

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2019

Adéla Rubešová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Morfologické formy spirochet druhového
komplexu *Borrelia burgdorferi* a možnosti
indukce jejich změn**

Bakalářská práce

Adéla Rubešová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

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

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením Mgr. Michala Křupky, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne:

Adéla Rubešová

Souhrn

Tato bakalářská práce se zabývá patogenem, který způsobuje lymeskou boreliózu. Navzdory tomu, že je tento patogen znám již skoro 40 let, není této bakterii ještě zcela porozuměno. I přes mnoho provedených studií neexistuje jednoznačný závěr o perzistentních infekcích provázejících lymeskou boreliózu vyskytujících se i po adekvátní antibiotické léčbě. Toto téma tak zůstává nadále velmi kontroverzním. Jednou z uvažovaných příčin těchto chronických problémů je existence pleomorfních forem této bakterie. Neexistuje však žádný konsenzus, který by jednoznačně vyvrátil, či potvrdil klinický význam pleomorfních forem této bakterie v patogenezi lymeské boreliózy. Objasnění této problematiky by tak mohlo vést v nejlepším případě k vyřešení příčiny chronických obtíží doprovázejících lymeskou boreliózu. Proto byla tato práce zaměřena hlavně na atypické formy spirochet *B. burgdorferi*, a to i z důvodu značných rozdílů v názvosloví a charakteristikách jednotlivých morfologických forem této bakterie.

Experimentální část této práce proto byla věnována indukci různých morfologických forem této bakterie po osmotickém ovlivnění a po společné kultivaci s eukaryotickými buňkami buněčné linie U937. Pro tento experiment tedy bylo nutné zavést novou kultivační metodu umožňující kultivaci spirochet *B. burgdorferi sensu stricto* s eukaryotickou buněčnou linií U937, kdy bylo možné pozorovat adherenci těchto bakterií k eukaryotickým buňkám. Mikrokolonie tvořené živými bakteriemi byly eukaryotickými buňkami fagocytovány. Zároveň však byla pozorována i tvorba živých cystických forem této bakterie, které naopak vykazovaly odolnost a těmito eukaryotickými buňkami fagocytovány nebyly. Tato nově zavedená metoda byla následně určena jako vhodná pro využití při dalších studiích chování různých morfologických forem *B. burgdorferi*.

Summary

This bachelor thesis studies the pathogen *Borrelia burgdorferi* that which causes Lyme disease. Despite the fact that this pathogen has been known for almost forty years, there is no clear conclusion about persistent infections associated with Lyme disease, resisting the adequate antibiotic therapy. Thus, this topic remains very controversial. One of the possible causes of these chronic problems is the existence of pleomorphic forms of this bacterium in the pathogenesis of Lyme disease. There is no study which would confirm or disprove a clinical value of pleomorphic forms in Lyme disease pathogenesis. If we could get more insight into this field, chronic manifestations connected with the Lyme disease could be dealt with. Therefore, this work was mainly focused on atypical forms of *B. burgdorferi* spirochetes, partly due to large variability in the nomenclature and characteristics of the individual morphological bacterial forms.

The experimental part of this work was dedicated to induction of various morphological forms of this bacterium after osmotic influencing and after cocultivation with eukaryotic cells of the cell line U937. For that we had to develop a new cultivation method allowing the cultivation of *B. burgdorferi s. s.* with the eukaryotic cell line U937, so we could observe adherences of these bacteria to eukaryotic cells. Microcolonies formed by live bacteria were phagocytosed by eukaryotic cells. At the same time, there was also observed formation of live cystic forms of this bacterium. On the other hand, these forms were not phagocytosed by the eukaryotic cells. This newly introduced cocultivation method proved to be a very useful method in further studies of behaviour of *B. burgdorferi*.

Chtěla bych velice poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce, panu Mgr. Michalu Křupkovi, Ph.D. za jeho ochotu, čas, trpělivost, nespočet cenných rad a za poskytnutí potřebných studijních materiálů během celé doby psaní mé bakalářské práce. Další díky také patří celému kolektivu Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za zpříjemnění pracovního prostředí. Tato práce byla podpořena studentským grantem IGA_LF_2019_014.

