

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
**JIHOČESKÉ UNIVERZITY V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**  
**Katedra medicínské biologie**



**DYNAMIKA PŘENOSU *BORRELIA BURGDORFERI* SENSU  
STRICTO Z KLÍŠTĚTE *IXODES RICINUS* NA HOSTITELE**

**Bakalářská práce 2010**

**Autor:** Jana Páleníková

**Vedoucí práce:** RNDr. Helena Horká

Páleníková J., 2010: Dynamika přenosu *Borrelia burgdorferi* sensu stricto z klíštěte *Ixodes ricinus* na hostitele. [Dynamics of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto transmission from the tick *Ixodes ricinus* to the host. BSc. Thesis in Czech] - 32 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Aim of this study was to examine dynamics and duration of transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto from *Ixodes ricinus* tick to the host during feeding. We determined infection of *Bbss* in murine tissues from five time points. Furthermore, we determined the location of *Bbss* in *Ixodes ricinus* ticks before and during blood meal.

Práce byla financována ze zdrojů:

projekt LC06009 Centrum molekulární ekologie vektorů a patogenů  
grant č. IAA600960811 Grantové agentury Akademie věd České republiky  
MSM6007665801 Výzkumný záměr PřF JU České Budějovice

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.

V Českých Budějovicích dne

.....

Jana Páleníková

### **Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své skvělé školitelce RNDr. Heleně Horké za pomoc při zpracování mé práce, za cenné rady a především za morální podporu v těžkých chvílích. Jmenovitě děkuji Honzovi Erhartovi za zásobení klíšťaty, Evě Výletové za pomoc při pitvě klíšťat a Jiřímu Salátovi za pomoc při pitvě myší. Speciální dík patří Veronice Slavíkové za kultivaci borelií a pomoc s real-time PCR. V neposlední řadě patří poděkování panu Doc.RNDr. Janu Kopeckému, CSc za umožnění práce v laboratoři Imunologie parazitóz. Na závěr bych chtěla poděkovat také své rodině za jejich trpělivost a podporu při studiu.

## OBSAH

<b>1. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>	<b>1</b>
1.1.Klíště .....	1
1.1.1.Klíště obecné.....	1
1.2.Rod <i>Borrelia</i> .....	2
1.2.1.Morfologie.....	3
1.2.2.Genom.....	4
1.3.Lymeská borelióza.....	4
1.4.Vzájemné interakce.....	5
1.4.1.Interakce klíště – borelie.....	5
1.4.2.Interakce borelie – hostitel.....	6
1.4.3.Interakce klíště – hostitel.....	7
1.5.Slinami aktivovaný přenos patogenů.....	8
<b>2. CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>10</b>
<b>3. MATERIÁL A METODY.....</b>	<b>11</b>
3.1.Laboratorní zvířata.....	11
3.1.1.Myši.....	11
3.1.2.Morče.....	11
3.1.3.Klíšťata.....	11
3.2.Borelie.....	11
3.3.Infekce klíšťat sáním na infikovaných myších.....	11
3.3.1. Infekce myší.....	11
3.3.2. Infekce klíšťat.....	12
3.4.Dynamika přenosu borelií v závislosti na době sání.....	12
3.4.1. Design pokusu.....	12
3.4.2. Pitva myší.....	12
3.4.3. ELISA.....	12
3.4.4. Izolace DNA.....	13
3.4.5. Real-time PCR.....	13
3.5.Dynamika migrace borelií v klíštěti v závislosti na době sání.....	14
3.5.1. Design pokusu.....	14
3.5.2. Pitva klíšťat.....	14
3.5.3. Izolace DNA.....	14
3.5.4. Real-time PCR.....	14

<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	<b>15</b>
4.1.Dynamika přenosu borelií v závislosti na době sání.....	15
4.2.Dynamika migrace borelií v klíštěti v závislosti na době sání.....	19
<b>5. DISKUSE</b> .....	<b>20</b>
<b>6. ZÁVĚR</b> .....	<b>21</b>
<b>7. SEZNAM ZKRATEK</b> .....	<b>23</b>
<b>8. CITOVANÁ LITERATURA</b> .....	<b>24</b>

# 1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

## 1.1 Klíště

Klíšťata jsou obligátní, krev sající ektoparazité, kteří jsou po komárech druhými nejčastějšími vektory lidských patogenů (Parola et Raoult 2001).

Taxonomicky řadíme klíšťata do kmene Arthropoda, podkmene Chelicerata, třídy Arachnida, řádu Acarina a podřádu Ixodides, který dále můžeme rozlišit na dvě čeledi, tzv. „hard ticks“ (Ixodidae), která se vyznačují přítomností hřbetního štítku, a „soft ticks“ (Argasidae), která mají ohebnou kutikulu (Oschmann et al. 1999, Gray et al. 2002). Ixodidae potřebují k plnému nasátí několik dní, během nichž zůstávají pevně přichyceni ke svému hostiteli, zatímco Argasidae vyžadují pouze pár minut či hodin opakovaného sání, během něhož nejsou ke svému hostiteli pevně přichyceni (Bergman 1996).

Čeď Ixodidae můžeme dále členit na Prostriata a Metastriata, přičemž z hlediska přenosu patogenů jsou významnější Prostriata, kam spadá rod *Ixodes*. Klíšťata tohoto rodu (*I. ricinus*, *I. scapularis*, *I. pacificus*, *I. persulcatus*) jsou hlavními přenašeči borelií, mimoto se podílí na přenosu řady dalších patogenů: *Anaplasma phagocytophylum*, *Francisella tularensis*, virus klíšťové encefalidity (Gray et al. 2002).

Hlavními přenašeči komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*Bbsl*) jsou především *Ixodes ricinus* v Evropě, *Ixodes scapularis* a *Ixodes pacificus* v Severní Americe a dále *Ixodes persulcatus* a *Ixodes ovatus* v Asii. V Evropě byly jako vektory *Borrelia burgdorferi* sensu lato popsány ještě další dva druhy, a sice *Ixodes hexagonus* a *Ixodes urinae* (Gern et Humair 2002). Přenos patogenů probíhá transstadiálně z nakažené larvy na nymfu či z nakažené nymfy na dospělé, přičemž nymfa či dospělec mohou infikovat hostitele. Přenos transovariální ze samice na larvy je pouze vzácný a neefektivní (Zhioua et al. 1994).

Klíšťata můžeme nalézt přímo v úkrytech svých hostitelů, pak jsou označována jako nidikolní, nebo ve volné vegetaci, tzv. non-nidikolní klíšťata. Z tohoto vyplývá, že non-nidikolní klíšťata, mezi které patří *Ixodes ricinus*, snáze přijdou do kontaktu s člověkem, a proto jsou také nejčastějšími přenašeči patogenů na člověka (Gern et Humair 2002). Dále můžeme klíšťata podle počtu hostitelů rozlišit na jedno-, dvoj- a trojhostitelské druhy.

### 1.1.1. Klíště obecné

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) je nejrozšířenějším druhem v Evropě, můžeme ho nalézt po celé západní, střední a jižní Evropě (Gern et Humair 2002). Vyskytuje se

především v listnatých a smíšených lesích, křovinatých porostech a loukách s vysokou vlhkostí (min. 80%) (Randolph et al. 2000). Výška, ve které klíště obecné hledá svého hostitele, závisí na jednotlivých vývojových stádiích a na struktuře vegetace (Meilon et Jaenson 1997). V posledních letech byl zaznamenán posun *Ixodes ricinus* do vyšších nadmořských výšek a s tím spojený nárůst výskytu některých lidských patogenů v těchto oblastech (Danielová et al. 2006).

Životní cyklus klíštěte obecného zahrnuje tři vývojová stádia: larvu, nymfu a dospělce. Každé stádium saje krev ze svého hostitele několik dní, což poskytuje hostitelskému imunitnímu systému příležitost k obraně, která vede ke zhoršení sání klíštěte až k jeho odpadnutí (Bergman 1996). Sání larev trvá 2 až 3 dny, nymf 3 až 4 dny a dospělé samice sají 7 až 9 dní. Dospělí samci sají krev pouze výjimečně.

*Ixodes ricinus* je typickým trojhostitelským druhem, což znamená, že každé stádium saje na jiném hostiteli. Mezi hostitele patří více jak 300 druhů obratlovců zahrnujících savce, ptáky a ještěrky v závislosti na stádiu. Larvy a nymfy sají spíše na menších druzích, zatímco dospělci na větších. Na člověku mohou parazitovat všechna stádia, nejčastěji však nymfy. Po nasátí opouští každé stádium hostitele a další vývoj probíhá v opadance. Samice je schopná kopulovat až po částečném nasátí krve, a to buď přímo na hostiteli nebo mimo něj, posléze klade vajíčka, kterých může být až 5000. Celý vývoj kolísá mezi 2 a 6 roky, v našich podmínkách jsou to průměrně tři roky (Oschmann et al. 1999).

S klíštětem obecným jsou spjaty druhy *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. valaisiana* a *B. lusitaniae*. Avšak Crippová et al. ukázali, že nejúspěšněji přenáší *B. afzelii* (Crippa et al. 2002).



Obr.1: *Ixodes ricinus*. Foto Jan Dvořák

## 1.2. Rod *Borrelia*

Borelie jsou mikroaerofilní Gram-negativní spirochety, které taxonomicky řadíme do třídy Spirochaetes, řádu Spirochaetales a čeledi Spirochaetaceae. Do této čeledi patří kromě rodu *Borrelia* další významný rod *Treponema*, způsobující závažná onemocnění člověka.

Do rodu *Borrelia* patří druhy spirochet způsobující návratnou horečku (např. *B. duttoni*) a komplex dvanácti druhů souhrnně označovaný *Borrelia burgdorferi* sensu lato

(Postic et al. 1998). Patří sem *B. burgdorferi* sensu stricto (*Bbss*), *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. bissetti*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdae*, *B. sinica*, *B. spielmani* a *B. andersoni*. (Johnson et al. 1984, Baranton et al. 1992, Canica et al. 1993, Wang et al. 1997, Le Fleche et al. 1997, Postic et al. 1998, Marconi et al. 1995, Masuzawa et al. 2001, Richter et al. 2004, Fukunaga et al. 1996, Kawabata et al. 1993). Recentně byly popsány dva nové druhy *B. carolinensis* a *B. americana* (Rudenko et al. 2009 a, b).

