

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

## **Proč neexistuje vakcína proti Lymeské borelióze?**

Bakalářská práce

**Klára Koutská**

Školitel: prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

České Budějovice 2019

**Koutská, K.** 2019: Proč neexistuje vakcína proti lymeské borelióze? [Why there is no vaccine against Lyme Borreliosis? Bc. Thesis, in Czech] - 44 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Anotace**

Lyme borreliosis is at the moment the most common vector borne disease. However, to this day there is still no human vaccine that would prevent infection. There has been effort to develop effective vaccine, but it failed inevitably. Fortunately, new vaccine is being developed at the moment and its release is expected soon. The aim of this thesis is to answer the main question which is asked in the thesis by explainig various reasons that complicate vaccine development.

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

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

V Českých Budějovicích dne 17. 4. 2019

.....

Klára Koutská

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za zadání poutavého tématu, za cenné rady, poskytnuté materiály, odborné vedení a taktéž velkou trpělivost.

Dále bych ráda poděkovala své rodině za trpělivost a podporu během studia, a především při psaní bakalářské práce, čehož bych nedocílila bez jejich porozumění.

## Obsah

1	ÚVOD.....	1
2	ROD BORRELIA.....	2
2.1	Morfologie .....	2
2.2	Genetika .....	3
2.2.1	Chromozom .....	3
2.2.2	Plazmidy .....	3
2.3	Povrchové proteiny <i>B. burgdorferi</i> .....	4
2.3.1	Outer surface protein A (OspA) .....	4
2.3.2	Outer surface protein B (OspB).....	5
2.3.3	Outer surface protein C (OspC).....	5
2.3.4	Outer surface protein E a F (OspE, OspF).....	6
2.3.5	Decorin-binding protein A a B (DbpA a B) .....	6
2.3.6	Fibronectin-binding proteiny (BBK32).....	6
2.3.7	Integrin-binding proteiny.....	7
2.3.8	Erp proteiny (OspE/F-related proteins) .....	7
2.3.9	VlsE .....	8
2.4	Patogeneze a imunitní odpověď.....	9
2.4.1	Interakce patogen-vektor .....	9
2.4.2	Interakce patogen-hostitel .....	10
2.4.3	Interakce klíště-hostitel.....	14
3	LYMESKÁ BORELIÓZA .....	15
3.1	Historie.....	15
3.2	Klinické projevy .....	16
3.2.1	Postižení kůže .....	17
3.2.2	Postižení kloubů .....	17
3.2.3	Neuroborelióza .....	18

3.2.4	Lymeská karditida .....	18
3.2.5	Postižení oka.....	19
4	KLÍŠŤATA.....	20
4.1	Klíšťákovití (Argasidae) .....	20
4.2	Klíšťatovití (Ixodidae) .....	21
4.2.1	Slinné žlázy a sliny .....	22
5	VAKCÍNY .....	23
5.1	Alternativy vakcín.....	23
5.1.1	Inaktivované celobuněčné vakcíny.....	23
5.1.2	Vakcíny založené na OspA.....	23
5.1.3	Vakcíny založené na OspB.....	24
5.1.4	Vakcíny založené na OspC.....	25
5.1.5	Vakcíny založené na BBA52.....	25
5.1.6	Vakcíny založené na DbpA .....	25
5.1.7	Vakcíny založené na BBK32.....	25
5.1.8	Vakcíny proti klíšťatům.....	26
5.2	LYMErix™.....	27
5.3	VLA15 .....	28
6	DISKUZE .....	31
7	ZÁVĚR.....	36
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	37

# 1 ÚVOD

Lymeská borelióza je bakteriální onemocnění přenášené členovci, které lidstvo obtěžuje už řadu let. Dlouhou dobu je snaha vyvinout účinnou vakcínu, což je ale do značné míry komplikováno antigenní variabilitou a množstvím druhů patřících do komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato*.

Do skupiny borelií způsobující boreliózu patří 19 druhů, ovšem pouze 4 náležící do komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* a *Borrelia bavariensis*) jsou pro člověka patogenní. Borelióza je multiorgánové onemocnění, rozšiřuje se tedy postupně do více orgánových soustav a je pro ni typické velké spektrum symptomů (Petzke a Schwartz, 2015).

Přestože je borelióza léčitelná antibiotiky, v případě pozdního rozpoznání nemoci se snižuje pravděpodobnost vyléčení a může mít vážné trvalé následky. Prevence ve formě očkování je složitá vzhledem k variabilitě vnějších povrchových proteinů borelií, které komplikují vývoj efektivní vakcíny. Po neúspěchu slibně vypadající OspA vakcíny LYMERix™ v USA, která byla stažena z důvodu obav veřejnosti z vedlejších účinků způsobených mediálními tlakem, se na trhu zatím jiná neobjevila (Skotarczak, 2015). V roce 2018 ovšem úspěšně prošla testovací fází I vakcína VLA15 od francouzské společnosti Valneva, která již po prvním testování vykazuje veliký potenciál.

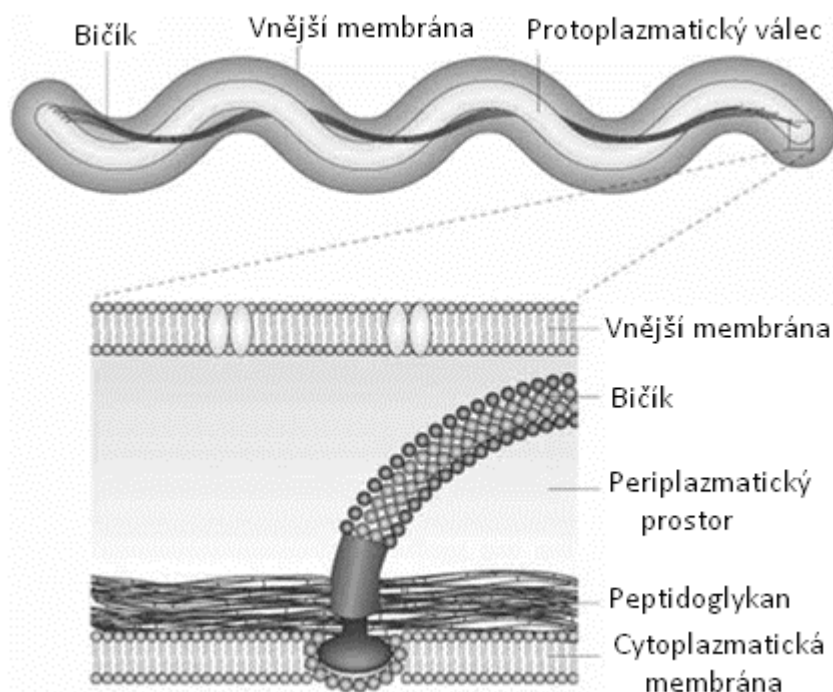
Vzhledem k výše zmíněným komplikacím v oblasti vakcinace zatím zůstává jediným způsobem ochrany proti lymeské borelióze prevence infekce, tedy omezení interakce s vektory, kterými jsou klíšťata rodu *Ixodes*. Lidé by se měli vyhýbat oblastem s vysokým výskytem klíšťat, používat repelent, nosit ochranné oblečení a v případě přisátí klíště včas odstranit. V mnohých případech ale nemusí dojít k rozpoznání klíštěte. Až jedna třetina pacientů, u kterých se objevila *erythema migrans*, si není vědomá přisátí klíštěte (Nigrovic a Thompson, 2007).

## 2 ROD BORRELIA

*Borrelia* je rod gramnegativních bakterií řazených do třídy Spirochaetes, řádu Spirochaetales a do vývojově staré čeledi Spirochaetaceae. Patří sem společně s rody *Leptospira* a *Treponema*. Rod *Borrelia* obsahuje některé druhy, které způsobují tzv. návratnou horečku. Ta se projevuje opakovanými episodami horeček a řadou nespecifických symptomů (např. bolest hlavy a svalů, zimnice, bolesti břicha). Do této skupiny patří například *Borrelia recurrentis* (Dworkin et al., 2008). Komplex *Borrelia burgdorferi sensu lato* zahrnuje celkem 19 druhů, z čehož 4 jsou pro člověka patogenní (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii* a *B. bavariensis*) (Petzke a Schwartz, 2015).

### 2.1 Morfologie

Borelie mají spirálovitě stočené tělo, jehož délka se může hodně lišit. Pohybuje se od 8 do 30  $\mu\text{m}$  (8  $\mu\text{m}$  v případě *B. coriaceae* a cca 20  $\mu\text{m}$  v případě *B. burgdorferi*). Šířka těla je od 0,2 do 0,5  $\mu\text{m}$  (Babour a Hayes, 1986). Mají tělo ve tvaru tenké, dlouhé spirály čítající 4–15 pravidelně vzdálených závitů. V periplazmatickém prostoru je ukotveno 7–11 bičíků pomocí bazálních disků. Pohyb borelií probíhá smršťováním a natahováním, či rotačním pohybem kolem své osy. Rozmnožovací cyklus borelií trvá 17 hodin (Bolehovská et al., 2009).



Obr. 1: Detailní struktura spirochet borelií. Převzato a upraveno dle (Bolehovská et al., 2009)

## 2.2 Genetika

Genom borelií je sice jeden z menších, ale řadí se k jednomu z nejkompexnějších mezi bakteriemi. Genom kmene B31 *Borrelia burgdorferi* má 21 plazmidů, a dokonce se předpokládá, že došlo ke ztracení několika plazmidů z původního počtu 23 mezi jeho izolací v roce 1982 a dokončení jeho genomové sekvence (Casjens et al., 2000). Borelie mají jeden lineární chromozom dlouhý zhruba 900kbp a 21 plazmidů. Plazmidy se dělí na 12 lineárních o délce od 5 do 220kbp a 9 cirkulárních o délce zhruba 612kbp. Chromozomy nesoucí housekeeping (referenční) geny jsou konstantní, oproti tomu plazmidy nesoucí geny kódující povrchové lipoproteiny jsou mnohem více variabilní a liší se v závislosti na druhu borelií. Díky této vlastnosti jsou schopny kolonizovat velké množství organismů např. členovce, teplokrevné savce aj. (Casjens et al., 2010).

Geny v hlavním chromozomu jsou kondenzované, avšak plazmidy jsou neobvyklé v porovnání s většinou bakteriálních plazmidů, jelikož obsahují paralogní sekvence, mnoho pseudogenů a v některých případech geny esenciální. V laboratoři bylo zjištěno, že s výjimkou plazmidu cp26 nejsou plazmidy za potřebí k růstu v kultuře, ale ve většině případů jsou potřebné k infekci myši nebo přenosu klíštětem (Casjens et al., 2010). Genová exprese je ovlivněna vnějšími podmínkami, jako je změna pH, teplota a podmínky v hostiteli. V sajícím klíštěti se mění teplota z okolní na 37°C a při procesu sání krve v klíštěcích střevech dochází ke změnám pH, kdy klesá z 7,4 na 6,8 (Pal a Fikrig, 2003).

### 2.2.1 Chromozom

Genom má nižší obsah guaninu a cytosinu činící zhruba 28,6 % a předpokládá se, že obsahuje 846 zřejmě nedotčených protein kódujících genů a 10 nebo méně genů, které se zdají být zkrácené či obsahují mutace. Analýza nasvědčuje tomu, že replikační počátek se nachází blízko centra lineárního chromozomu. Zhruba 60 % chromozomálních genů má podobnost s geny jiných organismů, jejichž funkce je alespoň z části známá. Další 10 % je podobných genům jiných organismů, jejichž funkce je ale dosud neznámá. A 30 % tvoří geny unikátní pro borelie (Casjens et al., 2010).

### 2.2.2 Plazmidy

Borelie mají mnoho plazmidů, cirkulární plazmidy (cp) a lineární plazmidy (lp). Ke zkratkám bývá přidruženo číslo, které je založeno na jejich velikosti určené gelovou elektroforézou. Genom kmene B31 čítá 12 lineárních a 9 cirkulárních plazmidů. Většina genů lineárních plazmidů, které nejsou zapojeny do replikace, nemá žádné homology mimo rod



borelií, ale bylo prokázáno, že některé z nich jsou zapojeny do restriční modifikace, metabolismu nukleotidů a vyhýbání se imunitní odpovědi hostitele. Dále bylo prokázáno, že řada genů na lineárních plazmidech kóduje geny povrchových lipoproteinů. Na rozdíl od cirkulárních plazmidů není žádný z 12 lineárních plazmidů homologní v celé své délce, takže tvoří 12 různých typů plazmidů – lp5, lp17, lp21, lp25, lp28-1, lp28-2, lp28-3, lp28-4, lp36, lp38, lp54 a lp56. Genom kmene B31 obsahuje pouze 3 organizační typy cirkulárních plazmidů – cp9, cp26 a sedm různých cp32 (cp32-1, cp32-3, cp32-4, cp32-6, cp32-7, cp32-8, cp32-9). Důležitou funkci má plazmid cp26, který prokázal podstatnou roli v množení bakterií a je bezesporu nezbytný pro zachování enzootického cyklu spirochet. Nese geny, které kódují proteiny zapojené do syntézy GMP, vazby hostitelského integrinu, import oligopeptidu aj. Také kóduje povrchový antigen OspC (Casjens et al., 2010).

## **2.3 Povrchové proteiny *B. burgdorferi***

Velká část genomu borelií kóduje lipoproteiny. Tyto proteiny následně interagují buď s hostitelskými nebo klíštěcími ligandy a napomáhají tak přežití patogenu. Hned po vstupu do hostitele musí *B. burgdorferi* překonat jeho imunitní systém. Rozhodujícím faktorem přirozené imunity je komplementová kaskáda, skládající se z klasické, lektinové a alternativní cesty. *B. burgdorferi* využívá tzv. complement regulating-acquiring surface proteins (CRASP) a OspE/F related proteins (Erp), aby navázala faktor H nebo FHL protein (factor-H-like) a tudíž zabránila zničení komplementem. Tato schopnost potlačovat komplement se liší u každého druhu (genospecies) (Hovius et al., 2007).

### **2.3.1 Outer surface protein A (OspA)**

Tento protein je primárně exprimován v klíštěti během sání (Pal et al., 2004a). OspA je povrchový lipoprotein o velikosti cca 28,5 kD, jehož gen se nachází na lineárním plazmidu lp49 (Šadžiene et al., 1993). K vnější membráně je připojen pomocí N-terminálního lipidického segmentu. C-terminální segment je dál od bakteriálního povrchu, a tedy přístupnější pro anti-OspA protilátky. Předpokládá se, že OspA působí v klíštěti během sání krve jako protilátkový štít proti imunitní obraně hostitele. Navíc OspA údajně zakrývá ostatní povrchové proteiny jako P13 a P66 a tím je chrání od rozpoznání protilátkou (Comstedt et al., 2014).

Další funkcí OspA je adheze na plazminogen a TROSPA (tick receptor for OspA) ve střevě klíštěte (Comstedt et al., 2014). Během krmení klíštěte se sníží exprese OspA, což uvolní borelie a umožňuje migraci přes střevní epitel do slinných žláz a následně do krevního

oběhu hostitele. Na základě toho fungují OspA vakcíny, jejichž protilátky napadají borelie již ve střevě klíštěte a tím zabraňují migraci do těla hostitele (Pal et al., 2001).

Druhy borelií způsobující lymeskou boreliózu exprimují na svém povrchu různé serotypy OspA, *B. burgdorferi sensu stricto* serotyp 1, *B. afzelii* serotyp 2, *B. garinii* serotypy 3, 5 a 6, a *B. bavariensis* serotyp 4. V Severní Americe převažuje *B. burgdorferi sensu stricto*, avšak u pacientů s Lymeskou boreliózou byly izolovány i *B. spielmanii*, *B. lusitaniae*, *B. bissettii* a *B. valaisiana*, což ukazuje, že nemoc může být způsobena i méně častými druhy. Za účelem vytvoření vakcíny, která pokryje všechny druhy, je potřeba vytvořit multivalentní OspA vakcínu (Comstedt et al., 2014).

