen DE, Dattwyler RJ, Golde WT, Dunn JJ, Wang I, Wormser GP, Schriefer ME, Luft BJ (1999): Four Clones of *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto Cause Invasive Infection in Humans. *Infection and Immunity* 67, 3518 – 3524.
- Shin JJ, Glickstein L, Steere AC (2007): High levels of inflammatory chemokines and cytokines in joint fluid and synovial tissue throughout the course of antibiotic-refractory lyme arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 56, 1325 – 1335.
- Schaible UE, Wallich R, Kramer MD, Gern L, Anderson JF, Museteanu C, Simon MM (1993): Immune sera to individual *Borrelia burgdorferi* isolates or recombinant OspA thereof protect SCID mice against infection with homologous strains but only partially or not at all against those of different OspA/OspB genotype. *Vaccine* 11, 1049 – 1054.
- Schmidt BL (1997): PCR in Laboratory Diagnosis of Human *Borrelia burgdorferi* Infections. *Clinical Microbiology Reviews* 10, 185 – 201.
- Schwartz I, Wormser GP, Schwartz JJ, Cooper D, Weissensee P, Gazumyan A, Zimmermann E, Goldberg NS, Bittker S, Campbell GL, Pavia CS (1992): Diagnosis of Early Lyme Disease by Polymerase Chain Reaction Amplification

and Culture of Skin Biopsies from Erythema Migrans Lesions. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 3082 – 3088.

- Sigal LH (1999): Lyme Disease and the Lyme Disease Vaccines. *Bulletin on the Rheumatic Diseases* 48, 1 – 4.
- Sigal LH, Zahradnik JM, Lavin P, Patella SJ, Bryant G, Haselby R, Holton E, Kunkel M, Adler-Klein D (1998): A Vaccine Consisting of Recombinant *Borrelia burgdorferi* Outer-Surface Protein A to Prevent Lyme Disease. *The New England Journal of Medicine* 339, 216 – 222.
- Smith RP, Schoen RT, Rahn DW, Sikand VK, Nowakowski J, Parenti DL, Holman MS, Persing DH, Steere AC (2002): Clinical Characteristics and Treatment Outcome of Early Lyme Disease in Patients with Microbiologically Confirmed Erythema Migrans. *Annals of Internal Medicine* 136, 421 – 428.
- Sorensen HP, Mortensen KK (2005): Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 115, 113 – 128.
- Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F (2012): Lyme borreliosis. *Lancet* 379, 461 – 473.
- Steere AC, Broderick TF, Malawista SE (1978): Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: Epidemiologic evidence for a tick vector. *American Journal of Epidemiology* 108, 312 – 321.
- Steere AC, Coburn J, Glickstein L (2004): The emergence of Lyme disease. *The Journal of Clinical Investigations* 113, 1093 – 1101.
- Steere AC, Falk B, Drouin EE, Baxter-Lowe LA, Hammer J, Nepom GT (2003): Binding of outer surface protein A and human lymphocyte function-associated antigen 1 peptides to HLA-DR molecules associated with antibiotic treatment-resistant Lyme arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 48, 534 – 540.
- Steere AC, Sikand VK, Meurice F, Parenti DL, Fikrig E, Schoen RT, Nowakowski J, Schmid CH, Laukamp S, Buscarino C, Krause DS (1998): Vaccination Against Lyme Disease with Recombinant *Borrelia burgdorferi* Outer-Surface Lipoprotein a with Adjuvant. *The New England Journal of Medicine* 339 (209 – 215).