Prokazatelný vztah k Lymeské borelióze mají pouze čtyři z těchto druhů, a to *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* a *B. afzelii* a *B. spielmani* (Wilske et al. 2007). V severní Americe je hlavním původcem této nemoci *B. burgdorferi* sensu stricto, přenášena klíšťaty *Ixodes scapularis* a *Ixodes pacificus* (Seinost et al. 1999, Barbour et Fish 1993). V Evropě se vyskytují všechny čtyři infekční druhy (*Bbss*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmani*), jejichž vektorem je *Ixodes ricinus* (Johnson et al. 1984, Baranton et al. 1992, Canica et al. 1993, Wilske et al. 2007). V Asii nalezneme *B. afzelii* a *B. garinii* přenášené *Ixodes persulcatus* (Miyamoto et Masuzawa 2002). V Asii a Evropě byla též popsána infekce *B. valaisiana*, která způsobuje erythema migrans a často se vyskytuje v koinfekci s *B. garinii* (Bartůněk et al. 2006).

Jednotlivé druhy se liší nejen svými přenašeči, ale také hostiteli. *B. afzelii*, *B. bissetti* a *B. burgdorferi* sensu stricto jsou spjaty především s malými hlodavci, zatímco *B. valaisiana* infikuje pouze ptáky (Kurtenbach et al. 2002).

### 1.2.1 Morfologie

Pro borelie ze skupiny *Borrelia burgdorferi* sensu lato je stejně jako pro všechny spirochety typický protáhlý spirálovitý tvar s pravidelnými závity ve vzdálenosti 2,2  $\mu\text{m}$ , jejichž počet se pohybuje mezi čtyřmi až patnácti (Goldstein et al. 1996). Borelie dosahují délky 10 - 20  $\mu\text{m}$  a šířky 0,2 - 0,5  $\mu\text{m}$  (Barbour et Hayes 1986).

Buněčná stěna borelií skládající se ze tří vrstev (peptidoglykanová, střední lipopolysacharidová a vnější lipoproteinová) je od cytoplazmatické membrány oddělena periplazmatickým prostorem (Barbour et Hayes 1986). V tomto prostoru se nachází 7 - 11 helikálních bičků, které se vypínají z bazálních disků umístěných v cytoplazmatické membráně na obou pólech buňky. Tyto bičky obtáčí celý buněčný cylindr a kromě pohybu udělují zřejmě boreliím i jejich typický spirálovitý tvar (Motaleb et al. 2000, Wolgemuth et al. 2006). Bičky jsou tvořeny tzv. flagelárními proteiny dvou tříd. FlaA se nachází v pochvě bičků a je typický pro spirochety a FlaB nazývaný též flagellin se nachází



v dřeni bičků (Ge et al. 1998). Díky uložení bičků pod vnější membránou jsou tyto jinak velmi imunogenní proteiny chráněny před imunitním systémem hostitele.

Spirochety mají na svém povrchu vnější membránu, která tvoří bariéru chránící antigeny umístěné pod ní před imunitním systémem hostitele. Tato membrána se vyznačuje vyšším zastoupením proteinů kovalentně modifikovaných s lipidy a absencí lipopolysacharidu, který je jinak typický pro Gram-negativní bakterie. Navíc je tato membrána značně tekutá a labilní. Tato unikátní architektura vnější membrány zřejmě odpovídá za lepší přežití borelií v přenašeči i hostiteli (Haake et al. 2000).

### 1.2.2 Genom

Genom *Borrelia burgdorferi* je jeden z nejvíce komplexních genomů známých u prokaryot. Kompletní genomová sekvence *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (kmene B31) byla publikována v roce 1997 Fraserovou et al. (Fraser et al. 1997). Tvoří ho jeden lineární chromosom o velikost 910 725 párů bází (bp) s průměrným obsahem G+C 28,6 % a dvanáct lineárních a devět cirkulárních plazmidů o celkové velikosti 610 649 bp (Casjens et al. 2000). Chromosomální geny kódují základní proteiny pro replikaci DNA, transkripci, translaci, transport látek a energetický metabolismus. Avšak chybí zde geny pro syntézu aminokyselin, mastných kyselin, kofaktorů a nukleotidů. Tento nedostatek biosyntetických drah je důvodem, proč růst borelií in vitro vyžaduje speciální růstové medium BSK-H doplněné králičím sérem (Barbour et Hayes 1986). Na plazmidech jsou kódovány především geny pro povrchové proteiny bakterií a faktory virulence. Například plazmid cp26 nese gen pro povrchový lipoprotein OspC se nachází ve všech přírodních izolátech a neztrácí se během in vitro kultivace. Některé plazmidy se však během kultivace ztrácejí, což může vést ke ztrátě virulence. Lineární plazmidy obsahují velké množství pseudogenů, které jsou zřejmě důsledkem rychlých evolučních změn (Casjens et al. 2000).

### **1.3. Lymeská borelióza**

V současné době je Lymeská borelióza nejběžnějším členovci přenášeným onemocněním v USA a Evropě. Svůj název získala podle městečka Old Lyme ve státě Connecticut, kde byla poprvé pozorována v roce 1976 u dětí trpících revmatoidní artritidou. Později bylo zjištěno, že tato artritida je pozdním projevem onemocnění přenášeného klíšťaty. V roce 1981 objevil Burgdorfer v nymfách *Ixodes scapularis* bakterii, která byla nazvána *Borrelia burgdorferi*. O rok později byla tato spirocheta

kultivována z pacientů trpících Lymeskou boreliózou, čímž se potvrdilo, že *B. burgdorferi* je etiologickým původcem tohoto onemocnění (Steere 1989).

S Lymeskou boreliózou jsou prokazatelně spojeny čtyři druhy z komplexu *Borrelia burgdorferi*, a to *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. spielmanii* (Wilske et al. 2007).

Lymeská borelióza probíhá u lidí zpravidla ve třech fázích, které se liší klinickými příznaky: 1. lokalizovaná infekce v místě kousnutí, 2. rozptýlená infekce, 3. perzistentní infekce probíhající měsíce až roky po kousnutí. Avšak v některých případech se může projevit pouze lokalizovaná infekce či pouze pozdní fáze nemoci jako je artritida (Steere 2001).

Infekce boreliemi je komplexní proces začínající při sání infikovaného klíštěte na kůži člověka. Při tomto procesu se dostanou borelie ze střeva klíštěte, do slinných žláz a společně se slinami do kůže člověka. Zde borelie během jednoho měsíce způsobují lokální infekci zvanou erythema migrans (EM), která se projevuje jako načervenalý terč s projasněním ve středu. Tato fáze může být doprovázena příznaky chřipky jako je bolest hlavy, únava či malátnost. Během druhé fáze infekce se borelie dostávají z kůže do sekundárních orgánů zahrnujících především srdce, klouby a nervovou soustavu (Pfister et al. 1994). Můžeme je nalézt též v krvi a mozkomíšním moku (Duray et al. 1988). U neléčených pacientů s Lymeskou boreliózou infekce přetrvává až několik let, přičemž příznaky nemoci jsou minimální nebo žádné.

Klinické projevy do značné míry závisí také na druhu borelií, kterými je člověk infikován. *B. burgdorferi* sensu stricto způsobuje především onemocnění velkých kloubů, *B. afzelii* napadá převážně kůži a způsobuje její poškození a *B. garinii* je neurotropní a způsobuje celou škálu neurologických příznaků (Steere et al. 1987, Brown et al. 2003).

## **1.4. Vzájemné interakce**

### 1.4.1. Interakce klíště - borelie

Během sání na infikovaném hostiteli získá larva klíštěte spirochety, které putují společně s krví do střeva klíštěte. Zde borelie zůstávají přichyceny během přeměny klíštěte v následující vývojové stádium. V průběhu dalšího sání dojde ke zmnožení spirochet ve střevě klíštěte a k jejich migraci do slinných žláz (Hovius et al. 2007). Při pobytu v lumen střeva zvyšují borelie expresi povrchového lipoproteinu A (OspA), pomocí kterého dojde k ukotvení borrelie na klíštěcí receptor TROSPA (tick receptor for OspA). Přítomnost tohoto receptoru je vyšší v infikovaných nymfách. Tato interakce zajistí

ukotvení borelie ve střevě klíštěte a zároveň ji chrání před obrannými mechanismy klíštěte (Pal et al. 2004). Důležitou roli zde hraje také další povrchový lipoprotein B (Osp B) (Neelakanta et al. 2007) a částečně i lipoprotein D (OspD) (Li et al. 2007).

Při dalším sání klíštěte dochází ke snížení exprese OspA, B a TROSPA a ke zvýšení exprese povrchového lipoproteinu C (OspC). Tento lipoprotein usnadňuje migraci spirochet ze střeva klíštěte do slinných žláz a je nezbytný pro infekci hostitelských tkání (Gilmore et al. 2000, Schwan 2003). Kromě zvýšené exprese OspC je zvýšena také exprese VlsE, BBK32, Dbp-A a Dbp-B (Kočí et al. 2006, Hodzic et al. 2002).

Regulace exprese OspA a C je kromě vnějších faktorů, jako jsou teplota a pH, řízena také RpoN/RpoS sigma faktory (De Silva et al. 2009, Caimano et al. 2005, 2007).

#### 1.4.2. Interakce borelie - hostitel

Během sání klíštěte infikují borelie hostitelskou tkáň a indukují silnou imunitní odpověď, která zahrnuje mechanismy přirozené i adaptivní imunity. Avšak borelie si vyvinuly několik způsobů, které jim umožňují vyhnout se hostitelskému imunitnímu systému a přetrvávat v hostiteli i po dobu několika let. Mezi tyto mechanismy patří snížená exprese některých povrchových lipoproteinů, inaktivace efektorových mechanismů a skrývání se v imunologicky privilegovaných místech jako je mezibuněčná hmota.

Hlavní úlohu v obraně proti boreliím v počátečních infekce hraje přirozená imunita. Důležitým mechanismem je degradace spirochet pomocí komplementu. Povrchové antigeny borelií aktivují alternativní dráhu komplementu. Složka C3b komplementu společně se složkou C5 vytvoří membrány atakující komplex (MAC), který se naváže na borelie a vede k lýze bakterií (Hovius et al. 2007). Na místo infekce infiltrují také dendritické buňky, makrofágy, neutrofilů a monocytů (Steere et al. 2004).

Lipoproteiny na povrchu spirochet reagují s Toll-like receptory 1 a 2 (TLR) na povrchu fagocytů (Hirschfeld et al. 1999, Wooten et al. 2002, Wang et al. 2004), což vede k aktivaci makrofágů a tím k následné produkci prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12 a TNF- $\alpha$  (Randolph et al. 1995), k produkci adhesivních molekul a vytvoření superoxidu a oxidu dusného makrofágy a neutrofilů (Morrison et al. 1997), což vyústí v následnou likvidaci spirochet.