### 2.3.2 Outer surface protein B (OspB)

OspB je povrchový protein o velikosti 31 kDa (Ergström et al., 1989). Několik studií tvrdí, že OspB se vyskytuje na povrchu *B. burgdorferi* uvnitř nekrmeného klíštěte. OspB se stejně jako OspA navazuje na stěnu střeva klíštěte, ovšem v tomto případě nejde o vazbu na TROSPA (Fikrig et al., 2004). Geny pro vnější povrchové proteiny A a B (OspA a OspB) jsou kódovány v jediném operonu na 49-kb lineárním plazmidu lp49 (Šadžiene et al., 1993).

### 2.3.3 Outer surface protein C (OspC)

OspC je povrchový protein jehož molekulová hmotnost je 25 kDa a je kódován plazmidem cp27 (Šadžiene et al., 1993). Je exprimován *B. burgdorferi* během přenosu z klíštěte do hostitele (Fingerle et al., 1995). Jakmile klíštěte započne sání, borelie se v jeho střevech znásobí a sníží expresi OspA. Ve stejném okamžiku začnou produkovat OspC a činí tak i během celého procesu přenosu a časné infekce. Zdá se tedy, že tento protein usnadňuje migraci ze střeva do slinných žláz. Po přenosu OspC hraje roli i při kolonizaci tkáně hostitele (Pal et al., 2004b). Mutované borelie s delecí v OspC prokazují defekt při přesunu do slinných žláz a také během infekce hostitele (Pal et al., 2004a).

Expresí vnějších povrchových proteinů borelií je multifaktoriální proces čili ovlivněna vícero vlivy (teplota, pH aj.). V případě OspC je navíc transkripce ovlivněna alternativním sigma faktorem RpoS (Hübner et al., 2001). RpoS je regulován malou nekódující sekvencí RNA (DsrA<sub>Bb</sub>) ovlivněnou změnou teploty. Genom kmene s chybějícím DsrA<sub>Bb</sub> není schopen regulovat RpoS a v důsledku ani OspC (Lybecker a Samuels, 2007).

Alternativa OspA vakcíny by mohla být založená na obranné schopnosti a antigenitě OspC, jelikož již byla u vakcíny založené na OspC prokázána imunitní odpověď. Nevýhodou je v tomto případě imunologická heterogenita proteinů OspC mezi jednotlivými druhy borelií

(Schuijt et al., 2011). Kumaran et al. (2001) prokázali krystalovou strukturou kmene B31, že monomer OspC je polymorfní a složen z jednoho dlouhého a čtyř krátkých  $\alpha$ -helixů (Kumaran et al., 2001). Z toho důvodu byl učiněn pokus o vyvinutí multivalentní chimérické OspC vakcíny, u které se však v první testovací fázi u poloviny jedinců objevil erytém a otok v místě vpichu (Schuijt et al., 2011).

#### **2.3.4 Outer surface protein E a F (OspE, OspF)**

Geny ospE a ospF jsou strukturálně uspořádané v tandemu jako jedna transkripční jednotka pod kontrolou společného promotoru. OspE gen, umístěný na 5' konci operonu, má délku 513 nukleotidů a kóduje 171-aminokyselinový protein s molekulovou hmotností 19,2 kDa. Gen ospF, umístěný 27 bp od stop kodonu genu ospE, sestává z 690 nukleotidů a kóduje protein o 230 aminokyselinách s molekulovou hmotností 26,1 kDa (Lam et al., 1994).

#### **2.3.5 Decorin-binding protein A a B (DbpA a B)**

*B. burgdorferi* obsahuje 2 decorin-binding proteiny (Dbps) A a B. Jsou kódovány na operonu plazmidu lp54 a mají molekulovou hmotnost 18–20 kDa. Dbps jsou povrchové lipoproteiny exprimované pouze během pozdní fáze sání nymfy a v savčím hostiteli. DbpA a DbpB mají aminokyselinovou podobnost z 41 %, ale přesto mají rozdílnou vazbu na GAG (glykosaminoglykany) (Petzke a Schwartz, 2015). Podobně jako OspC je exprese DbpA regulována alternativním sigma faktorem RpoS (Hübner, 2001). Decorin-binding protein A a B (DbpA a B) využívá vazbu na decorin, nacházející se na kolagenním vlákne (Hagman et al., 2000). Decorin je malý proteoglykan spojující se s kolagenem a je strukturální jednotkou extracelulární matrix (Petzke a Schwartz, 2015). Díky tomuto připojení se následně mohou spirochety *B. burgdorferi* navazovat na hostitelovu extracelulární matrix. Tato adheze v časně fázi infekce může napomáhat přežití i malému množství spirochet přenesených klíštětem. Myš s deficientním decorinem infikovaná *B. burgdorferi* vykazuje snížení počtu *B. burgdorferi* a méně artritidy než běžné myši. Dále bylo prokázáno, že u myši po imunizaci rekombinantním DbpA došlo k vyvolání ochranné imunity proti *B. burgdorferi*. Přítomnost decorin-binding proteinů je tedy důležitá pro šíření borelií (Hovius et al., 2007). Vakcinace DbpA však nechrání proti infekci boreliemi přenášenými klíštětem. Důvodem je zřejmě to, že spirochety v klíšťatech tento antigen neexprimují (Hagman et al., 2000).

#### **2.3.6 Fibronectin-binding proteiny (BBK32)**

Podobný předchozímu je fibronectin-binding protein, který se také váže na extracelulární matrix, konkrétně na fibronektin (Hovius et al., 2007). Fibronektin

je glykoprotein extracelulární matrix obsahující domény pro interakci s heparinem, kolagenem a integriny. Studie prokázaly, že adheze borelií k extracelulární matrix může být blokována anti-fibronectinovými protilátkami. Nejlépe popsáný fibronectin-binding protein je BBK32 o molekulové hmotnosti 47 kDa, kódovaný na plazmidu. Syntéza BBK32 závisí na alternativním sigma faktoru RpoS v souladu s jeho zvýšenou expresí během savčí infekce. (Fischer et al., 2006) Je tedy syntetizován při rané infekci a umožňuje tak boreliím namnožit se. Výzkumy prokázaly, že u myši infikované *B. burgdorferi* s defektním BBK32 došlo k významnému útlumu lymeské boreliózy, což značí důležitost BBK32 při infekci (Hovius et al., 2007). Dřívější studie byly však protichůdné. Seshu et al. prokázali, že mutanti s defektním BBK32 mají sníženou schopnost infekce, Li et al. oproti tomu prokázali, že i mutanti s defektním BBK32 si zachovali plnou patogenitu. Novější výzkumy používající *in vivo* zobrazovací metody podporují roli BBK32 během myší infekce, pravděpodobně zprostředkováním navázání na cévní stěnu. BBK32 se také váže na GAG včetně heparinu a dermatan sulfátu. Proteinů vázajících se na fibronectin bylo popsáno více. Protein RevA je 17 kDa protein kódovaný na plazmidu cp32. Tento protein vykazuje satureovatelnou vazbu na fibronectin. RevA je exprimován výhradně v savčí tkáni, a ne v klíšťatech. Vazbu na fibronectin vykazuje také paralogní RevB a protein BB0347 kódovaný na chromozomu. Avšak všechny vykazují slabší vazbu na fibronectin než BBK32 (Petzke a Schwartz, 2015).

### 2.3.7 Integrin-binding proteiny

Protein P66 je kódován na chromozomálním lokusu bb0603. Bylo zjištěno, že P66 je ligand pro integriny  $\alpha_{Ib}\beta_3$  a  $\alpha_v\beta_3$ . Přestože mutanti s deficitním P66 jsou schopni přežít v klíšťatech, při testování na myších jsou rychle vyloučeni z místa inokulace a ztrácejí schopnost infekce. Studie naznačují, že P66 vázající se na  $\beta_3$  integriny hrají důležitou roli v endoteliálním transportu borelií (Petzke a Schwartz, 2015).

### 2.3.8 Erp proteiny (OspE/F-related proteins)

Erp jsou lipoproteiny borelií a velkým kandidátem pro vývoj vakcíny. Jsou exprimovány bakterií během časné fáze infekce hostitele a hrají důležitou roli v přenosu z klíštěte do hostitele. Exprese je v klíštěti snížena a po přenosu do hostitele je zvýšena. Skupina Erp proteinů je kódována na plazmidech kruhových i lineárních. Konkrétně se jedná o plazmidy cp32 a lp56 (Stevenson et al., 1998). V bioinformatické analýze provedené Bencurovou et al. (2018) bylo cílem najít nové kandidáty použitelné při vývoji vakcíny. Bylo studováno 15 proteinů, z nichž tři kandidáti s nejlepšími antigenními vlastnostmi a konektivitou patří do skupiny Erp proteinů kódovaných erp geny (erpX, erpL, erpY).

Erp geny jsou značně různorodé, což má za následek interakce s různými hostitelskými komponentami a inhibici lýzy způsobené komplementem. Alternativní cesta aktivace komplementu má za následek rozložení C3 na C3a a C3b. C3b složka komplementu se poté naváže na povrch buňky, čímž způsobí opsonizaci a zabití. Buňky se proti zničení brání obalením svého povrchu plazmatickým proteinem faktorem H, který způsobí degradaci C3b složky komplementu (Stevenson et al., 2002).

Erp proteiny umožňují infekci hostitele právě tím, že blokují alternativní cestu komplementu – interagují s faktorem H komplementu a s faktor H-related proteiny. Na faktor H se prokazatelně navazují ErpA/I/N, ErpC, ErpP a ErpX. Dále se Erp navazují na plazmin/plazminogen, laminin a ostatní části extracelulární matrix. K tvorbě účinné vakcíny je zatím nejlepším kandidátem ErpX. Druhým kandidátem v pořadí je lipoprotein ErpL, který je součástí OspF-related rodiny, který se navíc navazuje na heparin sulfát a plazminogen. Vazba na heparin sulfát vede k adhezi gliových, synoviálních a respiračních epiteliálních buněk a podporuje kolonizaci tkání (Bencurova et al., 2018).

Borelie za nízké teploty (23 °C) exprimují Erp proteiny ve velmi malém množství, jakmile začne klíště sát krev, teplota vzroste (z 23 °C na 34 °C), což má vliv na zvýšení exprese Erp proteinů (Bencurova et al., 2018).

### 2.3.9 VlsE

Genom kmene B31 nese lokus na telomerovém konci plazmidu lp28 kódující 35 kDa lipoprotein VlsE a sérii patnácti kazet se značnou sekvenční podobností s VlsE (Petzke a Schwartz, 2015). Jakmile se infekce rozšíří, musí *B. burgdorferi* uniknout získané imunitě hostitele. Jeden z faktorů důležitých v tomto procesu je rekombinace ve vls (variable major protein-like sequence) lokusu. Vls lokus se sestává z místa pro expresi lipoproteinu VlsE a patnácti neexprimovaných spících kazet lokalizovaných proti směru transkripce. Na základě infekce hostitele dojde k náhodné rekombinaci spících vls kazet za vzniku vlsE genu (genová konverze), což má za následek více variací VlsE proteinu v průběhu infekce (Hovius et al., 2007).

U myši experimentálně infikovaných *B. burgdorferi* a u pacientů trpících lymeskou boreliózou, byla zjištěna silná protilátková odpověď proti konzervovaným oblastem VlsE. Navíc u těchto myši byla pozorována protilátková odpověď i proti variabilním oblastem VlsE. Schopnost *B. burgdorferi* přežít v přítomnosti takto silné anti-VlsE protilátkové odpovědi

svědčí o tom, že antigenní variabilita vls ochraňuje spirochety proti destrukci protilátkami proti VlsE (Hovius et al., 2007).

## 2.4 Patogeneze a imunitní odpověď

*B. burgdorferi* je nejznámější klíštětem přenášený patogen, klíště je tedy důležitým vektorem zajišťujícím přenos do obratlovčího hostitele, kde se patogen množí a způsobí infekci. Hostitel (převážně savec) je zase pro klíště nepostradatelným zdrojem potravy. Za účelem přežití všech fází životního cyklu vektoru a hostitele borelie získaly schopnost adaptace na proměnlivé prostředí tím, že exprimují vnější povrchové proteiny a využívají klíštěcích proteinů k přenosu do savčího hostitele (De Taeye et al., 2013).

Borelie jsou vysoce invazivní, ale neprodukují toxiny. Patogeneze spočívá v hostitelské zánětlivé odpovědi. Nejprozkoumanějšími aspekty patogeneze borelií je adheze a únik před imunitním systémem (Petzke a Schwartz, 2015). Vztah mezi patogenem, hostitelem a vektorem je popisován trojicí interakcí – interakce patogen-vektor, patogen-hostitel a hostitel-vektor (Nuttall, 1999), které budou rozebrány v následujících kapitolách.

### 2.4.1 Interakce patogen-vektor

Za účelem adaptace na různá prostředí v těle klíštěte a obratlovce vyvinuly borelie mnoho strategií. Kolonizace a interakce s tkáněmi hostitele je důležitá pro přežívání borelií. Děje se to převážně díky množství jejich povrchových proteinů a expresi, která se mění s prostředím, ve kterém se v určitém okamžiku nachází.

Člověk může být nakažen jakýmkoli vývojovým stádiem klíštěte, většinu lidských infekcí však přenášejí nymfy. Klíště se boreliemi nakazí tak, že larva nasaje infikovanou krev. Ve střevě následně dojde k rapidnímu namnožení spirochet a po svléknutí jejich počet klesá. Pokud klíště nesaje, nachází se borelie v jeho střevě. Jakmile nymfa započne na dalším hostiteli sání, borelie se opět velmi rychle namnoží a poté se přesouvají skrz hemolymfu do slinných žláz. Během 72 hodin jejich počet vzroste z cca 500 na 170 000 (Schwan a Piesman, 2002). Během sání hraje značnou roli počet povrchových proteinů a jejich exprese. Ta se liší na základě toho, v jaké části klíštěcího těla se borelie zrovna nacházejí. V okamžiku, kdy klíště začne sát infikovanou krev, exprese OspA a OspB se zvýší za účelem vazby na stěnu střeva klíštěte (Schwan a Piesman, 2002). Protein OspA se zde váže na TROSPA (tick receptor for OspA), díky čemuž se vyhne obranným mechanismům klíštěte. Hladina TROSPA (tick receptor for OspA) se zvyšuje v závislosti na infikaci boreliemi. Blokace TROSPA antisérem zabraňuje vazbě borelií na stěnu střeva a tím znesnadňuje kolonizaci (Pal et al., 2004a).

Protein OspC hraje roli při migraci do slinných žláz. Migrace je provázána snížením exprese proteinů OspA a OspB, současně i TROSPA. Oproti tomu se zvyšuje exprese OspC společně s DbpA, DbpB a BBK32. Pal et al. (2004) prokázal ve svém pokusu, že IgG F(ab<sub>2</sub>) fragmenty anti-OspC úspěšně blokovaly kolonizaci slinných žláz boreliemi (Pal et al., 2004b). Bylo pozorováno, že borelie exprimující na svém povrchu OspC, ErpP/A/C a povrchovou enolázu (fosfoenolpyruváthydratáza) imobilizují hostitelský plazminogen. Bylo prokázáno, že plazminogen obratlovců je důležitý pro účinné šíření borelií v klíšťatech a u myši. V přítomnosti aktivátorů plazminogenu je na povrchu borelií generován enzymaticky aktivní plazmin, což má za následek zvýšený průnik endoteliálních monovrstev (De Taeye, 2013).