Obsah

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	OBEČNÁ HISTORIE	3
3.2	LYMESKÁ BORELIÓZA	4
3.2.1	Klinické projevy u člověka	4
3.2.2	Diagnostika	6
3.2.3	Terapie a prevence	6
3.3	BAKTERIÁLNÍ KOMPLEX <i>BORRELIA BURGENDORFERI SENSU LATO</i> (BBSL)	6
3.3.1	Morfologie spirochet	7
3.3.2	Genom spirochet Bbsl	10
3.3.3	Další morfologické formy Bbsl	10
4	MATERIÁL A METODY	20
4.1	BIOLOGICKÝ MATERIÁL	20
4.1.1	Bakteriální kultura použitá v experimentu	20
4.1.2	Buněčná linie použitá v experimentu	20
4.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, SOUPRAVY A ROZTOKY	21
4.2.1	Použité chemikálie	21
4.2.2	Použité soupravy	21
4.2.3	Použité roztoky a jejich příprava	21
4.3	SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ A ZAŘÍZENÍ	22
4.4	POUŽITÉ EXPERIMENTÁLNÍ A VYHODNOCOVACÍ POSTUPY	23
4.4.1	Kultivace a barvení <i>B. burgdorferi</i> pro pozorování ve fluorescenčním mikroskopu	23
4.4.2	Osmotická indukce odlišných morfologických forem <i>B. burgdorferi</i>	25
4.4.3	Kultivace spirochet <i>B. burgdorferi s. s.</i> společně s buňkami buněčné linie U937	25
5	VÝSLEDKY	29
6	DISKUZE	38
7	ZÁVĚR	41
8	LITERATURA	42

Seznam symbolů a zkratek

ACA – acrodermatitis chronica atrophicans

ATCC – American Type Culture Collection

Bb – *Borrelia burgdorferi*

Bbsl – *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Bbss – *Borrelia burgdorferi sensu stricto*

BFL – „biofilm-like“ kolonie

BSK – médium Barbour-Stoenner-Kelly

CFDA-SE – 5(6)-karboxyfluorescein diacetát *N*-sukcinimidyl ester

CFSE – karboxyfluorescein sukcinimidyl ester

CM – cytoplazmatická membrána

CRASPs – complement regulator-acquiring surface proteins

cp – kruhový plazmid

DAPI – 4,6-diamidino-2-fenylindol

DbpA – decorin binding protein A

DbpB – decorin binding protein B

ECACC – European Collection of Animal Cell Culture

EM – erythema migrans

EPS – extracellular polymeric substances (extracelulární polymerní látka bakteriálních biofilmů)

Erp – OspEF related proteins

FBS – fetální bovinní sérum

FHL-1 – faktor H-like protein 1

FlaA – flagellin A (vnější protein bičíku)

FlaB – flagellin B (vnitřní protein bičíku)

JRA – juvenilní revmatoidní artritida

LB – lymeská borelióza

lp – lineární plazmid

Osp – outer surface proteins (OspA–F)

PI – propidium jodid

RBs – round bodies

RPMI-1640 – médium Roswell Park Memorial Institute 1640

SSPs – serum-starvation proteins

TROSPA – tick receptor for OspA

VlsE – variable major protein E

Seznam obrázků

Obrázek 1: Morfologická stavba *B. burgdorferi* (Bb); A – snímek ultrastruktury příčného průřezu Bb z transmisního elektronového mikroskopu, B – schématický náčrt struktury Bb na podélném průřezu (upraveno dle Singh *et Girschick*, 2004).

Obrázek 2: Zachycení morfologických struktur *B. burgdorferi* (Bb) pomocí transmisní elektronové mikroskopie po dvoudenní kultivaci v RPMI-1640 médiu bez přídavku krevního séra; A – snímek spirochet a cystických forem Bb, B – detailní struktura cystické formy Bb s odškrucujícími se váčky označenými šipkami (upraveno dle Alban *et al.*, 2000).

Obrázek 3: Snímek „biofilm-like“ kolonie kmene *B. burgdorferi* B31 v časně fázi vývoje (po dvoudenní *in vitro* kultivaci) pozorované pomocí světelné mikroskopie v temném poli, zvětšení 400x (upraveno dle Sapi *et al.*, 2012).

Obrázek 4: Snímky spirochet rodu *Borrelia* pořízené z fluorescenčního mikroskopu při zvětšení 400x. A – barveno fluorochromem CFSE, B – barveno za využití soupravy LIVE/DEAD® *BacLight*™ Bacterial Viability Kit (foto: Adéla Rubešová).