Borelie však mají několik mechanismů, díky nimž se mohou těmto obranným reakcím hostitele vyhnout či je potlačit. Jedním z nich je inhibice komplementu inaktivací C3b složky. Na svém povrchu borelie exprimují CRASP protein (complement regulator-acquiring surface protein), který patří do rodiny Erp proteinů (OspE/F related protein)

a váže se na faktor H a faktor H-like protein 1, které jsou přirozenými inhibitory C3b složky komplementu (Kraiczky et al. 2004 a, b, Hellwage et al. 2001). Schopnost borelií inhibovat komplement kolísá mezi různými izoláty (Kurtenbach et al. 1998).

Další obrannou reakcí borelií na hostitelský imunitní systém je inhibice či změna exprese některých povrchových proteinů. Nejvýznamnější z těchto proteinů je VlsE (variable major protein-like sequence), který je kódován plasmidem lp28. Lokus *vls* podléhá náhodné rekombinaci. Výsledné variace v sekvenci VlsE proteinu mění jeho antigenní vlastnosti (Liang et al. 2004). In vitro k rekombinaci nedochází (Zhang et Norris 1998). Později během infekce je pod tlakem imunitního systému snížena exprese také OspC. Z tohoto důvodu protilátky proti OspC hrají roli při počáteční infekci, avšak nedovedou bojovat proti perzistentní infekci (Liang et al. 2002) .

#### 1.4.3 Interakce klíště - hostitel

Klíšťata čeledi Ixodidae sají na svém hostiteli po dobu několika dní. Takto dlouhý kontakt umožňuje hostitelskému imunitnímu systému vyvinout odpověď proti sajícímu klíštěti, zahrnující složky přirozené a adaptivní imunity, která vede k poškození klíštěte. Opakované sání klíštěte na hostiteli vyvolává kožní bazofilní hypersenzitivitu, která je typem oddálené hypersenzitivity (DTH – delayed type hypersensitivity) a je zprostředkována Th1 lymfocyty (Allen 1973, Brossard et Wikel 1997). DTH reakce může poškodit klíště, což se projeví sníženou hmotností plně nasátého klíštěte, omezením snůšky až smrtí sajícího klíštěte (Ribeiro et al. 1995).

Navzdory těmto překážkám jsou klíšťata schopná sát po dobu několika dní díky molekulám obsaženým v jejich slinách, které potlačují hostitelskou imunitní odpověď. Klíštěcí sliny obsahují řadu farmakologicky aktivních molekul s antihemostatickými, vazodilatačními a imunosupresivními vlastnostmi (Wikel et Bergman 1997).

Mezi tyto účinky patří inhibice alternativní dráhy komplementu (Lawrie et al. 2005), vazba histaminu (Paesen et al. 2000), inaktivace anafylatoxinů (Ribeiro et Spielman 1986), inhibice fagocytózy (Kýčková et Kopecký 2006), potlačení produkce oxidu dusného a superoxidu neutrofilů a makrofágů (Ribeiro et al. 1990, Kuthejlová et al. 2001), inhibice aktivace NK buněk (Kopecký a Kuthejlová 1998), inhibice interferonu  $\gamma$  (Hajnická et al. 2000), inhibice aktivace T-buněk (Kovář et al. 2002).

Klíšťata také snižují produkci prozánětlivých cytokinů IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  a naopak zvyšují produkci IL-10 a TGF- $\beta$ . Dochází tedy k Th2 polarizaci imunitní odpovědi (Ferreira et Silva 1999, Kopecký et al. 1999).

Z konkrétních molekul, které jsou zodpovědné za některé vlastnosti klíštěcích slin, mohou být uvedeny inhibitory alternativní dráhy komplementu Isac z *I. scapularis* (Valenzuela et al. 2000) a IRAC 1 a 2 z *I. ricinus* (Schroeder et al. 2007). Salp 15 z *I. scapularis* a jeho homolog z *I. ricinus* inhibuje proliferaci CD4+ T- lymfocytů (Anguita et al. 2002). Protein Iris ze slin *I. ricinus* také potlačuje funkci T-lymfocytů, a sice inhibicí IFN- $\gamma$ , dále potlačuje produkci TNF- $\alpha$  makrofágy a navíc je inhibitorem serinových proteáz a má antihemostatické účinky (Leboulle et al. 2002, Prevot et al. 2006). Dalšími nedávno popsány proteiny klíštěcích slin jsou Sialostatin L a L2 z *Ixodes scapularis*, které jsou inhibitory cysteinových proteáz a vykazují protizánětlivé a imunosupresivní účinky (Kotsyfakis et al. 2006, 2007).

### 1.5. Slinami aktivovaný přenos patogenů

Sliny klíšťat obsahují řadu imunomodulačních, antikoagulačních či jinak farmakologicky aktivních molekul, které usnadňují přenos, přežití a množení borelií v hostiteli (Nuttall et al. 1994, Macháčková et al. 2006). Tento jev, kdy je přenos patogenů usnadňován slinami krevsajících vektorů, byl nazván SAT (saliva-activated transmission) neboli slinami aktivovaný přenos patogenů (Jones et al. 1987).

Poprvé byl tento fenomén zaznamenán u Thogoto viru, jehož vektorem je *Rhipicephalus appendiculatus* (Jones et al. 1987, Jones et al. 1989). U tohoto viru byl pozorován neviremický přenos patogena z infikovaných jedinců na neinfekční při společném sání na morčeti (tzv. co-feeding neboli sousání). Tento přenos patogenů sousáním, při němž není pozorována virémie hostitele, je považován za nepřímý důkaz SAT. Přímým důkazem tohoto efektu je zvýšená infektivita patogena, pokud je hostitel infikován patogenem společně s extraktem ze slinných žláz (SGE) či slinami (Labuda et al. 1993 b).

V současné době je SAT přímo i nepřímo znám u několika patogenů a jejich vektorů. Např. u již zmíněného Thogoto viru a *Rhipicephalus appendiculatus* (Jones et al. 1987, Jones et al. 1989), TBE viru a *Ixodes ricinus* (Labuda et al. 1993a, Labuda et al. 1993b), u *Francisella tularensis* a *Ixodes ricinus* (Kročová et al. 2003) a u západonilského viru a *Ornithodoros moubata* (Lawrie et al. 2004). V rámci komplexu *Bbsl* byl

zaznamenán SAT u těchto druhů: *B. afzelii* a *Ixodes ricinus* (Pechová et al. 2002), *Bbss* a *Ixodes scapularis* (Zeidner et al. 2002), *B. garinii* a *Ixodes persulcatus* (Sato et Nakao 1997) a *B. lusitaniae* a *Ixodes ricinus* (Zeidner et al. 2002).

Ačkoliv je v dnešní době studiu slinami aktivovaného přenosu patogenů věnována velká pozornost, dosud nejsou plně známy molekuly, které jsou za tento efekt zodpovědné. Imunomodulační molekuly obsažené v klíštěcích slinách, které jsou se SATem spojovány, se liší mezi jednotlivými patogeny a jejich vektory. Stejně tak se neví, zda je efekt SATu způsoben pouze jednou molekulou, či zda jde o výsledek kombinace několika molekul (Zeidner et al. 2002). Zatím jediným známým SAT faktorem je protein Salp 15 z *I. scapularis* a jeho homolog z *I. ricinus* (Anguita et al. 2002, Ramamoorthi et al. 2005). Salp 15 interaguje s povrchovým lipoproteinem OspC borelií a tím je chrání před protilátkami zprostředkovaným zabíjením, exprese tohoto proteinu je v přítomnosti spirochet zvýšená (Hovius et al. 2008). Účinky tohoto proteinu spočívají v jeho schopnosti inhibovat proliferaci CD4<sup>+</sup> T lymfocytů potlačením toku vápenatých iontů po navázání Salp15 na TCR receptor. Toto navázání má totiž vliv na snížení produkce IL-2, který stimuluje proliferaci T-buněk (Anguita et al. 2002).

## 2. CÍLE PRÁCE

1. *Podrobná literární rešerše slinami aktivovaného přenosu patogenů klíšťaty.*
  
2. *Experiment 1 :*  
*Dynamika přenosu borelií na hostitele v závislosti na době sání.*
  
3. *Experiment 2 :*  
*Dynamika migrace borelií v orgánech klíštěte (střevo, slinné žlázy) v závislosti na délce sání krve.*

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1. Laboratorní zvířata

##### 3.1.1. Myši

V pokusech byly použity samice inbredních myší kmen C3H/HeN (AnLab s.r.o.) ve stáří 8 týdnů. Tyto myši jsem použila jednak jako zdroj infekce pro klíšťata a pak ve vlastním pokusu. Myši byly chovány ve zvěřinci Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za standardních podmínek.

##### 3.1.2. Morče

Pro sání dospělců byla použita tříměsíční samice morčete z chovu Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích.

##### 3.1.3 Klíšťata

Pro pokusy byly použity larvy a nymfy *Ixodes ricinus* z chovu Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích.

#### 3.2. Borelie

Pro infekci klíšťat byly použity spirochety *Borrelia burgdorferi sensu stricto* kmen CB53, 11tá pasáž. Borelie byly kultivovány v termostatu při 34 °C v BSK-H médiu (SIGMA) s 6 % králíčího séra a 1% směsí antibiotik pro borelie (SIGMA). Pro infekci klíšťat bylo nutné znát koncentraci boreliové suspenze, proto byla koncentrace borelií spočítána dle Magnusona (Magnuson, 1948). Na podložní sklo bylo nanášeno 3,5 µl boreliové suspenze a překryto krycím sklem o rozměrech 18 × 18 mm. Poté byl v temném poli optického mikroskopu (zvětšení 400×) spočítán počet borelií v 20ti zorných polích. Výsledný počet borelií v 1 ml byl pak vypočítán podle vzorce:

$$\text{počet bor./ml} = \underline{a} * 7,7 * 10^5$$

kde a znamená průměrný počet borelií ze 20ti zorných polí.

Borelie byly následně doředy do potřebné koncentrace.

#### 3.3. Infekce klíšťat sáním na infikovaných myších

##### 3.3.1. Infekce myší

Pro infekci klíšťat bylo použito 8 inbredních myší kmene C3H/HeN, které byly infikovány boreliemi *Bbss* kmene CB53, 11tá pasáž. Každá myš byla subkutánně (s.c.)



infikována 20 $\mu$ l boreliové suspenze, která obsahovala  $1 \times 10^5$  borelií. Aby se infekce v myších rozvinula, byly ponechány 1 měsíc ve zvířinci Parazitologického ústavu AV ČR. Poté byla provedena vlastní infekce klíšťat.

