

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

**Analýza invazivní schopnosti a infekčního potenciálu nově  
popsaných druhů borelie z komplexu *Borrelia burgdorferi*  
sensu lato, *B. americana* a *B. carolinensis* na laboratorním  
modelu infikovaných savců.**

Diplomová práce

**Bc. Lucie Šolcová**

Školitelka: Maryna Golovchenko, MSc.

Vedoucí práce: Nataliia Rudenko, PhD.

Fakultní garant: doc. Mgr. Tomáš Doležal, PhD.

České Budějovice 2016

Šolcová, L., 2016: Analýza invazivní schopnosti a infekčního potenciálu nově popsanych druhů borelie z komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *B. americana* a *B. carolinensis* na laboratorním modelu infikovaných savců. [Analysis of invasive capabilities and infectious potential of newly described species of borrelia from *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, *B. americana* and *B. carolinensis* on laboratory model of infected mammals. Mgr. Thesis, in Czech]. – 43p., Faculty of Science, Univerzity of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of the study was to analyze the infectious potential of the newly described species, *B. americana* and *B. carolinensis*, studied on the laboratory model mammals – mice. Our goal was to analyze and compare the vectorial capacity of two different tick vectors, *Amblyomma americanum* and *Ixodes ricinus*, in acquiring and transmission of both spirochete species to the host. The results of this study confirmed that ticks *A. americanum* and *I. ricinus* are capable to maintain and transmit *B. americana* and *B. carolinensis*. We confirmed that both analysed spirochete species, *B. carolinensis* and *B. americana*, showed the potential to develop the disease in laboratory model mammal, which indirectly support the fact that both spirochete species might be considered as the risk factors in the area where they are distributed. Our results shows that *A. americanum* is able to transmit both spirochete species, which increases that risk of acquiring the Lyme disease to human population in the area of distribution of *A. americanum*.

**Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové 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, 13. 12. 2016

.....  
Lucie Šolcová

## **Poděkování:**

Na prvním místě patří mé velké nepopsatelné děkuji mým školitelkám Marině Golovchenko, MSc. a Natashe Rudenko, PhD. a to nejen za velmi zajímavé téma, veškerou pomoc v laboratoři a za ochotu mi odpovídat na veškeré dotazy, ale hlavně za nekončící trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Prof. RNDr. Liborovi Grubhofferovi, CSc, který mi umožnil pracovat v Laboratoři molekulární biologie vektorů a patogenů. Neocenitelné děkuji patří i mým rodičům za dlouholetou podporu, které si nesmírně vážím.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	1
1.1	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato .....	1
1.1.1	Morfologie borelie .....	4
1.1.2	Přenos borelií na hostitele.....	5
1.1.3	Imunitní odpověď hostitele proti boreliím .....	6
1.1.4	Odpověď borelie na imunitní odpověď hostitele .....	7
1.2	<i>Borrelia americana</i> .....	8
1.2.1	Rozšíření <i>B. americana</i> a další vektory .....	8
1.3	<i>Borrelia carolinensis</i> .....	9
1.3.1	Rozšíření <i>B. carolinensis</i> a další vektory .....	9
1.4	Vektory <i>Ixodes ricinus</i> a <i>Amblyomma americanum</i> .....	10
<b>2</b>	<b>Cíl práce</b> .....	11
<b>3</b>	<b>Materiál a metody</b> .....	12
3.1	Příprava média BSK II a MKP pro borelie .....	12
3.2	Kultivace borelií z komplexu <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	14
3.3	Mikroskopie temného pole .....	14
3.4	Infikování laboratorního modelu savce .....	14
3.5	Metoda přímé diagnostiky .....	15
3.6	Extrakce a izolace genomové DNA z borelií, z klíšťat a z myších tkání .....	15
3.7	Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	15
3.7.1	Průkaz přítomnosti plasmidů s geny zodpovědnými za infekčnost borelií .....	17
3.7.2	Průkaz přítomnosti DNA borelií v klíšťatech a v myších tkáních .....	17
3.8	Elektroforéza.....	18
3.9	Purifikace PCR produktů .....	19
3.10	Klonování, transformace kompetentních buněk a purifikace plazmidové DNA z rekombinantu .....	19
3.10.1	Kontrola přítomnosti inzertu v plazmidu („screening“).....	19
3.11	Sekvenace .....	20
<b>4</b>	<b>Výsledky</b> .....	21
4.1	Kultivace borelií .....	21
4.2	Průkaz přítomnosti plasmidů nesoucích geny zodpovědné za infekčnost borelií....	21
4.3	Průkaz přítomnosti DNA borelií v myších tkáních .....	22
4.4	Průkaz trans-stadialního přenosu borelií z larev na nymfy.....	23

4.5	Průkaz přenosu borelií z nymf na naivní myši .....	24
4.6	Ověření DNA borelií sekvenací.....	25
4.7	Shrnutí výsledků .....	25
<b>5</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>32</b>
<b>7</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>33</b>

# 1 Úvod

Zjištění infekčního potenciálu u druhů *Borrelia americana* a *B. carolinensis* na modelu laboratorních zvířat nám poskytne příležitost k prozkoumání jejich patogeneze a rozšíří naše znalosti ohledně kompletního spektra druhů borelií schopných vyvolávat lymskou boreliózu u člověka. Tato informace je velice aktuální, protože před nedávnou dobou byla zaznamenána přítomnost obou zmíněných druhů spirochét z jihovýchodní USA v klíšťatech v Evropě. Zjištění, zda klíště *Amblyomma americanum* má schopnost udržovat a přenášet vybrané druhy borelií, nám dá šanci přehodnotit jeho roli jako potenciálního vektoru původce lymské boreliózy.

## 1.1 *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Druhy *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) patří mezi spirochéty (*Spirochaetae*). Tento kmen mimo rod *Borrelia* obsahuje další důležité významné rody jako je *Treponema* - původce syfilis člověka (Rygg & Borch 2006), *Leptospira* - leptospirózy člověka a zvířat (Reis et al., 2008) nebo *Brachyspira* - dysentérie prasat, střevní spirochetóza ptáků (Bano et al., 2008; Leser et al., 2000).

Rod *Borrelia* můžeme rozdělit do dvou fyletických skupin, které způsobují různé onemocnění. Jedna skupina způsobuje návratnou horečku (např. *Borrelia hermsii*, *B. lonestari*). Druhá skupina způsobuje lymskou boreliózu (LB), jejichž komplex se souhrně nazývá *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) (Ras et al., 1996; Rudenko et al., 2011). Tento komplex se neustále rozrůstá, nyní zahrnuje 21 pojmenovaných druhů (Tab. 1). Komplex *Borrelia burgdorferi* s.l. se skládá z: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (s.s.) (Johnson et al., 1984), *B. afzelii* (Canica et al., 1993), *B. americana* (Rudenko et al., 2009a), *B. andersonii* (Marconi et al., 1995), *B. bavariensis* (Margos et al., 2009), *B. bisseectii* (Postic et al., 1998), *B. californiensis* (Postic et al., 2007), *B. carolinensis* (Rudenko et al., 2009b), *B. finlandensis* (Casjens et al., 2011), *B. garinii* (Baranton et al., 1992), *B. chilensis* (Ivanova et al., 2014), *B. japonica* (Kawabata et al., 1993), *B. kurtenbachii* (Margos et al., 2010), *B. lusitaniae* (Le Fleche 1997), *B. mayonii* (Pritt et al., 2016), *B. sinica* (Masuzawa et al., 2001), *B. spielmanii* (Richter et al., 2006), *B. tanukii* (Fukunaga et al., 1996), *B. turdi* (Fukunaga et al., 1996), *B. valaisiana* (Wang et al., 1997) a *B. yangtze* (Chu et al., 2008).

Ne každý druh borelie je schopen infikovat člověka (Wang et al., 1999). LB u lidí způsobují převážně tři druhy spirochét z komplexu *B. burgdorferi* s.l. a to je *B. burgdorferi* s.s. v USA a v Evropě (Fingerle et al., 2008) a *B. garinii* a *B. afzelii* v Euroasii (Strle et al., 2006). Nicméně, ze vzorků člověka se občas izolují i další druhy a to *Borrelia valaisiana* (Evropa a Turecko) (Diza et al., 2004), *B. spielmanii* (Evropa) (Fingerle et al., 2008), *B. lusitaniae* (Evropa) (Collares-Pereira et al., 2004), *B. americana* a *B. andersonii* (Florida, Georgia, USA) (Clark et al., 2013), *B. bissettii* (USA, Evropa) (Rudenko et al., 2016, 2009c) a *B. mayonii* (USA) (Pritt et al., 2016).

LB je nejrozšířenější klíšťaty přenášené onemocnění na světě (podle oficiálních statistik až 85 500 pacientů ročně v Evropě a více než 300 000 v USA). Epidemiologické studie jasně ukazují velký nárůst tohoto onemocnění v poslední době (celkový počet lidí s diagnózou LB je 10x vyšší každým rokem) (Hubálek 2009). LB probíhá ve třech stádiích (kožní infekce, nervové postižení a chronická artritida) (Hubálek et al., 2009; Nau et al., 2009; Smith et al., 2002). Nicméně infekce jsou dost variabilní, některá stádia nemusí proběhnout, či můžou probíhat bez jasných symptomů, nebo naopak mohou být závažnější, pokud klíště kromě původce LB přenáší i jiné patogeny např. *Babesia microti* (Steere et al., 2004; Swanson et al., 2006). Klinické projevy závisí i na druhu borelie, která infikovala člověka: např. *Borrelia afzelii* infikuje hlavně kůži, *B. garinii* postihuje nejvíce nervovou soustavu a *B. burgdorferi* s.s. má afinitu k postižení kloubů (Ryffel et al., 1999). Klinické příznaky se liší i geograficky např. v Severní Americe u 60% neléčených pacientů borelie postihují hlavně klouby (kvůli tomu, že v USA je hlavním druhem borelie *B. burgdorferi* s.s.) ale v Evropě jen u 3 až 15% pacientů (*B. burgdorferi* s.s. se zde vyskytuje zřídka) (Steere 1989).

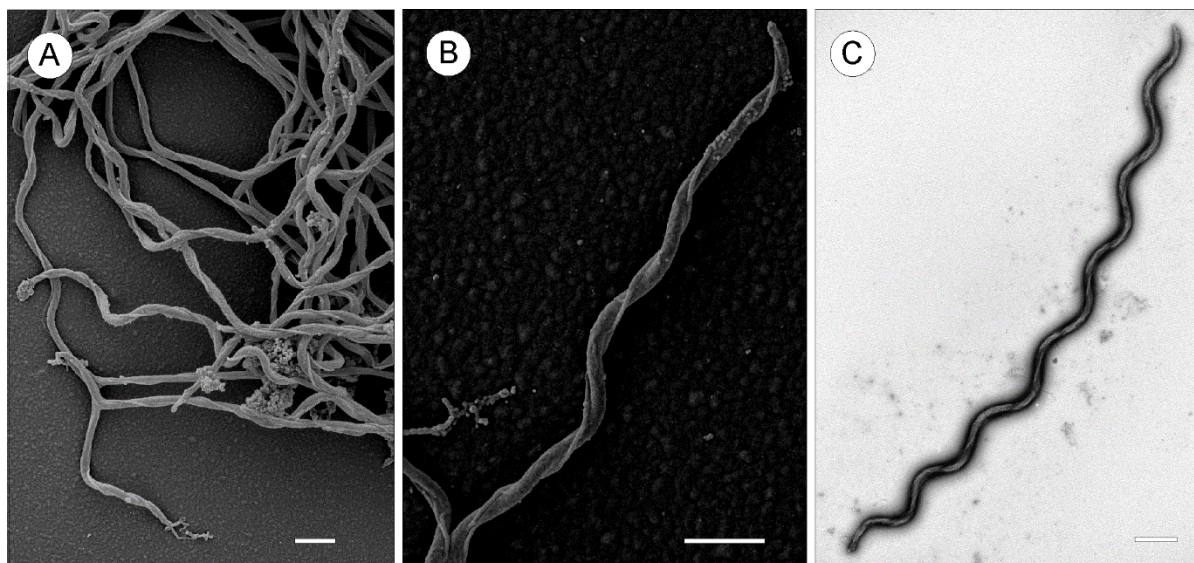
Tab. 1: Seznam druhů borelie (GEOG. ROZ.: geografické rozšíření, PAT: patogeneze).

DRUH	GEOG. ROZ.	VEKTOR	REZERVOÁR	PAT	REFERENCE
<i>B. chilensis</i>	Jižní Amerika	<i>I. stilesi</i>	hlodavci pudu jižní	-	Ivanova et al., 2014
<i>B. americana</i>	USA	<i>I. minor</i> <i>I. pacificus</i>	ptáci	+	Rudenko et al., 2009a Clark et al., 2013
<i>B. andersonii</i>	USA	<i>I. dentatus</i>	králíci	+	Marconi et al., 1995 Clark et al., 2013
<i>B. californiensis</i>	USA	<i>I. pacificus</i> <i>I. jellisonii</i> <i>I. spinipalpis</i>	jelenec tarbíkomyš	-	Postic et al., 2007
<i>B. carolinensis</i>	USA	<i>I. minor</i>	hlodavci ptáci	-	Rudenko et al., 2009b
<i>B. mayonii</i>	USA	<i>I. scapularis</i>	-	+	Pritt et al., 2016
<i>B. bissettii</i>	USA Evropa	<i>I. ricinus</i> <i>I. scapularis</i> <i>I. pacificus</i> <i>I. minor</i>	hlodavci	+	Postic et al., 1998 Rudenko et al., 2008 Rudenko et al., 2009c Girard et al., 2011
<i>B. burgdorferi</i> <i>s.s.</i>	USA Evropa	<i>I. ricinus</i> <i>I. scapularis</i>	hlodavci, ptáci, savci, ještěrky	+	Baranton et al., 1992 Picken et al., 1996
<i>B. kurtenbachii</i>	USA Evropa	<i>I. scapularis</i>	hlodavci	-	Margos et al., 2010
<i>B. spielmanii</i>	Evropa	<i>I. ricinus</i>	hlodavci	+	Richter et al., 2006 Földvári et al., 2005
<i>B. finlandensis</i>	Evropa	<i>I. ricinus</i>	-	-	Casjens et al., 2011
<i>B. lusitaniae</i>	Evropa Sev. Afrika	<i>I. ricinus</i>	hlodavci ještěrky	+	LeFleche et al., 1997 Collares-Pereira et al., 2004
<i>B. bavariensis</i>	Evropa Asie	<i>I. ricinus</i> <i>I. persulcatus</i>	hlodavci	+	Margot et al., 2009, 2013
<i>B. afzelii</i>	Evropa Asie	<i>I. ricinus</i> <i>I. persulcatus</i>	hlodavci	+	Canica et al., 1993 Rijpkema et al., 1997
<i>B. garinii</i>	Evropa Asie	<i>I. ricinus</i> <i>I. persulcatus</i> <i>I. hexagonus</i> <i>I. nipponensis</i>	hlodavci ptáci ještěrky	+	Baranton et al., 1992 Rijpkema et al., 1997 Ryffel et al., 1999
<i>B. valaisiana</i>	Evropa Asie	<i>I. ricinus</i> <i>I. granulatus</i>	ptáci ještěrky	+	Wang et al., 1997 Ryffel et al., 1999
<i>B. sinica</i>	Čína	<i>I. ovatus</i>	hlodavci	-	Masuzawa et al., 2001
<i>B. yangtze</i>	Čína	<i>I. granulatus</i> <i>I. haemaphysalis</i>	hlodavci	-	Chu et al., 2008
<i>B. japonica</i>	Japonsko	<i>I. ovatus</i>	hlodavci	-	Kawabata et al., 1993
<i>B. tanuki</i>	Japonsko	<i>I. tanuki</i>	psi, kočky	-	Fukunaga et al., 1996
<i>B. turdi</i>	Japonsko	<i>I. turdus</i>	ptáci	-	Fukunaga et al., 1996



### 1.1.1 Morfologie borelie

Borelie jsou charakteristické protáhlým spirálovitým tvarem s počtem závitů 3 až 10. Jejich délka se pohybuje od 3 do 40  $\mu\text{m}$  a šířka dosahuje až 0,5  $\mu\text{m}$  (Mahon et al., 2014).



