

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Vliv délky sání klíštěte *Ixodes ricinus* na přenos  
spirochéty *Borrelia afzelii***

Bakalářská práce

**Adéla Chlastáková**

Školitel: Prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

Konzultant: RNDr. Radek Šíma, Ph.D.

České Budějovice 2014

Chlastáková, A., 2014: Vliv délky sání klíštěte *Ixodes ricinus* na přenos spirochéty *Borrelia afzelii*. [Effect of *Ixodes ricinus* feeding duration on transmission of the spirochete *Borrelia afzelii*. Bc. Thesis, in Czech.] – 54 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

#### Anotace

Lyme borreliosis is a multisystem infectious disease caused by tick-borne spirochetes belonging to the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex. It is generally believed that if a tick is attached for less than 24 hours, infection is unlikely because it requires between 36 and 48 hours of attachment for *Borrelia burgdorferi* to travel from within the tick into its saliva. Nevertheless, there is evidence that transmission to a host may even occur in the early phases of tick feeding. We investigated the dynamics of *Borrelia afzelii* transmission by nymphal *Ixodes ricinus* ticks with special respect to the first day of tick attachment.

Tato práce byla financována z grantu GAČR 590/3154.

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 25. dubna 2014

.....

Adéla Chlastáková

## Poděkování

Na tomto místě bych chtěla předně poděkovat svému školiteli, prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc., za jeho cenné rady, pomoc při zpracování mé práce a za umožnění práce v laboratoři imunologie parazitóz. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Radku Šímovi, Ph.D. za velmi přínosné konzultace, RNDr. Heleně Langhansové, Ph.D. a Bc. Veronice Slavíkové za vstřícnost a ochotu vždy pomoci a v neposlední řadě také Honzovi Erhartovi za pomoc s nasazováním a vyjímáním klíšťat. Velký dík patří též mé rodině za jejich trpělivost a mému příteli za zájem a podporu v těžkých chvílích.

# OBSAH

1.	ÚVOD .....	1
2.	<b>PŘEHLED LITERATURY</b> .....	3
2.1.	Historický přehled .....	3
2.2.	Lymeská borelióza .....	4
2.2.1.	Symptomy .....	4
2.2.1.1.	Lokalizovaná infekce .....	5
2.2.1.2.	Diseminovaná infekce .....	5
2.2.1.3.	Persistentní infekce .....	7
2.2.1.4.	Syndrom po proběhlé lymeské borelióze .....	7
2.2.2.	Diagnostika .....	8
2.2.3.	Léčba .....	8
2.3.	Klíšťata .....	9
2.3.1.	Klíště obecné ( <i>Ixodes ricinus</i> ) .....	10
2.3.2.	Slinami aktivovaný přenos patogenů (SAT) .....	11
2.4.	Borelie .....	12
2.4.1.	Rod <i>Borrelia</i> .....	12
2.4.2.	Morfologie .....	13
2.4.3.	Genom .....	14
2.4.4.	Životní cyklus .....	15
3.	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	19
4.	<b>MATERIÁL A METODY</b> .....	20
4.1.	Myši .....	20
4.2.	Klíšťata .....	20
4.3.	Borelie .....	20
4.4.	Infekce nymf <i>Borrelia afzelii</i> .....	20
4.5.	Nasazování nymf na myši, jejich vyjímání a pitva myší .....	21
4.6.	Izolace DNA .....	22
4.6.1.	Izolace DNA z nymf <i>Ixodes ricinus</i> .....	22
4.6.2.	Izolace DNA z boreliové kultury (příprava pozitivní kontroly) .....	22
4.6.3.	Izolace DNA z myších orgánů .....	23
4.7.	Klasická PCR 1 .....	23
4.8.	Klasická PCR 2 .....	24
4.9.	Nested („zahnížděná“) PCR .....	24
4.10.	Agarózová gelová elektroforéza .....	25
5.	<b>VÝSLEDKY</b> .....	26

6.	<b>DISKUSE</b> .....	32
7.	<b>ZÁVĚR</b> .....	38
8.	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK</b> .....	39
9.	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	41

# 1. ÚVOD

Lymeská borelióza (LB) je nejčastějším členovci přenášeným onemocněním v Euroasii a v USA. Prokazatelně ji způsobují 3 genospecies spirochét náležící do komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) – *B. afzelii*, *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.) a *B. garinii*. Vektorem borelií jsou především klíšťata spadající do rodu *Ixodes* (Wang a kol. 1999). Vzhledem k tomu, že LB je multiorgánové onemocnění, vyznačuje se širokým spektrem symptomů kožními projevy, případně doprovázenými chřipkovými příznaky, počínaje a postižením srdce, nervové soustavy či kloubů konče (Murray a Shapiro 2010, Biesiada a kol. 2012).

Lymeská borelióza je léčitelná antibiotiky. I zde však platí, že čím dříve je zahájena antibiotická terapie, tím vyšší je pravděpodobnost úplného zotavení se z nemoci. Ne vždy je však včasná diagnostika LB, jež se také někdy díky šíří svých klinických příznaků označuje jako „nový velký imitátor“, možná (Wormser a kol. 2006, Aucott a kol. 2009).

Ačkoliv existuje mnoho kandidátních vakcín, založených mimo jiné na vnějších povrchových proteinech borelií či na proteinech klíštěte obsažených v jeho slinách, na trhu doposud žádná vakcína určená lidem dostupná není (Schuijt a kol. 2011). Jedinou vakcínou, která zatím úspěšně prošla fázemi I, II a III klinického testování a byla v roce 1998 ve Spojených státech schválena k užívání, zůstává být OspA vakcína LYMERix™. O 4 roky později byla nicméně tato očkovací látka, která po podání série 3 vakcinačních dávek poskytovala zhruba 80 % ochranu proti LB, z trhu stažena v důsledku obav veřejnosti z vedlejších účinků a s tím souvisejícím poklesem jejího prodeje (Nigrovic a Thompson 2007).

Jedinou ochranou před LB tedy zůstávají být taková preventivní opatření jako vyhýbání se oblastem s vysokým výskytem klíšťat, nošení světlého ochranného oblečení, užívání repelentních přípravků proti klíšťatům, modifikace krajiny za účelem snížení počtu klíšťat (kosení trávy, vyhrazení prostor pouze pro vysokou zvěř atd.) a včasné odstranění přisátého klíštěte dříve, než dojde k přenosu borelií (Wright a kol. 2012). Za jak dlouho od začátku sání klíštěte však tato transmise nastává?

Všeobecně rozšířeným přesvědčením založeným na několika studiích přenosu *B. burgdorferi* s.s. z amerických klíšťat *I. scapularis* či *I. pacificus* na myš je, že k transmisi borelií během prvních 24 hodin po přisátí klíštěte nedochází a pravděpodobnost přenosu se zvyšuje s rostoucí dobou sání. Maximální přenos borelií na hostitele pak nastává mezi 48. a

72. hodinou (Piesman 1993, Shih a Spielman 1993, Peavey a Lane 1995, des Vignes a kol. 2001, Ohnishi a kol. 2001, Piesman a Schneider 2002, Hojgaard a kol. 2008). Objevily se však i studie tvrdící, že k přenosu *B. burgdorferi* s.l. na hlodavce může dojít během prvních 24 hodin sání klíštěte (Piesman a kol. 1987, Alekseev a kol. 1996, Kahl a kol. 1998, Crippa a kol. 2002).

Kateřina Peržinová v rámci Středoškolské odborné činnosti dospěla k závěru, že k přenosu *B. burgdorferi* s.s. z nymf *I. ricinus* na myš může dojít již za 6 hodin po přisátí klíštěte (Peržinová 2008). Stejná problematika byla tématem bakalářské práce Jany Páleníkové, která zaznamenala transmissi *B. burgdorferi* s.s. dokonce po pouhých dvou hodinách sání a taktéž prokázala přítomnost borelií ve slinných žlázách nenasátých klíšťat (Páleníková 2010). Je zřejmé, že při podobné rychlosti přenosu by se i včasné odstranění přisátého klíštěte mohlo minout účinkem.

Mně byla tato práce, jež též řeší dynamiku přenosu borelií ze sajícího klíštěte na hostitele, zadána za účelem buď potvrdit, anebo vyvrátit výsledky Kateřiny a Jany, a tak aspoň trochu přispět k vyjasnění nesrovnalostí s tímto tématem spojených.

## 2. PŘEHLED LITERATURY

### 2.1. Historický přehled

V letech 1764 a 1771 navštívil Rev. Dr. John Walker souostroví Hebridy za účelem zjišťování jejich ekonomického potenciálu. Ve své zprávě uvádí, že na ostrově Jura žije velký počet ochrnutých lidí v důsledku onemocnění rozšířeného v této oblasti. Vzhledem k tomu, že dále charakterizuje jak symptomy nemoci, tak i vektora samotného, zřejmě se jedná o první detailní popis lymeské boreliózy (Summerton 1995).

Evropské studie vydávané na konci 19. a na počátku 20. století popisují kožní manifestace LB včetně rozšiřující se kruhovitě léze objevující se po kousnutí infikovaným klíštětem – erythema chronicum migrans (ECM) (Afzelius 1921). Ve 20. letech 20. století začínají být dále rozpoznávány neurologické problémy následující po vystavení klíštěti (Garin a Bujadoux 1993).

Úplný popis symptomů LB byl nicméně získán až po vypuknutí epidemie oligoartikulární formy artritidy ve východním Connecticutu, kdy nejvyšší nárůst případů byl pozorován v létě a na počátku podzimu. Bylo studováno 39 dětí a 12 dospělých ze tří connecticutských měst, u nichž se vyvinula nemoc charakterizovaná asymetrickými otoky a bolestí několika velkých kloubů, obzvláště kolen. 25 % pacientů navíc zaznamenalo rozšiřující se červenou kruhovitou lézi, jež předcházela nástupu artritických symptomů a jejíž popis odpovídal ECM. Jak sérologické testy, tak i kultivace synovia a synoviální tekutiny neodhalily v tehdejší době známé agens artritidy, a proto se dospělo k závěru, že nemoc je způsobena doposud neobjeveným původcem, který je přenášen členovcem (Steere a kol. 1977a). Protože dvě ze tří zkoumaných měst se jmenovaly Lyme a Old Lyme, bylo onemocnění pojmenované jako lymeská artritida. Jak však přibývaly stále další symptomy (nevolnost, únava, bolest hlavy a zad, neurologické potíže atd.), byl název změněn na lymeskou nemoc (Steere a kol. 1977b).

Předpoklad, že lymeská borelióza je přenášena klíštětem, vedl ke studiu klíšťat *Ixodes scapularis* nasbíraných během roku 1977 v oblasti východně od řeky Connecticut, kde byla zaznamenána vysoká incidence ECM a lymeské artritidy. Z klíšťat se však nepodařilo vyizolovat původce LB (Wallis a kol. 1978).



V roce 1981 poskytl epidemiolog Jorge Benach Willymu Burgdorferovi klíšťata *I. scapularis* nasbíraná na ostrově Shelter Island ve státě New York, což byla zároveň oblast s endemickým výskytem LB, za účelem demonstrace agens horečky Skalistých hor *Rickettsia rickettsii*. Ačkoliv žádné ze 44 vyšetřovaných klíšťat neobsahovalo rickettsie, v klíštěcích střevech Burgdorfer pozoroval mikroorganismy, jejichž spirochetální povahu posléze potvrdil mikroskopii v temném poli (Burgdorfer 1984). To, že tato spirochéta, pojmenovaná na počest svého objevitele *Borrelia burgdorferi*, je dlouho hledaným etiologickým původcem LB, pak bylo prokázáno identifikací spirochét, které byly morfologicky podobné spirochétám detekovaným v *Ixodes scapularis*, v krvi, ECM a mozkomíšním moku lidí s lymeskou nemocí. V séru pacientů byl taktéž zaznamenán zvýšený titr specifických antiboreliových protilátek tříd IgM a IgG (Benach a kol. 1983, Berger a kol. 1983, Steere a kol. 1983, Waldo a Sidhu 1983).

Burgdorfer později svými dalšími výzkumy dokázal, že přenašečem LB není pouze americké klíště *I. scapularis*, ale i jeho protějšek, žijící na západním pobřeží USA, *I. pacificus* či evropský druh klíštěte *I. ricinus* (Burgdorfer 1984).

## 2.2. Lymeská borelióza

Lymeská borelióza je nejčastější nemocí přenášenou členovci v Euroasii a v USA. Jedná se o multiorgánové onemocnění, které prokazatelně způsobují tři druhy spirochét náležící do rodu *Borrelia*. *Borrelia burgdorferi* s.s. je hlavním původcem LB v Severní Americe, kdežto většina evropských případů je přičítána *B. afzelii* a *B. garinii* (Wang a kol. 1999).

### 2.2.1. Symptomy

LB je doprovázena celou řadou symptomů, existují ale i asymptomatické infekce, které budou zřejmě častější v Evropě než v USA (Steere a kol. 2003). Obecně lze tvrdit, že klinické manifestace závisí do určité míry na druhu borelie, jíž je pacient infikován. *B. burgdorferi* s.s. způsobuje především artritidu. *B. afzelii* zase napadá kůži, a je tedy asociována zejména s kožními projevy LB, jako jsou acrodermatitis chronica atrophicans a erythema chronicum migrans. *B. garinii* je hlavním původcem lymeské neuroboreliózy

(Lünemann a kol. 2001, Tjisse-Klasen a kol. 2013).

Klinické symptomy LB lze rozdělit do tří fází: lokalizovaná infekce, diseminovaná infekce a persistentní infekce. Výskyt jednotlivých fází se mezi lidmi s LB liší – u některých pacientů se projeví jen lokalizovaná infekce, kdežto jiní budou trpět pouze pozdními symptomy nemoci, aniž by se u nich objevily příznaky asociované s lokalizovanou či diseminovanou infekcí. Též je možné pozorovat regionální rozdíly v klinické manifestaci LB, zejména mezi Severní Amerikou a Evropou, což je dáno tím, že na obou kontinentech se vyskytují odlišné genospecies řazené do komplexu *Borrelia burgdorferi* s.l. (Steere a kol. 2004).

#### 2.2.1.1. Lokalizovaná infekce

Klasickým symptomem první fáze LB je kožní vyrážka erythema chronicum migrans (nebo také erythema migrans), objevující se zhruba u 80 % pacientů 1 – 3 týdny po kousnutí klíštětem obvykle na dolních končetinách a trupu. Jedná se o kruhovitou, erytematózní lézi o průměru přinejmenším 5 cm, jejíž průměrná velikost činí 15 cm. Nejčastěji je léze buď zcela červená, anebo jde o prstencový lem s centrálním výbledem. Vyrážka většinou nebolí, nesvědí a během několika týdnů až měsíců spontánně vymizí. ECM může být asociována s chřipkovými příznaky, jako jsou malátnost, zvýšená teplota, bolest hlavy, svalů a kloubů, ztuhlost šíje či lokalizovaná lymfadenopatie (Murray a Shapiro 2010, Vasudevan a Chatterjee 2013).