### 3.3.2. Infekce klíšťat

Klíšťata *Ixodes ricinus* z chovu Parazitologického ústavu AV ČR byla umístěna do kloboučků připevněných na hřbet infikovaných myší. Zde byly ponechány do plného nasátí. Na 5 myší byly nasazeny larvy v počtu přibližně 100 larev na myš. Na zbylé tři myši byly nasazeny nymfy v počtu přibližně 20 nymf na myš. Po nasátí byla klíšťata uchovávána v Parazitologickém ústavu AV ČR při teplotě 25 °C a relativní vlhkosti vzduchu 80 % až do metamorfózy v nymfy či dospělce. Poté byla u reprezentativního vzorku klíšťat zkontrolována přítomnost boreliové DNA pomocí real-time PCR.

## **3.4. Dynamika přenosu borelií v závislosti na době sání**

### 3.4.1. Design pokusu

Pro vlastní pokus bylo použito 20 inbredních myší kmene C3H/HeN. Ty byly rozděleny do pěti skupin po čtyřech myších. Každá z pěti skupin představovala jeden časový interval. Na každou myš bylo do kloboučku nasazeno 12 nymf (promořenost 50 %), a to v intervalech -48, -16, -8, -4 a -2 hodiny. Poté v čase 0 byly nymfy ze všech myší odebrány. Tyto myši byly měsíc ponechány ve zvířinci Parazitologického ústavu AV ČR pro rozvoj infekce a poté byla provedena pitva. Pokus byl proveden dvakrát s časovým odstupem tří měsíců.

### 3.4.2. Pitva myší

Po měsíci byla provedena pitva myší. Myši byly nejprve uspány etherem, poté byly vykrveny a byly jim odebrány jednotlivé orgány: močový měchýř, srdce, kotník (tibiotarsus). Orgány byly zváženy a poté byla pomocí real-time PCR zkoumána přítomnost boreliové DNA. Přítomnost protilátek proti boreliím v krvi byla zkoumána metodou ELISA.

### 3.4.3. ELISA

Z myších krví byla připravena séra. Ta byla poté metodou ELISA zkoumána na přítomnost protilátek proti boreliím. Na dno jamek mikrotitračního panelu byl navázán boreliový antigen o koncentraci 10  $\mu$ g/ml ve vazebném roztoku (1,59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 2,93 g

NaHCO<sub>3</sub> v 1 litru H<sub>2</sub>O, pH 9,6). Mikrotitrační panel byl inkubován ve vlhké komůrce 24 hodin při teplotě 4 °C. Poté byly nespecifické vazby vyblokovány blokovacím pufrům (5% PTS v PBS). Po promytí byla přidána testovaná myščí séra, pozitivní a negativní kontrola (normální myščí sérum), vše ředěno 1:100. Po inkubaci (45 min. při 37 °C) byl panel opět promyt a byla přidána antimyšší protilátka značená peroxidázou ředěná 1:1000. Následovala další inkubace a promytí. Nakonec byla vyvolána enzymatická reakce přidáním substrátového roztoku (10 ml fosfocitrátového pufru, 4 mg OPD, 4 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Reakce byla přibližně po deseti minutách zastavená 2M kyselinou sírovou. Absorbance byla změřena na vertikálním spektrofotometru (Multiskan MCC 340, Labsystems Oy) při vlnové délce 490 nm.

#### 3.4.4. Izolace DNA

Izolace DNA z kloubů, srdcí a močových měchýřů byla provedena pomocí High Pure Template Preparation kit (Roche). Jednotlivé orgány, vyjma kloubů, byly rozkrájeny na menší kousky a bylo k nim přidáno 200 µl T<sub>1</sub> pufru a 40 µl proteinázy K. Ke kloubům byla pro snadnější rozložení přidána kolagenáza (ředěná 1:100). Poté byly orgány inkubovány 4,5 hod při 56 °C. Další postup izolace byl proveden podle návodu dodaného výrobcem. Vyizolovaná DNA byla uložena do mrazáku a poté byla testována pomocí real-time PCR na přítomnost boreliové DNA.

#### 3.4.5. Real-time PCR.

Pro amplifikaci byl vybrán úsek genu kódujícího flagelin o délce 69 bází. Amplifikace probíhala v přístroji Rotor-gene (Corbett Research). Reakce byla prováděna v triplicacích, tzn. každý vzorek i kalibrační vzorky byly vždy dány do tří mikrozkušavek. Jako negativní kontrola byla použita MiliQ voda. Pro kalibrační vzorky byla použita DNA izolovaná ze známého počtu borelií z kultury, ředěná desítkovou řadou. Reakční objem byl 20 µl : 16 µl reakční směsí + 4 µl DNA.

##### Složení reakční směsi (16 µl):

- 10,1 µl MiliQ H<sub>2</sub>O
- 2 µl pufru (TaKaRa)
- 1,6 µl směsi nukleotidů (TaKaRa)
- 1 µl + 1 µl primerů (Generi-Biotech)
- 0,2 µl sondy (Generi-Biotech)
- 0,1 µl Taq DNA polymerázy (TaKaRa)

Sekvence použitých primerů a sondy byla následující (Pahl et al. 1999):

FlagF : 5' - TCT TTT CTC TGG TGA GGG AGC T - 3'

FlagR : 5' - TCC TTC CTG TTG AAC ACC CTC T - 3'

Sonda : 5' FAM - AAA CTG CTC AGG CTG CAC CGG TTC- BHQ 3'

Každá reakce měla celkem 45 cyklů o dvou fázích. První fáze probíhala 15 sekund při 95 °C a druhá fáze po dobu 60 sekund při 60 °C.

Hodnoty naměřené pomocí real-time PCR byly zpracovány a zaneseny do grafu jako počet spirochet na miligram tkáně.

### **3.5. Dynamika migrace borelií v klíštěti v závislosti na době sání**

#### 3.5.1. Design pokusu

Pro tento pokus bylo použito 25 dospělých samic *Ixodes ricinus*, které byly získány sáním na myši infikované *Bbss* (promořenost cca 50 %). Samice byly nasypány do kloboučku morčete a v intervalech 6, 12, 24 a 48 hodin bylo vždy pět přisátých samic odebráno a provedena pitva. Poslední skupinu tvořilo pět samic, které na morčeti nesály, ty představovaly interval 0.

#### 3.5.2. Pitva klíšťat

Okamžitě po odstranění klíšťat z morčete byla provedena pitva. Samice byly připevněny do Petriho misky s voskem a byly z nich vypreparovány slinné žlázy a střevo. Ty byly vloženy do 30 µl PBS (fosfátový pufr) a uschovány v mrazáku. Poté z nich byla vyizolována DNA.

#### 3.5.3. Izolace DNA

K izolaci slinných žláz a střev byl použit DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). Postup izolace byl proveden podle návodu dodaného výrobcem. Inkubace v lyzačním pufru probíhala 2,5 hodiny. Získaná DNA byla stejně jako v předchozím případě uložena do mrazáku a poté byla pomocí real-time PCR detekována přítomnost borelií v jednotlivých klíštěcích orgánech.

#### 3.5.4. Real-time PCR

Reakce byla prováděna stejně jako v předchozím pokusu (viz 3.4.5.)

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Dynamika přenosu borelií v závislosti na době sání.

V tomto pokuse byl zkoumán vliv doby sání klíšťat na přenos borelií na hostitele. Postup pokusu je popsán v kapitole 3.4. Úspěšnost sání klíšťat v jednotlivých intervalech ukazuje Tabulka 1.

2 hodiny		4 hodiny		8 hodin		16 hodin		48 hodin	
myš	přísátá klíšťata	myš	přísátá klíšťata	myš	přísátá klíšťata	myš	přísátá klíšťata	myš	přísátá klíšťata
1.	5	9.	4	17.	3	25.	5	33.	10
2.	3	10.	6	18.	2	26.	6	34.	4
3.	3	11.	1	19.	2	27.	2	35.	11
4.	2	12.	1	20.	7	28.	6	36.	12
5.	3	13.	6	21.	11	29.	11	37.	7
6.	7	14.	7	22.	8	30.	2	38.	10
7.	1	15.	8	23.	8	31.	9	39.	9
8.	9	16.	3	24.	1	32.	11	40.	12

Tab. 1: Úspěšnost sání klíšťat v jednotlivých intervalech. Na každou myš bylo nasazeno 12 nymf.

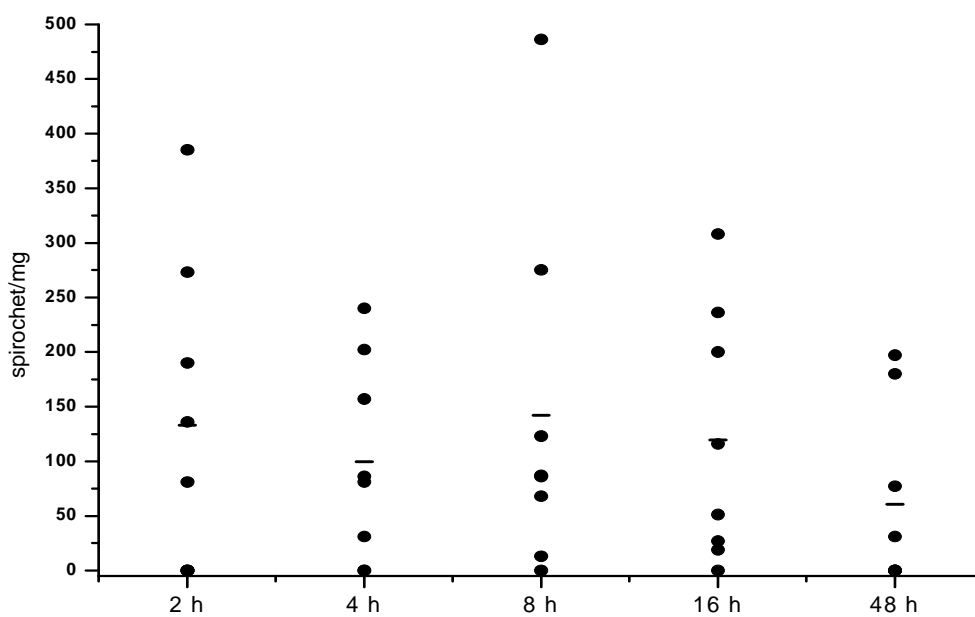
Množství borelií ve tkáních izolovaných z myší bylo na hranici detekovatelnosti pomocí konvenční PCR, proto byla pro detekci zvolena citlivější real-time q-PCR. Výsledky q-PCR shrnuje Tabulka 2. Přítomnost boreliové DNA byla prokázána u všech zkoumaných myší. Nejčastěji byly borelie přítomny v močovém měchýři a srdci a nejméně v kloubech. Infikováno bylo 30 močových měchýřů, 29 srdcí a 22 kloubů.