#### 2.4.2 Interakce patogen-hostitel

Klíšťata sají na různých hostitelích, což zvyšuje komplexnost interakce mezi boreliemi, klíštětem a hostitelem. Adaptace na specifické obratlovčí hostitele je základem odlišných přenosových modelů borelií. V Evropě jsou v případě *B. garinii* díky adaptacím hlavními hostiteli ptáci, kdežto pro *B. afzelii* jsou to hlodavci. Oproti tomu *B. burgdorferi* má větší paletu hostitelů obsahující ptáky i hlodavce. *Borrelia burgdorferi sensu lato* musí při invazi savčího hostitele překonat komplementový systém. Komplement je jednou z hlavních složek vrozené imunity. Cílem borelií je únik před komplementem nejen při ale i po přenosu do hostitele. Borelie se brání eliminaci komplementem vícero způsoby. Zprvým, že rekrutuje regulační faktory komplementu hostitele, zadruhé díky vlastním únikovým mechanismům a zatřetí využitím klíštěcích proteinů (De Taeye et al., 2013). Jedním z faktorů přispívajících k přenosu borelií je vazba na plazminogen, což umožňuje spirochetám nabýt extracelulární proteolytickou aktivitu hostitele. Plazminogen, komplement a komplement regulující proteiny jsou klíštětem přijaty při sání krve. Borelie v permisivním systému (umožňující přenos) ve střevě klíštěte na svůj povrch navazují komplement regulující proteiny, čímž se vyhýbají lýze zprostředkované komplementem a mohou být přeneseny do hostitele. V nepermisivním systému spirochety nenavazují komplement regulující proteiny, jsou tedy komplementem zničeny předtím, než mohou být přeneseny do hostitele (Kurtenbach et al., 2002).

Komplementový systém je součástí vrozené imunity skládající se z komplexní sítě plazmatických a přidružených membránových proteinů, které jsou aktivovány kaskádovitě. Komplement je aktivovaný skrze klasickou, alternativní nebo lektinovou cestu, při čemž všechny prokazatelně mají význam při aktivaci komplementu boreliemi. V lidském séru, které postrádalo protilátky specifické pro borelie, bylo popsáno usmrcení sérum senzitivních borelií

klasickou cestou komplementu. Navíc, kromě lýzy iniciované protilátkami klasické cesty komplementu, byly proti boreliím popsány také baktericidní protilátky nezávislé na komplementu (De Taeye et al., 2013). Klasická cesta je většinou aktivována protilátkami, kdežto alternativní cesta komplementu je aktivována stykem s povrchovými proteiny patogenů. Alternativní dráha má schopnost rychle reagovat na přítomnost mikroorganismů předtím, než jsou vytvořené protilátky (Kurtenbach et al., 2002). V přítomnosti C1 inhibitoru (inhibitor serinové proteázy klasické a lektinové cesty – ne však alternativní) bylo zabití borelií plně zrušeno, což naznačuje, že alternativní cesta je hlavně důležitá pro zesílení aktivace komplementu. Nedávný objev proteinu TSLPI (Tick Salivary Lectin Pathway Inhibitor) ve slinách klíštěte inhibující vazbu MBL (manose-binding lectin) odhalil roli lektinové cesty v aktivaci komplementu borelií. Všechny tři cesty – klasická, alternativní, lektinová – mají tedy význam při obraně proti boreliím, při čemž klasická a lektinová započínají aktivaci komplementu a alternativní tento proces zesiluje (De Taeye et al., 2013).

Aktivace komplementu alternativní cestou je iniciována spontánní hydrolyzou C3 na C3a a větší C3b. C3a působí chemotakticky a C3b se váže na povrchové antigeny patogenů, což způsobí kaskádovou reakci. Na takto vzniklý komplex se váže sérový protein faktor B, který je štěpen sérovou proteázou zvanou faktor D na Ba a Bb za vzniku C3 konvertázy C3bBb. Ta je následně stabilizována properdinem (faktor P) a působí jako alternativní C3 konvertáza, která posléze štěpí C3 na C3a a C3b, které se navazují v okolí místa enzymaticky aktivního C3b, který tento děj vyvolal. Tímto způsobem navázané C3b působí jako významné opsoniny a díky opsonizaci jsou patogeny rozpoznány fagocyty. Z C3 konvertázy mohou vznikat složitější komplexy (C3bBbC3b), které fungují jako alternativní C5 konvertáza. Štěpením C5 vznikne C5a a C5b. C5b se navazuje na další složky komplementu C6, C7 a C8. Touto cestou vzniklý komplex se zanoří do membrány patogenu a připojí se k němu C9, který v kombinaci se zbylými složkami tvoří tzv. membrane attack complex (MAC). MAC vytvoří v membráně póry, které zapříčiní lýzu buňky (Hořejší et al., 2017).

Klasická cesta aktivace je zahájena navázáním protilátek na povrch např. bakterie. Po vazbě se změní konformace protilátky a je odhaleno vazebné místo pro protein C1. Molekula C1 po navázání na protilátku získá proteolytickou funkci a štěpí C4 a C2. C4b a C2a vytvoří klasickou C3 konvertázu (C4bC2a) štěpící C3, které působí stejně jako u výše zmíněné alternativní cesty. Později se vytvoří klasická C5 konvertáza, která má za úkol štěpit C5. Lektinová cesta se podobá klasické s tím rozdílem, že je iniciována sérovým lektinem MBL. Strukturou a funkcí se podobá C1, čili po vazbě na povrch patogenu též štěpí C4 a C2.

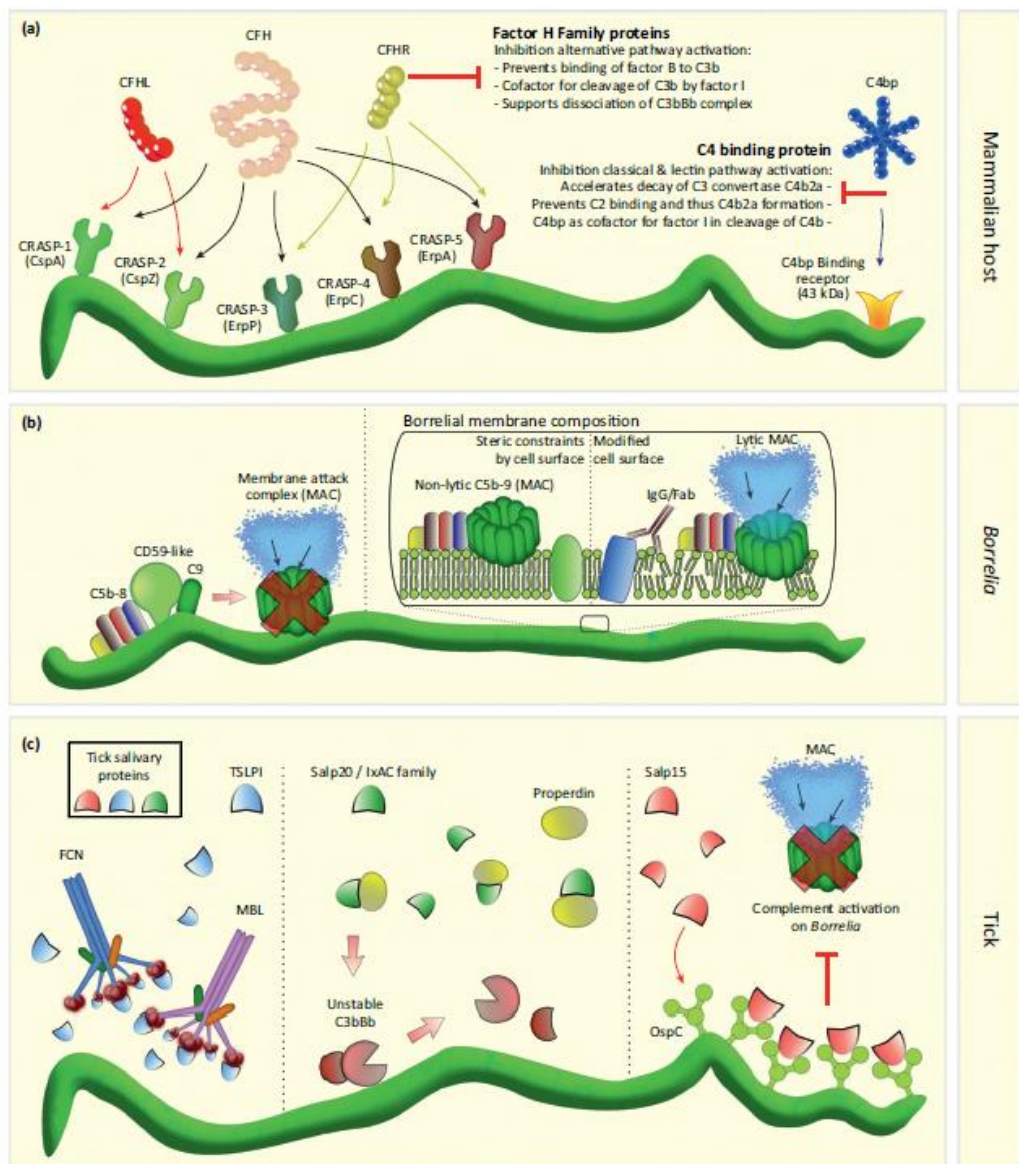


Komplementový systém je prospěšný z hlediska eliminace patogenů, avšak může být škodlivý i pro vlastní organismus. Aby k tomu nedocházelo, je aktivační cesta kontrolována regulačními faktory. Jako regulační faktory slouží plazmatické a membránové inhibitory (Hořejší et al., 2017).

Velká část patogenů vyvinula mechanismy, které jim umožňují zabránit aktivaci komplementu po infekci hostitele. Jedním z mechanismů je navázání regulátorů hostitelského komplementu na svém povrchu. Důležitou roli zde hrají povrchové proteiny borelií, především CRASP (complement regulator acquiring surface protein) a Erp (Kraiczy et al., 2004). CRASPs jsou lipoproteiny exprimované na povrchu borelií navazující jeden nebo více proteinů z rodiny faktoru H, kterými jsou kromě faktoru H protein FHL-1 (factor H-like protein) a pět CFHR proteinů (complement factor H-related) (Kraiczy et al., 2001). Vazba na faktor H způsobuje inhibici alternativní cesty. SCR (short consensus repeats) FHL-1 jsou identické s N-koncovou doménou faktoru H, ale FHL-1 má unikátní C-terminální prodloužení o čtyřech aminokyselinách (Kraiczy et al., 2001). CFHR proteiny nemají SCR homologní s komplement regulačními doménami faktoru H. Role CFHR v regulaci komplementu není dosud známá, avšak předpokládá se, že fungují jako kofaktor pro faktor H (De Teye et al., 2013). V roce 2009 Heinen et al. v článku navrhli, že CFHR-1 blokuje C5 konvertázu (Heinen et al., 2009). Zatím známe pět různých CRASP proteinů – CRASP-1 (CspA), CRASP-2 (CspZ), CRASP-3 (ErpP), CRASP-4 (ErpC) a CRASP-5 (ErpA), při čemž všech pět bylo identifikováno v *B. afzelii* (BaCRASP) a *B. burgdorferi sensu stricto* (BbCRASP). Všechny BbCRASPs navazují faktor H, BbCRASP-1 a 2 navíc vážou FHL-1 a BbCRASP-3, 4 a 5 vážou CFHR-1, 2 a 5. V případě BaCRASPs jsou vazby na rodinu faktoru H omezenější, např. BaCRASP-3 váže výhradně FHL-1. *B. spielmanii* exprimuje pouze CRASP 1-3, při čemž 1 a 2 vážou faktor H a FHL-1 3 váže faktor H a CFHR-1. *B. garinii* exprimuje ortologní CRASP-1 bez vazby na faktor H a se slabou vazbou na FHL-1. V případě ortologního CRASP-1 *B. bavariensis* je zachována schopnost vázat faktor H i FHL-1. Mimo proteiny z genové rodiny faktoru H, borelie také navazují C4b-binding protein (C4bp) skrze 43 kDa receptor. Bylo zjištěno, že C4bp váže jak *B. afzelii*, tak *B. burgdorferi* i *B. garinii*, vazba u *B. garinii* je však nejsilnější. C4bp inhibuje aktivaci komplementu klasickou a lektinovou cestou tím, že zvýší rozpad C3 konvertázy (C4bC2a) (De Teye et al., 2013).

Mnoho patogenů produkuje imitace komplementových membránových regulátorů. V případě borelií je to imitace proteinu CD59, který brání tvorbě MAC. Borelie exprimují na svém povrchu CD59-like proteiny, které zabraňují formaci MAC. Studie ukázaly, že změna

boreliového povrchu pomocí anti-*Borrelia* IgG nebo IgG Fab fragmentů umožnila účinnou tvorbu MAC, což naznačuje, že kompozice boreliových membrán inhibuje tvorbu MAC. CD59-like proteiny nejsou tvořeny všemi druhy borelií, jedná se tedy pravděpodobně o dodatečnou strategii. Vedle imitace proteinů ve svůj prospěch využívají borelie proteiny obsažené v slinách klíšťat, dokonce jejich tvorbu ovlivňují. Skrze OspC navazují Salp15, protein obsažený ve slinách klíštěte. Díky Salp15 jsou borelie chráněny před protilátkami a komplementem. Přestože OspC je velmi heterogenní, Salp15 se váže na OspC všech druhů se stejnou afinitou. Borelie také využívají protein TSLPI, který blokuje komplement v místě přisátí (De Taeye et al., 2013). Dále je exprimovaný povrchový lipoprotein VlsE přispívající k úniku před imunitním systémem a perzistenci v savčím hostiteli prostřednictvím propracovaného mechanismu antigenní variace (Bankhead a Chaconas, 2007).



Obr. 2: Molekulární mechanismy napomáhající boreliím k úniku před komplementem. Převzato z (De Taeye et al., 2013).

### 2.4.3 Interakce klíště-hostitel

Pro klíšťata je sání krve životně důležitý proces, při kterém však dochází k poškození hostitelovy kůže, hemostázy a k mobilizaci imunitního systému. Klíšťata se těmto jevům vyhýbají pomocí látek obsažených v jejich slinách, avšak hostitel taktéž bojuje s přísátým klíštětem. Jedním z obranných mechanismů hostitele je hemostáza – krevní srážlivost. Jakmile je poraněna céva, dojde k vazokonstrikci, která proběhne v důsledku reflexního stažení svalů, na základě serotoninu uvolněného z destiček a látek koagulační kaskády. Po kontaktu klíštěcího hypostomu s kolagenem dojde k aktivaci trombocytů a jejich degranulaci, čímž se do okolí uvolní farmakoaktivní látky (ADP, trombin aj.). Tyto látky se následně vážou na povrch trombocytů a spolu s nimi tvoří krevní zátku (Singh a Hermann, 2003). Pro klíšťata je hemostáza zásadní překážka, vůči níž se brání řadou antihemostatik, které lze nalézt v klíštěcích slinách, slinných žlázách, hemolymfě a vajíčkách. Díky antihemostatikům mohou klíšťata krev přijmout a trávit. Antihemostatika jsou taktéž atraktivními cíli pro vývoj protiklíštěcí vakcíny (Maritz-Olivier et al., 2007).