#### 2.2.1.2. Diseminovaná infekce

Během několika dní až týdnů po vypuknutí nemoci se borelie začnou šířit tělem pacienta. Tomu nasvědčuje fakt, že spirochéty byly v průběhu diseminované infekce vyizolovány z krve i mozkomíšního moku, a v malém množství byly pozorovány ve vzorcích myokardu, oční sítnice, svalů, kosti, sleziny, jater, mozkové pleny a mozku (Duray a Steere 1988).

Nejběžnější manifestací diseminované infekce v Severní Americe jsou mnohočetné migrující erytémy (Obr. 1). Tyto sekundární ECM se objevují mimo místo, kde bylo přisáté klíště, což je dáno šířením borelií krví a lymfou. Běžně postiženými místy jsou obličej a dolní končetiny. Počet sekundárních ECM kolísá od dvou po desítky a tyto léze jsou – ve srovnání s primární ECM – menší a světlejší (Vasudevan a Chatterjee 2013).



Obr. 1: Mnohočetné migrující erytémy (Aucott a kol. 2009).

.Další, méně běžnou kožní manifestací druhé fáze LB, vyskytující se převážně v Evropě, je boreliový lymfocytom. Jedná se o hustý lymfocytární infiltrát v kůži a/nebo podkoží, jež se klinicky prezentuje jako modročervený uzlík o průměru několika centimetrů. Nejčastěji bývá lokalizován na ušním lalůčku u dětí a na prsní bradavce či prsním dvorci u dospělých (Strle a kol. 1992).

Velmi vzácně je během druhé fáze LB pozorována lymeská karditida, jež se nejtypičtěji manifestuje jako atrioventrikulární blokáda (AV blokáda) I, II. či III. stupně, doprovázená dušností, závratěmi, palpitacemi až synkopou v případě II. a III. stupně (Dobbs a Mugmon 2013).

Lymeská neuroborelióza (LNB) je způsobena diseminací borelií do nervového systému a objevuje se zhruba u 10 – 15 % pacientů s neléčenou LB. V Evropě je častým symptomem LNB během diseminované infekce Bannwarthův syndrom – bolestivá lymfocytární meningoradikulitida, která může či nemusí být provázena parézami. V Severní Americe se zase LNB obvykle prezentuje jako meningitida, jejímž nejtypičtějším symptomem je bolest hlavy. Horečka a meningismus jsou většinou mírné či zcela chybí. Častým projevem LNB jsou též kraniální neuropatie, nejběžnější je obrna lícního nervu (Prasad a Sankar 1999, Hildenbrand a kol. 2009).

### 2.2.1.3. Persistentní infekce

Pokud lymeská borelióza není rychle a efektivně léčena, nastává měsíce až roky po nákaze třetí fáze LB zvaná persistentní infekce, jejímž nejběžnějším projevem je lymeská artritida. Artritida má monoartikulární či oligoartikulární charakter a postihuje primárně velké klouby – zejména kolenní a loketní klouby. Postižený kloub bývá oteklý, intenzivní bolest se ale obvykle nedostavuje (Murray a Shapiro 2010).

Častou klinickou manifestací pozdní LNB v Severní Americe je lymeská encefalopatie, kdežto v Evropě je vzácně pozorovaná chronická encefalomyelitida. Lymeská encefalopatie je obvykle mírná a vyznačuje se nespecifickými symptomy, jako jsou poruchy paměti a soustředění či nespavost. Mohou se vyskytnout i mírné psychické poruchy ve formě depresí, podrážděnosti a paranoii. Encefalopatie je zhusta doprovázena chronickým únavovým syndromem. Chronická encefalomyelitida má řadu různorodých příznaků, které odrážejí postižení mozku, míchy, hlavových a periferních nervů. Patří mezi ně mimo jiné bolest hlavy, slabost dolních končetin nebo částečné ochrnutí jedné poloviny těla (Fallon a Nields 1994, Prasad a Sankar 1999).

Chronické kožní onemocnění acrodermatitis chronica atrophicans (ACA), asociované s *B. afzelii* (Ohlenbusch a kol. 1996), se vyskytuje primárně v Evropě u starších osob. V časném zánětlivém stádiu se tvoří modročervené léze s prosáknutím a těstovitou konzistencí kůže, lokalizované obvykle na distálních částech končetin. Neléčená ACA nakonec přechází do pozdní atrofické fáze, kdy postupně vymizí elastická vlákna a dilatují cévy. Kůže se stává tenčí a připomíná cigaretový papír (Nadal a kol. 1988, Biesiada a kol. 2012).

### 2.2.1.4. Syndrom po proběhlé lymeské borelióze

Někteří lidé mohou po prodělané LB léčené antibiotiky trpět symptomy, které přetrvávají měsíce až roky po ukončení léčby. Tyto potíže se souhrnně označují jako syndrom po proběhlé lymeské borelióze (Post-Lyme Disease Syndrome) a zahrnují únavu, bolesti svalů, kloubů a poruchy neurokognitivních funkcí. Dosud však není jasné, zda syndrom je přímým následkem LB, či zda se jedná o důsledek deprese způsobené akutní infekcí (Cairns a Godwin 2005). Rozhodně zatím neexistuje přesvědčivý důkaz, že by *B. burgdorferi* perzistovala ve tkáních lidí léčených antibiotiky a koncentrace protilátek proti

boreliím je u spousty těchto pacientů na hranici detekovatelnosti (Wormser a kol. 2006).

### 2.2.2. Diagnostika

Lymeskou boreliózu lze diagnostikovat užitím přímých a nepřímých metod. Přímé metody jsou založeny na kultivaci borelií či na detekci proteinů a nukleových kyselin specifických pro borelie molekulárními metodami. Nepřímé metody jsou postavené na průkazu specifických IgM a IgG protilátek v séru nebo jiném biologickém materiálu (Wright a kol. 2012).

Ačkoliv kultivace zůstává být diagnostickým standardem ve výzkumných studiích, není z mnoho důvodů, jako jsou časová náročnost, nutnost speciálního média či nízká citlivost, užívaná v rutinní klinické praxi. Rovněž molekulární metody založené na polymerázové řetězové reakci (PCR) nebyly široce přijaty v laboratorní diagnostice kvůli nízké citlivosti PCR pro detekci *Borrelia burgdorferi* s.l. v krvi a mozkomíšním moku. Při provádění PCR navíc existuje riziko falešně pozitivních výsledků v důsledku neúmyslné kontaminace vzorků malým množstvím cílové DNA (Aguero-Rosenfeld a kol. 2005).

Z výše uvedených důvodů spočívá diagnostika LB v klinické praxi na demonstraci antiboreliových protilátek v séru pacientů. Dle doporučení amerického Centra pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC) se k detekci specifických protilátek užívá nejprve citlivý screeningový test jako ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) nebo IFA (immunofluorescence assay, nepřímá imunofluorescence) a pro potvrzení pozitivního výsledku tohoto testu se dále provádí specifičtější Western blot (nebo také imunoblot). Pokud vyjde výsledek screeningového testu negativní, konfirmační imunoblot není třeba provádět (Ledue a kol. 1996).

### 2.2.3. Léčba

Lymeská borelióza (zejména její první dvě stádia) je úspěšně léčitelná antibiotiky, podávanými buď orálně či intravenózně. Experti z Infectious Diseases Society of America doporučují k léčbě LB antibiotika doxycyklin, amoxicilin, cefuroxim-axetil, ceftriaxon, cefotaxim nebo penicilin G. O tom, jaké antibiotikum bude danému pacientovi podáváno, rozhodují takové faktory jako klinické projevy LB, věk pacienta, případné těhotenství či laktace. Například k léčbě ECM a boreliového lymfocytomu se užívají doxycyklin, amoxicilin či cefuroxim-axetil. Doxycyklin by se nicméně neměl předepisovat těhotným

nebo kojícím ženám a dětem mladším 8 let. Časná LNB je zase úspěšně léčena podáváním ceftriaxonu, cefotaximu či penicilinu G.

Podávání antibiotik osobám trpícím syndromem po proběhlé lymeské borelióze se nedoporučuje, neboť zatím nebylo prokázáno, že by antibiotická terapie byla v tomto případě účinná (Klempner a kol. 2001, Wormser a kol. 2006).

### 2.3. Klíšťata

Klíšťata jsou krev sající ektoparaziti suchozemských obratlovců včetně obojživelníků, plazů, ptáků a savců náležející do říše živočichové (Animalia), kmene členovci (Arthropoda), podkmene klepítkatci (Chelicerata), třídy pavoukovci (Arachnida), podtřídy roztoči (Acari), řádu Parasitiformes a podřádu klíšťatovci (Ixodida). Podřád klíšťatovci se dále dělí na 3 čeledi – Nuttalliellidae, klíšťákovití (Argasidae) a klíšťatovití (Ixodidae) (Black a Piesman 1994). Do čeledi Nuttalliellidae patří jediný druh – *Nuttalliella namaqua*, jež nese rysy jak klíšťákovitých, tak i klíšťatovitých (Mans a kol. 2011). Zástupci čeledi klíšťatovití („tvrdá“ klíšťata, angl. hard ticks) jsou charakterizováni přítomností chitinizovaného štítu (scutum) na hřbetní straně těla. Klíšťáci neboli „měkká“ klíšťata (angl. soft ticks) hřbetní štítek nemají, namísto toho celé jejich tělo pokrývá měkký kožovitý obal zvaný integument. „Tvrdá“ a „měkká“ klíšťata se liší i způsobem, jakým sají krev. Klíšťatovití v každém svém vývojovém stádiu sají pouze jednu velké množství krve (zhruba 100násobek hmotnosti jejich těla), a to po poměrně dlouhou dobu několika dnů až týdnů. Přebytkovou vodu z nasáté krve vylučují zpět do hostitele přes slinné žlázy. Klíšťáci sají opakovaně malé množství krve (zhruba 2 – 10 násobek hmotnosti jejich těla) a délka sání se pohybuje v řádech několika minut až hodin. Nadbytečná tekutina je sekretována koxálními žlázami (Mans a kol. 2011).

Do čeledi klíšťákovití spadají 4 rody – *Argas*, *Carios*, *Ornithodoros* a *Otobius*. „Měkká“ klíšťata z rodu *Ornithodoros* jsou vektory přinejmenším 13 druhů borelií asociovaných s návratnou horečkou. Do čeledi klíšťatovití jsou řazeny rody *Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Cosmiomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicentor* a *Rhipicephalus* (Horak a kol. 2002). Zejména rod *Ixodes* zahrnuje celou řadu přenašečů virů, bakterií a prvoků, způsobujících taková infekční onemocnění, jako jsou lidská granulocytární anaplasmóza (dříve lidská

granulocytární ehrlichioza), lidská monocytární ehrlichioza, lymeská borelióza, tularémie, Q horečka, klíšťová encefalitida či babezióza (Parola a Raoult 2001, Charrel a kol. 2004, Hunfeld a kol. 2008).

Hlavními vektory *B. burgdorferi* s.l. jsou klíšťata náležející do komplexu *Ixodes ricinus* – *I. scapularis* (dříve *I. dammini*) na střeozápadě a severovýchodě USA, *I. pacificus* na západním pobřeží USA, *I. ricinus* v Evropě a *I. persulcatus* v asijském Rusku, Číně a Japonsku. Tito tři přenašeči se nevyznačují striktně druhovou specifikou, např. *Ixodes ricinus* je vektorem všech tří druhů borelií patogenních pro člověka, tedy *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* a *B. afzelii*. I další klíšťata z rodů *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* a *Rhipicephalus* spolu s krevsajícím hmyzem se podílí na udržování borelií v přírodě a příležitostně na jejich přenosu na člověka (Wang a kol. 1999).

### 2.3.1. Klíšťe obecné (*Ixodes ricinus*)

Klíšťe obecné je roztoč náležící do čeledi klíšťatovití (Ixodidae), který je hlavním přenašečem lymeské boreliózy v Evropě.

Tělo klíšťete se skládá z hlavové části (gnathostoma) a z vlastního těla (idiosoma) (van der Hammen 1983). Hlavová část je tvořena především hypostomem pokrytým dozadu stočenými zoubky. V rýhách po stranách hypostomu jsou umístěné pedipalpy a chelicery. Když se chce klíšťe přisát na hostitele, vysune chelicery, kterými se zachytí v pokožce. Tímto přichycením dojde k natržení pokožky. Klíšťe následně začne zatahovat chelicery zpět, čímž do ranky vtlačí hypostom (Richter a kol. 2013). Sliny vylučované sajícím klíšťetem vytvoří v okolí hypostomu cementovou vrstvu, která brání vyjmutí klíšťete (Stewart a kol. 1998). Samečci se vyznačují přítomností velkého tvrdého štítku (scutum), který pokrývá celou dorzální část jejich těla. U samic a nymf štítek sahá pouze do 1/3 těla (van der Hammen 1983).

Životní cyklus klíšťete obecného zahrnuje tři vývojová stádia: larva, nymfa a dospělec (imago) (Obr. 2). Každé stádium saje krev pouze jednou po dobu několika dní. Po nasátí klíšťe z hostitele odpadá a skryté ve vegetaci prochází metamorfózou na další vývojové stádium. Dospělí samci krev nepřijímají. Jejich jediným posláním je oplodnit



Obr. 2: Tři vývojová stádia klíšťete *Ixodes ricinus*. Zleva: larvy, nymfy a dospělá samice (Gilbert a kol. 2014).

samici v okamžiku, kdy saje na hostiteli. Oplodněná nasátá samička poté odpadne, naklade zhruba 1000 – 3000 vajíček, ze kterých se později vylíhnou larvy, a uhynie. Celý cyklus trvá přibližně rok (Gray 1998).

Klíšťata napadají celou řadu teplokrevných a studenkrevných obratlovců včetně hlodavců, ještěrek, ptáků, ježků, zajíců, veverek, vysoké zvěře a hospodářských zvířat. Šestinohé larvy a osminohé nymfy sají na hostitelích všech velikostí od malých savců a ptáků až po kopytnatce, kdežto dospělá vývojová stádia se krmí výlučně na větších zvířatech, jako jsou vysoká zvěř a dobytek (Medlock a kol. 2013).

Klíště obecné aktivně vyčkává v trávě či jiné vegetaci, dokud se v jeho bezprostřední blízkosti neobjeví hostitel. Čas vhodný k vyčkávání a přítomnost hostitele klíšťatům indikují světločivné buňky a dále Hallerův orgán umístěný na chodidlech prvního páru nohou (Medlock a kol. 2013, Gilbert a kol. 2014).

Lokality, které klíšťata obývají, jsou determinovány citlivostí klíšťat k vysychání během neparazitických fází jejich životního cyklu (vyčkávání na hostitele, metamorfózy, kladení vajíček) a také dostupností vhodných hostitelů. *Ixodes ricinus* může přežít pouze v oblastech, kde relativní vlhkost vzduchu neklesá pod 80 %, jako jsou listnaté a jehličnaté lesy, vřesoviště, louky, pastviny a městské parky (Gray 1998, Medlock a kol. 2013).