Průměrný počet borelií v močových měchýřích se pohyboval od 61 do 142 spirochet na mg tkáně, v srdcích od 48 do 144 spirochet na mg tkáně a v kloubech 5 do 42 spirochet na mg tkáně. Přesný počet borelií v jednotlivých orgánech zkoumaných myší ukazují Grafy 1, 2 a 3. Podíl infekce jednotlivých orgánů na celkové infekci myší v jednotlivých intervalech znázorňuje Graf 4. Počet přisátých klíšťat neměl na infekci myší vliv.

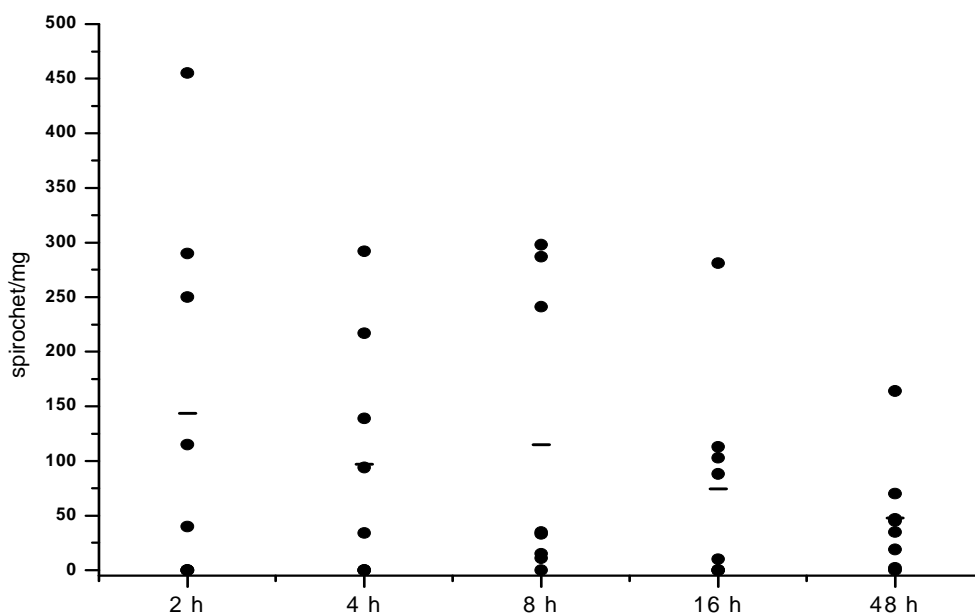
Séra pokusných myší zkoumaná metodou ELISA na přítomnost specifických protilátek proti boreliím byla ve všech případech negativní.

Mvš	Moč. měchýř	Srdce	Kloub	Celkově
<b>2 hodin</b>				
1.	+	+	+	+
2.	+	+	+	+
3.	+	+	+	+
4.	+	+	+	+
5.	+	-	-	+
6.	-	+	-	+
7.	+	-	-	+
8.	-	-	+	+
<b>4 hodin</b>				
9.	+	+	+	+
10.	-	+	+	+
11.	+	+	+	+
12.	+	+	+	+
13.	+	-	+	+
14.	-	-	+	+
15.	+	-	-	+
16.	+	+	-	+
<b>8 hodin</b>				
17.	+	+	+	+
18.	+	+	-	+
19.	+	+	+	+
20.	+	+	+	+
21.	-	+	-	+
22.	+	+	-	+
23.	+	+	-	+
24.	+	-	-	+
<b>16 hodin</b>				
25.	+	+	+	+
26.	+	+	+	+
27.	+	+	+	+
28.	+	+	-	+
29.	+	-	-	+
30.	-	+	+	+
31.	+	-	-	+
32.	+	-	-	+
<b>48 hodin</b>				
33.	+	+	+	+
34.	+	+	+	+
35.	+	+	+	+
36.	+	+	-	+
37.	-	+	-	+
38.	-	-	+	+
39.	-	+	-	+
40.	-	+	-	+

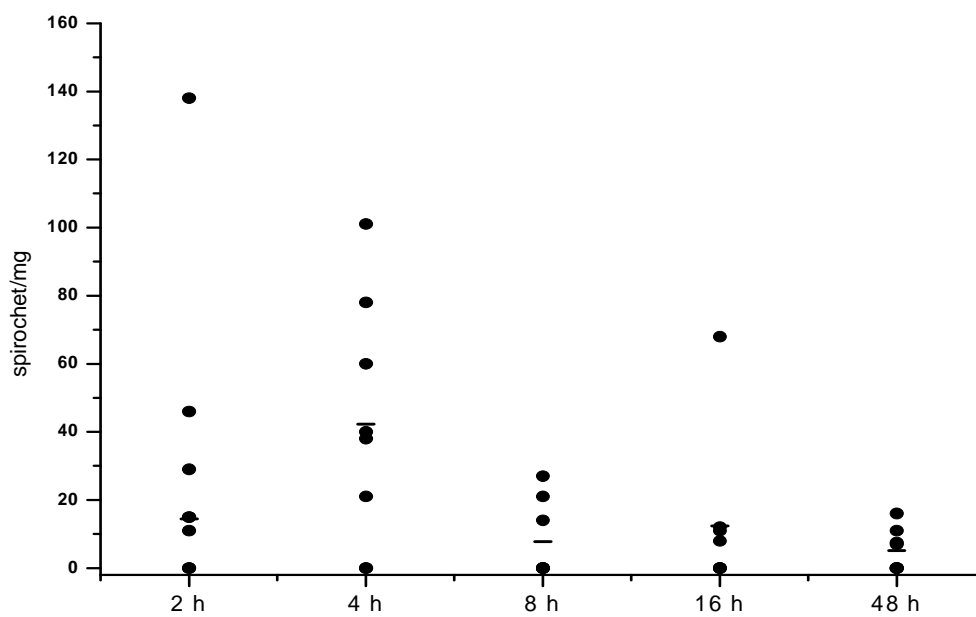
Tab. 2: Přítomnost boreliové DNA v jednotlivých myších orgánech a v myších celkově. (+)= borelie prokázány pomocí q-PCR, (-) = borelie neprokázány.



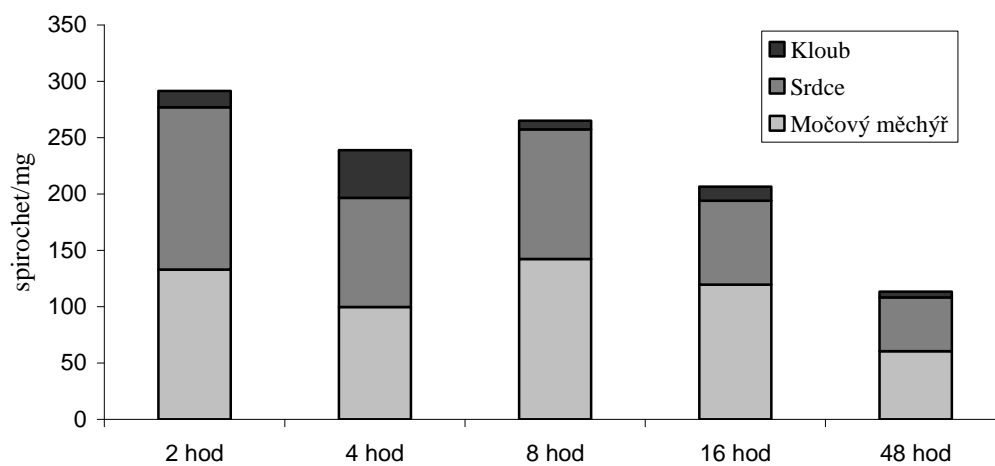
Graf 1 : Počet borelií v močových měchýřích jednotlivých myší v jednotlivých časových intervalech.



Graf 2 : Počet borelií v srdcích jednotlivých myší v jednotlivých časových intervalech.



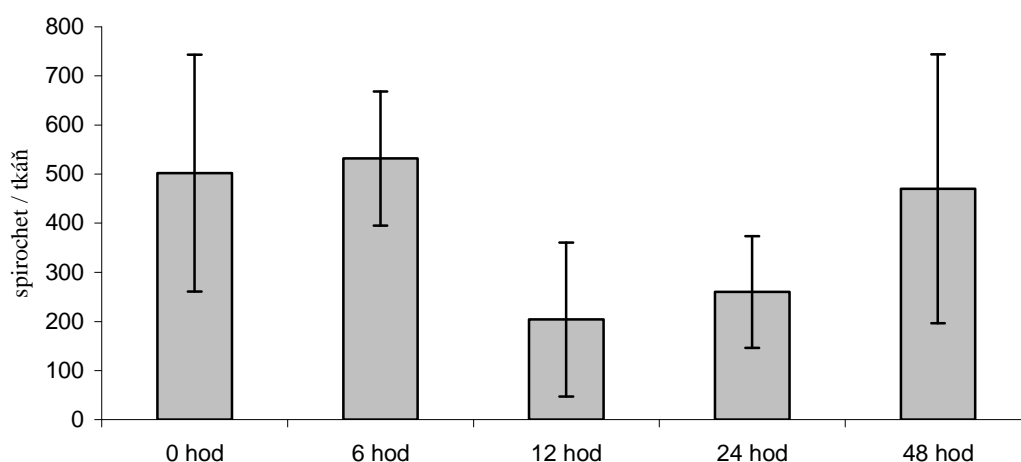
Graf 3 : Počet borelií v kloubech jednotlivých myší v jednotlivých časových intervalech.



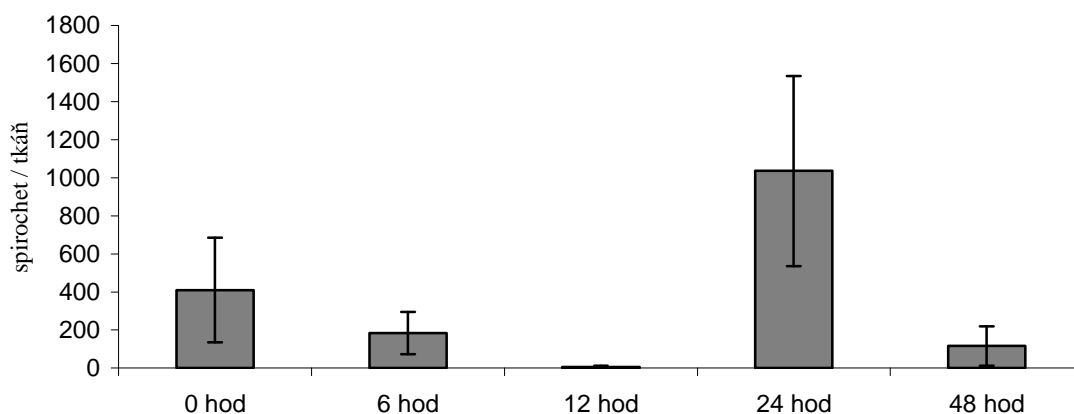
Graf 4 : Podíl infekce jednotlivých orgánů na celkové infekci myší v jednotlivých časových intervalech.