Obrázek 5: Snímek osmoticky indukovaných morfologických forem bakterie *B. burgdorferi* (Bb) pořízený z fluorescenčního mikroskopu při 400x zvětšení. Barveno za použití soupravy LIVE/DEAD® *BacLight*™ Bacterial Viability Kit. Šipka 1: mikrokolonie spirochet s neporušenou cytoplazmatickou membránou (CM), šipka 2: cystické formy s porušenou CM součástí mikrokolonie, šipka 3: cystická forma Bb s neporušenou CM (foto: Adéla Rubešová).

Obrázek 6: Výsledky 5denní kultivace *B. burgdorferi* v koncentračním gradientu 2 kultivačních médií, a to BSK-H a RPMI-1640 (foto: Adéla Rubešová).

Obrázek 7: Snímky nárůstu *B. burgdorferi* po 5denní kultivaci v koncentračním gradientu 2 médií (BSK-H a RPMI-1640), barveno propidium jodidem a SYTO® 9. Snímky pořízené fluorescenčním mikroskopem při zvětšení 200x (E, F a H) a 400x (A–D a G) (foto: Adéla Rubešová).

Obrázek 8: Snímky adherovaných morfologických forem bakterie *B. burgdorferi* (barveno za využití CFSE) k eukaryotickým buňkám linie U937 (barveno za využití DAPI) pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu při 400x zvětšení. Šipky označují formy adherované, hvězdičkou je pak označena extracelulární cystická forma (foto: Adéla Rubešová – A, D a E; Michal Křupka – B, C a F).

Seznam tabulek

Tabulka 1: Souhrnná terminologie jednotlivých morfologických variant *Borrelia burgdorferi* (upraveno dle Barbour *et* Hayes, 1986; Lantos *et al.*, 2014; Meriläinen *et al.*, 2015).

Tabulka 2: Souhrnný popis jednotlivých morfologických forem *B. burgdorferi* (upraveno dle Meriläinen *et al.*, 2015).

Tabulka 3: Nárůst mikrokolonií Bb v jednotlivých koncentracích BSK-H k RPMI-1640 médiu.

Tabulka 4: Počet jednotlivých eukaryotických buněk linie U937 vzhledem k lokalizaci bakterií *B. burgdorferi* (Bb) po 3denní kultivaci s touto bakteriální kulturou. Počítáno v 10 zorných polích.

1 Úvod

Onemocnění lymeská borelióza, které se ve skutečnosti v lidské populaci vyskytuje už velmi dlouho dobu, bylo důkladněji poznáno až téměř na konci 20. století. Lymeská borelióza je zapříčiněná spirochetami druhového komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato*, který dnes čítá více než dvacet druhů rodu *Borrelia*. Lymeská borelióza je jedno z nejčastějších multisystémových onemocnění, které přenáší členovci (konkrétně klíšťata rodu *Ixodes*). V případě pozdní diagnostiky či nevhodné léčby tohoto onemocnění, může vést až k velmi závažným chronickým obtížím. Tyto chronické obtíže se však ale mohou vyskytovat i u pacientů po vhodné a účinné antibiotické léčbě, a to jednak uplatněním autoimunitních procesů pacienta, či různým mechanismům, které *B. burgdorferi s. l.* využívá k delší perzistenci v hostiteli.

Jedním z těchto možných mechanismů je schopnost spirochet *Borrelia burgdorferi s. l.* vytvářet při nepříznivých životních podmínkách jiné morfologické formy než spirální, například různé sférické formy (cysty, vezikuly a L-formy). Tyto morfologické změny tak umožňují bakterii obejít imunitní systém hostitele a mnohdy poskytují bakterii rezistenci k určitým antibiotikům.

Problematika přeměny cystické formy *B. burgdorferi* s nízkou metabolickou aktivitou zpět k patogenní spirální formě byla již popsána. I při *in vivo* podmínkách bylo prokázáno, že jsou tyto cystické formy schopné konverze do spirochetální formy. Otázkou ale nadále zůstává, zdali tyto retransformované spirochety mohou umožnit propuknutí opětovné nákazy a vést tak k chronickým obtížím hostitele.

Touto bakalářskou prací jsem Vám tedy chtěla co nejlépe přiblížit problematiku jiných morfologických forem spirochet *B. burgdorferi* a nastínit tak význam jednotlivých morfologických forem, jejich indukci a jejich další možnosti studia.

2 Cíle práce

- Shromáždění dostupných literárních zdrojů.
- Vypracování literární rešerše zaměřené na téma bakteriálního rodu *Borrelia*, na patogenezi lymeské boreliózy a na různé morfologické formy spirochet druhového komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato*.
- Praktická část zaměřena na zvládnutí kultivačních metod spirochet *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, na indukci morfologických změn vyvolaných změnami vnějšího prostředí a na vyhodnocení jednotlivých výsledků za použití metod fluorescenční mikroskopie.