Klíště obecné je rozšířené po celé Evropě od Irska až po Ural a od severního Švédska až po severní Afriku (Medlock a kol. 2013). V současné době dochází v důsledku oteplování klimatu k posunu *Ixodes ricinus* do severnějších oblastí Evropy a do vyšších nadmořských výšek (Gray a kol. 2009).

### 2.3.2. Slinami aktivovaný přenos patogenů (SAT)

Přísátí klíštěte by normálně u hostitele v důsledku poškození epidermis a krevních cév vyústilo v kontrakci cév, aktivaci koagulační kaskády a ve vytvoření zánětlivé odpovědi. Klíště by nedokázalo dokončit sání a byla by výrazně narušena jeho životaschopnost a schopnost reprodukce. Klíšťata však mohou, navzdory této rejekční reakci hostitele, úspěšně sát po dobu několika dní až týdnů, neboť jejich sliny obsahují celou řadu farmakologicky aktivních látek s antihemostatickými (vazodilatátory, inhibitory agregace krevních destiček, antikoagulanty, fibrinolytické faktory), protizánětlivými a imunomodulačními účinky (Kazimírová 2008). Bylo prokázáno, že látky obsažené ve slinách klíštěte zároveň usnadňují přenos, přežití a množení některých patogenů přenášených klíšťaty v hostiteli. Tento fenomén se označuje jako slinami aktivovaný přenos (SAT) a jeho přímým důkazem je



zvýšená infektivita patogena po jeho inokulaci spolu se slinami či extraktem ze slinných žláz ve srovnání s inokulací patogena samotného. Za nepřímý důkaz SAT efektu je považován neviremický přenos patogenů mezi nakaženými a nenakaženými klíšťaty společně sajícími na jednom hostiteli (Nuttall a Labuda 2004). SAT byl poprvé rozpoznán u arboviru Thogoto a klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus* (Jones a kol. 1989). Od té doby byl přímo i nepřímo pozorován u celé řady patogenů a jejich vektorů včetně *I. ricinus* a *B. afzelii* (Pechová a kol. 2002), *I. ricinus* a *B. lusitaniae* (Zeidner a kol. 2002) a *I. ricinus* a *B. burgdorferi* s.s. (Macháčková a kol. 2006).

## 2.4. Borelie

### 2.4.1. Rod *Borrelia*

*Borrelia* je rod gramnegativních bakterií náležící spolu s medicínsky významnými rody *Treponema* a *Leptospira* do řádu Spirochaetales, třídy Spirochaetes, kmene spirochéty (Spirochaetae) a domény bakterie (Bacteria). Některé z druhů patřících do rodu *Borrelia* (např. *Borrelia recurrentis*, *B. duttoni*, *B. hermsii* a *B. turicatae*) jsou původci návratné horečky, onemocnění charakterizovaného opakovanými epizodami horečky a nespecifických symptomů, jako jsou bolest hlavy, svalů a kloubů (Dworkin a kol. 2008). Lymeská borelióza je asociovaná s boreliemi řazenými do komplexu *B. burgdorferi* s.l., který v současné době čítá přinejmenším 20 spirochetálních druhů (genospecies). Toto číslo však pravděpodobně není konečné, neboť jsou stále popisovány nové druhy. 12 genospecies z komplexu *B. burgdorferi* s.l. se zřejmě vyskytuje pouze v Euroasii (*B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. finlandensis*, *B. garinii*, *B. japonica*, *B. lusitaniae*, *B. sinica*, *B. spielmanii*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. valaisiana* a *B. yangtze*), kdežto 4 další druhy (*B. americana*, *B. andersonii*, *B. californiensis* a *B. kurtenbachii*) se nejspíš nachází výhradně v Severní Americe. *B. burgdorferi* s.s., *B. bissettii* a *B. carolinensis* jsou přítomny jak ve Starém, tak i v Novém světě (Baranton a kol. 1992, Canica a kol. 1993, Kawabata a kol. 1993, Marconi a kol. 1995, Fukunaga a kol. 1996, Le Fleche a kol. 1997, Wang a kol. 1997, Postic a kol. 1998, Masuzawa a kol. 2001, Richter a kol. 2006, Postic a kol. 2007, Chu a kol. 2008, Margos a kol. 2009, Rudenko a kol. 2009a,b, Margos a kol. 2010, Casjens a kol. 2011, Rudenko a kol.

2011). V nedávné době byl v Chile objeven jihoamerický genospecies taktéž náležející do komplexu *B. burgdorferi* s.l. – *B. chilensis* (Ivanova a kol. 2014).

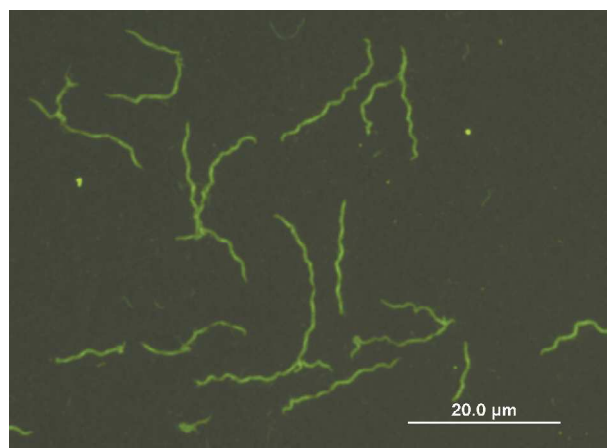
Z výše uvedených 20 genospecies lymeskou boreliózu prokazatelně způsobují *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* a *B. garinii* (Wang a kol. 1999). Patogenní potenciál by však mohly mít i *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii* a *B. bissetii*, neboť jejich DNA byla vyizolována ze vzorků získaných od pacientů se symptomy LB (Rijpkema a kol. 1997, Collares-Pereira a kol. 2004, Diza a kol. 2004, de Carvalho a kol. 2008, Fingerle a kol. 2008, Rudenko a kol. 2009c). Vzhledem k tomu, že *B. bavariensis* je blízce příbuzná *B. garinii* (Margos a kol. 2009) a *B. finlandensis* je zase blízce příbuzná *B. burgdorferi* s.s. (Casjens a kol. 2011), i tyto dva nedávno rozpoznané genospecies by mohly být potenciálními původci LB.

#### 2.4.2. Morfologie

Borelie jsou gramnegativní, motilní spirochéty o délce 10 – 30  $\mu\text{m}$  a šířce 0,2 – 0,5  $\mu\text{m}$ , jež svým tvarem připomínají plochou vlnu se zhruba 3 až 10 pravidelnými závity vzdálenými od sebe 2,2  $\mu\text{m}$  (Obr. 3) (Aguero-Rosenfeld a kol. 2005, Dombrowski a kol. 2009). Morfologie spirochét může být nicméně *in vitro* pozměněna v reakci na měnící se kultivační podmínky. Například při změně pH,

vystavení buněk antibiotikům, ve stárnoucích kulturách atd. nastává formace tzv. membránových pupenů (blebs), které obsahují spirochetální povrchové proteiny i lineární a cirkulární DNA (Barbour a Hayes 1986, Miklossy a kol. 2008). Za nepříznivých podmínek (nedostatek živin, přítomnost některých antibiotik) mohou borelie tvořit nepohyblivé cystické formy, které jsou schopné přejít zpět ve vegetativní buňky (Murgia a kol. 2002).

Borelie jsou obaleny amorfní slizovou vrstvou (S vrstva), tvořenou glykoproteiny. Pod S vrstvou se nachází vnější membrána, která sestává ze tří vrstev – vnitřní peptidoglykanové, střední lipopolysacharidové a vnější lipoproteinové. Vnější membrána je oddělena periplazmatickým prostorem od cytoplazmatické membrány na povrchu



Obr. 3: Morfologie spirochety *B. burgdorferi* (imunofluorescenční mikroskopie) (Křupka a kol. 2007).

protoplazmatického cylindru, který obsahuje cytoplazmu a genom. Periplazmatický prostor ukrývá 7 – 11 periplazmatických bičků nebo také axiálních filament, které se vypínají mezi oběma konci buňky z bazálních disků, umístěných v cytoplazmatické membráně, a obtáčí tělo borelie pod vnější buněčnou stěnou (Barbour a Hayes 1986, Bartůněk 2006). Axiální filamenta borelií jsou strukturně podobná bičkům jiných bakterií. Každé filamentum má 3 části: motor, háček a bičkové vlákno, které se skládá z majoritního 41 kDa proteinu FlaB (flagelin B) a minoritního 38 kDa proteinu FlaA (flagelin A). U většiny spirochetálních druhů vytváří FlaA obal, který obklopuje jádro tvořené FlaB. Kromě umožnění pohybu ve dvou fyziologicky odlišných prostředích (vektor, hostitel), které borelie během svého enzootického cyklu prostřídají, hrají bičky také důležitou roli v udržování buněčného tvaru. Buňky nesoucí mutaci v genu *flaB* nepřipomínaly plochou vlnu, nýbrž měly tyčinkovitý tvar (Dombrowski a kol. 2009, Charon a kol. 2012).

Borelie jsou mikroaerofilní, vysoce nutričně náročné bakterie, které se kultivují v různých modifikacích BSK (Barbour-Stoenner-Kelly) média. Běžně se například používá BSK-H médium doplněné 6% králičím sérem. Generační doba růstu borelií v tomto médiu při 37 °C je cca 12 hodin (Pollack a kol. 1993).

Spirochéty lze pozorovat v temném poli, ve fázovém kontrastu, užitím fluorescenčních mikroskopických technik, světelné mikroskopie po impregnaci stříbrem nebo elektronové mikroskopie (Aguero-Rosenfeld a kol. 2005).

### 2.4.3. Genom

Genom borelií je jedním z nejkompexnějších bakteriálních genomů. Genom *Borrelia burgdorferi* (americký kmen B31) se skládá z velkého lineárního chromozomu a dále z 12 lineárních a 9 cirkulárních plazmidů.

Chromozom je tvořen 910 725 páry bází (bp), průměrný obsah GC činí 28,6 %. Obsahuje přibližně 853 kódujících sekvencí, jejichž průměrná velikost je 992 bp. Celkem kódující sekvence – většinou se jedná o provozní (housekeeping) geny – představují 93 % chromozomu.

Velikost plazmidů se pohybuje od 9 do 62 kbp a obsah GC leží v rozmezí 20,7 % - 31,6 %. Plazmidy nesou cca 670 funkčních genů, z nichž některé kódují lipoproteiny diferenciatně exprimované na vnější membráně borelií během jejich životního cyklu (např. OspA, OspB, OspC, OspD, OspE, OspF, Dbp či VlsE) (Fraser a kol. 1997, Casjens a kol.

2000). Během kultivace *in vitro* může dojít ke ztrátě jednoho či více plazmidů, což sice nemá vliv na množení bakterií v kultuře, ale tato událost může vést ke snížení či ztrátě infekivity některých klonů v závislosti na tom, jaké plazmidy zrovna postrádají (Purser a Norris 2000). Výjimkou je plazmid cp26, který je esenciální pro růst borelií *in vitro* a jehož ztráta nikdy nebyla pozorována. Nese totiž gen *resT* kódující enzym nezbytný pro replikaci chromozomu a lineárních plazmidů, a možná i další geny nepostradatelné pro růst borelií. Je proto také někdy označován jako minichromozom (Byram a kol. 2004). Značné množství plazmidové DNA představují pseudogeny a nekódující sekvence, což nasvědčuje skutečnosti, že některé plazmidy by se mohly nacházet ve fázi rychlého vývoje.

Geny a pseudogeny vytváří velké množství rodin paralogních genů. Kompletní genom obsahuje 161 takových rodin, z nichž 107 zahrnuje přinejmenším jeden plazmidový gen. Velikost rodin se pohybuje v rozmezí od pouze 2 členů až k 41 členům. Byly pozorovány četné výměny sekvencí DNA mezi plazmidy a zřejmě též dochází k výměnám úseků DNA mezi plazmidy a pravým koncem chromozomu (Casjens a kol. 2000).

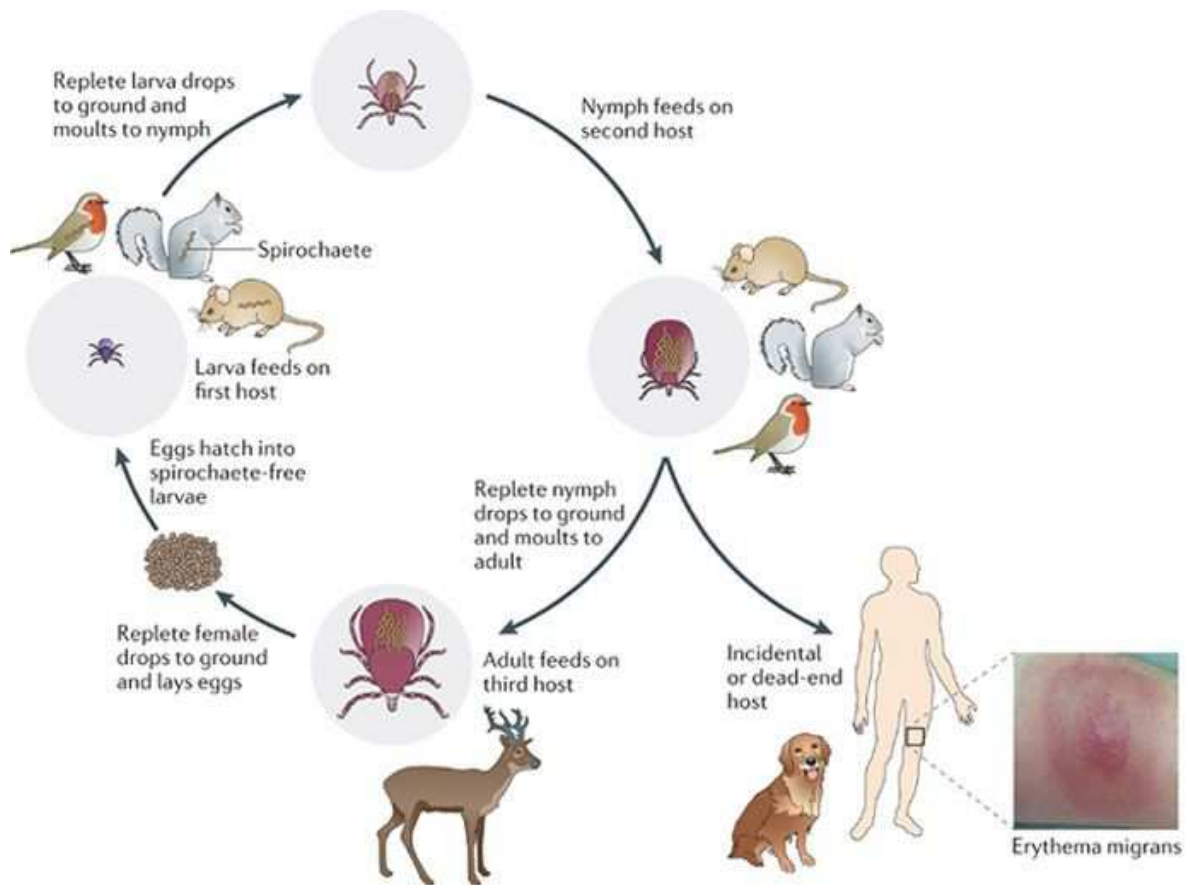
*B. burgdorferi* nemá schopnost syntetizovat aminokyseliny, nukleotidy, mastné kyseliny a kofaktory enzymů, neboť geny kódující enzymy těchto biosyntetických drah byly pravděpodobně ztraceny během koevoluce spirochét s vektorem a hostitelem. Namísto toho nese borelie 52 genů, které kódují proteiny transportující a/nebo vázající sacharidy, peptidy a aminokyseliny. energii pak *B. burgdorferi* získává prostřednictvím glykolýzy a fermentace cukrů na kyselinu mléčnou, protože postrádá i geny pro komponenty nezbytné k provádění Krebsova cyklu a oxidativní fosforylace. Tento fakt je konzistentní s mikroaerofilní povahou borelií (Brisson a kol. 2012).