## 4.2. Dynamika migrace borelií v klíštěti v závislosti na době sání

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit přítomnost borelií ve střevech a slinných žlázách dospělých samic v závislosti na době sání. Průběh pokusu je zaznamenán v kapitole 3.5. Výsledky prokázaly přítomnost boreliové DNA ve slinných žlázách i střevě dospělců ve všech časových intervalech. Průměrný počet borelií ve slinných žlázách se pohyboval od 204 do 532, ve střevě potom od 6 do 1036. Celkově byl vyšší výskyt borelií ve slinných žlázách (Graf 1, Graf 2). Avšak střeva klíšťat nebyla před izolací zbavena nasáté krve, důsledkem čehož mohlo dojít k inhibici q-PCR vzorků střev.



Graf 5 : Přítomnost boreliové DNA ve slinných žlázách dospělců v jednotlivých intervalech od přisátí.



Graf 6 : Přítomnost boreliové DNA ve střevech dospělců v jednotlivých intervalech od přisátí.



## 5. DISKUSE

V současnosti je Lymeská borelióza nejčastějším členovci přenášeným onemocněním v Evropě a USA. Každým rokem stoupá i v našich podmínkách počet osob, které jsou tímto onemocněním nakaženy, přesto však neexistuje vakcína, která by nákaze zabránila. Jedinou prevencí je tak včasné odhalení klíštěte a jeho bezprostřední odstranění. Z těchto důvodů je v poslední době výzkumu borelií a jejich vektorů věnována velká pozornost.

Hlavním úkolem mé práce bylo prověřit dynamiku přenosu *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (kmen CB53) z evropského klíštěte *Ixodes ricinus* na hostitele. Téma práce bylo navrženo na základě předchozích výsledků Kateřiny Peržinové, která prováděla podobný experiment v rámci své Středoškolské odborné práce před dvěma roky (Peržinová 2008).

Výsledky mé práce se však od Kateřiny odlišují. Z výsledků je zřejmé, že pomocí q-PCR byla prokázána přítomnost boreliové DNA alespoň v jedné ze tří zkoumaných tkání u všech myší ve všech časových intervalech, což znamená, že přenos *Borrelia burgdorferi* sensu stricto na hostitele byl u všech myší úspěšný. Peržinová ve své práci zaznamenala přenos borelií nejdříve po šesti hodinách, kdy byla nakažena jedna myš ze tří v intervalu, úspěšná infekce všech tří zkoumaných myší v intervalu nastala až po 29 a 60 hodinách. Při sání klíšťat po dobu dvou hodin však přenos borelií na myš nezaznamenala.

Tyto odlišné výsledky by mohly být způsobeny rozdílným způsobem infekce klíšťat. V naší práci byly infekční nymfy získány sáním larev *Ixodes ricinus* na myši infikované *Bbss* (kmen CB53), což je přirozený způsob infekce klíšťat v přírodě. Peržinová naopak získala infekční nymfy ponořením larev do boreliové kultury. Dalším důvodem, proč Kateřina ve svém experimentu nezaznamenala přítomnost boreliové DNA v časných intervalech, by mohl být velmi nízký počet těchto spirochet. Z vlastních zkušeností jsme zjistili, že množství boreliové DNA ve tkáních myší je u tohoto typu pokusů na hranici detekovatelnosti pomocí konvenční PCR. Je tedy možné, že i v předchozím pokuse Kateřiny Peržinové byly borelie ve tkáních přítomny v intervalu 2 hodin, avšak klasická PCR je nebyla schopna zachytit, tak jako tomu bylo v našem případě.

Součástí této práce bylo také zjistit, jaký je průběh diseminace borelií, konkrétně *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (kmen CB53) v evropském klíštěti *Ixodes ricinus* v závislosti na době sání.

Detailně je tato problematika popsána u amerického klíštěte *Ixodes scapularis*. U tohoto klíštěte jsou borelie primárně přítomny ve střevě, kde v počáteční fázi sání

klíštěte dojde k jejich aktivaci. Přesun spirochet do slinných žláz nastává po 48 hodinách sání (De Silva et al. 1995). Tato doba je také pokládána za nejkratší časový interval nutný pro přesnos borelií z *Ixodes scapularis* na hostitele (Piesman et al. 1987, Piesman 1993, des Vignes et al. 2001).

Naše výsledky ukazují, že tento model neplatí pro *Ixodes ricinus*. Z Grafu 5 je patrná přítomnost borelií ve slinných žlázách ve všech časových intervalech. Významný je zejména výskyt borelií ve slinných žlázách nenasátých klíšťat. Tyto výsledky korelují s dřívějšími studii prováděnými ve Švýcarsku, které také potvrdily přítomnost borelií z komplexu *Bbsl* ve slinných žlázách nenasátých klíšťat. Borelie byly přítomny ve slinných žlázách nymf (22%) i dospělců (36%) (Lebet et Gern 1996, Leuba-Garcia et al. 1994). Tento fakt podpírá výsledky z mého prvního Experimentu, které ukázaly, že přenos *Borrelia burgdorferi* sensu stricto z *Ixodes ricinus* na hostitele nastává již po dvou hodinách sání. Ačkoliv první Experiment byl prováděn s nymfami a druhý Experiment s dospělci, lze předpokládat, že rozložení borelií v jednotlivých orgánech je v obou vývojových stádiích totožné.

Časný přenos borelií na hostitele pozorovala i Crippová, která ukázala, že přenos *Borrelia afzelii* z *Ixodes ricinus* na hostitele nastává za méně než 48 hodin. V souvislosti s tímto hypotetizuje, že infekce *Borrelia afzelii* je systémová. Narozdíl od našich výsledků však neprokázala časný přenos *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (Crippa et al. 2002). Existuje však také teorie, že úspěšnost přenosu borelií kolísá mezi jednotlivými izoláty (Fingerle et al. 2002). V souvislosti s výše uvedenými fakty a hypotézami by mohly být výsledky Experimentu 2 popsány následujícím způsobem: Během prvních dvou intervalů je přítomnost borelií ve slinných žlázách vyšší, jelikož ještě nenastal přenos do hostitele (čas 0) nebo byl jen částečný (interval 2 h), v následujících intervalech 8 a 16 hodin nastal větší přenos borelií do hostitele, důsledkem čehož pokleslo jejich množství ve slinných žlázách, v intervalu 48 hodin však do slinných žláz domigrovaly aktivované borelie ze střeva, což mělo za následek opětovné zvýšení jejich počtu ve slinných žlázách. Celkově nižší přítomnost borelií ve střevech oproti slinným žlázám by mohla být způsobena inhibicí real-time PCR krví z nasátých klíšťat, která nebyla před izolací DNA vymyta.

Druhý Experiment bude v dohledné době zopakován pro verifikaci dosažených výsledků.

## 6. ZÁVĚR

- Byla prokázána přítomnost boreliové DNA v orgánech všech myší ze všech zkoumaných časových intervalů. Spirochety byly tedy úspěšně přeneseny na hostitele již po dvou hodinách sání.
  
- Byla prokázána přítomnost boreliové DNA ve slinných žlázách i střevech dospělců ze všech časových intervalů.

## 7. SEZNAM ZKRATEK

AV ČR	Akademie věd České republiky
BBK	Fibronectin binding protein, fibronektin vázající protein
Bbsl	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato
Bbss	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto
Bp	párů bází
BSK-H	Barbour-Stoenner-Kelly-H medium
C3H/HeN	kmen myši
CB 53	označení kmene <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto
CRASP	complement regulator-acquiring surface protein
Dbp	decorin binding protein, dekorin vázající protein
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
DTH	delayed type hypersensitivity, oddálený typ přecitlivělosti
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay, imunoenzymatická metoda
EM	erythema migrans
Erp	OspE/F related protein
IFN	interferon
IL	interleukin
lp	lineární plazmid
MAC	membrane attack komplex, membrány atakující komplex
NK	nukleové kyseliny
Osp	outer surface protein, vnější povrchový protein
PBS	phosphate-buffered saline, fosfáty pufovaný fyziologický roztok
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
s. c.	sub cutis, podkožní aplikace
SAT	saliva-activated transmission, slinami aktivovaný přenos
SGE	salivary gland extrakt, extrakt ze slinných žláz
SPF	specific pathogen free, označení laboratorních myši
TAE	TRIS-acetátový-EDTA pufr
Taq	označení polymerázy z bakterie <i>Thermus aquaticus</i>
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor, faktor nekrotizující nádory
TROSPA	tick receptor for OspA
Vls	variable major protein-like sequence

## 8. CITOVANÁ LITERATURA

**Allen, J.R.** (1973) Tick resistance: basophils in skin reactions of resistant guinea pigs. *Int. J. Parasitol.* 3, 195-200

**Anguita, J., Ramamoorthi, N., Hovius, J.W., Das, S., Thomas, V., Persinski R., Conze, D., Askenase, P., Rincón, M., Kantor, F.** (2002) Salp 15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation. *Immunity* 16, 849-859

**Barbour, A.G., Fish, D.** (1993) The biological and social phenomenon of Lyme disease. *Science.* 260, 1610-1616

**Barbour, A.G., Hayes, S.F.** (1986) Biology of *Borrelia* species. *Microbiol. Rev.* 50, 381-400

**Barranton, G., Postic, D., Saint Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J. C., Assous, M. and Grimont, P.A.D.** (1992) Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *Borrelia garinii* sp. nov.: and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 142, 378-383

**Bartůněk, P. a kol.** (2006) Lymeská borrelióza, 3. vydání: Praha: Grada Publishing. 128 s.

**Bergman, D.K.** (1996) Mouthparts and feeding mechanisms of hematophagous arthropods, pp. 31–61 in S.K. Wikel (Eds): The Immunology of Host–Ectoparasitic Arthropod Relationship. Cab International, Wallingford (UK)

**Brossard, M., Wikel, S.K.** (1997) Immunology of interactions between ticks and hosts. *Med. Vet. Entomol.* 11, 270-276