Složkami uvolněnými z poškozené tkáně jsou jako první aktivovány žírné buňky, makrofágy, a dendritické buňky, které do okolí vypouštějí chemoatraktanty, které rekrutují buňky přirozené imunity (neutrofilů a monocytů) a prozánětlivé cytokiny (TNF $\alpha$  a interleukin-1) do místa poškození. Mediátory uvolňované z žírných buněk (histamin a bradykinin) způsobují svědění a bolest. Monocyty vylučují růstové hormony, které indukují proliferaci fibroblastů, čímž přispívají k hojení ran. Dendritické buňky z epidermis (Langerhansovy buňky) migrují do lymfatických uzlin, kde prezentují antigen B a T lymfocytům, a tím aktivují adaptivní imunitní odpověď (Šimo et al., 2017).

### 3 LYMESKÁ BORELIÓZA

V současné době je lymeská borelióza nejčastějším onemocněním přenášeným vektorem v USA a Evropě. Ve spojených státech je každý rok nahlášeno zhruba 20 000 nových případů nákazy lymeskou boreliózou. Ročně se v USA nakazí 300 000 lidí. V Evropě počet nakažených ročně činí 65 000 – 85 000 (Comstedt et al, 2014). Předpokládá se však, že skutečná incidence je 3–5krát vyšší. Větší incidenci sledujeme u dvou věkových skupin, a to děti ve věku 2–15 let a dospělí 30–55 let (Poland, 2011).

Přestože lymeská borelióza je v případě včasného zjištění dobře léčitelná antibiotiky, je primární prevence infekce nejlepší přístup (Nigrovic a Thompson, 2007). V 60 % případů v USA, kdy nedošlo k včasnému rozpoznání nemoci, se vyvinula lymeská artritida. Navíc 10 % pacientů nereaguje na antibiotickou léčbu (Wressnigg et al, 2014). Prevence zahrnuje následující strategie: zamezení styku s klíštětem, profylaxe po kousnutí a vakcinace. Lidé by se měli vyhýbat oblastem s vysokým výskytem klíšťat, používat repelent s obsahem DEET (N,N-diethyl-meta-toluamid), nosit ochranné oblečení a v případě přisátí, klíště včas odstranit. K infekci dochází převážně po 36 hodinách, doporučuje se tedy pečlivá prohlídka po návštěvě místa, kde je možný výskyt klíšťat. V případě nalezení je do 72 hodin možné podat dávku doxycyklinu, která snižuje riziko nakažení o 87 %. Doxycyklin se však nesmí podávat dětem do osmi let. V mnohých případech ale nemusí dojít k rozpoznání klíštěte. Až jedna třetina pacientů, u kterých se objevila *erythema migrans*, si není vědomá přisátí klíštěte (Nigrovic a Thompson, 2007). Infekce boreliemi v lidském organismu indukuje tvorbu specifických protilátek IgM a IgG detekovatelných pomocí metod ELISA, IFA a western imunoblot (Hanson a Edelman, 2003).

#### 3.1 Historie

Lymeská borelióza byla poprvé zmíněna v roce 1883 dermatologem Buchwaldem v rámci popisu *acrodermatitis chronica atrophicans*. O několik let později byla popsána *erythema migrans*, lymfocytom a následně i postižení dalších orgánů. Až po dalších 20 letech bylo u nemocných po přisátí klíštětem popsáno multifokální postižení nervového systému. Stěžejní bylo popsání epidemického výskytu zánětlivé artropatie u 39 dětí a 12 dospělých, která se objevila v oblasti poblíž města Lyme (Connecticut). Kloubní infekci předcházela erytém a současně byl v této oblasti naměřen větší výskyt klíšťat *Ixodes dammini*. Tehdy došlo k popsání nové choroby – lymeské nemoci. Krátce poté byl objasněn i původce onemocnění, tedy spirocheta patřící mezi borelie nazvaná *Borrelia burgdorferi*. Na základě toho byla na III.

Mezinárodní konferenci nemoc nazvaná lymeská borelióza (Bartůněk, 2013a). V následující tabulce jsou vypsány nejdůležitější milníky pro popsání lymeské boreliózy.

Tab. I: Zásadní objevy v historii lymeské boreliózy, převzato z (Bartůněk, 2013a).

1883	první popis „idiopatické atrofie kůže“, později označené jako <i>acrodermatitis chronica atrophicans</i> (ACA)	Buchwald
1894	lymphocytosis benigna cutis	Spiegler
1909	erythema migrans (EM)	Afzelius
1921	souvislost s přisátým klíštětem a EM	Afzelius
1922	EM + postižení nervového systému	Garin Bujadoux
1923	první popis vícečetného EM	Lipschütz
1924	souvislost ACA a kloubních obtíží	Jessner
1941	meningoradikuloneuritida + postižení kloubů	Bannwarth
1946	úspěch PNC v léčbě ACA	Herxheimer
1948	speciální technika k průkazu spirochet v kožní biopsii z EM	Lenhoff
1971	zavedení techniky kultivace borelií	Kelly
1975	epidemická artritida	Steere
1980	postižení srdce	Steere
1982	izolace <i>B. burgdorferi</i> v klíštěti <i>Ixodes dammini</i>	Burgdorfer
1983	průkaz <i>B. burgdorferi</i> v krvi pacientů s LB	Benach
1984	průkaz protilátek v séru nemocných pacientů s LB	Ackermann
1985	první důkaz o transplacentárním přenosu <i>B. burgdorferi</i>	Schlesinger
1987	doporučen název lymeská borelióza (III. mezinárodní konference, New York)	

### 3.2 Klinické projevy

V časně fázi infekce je borelióza charakterizována lokalizovanou vyrážkou nazývanou *erythema migrans*, což je rozšiřující se kožní léze s blednoucím okrajem kolem místa kousnutí. Pokud je tato infekce neléčená, borelie se šíří a kolonizují ostatní tkáně, čímž způsobují další zdravotní komplikace. Mezi tyto komplikace patří neuroborelióza (71 % případů), lymeská artritida (22 % případů) a *dermatitis chronica atrophicans* (5 % případů). V případě *B. burgdorferi sensu stricto* se nejčastěji jedná o lymeskou artritidu, u *B. garinii* o neuroboreliózu a u *B. afzelii* o kožní projevy (De Taeye et al., 2013). Pokud není lymeská

borelióza rozpoznána a léčená, zhruba 60 % pacientů pociťuje ustupující či trvalé otoky a bolesti kloubů. V Evropě je tento projev méně častý, jelikož je zde borelióza způsobena převážně *B. afzelii* a *B. garinii*. V Americe je to *B. burgdorferi*, která je obzvláště artritogenní. Antibiotická léčba při včasném rozpoznání trvá 1-2 měsíce, avšak i přes léčbu mohou nastat komplikace v podobě artritidy. Tento stav se nazývá antibioticky refrakterní lymeská artritida (Steere et al., 2011).

### 3.2.1 Postižení kůže

Časným projevem infekce lymeské boreliózy je kožní léze, kterou má převážně na svědomí *B. afzelii* (90 % izolovaných kmenů). V první fázi časné lokalizované infekce se na těle pacienta vyskytuje *erythema migrans* nebo boreliový lymfocytom. Ve druhé fázi časné diseminované infekce se mohou objevovat sekundární léze někdy doprovázené dalšími příznaky (neuroborelióza, arytmie, myokarditida, artritida aj.) *Erythema migrans* reprezentuje 85 % všech kožních projevů a je typická pro první stádium nemoci. *Erythema migrans* se vyskytuje u více než poloviny nemocných. Tvoří se v rozmezí od 3-180 dní od přisátí, avšak v 75 % se objeví do 14 dnů. EM je typická červená okrouhlá skvrna o průměru od 5 do desítek cm. Boreliový lymfocytom je skvrna zbarvená do červena až tmavě fialova o velikosti od několika mm do 5 centimetrů. Nejčastěji jej najdeme u dětí na ušním lalůčku nebo špičce nosu. Bez léčby lymfocytom přetrvává měsíce, výjimečně přes rok. Projevem třetího stádia je *acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA) objevující se po několika letech od infekce. Projevuje se akutním zánětem kůže s nafialovělými skvrnami na okrajových částech těla, které prosakují a mají až těstovitou konzistenci. Po měsících se zánětlivá fáze překlene na atrofickou a kůže má podobu cigaretového papíru, kdy vymizí elastická vlákna a dilatace cév (Hercogová, 2013).

### 3.2.2 Postižení kloubů

Původně byla lymeská borelióza klasifikována jako revmatoidní onemocnění, ale díky dalšímu zkoumání bylo zjištěno, že artritida je jenom jedním z projevů infekčního onemocnění. Pojmem lymeská artritida je míněno široké spektrum projevů týkající se pohybového aparátu, které nastaly v různých stádiích lymeské boreliózy. V časné fázi jsou to pouze atalgie – bolesti různých částí pohybové soustavy, které později přecházejí v chronický zánět kloubů – artritidu. V USA je postižení kloubů nejčastějším důsledkem lymeské boreliózy, jelikož ke kloubům má největší afinitu *B. burgdorferi sensu stricto*. V Evropě není postižení kloubů tak časté. Je to dáno větším druhovým zastoupením borelií v Evropě. Přítomnost borelií v kloubním prostředí má za následek vznik lymeské artritidy.

Jejího vývoje se účastní dva mechanismy: perzistence infekce a infekcí navozené imunopatologické děje. Borelie jsou schopny se specificky vázat na cukerné složky proteoglykanů, chondroitinsulfátu, keratansulfátu a stavebních kamenů kolagenu. Patologické změny v kloubu jsou způsobeny kontaktem borelií s endotelovou buňkou a následnou aktivací leukocytů. Borelie poté díky buňkám produkujícím zánětlivé cytokiny vyvolají infiltraci tkáně. Aktivují synoviální buňky k tvorbě cytokinů (IL-1, TNF- $\alpha$ ), hydrolytických enzymů (proteinázy, kolagenázy) a dalších molekul se vztahem ke kloubní patologii, což má za následek destrukci buněk kloubní chrupavky. Borelie se nacházejí v „borderline-tissue“, která leží mezi vaskularizovanou a nevasularizovanou tkání (např. perichondrium, peritendineum a periostum) (Valešová, 2013).

### **3.2.3 Neuroborelióza**

Neuroborelióza je v Evropě druhé nejčastější postižení způsobené infekcí boreliemi. V tomto případě prostupují hematoencefalickou bariérou, pohybují se v mozkomíšním moku a perineurálně, čímž poškozují nervové buňky a neuroglie. Spirochety mimo přímé poškození neuroglie vyvolávají v CNS imunitní a autoimunitní reakce. V reakci na působení imunokomplexů se vyvíjí zánět cév, což může vyústit až k trombóze vedoucí k hypoxii mozku, míchy a periferních nervů. Důležitou roli v rozvoji primární autoimunitní odpovědi hostitele mají povrchové proteiny zejména OspA a OspB. Povrchový bičíkový antigen má podobnost s bílkovinou v axonech periferních nervů, díky čemuž autoimunitní reakce zapříčiní poškození myelinových pochev axonů. Zánět poté napadá mozkomíšni pleny, obaly míšních kořenů a kapiláry vyživující nervový systém. Klinické projevy se podobají meningoencefalitidě (bolest hlavy, horečky, svalový třes, nervové obrny, poruchy spánku a paměti aj.) (Bojar, 2013).

### **3.2.4 Lymeská karditida**

K postižení srdce dochází v druhém stádiu lymeské boreliózy po 2 týdnech až 5 měsících od infekce. K lymeské karditidě dochází v Severní Americe v 4-10 % případů a v Evropě to činí nejvýše 4 % všech pacientů s lymeskou boreliózou. Projevy jsou podobné jako u ostatních chorob oběhového ústrojí a klinické manifestace se dělí na poruchy srdečního rytmu, zánět osrdečníku, zánět srdečního svalu a rozšíření srdečních komor. U pacienta nastávají komplikace jako palpitace, bolesti na hrudi, dušnost, arytmie. Důležité pro správnou diagnostiku je sérologický průkaz protilátek proti boreliím a nález borelií v myokardu (Bartůněk, 2013b).

### **3.2.5 Postižení oka**

Následky lymeské boreliózy týkající se postižení oka se mohou vyskytovat ve všech stádiích, převážně jsou pozorovány u druhého a třetího stádia. Je těžké odlišit následky lymeské boreliózy od jiného náhodného očního postižení. Zánět spojivek (konjunktivitida) je jedním z prvotních příznaků. Dále se vyskytuje zánět oční rohovky, který nastupuje zhruba po měsících od prvních příznaků. Mimo prvních dvou jsou navíc pozorovány záněty žilnatky, odchlípení sítnice, neuropatie očního nervu a ochrnutí okoohybných nervů (Diblík, 2013).

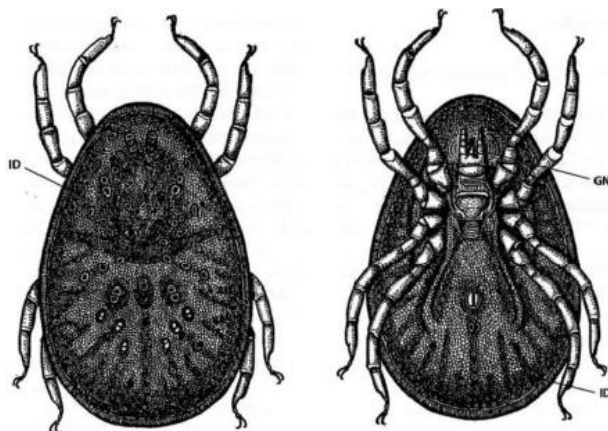


## 4 KLÍŠŤATA

Klíšťata jsou přenašeči lymeské boreliózy. Patří do kmene členovců (Arthropoda), podkmene klepítkatců (Chelicerata), třídy pavoukovců (Arachnida), řádu roztočů (Acarida) a podřádu klíšťata (Metastigmata) (Roháčová, 2006). Podřád Metastigmata se dělí na čeled' klíšťatovití (tvrdá klíšťata, Ixodidae) a čeled' klíšťákovití (měkká klíšťata, Argasidae) (Volf et al., 2007).

### 4.1 Klíšťákovití (Argasidae)

Též nazývaní „soft-ticks“ tedy měkká klíšťata. Název je odvozen od jejich měkkého tělního pokryvu. Pokryv je kožovitý. Tvrdý štítek (scutum), který nalézáme u klíšťatovitých, u dospělých klíšťáků úplně chybí. Žijí v hnízdech svých hostitelů, na kterých opakovaně a krátkou dobu sají (Volf et al., 2007). Jejich strategií je „hit and run“. Díky jejich měkkým tělům jsou schopni rychle nasát velké množství krve a uniknout, než si jich hostitel všimne (Haake, 2010). Některé druhy klíšťáků však dokáží (při čekání na hostitele) vydržet hladovět až několik let. U klíšťáků následují po larvě (na rozdíl od klíšťat) 3–4 nymfální stádia. Larvy mají napodobeninu klíšťecího štítku, který již dospělec postrádá. Od dospělce se také liší tím, že na hostiteli sají delší dobu, řádově hodiny až dny. V našich podmínkách se nejvíce vyskytuje *Argas reflexus* neboli klíšťák holubí, který v některých případech saje i na člověku, do jehož kontaktu se dostává díky holubům, na kterých parazituje. *Argas persicus* (klíšťák zhoubný) se objevuje v teplejších oblastech a napadá domácí drůbež. Některé druhy přenášejí *Borrelia anserina*, která napadá ptáky či riketsie *Aegyptianella pullorum*. Druh *Ornithodoros moubata* je zodpovědný za přenos *Borrelia duttoni*, která způsobuje nebezpečnou africkou návratnou horečku (Volf et al., 2007). *Borrelia recurrentis*, taktéž způsobující návratnou horečku, je však přenášena vší (Haake, 2010).