#### 2.4.4. Životní cyklus

Borelie mají komplexní životní cyklus (Obr. 4), v rámci něhož cirkulují mezi vektorem (členovcem) a hostitelem (obratlovcem). Nejběžnějším vektorem jsou klíšťata rodu *Ixodes*. Rezervoároví hostitelé *B. burgdorferi* čítají širokou škálu ptačích a savčích druhů (Křupka a kol. 2007). Ze spousty genospecies náležící do komplexu *B. burgdorferi* s.l., *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* a *B. garinii* jsou hlavními druhy způsobujícími LB. Principiálním rezervoárem *B. burgdorferi* s.s. jsou různé druhy hlodavců, ale je schopná infikovat i zajícovce a ptáky. Ptáci by kromě udržování LB v přírodě mohli hrát i extrémně důležitou roli v přenosu spirochét do nových oblastí, kde předtím životní cyklus borelií nebyl pozorován. Rezervoárem *B. garinii* jsou obecně ptáci, kdežto *B. afzelii* využívá

jakožto rezervoárové hostitele hlodavce (Piesman a Schwan 2010).

Životní cyklus klíštěte zahrnuje 3 stádia – larva, nymfa a dospělec. Každé z těchto vývojových stádií (u dospělců jen samička) saje krev pouze jednou. Larvy se mohou infikovat *B. burgdorferi* během sání na nakaženém hostiteli a udržet si infekci po nasátí, odpadnutí a metamorfóze do dalších stádií (tzv. transstadiální přenos) (Radolf a kol. 2012). K transovariálnímu přenosu (tedy přenosu borelií z infikované samice přes vajíčka na potomstvo) s největší pravděpodobností vůbec nedochází (Schoeler a Lane 1993, Matuschka a kol. 1998, Rollend a kol. 2013). Rovněž i co-feeding neboli sousání larev s nakaženými nymfami na jednom hostiteli nehraje v infekci larev *B. burgdorferi* tak důležitou roli jako transstadiální přenos (Richter a kol. 2002), ačkoliv sousání samotné zřejmě je schopno zachovat enzootický cyklus borelií v přírodě (Ogden a kol. 1997). Infikované larvy pak při sání krve přenášejí spirochéty na kompetentní rezervoárové hostitele (hlodavci, ptáci), na nichž se následně mohou krmit jiné, nenakažené larvy. Dospělá klíšťata obecně nejsou důležitá pro udržování borelií v přírodě, neboť sají především na větších zvířatech (např. na vysoké zvěři), která jsou ale nekompetentními hostiteli *B. burgdorferi*. Na člověku, jenž je považován za konečného hostitele, mohou sát larvy, nymfy i dospělci, ale za přenos LB jsou ve většině případů zodpovědné nymfy (Radolf a kol. 2012).



Obr. 4: Životní cyklus *B. burgdorferi* (Radolf a kol. 2012).

Borelie, jimiž se infikovala larva během sání na nakaženém hostiteli, kolonizují střevo klíštěte, které pak zůstává být infikované během následujících metamorfóz larvy v nymfu a dospělé. Šíření *B. burgdorferi* tělem klíštěte má zřejmě dvě fáze. Příjem krve na počátku první fáze spouští intenzivní množení spirochét ve střevě nakažené nymfy – během prvních 48 hodin sání se počet borelií může zvýšit až šestinásobně. Rychle se replikující spirochéty vytváří síť nemotilních organismů, jež postupně díky své úzké asociaci s diferencujícími se, hypertrofujícími a oddělujícími se epiteliálními buňkami postupuje k bazolaterálnímu povrchu střevního epitelu. Ve druhé fázi diseminace se z nemotilních spirochét stávají motilní, invazivní bakterie, které unikají ze střeva a migrují hemolymfou do slinných žláz, odkud jsou pak spolu se slinami inokulovány do pokožky hostitele (Dunham-Ems a kol. 2009). Výrazné zvýšení počtu spirochét ve slinných žlázách bylo pozorováno 48 – 60 hodin po počátku sání nymf. Tento časový interval se shoduje s faktem, že maximální přenos borelií ze sajícího klíštěte na hostitele nastává mezi 48. a 72. hodinou (des Vignes a kol. 2001, Piesman a kol. 2001).

Ve střevech nenasátých klíšťat exprimují borelie na vnější membráně vnější

povrchový protein A (OspA) (Yang a kol. 2004), jímž se váží k receptoru TROSPA (tick receptor for OspA) exprimovanému buňkami střevního epitelu. Interakce OspA–TROSPA je nezbytná pro úspěšnou kolonizaci klíštěcích střev boreliemi, a tak i pro přežití spirochét (Pal a kol. 2004). Jak klíště začne sát krev, dochází ke snížení exprese OspA a TROSPA a naopak nastává up-regulace vnějšího povrchového proteinu C (OspC). Tato změna je, kromě příjmu krve, dále regulována teplotou – spirochéty exprimovaly OspC při 32 – 37 °C, ale ne při 24 °C (Schwan a kol. 1995). Down-regulace OspA boreliím umožňuje opustit střevo a migrovat do slinných žláz. Zde borelie váží na exprimovaný OspC Salp15, protein přítomný ve slinách klíštěte a první známý SAT faktor, který inhibicí aktivace a proliferace CD4+ T buněk klíšťatům usnadňuje dokončit sání na hostiteli. Navázaný Salp15 poskytuje spirochétám jak ochranu proti baktericidním protilátkám, tak i proti zabití zprostředkovanému komplementem hostitele (Ramamoorthi a kol. 2005, Schuijt a kol. 2008).

### 3. CÍLE PRÁCE

- Určit dynamiku přenosu spirochéty *Borrelia afzelii* na hostitele v závislosti na délce sání klíšťat *Ixodes ricinus*.
- Posoudit případný vliv počtu sajících klíšťat na pravděpodobnost transmise borelií na hostitele.



## 4. MATERIÁL A METODY

### 4.1. Myši

V pokusu byly užity samice inbredního kmene C3H/HeN (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Německo) stáří 6 – 8 týdnů. Myši byly chovány ve zvěřinci Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za standardních podmínek, krmeny granulovanou směsí pro hlodavce a napájeny sterilní vodou *ad libitum*.

### 4.2. Klíšťata

V experimentu byly užity larvy a nymfy *Ixodes ricinus* z chovu Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích.

### 4.3. Borelie

K infekci larev byly použity spirochéty *Borrelia afzelii* (málo pasážovaný kmen CB-43) (Štěpánová-Tresová a kol. 2000). Borelie byly kultivovány v BSK-H médiu (Sigma-Aldrich) se 6 % králičího séra a 1 % směsi antibiotik pro borelie (Sigma-Aldrich) při 34 °C.

### 4.4. Infekce nymf *Borrelia afzelii*

Nymfy infikované *Borrelia afzelii* mi byly poskytnuty RNDr. Radkem Šímou, Ph.D. Přesto pro úplnost alespoň ve stručnosti popíši postup použitý k jejich získání. Na myši, jimž byla subkutánně inokulována dávka  $1 \times 10^5$  borelií a následně byly ponechány 1 měsíc pro rozvinutí infekce ve zvěřinci Parazitologického ústavu AV ČR, bylo nasazeno cca 100 larev na myš. Po nasátí byly larvy uchovávány při teplotě 25 °C a relativní vlhkosti vzduchu 80 % až do jejich metamorfózy na nymfy. Promořenost reprezentativního vzorku nymf byla zjišťována klasickou PCR 1.

#### 4.5. Nasazování nymf na myši, jejich vyjímání a pitva myši

Všem myším byla na hřbetu holicím strojkem oholena srst a na oholené místo byl následně pomocí lepidla a náplastové lepicí pásky připevněn klobouček (viz Obr. 5). Do kloboučku každé myši bylo pinzetou vloženo 10 nymf. Pouze u 2 hodinového časového intervalu byl počet vkládaných nymf zvýšen až na 14, aby se zajistilo sání co největšího počtu klíšťat. Po nasazení nymf byl klobouček uzavřen víčkem a klece (každá obsahovala 5 myši, tedy každá klec příslušela jednomu intervalu) byly umístěny do vaniček s vodou, aby se zamezilo případnému přelézání uniklých nymf mezi myšmi určenými do různých časových intervalů. 2 hodiny, 12 hodin, 24 hodin či 72 hodin od nasazování klíšťat na myši byly nymfy vyjmuty pinzetou a uchovávány v mrazáku při - 20 °C až do izolace DNA následované klasickou PCR 1 či 2. Na nymfy, které nebylo možné odstranit pinzetou, byl nanesen jodisol (SpofaDental a.s.). Kloboučky stejně jako vaničky s vodou byly po dobu jednoho týdne od nasazování klíšťat pravidelně kontrolovány na přítomnost možných nasátých neodstraněných nymf. Pokud byla taková nymfa nalezena, byla později vyšetřována na přítomnost boreliové DNA nested PCR.



Obr. 5: Myš s kloboučkem (Peržinová 2008).

Myši byly ponechány 1 měsíc pro rozvinutí infekce ve zvěřinci Parazitologického ústavu AV ČR. Po uplynutí této doby byly usmrceny zlomením vazů a byly jim odebrány ušní boltec, močový měchýř a hrot srdeční. Orgány nebyly váženy, aby se zamezilo případné kontaminaci, jež by během této procedury mohla nastat, ale rovnou byly vloženy do mrazáku, kde byly uchovávány při - 20 °C až do izolace DNA následované klasickou PCR 2.

## 4.6. Izolace DNA

DNA byla z boreliové kultury (pro přípravu pozitivních kontrol PCR), nymf a orgánů myši izolována pomocí kitu NucleoSpin<sup>®</sup> Tissue (Macherey-Nagel). Izolace byla prováděna dle návodu výrobce s pouze několika málo odchylkami během počátečních fází.

### 4.6.1. Izolace DNA z nymf *Ixodes ricinus*

Nymfy *Ixodes ricinus* byly zhomogenizovány pod binolupou (Carl Zeiss) v jamkách mikrotitrační destičky s 50 µl PBS. Vzniklá suspenze byla (kromě pevných částí) přenesena do mikrozkuvek a následně k ní bylo přidáno 180 µl lyzačního pufru T1 a 25 µl proteinázy K (c = 20 mg/ml). Vzorky byly inkubovány v termobloku při 56 °C cca 3,5 hodiny. Přidání 200 µl lyzačního pufru B3 bylo následováno další inkubací vzorku v termobloku při 70 °C po dobu 10 minut. Po přidání 210 µl 100% ethanolu byla směs přenesena do kolonek umístěných ve sběracích mikrozkuvkách a centrifugována 1 min při 11 000 g. DNA navázaná na silikátovou membránu kolonky byla posléze pročištěna přidáním 500 µl promývacího pufru BW, 1 minutovou centrifugací při 11 000 g, aplikací 600 µl promývacího pufru B5 a opět 1 minutovou centrifugací při otáčkách 11 000 g. Za účelem zbavení se přebytečného ethanolu byla centrifugace po dobu 1 minuty při 11 000 g ještě jednou zopakována. Nakonec bylo do kolonky přidáno 60 µl elučního pufru BE (pH 8,5) přehřátého na teplotu 70 °C. Po inkubaci při pokojové teplotě po dobu 1 minuty byly vzorky centrifugovány 1 min při 11 000 g. Získaná DNA byla uchovávána v mrazáku při – 20 °C.

### 4.6.2. Izolace DNA z boreliové kultury (příprava pozitivní kontroly)

Pro přípravu PCR pozitivní kontroly byl stanoven počet borelií v boreliové suspenzi dle Magnusona (Magnuson 1948). Z kultury borelií bylo odebráno 3,5 µl suspenze na podložní sklíčko, kapka byla překryta krycím sklíčkem a následně pozorována mikroskopii v temném poli (Amplival, Carl Zeiss) při 400 násobném zvětšení. Po spočítání spirochét ve 20 zorných polích byl k zjištění počtu borelií v 1 ml suspenze použit vzorec:

počet borelií/ml =  $a \times 7,7 \times 10^5$

a.... průměrný počet borelií ve 20 zorných polích

Z boreliové kultury bylo poté odebráno takové množství suspenze, aby obsahovalo požadovaný počet borelií (pro přípravu pozitivní kontroly  $10^7$  buněk). Následovala centrifugace po dobu 30 min při 9 200 g. K získanému peletu byl přidán homogenát neinfikovaného klíštěte v 50  $\mu$ l PBS a dále 180  $\mu$ l lyzačního pufru T1 spolu s 25  $\mu$ l proteinázy K ( $c = 20$  mg/ml). Směs byla inkubována v termobloku při 56 °C po dobu 3,5 hodiny. Dále izolace probíhala stejně jako v případě nymf *Ixodes ricinus* (viz 4.6.1.). Získaná DNA, pokud zrovna nebyla prováděna PCR, byla uložena v mrazáku při - 20 °C.

#### 4.6.3. Izolace DNA z myších orgánů

Ušní boltce, močové měchýře a srdce nebyly před izolací nijak upravovány (tedy ani krájeny na malé kousky), neboť toho nebylo třeba a navíc se tak zamezilo případným kontaminacím exogenní DNA, jež by při zpracování orgánů mohly nastat. Po přidání 180  $\mu$ l lyzačního pufru T1 a 25  $\mu$ l proteinázy K byly ušní boltce a močové měchýře inkubovány v termobloku při 56 °C po dobu 4,5 hodiny, srdce pak byla inkubována za stejných podmínek cca 6 hodin. Dále byla izolace prováděna stejně jako u nymf *Ixodes ricinus* (viz 4.6.1.). Pouze v případě ušních boltců následovala po přidání 200  $\mu$ l lyzačního pufru B3 a 10 minutové inkubaci vzorků při 70 °C dodatečná centrifugace při 11 000 g po dobu 5 min za účelem zbavení se chlupů, které by mohly zabránit odtoku tekutiny z kolonek do sběracích mikrozskumavek. DNA byla eluována 100  $\mu$ l BE pufru (pH 8,5) přehřátého na 70 °C a uchovávána v mrazáku při - 20 °C.