**Brown, C.R., Blaho, V.A., Loiacono, C.M.** (2003) Susceptibility to experimental Lyme arthritis correlates with KC and monocyte chemoattractant protein-1 production in joints and requires neutrophil recruitment via CXCR2. *J. Immunol.* 171, 893-901

**Caimano, M.J., Eggers, C.H., Gonzalez, C.A., Radolf, J.D.** (2005) Alternate sigma factor RpoS is required for the in vivo-specific repression of *Borrelia burgdorferi* plasmid lp54-borne *ospA* and lp6.6 genes. *J. Bacteriol.* 187, 7845–7852

**Caimano, M.J., Iyer, R., Eggers, C.H., Gonzalez, C., Morton, E.A., Gilbert, M.A., Schwartz, I., Radolf, J.D.** (2007) Analysis of the RpoS regulon in *Borrelia burgdorferi* in response to mammalian host signals provides insight into RpoS function during the enzootic cycle. *Mol. Microbiol.* 65, 1193-1217

**Canica, M.M., Nato, F., Du Merle, I., Mazie, J.C., Barranton, G. and Postic, D.** (1993) Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestation of Lyme borreliosis. *Scandinavian J. Infect.Diseas.* 25, 441-448

- Casjens, S., Palmer, N., van Vugt, R., Huang, W.M., Stevenson, B., Rosa, P., Lathigra, R., Sutton, G., Peterson, J., Dodson, R.J., Haft, D., Jockey, 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*. *Mol. Microbiol.* 35, 490-516
- Crippa, M., Rais, O. and Gern, L.** (2002) Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2, 3-9
- Danielová, V., Rudenko, N., Daniel, M., Holubová, J., Materna, J., Golovchenko, M., Schwarzová, L.** (2006) Extension of *Ixodes ricinus* ticks and agents of tick-borne diseases to mountain areas in the Czech Republic. *Internat J. Med. Microbiol.* 296 Suppl 40, 48-53
- de Silva, A.M., Fikrig, E.** (1995) Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks during blood feeding. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53, 397-404.
- de Silva, A.M., Tyson, K.R., Pal, U.** (2009) Molecular characterization of the tick-*Borrelia* interface. *Front. Biosci.* 14, 3051-3063
- des Vignes, F., Piesman, J., Heffernan, R., Schulze, T.L., Stafford III, K.C., Fish, D.** (2001) Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymph. *J. Infect. Dis.* 183, 773-778
- Duray, P.H., Steere, A.C.** (1988) Clinical pathologic correlations of Lyme disease by stage *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 539, 65-79
- Ferreira, B.R., Silva, J.S.** (1999) Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. *Immunol* 96, 434-439
- Fingerle, V., Rauser, S., Hammer, B., Kahl, O., Heimerl, C., Schulte-Spechtel, U., Gern, L., Wilske, B.** (2002) Dynamic of dissemination and outer surface protein expression of different European *Borrelia burgdorferi* sensu lato in artificially infected *Ixodes ricinus* nymphs. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1456-1463
- Fraser, C.M., Casjens, S., Huang, W.M., Sutton, G.G., Clayton, R., Lathigra, R., et al.** (1997) Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390, 580-586
- Fukunaga, M., Hamase, A., Okada, K., Nakao, M.** (1996) *Borrelia tanukii* Sp. Nov. and *Borrelia turdae* Sp. Nov. found from ixodid ticks in Japan: Rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiol. and Immunol.* 40, 877-881
- Ge, Y., Li, Ch., Corum, L., Slaughter, C.A., Charon, N.W.** (1998) Structure and expression of the FlaA periplasmic flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* 180, 2418-2425
- Gern, L., Humair, P.F.** (2002) Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. In Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control. O. Kahl, J.S. Gray, R.S. Lane, and G. Stanek, editor. CABI Publishing. Oxford, United Kingdom. 149-174

- Gilmore, R.D., Jr., Piesman, J.** (2000) Inhibition of *Borrelia burgdorferi* migration from the midgut to the salivary glands following feeding ticks on OspC-immunized mice. *Infect. Immun.* 68, 411-414
- Goldstein, S.F., Buttle, K.F., Charon, N.W.** (1996) Structural analysis of the *Leptospiraceae* and *Borrelia burgdorferi* by high-voltage electron microscopy. *J. Bacteriol.* 22, 6539-6545
- Gray, J., Kahl, O., Lane, R.S., Stanek, G.** (2002) Lyme borreliosis, biology, epidemiology and control. Wallingford: CABI Publishing. 347 s
- Haake, D.A.** (2000) Spirochetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiol.* 146, 1491-1504
- Hajnická, V., Kocáková, P., Slovák, M., Labuda, M., Fuchsberger, N., Nuttal, P.A.** (2000) Inhibition of antiviral action of interferon by tick salivary gland extract. *Parasite Immunol.* 22, 201-206
- Hellwage, J., Meri, T., Heikkilä, T., Alitalo, A., Panelius, J., Lahdenne, P., Seppälä, I.J., Meri, S.** (2001) The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *J. Biol. Chem.* 276, 8427-8435
- Hischfeld, M., Kirchning, C.J., Schwandner, R., et al.** (1999) Cutting edge: Inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by Toll-like receptor. *J. Immunol.* 163, 2382-2386
- Hodzic, E., Feng, S., Freet, K.J., Borjesson, D.L., Barthold, S.W.** (2002) *Borrelia burgdorferi* population kinetics and selected gene expression at the host-vector interface. *Infect. Immun.* 70, 3382-3388
- Hovius, J.W.R., van Dam, A.P., Fikrig, E.** (2007) Tick- host-pathogen interactions in Lyme borreliosis, *Trends Parasitol.* 23, 434-438
- Hovius, J.W., Schuijt, T.J., de Groot, K.A., Roelofs, J.J., Oei, G.A., Marquart, J.A., de Beer, R., van 't Veer, C., van der Poll, T., Ramamoorthi, N., Fikrig, E., van Dam, A.P.** (2008) Preferential protection of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by a Salp15 homologue in *Ixodes ricinus* saliva. *J. Infect. Dis.* 198, 1189-1197
- Johnson, R.C., Schmid, G.P., Hyde, P.W., Stiegerwalt, A.G., Brenner, D.J.** (1984) *Borrelia burgdorferi* sp. nov. :Etiologic agent of Lyme disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34, 496-497
- Jones, L.D., Davies, C.R., Steele, G.M., Nuttall, P.A.** (1987) A novel mode of arbovirus transmission involving a nonviremic host. *Science* 237, 775-777
- Jones, L.D., Hodgson, E., Nuttall, P.A.** (1989) Enhancement of virus transmission by tick salivary glands. *J. Gen. Virol.* 70, 1895-1898
- Kawabata, H., Masuzawa, T., Yanagihara, Y.** (1993) Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol. Immunol.* 37, 843-848

**Kočí, J., Derdáková, M., Peterková, K., Kazimírová, M., Selyemová, D., Labuda, M.** (2006) *Borrelia afzelii* gene expression in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 6, 296-304

**Kopecný, J., Kuthejlová, M.**(1998) Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanism of natural immunity in vitro. *Parasite Immunol.* 20,169-174

**Kopecný, J., Kuthejlová, M., Pechová, J.**(1999) Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon- $\gamma$  by the upregulation of interleukin-10. *Parasite Immunol.* 21, 351-356

**Kotsyfakis, M., Sá-Nunes, A., Francischetti, I.M., Mather, T.N., Andersen, J.F.** (2006) Antiinflammatory and immunosuppressive activity of Sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.* 36, 26298-26307

**Kotsyfakis, M., Karim, S., Andersen, J.F., Mather, T.N., Ribeiro, J.M.** (2007) Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.* 40, 29256-29262

**Kovář, L., Kopecný, J., Říhová, B.**(2002) Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick modulates the host immune response towards the Th2 cytokine profile. *Parasitol. Res.* 88, 1066-1072

**Kraiczy, P., Hartmann, K., Hellwage, J., Skerka, C., Kirschfink, M., Brade, V., Zipfel, P.F., Wallich, R., Stevenson, B.** (2004a) Immunological characterization of the complement regulator factor H-binding CRASP and Erp proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Int. J. Med. Microbiol.* 293 Suppl 37, 152-157

**Kraiczy, P., Hellwage, J., Skerka, C., Becker, H., Kirschfink, M., Simon, M.M., Brade, V., Zipfel, P.F., Wallich, R.** (2004b): Complement resistance of *Borrelia burgdorferi* correlates with the expression of Bb CRASP-1, a novel linear plasmid-encoded surface protein that interacts with human factor H and FHL-1 and is unrelated to Erp proteins. *J. Biol. Chem.* 279, 2421-2429

**Kročová, Z., Macela, A., Hernychová, L., Kroča, M., Pechová, J., Kopecný, J.** (2003) Tick salivary extract accelerates proliferation of *Francisella tularensis* in the host. *J. Parasitol.* 89, 14-20

**Kuthejlová, M., Kopecný, J., Štěpánová, G., Macela, A.**(2001) Tick salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelii* spirochetes by mouse macrophages. *Infect. Immun.* 69, 575-578

**Kurtenbach, K., De Michelis, S., Etti, S., Schafer, S.M., Sewell, H.S., Brade, V., Kraiczy, P.** (2002). Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato – the key role of host complement. *Trends. Microbiol.* 10, 74–79

**Kurtenbach, K., Sewell, H.S., Ogden, N.H., Randolph, S.E., Nutkal, P.A.** (1998) Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. *Infect. Immun.* 66, 1248-1251