Obr. 1: Typický spirálovitý tvar *Borrelia burgdorferi* (převzato z Rudenko et al., 2016).

Stavba borelie je unikátní. Buněčná stěna je flexibilní a skládá se ze tří vrstev - lipoproteinová, liposacharidová a peptidoglykanová (Barbour & Hayes 1986; Goldstein et al., 1996). Boreliím chybí bakteriální lipopolysacharid (Takayama et al., 1987). Mezi membránami je periplazmatický prostor a v něm se nachází bičíky (7-11), které obtáčí celou buňku borelie (Motaleb et al., 2000). Tyto bičíky rotují, smršťují se a natahují, což umožňuje rychlý šroubovitý pohyb bakterie a tím i průnik do jiných buněk nebo k překonání epiteliálních či hematoencefalických bariér (Harman et al., 2013; Grab et al., 2005).

Borelie mají složitý a neobvyklý genom - malý lineární chromozom (velikostně až 1Mb) a navíc velký počet plazmidů - 21, z nichž 9 je cirkulárních a 12 lineárních (Fraser et al., 1997). Na plasmidech bylo detekováno 430 možných genů (ORF - „open reading frames“), ze kterých jsou jen 16% identifikované. Některé z plazmidů se uplatňují při patogenezi borelie. Mezi nejdůležitější patří lp25 (kódují gen *pncA*), lp28-1 (gen *vlsE*), lp36 (gen *adeC*) (Jewett et al., 2007; Lawrenz et al., 2004; Purser et al., 2003). Dojde-li ke ztrátě důležitých plazmidů (např. pasážováním), může dojít i ke ztrátě infekčnosti (Purser & Norris et al., 2000).

Antigeny borelií jsou vázány hlavně na povrchu borelií („Outer surface proteins“ neboli vnější povrchové proteiny - OspA až OspF, VlsE atd.) a i na bičících (bičíkový flagelin FlaA, FlaB). Borelie mohou antigeny měnit podle toho, v jaké fázi životního cyklu se nachází, což

způsobuje vysokou toxicitu a umožňuje vyhnout se imunitním reakcím napadeného organismu (Hefty et al., 2002). Mimo tyto nejdůležitější antigeny obsahuje borelie další antigeny, které se podílejí na šíření infekce nebo buněčné adhezi, např. protein Dbp („Decorin binding protein“), lipoprotein BBK 32, protein Bgp („Borelia glycosaminoglycans binding protein“) a další (Cluss et al., 2004; Fischer et al., 2006; Guo et al., 1995).

Borelie se před nepříznivými podmínkami (změna okolního prostředí, pH, teploty, změna složení kultivačních médií, antibiotická léčba, imunitní obranná činnost hostitele) dokáže bránit několika způsoby. Borelie jsou adaptovány na nízké hladiny železa, dokáže tvořit tzv. ne-spirální formy (reverzibilní cysty), odškrtnit buněčnou stěnu (granula) či cytoplazmatickou membránu (bleb) nebo tvořit kolonie tzv. biofilmy, které sekretují na povrch ochranné extracelulární polymerní látky (Aguirre et al., 2013; Garon et al., 1989; Kersten et al., 1995; 2011; Sapi et al., 2012; Stricker & Johnson).

### 1.1.2 Přenos borelií na hostitele

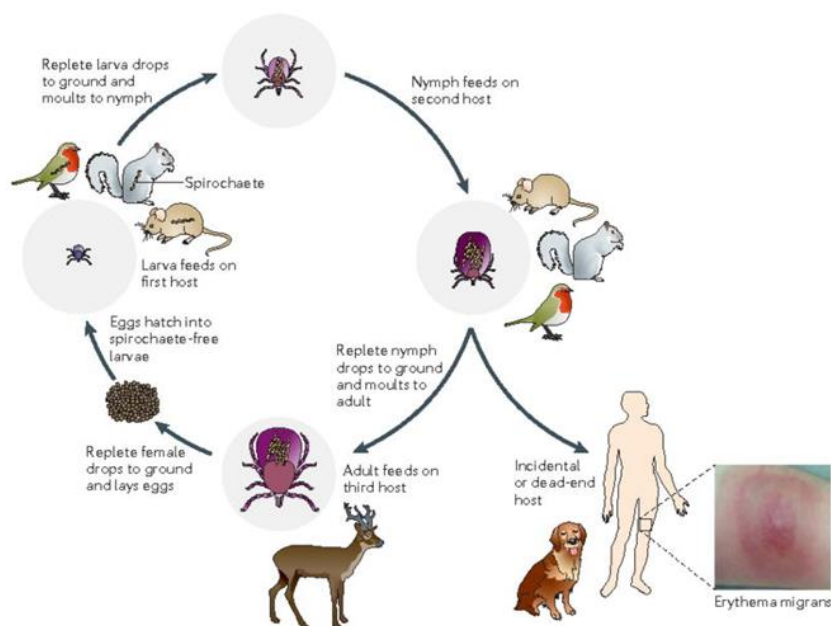
Nejčastější přenašeči borelie jsou klíšťata rodu *Ixodes*. V Severní Americe je to hlavně *I. scapularis* (dříve *I. dammini*) a *I. pacificus* (Bissett & Hill 1987; Persing et al., 1990). *I. dammini* byl v 90 letech uznán za stejný druh jako *I. scapularis* (Oliver et al., 1993). V Evropě jsou nejrozšířenějším vektorem *I. ricinus* a v Asii *I. persulcates* (Gem & Humair 2002; Fukunaga et al., 1995). Předpokládá se, že se na přenosu borelií může podílet i krevsající hmyz např. mouchy rodu *Tabanidae*, komáři rodu *Aedes*, *Culex*, blechy a muchničky, ale přenos na člověka nebyl doposud stoprocentně prokázán (Kosik-Bogacka et al., 2007; Magnarelli & Anderson 1988; Netušil et al., 2013).

Neinfikovaná klíšťata (všechny jejich stádia – larva, nymfa, imago) získávají borelie z infikovaných zvířat při sání krve a přenáší si infekci i do dalších vývojových stádií. Avšak k vertikálnímu přenosu nedochází: po posledním krmení samice kladou vajíčka ve kterých přítomnost *B. burgdorferi* s.l. prozatím nebyla prokázána (Hovius et al., 2007; Radolf et al., 2012). Klíšťata mohou být infikovaná i více než jedním druhem borelií z komplexu *B. burgdorferi* s.l. (Rauter et al., 2005).

Přirozeným hostitelem borelií je mnoho obratlovců (až 237 různých druhů zvířat), mezi nejhlavnější patří malí savci a ptáci, ale můžeme je objevit i v ještěrkách (Anderson et al., 1986; Anderson & Magnarelli 1984; Clark et al., 2005; Levin et al., 1996; Rudenko et al., 2011). Některé druhy borelie mají často spojitost s určitým druhem zvířete - hostitele.

Například *B. afzelii*, *B. japonica*, *B. bissetii* preferuje malé hlodavce, ale *B. garini* a *B. valaisiana* nebo *B. turdi* malé ptáky. Tato hostitelská specificita je dána citlivostí nebo odolností různých druhů borelií ke komplementu hostitele. Tato citlivost přiřazuje mnoha druhům obratlovců status rezervoárového hostitele v přírodě (Hanincova et al., 2003; Kurtenbach et al., 2002). *B. burgdorferi* s.s. nevykazuje žádnou preferenci hostitele a proto se jí říká generalista (Hanincova et al., 2008).

Náhodným hostitelem borelií může být i člověk. Člověka dokáží nakazit všechna infikovaná stádia klíšťat, ale většinou jsou za přenos spirochét odpovědné nymfy (Radolf et al., 2012). Zda se infekce předá, záleží na několika faktorech např. doby sání, komplementu, počtu či generační době spirochét. Pouze 1/3 nakažených klíšťat je schopná předat infekci (Bartůněk 2013). Spirochety se předávají během sání klíštěte prvních 24 hodin, ke vzniku infekce je však většinou zapotřebí delší doby a to 48 hodin (Piesman et al., 1987).



Obr. 2: Enzootický cyklus *Borrelia burgdorferi* s.l. (převzato z Radolf et al., 2012).

### 1.1.3 Imunitní odpověď hostitele proti boreliím

Silná imunitní odpověď se začíná indukovat při sání klíštěte, když borelie infikují hostitele. Imunitní odpovědi se účastní jak vrozená (nespecifická) tak i specifická imunita. Vrozená imunita zahrnuje komplement, fagocyty (makrofágy, neutrofily a dendritické buňky), NK buňky („natural killer cells“) a cytokiny (Akira 2003; Berende et al., 2010).

V boji proti boreliím se nejprve účastní komplement (C3 proteasa B), který se naváže na povrch borelií a zahajuje mnoho reakcí např. zvýšený transport leukocytů do místa infekce, narušování membrány nebo přímou lýzi borelií (Gros et al., 2008; Hovius et al., 2007).

Klíčovou rolí v rozpoznání borelií a v aktivaci vrozené imunity dále hrají i některé specifické komponenty patogenů („PAMP - Pathogen-associated molecular patterns“), které se u hostitele běžně nenachází. (Akira & Takeda 2004 absent in the reference list). Tyto signály přijímají speciální receptory („PRRs - pattern recognition receptors“), ke kterým patří např. Toll-like receptor (TLR1 a 2), NOD-like receptor (NOD2 - „Nucleotide-binding oligomerization domain protein“) nebo C-lektin receptor (MR - manóza) (Berende et al., 2010; Oosting et al., 2010; Wooten et al., 2002; Wang et al., 2004). Jejich úlohou je aktivace makrofágů a fagocytů, které stimulují tvorbu protizánětlivých cytokinů a účastní se fagocytózy (Berende et al., 2010; Cinco et al., 2001; Oosting et al., 2010).

Borelie indukuje kromě protizánětlivých cytokinů (IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ ) i anti-zánětlivé cytokiny (IL-10), chemokiny (IL-8), adhezivní molekuly (např. E-selektin) nebo oxid dusnatý vyráběný neutrofyly a makrofágy (Berende et al., 2010; Burns et al., 1997; Giambartolomei et al., 1999; Ma et al., 1994).

V pozdější fázi infekce antigeny prezentující buňky (např. makrofágy, dendritické buňky) mohou migrovat do lymfatických uzlin a stimulovat tak specifickou imunitu B/ T lymfocytů (Tilly et al., 2008).

#### **1.1.4 Odpověď borelie na imunitní odpověď hostitele**

Borelie v boji proti hostitelské imunitě má několik strategií. Mezi nejdůležitější strategií patří inhibice komplementu různými způsoby (Hellwage et al., 2001; Kraiczy et al., 2001; Schuijt et al., 2008). Sliny klíštěte mají mnoho imunosupresivních faktorů např. dokáží inhibovat makrofágy, fagocyty, cytokiny, T/B buňky, superoxid i oxid dusnatý (Hannier et al., 2003; Kuthejlová et al., 2001; Slamova et al., 2011). Borelie dokáže změnit expresi svých povrchových proteinů (př. vlsE) (Zhang & Norris 1998). Důležitou roli hrají i různé proteiny, které umožňují přilnutí k různým tkáňovým strukturám a napomáhají tak přetrvání borelií v organismu (protein BBK32 na fibronektin) (Fischer et al., 2006). Patří sem také již zmiňované rezistenční formy borelie, jako jsou cysty, bleby a biofilmy (Kersten et al., 1995; Stricker & Johnson 2011; Sapi et al., 2012).

Pro lehčí průnik borelií do celého organismu napomáhá vazba plasminogenu na povrchvé proteiny ERPC, ERPA a ERPP. Plasminogen se aktivuje na serinovou proteázu plasmin, který vede k degradaci extracelulárních matrix a membrán hostitele (Brissette et al., 2009). Díky tomuto fibrinolytickému systému se borelie dokáží šířit do různých tkání jako např. mozek, srdce, klouby nebo oči (Anderson 1985; Gebbia et al., 1999; Grab et al., 2005).

## 1.2 *Borrelia americana*

Rudenko a kolegové (2009a) objevili v roce 2009 nový druh borelie, který pojmenovali *Borrelia americana*. V letech 1993 až 1999 v Jižní Karolíně a v jihovýchodní USA bylo nasbíráno celkem 118 vzorků z různých ptáků, hlodavců a klíšťat. Analýza všech vzorků prokázala, že se sedm z nich lišilo od ostatních a představovalo nový druh. Nová *B. americana* byla izolována z nymf klíštěte *Ixodes minor* posbíraných z ptáka střízlíka karolinského (*Thryothorus ludovicianus*) a z pipila rudookého (*Pipilo erythrophthalmus*) ze Severní Karolíny (Rudenko et al., 2009a). Nově objevený druh měl velkou podobnost se vzorkem patřícím do dříve popsané skupiny genomospecies 1, která ale kvůli malému množství vzorků nebyla označena jako nový druh. Vzorek genomospecies 1 byl izolován ze vzorků z *Ixodes Pacificus* z Kalifornie (1989-1991) (Schwan et al., 1993; Rudenko et al., 2009a).