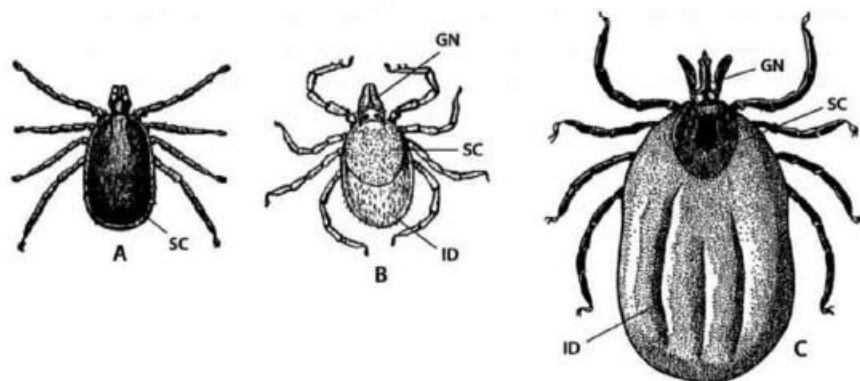
Obr. 3 Acarina, Ixodida, Argasidae, *Argas reflexus* (klíšťák holubí), dospělá samice (dorsální a ventrální pohled). GN – gnathosoma, ID – idiosoma. Převzato z (Volf et al., 2007).

## 4.2 Klíšťatovití (Ixodidae)

Dospělci mají na dorzální straně těla typický tvrdý štítek (scutum) a mají vizuálně rozlišenou hlavu (capitulum) od těla (Blagburn a Dryan, 2009). U samců zakrývá štítek téměř celé tělo, oproti tomu samičkám sahá zhruba do poloviny idiosomy v nenasátém stavu. Díky tomu, může samička mnohonásobně zvětšit svůj objem v závislosti na množství pozřené krve. Gnathosoma je vybavena ústním ústrojím s hypostomem (Volf et al., 2007). Hypostom je přizpůsoben k proniknutí do kůže a k sání krve. Má na svém povrchu umístěné obrácené, zahnuté zoubky. Díky tomu se klíště lépe udrží v pokožce a začne vylučovat sliny s obsahem látky, která kolem hypostomu vytvoří bílkovinnou „cementovou“ vrstvu pro zvýšení stability klíštěte. Dále se ve slinách nachází látky potlačující lokální imunitu, zmírňující bolest, zabraňující srážení krve (enzym ixodin) a uzavírající kapiláry. Hostitelské buňky v reakci na přisátí klíštěte produkují histamin, který je však blokován látkou přítomnou ve slinách (Bolehovská et al., 2009). Oproti klíšťákům se klíšťata krmí pomalu, jejich taktikou je „sit and sip“, což znamená, že na svém hostiteli setrvávají i několik dní až týdnů. Během této doby může dojít k přenosu borelií, navíc jsou vystaveni hostitelskému homeostatickému a obrannému mechanismu (Haake, 2010).

Vývojový cyklus většiny klíšťat je tříhostitelský a trvá zpravidla několik let. Některé druhy klíšťat po nasátí na svém hostiteli zůstávají, nemají tedy tříhostitelský cyklus, ale jedno nebo dvouhostitelský (Volf et al., 2007). Dospělí samci klíšťat krev nesají, avšak na hostiteli se páří se samicemi, jsou totiž přitahováni k sajícím samičkám pohlavními feromony (Stich et al., 2008). Poté co se klíště plně nasaje, odpadne z hostitele a dochází k přeměně na vyšší instar (larva → nymfa → dospělec). Dospělé samice po nasátí krve začnou produkovat vajíčka. Po naklazení vajíček samičky umírají (Volf et al., 2007, Stich et al., 2008). Vajíčka samic nakažených boreliemi jsou neinfekční, jelikož borelie nejsou přenosné transovariálně (Hovius et al., 2007).

Klíšťata loví tak, že vystoupají na vyšší trávy, keře či jinou listovou vegetaci, roztáhnou přední nohy a čekají na kolemjdoucího hostitele. Jakmile se hostitel otře o list, klíště se okamžitě uvolní a vyleze na hostitele (Blagburn a Dryan, 2009). Klíšťata hostitele hledají pomocí Hallerova orgánu (jamka se smyslovými brvami vnímajícími teplo, CO<sub>2</sub> a další chemické sloučeniny) nacházejícího se na tarzálních člancích předního páru nohou. Po nalezení hostitele nedojde ihned k přisátí. Klíště nejprve najde nejvhodnější místo pomocí sensorických orgánů umístěných na palpách (Volf et al., 2007).



Obr. 4: *Ixodes ricinus* (klíště obecné). A - dospělý samec, B - dospělá samice (nenasátá), C - dospělá samice (nasátá). GN - gnathosoma, SC - scutum, ID - idiosoma (převzato z Volf et al., 2007)

V Evropě a Asii jsou nejčastějšími vektory borelií *Ixodes ricinus* a *Ixodes persulcatus*, kdežto v Severní Americe jimi jsou *Ixodes scapularis* a *Ixodes pacificus* (Schwan a Piesman, 2002). *Ixodes ricinus* je klíště běžně se vyskytující na území České republiky, které se vyznačuje tříhostitelským cyklem (Volf et al, 2007), při němž nymfy a dospělci mají schopnost přenést borelii do savčího hostitele (De Taeye et al., 2013).

#### 4.2.1 Slinné žlázy a sliny

Sliny klíšťat hrají důležitou roli v přenosu patogenů. Osmoregulační funkci v tomto případě nezastupují malphigické trubice, nýbrž právě slinné žlázy. Během sání je klíště schopné do těla hostitele vrátit 70 % tekutiny a iontů z krve slinami (Bowman a Sauer, 2004). Slinné váčky klíšťat se skládají z mnoha alveol (acinů) tří typů – I, II, III. Samci mají navíc typ IV (Šimo et al., 2017).

Sliny klíšťat jsou směsí vysoce komplexních bioaktivních molekul. Během procesu sání krve se klíšťata musí vyrovnat s faktory hostitele znesnadňující tento úkon – hemostázou, zánětem a imunitou. K tomu slouží komponenty obsažené ve slinách. Jejich sliny obsahují protizánětlivé, antikoagulační, vasodilatační a imunomodulační látky (Ribeiro a Francischetti, 2003). Srovnávací analýzy slinných žláz klíšťaty ukázaly, že molekulární exprese se liší podle stadia života klíšťat, pohlaví i podle přítomnosti patogenního mikroorganismu. Pro potlačení vazokonstriktorů hostitele klíšťata vylučují vazodilatátory do místa poranění tkáně, např. neproteinové látky odvozené od lipidů, jako je prostacyklin a prostaglandiny (Šimo et al., 2017). Důležitý je protein Salp15, který se ve slinných žlázách váže na protein OspC exprimovaný boreliemi. Tato vazba napomáhá boreliím v přenosu a při úniku před hostitelským imunitním systémem. Vzhledem k jeho vlastnostem je protein Salp15 atraktivním kandidátem pro vývoj vakcíny (Hovius et al., 2008).

## 5 VAKCÍNY

Vakcíny slouží k vyvolání imunitní odpovědi za účelem zabránění možné budoucí infekci. Hlavní strategií při vývoji vakcíny proti lymeské borelióze je vytvoření imunogenního rekombinantního OspA. Na základě této strategie prošly třetí fází klinických testů dvě vakcíny. První je vakcína registrovaná pod názvem LYMERix™ od společnosti SmithKline Beecham (Pittsburgh, Pensylvánie, USA) a vakcína registrovaná jako ImuLyme™ od Pasteur Mérieux Connaught (Swiftwater, Pensylvánie, USA). V obou případech obranný mechanismus zahrnoval vakcinaci proti OspA s následným vývojem cirkulujících anti-bakteriálních protilátek požitých klíštětem během sání krve. Tyto protilátky sloužily k vázání a neutralizaci životaschopných borelií přítomných ve střevě klíštět tak, že během sání krve nemohly být infekční spirochety přeneseny na hostitele (Poland, 2011).

### 5.1 Alternativy vakcín

Snaha o vývoj účinné vakcíny proti lymeské borelióze je proces, který trvá již desítky let. Strategií je vícero, avšak doposud se jen některé ukázaly jako perspektivní. V následujících kapitolách jsou rozebrány možnosti vakcinace.

#### 5.1.1 Inaktivované celobuněčné vakcíny

Jak již název napovídá, celobuněčné vakcíny využívají pro imunizaci celé bakterie určitým způsobem inaktivované. Tento typ vakcíny byl používán v případě vakcinace psů. V roce 1992 získala plnou licenci celobuněčná vakcína nazvaná Lymeavax® (*B. burgdorferi* bacterin, Fort Dodge Laboratories, Iowa, USA). Je podávána zdravým psům od 12 týdnů po dvou dávkách intramuskulárně. Dva roky po udělení licence byly provedeny laboratorní testy s příznivými výsledky, které ukazovaly 78% úspěšnost vakcíny. U žádného z 1969 psů očkovaných přípravkem Lymeavax® nebyl zjištěn závažný nežádoucí účinek nebo imunitně zprostředkované onemocnění. V roce 1994 získala licenci vakcína Galaxy® Lyme (Schering-Plough Animal Health, New Jersey, USA) založená na podobném principu (Hanson a Edelman, 2003). Jelikož celobuněčná vakcína představovala riziko zkřížené reaktivity s různými antigeny, výzkum se pro vývoj lidské vakcíny zaměřil na tvorbu rekombinantních proteinů (Thanassi a Schoen, 2000).

#### 5.1.2 Vakcíny založené na OspA

Již dříve byly vyvinuty lidské vakcíny založené na rekombinantním OspA. Jednalo se o ImuLyme™ a LYMERix™. Jejich vývoj probíhal téměř paralelně, avšak na trh byla uvedena

pouze vakcína LYMERix™, která však byla po krátké době stažena z trhu. Důvody neúspěchu a konkrétnější informace jsou rozebrány v kapitole níže.

LYMERix™ a ImuLyme™ byly monovalentní rekombinantní OspA vakcíny využívající pouze serotyp 1, čili molekulu OspA z *B. burgdorferi sensu stricto*. Byly tedy využívány exkluzivně pro americký trh. Aby byla vakcína efektivní i v Evropě a Asii, kde je více druhů původců lymeské boreliózy, byla vyvinuta vakcína druhé generace, která je multivalentní, tzn. obsahuje více serotypů OspA, a tedy je cílená na více druhů borelií z komplexu *B. burgdorferi sensu lato*. V případě takto vzniklé vakcíny by měla být eliminována T buněčná zkřížená reaktivita nahrazením domnělého zkříženě reaktivního epitopu OspA-1 odpovídající sekvencí OspA-2 (Barret a Portsmouth, 2013). Mimo lidské rekombinantní OspA vakcíny byla vyvinuta a licencována podobná varianta i pro psy s názvem Recombitek™ Lyme (Merial Ltd., New Jersey, USA), která využívá bakteriální extrakt a rekombinantní OspA. Vakcína využívající kombinaci rekombinantního OspA a OspB s adjuvans v podobě purifikovaného saponinu měla taktéž slibné výsledky, jelikož ochránila 8 z 10 psů před infekcí, avšak nikdy jí nebyla udělena licence (Hanson a Edelman, 2003).

Výhodami OspA vakcíny je, že zabraňuje již přenosu do hostitele čímž je snazší pro testování účinnosti a zaměřuje se na poměrně konzervovaný protein v rámci druhu (oproti např. OspC). Nevýhodou je požadované udržení vysokých titrů protilátek pro účinnost, je tedy potřeba vakcínových „boosterů“ a dále jsou to nežádoucí účinky, které pravděpodobně způsobují autoimunitu (Embers a Narasimhan, 2013).

### 5.1.3 Vakcíny založené na OspB

Molekula OspB se v mnoha ohledech podobá OspA (také se váže na střevní stěnu klíštěte), čili i ta je kandidátem pro vytvoření vakcíny, avšak OspA se v tomto směru prokázala jako efektivnější (Fikrig et al., 1995). Bylo zjištěno, že vakcinace OspB z kmene borelií B31 chránila myši před infekcí *B. burgdorferi* B31, ale ne proti *B. burgdorferi* N40, což demonstruje, že spirochety N40, které se vyhýbají imunitě vůči očkování OspB, mají zkrácenou formu OspB v důsledku stop kodonu TAA v nukleotidu 577. Oproti tomu *B. burgdorferi* N40, které exprimují OspB plné délky, nejsou schopny infikovat myši imunizované OspB. C-konec OspB je důležitý pro vyvolání ochranné imunitní odpovědi. Zkrácení nebo modifikace proteinů vnějšího povrchu, mohou být prostředky, kterými borelie unikají obraně hostitele (Fikrig et al., 1993). Tato studie naznačuje, že účinnost OspB vakcíny je závislá na kmenech borelií a délce OspB.

#### **5.1.4 Vakcíny založené na OspC**

Molekula OspC napomáhá boreliím v přesunu ze střeva do slinných žláz, případná vakcína založená na rekombinantní molekule OspC by tedy zabránila přesunu do slin, a tedy i do hostitele. Problémem v případě molekuly OspC je však její heterogenita. Proteiny OspC napříč kmeny jednotlivých druhů jsou identické pouze ze 70-80 %. Zkřížená ochrana OspC je pravděpodobně více omezena, protože aktivní imunizace pomocí OspC z jednoho izolátu *B. burgdorferi sensu stricto* nedokázala ochránit myši proti infekci *B. burgdorferi sensu stricto* z jiného genetického kmene (Hanson a Edelman, 2003). Jak již bylo výše zmíněno v kapitole věnované OspC, pokusy na vyvinutí vakcíny OspC byly nezdařené. Přestože by OspC měly být schopny zajistit účinnou ochranu, v první fázi testování se u poloviny očkovaných jedinců objevil erytém a otok (Schuijt et al., 2011).

#### **5.1.5 Vakcíny založené na BBA52**

BBA52 je vnější membránový protein bez přiřazené funkce kódován lineárním plazmidem lp54. Protein BBA52 usnadňuje přechod borelií z vektoru do hostitele a je potenciálním antigenem, který má roli při přenosu lymeské boreliózy (Kumar et al., 2010). Studie s aktivní imunizací prokázaly, že myši imunizované BBA52 byly významně méně náchylné k následné infekci vyvolané klíšťaty. Podobně pasivní přenos protilátek proti BBA52 zcela blokoval přenos *B. burgdorferi* ze sajících klíšťat (Kumar et al., 2011).

#### **5.1.6 Vakcíny založené na DbpA**

Dalším kandidátem na vývoj vakcíny je povrchový protein DbpA. Protilátky vzniklé vakcinací by měly napadat patogen uvnitř hostitele. Protein DbpA se prokázal jako ochranný imunogen v případě, že imunizovaným myším byly injekčně podány borelie kultivované *in vitro* (Hanson et al., 1998). V tomto případě byla vyvolána žádoucí imunitní odpověď, ta se však nedostavila, pokud došlo k přenosu patogenu klíštětem. Tento poznatek naznačuje, že DbpA nemusí být vhodná jako vakcína proti lymeské borelióze (Hagman et al., 2000).

#### **5.1.7 Vakcíny založené na BBK32**

Tato vakcína by měla působit uvnitř klíštěte, kde by zabraňovala přenosu z vektoru na hostitele (Fikrig et al., 2000). Studie od Li et al. (2006) tvrdí, že *B. burgdorferi* postrádající BBK32 si u testovaných myší zachovaly plnou patogenitu, bez ohledu na to, zda byly myši uměle infikovány injekční stříkačkou nebo přirozeně kousnutím klíšťaty. Ztráta exprese BBK32 v mutantu neměla žádný negativní vliv na přenos borelie z myší na klíště ani z klíštěte na myš. Tyto výsledky naznačují, že další proteiny mohou doplňovat funkci BBK32 během

přirozeného životního cyklu (Li et al., 2006). BBK32 v kombinaci s DbpA a OspC byla úspěšná proti injekční infekci, ale ne samostatně (Brown et al., 2005). Dá se tedy předpokládat, že účinná vakcína by musela obsahovat vícero komponent.