- Stevens RC (2000): Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. *Structure* 8, 177 – 185.
- Sticker RB (2007): Counterpoint: Long-Term Antibiotic Therapy Persistent Symptoms Associated with Lyme Disease. *Clinical Infectious Diseases* 45, 149 – 57.
- Stübs G, Rupp B, Schumann RR, Schröder NWJ, Rademan J (2010): Chemoenzymatic Synthesis of a Glycolipid Library and Elucidation of the Antigenic Epitope for Construction of a Vaccine Against Lyme Disease. *Chemistry – A European Journal* 16, 3536 – 3544.
- Systém Epidat, navštíveno dne 9.4.2016 na www.szu.cz.
- Turánek Knötigová P, Zyka D, Mašek J, Kovalová A, Křupka M, Bartheldyová E, Kulich P, Koudelka Š, Lukáč R, Kauerová Z, Vacek A, Stuchlová Horynová M, Kozubík A, Miller AD, Fekete L, Kratochvílová I, Ježek J, Ledvina M, Raška M, Turánek J (2015): Molecular Adjuvants Based on Nonpyrogenic Lipophilic Derivatives of norAbuMDP/GMDP Formulated in Nanoliposomes: Stimulation of Innate and Adaptive Immunity. *Pharmaceutical Research* 32, 1186 – 1199.
- Vaz A, Glickstein L, Field JA, McHugh G, Sikand VK, Damle N, Steere AC (2001): Cellular and Humoral Immune Responses to *Borrelia burgdorferi* Antigens in Patients with Culture-Positive Early Lyme Disease. *Infection and Immunity* 69, 7437 – 7444.
- Wallich R, Siebers A, Jahraus O, Brenner C, Stehle T, Simon MM (2001): DNA Vaccines Expressing a Fusion Product of Outer Surface Proteins A and C from *Borrelia burgdorferi* Induce Protective antibodies Suitable for Prophylaxis but Not for Resolution of Lyme Disease. *Infection and Immunity* 69, 2130 – 2136.
- Wang G, Aquero-Rosenfeld, Wormser GP, Schwartz I (2010): Detection of *Borrelia burgdorferi*. In: Samuels DS, Radolf JD: *Borrelia*, molecular biology, host interaction and pathogenesis. Caister Academic Press, Norfolk.
- Wang IN, Dykhuizen DE, Qiu W, Dunn JJ, Bosler EM, Luft B (1999): Genetic Diversity of OspC in a Local Population of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *Genetic* 151, 15 – 30.

- Widhe M, Jarefors S, Erkefelt C, Vrethem M, Bernstöm S, Forsberg P, Ernerudh J (2004): *Borrelia*-Specific Interferon- γ and Interleukin-4 Secretion in Cerebrospinal Fluid and Blood during Lyme Borreliosis in Humans: Association with Clinical Outcome. *The Journal of Infectious Diseases* 189, 1881 – 1891.
- Willet TA, Meyer AL, Brown EL, Huber BT (2004): An effective second-generation outer surface protein A-derived Lyme vaccine that eliminates a potentially autoreactive T cell epitope. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 1303 – 1308.
- Wilske B (2003): Diagnosis of Lyme Borreliosis in Europe. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 3, 215 – 227.
- Wilske B, Fingerle V, Schulte-Spechtel U (2007): Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 49, 13 – 21.
- Wilske B, Preac-Mursic V, Göbel UB, Graf B, Jauris S, Soutschek E, Schwab E, Zumstein G (1993a): An OspA Serotyping System for *Borrelia burgdorferi* Based on Reactivity with Monoclonal Antibodies and OspA Sequence Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 340 – 350.
- Wilske B, Preac-Mursic V, Jauris S, Hofmann A, Pradel I, Soutschek E, Schwab E, Will G, Wanner G (1993b): Immunological and Molecular Polymorphisms of OspC, an Immunodominant Major Outer Surface Protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 61, 2182 – 2191.
- Wormser GP, Dattwyler RJ, Shapiro ED, Halperin JJ, Steere AC, Klemperer MS, Krause PJ, Bakken JS, Strle F, Stanek G, Bockenstedt L, Fish D, Dumler JS, Nadelman R (2006): The Clinical Assessment, Treatment, and Prevention of Lyme Disease, Human Granulocytic Anaplasmosis, and Babesiosis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 43, 1089 – 1134.
- Wormser GP, Nadelman RB, Dattwyler RJ, Dennis DT, Shapiro ED, Steere AC, Rush TJ, Rahn DW, Coly PK, Persing DH, Fish D, Luft BJ (2000): Practice Guidelines for the Treatment of Lyme Disease. *Clinical Infectious Diseases* 31, 1 – 14.

- Xu Q, McShan K, Liang FT (2010): Two regulatory elements required for enhancing OspA expression in *Borrelia burgdorferi* grown in vitro but repressing its expression during mammalian infection. *Microbiology* 156, 2194 – 2204.
- Žáková A (2000): Monitoring the presence of borreliae in *Ixodes ricinus* ticks in Brno Park Pisarky, Czech Republic. *Biologia*, 55, 661–666.