Odlišnost nového druhu *B. americana* od ostatních *B. burgdorferi* s.l. byla prokázána pomocí multilokusové sekvenční analýzy, která zahrnovala sekvenční analýzy genů kódujících 16S rRNA, *p66*, *ospA*, *flagellin* a IGS (intergenic spacer) a fylogenetickou analýzu ze sekvence z uvedených fragmentů. RFLP metoda („restriction fragment length polymorphism“) ukázala, že *B. americana* má dvě podskupiny A a B (Rudenko et al., 2009a).

### 1.2.1 Rozšíření *B. americana* a další vektory

Později byla *B. americana* dále potvrzená ve vzorcích z různých druhů klíšťat a hostitelů (převážně ptáci) a i v různých částech světa. *Borrelia americana* také byla izolována z *I. pacificus* a *Dermacentor occidentalis* parazitující na leguánovi (*Sceloporus occidentalis*) z jižní Kalifornie (Lane et al., 2013).

V Kalifornii (San Francisco) byla *B. americana* objevena v klíšťatech *Ixodes pacificus*. Testování byli 5960 *I. pacificus*, 40 *I. spinipalpis* a malí savci v letech 2009 až 2012. Z celkového počtu bylo 218 izolátů pozitivních na *Borrelia burgdorferi* s.l. a mezi různými

druhy borelií byla potvrzena i přítomnost *B. americana* a to v *Ixodes pacificus* (Fedorova et al., 2014).

Další nová studie ukazuje, že *B. americana* byla detekována v nymfě *Ixodes auritulus* parazitující na drozdovi pruhokřídlem (*Ixoreus naevicus*) na ostrově Vancouver při pobřeží kanadské provincie Britské Kolumbie. Mimo jiné *B. americana* se zaznamenala i v dalších 4 nymfách *I. auritulus*, které byly posbírány z jiného ptáka - pipila skvrnitého (*Pipilo maculus*) (Scott & Foley 2016).

*B. americana* byla objevena v klíštěti *Ixodes pararicinus* parazitující na savcích a to na skotu a na jelenech v Uruguay (Jižní Amerika) (Barbieri et al., 2013). V Jižní Americe byla *B. americana* dále zaznamenána i v Argentině a to také v klíštěti *I. pararicinus* (Nava et al., 2014).

Další výskyt *B. americana* byl dokonce nově zaznamenán i v Číně v oblasti Heilongjiang. *B. americana* byla tady detekována v klíštěti *Ixodes persulcatus*. Pomocí sekvenace se zjistilo, že tato čínská *B. americana* má velkou podobnost (99,8%) s americkým kmeny SCW-30f, SCW-41, SCW-32 borelie (Yu et al., 2016).

### **1.3 *Borrelia carolinensis***

Další druh borelie byl objeven roku 2009 ve vzorků ucha hlodavců – 9 vzorků z amerických křečků (*Peromyscus gossypinus*) a 6 vzorků z lesomyši (*Neotoma floridana*) a 1 vzorek z klíštěte *Ixodes minor* (sajícím na *N. floridana*) v 5 oblastech Jižní Karolíny. Multilokusová sekvenční analýza odhalila u 16 vzorků (z celkového počtu 118) neznámý RFLP vzorec u rrf-rrl mezigenového úseku a genů pro *flagellin*. Odlišné nukleotidy v sekvenci 16S rRNA také oddělovaly tento druh od jiných druhů borelie. Výsledky multilokusové sekvenční analýzy tedy potvrdily existenci nového druhu borelie patřící do komplexu *B. burgdorferi* s.l., který byl pojmenován podle oblasti výskytu jako *Borrelie carolinensis* (Rudenko et al., 2009b, 2011).

#### **1.3.1 Rozšíření *B. carolinensis* a další vektory**

V letech 2014 Foley a jeho kolegové našli *B. carolinensis* v pustinné oblasti v klíštěti *Ixodes minor* sajícím na *Microtus californicus scirpensis* (izolovaný poddruh hraboše kalifornského). Hlodavci byli pochyťáni podél řeky Amargosa poblíž Tecopa Hot Springs (Kalifornie) (Foley et al., 2014).

*B. carolinensis* byla dokonce objevena i v Evropě. V roce 2010 Cotté a jeho kolegové posbírali celkem 572 *I. ricinus* v lesích v západní Francii. Tato klíšťata byla infikována různými patogeny, ale 35 (6,1%) klíšťat bylo pozitivních na *B. burgdorferi* s.l. Kromě *Borrelia garinii* a *B. afzelii* byla také potvrzena přítomnost *B. carolinensis* v analyzovaných klíšťatech. Jednalo se tedy o první záznam *B. carolinensis* v Evropě (Cotté et al., 2010).

*B. carolinensis* byla detekována i v Číně. Ve zvorcích DNA extrahovaných z klíšťat z 10 oblastí v 8 provinciích Číny. *B. carolinensis* byla jednou z 8 DNA objevených v analyzovaných klíšťatech, 4 vzorky pocházeli z klíšťete *Haemaphysalis longicornis* a odpovídaly *Borrelia carolinensis* (Yu et al., 2016).

#### **1.4 Vektory *Ixodes ricinus* a *Amblyomma americanum***

Klíště *Ixodes ricinus* je rozšířeno hlavně v Evropě a považuje se za plnohodnotný vektor borelií, které způsobují onemocnění LB (Jaenson et al 2011, Cotté et al, 2010).

*Amblyomma americanum* se hojně vyskytuje v USA (Stromdahl et al., 2015). Zda klíšťe *A. americanum* je schopno být kompetentním vektorem spirochét komplexu *B. burgdorferi* s.l. je ale stále otázkou. *A. americanum* má ve slinách biologicky aktivní látky, které dokáží ničit borelie. Z tohoto důvodu se spekulovalo, že je velice nepravděpodobné, že by *A. americanum* mohlo přenášet borelie (Zeidner et al., 2009). Avšak tento výrok potvrzuje i vyvrací několik studií. Například nedávná studie Stromdahl a kolegů (2015) nepotvrdili přítomnost borelií ani v jednom klíšťeti *A. americanum* z 1097 analyzovaných klíšťat. Oproti tomu další studie tutu hypotézu vyvrací. Od dvou různých lidí, prokazujících typické příznaky LB – erythemu migrans, žijících v lokalitě New Jersey, byla odebrána klíšťata *A. americanum*, ve kterých byla potvrzená DNA *B. burgdorferi* s.s., dále byla DNA borelie potvrzená i u samostatných nymf (3,4%) a imág (5,4%) (Schultz et al., 1984). Teltow a kolegové (1991) taktéž izolovali *B. burgdorferi* z *A. americanum* posbíraných v Texasu (0,84%). *B. burgdorferi* (1,9%) byla také detekována v klíšťatech *A. americanum* shromážděných v jihovýchodním Missouri a jeho okolí, kde se běžně vyskytuje LB (Feir et al., 1994). Rudenko a její kolegové potvrdili přítomnost DNA vybraných ospC typů *B. burgdorferi* s.s. v populaci *A. americanum* z Floridy, USA (Rudenko et al., 2016). Relativně nová studie dokonce detekovala DNA *B. burgdorferi* s.l. v *A. americanum* odebraných z lidí pocházejících z Floridy a Georgii (Clark et al., 2013).

## 2 Cíl práce

- 1) Za použití metody přímé diagnostiky studovat infekční potenciál druhů borrelií, *B. americana* a *B. carolinensis* na laboratorních zvířatech.
- 2) Analyzovat a srovnávat schopnost dvou různých vektorů *Amblyomma americanum* a *Ixodes ricinus* zachovávat a přenášet infekci na hostitele.
- 3) Interpretovat získané výsledky z hlediska potenciálního rizika nákazy lymfskou boreliózou pro lidi v oblastech, kde byla zjištěna přítomnost klíšťat *A. americanum* a dvou druhů *Borrelie*.



### 3 Materiál a metody

Tab. 2: Přehled použitých přístrojů.

Centrifugy	Centrifuge 5415 R (Eppendorf), Centrifuge 5415D (Eppendorf)
Inkubátor	Thermomixer (Eppendorf)
Mikroskop s temným polem	Leica DM 1000 LED (Leica)
Petroff - Hausserova komůrka	hloubka: 0,02 mm, Hausser Scientific, PA, USA
Vortex	V1+ plus (Biosan)
Homogenizátor	TissueeLyser II (Qiagen)
PCR box	DNA/RNA UV cleaner UVC/T-M-AR (Biosan)
PCR cycler	Mastercycler personal (Eppendorf)
Elektroforéza	OVL Easycast™ B2 (Thermo scientific)
Fotosystém na focení gelů	Kodak
Flow box	ESCO Class II BSC
Třepačka	GallenKamp

Tab. 3: Přehled použitých chemikálií a kitů.

Médium pro kultivaci borelií	BSK II	protokol P. Rosa (Tab. 4)
	MKP	protokol E. Ruzic – Sabljic (Tab. 6)
Izolace DNA	gDNA	DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen)
	pDNA	QIAprep® Spin Miniprep Kit
PCR Semi-nested PCR	2x Master mix	Taq DNA polymeráza 400 μM dATP, 400 μM dGTP, 400 μM dCTP, 400 μM dTTP, 3mM MgCl <sub>2</sub> (Promega)
Nested PCR	2x Master mix	HotStarTaq DNA Polymeráza 400 μM dATP, 400 μM dGTP, 400 μM dCTP, 400 μM dTTP, 3 mM MgCl <sub>2</sub> (Qiagen)
Elektroforéza	Agarózový gel	1x TAE pufr, 0.9 -2.5% agarosa (Serva)
	50x TAE pufr	200 mM Tris - HCl, 50 mM EDTA
	6x DNA Loading dye	0.03 % bromophenol blue, 0.03 % xylene cyanol, FF, 0.4 % orange G, 15 % Ficoll™ 400, 10 mM Tris - HCl (pH 7.5) a 50 mM EDTA (pH 8.0) (MBI Fermentas)
	Marker	100 bp Gene Ruler (Promega)
Purifikace PCR produktu	Kolonky	Ultrafree®-DA DNA extraction from agarose gels (Millipore)
Klonování a transformace		TOPO TA Cloning Kit For Sequencing (Invitrogen)

#### 3.1 Příprava média BSK II a MKP pro borelie

Médium BSK II bylo připraveno podle protokolu Dr. P. Rosa (Rocky Mountain Laboratory, USA). Látky CMRL, neopeptone a BSA byly míchány dohromady až do rozpuštění, poté k nim byly přidány další látky (Tab. 4) až na želatinu. Přidání želatiny vyžadovalo nejprve rozpuštění v horké vodě, pak byla přimíchána k základnímu roztoku. pH roztoku bylo upraveno na 7,6 pomocí NaOH. Hotový roztok při teplotě 55°C byl následně přefiltrován skrz 0,2 μm filtr, pak bylo přidáno králičí sérum. Toto médium bylo rozděleno do

zkumavek po 50 ml a uschováno v mrazáku při - 20 °C. (Dr. Rosa P., <http://www.niaid.nih.gov>).

Tab. 4: Složení média BSK II.

Látka	Množství g/l
10x CMRL	9,7
Neopeptone	5
BSA	50
Yeastolate	2
HEPES	6
Glukóza	5
Citrát sodný	0,7
Pyruvát sodný	0,8
N-acetyl glukózamin	0,4
Hydrogenuhličitan sodný	2,2
Želatina	10

\*Králičí sérum – 60 ml na 1 liter média.

Druhé médium MKP bylo připraveno podle protokolu Prof. E. Ruzic – Sabljic (University of Ljubljana, Institute of Microbiology and Immunology, Slovinsko). Základní médium bylo připraveno následujícím způsobem: látky (Tab. 5), které byly ve formě prášku byly rozpuštěny v 750 ml destilované vodě, následně bylo přimícháno 100 ml 10x CMRL. pH roztoku bylo upraveno na 7,6 pomocí NaOH a médium bylo doplněno destilovanou vodou pro konečný objem 1 liter. Tento základní roztok byl sterilizován přefiltrováním skrz 0,2 µm filtr a rozdělen do 50 ml zkumavek a uschováván na -20°C po dobu do 3 měsíců.

MKP kultivační médium bylo pak připraveno ze základního roztoku. Zbytek látek (želatina, králičí sérum a BSA) byly zahřáty na 33°C a poté se přidaly k základnímu roztoku. Hotové médium bylo přefiltrováno přes 2,2 µm filtr a skladováno v lednici (+4°C) po dobu maximálně jednoho měsíce. MKP médium se nezmrazuje a používá se jen kátkou dobu.

Tab. 5: Složení základního média MKP.

Látka	Množství g/l
10x CMRL	9,7
Neopeptone	3
HEPES	6
Glukóza	3
N-acetyl glukózamin	0,4
Hydrogenuhličitan sodný	2
Kyselina citrónová	0,7
Kyselina pyrohroznová	0,8

Tab. 6: Složení kompletního média MKP.

Látka	Množství ml
Základní médium MKP	1000
Želatina 7%	200
Králičí sérum	72
BSA	35

### 3.2 Kultivace borelií z komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Za sterilních podmínek byly jednotlivé kultury (ze zmražených zásobných kultur) nasázeny očkovací kličkou do již připraveného 10 ml BSK II a MKP média. Kultivace borelií probíhala *in vitro* při 34°C a při pokojové teplotě. V průběhu inkubace se vzorky kontrolovaly v pravidelných intervalech. Růst kultury byl pozorován pod mikroskopem v temném poli a pouze nekontaminované a dobře narostlé (nad  $10^7$ ) kultury byly využity pro další experimenty.

### 3.3 Mikroskopie temného pole

Pomocí mikroskopu byla zjištěna životnost, nárůst a čistota kultury. Borelie byly sledovány pod objektivem 10x nebo 40x. Pro stanovení celkového počtu borelií ve vzorku byla využita Petroff - Hausserova komůrka. Vzorek (10  $\mu$ m) byl přenesen pipetou do komůrky. Pro stanovení koncentrace byl spočítán průměrný počet bakterií v úhlopříčce pěti větších čtverců Petroff- Hausserovy komůrky. Koncentrace buněk v 1 ml kultury byla spočítána pomocí vzorku  $A \times 1,25 \cdot 10^6$ , kde A je průměrný počet bakterií ve větším čtverci počítací komůrky.