### 4.7. Klasická PCR 1

Amplifikována byla část genu pro flagelin o velikosti 156 bp. V reakci byly užity přímý primer 5' - AGC AAA TTT AGG TGC TTT CCA A - 3' a zpětný primer 5' - GCA ATC ATT GCC ATT GCA GA - 3' (Schwaiger a kol. 2001). Reakční směs o celkovém objemu 20  $\mu$ l byla tvořena 4  $\mu$ l vody (PCR H<sub>2</sub>O, Top-Bio), 10  $\mu$ l Master Mixu (2 $\times$  koncentrovaný FastStart PCR Master, Roche Applied Science), 1  $\mu$ l přímého primeru (0,01

mM, Generi Biotech). 1  $\mu$ l zpětného primeru (0,01 mM, Generi Biotech) a 4  $\mu$ l templátové DNA. Do negativní kontroly bylo namísto 4  $\mu$ l DNA přidáno 4  $\mu$ l PCR vody. DNA byla amplifikována v termocykleru UNO II (Biometra). Amplifikační program sestával z počáteční denaturace (94 °C, 5 min) a dále z 35 cyklů tvořených denaturací (94 °C, 30 s), nasedáním primerů (annealing, 60 °C, 30 s) a syntézou DNA (extension/elongation, 72 °C, 40 s). Produkty PCR byly posléze separovány agarózovou gelovou elektroforézou.

#### **4.8. Klasická PCR 2**

Amplifikována byla část genu pro 23S rRNA o velikosti 260 bp. V reakci byly užity primery Bor1 5' - AGA AGT GCT GGA GTC GA - 3' a Bor2 5' - TAG TGC TCT ACC TCT ATT AA - 3' (Schwartz a kol. 1992). Reakční směs o celkovém objemu 20  $\mu$ l byla tvořena 6,4  $\mu$ l vody (PCR H<sub>2</sub>O, Top-Bio), 10  $\mu$ l Master Mixu (2 $\times$  koncentrovaný FastStart PCR Master, Roche Applied Science), 0,8  $\mu$ l Bor1 primeru (0,01 mM, Generi Biotech), 0,8  $\mu$ l Bor2 primeru (0,01 mM, Generi Biotech) a 2  $\mu$ l templátové DNA. Do negativní kontroly bylo namísto 2  $\mu$ l DNA přidáno 2  $\mu$ l PCR vody. DNA byla amplifikována v termocykleru UNO II (Biometra). Amplifikační program sestával z počáteční denaturace (94 °C, 15 min), dále ze 40 cyklů tvořených denaturací (94 °C, 30 s), nasedáním primerů (53 °C, 30 s) a syntézou DNA (72 °C, 40 s) a nakonec z konečné syntézy DNA (72 °C, 7 min). Produkty PCR byly posléze separovány agarózovou gelovou elektroforézou.

#### **4.9. Nested („zahnížděná“) PCR**

První (externí) kolo:

Viz klasická PCR 2.

Druhé (interní) kolo:

Amplifikována byla část genu pro 23S rRNA o velikosti 222 bp. V reakci byly užity primery Bor3 5' - GCG AAA GCG AGT CTT AAA AGG - 3' a Bor4 5' - ACT AAA ATA AGG CTG AAC TTA AAT - 3' (Schwartz a kol. 1992). Reakční směs o celkovém objemu 20  $\mu$ l byla tvořena 7,6  $\mu$ l vody (PCR H<sub>2</sub>O, Top-Bio), 10  $\mu$ l Master Mixu (2 $\times$  koncentrovaný FastStart PCR Master, Roche Applied Science), 0,8  $\mu$ l Bor3 primeru (0,01 mM, Generi

Biotech), 0,8  $\mu$ l Bor4 primeru (0,01 mM, Generi Biotech) a 0,8  $\mu$ l PCR produktu z prvního kola. DNA byla amplifikována v termocykleru UNO II (Biometra). Amplifikační program sestával z počáteční denaturace (94 °C, 15 min), dále ze 40 cyklů tvořených denaturací (94 °C, 30 s), nasedáním primerů (58 °C, 30 s) a syntézou DNA (72 °C, 40 s) a nakonec z konečné syntézy DNA (72 °C, 7 min). Produkty PCR byly posléze separovány agarózovou gelovou elektroforézou.

#### **4.10. Agarózová gelová elektroforéza**

Amplifikační produkty klasické PCR 1, klasické PCR 2 a nested PCR byly separovány v 1,5% agarózovém gelu tvořeném 1,2 g agarózy (Amresco) a 80 ml 1× koncentrovaného TAE pufu (připraven z 10× koncentrovaného zásobního roztoku, který obsahoval 48,4 g TRISu; 2,92 g EDTA; 11,412 ml 98% kyseliny octové, to celé doplněné na 1 l Milli-Q vodou). Vzorke předtím, než byly nanášeny do jamek, byly smíchány se 4  $\mu$ l interkalačního barviva SYBR Green (2 g Ficoll, 100  $\mu$ l 1M TRIS, 10 mg Orange G, 20  $\mu$ l 10 000× koncentrovaného SYBR® Green (Sigma-Aldrich)). K určování velikosti DNA fragmentů byly užity DNA marker 200-1500 (Top-Bio) nebo GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Separace probíhala po dobu 55 min při napětí 72 V a proudu 50 mA. Po skončení elektroforézy byl gel prohlížen a vyhodnocován pod UV lampou (Biometra).

## 5. VÝSLEDKY

Ačkoliv 20 myší bylo rozděleno do 4 skupin po pěti a každá pětice měla příslušet jednomu z dohodnutých časových intervalů (2 hodiny, 12 hodin, 24 hodin, 72 hodin), při vyjímání nymf z myší v určených časech se objevily problémy. Ne všechny sající nymfy šly pinzetou vyjmout a odstranění takto pevně přísátých klíšťat se většinou neobešlo bez poranění pokožky myši, což automaticky ještě více ztížilo vytahování ostatních stále sajících klíšťat. Řada nymf se navíc přichytila pod lemem kloboučku či až pod náplastovou páskou, v důsledku čehož k nim byl obtížný přístup a také byly snáze přehlédnutelné. Na nymfy, o kterých jsme věděli a které se nám nepodařilo vyjmout pinzetou, byl aplikován jodisol, jenž klíště usmrtil, a tak zabránil jeho dalšímu sání. Bohužel jsme ale přišli vzhledem k pozdní aplikaci jodisolu až po 40 hodinách od začátku měření o prakticky celý 12 hodinový interval. Navzdory užití jodisolu však byly později, v rámci pravidelných kontrol kloboučků po dobu jednoho týdne od nasazování klíšťat, na některých myších nalezeny nymfy, kterým se podařilo sát 72 hodin a déle. Zřejmě se jednalo o klíšťata, která byla – i přes veškerou naši snahu – přehlédnuta. Úspěšnost sání nymf na jednotlivých myších, počet odstraněných či nenalezených nymf a taktéž i počet klíšťat, které se nám nepodařilo v rámci časového intervalu odstranit, znázorňuje tabulka I.

Tab. I: Úspěšnost sání nymf na jednotlivých myších, počet odstraněných, neodstraněných a nenalezených nymf.

Myš	počet nymf nasazovaných na myš	sající nymfy	odstraněné <sup>a</sup> nymfy	neodstraněné <sup>b</sup> nymfy	nenalezené <sup>c</sup> nymfy
<b>2 hodiny</b>					
1	12	11	11	0	1
2	12	12	12	0	0
3	10	10	10	0	0
4	12	12	9	3	0
5	14	14	12	2	0
<b>12 hodin</b>					
6	10	10	10	0	0
7	10	7	6	2	2
<b>24 hodin</b>					
8	10	9	10	0	0
9	10	10	9	1	0
10	10	10	10	0	0
11	10	10	10	0	0
12	10	10	10	0	0
<b>40 hodin</b>					
13	10	10	7	3	0
14	10	10	9	1	0
15	10	9	10	0	0
<b>72 hodin</b>					
16	10	8	7	1	2
17	10	7	6	1	3
18	10	10	10	0	0
19	10	10	10	0	0
20	10	10	10	0	0

<sup>a</sup>Nymfy nesající nebo nymfy vyjmuté pinzetou či zabitě účinkem jodisolu v rámci určeného časového intervalu. <sup>b</sup> Nymfy sající na myši déle (sály po dobu 72 hod a více od nasazení), než byl určený časový interval. <sup>c</sup> Nymfy chybějící do počtu, které nebyly pozorovány v kloboučcích ani ve vaničkách s vodou.



Vždy 3 nymfy na myš byly vyšetřovány klasickou PCR 1 či klasickou PCR 2 na přítomnost boreliové DNA. Promořenost nymf sajících po dobu 2 hodin, 12 hodin či 24 hodin byla cca 87 %.

Promořenost nymf sajících 72 hod však vycházela nižší, cca 57 %. Tuto nesrovnalost přisuzují většímu objemu krve (a tím pádem i vyšší koncentraci látek inhibujících PCR), který nymfy sající po dobu 3 dnů nasály ve srovnání s klíšťaty, jež sála maximálně 1 den (Davalieva a Efremov 2010, Schrader a kol. 2012).

Nymfy, které nebyly odstraněny včas, a tudíž sály 72 hodin a déle, byly vyšetřovány na přítomnost borelií nested PCR. Výsledky nested PCR jsou uvedené v tabulce II.

Tab. II: Promořenost neodstraněných nymf.

<b>myš</b>	<b>nymfa</b>	<b>výsledek nested PCR</b>
<b>4</b>	1	–
	2	+
	3	–
<b>5</b>	4	+
	5	–
<b>7</b>	6	+
	7	–
<b>9</b>	8	+
<b>13</b>	9	+
	10	–
	11	+
<b>14</b>	12	+
<b>16</b>	13	+
<b>17</b>	14	+

(+) boreliová DNA prokázána nested PCR

(–) boreliová DNA neprokázána nested PCR

Vzhledem k tomu, že na všech myších sála aspoň jedna nakažená neodstraněná nymfa, tyto myši nemohly být zařazeny do časového intervalu, do kterého byly původně určeny, a proto byly začleněny do nového intervalu  $\geq 72$  hodin. Sloučením dat uvedených v tabulkách I a II jasně vyplyne, že do 2 hod. intervalu mohly nakonec patřit 3 myši, do 12 hod. intervalu 1 myš, do 24 hod. intervalu 4 myši, do 40 hod. intervalu 1 myš, do 72 hod. intervalu 3 myši a do intervalu  $\geq 72$  hodin 8 myší.

Každé myši byly odebrány ušní boltec, močový měchýř a srdce, tedy cílové orgány šíření borelií, které byly podrobeny za účelem detekce spirochetální DNA klasické PCR 2. Srdce byla dále ještě vyšetřována citlivější nested PCR, ale výsledky obou analýz byly srovnatelné. Z toho důvodu nested PCR nebylo třeba provádět, neboť klasická PCR 2 byla dostatečně citlivá a navíc, vzhledem k nižšímu požadavku na manipulaci se vzorky, i méně přístupná falešně pozitivním výsledkům než nested PCR. Přítomnost boreliové DNA v jednotlivých orgánech a případný negativní vliv jodisolů na přenos a infekci myší *B. afzelii* jsou zaznamenány v tabulce III.

Na základě údajů uvedených v tabulce III lze soudit, že s rostoucí délkou sání nakaženého klíštěte se zvyšuje pravděpodobnost přenosu borelií na hostitele. Nákaza byla nejdříve prokázána u myší, na nichž nymfy sály po dobu 3 dnů. Naopak transmise borelií během prvních 24 hodin sání nebyla zaznamenána u žádné z 8 myší. U nakažených myší byla přítomnost boreliové DNA vždy prokázána ve všech zkoumaných orgánech. Naopak borelie nebyly detekovány v žádném orgánu kontrolní myši, tedy ke kontaminacím vzorků cizorodou DNA během pre-amplifikační fáze s nejvyšší pravděpodobností nedocházelo, a tudíž se nejedná o falešně pozitivní výsledky. Jodisol, třebaže je dezinfekčním přípravkem, zřejmě neměl vliv na infekci myší.

Zajímavé je, že v intervalu  $\geq 72$  hodin došlo k nákaze pouze 3 myší z 8, ačkoliv na každé myši sála minimálně jedna nakažená nymfa po dobu tří a více dnů. Dvě z těchto myší byly přitom původně určeny do 72 hodinového intervalu a jedna do 40 hodinového intervalu (viz Tab. I). Toto pozorování by se dalo vysvětlit skutečností, že pravděpodobnost přenosu nákazy se zvyšuje nejen s délkou sání klíšťat na hostiteli, ale je do určité míry ovlivněna i počtem klíšťat sajících po dobu 3 dní a více, jak lze vyčíst z tabulky IV.

Tab. III: Přítomnost boreliové DNA v orgánech jednotlivých myší a případný vliv jodisolů na přenos borelií z klíšťat na myši.