### 5.1.8 Vakcíny proti klíšťatům

Jednou z alternativních strategií je vakcinace proti klíšťatům. Protiklíštěcí vakcíny založené na rekombinantních antigenech nepředstavují zdravotní riziko, jsou šetrné k životnímu prostředí, navíc rezistence klíšťat vůči vakcínám je méně pravděpodobná ve srovnání s chemickými pesticidy. Vakcíny zaměřené na klíšťata také umožňují zahrnutí více antigenů, aby byly cílené na širokou škálu druhů klíšťat, stejně jako na antigeny specifické pro patogeny (Schetters, 2018). Obecně byly pro vývoj vakcíny zkoumány dva odlišné typy antigenů. Prvním z nich jsou konvenční antigeny vylučované ve slinách během přísátí klíšťat a krmení, tzv. exponované antigeny. Obvykle se jedná o proteiny nebo peptidy syntetizované ve slinných žlázách. Exponované antigeny jsou přijímány v místě sání klíšťat hostitelskými dendritickými buňkami, které je zpracovávají a prezentují T lymfocytům. Oproti tomu „skryté“ antigeny jsou normálně ukryty před mechanismy imunitního systému hostitele. Skryté antigeny jsou ty, které se nacházejí na střevní stěně klíšťat a interagují se specifickými imunoglobuliny, které jsou přijímány s krví. Lze tedy rozdělit vývoj vakcíny proti klíšťatům do tří linií – založené na exponovaných antigenech, skrytých antigenech a kombinaci obojího (Nuttall et al., 2006).

Vakcinace proti skrytým antigenům je odlišná od vakcinace proti antigenům exponovaným. V případě exponovaných antigenů vakcína aktivuje imunitní systém v důsledku čehož se po následujícím přísátí klíštěte aktivuje sekundární imunitní odpověď. Klíšťata ale ve slinných žlázách produkují látky, které mimo jiné potlačují imunitní systém hostitele. Ve výsledku získaná imunita proti klíšťatům sice snižuje, ale nezabraňuje přísátí klíšťat. Tudíž imunitní reakce indukovaná exponovanými antigeny nemusí poskytovat dostatečnou ochranu, zejména pokud je pro vývoj vakcíny použit pouze jeden exponovaný antigen. Způsob účinku vakcín založených na skrytých antigenech se výrazně liší od účinku vakcín na bázi exponovaných antigenů. Ačkoliv skryté antigeny neindukují imunitní reakci během uchycení a sání, jsou imunogenní, když jsou připraveny jako extrakty z tkání klíšťat (nebo jako rekombinantní proteiny) a poté použity k imunizaci. Imunizace skrytým antigenem indukuje specifické imunoglobuliny, které jsou přijaty při sání klíštěte. Protilátky interagují se skrytým antigenem na povrchu střeva, což způsobuje prasknutí střevní stěny, únik krve do tělní dutiny a smrt (Nuttall et al., 2006).

### 5.1.8.1 Vakcíny založené na Salp15

Protein Salp15 je obsažen ve slinách klíštěte, kde se váže na protein OspC, čímž ho brání před hostitelským imunitním systémem a tím napomáhá infekci (Ramamoorthi et al., 2005). Bylo prokázáno, že Salp15 antisérum významně chránilo myši od boreliové infekce. Zmíněné antisérum také výrazně zvýšilo ochrannou schopnost protilátek proti antigenům *B. burgdorferi*, jako je OspA nebo OspC. Myši aktivně imunizované Salp15 byly významně chráněny před boreliemi přenesenými klíštětem. Očkování molekulou vektora, kterou borelie vyžaduje pro efektivní šíření a infekci hostitele, ukazuje novou strategii v boji proti lymeské borelióze (Dai et al., 2009).

### 5.1.8.2 Vakcíny založené na TROSPA

Povrchový protein borelií OspA se ve střevě klíšťat váže na TROSPA, což umožňuje boreliím kolonizaci a přežití ve střevě. Vakcína založená na TROSPA by mohla vést ke snížení kolonizace a přežití borelií ve střevech klíšťat a taktéž by mohla snížit přenos patogenů do dalších hostitelů. U neinfikovaného klíštěte sajícího na infikované myši, která je imunizována antigenem TROSPA, by teoreticky nemělo dojít k přenosu borelií, jelikož anti-TROSPA protilátky by narušovaly vazbu borelií na střevo klíštěte. Vakcinace myši v endemických oblastech vakcínou na bázi TROSPA, samotnou nebo v kombinaci s vakcínou OspA, by mohla vést ke snížení míry infekce boreliemi u populací *I. scapularis*. V tomto případě by však bylo nutné vyvinout vhodnou vakcinační metodu. Perorální podání se u myši prokázalo jako účinné (Hovius et al., 2007). Ve studii od Merino et al. (2013) na hospodářských zvířatech však TROSPA vakcína neměla významný vliv na žádné z analyzovaných parametrů klíšťat. Jako vhodnější se prokázaly proteiny SILK a Q38 (Merino et al., 2013).

## 5.2 LYMERix™

Vakcína nesoucí název LYMERix™ vyráběná společností SmithKline Beecham (dnes GalaxoSmithKline) byla na trh uvedena v prosinci 1998 a z vlastní vůle stažena v únoru 2002. Pro vakcínu je unikátní mechanismus spočívající v zneškodnění patogenu přímo uvnitř klíštěte (Thanassi a Schoen, 2000). Vakcína byla založena na použití 30 µg rekombinantního lipoproteinu OspA exprimovaného v *Escherichii coli* s adjuvans 0,5 mg hydroxidu hlinitého. Pro vakcínu byl použit OspA kmene ZS7 *B. burgdorferi sensu stricto*. Vakcína byla podána intramuskulárně v dávce 0,5 ml, jakožto součást tří dávkové série podávané v časech 0, 1 a 12 měsíců. V klíčové třetí fázi klinických testů bylo provedeno testování 10 906 jedinců ve věku od 15 do 70 let. Byli náhodně rozděleni na dvě skupiny, které dostaly buď tři dávky vakcíny,



nebo injekci placeba. Ti, kteří obdrželi vakcínu, prokazovali v roce po vakcinaci 76% snížení lymeské boreliózy bez závažnějších vedlejších účinků. Na základě těchto slibných poznatků FDA (U.S. Food and Drug Administration) povolila dne 21. 12. 1998 uvedení vakcíny LYMERix™ na trh. Výrobce konkurenční ImuLyme™ po třetí testovací fázi z neznámých důvodů nezažádal FDA o schválení (Nigrovic a Thompson, 2006).

Hlavním problémem, který vedl ke stažení dosud jediné vakcíny proti lymeské borelióze, je převážně obava o bezpečnost vakcíny. Ta je navíc posílena hypotézou, která se týká očkovaného antigenu OspA. Údajně slouží jako autoantigen, a tedy má artritogenní účinky. Proti vakcíně vystupovali skupiny zaměřené na protiočkovací politiku, které zpochybňovaly její bezpečnost. Dalšími problémy byla cena vakcíny, problematický očkovací plán, potenciální potřeba boosterů a s tím vším související nízká poptávka (Poland, 2011).

Rekombinantní outer surface protein (rOspA) je hlavní antigenní komponentou této vakcíny. Studie naznačovaly T-buněčnou zkříženou reaktivitu mezi epitopy OspA (serotyp 1) a LFA-1<sub>αL</sub> (lymphocyte function-associated antigen 1<sub>αL</sub> chain) u pacientů s lymeskou artritidou (Schujit et al., 2011). Bylo zjištěno, že u pacientů s haplotypem HLA-DR4 je pozorována protilátková reaktivita s proteiny OspA a OspB (Thanassi a Schoen, 2000). Imunodominantní T buněčný epitop OspA<sub>165-173</sub> má částečnou homologní sekvenci s peptidem obsaženým v hLFA-1 (human lymphocyte function-associated antigen-1). Na základě toho se předpokládá, že artritida je výsledkem molekulární mimikry mezi epitopy OspA a LFA-1, což pravděpodobně vede k autoimunitě v postižené synoviální tkáni (Steere et al., 2011). Právě z důvodu homologie OspA s lidskou lymfocytární adhezivní molekulou LFA-1 byly vzneseny obavy z artritogenních efektů vakcíny (Rosé et al., 2001).

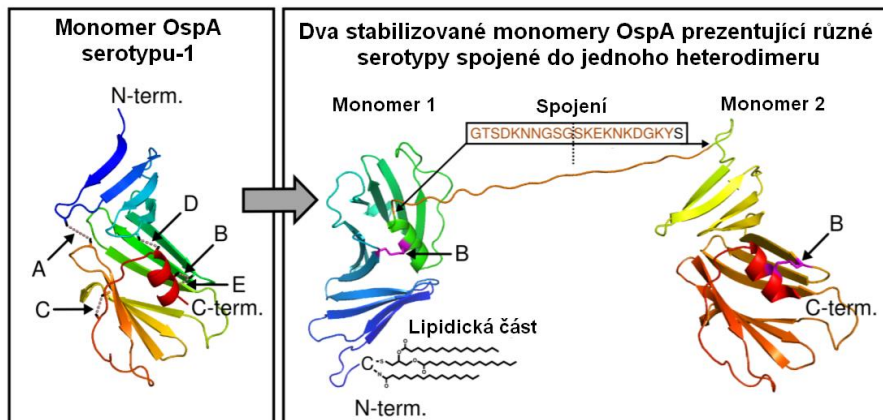
Kvůli rostoucím obavám o bezpečnost podala dne 14. 12. 1999 právní firma Sheller soudní žalobu na výrobce vakcíny LYMERix™, SmithKlineBeecham. Žalobce prezentoval 121 jednotlivců, kteří na sobě po vakcinaci pozorovali závažné nežádoucí účinky. Dále žaloba tvrdila, že vakcína způsobila újmu a že výrobce skrýval informace o možných rizicích (Nigrovic a Thompson, 2006).

### **5.3 VLA15**

V nedávné době se o pozici na trhu začala ucházet nová vakcína od francouzské společnosti Valneva SE pojmenovaná VLA15. Tato vakcína podobně jako LYMERix™ je založena na rekombinantním OspA proteinu, avšak liší se zásadním rozdílem. Oproti

Lymerixu je VLA15 cílená na všechny serotypy OspA (1-6) a tedy se její účinnost vztahuje na nejběžnější druhy borelií šířící lymeskou boreliózu (Comstedt et al., 2017).

Vakcína VLA15 je založena na C-terminální části proteinu OspA (tvořící přibližně 55 % plné délky). Většina přístupných epitopů OspA na povrchu spirochet byla lokalizována na C-terminální polovině proteinu. Tato část proteinu je zpřístupněna protilátkám v důsledku ukotvení k vnější membráně přes N-koncovou lipidovou skupinu. Aby C-konec byl srovnatelný s OspA plné délky, byla posílena stabilita zavedením mutací, které umožňují hydrofobní interakce. Je tedy důležité nejen zahrnout oblasti posilující ochranu vakcíny, ale taktéž zachovat vhodnou strukturu, která je schopná indukovat imunitní reakci. Na základě toho byla vytvořena vakcína použitím C-terminální části šesti serotypů OspA stabilizovaných disulfidovými vazbami a spojením dvou monomerů dohromady do tří heterodimerů, každý exprimovaný s lipidovou skupinou. Díky zavedení lipidové skupiny na N-konec každého heterodimeru a spojení vakcíny s hydroxidem hlinitým byla silně zvýšena imunogenicita u myši. Na obrázku 5 je schéma zmiňovaných heterodimerů. V levé části jsou písmeny A, B, C, D a E vyznačeny lokace modifikací. V pravé části je zobrazen stabilizovaný heterodimer a písmenem B označena pozice disulfidického můstku (Comstedt et al., 2014).



Obr. 5: Schematické znázornění heterodimerů obsažících ve vakcíně. Převzato a upraveno dle (Comstedt et al. 2014).

V případě serotypu 3 nebyla imunogenicita tak výrazná, jako u ostatních serotypů. Za účelem zvýšení imunogenicity byl navržen modifikovaný protein, u kterého byla třetina N-terminální části vyměněna za odpovídající sekvenci OspA z *B. valasiana*. Účinnost vakcíny VLA15 byla posuzována po stimulaci druhů borelií exprimujících pět různých serotypů – *B. burgdorferi sensu stricto* (serotyp 1), *B. afzelii* (serotyp 2), *B. bavariensis* (serotyp 4), *B. garinii* (serotyp 5 a 6). Ochrana proti prvním třem zmíněným druhům borelií byla stanovena za použití klíštěte rodu *Ixodes*. Izoláty borelií pro infekci klíšťat nikdy nebyly kultivovány

*in vitro*, ale byl využit cyklus infekce klíštěte z myši za účelem zachování plazmidů a faktorů virulence. Klíštěcí modely pro *B. garinii* (serotyp 3, 5 a 6) dosud nebyly popsány. Laboratorní testy inhibice růstu borelií byly popsány u OspA serotypů 1, 2, 4, 5 a 6, funkční test s *B. garinii* serotypu 3 však stále chybí, pravděpodobně proto, že spirochety byly citlivé na samotný komplement morčete běžně používaný v testu. Anti-OspA protilátky působí až ve střevě klíštěte, kde blokují přenos borelií. Z toho důvodu je ochrana závislá na cirkulaci dostatečného množství anti-OspA protilátek. Aby bylo zabráněno nutnosti častých přeočkování, je zapotřebí silná imunitní odpověď. Z důvodu časného stažení vakcíny LYMERix™ v roce 2002 nebyl stanoven interval po kterém by bylo zapotřebí posílení imunizace. V případě vakcíny LYMERix™ byla obava z časté revakcinace jedním z důvodů ke stažení, přestože stejně jako VLA15 obsahuje adjuvans ve formě hydroxidu hlinitého (Comstedt et al., 2017). Dalším značným rozdílem oproti vakcíně LYMERix™ je nahrazení T buněčného epitopu, který byl homologní s lidským LFA-1 a způsoboval lymeskou artritidu, odpovídající sekvenci z *B. afzelii*. Navíc by vakcína VLA15 měla být dostupná již pro děti od dvou let oproti výše zmiňované, která byla až od 15 let (Comstedt et al., 2014). Vakcína prošla úspěšně první testovací fází a v prosinci roku 2018 vstoupila do fáze druhé. Pokud všemi fázemi projde s pozitivními výsledky, měla by na konci roku 2019 dostat od FDA licenci.

## 6 DISKUZE

V předchozích kapitolách byla řešena problematika lymeské boreliózy, což je jedno z nejčastějších onemocnění přenášené členovci V Evropě, Asii a Severní Americe. V roce 2011 byla lymeská borelióza šestá nejčastější nemoc v USA s incidencí podobnou HIV. V Evropě ročně onemocní 65 000 – 85 000 a ve Spojených státech je to dokonce 300 000 případů ročně. Původcem choroby jsou spirochety z rodu *Borrelia*, konkrétně patřící do komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Do této skupiny patří 19 druhů, pro člověka jsou však prokazatelně patogenní pouze 4 – *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* a *Borrelia bavariensis* (Petzke a Schwartz, 2015). U pacientů s lymeskou boreliózou byly navíc pozorovány druhy *B. spielmanii*, *B. lusitaniae*, *B. bissettii* a *B. valaisiana*. V důsledku rozmanitosti původců nemoci je vývoj účinné vakcíny značně ztížen (Comstedt et al., 2014). Klinické projevy nemoci z části závisí na druhu borelie, jež nemoc způsobila, jelikož každá má tendenci migrovat do jiných tkání. V případě *B. burgdorferi sensu stricto* se převážně jedná o lymeskou artritidu, u *B. garinii* o neuroboreliózu a u *B. afzelii* o kožní projevy. Prvotním znakem provázejícím infekci boreliemi je kožní léze zvaná *erythema migrans*. Následky neléčené, resp. včas nerozpoznané boreliózy způsobí její přechod do chronické fáze, která je již nevy léčitelná a u pacientů vyvolává vážné komplikace jako je artritida, záněty míšních nervů a mozkových blan (De Taeye et al., 2013).