### 3.4 Infikování laboratorního modelu savce

K inokulaci laboratorních myší se zvolila narostlá kultura, která nebyla kontaminována (*Borrelia americana* kmen SCW-30E a *Borrelia carolinensis* kmen SCW-13). Tato kultura byla naředěna na požadovanou koncentraci  $10^5$  spirochét ve 100  $\mu$ l média.

K inokulaci byly použity bílé laboratorní myši kmene CD1 z chovu Parazitologického Ústavu. Každá myš byla infikována stejným množstvím borelie ( $10^5/100 \mu$ l) subkutánně na krku injekční jehlou. Celkem bylo inokulováno 12 myší (4 myši - *Borrelia americana*, další 4 myši *Borrelia carolinensis*, 2 myši čistým médiem BSK bez borelií, které sloužily jako negativní kontrola a 2 myši *B. burgdorferi* s.s., které sloužily jako pozitivní kontrola).

### 3.5 Metoda přímé diagnostiky

První odběr tkání proběhl po týdenním infikování myši. Pomocí nůžek byl ustříhnut myším kousek tkáně z ucha. Kousek ucha se poté odebíral ještě dvakrát ve druhém a v šestém týdnu pro následnou analýzu pomocí PCR na přítomnost DNA borelie. Na infikovaných myších se nechaly krmit neinfikované larvy klíšťat *Ixodes ricinus* a *Amblyomma americanum*. Larvy klíšťat se pak nechaly vylíhnout do dalšího stádia (nymfy). Tyto nymfy byly nasazené na neinfikované (naivní) myši a po nasátí a odpadnutí klíšťat byly myši ponechané po dobu šesti týdnů pro detekci vyvíjení případné infekce. Po těchto šesti týdnech byly myši usmrceny a u každé myši se při pitvě odebírala krev a tkáně – ucho, srdce, slezina, močový měchýř a kloub.

### 3.6 Extrakce a izolace genomové DNA z borelií, z klíšťat a z myších tkání

Borelie byly odděleny od média centrifugací (4°C, 10 min/13,2 rpm). Supernatant byl opatrně odpipetován a dekontaminován. Pelety byly ihned zpracovány nebo zmrazeny na -20°C. Pro izolaci genomové DNA (gDNA) u všech vzorků byl použit DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen). Při izolaci se postupovalo striktně podle protokolu výrobce (Qiagen).

Tkáně z myši byly rozděleny podle jednotlivých orgánů do mikrozkuvek. Vzorky byly homogenizovány pomocí kuliček na homogenizátoru v prvním lyzačním roztoku z kitu (Qiagen). Dále se postupovalo podle protokolu od výrobce.

Klíšťata byla řádně rozdělena podle vývojových stádií (larva, nymfa) i druhu (*I. ricinus*, *A. americanum*) a označena v mikrozkuvkách (typ Ependorf). Vzorky klíšťat byly uchovávány v mrazáku při -20°C do zpracování. Homogenizace vzorků a následná izolace gDNA byla provedena stejným způsobem jako u vzorků tkání z myši.

Po izolaci gDNA všech vzorků proběhlo pro kontrolu měření koncentrace. Všechna vyizolovaná DNA byla uchovávána v lednici při 4°C.

### 3.7 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Přítomnost DNA spirochét ve vzorcích byla ověřena pomocí PCR, kde izolovaná genomová DNA byla použita jako templát. Celkový objem každé reakční směsi byl 20 µl. Amplifikace probíhala v přístroji Master cycler personal (Eppendorf).

Tab. 7: Složení reakční směs pro PCR (20 µl).

10x Pufr	2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2 µl
Taq DNA polymeráza	0,5 µl
10 mM dNTPs	1 µl
1 mM Primer reverse	1 µl
1 mM Primer forward	1 µl
DNA (templát)	1-5 µg
H <sub>2</sub> O	Odvozena od množství DNA

\*U reakční směsi byly látky jako je 10x PCR pufr, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM dNTPs a Taq DNA polymeráza nahrazeny 2x PCR Master mix (Promega).

Ke každé reakci byla připravena pozitivní i negativní kontrola. U pozitivní kontroly byla jako templát použita ověřená DNA z borelie (*B.burgdorferi* s.s.) a u negativní byl templát nahrazen deionizovanou vodou.

Tab. 8: Seznam všech použitých primerů pro PCR reakci (Anneal: annealing, F: Forward, R: Reverse).

Primer set	Anneal (C°)	PCR produkt (bp)	Sekvence F/R (5' -> 3')	Citace
<i>adeC</i>	55	496	CTTCTTGTGTGCCGGCTTTG TCGTGCCCATACCCTATTGC	Jewett et al., 2007
<i>pncA</i>	50	243	TAAAAACGGGGGCATTTGGC ACGCAAAAATCTAATGCCAATCCT	Purser et al., 2003
<i>vlsE</i>	55	110	TGGTGCGAAGGCTGATAAGG TTACATCCTTCAGCGCACCC	Liveris et al., 2008
<i>actin</i>	60	294	AGAGGGAAAT CGTGCGTGAC CAATAGTGATGA CCTGGCCGT	Buxbaum et al., 2014
<i>flagellin</i> out	52	497	AARGAATTGGC AGTTCAATC GCATTTTCWATTTTAGCAAGTGATG	Clark et al., 2005
<i>ospC</i> out	52	635	ATGAAAAAGAATACATTAAGTGC ATTAATCTTATAATATTGATTTTAATTAAGG	Bunikis et al., 2004
<i>ospC</i> inn	55	589	TATTAATGACTTTATTTTATTTATATCT TTGATTTTAATTAAGGTTTTTTTGG	Bunikis et al., 2004
<i>clpA</i> outer	48	849	GATAGATTTCTTCCAGACAAAG TTCATCTATTAAGCTTTCCC	Margos et al., 2008
<i>clpA</i> inner	50	706	GACAAAGCTTTTGATATTTTAG CAAAAAAACATCAAATTTTCTATCTC	
<i>uvrA</i> outer	48	910	GAAATTTTAAAGGAAATTAAGTAG CAAGGAACAAAACATCTGG	
<i>uvrA</i> inner	50	677	GCTTAAATTTTAATTGATGTTGG CCTATTGGTTTTTGATTTATTG	
M13	50	754	GTAAAACGACGGCCAG CAGGAAACAGCTATGAC	

### 3.7.1 Průkaz přítomnosti plasmidů s geny zodpovědnými za infekčnost borelií

Narostlé kultury borelií byly zkontrolovány pomocí PCR s primery specifickými pro geny *adeC*, *pncA* a *vlsE* na přítomnost zmíněných genů, které jsou zodpovědné za infekci spirochét. Podmínky amplifikační reakce můžeme vidět v Tab. 9.

Tab. 9: Jednotlivé kroky amplifikační reakce PCR.

1. Počáteční denaturace DNA	96°C	5 min	
2. Denaturace*	95°C	30 sek	
3. Nasedání primerů*	<i>adeC</i>	55°C	30 sek
	<i>pncA</i>	50°C	
	<i>vlsE</i>	55°C	
4. Elongace*	72°C	1 min	
5. Závěrečná elongace	72°C	10 min	
6. Teplota po skončení reakce	4°C	∞	

\*Bod 2-4 se 30 až 35x opakoval.

### 3.7.2 Průkaz přítomnosti DNA borelií v klišťatech a v myších tkáních

Kvalita DNA myší byla nejprve zkontrolována pomocí primerů na myší aktin. Poté byla DNA myší a klišťat zkontrolována na přítomnost DNA borelií pomocí primerů specifických pro geny *flagellin* a *ospC*. Myší vzorky byly dodatečně kontrolovány na přítomnost DNA borelií s primery specifickými pro housekeeping geny borelie *clpA* a *uvrA*.

Amplifikační reakce s primery pro *flagellin* a *actin* probíhala obdobně, jak je uvedeno v Tab. 9, jen teplota nasedání primerů se lišila: pro *flagellin* 52°C a pro *actin* 60°C. Pro zvýšení citlivosti reakce a zároveň pro snižování inhibice PCR reakce cizorodou DNA (DNA myší) byla použita tzv. nested PCR (Tab. 10), kde pro druhý krok (druhý round PCR) bylo jako templát použito 5 µl z předchozí reakce. Tato metoda byla použita s primery pro *ospC*. V prvním kroku byla využita sada primerů *ospC* out R/F, v druhém *ospC* inn R/F.

Tab. 10: Jednotlivé kroky amplifikační reakce nested PCR.

1. Počáteční denaturace DNA	95°C	5 min	
2. Denaturace*	94°C	30 sek	
3. Nasedání primerů*	<i>Ospc</i> out	52°C	30 sek
	<i>Ospc</i> inn	55°C	
4. Elongace*	72°C	1 min	
5. Závěrečná elongace	72°C	10 min	
6. Teplota po skončení reakce	4°C	∞	

\* Bod 2-4 se 35x opakoval.

V případě housekeeping genů byla provedena „semi-nested“ PCR. Tato PCR se skládala ze dvou reakcí viz. Tab. 11 a 12. Pro první reakci (spacer) jako teplát slouží myší DNA a používají se primery *clpA* Forward 1 a *clpA* Reverse, *uvrA* Forward 1 a *uvrA* Reverse. Pro druhou reakci (semi-nested) s primery *clpA* Forward 2 a *clpA* Reverse a *uvrA* Forward 2 a *uvrA* Reverse a jako teplát se odebírá 5  $\mu$ l z první reakce. Speciální podmínky, tzv. „touch down“ PCR byly použité pro první část „semi-nested“ PCR.

Tab. 11: První amplifikační reakce pro „semi-nested“ PCR s primery pro „housekeeping“ geny.

1. Počáteční denaturace DNA	95°C	15 min
2. Denaturace*	94°C	30 sek
3. Nasedání primerů*	55-48°C **	30 sek
4. Elongace*	72°C	30 sek
5. Závěrečná elongace	72°C	5min
6. Teplota po skončení reakce	14°C	$\infty$

\*Bod 2-4 se 35x opakoval.

\*\* Teplota nasedání primerů se s každým jednotlivým cyklem snížila o 1°C, pak se dalších 20 cyklů opakovalo při teplotě nasedání 48°C.

Tab. 12.: Druhá amplifikační reakce pro „semi-nested“ PCR.

1. Počáteční denaturace DNA	95°C	7 min
2. Denaturace*	94°C	30 sek
3. Nasedání primerů*	50°C	30 sek
4. Elongace*	72°C	30 sek
5. Závěrečná elongace	72°C	5 min
6. Teplota po skončení reakce	14°C	$\infty$

\* Bod 2-4 se 35x opakoval.

### 3.8 Elektroforéza

Po ukončení PCR reakce byly vzorky kontrolovány elektroforézou v agarózovém gelu. Koncentrace gelu závisela na velikosti očekávaného PCR produktu (od 0,9 do 2,5 % agarózy). Ke všem vzorkům byl přidán 3,3  $\mu$ l 6x koncentrovaný vzorkový pufr (6x Orange DNALoading Dye, Thermo Scientific, 50x SYBR GreenI). SYBR GreenI byl použit pro vizualizaci DNA na gelu. Jako marker se použil 100 bp gene ruler (Invitrogen). Elektroforéza probíhala v 1x TAE pufru při napětí 80 až 100 V po dobu 10 až 40 minut. K vizualizaci výsledků posloužila UV lampa, výsledek se vyfotil a uložil.

### 3.9 Purifikace PCR produktů

Z agarózového gelu (0,9%) byly vyříznuty PCR produkty. Tyto PCR produkty byly purifikovány pomocí kolonek Millipore (Ultrafree DA DNA extraction from agarose gels) podle protokolu daného výrobcem. Purifikované PCR produkty byly použité k následnému zaklonování do plasmidového vektoru nebo k přímé sekvenaci.

### 3.10 Klonování, transformace kompetentních buněk a purifikace

#### plazmidové DNA z rekombinantu

Purifikovaný PCR produkt byl klonován do TOPO TA Cloning vektoru (TOPO TA Cloning Kit For Sequencing - Invitrogen). Klonovací reakce se skládala ze 4  $\mu$ l purifikovaného PCR produktu, 1  $\mu$ l pufového roztoku a 1  $\mu$ l vektoru z kitu. Celá reakční směs se nechala inkubovat při pokojové teplotě po dobu 30 minut.

Ihned na to navázal další krok - transformace. Kompetentní buňky (One Shot TOP10 *E. coli*) se nechaly pomalu rozmrazit na ledu a přidaly se k nim 2  $\mu$ l z klonovací reakce. Po 30 minutové inkubaci na ledu nastal tzv. „heat shock“, kdy se vzorky nechaly ve 42°C vodní lázni přesně 30 sekund a ihned se vložily zpět na led. Ve sterilním boxu se ke směsi přidalo 250  $\mu$ l SOC média a tato reakční směs byla inkubována v třepačce po dobu 1,5 hodiny při 37°C. Po inkubaci byla buněčná kultura rozetřena na připravené Petriho misky s LB agarem a ampicilinem (50  $\mu$ g/ml) a nechala se inkubovat přes noc při teplotě 37°C. Narostlé jednotlivé kolonie byly přeočkovány do LB/ampicilin tekutého média a opět byly inkubovány přes noc v třepačce při 37°C.

Buněčné pelety byly použité pro izolaci plazmidové DNA. Plazmidová DNA byla izolována podle návodu kitu "QIAprep® Spin Miniprep Kit.

#### 3.10.1 Kontrola přítomnosti inzertu v plazmidu („screening“)

Přítomnost inzertu v plazmidu byla ověřena metodou PCR. Byly použity specifické primery, které byly využity pro amplifikaci části genu *ospC* inn (Forward a Reverse) a vektor-specifické primery M13 (Forward a Reverse). Podmínky pro amplifikační reakci PCR jsou v tabulce 13. Výsledky pak byly zkontrolovány elektroforézou na agarózovém gelu (2,5%). Plazmidy ve kterých přítomnost inzertu byla prokázána pak byly osekvenovány.



Tab. 13: Jednotlivé kroky amplifikační reakce pro primery M13 a *ospC* inn.

1. Denaturace DNA		95°C	5 min
2. Denaturace*		94°C	30 sek
3. Nasedání primerů*	M13	50°C	30 sek
	<i>ospC</i> inn	55°C	
4. Elongace*		72°C	1 min
5. Závěrečná elongace		72°C	10 min
6. Teplota po skončení reakce		14°C	∞

\*Bod 2-4 se 35x opakoval.