Myš	jodisol	ušní boltec	močový měchýř	srdce	celkový výsledek
<b>2 hodiny</b>					
1	ne	–	–	–	–
2	ne	–	–	–	–
3	ne	–	–	–	–
<b>12 hodin</b>					
6	ne	–	–	–	–
<b>24 hodin</b>					
8	ne	–	–	–	–
10	ano	–	–	–	–
11	ano	–	–	–	–
12	ne	–	–	–	–
<b>40 hodin</b>					
15	ano	–	–	–	–
<b>72 hodin</b>					
18	ano	–	–	–	–
19	ne	+	+	+	+
20	ano	+	+	+	+
<b>≥ 72 hodin</b>					
4	ne	–	–	–	–
5	ne	–	–	–	–
7	ne	–	–	–	–
9	ano	–	–	–	–
13	ano	–	–	–	–
14	ano	+	+	+	+
16	ne	+	+	+	+
17	ne	+	+	+	+
<b>Kontrola</b>					
21 <sup>a</sup>	ne	–	–	–	–

(ano) jodisol aplikován na některé nymfy sající na dané myši

(ne) jodisol neaplikován na žádnou nymfu sající na dané myši

(+) boreliová DNA prokázána klasickou PCR 2

(–) boreliová DNA neprokázána klasickou PCR 2

<sup>a</sup> kontrolní myš, na níž nesály žádné nymfy

Tab. IV: Vliv počtu nakažených a nenakažených nymf sajících 72 hodin a déle na infekci myši.

myš	celkový výsledek PCR	celkový počet nymf sajících 72 hodin a déle	nakažené nymfy sající 72 hodin a déle
1	-	0	0
2	-	0	0
3	-	0	0
4	-	3	1
5	-	2	1
6	-	0	0
7	-	2	1
8	-	0	0
9	-	1	1
10	-	0	0
11	-	0	0
12	-	0	0
13	-	3	2
14	+	1	1
15	-	0	0
16	+	8	minimálně 3 <sup>a</sup>
17	+	7	minimálně 4 <sup>b</sup>
18	-	10	minimálně 2 <sup>c</sup>
19	+	10	minimálně 1 <sup>d</sup>
20	+	10	minimálně 4 <sup>e</sup>

(+) boreliová DNA prokázána klasickou PCR 2

(-) boreliová DNA neprokázána klasickou PCR 2

<sup>a</sup> promořenost zjišťována u 5 z 8 nymf, <sup>b</sup> promořenost zjišťována u 5 ze 7 nymf, <sup>c</sup> promořenost zjišťována u 3 z 10 nymf, <sup>d,e</sup> promořenost zjišťována u 5 z 10 nymf

## 6. DISKUSE

V podstatě by se vědecké práce zkoumající vliv délky sání klíšťat na přenos borelií na hostitele daly rozdělit do tří základních skupin. Do první skupiny by patřily studie řešící přenos *B. burgdorferi* s.s. z klíštěte *I. scapularis* na myš, které vůbec nezaznamenaly, že by k transmisi spirochét docházelo během prvního dne sání. Des Vignes a kol. neprokázali přítomnost borelií u žádné z 58 myší náležících do 24 hodinového intervalu (des Vignes a kol. 2001). Ke stejnému závěru dospěli i Shih a Spielman u 8 myší, na nichž klíšťata sála po dobu 16 hodin a u 9 myší, na kterých byly nymfy ponechány 24 hodin (Shih a Spielman 1993). Taktéž i ve studii zkoumající přenos *B. burgdorferi* s.s. klíšťaty *I. pacificus* nebyla nakažena žádná z 8 myší poté, co na nich po dobu 24 hodin sály nymfy (Peavey a Lane 1995). Pravděpodobnost přenosu borelií na hostitele se zvyšovala s rostoucí dobou sání klíšťat. Po 24 hodinách sání klíštěte nebyla infikována žádná myš, po 36 hodinách bylo nakaženo průměrně 10 % myší (Piesman 1993, Shih a Spielman 1993), po 42 hodinách 25 % myší (Piesman 1993), po 48 hodinách průměrně 27 % myší (Piesman 1993, Shih a Spielman 1993, Peavey a Lane 1995, des Vignes a kol. 2001), po 72 hodinách bylo v průměru infikováno 67 % myší (Shih a Spielman 1993, Peavey a Lane 1995, des Vignes a kol. 2001) a sání klíšťat po dobu 4 dnů a déle vyústilo v nákazu zhruba 89 % myší (Peavey a Lane 1995, des Vignes a kol. 2001). Tyto údaje o rychlosti transmise borelií z klíštěte na hostitele podporuje jiná studie (Hojgaard a kol. 2008), v níž pravděpodobnost, že 50 % nakažených klíšťat přenesou *B. burgdorferi* s.s., nastala 68 hodin od počátku sání. Prodleva mezi dobou, kdy klíšťata začnou přijímat krev, a transmisí *B. burgdorferi* na hostitele je dána mechanismem šíření borelií v klíštěti. Borelie kolonizující střevo nenasátého klíštěte představují homogenní populaci produkující hlavně OspA. Jakmile klíště najde hostitele a začne sát krev, nastává intenzivní replikace borelií a z homogenní populace se v důsledku up-regulace OspC stává heterogenní populace spirochét zahrnující všechny čtyři možné fenotypy (tedy  $\text{OspA}^+\text{OspC}^-$ ,  $\text{OspA}^-\text{OspC}^+$ ,  $\text{OspA}^+\text{OspC}^+$  a  $\text{OspA}^-\text{OspC}^-$ ) (Ohnishi a kol. 2001). Některé borelie opustí střevo a začnou hemolymfou migrovat do slinných žláz, odkud se pak spolu se slinami mohou dostat do pokožky hostitele. Diseminace ze střeva do slinných žláz probíhá zhruba mezi 36. a 48. hodinou (de Silva a Fikrig 1995). K nejvyššímu nárůstu počtu spirochét ve slinných žlázách pak dochází mezi 48. a 60. hodinou po přísátí klíštěte (Piesman a kol. 2001).

I má práce by se dala zařadit do této první skupiny studií, neboť ani já neprokázala infekci u žádné myši, jež náležela do 2 hod., 12 hod. nebo 24 hod. intervalu. Přenos jsem poprvé zaznamenala u skupiny myší, na nichž nymfy sály po dobu 72 hodin, tedy i z mých výsledků lze usuzovat, že riziko nákazy lymeskou boreliózou se zvyšuje s rostoucí délkou sání infikovaného klíštěte. To, že jsem po 40 hodinách od nasazení klíšťat nepozorovala přenos borelií, není nic podivného, protože do 40 hod. intervalu se nakonec dala zařadit pouze jedna jediná myš. Dle studií uvedených výše se po 36 hodinách sání klíšťat nakazí zhruba 10 % myší a po 42 hodinách sání 25 % myší. Z toho vyplývá, že je daleko větší pravděpodobnost, že jediná myš, na níž sála nymfa po dobu 40 hodin, bude spíše zdravá než nakažená.

Do druhé skupiny by se daly zařadit studie, jež již zmiňují přenos spirochét z komplexu *B. burgdorferi* s.l. na hlodavce kolem 24. hodiny od nasazování klíšťat, a to pouze u minimálního počtu hostitelů. Piesman a kol. sice během prvních 24 hodin sání klíšťat nezaznamenali přenos borelií na žádnou z 8 myší, zato byl v tomto časovém intervalu infikován 1 křeček ze 6 (Piesman a kol. 1987). V jiné studii žádná z 10 myší patřících do 24 hodinového intervalu nebyla infikována *B. burgdorferi* s.s., zato u 1 ze 6 myší náležících do téhož intervalu byla prokázána nákaza *B. afzelii* (Crippa a kol. 2002). Objevila se i evidence, že borelie z komplexu *B. burgdorferi* s.l. jsou už krátce po přísátí klíštěte přítomny v cementové vrstvě v okolí hypostomu a že k transmisi borelií, pokud je klíště vyjmuta bez cementové vrstvy, dochází už za 20 – 22 hodin od začátku sání (Alekseev a kol. 1996). Podobně časný přenos borelií byl možná pozorován i v klinické praxi (Hynote a kol. 2012).

V mé práci náležely do 24 hodinového intervalu pouze 4 myši a to je dost nízký počet na zachycení případné transmise borelií. Pokud však, ačkoliv v menšině případů, mohou borelie skutečně infikovat hostitele během prvního dne sání klíštěte, čím by se tato skutečnost dala zdůvodnit? Crippa a kol. přišli se třemi hypotézami. Prvním vysvětlením je případná systémová infekce klíšťat. Existují četné evidence přítomnosti borelií ve slinných žlázách nenasátých klíšťat, a to jak v případě *I. scapularis* (Piesman 1995, Piesman a kol. 2001), tak i *I. ricinus* (Lebet a Gern 1994, Leuba-Garcia 1994). Tyto spirochéty by však kvůli své velmi nízké četnosti vůbec nemusely dokázat iniciovat infekci (Piesman a Schneider 2002), ba dokonce by vůbec nemusely být infekční (Ohnishi a kol. 2001), což podporuje zjištění, že homogenát slinných žláz dokázal u myší způsobit infekci teprve tehdy, když byl získán z klíšťat sajících po dobu 60 hodin a déle (Piesman 1995). Existuje i možnost, že se borelie dostaly do slinných žláz při vyjímání tohoto orgánu, a to ze střeva pitvané nymfy.

Druhou hypotézou jsou rozdíly ve strategii, kterou by mohly uplatňovat různé druhy borelií, jakmile se jednou dostanou do pokožky hostitele. *B. burgdorferi* s.s. by se mohla zdržovat v místě přisátí klíštěte a odtud se začít šířit s určitým zpožděním. Pokud by tedy klíště bylo vyjmutο během prvního dne sání, spolu s ním by byly odstraněné i borelie zatím stále omezené jen na kousek kůže asociovaný s hypostomem. Naopak *B. afzelii*, často spojená s kožními manifestacemi, by se z místa přisátí šířila daleko rychleji, a tím pádem by ani včasné odstranění klíštěte nemuselo zabránit infekci (Crippa a kol. 2002). Tomuto tvrzení nicméně odporuje fakt, že i *B. burgdorferi* s.s. se může přenést na hostitele během prvních 24 hodin sání klíštěte (Piesman a kol. 1987), jakožto i třetí hypotéza Crippa a kol., v rámci níž zmiňují možnost, že dynamika přenosu ani tak nezávisí na druhu borelie, jako spíše na izolátu. Vypozorovali totiž, že první izolát *B. afzelii* (NE496) infikoval v časovém intervalu  $\geq 72$  hodin 100 % myší, kdežto druhý izolát (NE2963) vyvolal ve stejném intervalu infekci pouze u 40 – 50 % myší (Crippa a kol. 2002). Ať už infektivita spirochét souvisí s použitým izolátem či nikoliv, mezi jednotlivými studiemi mnohdy skutečně lze pozorovat velké rozdíly ve schopnosti stejného druhu borelie infikovat myš. Například poměry počtu nakažených myší spirochétou *B. burgdorferi* s.s. po 48 hodinách sání klíštěte *I. scapularis* ku celkovému počtu myší jsou následující: 2/8 (kmen JD1) (Piesman a kol. 1987), 6/8 (kmen JD1) (Piesman 1993), 0/17 (kmen JD1) (des Vignes a kol. 2001), 2/17 (kmen B31) (des Vignes a kol. 2001) a 10/10 (kmen JD1) (Shih a Spielman 1993). Je možné, že zrovna v mém experimentu měly borelie sníženou schopnost infikovat myš, což by aspoň z části vysvětlilo nákazu pouze 3 myší z 8 spadajících do intervalu  $\geq 72$  hodin.

Nakonec do třetí skupiny by se daly zařadit takové práce, z nichž vyplývá, že k přenosu borelií z komplexu *B. burgdorferi* s.l. dochází dříve než za 20 hodin od počátku sání klíštěte, a to u velkého počtu hostitelů. V jedné studii bylo po 16,7 hodinách sání nymf *I. ricinus* nakaženo cca 50 % pískomilů (Kahl a kol. 1998). Kateřina Peržinová v rámci Středoškolské odborné činnosti prokázala nákazu u 1 myši z 3, na kterých klíšťata sála pouze 6 hodin (Peržinová 2008) a Jana Páleníková při vypracovávání své bakalářské práce dokonce zaznamenala transmisi borelií u všech 10 myší, které patřily do 2 hodinového časového intervalu (Páleníková 2010). Takovéto údaje jsou ve zjevném rozporu zejména s vědeckými pracemi, které jsem zařadila do první, početnější skupiny, a tedy i s mými výsledky. Vůbec neodpovídají modelu diseminace borelií v klíštěti a dle mého názoru by se takto rychlý přenos dal vysvětlit pouze přítomností borelií ve slinných žlázách, přičemž tyto spirochéty by musely být schopné vyvolat infekci u hostitele. Toto tvrzení by však odporovalo závěrům, ke kterým dospěly jiné studie (Piesman 1995, Ohnishi a kol. 2001,

Piesman a Schneider 2002). Jana Páleníková skutečně zaznamenala přítomnost borelií ve slinných žlázách ve všech zkoumaných časových intervalech (6 hod., 12 hod., 24 hod., 48 hod.) včetně nenasátých nymf, průměrný počet borelií se pohyboval od 204 do 532 buněk. Nutno podotknout, že ve srovnání s jinými studii, které též měřily počet borelií ve slinných žlázách, jsou Janou zjištěná čísla překvapivě vysoká (Ohnishi a kol. 2001, Piesman a kol. 2001).

Příčinu rozdílů mezi mými výsledky a výsledky Jany či Kateřiny bych nehledala v citlivosti metody užití k detekci spirochét v myších orgánech. Kateřina stejně jako já užívala klasickou PCR, a přesto dospěla k odlišným výsledkům. Navíc nelze tvrdit, že například real-time PCR je vždy citlivější než klasická PCR, neboť citlivost amplifikačních metod se z velké části odvíjí od použitých reagensů, zejména pak primerů. Já sama pracovala se dvěma dvojicemi primerů, z nichž jeden pár byl desetkrát citlivější než druhý (Radek Šíma, ústní sdělení). Přítomnost boreliové DNA v srdeční tkáni jsem navíc, kromě klasické PCR, zkoumala i nested PCR – jejíž citlivost je dle některých studií srovnatelná s real-time PCR (Kawada a kol. 2004, Calderaro a kol. 2006) a ani tehdy jsem nezaznamenala žádný přenos borelií během prvního dne sání klíšťat.

Nesrovnalost mezi mými výsledky a výsledky Jany/Kateřiny by se nicméně dala přičíst rozdílným izolátům použitým k infekci klíšťat a následně i myší. Jak Jana Páleníková, tak i Kateřina Peržinová pracovaly s *B. burgdorferi* s.s. (kmen CB-53) (Peržinová 2008, Páleníková 2010), kdežto já obdržela nymfy infikované *B. afzelii* (kmen CB-43). Je možné, že právě rozdíly v infektivitě obou izolátů (Crippa a kol. 2002) by se dala přičíst skutečnost, že zatímco Jana a Kateřina pozorovaly přenos borelií během prvního dne sání klíšťat, já nikoliv.

Vysoká citlivost PCR činí tuto techniku velmi náchylnou ke kontaminacím exogenní DNA, a tím pádem i k falešně pozitivním výsledkům. Ať už se jedná o cross-kontaminace mezi vzorky, o DNA vyskytující se v laboratorním prostředí na stolech, nástrojích, stojanech na zkumavky atd., neboť více lidí v téže laboratoři pracuje se stejným organismem, či o amplikon, který se nahromadil v důsledku opakované amplifikace stále té samé sekvence, nechtěná DNA se může dostat do zkoumaných vzorků, a v případě, že nejsou pravidelně prováděny negativní kontroly, může tato událost vést k misinterpretaci získaných výsledků (Aslanzadeh 2004). Při zkoumání přenosu borelií ze sajícího klíštěte na myš může ke kontaminacím dojít jak při vyjímání orgánů z myší a izolaci DNA z orgánů, tak i při PCR (a případně elektroforéze). V rámci PCR se negativní kontroly provádí zcela automaticky, to samé se ale nedá říct o izolaci DNA. Já se při své práci s kontaminacemi na úrovni izolace



DNA setkala a z toho důvodu jsem si i zde zavedla systém negativních kontrol. V první řadě se jedná o kontrolní myš, na níž nesály žádné nymfy a jež nikdy nepřišla do styku s boreliemi. Orgány této myši byly zpracovávány společně s orgány vyšetřovaných myší. Dále jsem čistotu své práce kontrolovala prováděním negativních kontrol srovnatelných s PCR negativními kontrolami – v konečném výsledku obsahovaly kontroly všechny reagensie, použité při zpracování vzorku, pouze nebyla přidána žádná DNA. Jana ani Kateřina ve svých pracích provádění negativních izolačních kontrol nezmiňují. Tedy ačkoliv by jejich výsledky mohly být správné, nelze nijak dokázat, že při izolaci DNA z jednotlivých orgánů nedocházelo ke kontaminacím.