- Kýčková, K., Kopecký, J.** (2006) Effect of tick saliva on mechanisms of innate immune response against *Borrelia afzelii*. *J. Med. Entomol.* 43, 1208-14
- Labuda, M., Jones, L.D., Williams, T., Nuttall, P.A.** (1993b) Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts. *Med. Vet. Entomol.* 7, 193-196
- Labuda, M., Danielová, V., Jones, L.D., Nuttall, P.A.** (1993a) Amplification of tick-borne encephalitis virus infection during co-feeding of ticks. *Med. Vet. Entomol.* 7, 339-342
- Lawrie, C.H., Sim, R.B., Nuttall, P.A.** (2005) Investigation of the mechanisms of anti-complement activity in *Ixodes ricinus* ticks. *Mol. Immunol.* 42, 31-38
- Lawrie, C.H., Uzategui, N.Y., Gould, E.A., Nuttall, P.A.** (2004) Ixodid and argasid tick species and west nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 653-657
- Lebet, N., Gern, L.** (1994) Histological examination of *Borrelia burgdorferi* infections in unfed *Ixodes ricinus* nymphs. *Exp. Appl. Acarol.* 18, 177-183.
- Leboulle, G., Crippa, M., Decrem, Y., Mejri, N., Brossard, M., Bollen, A., Godfroid, E.** (2002) Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *J. Biol. Chem.* 277,10083-10089
- Le Fleche, A., Postic, D., Girardet, K., Peter, O., Baranton, G.** (1997) Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 921-5
- Leuba-Garcia, S., Kramer, M.D., Wallich, R., Gern, L.** (1994) Characterization of *Borrelia burgdorferi* isolated from different organs of *Ixodes ricinus* ticks collected in nature. *Zentbl. Bakteriol.* 280, 468-475
- Li, X., Neelakanta, G., Liu, X., Beck, D.S., Kantor, F.S., Fish, D., Anderson, J.F., Fikrig, E.** (2007) Role of outer surface protein D in the *Borrelia burgdorferi* life cycle. *Infect. Immun.* 75, 4237-4244
- Liang, F.T., Nelson, F.K., Fikrig, E.** (2002) Molecular adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the murine host. *J. Exp. Med.* 196, 275-280
- Liang, F.T., Yan, J., Mbow, M.L., Sviat, S.L., Gilmore, R.D., Mamula, M., Fikrig, E.** (2004) *Borrelia burgdorferi* changes its surface antigenic expression in response to host immune responses. *Infect. Immun.* 72, 5759-5767
- Macháčková, M., Oborník, M., Kopecký, J.** (2006) Effect of salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks on the proliferation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in vivo. *Folia Parasitol.* 53,153-158
- Magnuson, H.J., Eagle, H., Fleischman, R.** (1948) The Minimal Infectious Inoculum of *Spirochaeta pallida* (Nichols strain) and Consideration of Its Rate of Multiplication in vivo. *Am. J. Syph. Gonorrh. Ven. Dis.* 32, 1-18

- Marconi, R.T., Liveris, D., Schwartz I.** (1995) Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2427-34
- Masuzawa, T., Takada, N., Kudeken, M., Fukui, T., Yano, Y., Ishiguro, F., Kawamura, Y., Imai, Y., Ezaki, T.** (2001) *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. I. *J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1817-1824
- Meilon, H.A., Jaenson, T.G.T.** (1997) Questing behaviour of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 21, 747-754
- Miyamoto, K., Masuzawa, T.**(2002) Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Japan and East Asia. In Lyme Borreliosis : Biology, Epidemiology and Control pp.201-222. CABI International. Wallingford. Oxford, UK
- Morrison, T.B., Weis, J.H., Weis, J.J.** (1997) *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A (OspA) activates and primes human neutrophils. *J. Immunol.* 158, 4838-4845
- Motaleb, M. A., Corum, L., Bono, J. L., Elias, A. F., Rosa, P., Samuels, D. S., Charon, N. W.** (2000) *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 10899-10904.
- Neelakanta, G., Li, X., Pal, U., Liu, X., Beck, D.S., DePonte, K., Fish, D., Kantor, F.S., Fikrig, E.** (2007) Outer surface protein B is critical for *Borrelia burgdorferi* adherence and survival within Ixodes ticks. *PLoS Pathog.*, 3:e33.
- Nuttall, P.A., Jones, L.D., Labuda, M., Kaufman, W.R.** (1994) Adaptations of arboviruses to ticks. *J. Med. Entomol.* 31,1-9
- Oschmann, P., Kraiczy, P., Halperin, J., Brade, V.** (1999) Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis. UNI-MED, Bremen, Germany, pp. 16 - 17; 20 - 25; 30 - 34; 42 - 47
- Paesen, G.C., Adams, P.L., Nuttall, P.A., Stuart, D.L.** (2000) Tick histamine-binding proteins: lipocalins with a second binding cavity. *Biochem. Biophys. Acta.* 1482, 92-101
- Pahl, A., Kühlbrandt, U., Brune, K., Röllinghoff, M., Gessner, A.** (1999) Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 6, 1958-1963
- Pal, U., Li, X., Wang, T., Montgomery, R., Ramamoorthi, N., deSilva, A., Bao, F., Yang, X., Pypaert, M., Pradhan, D.** (2004) TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell* 119, 457-468
- Parola, P., Raoult, D.** (2001) Ticks and tick-borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin. Infect. Dis.* 32, 897-928.
- Pechová, J., Štěpánová, G., Kovář, L., Kopecký, J.** (2002) Tick salivary gland extract-activated transmission of *Borrelia afzelii* spirochaetes. *Folia Parasitol.* 49, 153-159

**Peržinová, K.** (2008) Přenos spirochet *Borrelia burgdorferi* sensu stricto klíštětem *Ixodes ricinus*. Středoškolská odborná činnost.

**Pfister, H.W., Wilske, B., Weber, K.** (1994) Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. *Lancet* 343, 1013-1016

**Piesman, J.** (1993) Dynamics of *Borrelia burgdorferi* transmission by nymphal *Ixodes dammini* ticks. *J. Infect. Dis.* 167, 1082–1085

**Piesman, J., Mather, T.N., Sinsky, R.J., Spielman, A.** (1987) Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *J. Clin. Microbiol.* 23, 557-558

**Postic, D., Ras, N.M., Lane, R.S., Hendson, M., Baranton, G.** (1998) Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *J. Clin. Microbiol.* 36, 3497-3504

**Prevot, P.P., Adam, B., Boudjeltia, K.Z., Brossard, M., Lins, L., et al.** (2006) Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *J. Biol. Chem.* 281, 26361-26369

**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

**Randolph, G.J., Furie, M.B.** (1995) A soluble gradient of endogenous monocyte chemoattractant protein-1 promotes the transendothelial migration of monocytes in vitro *J. Immunol.* 155,3610-3618

**Randolph, S.E., Green, R.M., Peacey, M.F. and Rogers, D.J.** (2000) Seasonal synchrony: the key to tick-borne encephalitis foci identified by satellite data. *Parasitol.* 121, 15-23

**Ribeiro, J.M.C., Weiss, J.J., Telford, S.R.III.** (1990) Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Exp. Parasitol.* 70, 382-388

**Ribeiro, J.M.C., Spielman, A.** (1986) *Ixodes dammini*:salivary anaphylatoxin inactivating activity. *Exp. Parasitol.* 70, 382-388

**Ribeiro, J.M.C.** (1995) How ticks make a living. *Parasitol. Today* 11, 91-93

**Richter, D., Schlee, D.B., Allgöwer, R., Matuschka, F.R.**(2004) Relationships of a Novel Lyme Disease Spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with Its Hosts in Central Europe. *App Environment Microbiol.* 6414-6419

**Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Oliver, J.H. Jr.** (2009a) *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato complex from the southeastern region of the United States. . *J. Clin. Microbiol.* 47,134-141

- Rudenko, N., Golovchenko, M., Lin, T., Gao, L., Grubhoffer, L., Oliver, J.H. Jr.** (2009b) Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, *Borrelia americana* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3875-3880
- Sato, Y., Nakao, M.** (1997) Transmission of the Lyme disease spirochaete, *Borrelia garinii*, between infected and uninfected *Ixodes persulcatus* during cofeeding on mice. *J. Parasitol.* 83, 547-550
- Seinost, G., Dykhuisen, D.E., Dattwyler, R.J., Golde, W.T., Dunn, J.J., Wang, I.N., Woemser, G.P., Schriefer, M.E. and Luft, R.J.** (1999) Four clones of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto cause invasive infection in human. *Infect. Immun.* 68, 3518-3524
- Schroeder, H., Daix, V., Gillet, L., Renaud, J.C., Vanderplasschen, A.** (2007) The paralogous salivary anti-complement proteins IRAC I and IRAC II encoded by *Ixodes ricinus* ticks have broad and complementary inhibitory activities against the complement of different host species. *Microbes Infect.* 9, 247-250
- Schwan, T.G.** (2003) Temporal regulation of outer surface proteins of the Lyme-disease spirochetes *Borrelia burgdorferi*. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 108-112
- Steere, A.C.** (1989) Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 321, 586-596
- Steere, A.C.** (2001) Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 345, 115-125
- Steere, A.C., Coburn, J., Glickstein, L.** (2004) The emergence of Lyme disease; *J. Clin. Invest.* 113, 1093-1101
- Steere, A.C., Schoen, R.T., Taylor, E.** (1987) The clinical evolution of Lyme arthritis. *Ann. Intern. Med.* 107, 725-731
- Valenzuela, J.G., Charlab, R., Mather, T.N., Ribeiro, J.M.** (2000) Purification, cloning, and expression of novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.* 275, 18717-18723
- Wang, G., Ma, Y., Buyuk, A., McClain, S., Weis, J.J., Schwartz, I.** (2004) Impaired host defense to infection and Toll-like 2 receptor independent killing of *Borrelia burgdorferi* clinical isolates in TLR 2-deficient C3H/HeJ mice. *FEMS Microbiol. Lett.* 231, 219-225
- Wang, G., van Dam, A.P., Le Fleche, A., Postic, D., Peter, O., Baranton, G., de Boer, R., Spanjaard, L., Dankert, J.** (1997) Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 926-32
- Wikel, S.K., Bergman, D.** (1997) Tick-host immunology: significant advances and challenging opportunities. *Parasitol. Today* 13, 383-389

- Wilske, B., Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U.** (2007) Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 49, 13-21
- Wolgemuth, C.W., Charon, N.W., Goldstein, S.F., Goldstein, R.E.** (2006) The flagellar cytoskeleton of the spirochetes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 11, 221-227
- Wooten, R.M., Ma, Y., Yoder, R.A., et al.** (2002) Toll-like receptor 2 is required for innate, but not acquired, host defense to *Borrelia burgdorferi*. *J. Immunol.* 168, 348-355
- Wooten, R.M., Ma, Y., Yoder, R.A., Brown, J.P., Weis, J.H., Zachary J.F., Kirschning C.J., Wies, J.J.** (2002) Toll-like receptor 2 is required for innate, but not acquired, host defense to *Borrelia burgdorferi*. *J. Immunol.* 168, 348-355
- Zeidner, N.S., Schneider, B.S., Nuncio, M.S., Gern, L., Piesman, J.** (2002) Coinoculation of *Borrelia* spp. with tick salivary gland lysate enhances spirochete load in mice and is tick species-specific. *J. Parasitol.* 88, 1276-1278
- Zhang, J.R., Noris, S.J.** (1998) Genetic variation of the *Borrelia burgdorferi* gene vlsE involves cassette-specific, segmental gene conversion. *Infect. Immun.* 66, 3698-3704
- Zhioua, E., Aeschlimann, A., Gern, L.** (1994) Infection of field-collected *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) larva with *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. *J. Med. Entomol.* 31, 763-766.