### 3.11 Sekvenace

Vzorky byly sekvenované v sekvenační laboratoři BIOGEN Praha, s.r.o. ve dvou směrech s primery M13 Forvard a M13 Reverse. Vzorky byly připravené podle návodu ze sekvenační laboratoře. Do dvou 200µl mikrozkuumavek (typ Ependorf) bylo přidáno 5-20 ng PCR produktu nebo 25-80 ng plazmidu, dále byly přidány vektor-specifické primery (2,5 pmol/µl) ke každé reakci. Získané výsledky pak byly zpracovány v DNASTar a sekvenace byly porovnané z informací v GenBanku (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 4 Výsledky

### 4.1 Kultivace borelií

Kultivovány byly izoláty *Borrelia americana* kmeny SCW-30E a SCW-41 a *Borrelia carolinensis* kmeny SCW-13 a SCW-19. Borelie byly inkubovány ve dvou médiích (MKP a BSK II) při pokojové teplotě a při 34°C.

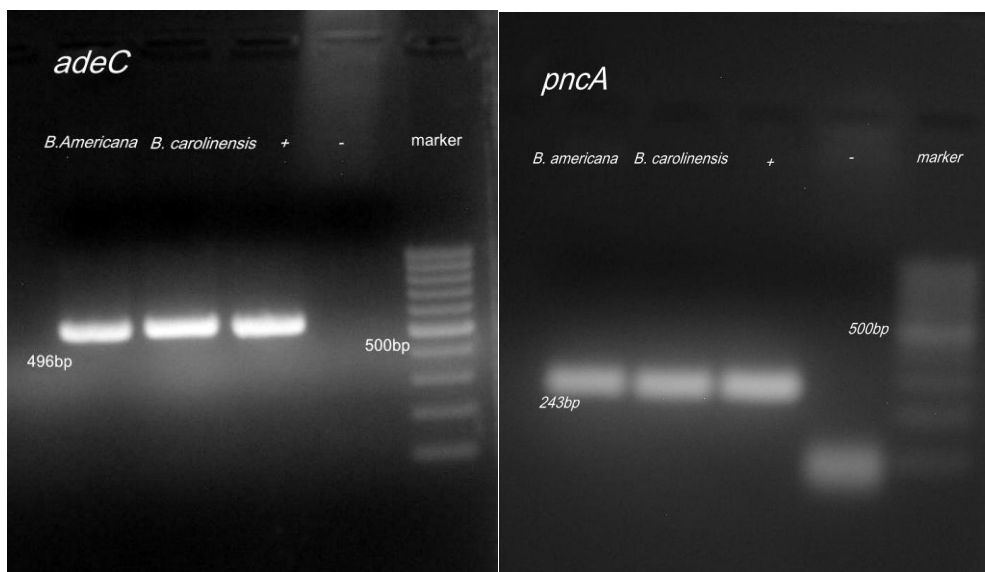
Při srovnání kultivací na tom byly obě kultury stejně. *B. americana* i *B. carolinensis* nejlépe rostly v BSK II a při 34°C. Nejpomaleji rostl kmen SCW-41 *B. americana*. U kultury *B. carolinensis* SCW-19 došlo ke kontaminaci. Nejlépe rostl kmen *B. americana* kultura - SCW-30e (z *Ixodes minor* z ptáka střízlíka karolinského *Thryothorus ludovicianus*, původ v Severní Americe) a u *B. carolinensis* kmen SCW-13 (izolováno z křečka bavlnového *Peromyscus gossypinus*, původ v Severní Americe) (Rudenko et al., 2009a, 2009b). Tyto kultury byly použité pro další experimenty.

### 4.2 Průkaz přítomnosti plasmidů nesoucích geny zodpovědné za infekčnost borelií

Genomová DNA obou borelií byla zkontrolována na přítomnost plasmidů nesoucích geny zodpovědné za infekčnost kultur borelie. Tyto geny jsou *adeC*, *pncA* a *vlsE*. Přítomnost genů *adeC* a *pncA* byla prokázána v obou kulturách borelií. Třetí gen zodpovědný za infekčnost kultur borelie *vlsE* nebyl prokázán očividně z důvodů nespecifity primerů, které původně byly navrhované pro *B. burgdorferi* sensu stricto (Tab. 14). Amplifikace částečných sekvencí genu *adeC* a *pncA* s použitím genomové DNA obou druhů borelie je představena na obrázku 3.

Tab. 14: Přítomnost genů v kulturách borelie.

Infekční gen	<i>B. americana</i>	<i>B. carolinensis</i>
<i>adeC</i>	+	+
<i>pncA</i>	+	+
<i>vlsE</i>	?	?



Obr. 3: PCR produkty představují úseky genů *adeC* a *pncA* v kulturách *B. americana* a *B. carolinensis*, + pozitivní kontrola (DNA *B. burgdorferi* s.s.), - negativní kontrola a marker.

Obě kultury borelie jsme považovaly za infekční. Narostlé nekontaminované kultury byly použité pro infekci myši. Myši byly infikované  $10^5$  spirochét ve 100  $\mu$ l média na každou myš a to pod kůži na krku pomocí injekční jehly.

### 4.3 Průkaz přítomnosti DNA borelií v myších tkáních

Výsledky detekce DNA borelií v uších experimentálních myši ukazují, že po prvním týdnu ani v jedné myši nebyla prokázána přítomnost boreliové DNA. Po druhém týdnu po inokulaci živé kultury DNA, byla borelie detekovaná ve dvou myších infikovaných *B. americana*. Po šestém týdnu po inokulaci byla přítomnost DNA borelie prokázána ve všech experimentálních myších (Tab. 15). Na obrázku 4 jsou uvedeny výsledky ze šestého týdne. Vzorky byly testovány PCR metodou s použitým primerem pro *flagellin B. burgdorferi* s.l. (fragment 497bp).

Tab. 15: Přítomnost borelií v uších v jednotlivých týdnech.

	<i>B. carolinensis</i>					<i>B. americana</i>				
Myš	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1. týden	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2. týden	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
6. týden	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-



Obr. 4: Detekce DNA *B. carolinensis* v myších uších v 6 týdnu. Jamka 1 až 4 (experimentální myši), 5 (kontrolní myš bez borelií), + pozitivní kontrola (DNA *B. burgdorferi* s.s.), - negativní kontrola a marker.

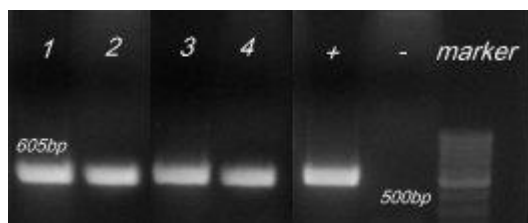
Všechny myši se podařilo infikovat. Na tyto infekční myši se nasázely larvy klíšťat *I. ricinus* a *A. americanum*, které se po nakrmení ponechaly vylíhnout do nymf.

#### 4.4 Průkaz trans-stadiálního přenosu borelií z larev na nymfy

Výsledky detekce borelií v nasatých larvách a ve vylíhlých nymfách *A. americanum* a *I. ricinus* jsou zaznamenány v Tab. 16. Na demonstračním obrázku 5 jsou uvedeny výsledky přítomností DNA *B. americana* ve vylíhlých nymfách klíšťat *A. americanum* a *I. ricinus*. Použila se metoda PCR s primery pro *flagellin* a citlivější metoda nested PCR s primery pro *ospC* gen (out a inn) (fragment 605bp).

Tab. 16: Detekce borelií v jednotlivých vývojových stádiích klíštěte sající na infekčních myších.

rod	myš	klíště	larva	nymfa
<i>B. carolinensis</i>	1	<i>A. americanum</i>	+	+
	2	<i>A. americanum</i>	+	+
	3	<i>I. ricinus</i>	+	+
	4	<i>I. ricinus</i>	+	+
<i>B. americana</i>	1	<i>A. americanum</i>	+	+
	2	<i>A. americanum</i>	+	+
	3	<i>I. ricinus</i>	+	+
	4	<i>I. ricinus</i>	+	+



Obr. 5: Detekce DNA *Borrelie americana* v nymfách *A. americanum* (jamka 1, 2) a *I. ricinus* (jamka 3, 4), + pozitivní kontrola (DNA *B. burgdorferi* s.s.), - negativní kontrola, marker.

Všechny larvy klíšťat *I. ricinus* a *A. americanum* byly infekční a infekčnost si ponechaly až do dalšího vývojového stádia - nymfy. Tyto infekční nymfy se pak nechaly sát na naivních myších.

#### 4.5 Průkaz přenosu borelií z nymf na naivní myši

Výsledky testování přítomností DNA borelie v orgánech myši (6 týdnů po nakrmení infekčních nymf na naivních myších) jsou uvedeny v Tab. 17 a 18. Analýza proběhla pomocí citlivější metody nested PCR s primery *ospC* out a *ospC* inn (fragment 605bp).

Tab. 17: Přítomnost DNA *B. carolinensis* ve tkáních u myši 1-4.

<i>Borrelia carolinensis</i>							
myš	klíště	srdce	krev	slezina	moč. měchýř	kloub	ucho
1	<i>A. americanum</i>	+	+	+	+		+
2	<i>A. americanum</i>	+	+	+	+		+
3	<i>I. ricinus</i>	+	+	+	+		+
4	<i>I. ricinus</i>	+	+		+		+



Obr. 6: Potvrzení přenosu patogenu nymfami obou druhů spirochét na myš po krmení. Přítomnost DNA *B. carolinensis* u myši po nasátí infikované nymfy *A. americanum* a u myši po nasátí infikované nymfy *I. ricinus* (H – srdce, B – krev, S – slezina, U – močový měchýř, J – kloub, E – ucho, + pozitivní kontrola (DNA *B. burgdorferi* s.s.), - negativní kontrola a marker).

Tab. 18: Přítomnost DNA *B. americana* ve tkáních myši 1-4.

<i>Borrelia americana</i>							
myš	klíště	srdce	krev	slezina	moč. měchýř	kloub	ucho
1	<i>A. americanum</i>		+				
2	<i>A. americanum</i>		+				
3	<i>I. ricinus</i>		+				
4	<i>I. ricinus</i>		+		+		+



Obr. 7: Přítomnost DNA *B.americana* v krvi myši po nasátí infikované nymfy *A. americanum* a myši po nasátí infikované nymfy *I. ricinus* (H – srdce, S – slezina, B – krev, U – močový měchýř, J – kloub, E – ucho, + pozitivní kontrola (DNA *B. burgdorferi* s.s.), - negativní kontrola a marker).

Nymfy *A. americanum* a *I. ricinus* přenesly borelie druhu *B. carolinensis* a *B. americana* do všech testovaných naivních myši. *B. carolinensis* byla rozšířená ve všech orgánech až na klouby. *B. americana* byla detekována pouze v krvi a u jediné myši navíc i v močovém měchýři a uchu. Pro ověření výsledků proběhlo následné sekvenování PCR produktů.

#### 4.6 Ověření DNA borelií sekvenací

Výbrané PCR produkty z testovaných myších tkání byly osekvenovány. Sekvenační reakce potvrdila přítomnost sekvencí identických původně použitými *B. carolinensis* a *B. americana*.

#### 4.7 Shrnutí výsledků

V této práci byly spirochéty *B. americana* kmen SCW-30e a *B. carolinensis* kmen SCW-13 zkontrolovány na přítomnost genů *adeC*, *pncA* a *vlsE*, které se nacházejí na plasmidech a jsou zodpovědné za infekční potenciál borelie. Geny *adeC* a *pncA* byly přítomny u obou druhů

borelií. Gen *vlsE* se v obou druzích borelie nebyl detekován nejspíš z důvodů nespecifity primerů, které původně byly navrhované pro *B. burgdorferi* sensu stricto.

Naivní myši byly infikovány borelií *B. americana* SCW-30e a *B. carolinensis* SCW-13. Přítomnost DNA borelií byla detekována u všech myších v uších. Po krmení neinfikovaných larev *Ixodes ricinus* a *Amblyomma americanum* na infekčních myších až do úplného nasátí a následujícího vylíhnutí larev do dalšího vývojového stádia nymfy. DNA obou druhů borelií byla detekována v nymfách jak *I. ricinus* tak i *A. americanum*. Tímto byla prokázána schopnost obou druhů klíštěcích vektorů získávat borelie z infekčního hostitele a ponechat si ji při trans-stadiálním přenosu.

Po krmení infekčních nymf *I. ricinus* a *A. americanum* na naivních myších byla prokázána přítomnost DNA *B. carolinensis* u všech experimentálních myší ve všech kontrolovaných orgánech a to v krvi, srdci, močovém měchýři, uších a v slezině. Přítomnost DNA *B. carolinensis* nebyla potvrzená jen v kloubech. V případě *B. americana* přítomnost DNA byla potvrzená jen v krvi, u jediné myši navíc i v uchu a slezině. Je možné, že by se borelie rozšířily krevní cestou dál do ostatních tkání, když by se myši nechaly žít déle než šest týdnů. Na druhou stranu tyto výsledky také můžou ukazovat na neschopnost borelie druhu *B. americana* diseminovat do hostitelských orgánů a vyvolávat tak systémové onemocnění, nebo že *B. americana* je citlivá na hostitelský komplement a schovává se v hostitelských tkáních v jiné morfologické formě, jako je například cysta, nebo bleb. Detekce přítomnosti persistentních forem spirochét v hostiteli vyžaduje PCR s primery odlišnými od těch, které jsme používali v naší práci. Detekce persistentních forem borelií nebyla cílem této práce, ale odpovědí na výše zmíněné spekulace by mohla být kultivace spirochét z myších orgánů a z krve. V případě pozitivních kultur by se potvrdila přítomnost persistentních forem *B. americana* v myších. V případě negativních kultur (i z krve) by bylo potvrzeno, že detekována DNA nepředstavuje živý organismus, ale nejspíš zbytky DNA která je schopna přetrvávat v hostiteli i po zabití spirochéty komplementem.

## 5 Diskuze

Je známo, že minimálně tři z 21 popsaných druhů spirochét komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* a *B. afzelii*) dokáží definitivně proniknout do vnitřních orgánů nebo tkání hostitelů a způsobit tak lymskou boreliózu. Nicméně další druhy borelie se čas od času objevují ve vzorcích člověka i přestože nejsou považovány za patogenní. Znamená to, že tyto druhy borelie mají patogenní potenciál, který by mohl vyniknout za příznivých podmínek. V poslední době bylo popsáno hojné množství nových druhů borrelie, avšak patogenita většiny těchto druhů je pořad nejasná.

Tato práce byla zaměřená především na zjištění patogenního potenciálu severoamerických druhů borelií z komplexu *Borelie burgdorferi* s.l., *B. americana* a *B. carolinensis*, které byly izolovány z klíštěcích vektorů a vzorků hostitelů, široce se vyskytujících v jihovýchodních USA, oblastí tradičně uznanou jako neendemickou pro LB.