Borelie na svém povrchu exprimují řadu proteinů, které jim napomáhají v kolonizaci a přenosu do vektorů a hostitele. K jejich expresi dochází v závislosti na prostředí a okolních podmínkách v nichž se právě nacházejí. Každý protein na povrchu borelií má svou specifickou funkci, jež určitým způsobem napomáhá boreliím v přežití. Tyto proteiny jsou využívány pro vývoj vakcíny proti lymeské borelióze (Hovius et al., 2007). Protilátky se snaží narušit mechanismus díky kterému borelie přežívají v klíštěti a jsou přenášeny do hostitele. V tomto mechanismu je nejdůležitější protein OspA, který klíšťatům napomáhá v kolonizaci klíštěcího střeva díky jeho vazbě na TROSPA. Díky této vazbě klíšťata setrvávají ve střevě klíštěte do doby, než začne sát na hostiteli (Pal et al., 2001). Během sání borelie zvyšují expresi proteinu OspC, díky čemuž putují do slinných žláz (Pal et al., 2004b). Ve slinách se na OspC váže klíštěcí protein Salp15, což boreliím napomáhá při přenosu a získávají ochranu před imunitním systémem (Ramamoorthi et al., 2005).

Borelie vyvinuly mnoho strategií, díky kterým jsou schopny přežít proměnlivé prostředí a všechny fáze životního cyklu vektoru a hostitele tím, že exprimují vnější povrchové proteiny

a využívají klíčících proteinů k přenosu do savčího hostitele. Právě díky těmto strategiím je složité vyvinout vakcínu, která eliminuje borelie v těle hostitele. Namísto toho se osvědčily vakcíny, jež zabíjejí spirochety ještě předtím, než dojde k přenosu.

Na stejném principu fungují OspA vakcíny. Mechanismus účinku vakcíny je neobvyklý v tom, že působí ve střevě klíštěte, a ne v těle příjemce vakcíny. Předpokládá se, že OspA protilátky zabraňují infekci řadou mechanismů zahrnujících přímé nebo komplementem zprostředkované zabíjení, inhibici růstu a agregace (Thanassi a Schoen, 2000). Dále interferují s jednou z mnoha specifických funkcí přisuzovaných OspA, jako je vazba na plazminogen podporující šíření bakterií, vazba na TROSPA ve střevě klíštěte a ochrana před získanou imunitou hostitele, z nichž všechny vyžadují rozpoznání a vazbu OspA (Livey et al., 2011). Protein OspA se liší u každého druhu borelií. Patogenní borelie exprimují šest různých serotypů - *B. burgdorferi sensu stricto* serotyp 1, *B. afzelii* serotyp 2, *B. garinii* serotypy 3, 5 a 6, a *B. bavariensis* serotyp 4 (Comstedt et al., 2014).

Ukázalo se, že monovalentní rekombinantní vakcíny založené na OspA serotypu 1 odvozeném z *B. burgdorferi sensu stricto* byly účinné v klinických studiích ve Spojených státech, z nichž jedna (LYMErix™) byla v roce 1998 licencována pro humánní použití. Nepodložená hypotéza, že LYMErix™ vyvolal artritidu u některých příjemců vakcín byla jedním z řady faktorů, které přispěly k omezenému prodeji a následnému stažení vakcíny v roce 2002. Monovalentní vakcína OspA navíc neměla potenciál chránit před lymeskou boreliózou mimo USA. V Evropě a Asii totiž boreliózu způsobuje nejen *B. burgdorferi sensu stricto*, ale také *B. afzelii* a *B. garinii*. Vzhledem k tomu, že imunita indukovaná OspA je do značné míry typově specifická, k prevenci lymeské boreliózy v těchto zeměpisných oblastech je zapotřebí multivalentní vakcíny OspA (Schwendinger et al., 2013).

Mezeru na trhu se momentálně pokouší zaplnit francouzská společnost Valneva, která vyvinula vakcínu s názvem VLA15. Ta je oproti výše zmíněné vakcíně multivalentní čili v sobě zahrnuje všech šest serotypů díky čemuž je vhodná pro globální využití. Dva ze šesti serotypů jsou spojeny do jednoho heterodimeru (Comstedt et al., 2015). Vzhledem k situaci kolem lymeské boreliózy dostala vakcína v červenci 2017 od FDA (Food and Drug Administration – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv) označení „Fast Track“ umožňující rychlejší vývoj a výsledky. VLA15 úspěšně prošla první fází testů od FDA a vstoupila do fáze druhé. V případě OspA vakcíny je zapotřebí brát v potaz, že v okamžiku, kdy započne klíště sání, dojde ke snížené expresi OspA a migraci do slinných žláz. Borelie vstupující do těla

hostitele ve většině případů již nemají na svém povrchu protein OspA a je tedy potřeba velké množství cirkulujících protilátek v krvi zajištěné častou revakcinací. Doposud však není jasně stanovena doba, po kterou bude aktivní jedna dávka vakcíny (Comstedt et al., 2017).

Důvodů pro vývoj vakcíny je mnoho. Existují oblasti v USA a v Evropě, kde je ročně infikováno 1-3 % populace a infekce roste v rozsahu a intenzitě. Ekonomické a sociální náklady lymeské boreliózy jsou značné. Náklady vyplývají z vícenásobných zbytečných diagnostických testů, zdlouhavých perorálních a injekčních léčeb antibiotiky, ztrát práce a vzdělání, snížené kvality života, poklesu cestovního ruchu a hodnot nemovitostí v endemických oblastech a rozsáhlého strachu z nákazy. Praktické a environmentálně bezpečné metody kontroly klíšťat nejsou dostupné a správa divoké zvěře se jeví jako marná. Osobní ochrana zahrnující nošení dlouhých oděvů světlých barev, používání repelentů a akaracidů na oděvy a rychlé odstranění klíšťat se neprojeví na snížení případů lymeské boreliózy. Všechny zmíněné faktory ve spojení s opožděnou léčbou nebo úplným selháním antibiotik podněcují výzkum vakcíny (Hanson a Edelman, 2003).

Přestože se protein OspA prokázal jako nejvhodnější kandidát pro vývoj vakcíny, cílených látek k výzkumu je vícero. Dalšími kandidáty pro vývoj vakcíny jsou mimo OspA také OspB, OspC, BBK32, BBA52, DbpA, Salp15, TROSPA a mnohé další. Protein OspB je z velké části podobný OspA, avšak v případě vakcinace je problémový, jelikož jeho imunogenita závisí na kmeni borelií a délce proteinu OspB. Vývoj účinné vakcíny by byl složitý, jelikož efektivní vakcína založená na OspB by musela obsahovat OspB ze všech kmenů patogenních borelií (Fikrig et al., 1993). Vakcína založená na OspC by zabránila přesunu borelií do slinných žláz a tím je eliminovala. Především by ale protilátky proti OspC ničily borelie po vstupu do hostitele. OspC je však vysoce heterogenní protein a vzniklá vakcína by musela obsahovat mnoho komponent. Je známý pokus o vyvinutí multivalentní chimérické OspC, avšak v první testovací fázi se u velké části testovaných jedinců objevil erytém a otok v místě vpichu (Schuijt et al., 2011).

Dalším potenciálním kandidátem je protein BBA52, u kterého byla prokázána imunita na testovaných myších. Protilátky proti BBA52 zcela blokovaly *B. burgdorferi* ze sajících klíšťat. Je však zapotřebí další výzkum (Kumar et al., 2011). Dá se předpokládat, že by tento antigen mohl sloužit jako jedna ze složek vakcíny, podobně jako u proteinu vázajícího se na fibronectin BBK32. Studie týkající se imunogenity BBK32 jsou protichůdné, avšak osvědčilo se injekční podání BBK32 společně s OspC a DbpA (Brown et al., 2005). U proteinu

vázajícího se na dekorin DbpA bylo zjištěno, že je imunogenní pouze v případě, že byly injekčně podány borelie kultivované *in vitro* a nezbraňuje tedy přirozené infekci klíšťaty (Hagman et al., 2000).

Vakcína může být zaměřena jednak přímo proti boreliím nebo proti klíšťatům a jimi syntetizovaným proteinům. Zpočátku bylo převážně u hospodářských zvířat napadení klíšťaty předcházeno používáním akaricidů (pesticidy určené k hubení roztočů), avšak po čase se v některých oblastech u klíšťat vyvinula resistance. V důsledku dochází k nárůstu onemocnění přenášených klíšťaty, což negativně ovlivňuje produktivitu hospodářských zvířat. Očkování proti klíšťatům by tyto problémy vyřešilo, zatím jsou však tyto typy očkování zaměřeny na ochranu hospodářských zvířat a jejich použití v rámci lidské vakcíny je nejisté (Schetters, 2018).

V současné době je známým faktem, že sliny klíšťat obsahují látky, které boreliím napomáhají při přenosu a kolonizaci tkání hostitele. Konkrétně Salp15 se ukázal jako vhodný kandidát pro vývoj vakcíny. V kombinaci s rekombinantním OspC nebo OspA by pak značně zvyšoval obrannou schopnost protilátek (Dai et al., 2009). Podobně by mohl fungovat protein TROSPA nacházející se na stěně střeva klíštěte (Hovius et al., 2007).

V případě, že by selhala slibně vypadající vakcína VLA15, která je založena čistě na OspA mohl by být výzkum směřován spíše k vývoji vakcín sestávajících se z různých kombinací výše zmíněných proteinů. Díky tomu by vakcína pokryla větší spektrum antigenů a zvýšila by se její šance na úspěch. Vakcína s kombinací OspA a proteinu Salp15 by měla veliký potenciál k úspěchu, jelikož by byla cílená nejen proti antigenům borelií, ale taktéž proti klíšťatům. Podobně by mohla fungovat chimérická vakcína, kde by chiméru tvořily proteiny OspA a OspC s dodatkem proteinu Salp15. Taková vakcína by teoreticky indukovala tvorbu protilátek proti OspA, OspC a Salp15, který by zesiloval a pojišťoval účinnost protilátek.

V budoucnu by tedy vývoj účinné vakcíny proti borelióze měl být založen na kombinaci faktorů skládajících se z více antigenů borelií, antigenů klíšťat nebo jejich kombinací, což způsobí synergickou imunitní reakci proti boreliím a proti klíšťatům. Takový postup může být nejen účinný pro prevenci přenosu borelií z klíštěte na hostitele, ale také při prevenci přenosu jiných patogenů přenášených členovci.

Důvodů proč doposud není vakcína proti lymeské borelióze je mnoho. Od složité antigenní struktury a variability borelií, přes jejich komplexní strategie, jimiž se vyhýbají

imunitnímu systém až po náročnost vývoje samotné vakcíny. Momentálně se však zdá, že vývoj vakcíny spěje do zdárného konce a lidstvo si bude moci oddechnout od obávané nemoci, která ho sužuje již desítky let.



## 7 ZÁVĚR

V práci byla řešena problematika vakcíny proti lymeské borelióze, konkrétně problematika výzkumu, jehož důsledkem je momentální absence účinné lidské vakcíny na trhu. K pochopení celého problému bylo zapotřebí popsat původce nemoci – borelie. Ty na svém povrchu prezentují řadu antigenů, jimiž si zajišťují přežití uvnitř vektora a hostitele. Jejich strategie jim taktéž napomáhají při úniku před imunitním systémem a díky tomu k zabránění vlastní eliminace. Díky rozmanitosti antigenů a strategií je náročné vakcínu vyvinout. Dále byl popsán vektor borelií, což je klíště rodu *Ixodes*. Jeho životní cyklus je pro borelie výhodný z důvodu sání na vícero hostitelích. Bylo zapotřebí taktéž zmínit lymeskou boreliózu jako takovou a rozebrat jednotlivé klinické příznaky a důsledky neléčené nemoci. Právě kvůli vážným trvalým následkům, které borelióza způsobuje, je vakcína tolik důležitá. V minulosti již byla vyvinuta vakcína proti borelióze, ta však převážně díky mediálnímu tlaku selhala a byla stažena z prodeje. Momentálně je vyvíjena velice slibně vypadající vakcína, která má mnohem lepší perspektivu než vakcína předchozí, hlavně díky tomu, že je cílená na všechny pro člověka patogenní borelie. Její úspěch je téměř jistý. Selže-li však také, existuje ještě více možností, na kterých by mohla být případná vakcína založena.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

**Bankhead, T., Chaconas, G.** (2007): The role of VlsE antigenic variation in the Lyme disease spirochete: persistence through a mechanism that differs from other pathogens, *Molecular Microbiology* 65(6): 1547-1558.

**Barbour, A. G., Hayes, S. F.** (1986): Biology of Borrelia Species, *Microbiology Reviews* 50: 381-400.

**Barett, P. N., Portsmouth, D.** (2013): The need for a new vaccine against lyme borreliosis, *Expert Review of Vaccines* 12(2): 101-103.

**Bartůněk, P.** (2013a): Historie. In: Bartůněk, P. (eds.): *Lymeská borelióza 4*. Grada, Praha: 17-19.

**Bartůněk, P.** (2013b): Lymeská karditida, In: Bartůněk, P. (eds.): *Lymeská borelióza 4*. Grada, Praha: 113-127.

**Bencurova, E., Gupta, S. K., Oskoueian, E., Bhide, M., Dandekar, T.** (2018): Omics and bioinformatics applied to vaccine development against Borrelia, *Molecular Omics* 14(5): 330-340.

**Blagburn, B. L., Dryden, M. W.** (2009): Biology, Treatment, and Control of Flea and Tick Infestations. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 39(6): 1173–1200.

**Bojar, M.** (2013): Neuroborelióza In: Bartůněk, P. (eds.): *Lymeská borelióza 4*. Grada, Praha: 93-112.

**Bolehovská, R., Plíšek, S., Plíšková, L., Čermáková, Z., Palička, V.** (2009): Lymeská borelióza, *Klinická Biochemie a Metabolismus* 17(38): 24–28.

**Bowman, A. S., Sauer, J. R.** (2004): Tick salivary glands: function, physiology and future. *Parasitology* 129(7): 67-81.

**Brown, E. L., Kim, J. H., Reisenbichler, E. S., Höök, M.** (2005): Multicomponent Lyme vaccine: Three is not a crowd. *Vaccine* 23: 3687-3696.

**Casjens, S. R., Eggers, C. H., Schwartz I.** (2010): *Borrelia* Genomics: Chromosome, Plasmids, Bacteriophages and Genetic Variation. In: Samuels, D. S., Radolf, J. D. (eds.): *Borrelia: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis*, UK Caister Academic Press, Norfolk: 27–53.