Na závěr bych se chtěla pokusit podat vysvětlení pro překvapivě nízký počet infikovaných myší patřících do intervalu  $\geq 72$  hodin. Pouze u 3 myší z 8 byla prokázána infekce. Z toho dvě myši původně patřily do 72 hodinového intervalu a jedna do 40 hodinového intervalu. Minimální počet borelií, jež musí být inokulován do pokožky hostitele, aby dokázal vyvolat infekci, se zřejmě liší mezi jednotlivými kmeny/izoláty. Například k nákaze myši *B. burgdorferi* s.s. (kmen B31) bylo třeba subkutánně inokulovat průměrně 371 borelií, kdežto v případě *B. burgdorferi* s.s. (kmen N40D10/E9) se jednalo o dávku obsahující průměrně 46 borelií (Chan a kol. 2012). Dalo by se tedy hypotetizovat, že čím více infikovaných klíšťat saje na myši po dobu 2 dny a déle (kdy už borelie docestují ze střeva do slinných žláz (Piesman a kol. 2001)), tím vyšší je pravděpodobnost, že bude do pokožky vpraven minimální počet borelií nutný k vyvolání infekce. Minimální počet sajících nakažených klíšťat by se pak lišil v závislosti na kmenu/izolátu borelií užitém v daném experimentu. V mém pokusu pravděpodobně 1 či 2 infikované nymfy ještě nedokázaly nakazit myš, na které sály po dobu  $\geq 72$  hodin, zato v jiném pokusu, ve kterém by byl užit i jiný izolát, by infekci dokázalo způsobit jediné sající klíště (des Vignes a kol. 2001). Této hypotéze odporuje fakt, že myš 14 byla nakažená, ačkoliv na ni po dobu 3 dní a více sála pouze jedna nymfa. V tomto konkrétním případě však mohlo k nákaze dojít v důsledku sání skupiny nymf, které byly odstraněné po 40 hodinách od nasazení na myš (viz Tab. I). Určitou roli v pravděpodobnosti přenosu by však možná mohl hrát i celkový počet sajících klíšťat (tedy nakažených i nenakažených). Sliny klíštěte obsahují celou řadu imunomodulačních látek, které ovlivňují imunitní systém hostitele, a tak klíštěti umožňují dokončit sání. Zároveň však v rámci SAT efektu usnadňují přenos, přežití a množení borelií v hostiteli (Pechová a kol. 2002, Macháčková a kol. 2006). Čím více klíšťat by sálo ve své těsné blízkosti, tím více imunomodulačních látek by bylo inokulováno do pokožky hostitele, což by mohlo usnadnit transmissi borelií. Při vyjímání nymf z myší bylo patrné, že klíšťata měla tendenci sát spíše

ve skupinách než jednotlivě. I velký počet sajících klíšťat nicméně nemusí vyústit v nákazu hostitele (1 myš z 3, na nichž nymfy sály 72 hodin nebyla infikovaná – viz Tab. III), přenos borelií na hostitele v 72 hodinovém intervalu nemusí být nutně stoprocentní (Peavey a Lane 1995, des Vignes a kol. 2001).

## 7. ZÁVĚR

- Transmise *Borrelia afzelii* na myš nastala nejdříve 72 hodin od počátku sání nymf *Ixodes ricinus*. Během prvního dne sání klíšťat přenos nebyl zaznamenán, a to u žádné z 8 myší.
- Pravděpodobnost přenosu borelií se zvyšovala s rostoucí dobou sání nymf a do určité míry závisela i na počtu sajících klíšťat. Čím více nymf na myši sálo, tím bylo pravděpodobnější, že myš bude nakažená. Efekt počtu sajících klíšťat se projevil pouze během třetího dne sání, naopak během prvních 24 hodin neměl na transmissi spirochét žádný vliv.

## 8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

23S rRNA	ribozomální RNA o velikosti 23 Svedbergových jednotek
ACA	acrodermatitis chronica atrophicans
AV blokáda	atrioventrikulární blokáda
AV ČR	Akademie věd České republiky
bp	base pair, komplementární pár bazí, jednotka užívaná k popisu velikosti molekuly DNA
BSK médium	Barbour-Stoenner-Kelly médium
C3H/HeN	označení inbredního kmene myši
CB-43	označení českobudějovického kmene <i>Borrelia afzelii</i>
CB-53	označení českobudějovického kmene <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.
CDC	Centers for Disease Control and Prevention, Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí
cp	circular plasmid, cirkulární plazmid
Dbp	decorin-binding protein, protein vázající decorin
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
ECM	erythema chronicum migrans
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, imunologická metoda fungující na bázi imunoenzymatické reakce
FlaA	flagelin A
FlaB	flagelin B
IFA	immunofluorescence assay, nepřímá imunofluorescence
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
kDa	kilodalton, jednotka užívaná k popisu molekulových hmotností proteinů
LB	lymeská borelióza (též lymeská borelióza)
LNB	lymeská neuroborelióza
obsah GC	podíl guanino-cytosinového komplementárního páru v dané molekule DNA

OspA–OspF	outer surface protein A–F, vnější povrchový protein A–F
PBS	phosphate buffered saline, fyziologický roztok pufovaný fosfáty
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
ResT	telomere resolvase, enzym nacházející se u bakterií, jejichž genom obsahuje lineární plazmidy
RNA	ribonucleic acid, ribonukleová kyselina
SAT	saliva-activated transmission , slinami aktivovaný přenos
s.l.	sensu lato, v širším slova smyslu
s.s.	sensu stricto, v užším slova smyslu
TAE	pufr obsahující komponenty Tris, acetát a EDTA
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TROSPA	tick receptor for OspA, klíčecí receptor pro OspA
VlsE	variable major protein-like sequence, expressed; povrchový lipoprotein <i>B. burgdorferi</i> exprimovaný lokusem variable major protein-like sequence

## 9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

**Afzelius A. 1921:** Erythema chronicum migrans. *Acta Derm. Venereol.* 2: 120–125.

**Aguero-Rosenfeld M.E., Wang G., Schwartz I., Wormser G.P. 2005:** Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 484–509.

**Alekseev A.N., Burenkova L.A., Vasilieva I.S., Dubinina H.V., Chunikhin S.P. 1996:** Preliminary studies on virus and spirochete accumulation in the cement plug of ixodid ticks. *Exp. Appl. Acarol.* 20: 713–723.

**Aslanzadeh J. 2004:** Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 34: 389–396.

**Aucott J., Morrison C., Munoz B., Rowe P.C., Schwarzwald A., West S.K. 2009:** Diagnostic challenges of early Lyme disease: lessons from a community case series. *BMC Infect. Dis.* 9: 79.

**Baranton G., Postic D., Saint Girons I., Boerlin P., Piffaretti J.C., Assous M., Grimont P.A. 1992:** Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 378–383.

**Barbour A.G., Hayes S.F. 1986:** Biology of *Borrelia* species. *Microbiol. Rev.* 50: 381–400.

**Bartůněk P. (Ed.) 2006:** Lymeská borelióza – 3., doplněné a přepracované vydání. Grada Publishing a.s., Praha, 123 pp.

**Benach J.L., Bosler E.M., Hanrahan J.P., Coleman J.L., Habicht G.S., Bast T.F., Cameron D.J., Ziegler J.L., Barbour A.G., Burgdorfer W., Edelman R., Kaslow R.A. 1983:** Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 308: 740–742.

**Berger B.W., Clemmensen O.J., Ackerman A.B. 1983:** Lyme disease is a spirochetosis. A review of the disease and evidence for its cause. *Am. J. Dermatopathol.* 5: 111–124.

**Biesiada G., Czepiel J., Leśniak M.R., Garlicki A., Mach T. 2012:** Lyme disease: review. *Arch. Med. Sci.* 8: 978–982.

**Black W.C. 4th, Piesman J. 1994:** Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 10034–10038.

**Brisson D., Drecktrah D., Eggers C.H., Samuels D.S. 2012:** Genetics of *Borrelia burgdorferi*. *Annu. Rev. Genet.* 46: 515–536.

**Burgdorfer W. 1984:** Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. *Yale J. Biol. Med.* 57: 515–520.

**Byram R., Stewart P.E., Rosa P. 2004:** The essential nature of the ubiquitous 26-kilobase circular replicon of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* 186: 3561–3569.

**Cairns V., Godwin J. 2005:** Post-Lyme borreliosis syndrome: a meta-analysis of reported symptoms. *Int. J. Epidemiol.* 34: 1340–1345.

**Calderaro A., Piccolo G., Gorrini C., Peruzzi S., Zerbini L., Bommezzadri S., Dettori G., Chezzi C. 2006:** Comparison between two real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*. *Acta Biomed.* 77: 75–80.

**Canica M.M., Nato F., du Merle L., Mazie J.C., Baranton G., Postic D. 1993:** Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 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., 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*. *Mol. Microbiol.* 35: 490–516.

**Casjens S.R., Fraser-Liggett C.M., Mongodin E.F., Qiu W.G., Dunn J.J., Luft B.J., Schutzer S.E. 2011:** Whole genome sequence of an unusual *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate. *J. Bacteriol.* 193: 1489–1490.

- Collares-Pereira M., Couceiro S., Franca I., Kurtenbach K., Schäfer S.M., Vitorino L., Goncalves L., Baptista S., Vieira M.L., Cunha C. 2004:** First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1316–1318.
- Crippa M., Rais O., 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.
- Davalieva K., Efremov G.D. 2010:** Influence of salts and PCR inhibitors on the amplification capacity of three thermostable DNA polymerases. *Maced. J. Chem. Chem. Eng.* 29: 57–62.
- de Carvalho I.L., Fonseca J.E., Marques J.G., Ullmann A., Hojgaard A., Zeidner N., Núncio M.S. 2008:** Vasculitis-like syndrome associated with *Borrelia lusitaniae* infection. *Clin. Rheumatol.* 27: 1587–1591.
- 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.
- des Vignes F., Piesman J., Heffernan R., Schulze T.L., Stafford K.C. 3rd, Fish D. 2001:** Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *J. Infect. Dis.* 183: 773–778.
- Diza E., Papa A., Vezyri E., Tsounis S., Milonas I., Antoniadis A. 2004:** *Borrelia valaisiana* in cerebrospinal fluid. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 1692–1693.
- Dobbs L.B., Mugmon M.A. 2013:** Wenckebach responsive to cephalosporins – it must be Lyme carditis. *J. Community Hosp. Intern. Med. Perspect.* 3: 3–4.
- Dombrowski C., Kan W., Motaleb M.A., Charon N.W., Goldstein R.E., Wolgemuth C.W. 2009:** The elastic basis for the shape of *Borrelia burgdorferi*. *Biophys. J.* 96: 4409–4417.
- Dunham-Ems S.M., Caimano M.J., Pal U., Wolgemuth C.W., Eggers C.H., Balic A., Radolf J.D. 2009:** Live imaging reveals a biphasic mode of dissemination of *Borrelia burgdorferi* within ticks. *J. Clin. Invest.* 119: 3652–3665.



**Duray P.H., Steere A.C. 1988:** Clinical pathologic correlations of Lyme disease by stage. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 539: 65–79.

**Dworkin M.S., Schwan T.G., Anderson D.E. Jr., Borchardt S.M. 2008:** Tick-borne relapsing fever. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 22: 449–468.

**Fallon B.A., Nields J.A. 1994:** Lyme disease: a neuropsychiatric illness. *Am. J. Psychiatry* 151: 1571–1583.

**Fingerle V., Schulte-Spechtel U.C., Ruzic-Sabljic E., Leonhard S., Hofmann H., Weber K., Pfister K., Strle F., Wilske B. 2008:** Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Med. Microbiol.* 298: 279–290.

**Fraser C.M., Casjens S., Huang W.M., Sutton G.G., Clayton R., Lathigra R., White O., Ketchum K.A., Dodson R., Hickey E.K., Gwinn M., Dougherty B., Tomb J.F., Fleischmann R.D., Richardson D., Peterson J., Kerlavage A.R., Quackenbush J., Salzberg S., Hanson M., van Vugt R., Palmer N., Adams M.D., Gocayne J., Weidman J., Utterback T., Watthey L., McDonald L., Artiach P., Bowman C., Garland S., Fuji C., Cotton M.D., Horst K., Roberts K., Hatch B., Smith H.O., Venter J.C. 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. Immunol.* 40: 877–881.

**Garin C., Bujadoux A. 1993:** Paralysis by ticks. 1922. *Clin. Infect. Dis.* 16: 168–169.

**Gilbert L., Aungier J., Tomkins J.L. 2014:** Climate of origin affects tick (*Ixodes ricinus*) host-seeking behavior in response to temperature: implications for resilience to climate change? *Ecol. Evol.* 4: 1186–1198.

**Gray J.S. 1998:** The ecology of ticks transmitting Lyme borreliosis. *Exp. Appl. Acarol.* 22: 249–258.

- Gray J.S., Dautel H., Estrada-Peña A., Kahl O., Lindgren E. 2009:** Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2009: 593232.
- Hildenbrand P., Craven D.E., Jones R., Nemeskal P. 2009:** Lyme neuroborreliosis: manifestations of a rapidly emerging zoonosis. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 30: 1079–1087.
- Hojgaard A., Eisen R.J., Piesman J. 2008:** Transmission dynamics of *Borrelia burgdorferi* s.s. during the key third day of feeding by nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 45: 732–736.
- Horak I.G., Camicas J.L., Keirans J.E. 2002:** The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Exp. Appl. Acarol.* 28: 27–54.
- Hunfeld K.P., Hildebrandt A., Gray J.S. 2008:** Babesiosis: recent insights into an ancient disease. *Int. J. Parasitol.* 38: 1219–1237.
- Hynote E.D., Mervine P.C., Stricker R.B. 2012:** Clinical evidence for rapid transmission of Lyme disease following a tickbite. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 72: 188–192.
- Chan K., Awan M., Barthold S.W., Parveen N. 2012:** Comparative molecular analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strains B31 and N40D10/E9 and determination of their pathogenicity. *BMC Microbiol.* 12: 157.
- Charon N.W., Cockburn A., Li C., Liu J., Miller K.A., Miller M.R., Motaleb M.A., Wolgemuth C.W. 2012:** The unique paradigm of spirochete motility and chemotaxis. *Annu. Rev. Microbiol.* 66: 349–370.
- Charrel R.N., Attoui H., Butenko A.M., Clegg J.C., Deubel V., Frolova T.V., Gould E.A., Gritsun T.S., Heinz F.X., Labuda M., Lashkevich V.A., Loktev V., Lundkvist A., Lvov D.V., Mandl C.W., Niedrig M., Papa A., Petrov V.S., Plyusnin A., Randolph S., Süß J., Zlobin V.I., de Lamballerie X. 2004:** Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 10: 1040–1055.
- Chu C.Y., Liu W., Jiang B.G., Wang D.M., Jiang W.J., Zhao Q.M., Zhang P.H., Wang Z.X., Tang G.P., Yang H., Cao W.C. 2008:** Novel genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks in southwestern China. *J. Clin. Microbiol.* 46: 3130–3133.