*Amblyomma americanum* (Linnaeus) je hlavním klíštětem ve východní, jihovýchodní a středozápadní USA, které parazituje na člověku. Je známo svým aktivním chováním ve vyhledávání hostitelů a schopností přenášet více druhů patogenů např. různé druhy *Rickettsia* (Cohan et al., 2009; Stromdahl et al., 2008) nebo druhy *Ehrlichia* (Varela-Stokes et al., 2007; Wolf et al., 2000). *A. americanum* se vyskytuje ve velkých hustotách, napadá široké spektrum hostitelů od malých až velkých savců, ptáků, plazů ale i lidí (Cooley & Kohls 1944). Dlouhodobé studie ukazují, že například v Mississippi 53% klíšťat, která byla odstraněna z lidí, byla právě *A. americanum* (Goddart 2003). V Jižní Karolíně a Georgii 83% odstraněných klíšťat z člověka byla identifikovaná jako *A. americanum* (Felz et al., 1996).

Kvůli tomu se *A. americanum* považuje za jeden z nejvíce zdravotně a hospodářsky významných klíštěcích vektorů ve Spojených státech. Nicméně zapojení *A. americanum* do přenosu spirochét *B. burgdorferi* s.l. v jihovýchodních USA je otázkou, na kterou dodnes neexistuje jednoznačná odpověď. Tato problematika je předmětem diskuze už 30 let, ale omezený počet publikovaných studií přináší poněkud rozporuplné výsledky. Schultz a kolegové (1984) tvrdí, že klíště *A. americanum* může sloužit jako potencionální vektor pro borelie a je schopné spirochéty přenášet stejně jako klíště *I. scapularis*. Clark a kolegové (2013) taktéž propagují myšlenku, že klíšťata *A. americanum* jsou důležitým vektorem borelií, které způsobují LB v jihovýchodních Spojených Státech. Navíc existují studie, které přítomnost borelií v *A. americanum* prokázaly (viz. Clark et al., 2013; Schultz et al., 1984; Teltow et al., 1991). Některé studie však poukazují na to, že záleží na druhu borelie, zda přežije



v klíštěti *A. americanum*, či bude zabitá slinami klíštěte. Důležitým faktorem je také geografický původ klíštěcí populace. Ukázalo se, že *A. americanum* pocházející z Texasu ničí *B. burgdorferi* s.l., oproti tomu *A. americanum* z Alabamy jsou schopné udržet infekčnost (5%) (Piesman et al., 1988). DNA *B. burgdorferi* s.l. (13 z 590 izolátů – 2,2% infekčnost) byla detekována v klíšťatech *A. americanum* pocházejících z Tennessee, Floridy a z Georgie (Rudenko et al., 2016).

Možná kompatibilita geneticky variabilních kmenů (nebo druhů) spirochét a různých populací *A. americanum* již byla diskutována.

Naše nedávné zjištění přítomnosti DNA borelie v populaci *A. americanum* na Floridě se liší od nedávno publikovaných výsledků a naznačuje, že když se kompatibilní kmeny (druhy) spirochét setkají s odpovídající populací klíšťat, může dojít k udržování a přenosu infekce. Je možné, že vedle hlavního enzootického přenosového cyklu *B. burgdorferi* s.l. na jihovýchodě USA, který zahrnuje klíšťata z rodu *Ixodes* a hlodavce jako hostitelé, mohou existovat paralelní přenosné cykly (samostatné nebo překrývající se) pro další kmeny nebo druhy borelie a to včetně *B. americana* a *B. carolinensis*. Je možné, že interakce *A. americanum* a *Borrelie* v jihovýchodní USA představuje případ diferenciální nebo selektivní kompatibility (původ populace klíšťat – druh spirochéty?). Výsledky této práce nepřímo podporují tuto možnost.

### *Borrelia americana*

Stále není známo, zdali *Borrelia americana* může, či nemůže infikovat člověka. Všechny izoláty *B. americana* jsou spojené s klíšťaty *I. minor*, které nejsou typickými klíšťaty sajícími na člověku. Nicméně *B. americana* už byla izolována z *Ixodes pacificus*, dále pak z *I. parvicinus* a *I. persulcatus* (Fedorova et al., 2014; Lane et al., 2013; Nava et al., 2014; Yu et al., 2016). Další publikace rozšířily spektrum vektorů pro *B. americana* na klíšťata mimo rod *Ixodes*: DNA *B. americana* byla detekována v klíštěti *Dermacentor occidentalis* z jižní Kalifornie (Lane et al., 2013). Naše výsledky potvrzují, že klíšťata *I. ricinus* a *A. americanum* jsou také schopné udržovat a přenášet tuto *B. americana*.

Klíšťata *I. minor*, ze kterých byla původně izolovaná *B. americana*, se krmí na ptácích. Další hostitelé *B. americana* prozatím nejsou známi. Scott a Foley (2016) detekovali *B. americana* v klíšťatech *Ixodes auritulus*, které parazitují výhradně jen na ptácích. Ptáci často migrují a je velmi pravděpodobné, že právě ptačí migrace může za rozšiřování areálu výskytu

*B. americana*. Mimo jiné, migrační cesty ptáků jsou často propojené, je zde velké riziko přenosu infekčních klíšťat na jiné migrační ptáky, a tak ještě většího rozšíření výskytu *B. americana* i v jiných zemích (Scott & Foley 2016).

Naše výsledky potvrzují, že klíšťata *I. ricinus* a *A. americanum* jsou schopné udržovat a přenášet *B. americana*, i když její rozšíření v orgánech hostitele je velice omezené (byla detekována jen v krvi). Naše experimenty se prováděly na myších. Existuje tady možnost nekompatibility (nebo částečné compatibility) tohoto hostitele se spirochétou. Tuto domněnku potvrzuje fakt, že různé izoláty *B. burgdorferi* sensu lato mají různý infekční potenciál a organotropismus u různých hostitelů, dokonce i u druhů vysoce příbuzných mezi sebou. Například, bylo prokázáno, že různé ospC typy *B. burgdorferi* sensu stricto ve východních Spojených Státech mají odlišnou citlivost na dva tradiční hostitele - křečka bavlnového (*Peromyscus gossypinus*) na jihovýchodě a křečka bělonohého (*Peromyscus leucopus*) na severovýchodě USA (Rudenko et al., 2013). Citlivost jiných druhů borelií vůči komplementu různých hostitelů již bylo popsáno (Gern et al., 1998; Kurtenbach et al., 1998; Ticha et al., 2016). V našich dalších experimentech bude zapotřebí použít jako zvířecí laboratorní model ptáka.

I přesto se nám podařilo nakazit laboratorní myši *B. americana* a pak prokázat přítomnost DNA tohoto druhu borelie v krvi myší, na kterých sály infekční nymfy. Tento fakt ještě jednou potvrzuje možnost selektivní compatibility ve výběru jak vektoru, tak i hostitele pro různé druhy borelie, zejména pro *B. americana*.

Dalším objasněním přítomností *B. americana* jen v krvi a velice omezeně v orgánech myši může být takzvaný organotropismus spirochét. Je známo, že jednotlivé druhy *Borrelia burgdorferi* s.l. způsobují různé klinické projevy lymské boreliózy. V Severní Americe, kde převládá *B. burgdorferi* s.s., je nejběžnější artritida, zatímco v Eurasii, kde je největší výskyt *B. garinii* a *B. afzelii*, je nejvíce případů s neuroboreliózou a akrodermatitidou. Stále více důkazů naznačuje, že některé druhy borelie se šíří krví do různých tkání lépe než ostatní. Diseminace spirochét, jejich perzistence, tkáňový tropismus a závažnost onemocnění se značně liší u různých druhů, což naznačuje, že různé druhy mohou hrát různou roli v patogenitě a vývoje klinického onemocnění. Je tedy možné, že organotropismus *B. americana* je naprosto odlišný od ostatních druhů borelií a tak i klinický obraz LB způsobené tímto druhem borelie může být zcela jiný, a proto patogeneze tohoto druhu vyžaduje hlubší zkoumání.

Zjišťování patogenního potenciálu *B. americana* dostalo ještě větší význam po publikaci Dr. Kerry Clarka z Univerzity Severní Floridy, který analyzoval sekvence DNA borelie u pacientů nakažených LB ve Spojených státech. *B. americana* (99% shody) byla detekována ve 25% z celkového množství 118 pozitivních vzorků krve (Clark et al., 2013). Tuto teorii je nutno podrobit dalšímu zkoumání a kontrolám, ale i přesto vnáší nové světlo do diskuze ohledně potenciální patogenese tohoto nově popsaného druhu.

### *Borrelia carolinensis*

Na rozdíl od *B. americana*, která byla izolována z klíšťat, *B. carolinensis* byla vykultivována z ušní tkáně hlodavců, kteří jsou dvěma hlavními reservoiry pro *Borrelia burgdorferi* s.l. na jihu USA. Z 16 původních izolátů, které patřily do nové skupiny komplexu *B. burgdorferi* sensu lato a byly pojmenovány *B. carolinensis*, 9 izolátů bylo izolováno z křečka bavlnového (*P. gossypinus*), 6 z lesomyši floridské (*N. floridana*) a pouze 1 z klíštěte *I. minor*, samice, která se krmila na *N. floridana*. Zdá se tak, že *N. floridana* a *P. gossypinus* jsou primárními hostiteli tohoto druhu borelie. Geografické rozšíření obou druhů hlodavců a fakt, že na nich také parazitují jiná klíšťata, jako *I. scapularis*, *I. affinis*, *I. minor*, *D. variabilis*, a *A. maculatum*, může být použito pro možnost předpokladu dalšího rozšíření *B. carolinensis* jak v USA, tak i v jiných částech světa. Už v roce 2010 - rok po objevení *B. carolinensis*, skupina francouzských vědců publikovala nález tohoto druhu borelie v klíšťatech z jihu Francie (Cotté et al., 2010). Hajkova a kolegové (2016 nepublikovaná data) zjistili přítomnost *B. carolinensis* v klíšťatech *I. ricinus* z kočky domácí na jihu České Republiky. Tato fakta potvrzují přenos tohoto druhu borelie z amerického kontinentu do Evropy.

Dále v roce 2014 Foley a jeho kolegové popsali přítomnost *B. carolinensis* u hlodavců z Kalifornie, včetně domácích a polních myší, stejně jako v ohroženém, samostatném poddruhu kalifornského hraboše *Microtus californicus scirpensis* (Foley et al., 2014). Tento poslední objev je velice překvapivý, protože *Microtus californicus* žije v extrémně vyprahlých oblastech Severní Ameriky, kde je minimum vegetace a které je vzdáleno 3500 km od míst kde se *I. minor* běžně vyskytuje. Tento neočekávaný nález vznáší záhadu, jak se *B. carolinensis* mohla objevit na takto odlehlém místě. Autoři se domnívají, že jsou za to zodpovědní opět stěhovaví ptáci (s migrační trasou z jihovýchodní Severní Ameriky do Střední Ameriky a zpět do východních USA), ale pro úplné potvrzení je nutno tuto tézi podrobit dalšímu zkoumání (Foley et al., 2014).

Veškeré objevy *B. carolinensis* svědčí o tom, že geografické rozšíření tohoto druhu borelie není omezeno jen místem jejího primárního objevení.

Výsledky z této práce potvrdily patogenní potenciál *B. carolinensis* u hlodavců. Přítomnost DNA *B. carolinensis* v každé analyzované hostitelské tkáni (kromě kloubů), byla potvrzena.

Nepřítomnost DNA *B. carolinensis* v kloubech hlodavců může svědčit o úplně jiném klinickém obrazu LB vyvolané tímto druhem spirochét. Na rozdíl od lymfské artritidy, která je typická pro Spojené státy, kde převažuje *B. burgdorferi* s.s., infekce vyvolaná *B. carolinensis*, může být typická jiným charakterem onemocnění, a proto může být špatně diagnostikovaná nebo zcela přehlédnutá v té části USA, kde se vyskytuje.

Schopnost *B. carolinensis* infikovat hlodavce nepřímo ukazuje na potenciální riziko nákazy člověka tímto druhem borelie. Nicméně epidemiologický význam *B. carolinensis* pro člověka stále není známý. Jelikož hlodavci, ve kterých byla *B. carolinensis* zaznamenána, jsou běžně parazitováni i jinými druhy klíšťat, včetně těch která parazitují na člověku, mohl by tento druh borelie potenciálně infikovat i člověka. Jak už bylo řečeno, tento druh borelie je blízce příbuzný *B. bissettii*, která je spojována s LB u lidí jak v Severní Americe, tak i v Evropě (Rudenko et al., 2008, 2009, 2016). Je velice pravděpodobně, že stejně jak *B. bissettii*, *B. carolinensis* také může být potenciálně patogenní pro člověka. Obdržená data rozšiřují naše znalosti ohledně infekčního potenciálu tohoto druhu borelie a napomáhá tak k pochopení, zda tato borelie může být významným ohrožením i pro zdraví člověka.

Využití kompetentního vektora borelií *I. ricinus* a vektora, který je stále, i když omylem, považován za nekompetentního vektora borelií klíštěte *A. americanum*, nám přineslo nové poznatky do oblasti studií klíšťat a jimi přenášených patogenů. Tolerance klíštěte *A. americanum* k boreliím druhu *B. americana* a *B. carolinensis*, jeho agresivní charakter krmení, nevybíravost mezi hostiteli a široká distribuce v Severní Americe, výrazně mění jeho význam pro lidské zdraví v oblastech jeho výskytu. Naše výsledky potvrzují, i když nepřímo, že *A. americanum* může přenášet *B. carolinensis* a i *B. americana* na člověka při kousnutí.

## 6 Závěr

V této práci se povedlo prokázat, že infikované larvy obou druhů klíšťat, a to kompetentního pro *B. burgdorferi* s.l. vektoru *I. ricinus* a *A. americanum* s nejasnou kompetencí, přenášejí *B. americana* a *B. carolinensis* do dalšího vývojového stádia (nymfy) a hostitele.