- Casjens, S. R., Palmer, N., Van Vugt, R., Huang, W. M., Stevenson, B., Rosa, P., Lathigra, R., Sutton, G., Peterson, J., Dodson, R. J., Haft, D., Hickey, E., Gwinn, M., White, O., Fraser, C. M.** (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(3): 490-516.
- Comstedt, P., Hanner, M., Schüler, W., Meinke, A., Lundberg, U.** (2014): Design and Development of a Novel Vaccine for Protection against Lyme Borreliosis, *PLoS one* 9(11): 1-12.
- Comstedt, P., Hanner, M., Schüler, W., Meinke, A., Schlegl, R., Lundberg, U.** (2015): Characterization and optimization of a novel vaccine for protection against Lyme borreliosis, *Vaccine* 33(44): 5982-5988.
- Comstedt, P., Schüler, W., Meinke, A., Lundberg, U.** (2017): The novel Lyme borreliosis vaccine VLA15 shows broad protection against *Borrelia* species expressing six different OspA serotypes, *PLoS one* 12(9): 1-13.
- Dai, J., Wang, P., Adusumilli, S., Booth, C. J., 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.
- De Taeye, S. W., Kreuk, L., van Dam, A. P., Hovius, J. W., Schuijt, T. J.** (2013): Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: it takes three to tango, *Trends in Parasitology* 29(3): 119-128.
- Diblík, P.** (2013): Postižení oka, In Bartůněk, P. (eds.): *Lymeská borelióza 4*. Grada, Praha: 129-131.
- Dworkin, M. S., Schwan, T. G., Anderson, D. E., Borchardt, S. M.** (2008): Tick-Borne Relapsing Fever, *Infectious Disease Clinics of North America* 22(3): 449-468.
- Embers, M. E., Narasimhan, S.** (2013): Vaccination against Lyme disease: past, present, and future, *Cellular and infection mikrobiology* 3: 1-15.
- Ergström, S., Bundoc, V. G., Barbour, A. G.** (1989): Molecular analysis of linear plasmid-encoded major surface proteins, OspA and OspB, of the Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*, *Molecular Microbiology* 3(4): 479-486.

- Fikrig, E., Feng, W., Barthold, S. W., Telford, S. R., Flavell, R. A.** (2000): Arthropod- and Host-Specific *Borrelia burgdorferi* bbk32 Expression and the Inhibition of Spirochete Transmission, *The Journal of Immunology* 164(10): 5344-5351.
- Fikrig, E., Pal, U., Chen, M., Anderson, J. F., Flavell, R. A.** (2004): OspB Antibody Prevents *Borrelia burgdorferi* Colonization of *Ixodes scapularis*, *Infection and Immunity* 72(3): 1755-1759.
- Fikrig, E., Tao, H., Kantor, F. S., Barthold, S. W., Flavell, R. A.** (1993): Evasion of protective immunity by *Borrelia burgdorferi* by truncation of outer surface protein B, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 4092-4096.
- Fikrig, E., Telford, S. R., Wallich, R., Chen, M., Lobet, Y., Matuschka F. R., Kimsey, R. B., Kantor, F. S., Barthold, S. W., Spielman, A., Flavell, R. A.** (1995): Vaccination against Lyme disease caused by diverse *Borrelia burgdorferi*, *Journal of Experimental Medicine* 181(1): 215-221.
- Fingerle, V., Hauser, U., Liegl, G., Petko, B., Preac-Mursic, V., Wilske, B.** (1995): Expression of Outer Surface Protein A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *Journal of Clinical Microbiology* 33(7): 1867-1869.
- Fischer, J. R., Leblanc, K. T., Leong, A J. M.** (2005): Fibronectin Binding Protein BBK32 of the Lyme Disease Spirochete Promotes Bacterial Attachment to Glycosaminoglycans. *Infection and Immunity* 74(1): 435-441.
- Gross, D. M., Forsthuber, T., Tary-Lehmann, M., Etling, C., Ito, K., Nagy, Z. A., Field, J. A., Steere, A. C., Huber, B. T.** (1998): Identification of LFA-1 as a Candidate Autoantigen in Treatment-Resistant Lyme Arthritis, *Science* 281(5377): 703-706.
- Haake, D.A.** (2010): Introduction, In: Samuels, D. S., Radolf, J. D. (eds.): *Borrelia: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis*. UK Caister Academic Press, Norfolk: 1-7.
- Hagman, K. E., Yang, X., Wikel, S. K., Schoeler, G. B., Caimano, M. J., Radolf, J. D., Norgard, M. V.** (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.
- Hanson, M. S., Cassatt, D. R., Guo, B. P., Patel, N. K., McCarthy, M. P., Dorward, D. W., Höök, M.** (1998): Active and Passive Immunity against *Borrelia Burgdorferi* Decorin

Binding Protein A (DbpA) Protects against Infection, *Infection and Immunity* 66(5): 2143-2153.

**Hanson, M. S., Edelman, R.** (2003): Progress and controversy surrounding vaccines against Lyme disease, *Expert Review of Vaccines* 2(5): 683-703.

**Heinen, S., Hartmann, A., Lauer, N., Wiehl, U., Dahse, H. M., Schirmer, S., Gropp, K., Enghardt, T., Wallich, R., Hälbig, S., Mihlan, M., Schlötzer-Schrehardt, U., Zipfel, P. F., Skerka, CH.** (2009): Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation, *Blood* 114(12): 2439-2447.

**Hercogová, J.** (2013): Postižení kůže, In: Bartůněk, P. (eds.): *Lymeská borelióza 4. Grada*, Praha: 73-82.

**Hořejší, V., Bartůňková, J., Brdíčka, T., Špišek, R.** (2017): Základy imunologie 6. *TRITON*, Praha: 51-56.

**Hovius, J. W. R., Levi, M., Fikrig, E.** (2008): Salivating for Knowledge: Potential Pharmacological Agents in Tick Saliva, *PLoS medicine* 5(2): 202-208.

**Hovius, J. W. R., van Dam, A. P., Fikrig, E.** (2007): Tick–host–pathogen interactions in Lyme borreliosis. *Trends in Parasitology* 23(9): 434-438.

**Hübner, A., Yang, X., Nolen, D. M., Popova, T. G., Cabello, F. C., Norgard, M. V.** (2001): Expression of *Borrelia burgdorferi* OspC and DbpA is controlled by a RpoN-RpoS regulatory pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 12724-12729.

**Kraiczy, P., Hartmann, K., Hellwege, J., Skerka, Ch., Kirschfink, M., Brade, V., Zipfel, P. F., Wallich, R., Stevenson, B.** (2004): Immunological characterization of the complement regulator factor H-binding CRASP and Erp proteins of *Borrelia burgdorferi*, *International Journal of Medical Microbiology Supplements* 293: 152-157.

**Kraiczy, P., Skerka, C., Kirschfink, M., Brade, V., Zipfel, P. F.** (2001): Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconnectin and Factor H, *European Journal of Immunology* 31(6): 1674–1684.

**Kumar, M., Kaur, S., Kairu, T., Yang, X., Bossis, I., Anderson, J. F., Pal, U.** (2011): *Borrelia burgdorferi* BBA52 is a potential target for transmission blocking Lyme disease vaccine, *Vaccine* 29: 9012-9019.

- Kumar, M., Yang, X., Coleman, A. S., Pal, U.** (2010): BBA52 Facilitates *Borrelia burgdorferi* Transmission from Feeding Ticks to Murine Hosts, *The Journal of Infectious Diseases* 201(7): 1084-1095.
- Kumaran, D., Eswaramoorthy, S., Luft, B. J., Koide, S., Dunn, J. J., Lawson, C. L., Swaminathan, S.** (2001): Crystal structure of outer surface protein C (OspC) from the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, *The EMBO Journal* 20: 971-978.
- Kurtenbach, K., De Michelis, S., Etti, S., Schäfer, S. M., Sewell, H. S., Brade, V., Kraiczy, P.** (2002): Host association of *Borrelia burgdorferi sensu lato* – the key role of host complement, *TRENDS in Microbiology* 10(2): 74-79.
- Lam, T. T., Nguyen, T.P., Montgomery, R. R., Kantor, F. S., Fikrig, E., Flavell, R. A.** (1994): Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease, *Infection and Immunity*. 62 (1): 290-298
- Li, X., Liu, X., Beck, D. S., Kantor, F. S., Fikrig, E.** (2006): *Borrelia burgdorferi* Lacking BBK32, a Fibronectin-Binding Protein, Retains Full Pathogenicity, *Infection and Immunity* 74(6): 3305-3313.
- Livey, I., O'Rourke, M., Traweger, A., Savidis-dacho, H., Crowe, B. A., Barrett, P.N., Yang, X., Dunn, J. J., Luft, B. J.** (2011): A New Approach to a Lyme Disease Vaccine, *Clinical Infectious Diseases* 52(3): 266-270.
- Lybecker, M. C., Samuels, D. S.** (2007): Temperature-induced regulation of RpoS by a small RNA in *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology* 64: 1075–1089.
- Maritz-Olivier, C., Stutzer, C, Jongejan, F., Neitz, A. W. H., Gaspar, A. R. M.** (2007): Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics, *Trends in Parasitology* 23(9): 397-407.
- Merino, O., Antunes, S., Mosqueda, J., Moreno-Cid, J. A., Pérez de la Lastra, J. M., Rosario-Cruz, R., Rodriguez, S., Domingos, A., de la Fuente, J.** (2013): Vaccination with proteins involved in tick–pathogen interactions reduces vector infestations and pathogen infection, *Vaccine* 31(49): 5889–5896.
- Nigrovic, L. E., Thompson, K. M.** (2007): The Lyme vaccine: a cautionary tale, *Epidemiology and Infection* 135: 1–8.

- Nuttall, P. A.** (1999): Pathogen-tick-host Interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE Virus, *Zentralblatt für Bakteriologie* 289: 492-505.
- Nuttall, P. A., Trimmell, A. R., Kazimirova, M., Labuda, M.** (2006): Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases, *Parasite Immunology* 28: 155-163.
- Pal, U., Fikrig, E.** (2003): Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the vector and vertebrate host. *Microbes and Infection* 5: 659-666.
- Pal, U., Li, X., Wang, T., Montgomery, R. R., Ramamoorthi, N., Desilva, A. M., Bao, F., Yang, X., Pypaert, M., Pradhan, D., Kantor, F. S., Telford, S., Anderson, J. F., Fikrig, E.** (2004a): TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell* 119: 457–468.
- Pal, U., Montgomery, R. R., Lusitani, D., Voet, P., Weynants, V., Malawista, S. E., Lobet, Y., Fikrig, E.** (2001): Inhibition of *Borrelia burgdorferi*-Tick Interactions In Vivo by Outer Surface Protein A Antibody, *The Journal of Immunology* 166(12): 7398-7403.
- Pal, U., Yang, X., Chen, M., Bockenstedt, L. K., Anderson, J. F., Flavell, R. A., Norgard M. V., Fikrig, E.** (2004b): OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *Journal of Clinical Investigation* 113(2): 220-230.
- Petzke, M., Schwartz, I.** (2015): *Borrelia burgdorferi* Pathogenesis and the Immune Response, *Clinics in Laboratory Medicine* 35(4): 745-764.
- Poland, G. A.** (2011): Vaccines against Lyme Disease: What Happened and What Lessons Can We Learn? *Clinical Infectious Diseases* 52: 253-258.
- Ramamoorthi, N., Narasimhan, S., Pal, U., Bao, F., Yang, X. F., Fish, D., Anguita, J., Norgard, M. V., Kantor, F. S., Anderson, J. F., Koski, R. A., Fikrig, E.** (2005): The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host, *Nature* 436: 573-577.
- Ribeiro, J. M. C., Francischetti, I. M. B.** (2003): Role Of Arthropod Saliva In Blood Feeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives, *Annual Review of Entomology* 48(1): 73-88.
- Roháčová, H.** (2006): Onemocnění přenášená klíšťaty, *Interní medicína pro praxi* 6: 280-283.

- Rosé, C. D., Fawcett, P. T., Gibney, K. M.** (2001): Arthritis following recombinant outer surface protein A vaccination for Lyme disease, *The Journal of Rheumatology*: 28 (11): 2555-2557.
- Schettters, T. P. M.** (2018): Vaccination against ticks, *Ectoparasites: Drug Discovery Against Moving Targets*: 25-42.
- Schuijt, T.J., Hovius, J.W., Van Der Poll, T., Van Dam, A.P., Fikrig, A E.,** (2011): Lyme borreliosis vaccination: the facts, the challenge, the future, *Trends in Parasitology* 27(1): 40-47.
- Schwan, T. G., Piesman, A. J.** (2002): Vector Interactions and Molecular Adaptations of Lyme Disease and Relapsing Fever Spirochetes Associated with Transmission by Ticks. *Emerging Infectious Diseases* 8(2): 115-121.
- Schwendinger, M. G., O'Rourke, M., Traweger, A., Savidis-Dacho, H., Pilz, A., Portsmouth, D., Livey, I., Barrett, P. N., Crowe, B. A.** (2013): Evaluation of OspA Vaccination-Induced Serological Correlates of Protection against Lyme Borreliosis in a Mouse Model, *PLoS One* 8(11): 1-8.
- Singh, S. K., Girschick, H. J.** (2003): Tick-host interaction and their immunological implications in tick-borne diseases, *Current science* 85(9): 1284-1298.
- Singh, S. K., Girschick, H. J.** (2004): Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*, *The Lancet Infectious Diseases* 4(9): 575–583.
- Skotarczak, B.** (2015): Why is There Still no Human Vaccine Against Lyme Borreliosis? *Folia Biologica* 63(3): 159-165.
- Steere, A. C., Drouin, E. E., Glickstein, L. J.** (2011): Relationship between Immunity to *Borrelia burgdorferi* Outer-surface Protein A (OspA) and Lyme Arthritis, *Clinical Infectious Diseases* 52(3): 259-265.
- Stevenson, B., Bono, J. L., Schwan, T. G., Rosa, P.** (1998): *Borrelia burgdorferi* erp proteins are immunogenic in mammals infected by tick bite, and their synthesis is inducible in cultured bacteria, *Infection and Immunity* 66(6): 2648-2654.
- Stevenson, B., El-Hage, N., Hines, M. A., Miller, J. C., Babb, K.** (2002): Differential binding of host complement inhibitor factor h by *borrelia burgdorferi* erp surface proteins: a



possible mechanism underlying the expansive host range of Lyme disease spirochetes, *Infection and Immunity* 70(2): 491-497.

**Stich, R. W., Schaefer, J. J., Bremer, W. G., Needham, G. R., & Jittapalpong, S.** (2008): Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*, *Veterinary Parasitology* 158(4): 256–273.

**Šadžiene, A., Wilske, B., Ferdows, M. S., Barbour, A. G.** (1993): The Cryptic ospC Gene of *Borrelia burgdorferi* B31 Is Located on a Circular Plasmid, *Infection and Immunity* 61(5): 2192-2195.

**Šimo, L., Kazimirova, M., Richardson, J., Bonnet, S. I.** (2017): The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7: 2235-2988.

**Thanassi, W. T., Schoen, R. T.** (2000): The Lyme Disease Vaccine: Conception, Development, and Implementation. *Annals of Internal Medicine* 132(8): 661-668.

**Valešová, M.** (2013): Postižení kloubů, In: Bartůněk, P. (eds.): *Lymeská borelióza 4*. Grada, Praha: 83-90.

**Volf, P., Horák, P., Čepička, I., Flegr, J., Lukeš, J., Mikeš, L., Svobodová, M., Vávra, J., Votýpka, J., Hypša, V., Nohýnková, E., Scholz, T.** (2007): Paraziti a jejich biologie. *TRITON*, Praha: 260-264.

**Wressnigg, N., Barrett, P. N., Pöllabauer, E. M., et al.** (2014): A Novel Multivalent OspA Vaccine against Lyme Borreliosis Is Safe and Immunogenic in an Adult Population Previously Infected with *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato, *Clinical and Vaccine Immunology* 21(11): 1490-1499.