**Ivanova L.B., Tomova A., Gonzáles-Acuña D., Murúa R., Moreno C.X., Hernández C., Cabello J., Daniels T.J., Godfrey H.P., Cabello F.C. 2014:** *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere. *Environ. Microbiol.* 16: 1069–1080.

**Jones L.D., Hodgson E., Nuttall P.A. 1989:** Enhancement of virus transmission by tick salivary glands. *J. Gen. Virol.* 70: 1895–1898.

**Kahl O., Janetzki-Mittmann C., Gray J.S., Jonas R., Stein J., de Boer R. 1998:** Risk of infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato for a host in relation to the duration of nymphal *Ixodes ricinus* feeding and the method of tick removal. *Zentralbl. Bakteriol.* 287: 41–52.

**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.

**Kawada J., Kimura H., Ito Y., Hoshino Y., Tanaka-Kitajima N., Ando Y., Futamura M., Morishima T. 2004:** Comparison of real-time and nested PCR assays for detection of herpes simplex virus DNA. *Microbiol. Immunol.* 48: 411–415.

**Kazimírová M. 2008:** Pharmacologically active compounds in tick salivary glands. *Adv. Arachnol. Dev. Biol.* 12: 281–296.

**Klempner M.S., Hu L.T., Evans J., Schmid C.H., Johnson G.M., Trevino R.P., Norton D., Levy L., Wall D., McCall J., Kosinski M., Weinstein A. 2001:** Two controlled trials of antibiotic treatment in patients with persistent symptoms and a history of Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 345: 85–92.

**Křupka M., Raška M., Běláková J., Horynová M., Novotný R., Weigl E. 2007:** Biological aspects of Lyme disease spirochetes: unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 151: 175–186.

**Lebet N., Gern L. 1994:** Histological examination of *Borrelia burgdorferi* infections in unfed *Ixodes ricinus* nymphs. *Exp. Appl. Acarol.* 18: 177–183.

- Ledue T.B., Collins M.F., Craig W.Y. 1996:** New laboratory guidelines for serologic diagnosis of Lyme disease: evaluation of the two-test protocol. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2343–2350.
- 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: 921–925.
- 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. *Zentralbl. Bakteriol.* 280: 468–475.
- Lünemann J.D., Zarmas S., Priem S., Franz J., Zschenderlein R., Aberer E., Klein R., Schouls L., Burmester G.R., Krause A. 2001:** Rapid typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in specimens from patients with different manifestations of Lyme borreliosis. *J. Clin. Microbiol.* 39: 1130–1133.
- Magnuson H.J., Eagle H., Fleischman R. 1948:** The minimal infectious inoculum of *Spirochaeta pallida* (Nichols strain) and a consideration of its rate of multiplication *in vivo*. *Am. J. Syph. Gonorrhoea Vener. Dis.* 32: 1–18.
- 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.
- Mans B.J., de Klerk D., Pienaar R., Latif A.A. 2011:** *Nuttalliella namaqua*: a living fossil and closest relative to the ancestral tick lineage: implications for the evolution of blood-feeding in ticks. *PLoS ONE* 6: e23675.
- 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 analysis 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: 2427–2434.

**Margos G., Hojgaard A., Lane R.S., Cornet M., Fingerle V., Rudenko N., Ogden N., Aanensen D.M., Fish D., Piesman J. 2010:** Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissettii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. *Ticks Tick Borne Dis.* 1: 151–158.

**Margos G., Vollmer S.A., Cornet M., Garnier M., Fingerle V., Wilske B., Bormane A., Vitorino L., Collares-Pereira M., Drancourt M., Kurtenbach K. 2009:** A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 5410–5416.

**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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1817–1824.

**Matuschka F.R., Schinkel T.W., Klug B., Spielman A., Richter D. 1998:** Failure of *Ixodes* ticks to inherit *Borrelia afzelii* infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3089–3091.

**Medlock J.M., Hansford K.M., Bormane A., Derdákóvá M., Estrada-Peña A., George J.C., Golovljova I., Jaenson T.G., Jensen J.K., Jensen P.M., Kazimírová M., Oteo J.A., Papa A., Pfister K., Plantard O., Randolph S.E., Rizzoli A., Santos-Silva M.M., Sprong H., Vial L., Hendrickx G., Zeller H., Van Bortel W. 2013:** Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasit. Vectors* 6: 1.

**Miklossy J., Kasas S., Zurn A.D., McCall S., Yu S., McGeer P.L. 2008:** Persisting atypical and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and local inflammation in Lyme neuroborreliosis. *J. Neuroinflammation* 5: 40.

**Murgia R., Piazzetta C., Cinco M. 2002:** Cystic forms of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: induction, development, and the role of RpoS. *Wien. Klin. Wochenschr.* 114: 574–579.

**Murray T.S., Shapiro E.D. 2010:** Lyme disease. *Clin. Lab. Med.* 30: 311–328.

**Nadal D., Gundelfinger R., Flueler U., Boltshauser E. 1988:** Acrodermatitis chronica atrophicans. *Arch. Dis. Child.* 63: 72–74.

**Nigrovic L.E., Thompson K.M. 2007:** The Lyme vaccine: a cautionary tale. *Epidemiol. Infect.* 135: 1–8.

**Nuttall P.A., Labuda M. 2004:** Tick-host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology* 129: Suppl. S177–S189.

**Ogden N.H., Nuttall P.A., Randolph S.E. 1997:** Natural Lyme disease cycles maintained via sheep by co-feeding ticks. *Parasitology* 115: 591–599.

**Ohlenbusch A., Matuschka F.R., Richter D., Christen H.J., Thomssen R., Spielman A., Eiffert H. 1996:** Etiology of the acrodermatitis chronica atrophicans lesion in Lyme disease. *J. Infect. Dis.* 174: 421–423.

**Ohnishi J., Piesman J., de Silva A.M. 2001:** Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 670–675.

**Pal U., Li X., Wang T., Montgomery R.R., Ramamoorthi N., de Silva A.M., Bao F., Yang X., Pypaert M., Pradhan D., Kantor F.S., Telford S., Anderson J.F., Fikrig E. 2004:** TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell* 119: 457–468.

**Páleníková J. 2010:** Dynamika přenosu *Borrelia burgdorferi* sensu stricto z klíštěte *Ixodes ricinus* na hostitele. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta Jihočeské university v Českých Budějovicích, 32 pp.

**Parola P., Raoult D. 2001:** Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin. Infect. Dis.* 32: 897–928.

**Peavey C.A., Lane R.S. 1995:** Transmission of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes pacificus* nymphs and reservoir competence of deer mice (*Peromyscus maniculatus*) infected by tick-bite. *J. Parasitol.* 81: 175–178.

**Pechová J., Štěpánová G., Kovár L., Kopecký J. 2002:** Tick salivary gland extract-activated transmission of *Borrelia afzelii* spirochaetes. *Folia Parasitol.* 49: 153–159.

**Peržinová K. 2008:** Přenos spirochét *Borrelia burgdorferi* sensu stricto klíštětem *Ixodes ricinus*. Středoškolská odborná činnost.

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

**Piesman J. 1995:** Dispersal of the Lyme disease spirochete *B. burgdorferi* to salivary glands of feeding nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 32: 519–521.

**Piesman J., Mather T.N., Sinsky R.J., Spielman A. 1987:** Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. *J. Clin. Microbiol.* 25: 557–558.

**Piesman J., Schneider B.S. 2002:** Dynamic changes in Lyme disease spirochetes during transmission by nymphal ticks. *Exp. Appl. Acarol.* 28: 141–145.

**Piesman J., Schneider B.S., Zeidner N.S. 2001:** Use of quantitative PCR to measure density of *Borrelia burgdorferi* in the midgut and salivary glands of feeding tick vectors. *J. Clin. Microbiol.* 39: 4145–4148.

**Piesman J., Schwan T.G. 2010:** Ecology of Borreliae and Their Arthropod Vectors. In: D.S. Samuels and J.D. Radolf (Eds.), *Borrelia: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 251–279.

**Pollack R.J., Telford S.R. 3rd, Spielman A. 1993:** Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1251–1255.

**Postic D., Garnier M., Baranton G. 2007:** Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates – Description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. *Int. J. Med. Microbiol.* 297: 263–271.

**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.

**Prasad A., Sankar D. 1999:** Overdiagnosis and overtreatment of Lyme neuroborreliosis are preventable. *Postgrad. Med. J.* 75: 650–656.

**Purser J.E., Norris S.J. 2000:** Correlation between plasmid content and infectivity in *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 13865–13870.

**Radolf J.D., Caimano M.J., Stevenson B., Hu L.T. 2012:** Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat. Rev. Microbiol.* 10: 87–99.

**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.

**Richter D., Allgöwer R., Matuschka F.R. 2002:** Co-feeding transmission and its contribution to the perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia afzelii*. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 1421–1425.

**Richter D., Matuschka F.R., Spielman A., Mahadevan L. 2013:** How ticks get under your skin: insertion mechanics of the feeding apparatus of *Ixodes ricinus* ticks. *Proc. Biol. Sci.* 280: 20131758.

**Richter D., Postic D., Sertour N., Livey I., Matuschka F.R., Baranton G. 2006:** Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 873–881.

**Rijpkema S.G., Tazelaar D.J., Molkenboer M.J., Noordhoek G.T., Plantinga G., Schouls L.M., Schellekens J.F. 1997:** Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clin. Microbiol. Infect.* 3: 109–116.

**Rollend L., Fish D., Childs J.E. 2013:** Transovarial transmission of *Borrelia* spirochetes by *Ixodes scapularis*: a summary of the literature and recent observations. *Ticks Tick Borne Dis.* 4: 46–51.

**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., Grubhoffer L., Oliver J.H. Jr. 2011:** Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis.* 2: 123–128.



**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.

**Rudenko N., Golovchenko M., Růžek D., Piskunová N., Mallátová N., Grubhoffer L. 2009c:** Molecular detection of *Borrelia bissettii* DNA in serum samples from patients in the Czech Republic with suspected borreliosis. *FEMS Microbiol. Lett.* 292: 274–281.

**Shih C.M., Spielman A. 1993:** Accelerated transmission of Lyme disease spirochetes by partially fed vector ticks. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2878–2881.

**Schoeler G.B., Lane R.S. 1993:** Efficiency of transovarial transmission of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in the western blacklegged tick, *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 30: 80–86.

**Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L., Johne R. 2012:** PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.* 113: 1014–1026.

**Schuijt T.J., Hovius J.W., van Burgel N.D., Ramamoorthi N., Fikrig E., van Dam A.P. 2008:** The tick salivary protein Salp15 inhibits the killing of serum-sensitive *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates. *Infect. Immun.* 76: 2888–2894.

**Schuijt T.J., Hovius J.W., van der Poll T., van Dam A.P., Fikrig E. 2011:** Lyme borreliosis vaccination: the facts, the challenge, the future. *Trends Parasitol.* 27: 40–47.

**Schwaiger M., Péter O., Cassinotti P. 2001:** Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) infections using a real-time PCR assay. *Clin. Microbiol. Infect.* 7: 461–469.

**Schwan T.G., Piesman J., Golde W.T., Dolan M.C., Rosa P.A. 1995:** Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 2909–2913.

**Schwartz J.J., Gazumyan A., Schwartz I. 1992:** rRNA gene organization in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* 174: 3757–3765.

**Steere A.C., Coburn J., Glickstein L. 2004:** The emergence of Lyme disease. *J. Clin. Invest.* 113: 1093–1101.

**Steere A.C., Grodzicki R.L., Kornblatt A.N., Craft J.E., Barbour A.G., Burgdorfer W., Schmid G.P., Johnson E., Malawista S.E. 1983:** The spirochetal etiology of Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 308: 733–740.

**Steere A.C., Malawista S.E., Hardin J.A., Ruddy S., Askenase W., Andiman W.A., 1977b:** Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. *Ann. Intern. Med.* 86: 685–698.

**Steere A.C., Malawista S.E., Snyderman D.R., Shope R.E., Andiman W.A., Ross M.R., Steele F.M. 1977a:** Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum.* 20: 7–17.

**Steere A.C., Sikand V.K., Schoen R.T., Nowakowski J. 2003:** Asymptomatic infection with *Borrelia burgdorferi*. *Clin. Infect. Dis.* 37: 528–532.

**Stewart R.L., Burgdorfer W., Needham G.R. 1998:** Evaluation of three commercial tick removal tools. *Wilderness Environ. Med.* 9: 137–142.

**Strle F., Pleterski-Rigler D., Stanek G., Pejovnik-Pustinek A., Ruzic E., Cimperman J. 1992:** Solitary borrelial lymphocytoma: report of 36 cases. *Infection* 20: 201–206.

**Summerton N. 1995:** Lyme disease in the eighteenth century. *BMJ* 311: 1478.

**Štěpánová-Tresová G., Kopecký J., Kuthejlová M. 2000:** Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks from southern Bohemia using monoclonal antibodies. *Zentralbl. Bakteriol.* 289: 797–806.

**Tijssse-Klasen E., Pandak N., Hengeveld P., Takumi K., Koopmans M.P., Sprong H. 2013:** Ability to cause erythema migrans differs between *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates. *Parasit. Vectors* 6: 23.

**van der Hammen L. 1983:** Notes on the comparative morphology of ticks (Anactinotrichida: Ixodida). *Zool. Meded.* 57: 209–242.

**Vasudevan B., Chatterjee M. 2013:** Lyme borreliosis and skin. *Indian J. Dermatol.* 58: 167–174.

- Waldo E.D., Sidhu G.S. 1983:** The spirochete in erythema chronicum migrans. Demonstration by light and electron microscopy. *Am. J. Dermatopathol.* 5: 125–127.
- Wallis R.C., Brown S.E., Kloter K.O., Main A.J. Jr. 1978:** Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: field study of ticks. *Am. J. Epidemiol.* 108: 322–327.
- 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: 926–932.
- Wang G., van Dam A.P., Schwartz I., Dankert J. 1999:** Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 633–653.
- Wormser G.P., Dattwyler R.J., Shapiro E.D., Halperin J.J., Steere A.C., Klempner M.S., Krause P.J., Bakken J.S., Strle F., Stanek G., Bockenstedt L., Fish D., Dumler J.S., Nadelman R.B. 2006:** The clinical assessment, treatment, and prevention of Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 43: 1089–1134.
- Wright W.F., Riedel D.J., Talwani R., Gilliam B.L. 2012:** Diagnosis and management of Lyme disease. *Am. Fam. Physician* 85: 1086–1093.
- Yang X.F., Pal U., Alani S.M., Fikrig E., Norgard M.V. 2004:** Essential role for OspA/B in the life cycle of the Lyme disease spirochete. *J. Exp. Med.* 199: 641–648.
- 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.