## 7 Literatura

- Aguirre, J. D., Clark, H. M., McIlvin, M., Vazquez, C., Palmere, S. L., Grab, D. J., & Culotta, V. C. (2013). A manganese-rich environment supports superoxide dismutase activity in a Lyme disease pathogen, *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(12), 8468-8478.
- Akira, S. (2003). Toll-like receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38105-38108.
- Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature reviews immunology*, 4(7), 499-511.
- Anderson, J. F., & Magnarelli, L. A. (1984). Avian and mammalian hosts for spirochete-infected ticks and insects in a Lyme disease focus in Connecticut. *The Yale journal of biology and medicine*, 57(4), 627.
- Anderson, J. F., Johnson, R. C., Magnarelli, L. A., & Hyde, F. W. (1986). Involvement of birds in the epidemiology of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity*, 51(2), 394-396.
- Anderson, J. F., Johnson, R. C., Magnarelli, L. A., & Hyde, F. W. (1985). Identification of endemic foci of Lyme disease: isolation of *Borrelia burgdorferi* from feral rodents and ticks (*Dermacentor variabilis*). *Journal of Clinical Microbiology*, 22(1), 36-38.
- Bano, L., Meriardi, G., Bonilauri, P., Dall'Anese, G., Capello, K., Comin, D., & Agnoletti, F. (2008). Prevalence, disease associations and risk factors for colonization with intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp.) in flocks of laying hens in north-eastern Italy. *Avian Pathology*, 37(3), 281-286.
- 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(3), 378-383.
- Barbieri, A. M., Venzal, J. M., Marcili, A., Almeida, A. P., González, E. M., & Labruna, M. B. (2013). *Borrelia burgdorferi* sensu lato infecting ticks of the *Ixodes ricinus* complex in Uruguay: first report for the Southern Hemisphere. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13(3), 147-153.
- Barbour, A. G., & Hayes, S. F. (1986). Biology of *Borrelia* species. *Microbiological reviews*, 50(4), 381.
- Bartůněk, P. (2013). *Lymeská borelióza: 4., přepracované a doplněné vydání*. Grada Publishing.
- Berende, A., Oosting, M., Kullberg, B. J., Netea, M. G., & Joosten, L. A. (2010). Activation of innate host defense mechanisms by *Borrelia*. *European cytokine network*, 21(1), 7-18.

- Bissett, M. L., & Hill, W. A. R. R. E. N. (1987). Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains isolated from *Ixodes pacificus* ticks in California. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(12), 2296-2301.
- Brissette, C. A., Haupt, K., Barthel, D., Cooley, A. E., Bowman, A., Skerka, C., & Stevenson, B. (2009). *Borrelia burgdorferi* infection-associated surface proteins ErpP, ErpA, and ErpC bind human plasminogen. *Infection and immunity*, 77(1), 300-306.
- Bunikis, J., Garpmo, U., Tsao, J., Berglund, J., Fish, D., & Barbour, A. G. (2004). Sequence typing reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents *Borrelia burgdorferi* in North America and *Borrelia afzelii* in Europe. *Microbiology*, 150(6), 1741-1755.
- Burns, M. J., Sellati, T. J., Teng, E. I., & Furie, M. B. (1997). Production of interleukin-8 (IL-8) by cultured endothelial cells in response to *Borrelia burgdorferi* occurs independently of secreted [corrected] IL-1 and tumor necrosis factor alpha and is required for subsequent transendothelial migration of neutrophils. *Infection and immunity*, 65(4), 1217-1222.
- Buxbaum, A. R., Wu, B., & Singer, R. H. (2014). Single  $\beta$ -actin mRNA detection in neurons reveals a mechanism for regulating its translatability. *Science*, 343(6169), 419-422.
- Canica, M. M., Nato, F., Merle, L. D., 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. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 25(4), 441-448
- 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. *Journal of bacteriology*, 193(6), 1489-1490
- Cinco, M., Cini, B., Murgia, R., Presani, G., Prodan, M., & Perticarari, S. (2001). Evidence of involvement of the mannose receptor in adhesion of *Borrelia burgdorferi* to monocyte/macrophages. *Infection and immunity*, 69(4), 2743-2747.
- Clark, K., Hendricks, A., & Burge, D. (2005). Molecular identification and analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lizards in the southeastern United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2616-2625.
- Clark, K. L., Leydet, B., & Hartman, S. (2013). Lyme borreliosis in human patients in Florida and Georgia, USA. *Int J Med Sci*, 10(7), 915-931.
- Cluss, R. G., Silverman, D. A., & Stafford, T. R. (2004). Extracellular secretion of the *Borrelia burgdorferi* Oms28 porin and Bgp, a glycosaminoglycan binding protein. *Infection and immunity*, 72(11), 6279-6286.
- Collares-Pereira, M., Couceiro, S., Franca, I., Kurtenbach, K., Schäfer, S. M., Vitorino, L., & Cunha, C. (2004). First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3), 1316-1318.
- Cooley, R. A., & Kohls, G. M. (1944). The genus *Amblyomma* (ixodidae) in the United States. *The Journal of Parasitology*, 30(2), 77-111.

- Cotté, V., Bonnet, S., Cote, M., & Vayssier-Taussat, M. (2010). Prevalence of five pathogenic agents in questing *Ixodes ricinus* ticks from western France. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(8), 723-730.
- Diza, E., Papa, A., Vezyri, E., Tsounis, S., Milonas, I., & Antoniadis, A. (2004). *Borrelia valaisiana* in cerebrospinal fluid. *Emerg Infect Dis*, 10(9), 1692-3.
- Euroimmun, A. G. (2015). Lyme Borreliosis—the Utility of Improved Real-Time PCR Assay in the Detection of *Borrelia burgdorferi* Infections.
- Fedorova, N., Kleinjan, J. E., James, D., Hui, L. T., Peeters, H., & Lane, R. S. (2014). Remarkable diversity of tick or mammalian-associated *Borreliae* in the metropolitan San Francisco Bay Area, California. *Ticks and tick-borne diseases*, 5(6), 951-961.
- Feir, D., Santanello, C. R., Li, B. W., Xie, C. S., Masters, E., Marconi, R., & Weil, G. (1994). Evidence supporting the presence of *Borrelia burgdorferi* in Missouri. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 51(4), 475-482.
- Felz, M. W., Durden, L. A., & Oliver Jr, J. H. (1996). Ticks parasitizing humans in Georgia and South Carolina. *The Journal of Parasitology*, 505-508.
- Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U. C., Ruzic-Sabljic, E., Leonhard, S., Hofmann, H., Weber, K., & 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. *International Journal of Medical Microbiology*, 298(3), 279-290.
- Fischer, J. R., LeBlanc, K. T., & Leong, J. M. (2006). Fibronectin binding protein BBK32 of the Lyme disease spirochete promotes bacterial attachment to glycosaminoglycans. *Infection and immunity*, 74(1), 435-441.
- Földvári, G., Farkas, R., & Lakos, A. (2005). *Borrelia spielmanii* erythema migrans, Hungary. *Emerging infectious diseases*, 11(11), 1794-1795.
- Foley, J., Ott-Conn, C., Worth, J., Poulsen, A., & Clifford, D. (2014). An *Ixodes minor* and *Borrelia carolinensis* enzootic cycle involving a critically endangered Mojave Desert rodent. *Ecology and evolution*, 4(5), 576-581.
- Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M., Sutton, G. G., Clayton, R., Lathigra, R., & Gwinn, M. (1997). Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, 390(6660), 580-586.
- Fukunaga, M., Takahashi, Y., Tsuruta, Y., Matsushita, O., Ralph, D., McCLELLAND, M. I. C. H. A. E. L., & Nakao, M. (1995). Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(4), 804-810.
- 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. *Microbiology and immunology*, 40(11), 877-881.
- Garon, C. F., Dorward, D. W., & Corwin, M. D. (1989). Structural features of *Borrelia burgdorferi*—the Lyme disease spirochete: silver staining for nucleic acids. *Scanning Microscop Suppl*, 3, 109-115.



- Gebbia, J. A., Monco, J. C. G., Degen, J. L., Bugge, T. H., & Benach, J. L. (1999). The plasminogen activation system enhances brain and heart invasion in murine relapsing fever borreliosis. *The Journal of clinical investigation*, 103(1), 81-87.
- Gem, L., & Humair, P. F. (2002). Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. *Lyme borreliosis* biology, epidemiology and control. CABI International, 149-174
- Gern, L., Estrada-Pena, A., Frandsen, F., Gray, J. S., Jaenson, T. G. T., Jongejan, F., & Nuttall, P. A. (1998). European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 287(3), 196-204.
- Giambartolomei, G. H., Dennis, V. A., Lasater, B. L., & Philipp, M. T. (1999). Induction of pro- and anti-inflammatory cytokines by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins in monocytes is mediated by CD14. *Infection and immunity*, 67(1), 140-147.
- Girard, Y. A., Fedorova, N., & Lane, R. S. (2011). Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* and detection of *B. bissettii*-like DNA in serum of north-coastal California residents. *Journal of clinical microbiology*, 49(3), 945-954.
- Goddard, J., Sumner, J. W., Nicholson, W. L., Paddock, C. D., Shen, J., & Piesman, J. (2003). Survey of ticks collected in Mississippi for *Rickettsia*, *Ehrlichia*, and *Borrelia* species. *Journal of vector ecology*, 28, 184-189.
- Goldstein, S. F., Buttle, K. F., & Charon, N. W. (1996). Structural analysis of the Leptospiraceae and *Borrelia burgdorferi* by high-voltage electron microscopy. *Journal of bacteriology*, 178(22), 6539-6545.
- Grab, D. J., Perides, G., Dumler, J. S., Kim, K. J., Park, J., Kim, Y. V., & Kim, K. S. (2005). *Borrelia burgdorferi*, host-derived proteases, and the blood-brain barrier. *Infection and immunity*, 73(2), 1014-1022.
- Gros, P., Milder, F. J., & Janssen, B. J. (2008). Complement driven by conformational changes. *Nature Reviews Immunology*, 8(1), 48-58.
- Guo, B. P., Norris, S. J., Rosenberg, L. C., & Höök, M. (1995). Adherence of *Borrelia burgdorferi* to the proteoglycan decorin. *Infection and immunity*, 63(9), 3467-3472.
- Hanincova, K., Schäfer, S. M., Etti, S., Sewell, H. S., Taragelova, V., Ziak, D., & Kurtenbach, K. (2003). Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. *Parasitology*, 126(01), 11-20.
- Hanincová, K., Ogden, N. H., Diuk-Wasser, M., Pappas, C. J., Iyer, R., Fish, D., & Kurtenbach, K. (2008). Fitness variation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strains in mice. *Applied and environmental microbiology*, 74(1), 153-157.
- Hannier, S., Liversidge, J., Sternberg, J. M., & Bowman, A. S. (2003). *Ixodes ricinus* tick salivary gland extract inhibits IL-10 secretion and CD69 expression by mitogen-stimulated murine splenocytes and induces hyporesponsiveness in B lymphocytes. *Parasite immunology*, 25(1), 27-37.
- Harman, M., Vig, D. K., Radolf, J. D., & Wolgemuth, C. W. (2013). Viscous dynamics of lyme disease and syphilis spirochetes reveal flagellar torque and drag. *Biophysical journal*, 105(10), 2273-2280.

- Hefty, P. S., Jolliff, S. E., Caimano, M. J., Wikel, S. K., & Akins, D. R. (2002). Changes in temporal and spatial patterns of outer surface lipoprotein expression generate population heterogeneity and antigenic diversity in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity*, 70(7), 3468-3478.
- Hellwage, J., Meri, T., Heikkilä, T., Alitalo, A., Panelius, J., Lahdenne, P., & Meri, S. (2001). The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 8427-8435.
- Hovius, J. W., van Dam, A. P., & Fikrig, E. (2007). Tick–host–pathogen interactions in Lyme borreliosis. *Trends in parasitology*, 23(9), 434-438.
- Hubálek, Z. (2009). Epidemiology of Lyme borreliosis. In *Lyme borreliosis* (Vol. 37, pp. 31-50). Karger Publishers.
- Chu, C. Y., Liu, W., Jiang, B. G., Wang, D. M., Jiang, W. J., Zhao, Q. M., & Cao, W. C. (2008). Novel genospecies of *Borrelia burgdorferi sensu lato* from rodents and ticks in southwestern China. *Journal of clinical microbiology*, 46(9), 3130-3133.
- Ivanova, L. B., Tomova, A., González-Acuña, D., Murúa, R., Moreno, C. X., Hernández, C., & 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. *Environmental microbiology*, 16(4), 1069-1080.
- Jaenson, T. G., & Lindgren, E. (2011). The range of *Ixodes ricinus* and the risk of contracting Lyme borreliosis will increase northwards when the vegetation period becomes longer. *Ticks and tick-borne diseases*, 2(1), 44-49.
- Jewett, M. W., Lawrence, K., Bestor, A. C., Tilly, K., Grimm, D., Shaw, P., & Rosa, P. A. (2007). The critical role of the linear plasmid lp36 in the infectious cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Molecular microbiology*, 64(5), 1358-1374.
- Johnson, R. C., Schmid, G. P., Hyde, F. W., Steigerwalt, A. G., & Brenner, D. J. (1984). *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 34(4), 496-497.
- Kawabata, H., Masuzawa, T., & Yanagihara, Y. (1993). Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiology and immunology*, 37(11), 843-848.
- Kersten, A., Poitschek, C., Rauch, S., & Aberer, E. (1995). Effects of penicillin, ceftriaxone, and doxycycline on morphology of *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(5), 1127-1133.
- Kosik-Bogacka, D. I., Kuźna-Grygiel, W., & Jaborowska, M. (2007). Ticks and mosquitoes as vectors of *Borrelia burgdorferi* sl in the forested areas of Szczecin. *Folia biologica*, 55(3-1), 143-146.
- Kraiczy, P., Skerka, C., Kirschfink, M., Brade, V., & Zipfel, P. F. (2001). Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconnectin and Factor H. *European journal of immunology*, 31(6), 1674-1684.

- Kurtenbach, Klaus, Henna-Sisko Sewell, Nick H. Ogden, Sarah E. Randolph, and Patricia A. Nuttall. "Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology." *Infection and Immunity* 66, no. 3 (1998): 1248-1251.
- Kurtenbach, Klaus, Simona De Michelis, Susanne Etti, Stefanie M. Schäfer, Henna-Sisko Sewell, Volker Brade, and Peter Kraiczy. "Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato—the key role of host complement." *Trends in microbiology* 10, no. 2 (2002): 74-79.
- Kuthejlová, M., Kopecký, J., Štěpánová, G., & Macela, A. (2001). Tick salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelii* spirochetes by mouse macrophages. *Infection and immunity*, 69(1), 575-578.
- Lane R. S., Fedorova N., Kleinjan J. E., Maxwell M. 2013. Eco-epidemiological factors contributing to the low risk of human exposure to ixodid tick-borne borreliae in southern California, USA. *Ticks Tick Borne Dis.* 4: 377–385
- Lawrenz, M. B., Wooten, R. M., & Norris, S. J. (2004). Effects of *vlsE* complementation on the infectivity of *Borrelia burgdorferi* lacking the linear plasmid lp28-1. *Infection and immunity*, 72(11), 6577-6585.
- Le Fleche, A., Postic, D., Girardet, K., Peter, O., & Baranton, G. (1997). Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(4), 921-925.
- Leser, T. D., Lindecrona, R. H., Jensen, T. K., Jensen, B. B., & Møller, K. (2000). Changes in bacterial community structure in the colon of pigs fed different experimental diets and after infection with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Applied and environmental microbiology*, 66(8), 3290-3296.
- Levin, M., LEVINE, J., & Yang, S. (1996). RESERVOIR COMPETENCE OF THE SOUTHEASTERN FIVE-LINED SKINK (*EUMECES INEXPECTATUS*) AND THE GREEN ANOLE. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 54(1), 92-97.
- Liveris, D., Mulay, V., Sandigursky, S., & Schwartz, I. (2008). *Borrelia burgdorferi vlsE* antigenic variation is not mediated by RecA. *Infection and immunity*, 76(9), 4009-4018.
- Ma, Y., Seiler, K. P., Tai, K. F., Yang, L., Woods, M., & Weis, J. J. (1994). Outer surface lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* stimulate nitric oxide production by the cytokine-inducible pathway. *Infection and immunity*, 62(9), 3663-3671.
- Magnarelli, L. A., & Anderson, J. F. (1988). Ticks and biting insects infected with the etiologic agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*. *Journal of clinical microbiology*, 26(8), 1482-1486.
- Mahon, C. R., Lehman, D. C., & Manuselis Jr, G. (2014). *Textbook of diagnostic microbiology*. Elsevier Health Sciences.
- Marconi, R. T., Liveris, D., & Schwartz, I. (1995). Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *Journal of clinical microbiology*, 33(9), 2427-2434.

- Margos, G., Gatewood, A. G., Aanensen, D. M., Hanincová, K., Terekhova, D., Vollmer, S. A., & Hurn, M. A. (2008). MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(25), 8730-8735.
- Margos, G., Vollmer, S. A., Cornet, M., Garnier, M., Fingerle, V., Wilske, B., & Kurtenbach, K. (2009). A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(16), 5410-5416.
- Margos, G., Hojgaard, A., Lane, R. S., Cornet, M., Fingerle, V., Rudenko, N., & Piesman, J. (2010). Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissetii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. *Ticks and tick-borne diseases*, 1(4), 151-158.
- Margos, G., Wilske, B., Sing, A., Hizo-Teufel, C., Cao, W. C., Chu, C., & Fingerle, V. (2013). *Borrelia bavariensis* sp. nov. is widely distributed in Europe and Asia. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(11), 4284-4288.
- Masuzawa, T., Takada, N., Kudaken, M., Fukui, T., Yano, Y., Ishiguro, F., & Ezaki, T. (2001). *Borrelia sinica* sp. nov., a lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(5), 1817-1824.
- Motaleb, M. A., Corum, L., Bono, J. L., Elias, A. F., Rosa, P., Samuels, D. S., & Charon, N. W. (2000). *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(20), 10899-10904.
- Nau, R., Christen, H. J., & Eiffert, H. (2009). Lyme disease--current state of knowledge.
- Nava, S., Barbieri, A. M., Maya, L., Colina, R., Mangold, A. J., Labruna, M. B., & Venzal, J. M. (2014). *Borrelia* infection in *Ixodes pararicinus* ticks (Acari: Ixodidae) from northwestern Argentina. *Acta tropica*, 139, 1-4.
- Netušil, J., Žáková, A., Vostal, K., Norek, A., & Stanko, M. (2013). The occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in certain ectoparasites (Mesostigmata, Siphonaptera) of *Apodemus flavicollis* and *Myodes glareolus* in chosen localities in the Czech Republic. *Acta Parasitologica*, 58(3), 337-341.
- Oliver, J. H., Owsley, M. R., Hutcheson, H. J., James, A. M., Chen, C., Irby, W. S., & Mclain, D. K. (1993). Conspecificity of the ticks *Ixodes scapularis* and *I. dammini* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 30(1), 54-63.
- Oosting, M., Berende, A., Sturm, P., ter Hofstede, H. J., de Jong, D. J., Kanneganti, T. D., & Joosten, L. A. (2010). Recognition of *Borrelia burgdorferi* by NOD2 is central for the induction of an inflammatory reaction. *Journal of Infectious Diseases*, 201(12), 1849-1858.
- Persing, D. H., Telford, S. R., Spielman, A., & Barthold, S. W. (1990). Detection of *Borrelia burgdorferi* infection in *Ixodes dammini* ticks with the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), 566-572.
- Picken, R. N., Cheng, Y., Strle, F., & Picken, M. M. (1996). Patient isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities to strain 25015. *Journal of Infectious Diseases*, 174(5), 1112-1115.

- 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). *Journal of Clinical Microbiology*, 36(12), 3497-3504
- 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. *International journal of medical microbiology*, 297(4), 263-271.
- Pritt, B. S., Mead, P. S., Johnson, D. K. H., Neitzel, D. F., Respcio-Kingry, L. B., Davis, J. P., & Paskewitz, S. M. (2016). Identification of a novel pathogenic *Borrelia* species causing Lyme borreliosis with unusually high spirochaetaemia: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(5), 556-564.
- Purser, J. E., & Norris, S. J. (2000). Correlation between plasmid content and infectivity in *Borrelia burgdorferi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13865-13870.
- Purser, J. E., Lawrenz, M. B., Caimano, M. J., Howell, J. K., Radolf, J. D., & Norris, S. J. (2003). A plasmid-encoded nicotinamidase (*PncA*) is essential for infectivity of *Borrelia burgdorferi* in a mammalian host. *Molecular microbiology*, 48(3), 753-764.
- 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. *Nature reviews microbiology*, 10(2), 87-99.
- Ras, N. M., Lascola, B., Postic, D., Cutler, S. J., Rodhain, F., Baranton, G., & Raoult, D. (1996). Phylogenesis of relapsing fever *Borrelia* spp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(4), 859-865.
- Rauter, C., & Hartung, T. (2005). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Applied and environmental microbiology*, 71(11), 7203-7216.
- Reis, R. B., Ribeiro, G. S., Felzemburgh, R. D., Santana, F. S., Mohr, S., Melendez, A. X., & Carvalho, M. S. (2008). Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. *PLoS Negl Trop Dis*, 2(4), e228.
- 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. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(4), 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. *Clinical microbiology and infection*, 3(1), 109-116.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Mokráček, A., Piskunová, N., Růžek, D., Mallatová, N., & Grubhoffer, L. (2008). Detection of *Borrelia bissettii* in cardiac valve tissue of a patient with endocarditis and aortic valve stenosis in the Czech Republic. *Journal of clinical microbiology*, 46(10), 3540-3543

- Rudenko, N., Golovchenko, M., Lin, T., Gao, L., Grubhoffer, L., & Oliver, J. H. (2009a). Delineation of a New Species of the *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Complex, *Borrelia americana* sp. nov. *Journal of clinical microbiology*, 47(12), 3875-3880.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., & Oliver, J. H. (2009b). *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from the southeastern region of the United States. *Journal of clinical microbiology*, 47(1), 134-141.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Růžůek, D., Piskunova, N., Mallátová, N., & Grubhoffer, L. (2009c). Molecular detection of *Borrelia bissetii* DNA in serum samples from patients in the Czech Republic with suspected borreliosis. *FEMS microbiology letters*, 292(2), 274-281
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., & Oliver, J. H. (2011). Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks and tick-borne diseases*, 2(3), 123-128.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., & Oliver, J. H. (2013). The rare ospC allele L of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, commonly found among samples collected in a coastal plain area of the southeastern United States, is associated with *Ixodes affinis* ticks and local rodent hosts *Peromyscus gossypinus* and *Sigmodon hispidus*. *Applied and environmental microbiology*, 79(4), 1403-1406.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Hönig, V., Mallátová, N., Krbková, L., Mikulášek, P., & Oliver, J. H. (2013). Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto ospC alleles associated with human Lyme borreliosis worldwide in non-human-biting tick *Ixodes affinis* and rodent hosts in southeastern United States. *Applied and environmental microbiology*, 79(5), 1444-1453.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Vancova, M., Clark, K., Grubhoffer, L., & Oliver, J. H. (2016). Isolation of live *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochaetes from patients with undefined disorders and symptoms not typical for Lyme borreliosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(3), 267-e9.
- Ryffel, K., Péter, O., Rutti, B., Suard, A., & Dayer, E. (1999). Scored antibody reactivity determined by immunoblotting shows an association between clinical manifestations and presence of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, and *B. valaisianain* humans. *Journal of clinical microbiology*, 37(12), 4086-4092.
- Rygg, Å., & Borch, K. (2006). HIV, gonorrhoe og syfilis i den Nord-Norske populasjonen.
- Sanders, F. H., & Oliver, J. H. (1995). Evaluation of *Ixodes scapularis*, *Amblyomma americanum*, and *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) from Georgia as vectors of a Florida strain of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Medical Entomology*, 32(4), 402-406.
- Sapi, E., Bastian, S. L., Mpoy, C. M., Scott, S., Rattelle, A., Pabbati, N., & Datar, A. (2012). Characterization of biofilm formation by *Borrelia burgdorferi* in vitro. *PLoS One*, 7(10), e48277.
- Scott, J. D., & Foley, J. E. (2016). Detection of *Borrelia americana* in the avian coastal tick, *Ixodes auritulus* (Acari: Ixodidae), collected from a bird captured in Canada. *Open J An Sci*, 6, 207-216.

- 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. *Infection and immunity*, 76(7), 2888-2894.
- Schulze, T. L., Bowen, G. S., Bosler, E. M., Lakat, M. F., Parkin, W. E., Altman, R., & Shisler, J. K. (1984). *Amblyomma americanum*: a potential vector of Lyme disease in New Jersey. *Science*, 224(4649), 601-603.
- Schwan, T. G., Schrupf, M. E., Karstens, R. H., Clover, J. R., Wong, J., Daugherty, M., & Rosa, P. A. (1993). Distribution and molecular analysis of Lyme disease spirochetes, *Borrelia burgdorferi*, isolated from ticks throughout California. *Journal of clinical microbiology*, 31(12), 3096-3108.
- Slamova, M., Skallová, A., Paleniková, J., & Kopecký, J. (2011). Effect of tick saliva on immune interactions between *Borrelia afzelii* and murine dendritic cells. *Parasite immunology*, 33(12), 654-660.
- Smith, R. P., Schoen, R. T., Rahn, D. W., Sikand, V. K., Nowakowski, J., Parenti, D. L., & Steere, A. C. (2002). Clinical characteristics and treatment outcome of early Lyme disease in patients with microbiologically confirmed erythema migrans. *Annals of internal medicine*, 136(6), 421-428.
- Steere, A. C., Coburn, J., & Glickstein, L. (2004). The emergence of Lyme disease. *The Journal of clinical investigation*, 113(8), 1093-1101.
- Steere, AC. (1989) Lyme disease. *N Engl J Med*, 321: 586–589.
- Stricker, R. B., & Johnson, L. (2011). Lyme disease: the next decade. *Infect Drug Resist*, 4, 1-9.
- Strle, F., Ružić-Sabljić, E., Cimperman, J., Lotrič-Furlan, S., & Maraspin, V. (2006). Comparison of findings for patients with *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* isolated from cerebrospinal fluid. *Clinical infectious diseases*, 43(6), 704-710.
- Stromdahl, E. Y., Nadolny, R. M., Gibbons, J. A., Auckland, L. D., Vince, M. A., Elkins, C. E., & Crowder, C. D. (2015). *Borrelia burgdorferi* not confirmed in human-biting *Amblyomma americanum* ticks from the southeastern United States. *Journal of clinical microbiology*, 53(5), 1697-1704.
- Swanson, S. J., Neitzel, D., Reed, K. D., & Belongia, E. A. (2006). Coinfections acquired from Ixodes ticks. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(4), 708-727.
- Takayama, K., Rothenberg, R. J., & Barbour, A. G. (1987). Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity*, 55(9), 2311-2313.
- Teltow, G. J., Fournier, P. V., & Rawlings, J. A. (1991). Isolation of *Borrelia burgdorferi* from arthropods collected in Texas. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 44(5), 469-474.
- Ticha, L., Golovchenko, M., Oliver Jr, J. H., Grubhoffer, L., & Rudenko, N. (2016). Sensitivity of Lyme Borreliosis Spirochetes to Serum Complement of Regular Zoo Animals: Potential Reservoir Competence of Some Exotic Vertebrates. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 16(1), 13-19.

- Tilly, K., Rosa, P. A., & Stewart, P. E. (2008). Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infectious disease clinics of North America*, 22(2), 217-234.
- Wang, G., Van Dam, A. P., Le Fleche, A., Postic, D., Peter, O., Baranton, G., & Dankert, J. (1997). Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(4), 926-932.
- Wang, G., Dam, A., Schwartz, I., Dankert, J. (1999): Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato: Taxonomic, Epidemiological, and Clinical Implications. *Clinical microbiology reviews*. 12 (4), 633 – 653.
- Wang, G., Ma, Y., Buyuk, A., McClain, S., Weis, J. J., & Schwartz, I. (2004). Impaired host defense to infection and Toll-like receptor 2-independent killing of *Borrelia burgdorferi* clinical isolates in TLR2-deficient C3H/HeJ mice. *FEMS microbiology letters*, 231(2), 219-225.
- Wooten, R. M., Ma, Y., Yoder, R. A., Brown, J. P., Weis, J. H., Zachary, J. F., & Weis, J. J. (2002). Toll-like receptor 2 is required for innate, but not acquired, host defense to *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of Immunology*, 168(1), 348-355.
- Yu, P. F., Niu, Q. L., Liu, Z. J., Yang, J. F., Chen, Z., Guan, G. Q., & Yin, H. (2016). Molecular epidemiological surveillance to assess emergence and re-emergence of tick-borne infections in tick samples from China evaluated by nested PCRs. *Acta tropica*, 158, 181-188.
- Zeidner, N., Ullmann, A., Sackal, C., Dolan, M., Dietrich, G., Piesman, J., & Champagne, D. (2009). A borreliacidal factor in *Amblyomma americanum* saliva is associated with phospholipase A 2 activity. *Experimental parasitology*, 121(4), 370-375.
- Zhang, J. R., & Norris, S. J. (1998). Kinetics and in vivo induction of genetic variation of vlsE in *Borrelia burgdorferi*. *Infection and immunity*, 66(8), 3689-3697.