3 Literární přehled

3.1 Obecná historie

Význačné historické zmínky vztahující se k lymeské borelióze (LB) a později i k bakteriím rodu *Borrelia* lze zaznamenat od druhé poloviny 19. století. Od této doby došlo k nejdůležitějším popisům jak kožních projevů lymeské boreliózy, tak i k popisům projevů neurologických.

V roce 1883 německý lékař Buchwald předložil případ výskytu acrodermatitis chronica atrophicans (ACA). Jedná se o kožní onemocnění, které je dnes známé jako pozdní projev lymeské boreliózy. Tento nález ACA je nejspíše první zmínkou vztahující se k LB (Weber, 2001). V roce 1907 holandský bakteriolog Nicholas Swellengrebel udělil bakteriím *Spirillum gallinarum* (původce návratných horeček) nové rodové označení *Borrelia*. Toto jméno zvolil po francouzském bakteriologovi Amédéeovi Borrelym, který u tohoto rodu poprvé pozoroval peritrichální bičíky (Swellengrebel, 1907). O tři roky později, v roce 1910, byl Švédem A. Afzeliem poprvé popsán nález erythema migrans (EM). Tento Švéd věřil ve spojitost nálezu EM s kousnutím klíštětem. Tuto spojitost potvrdil v roce 1921, ale původce tohoto onemocnění byl stále neznámý (Weber, 2001).

Další pokroky ve výzkumu návratných horeček zapříčiněné bakteriemi rodu *Borrelia* mohly dále pokračovat hlavně díky dostupnosti imunochemických a molekulárních metod, které se začaly používat v polovině šedesátých let minulého století. Velkým průlomem ale bylo vytvoření kultivačního média vhodného pro kultivaci *Borrelia hermsii* doktorem Richardem Kellym. Dnes je toto kultivační médium známé jako BSK II (Kelly, 1971; Burgdorfer, 2001). Samotnému objevu bakteriálního druhu *Borrelia burgdorferi* předcházelo, když Allen Steere se svými pracovníky přednesli v roce 1977 své závěry ohledně epidemického propuknutí juvenilní revmatoidní artritidy (JRA) u dětí žijících poblíž městečka Lyme v Connecticutu (Spojené státy americké). Největší incidence této nemoci se objevovala od léta do podzimu. JRA předcházela kožní erythematózní léze podobná té, kterou popsal Afzelius v roce 1921. Toto „nové“ onemocnění bylo pojmenované lymeská artritida, později jako lymeská nemoc, kvůli doprovázejícím neurologickým a kardiologickým obtížím (Steere *et al.*, 1977a; Steere *et al.*, 1977b). Nedlouho poté byl objeven i původce tohoto onemocnění v klíšťatech druhu *Ixodes dammini* (dnes znám pod druhem *Ixodes scapularis*), a to americkým vědcem švýcarského původu Willym Burgdorferem v roce 1981 pomocí nepřímé imunofluorescence. Byla tak odhalena spojitost mezi klíštětem rodu *Ixodes*, erythema migrans, lymeskou nemocí

a spirochetami *Borrelia burgdorferi* (Bb), pojmenované právě po svém objeviteli (Burgdorfer *et al.*, 1982).

Již výzkumníci Todd a Dutton se zmiňovali ve svém článku o cystických formách spirochet (Dutton *et Todd.*, 1907). O 100 let později začaly tyto morfologické formy opět zajímat evropské a americké badatele. Tak roku 1996 mnichovská laboratoř publikovala článek o morfologických formách *Borrelia burgdorferi* (tzv. L-formách), které mohly být indukovány *in vivo* medikací penicilinu (Preac *et al.*, 1996; Burgdorfer, 2001).

3.2 Lymeská borelióza

I přes zdokonalení preventivních opatření, diagnostických metod a terapie, patří lymeská borelióza k jednomu z nejčastějších onemocnění přenášené členovci, a to i přesto, že se vyskytuje pouze v oblasti mírného pásma severní polokoule (Rizzoli *et al.*, 2011).

3.2.1 Klinické projevy u člověka

Lymeská borelióza je charakterizována jako komplexní multisystemové, infekční, zánětlivé a chronické onemocnění, které může postihnout více orgánů a tělních systémů např. kožní, kloubní, srdeční, nervový systém a jiné (Křupka *et al.*, 2007). Toto onemocnění je doprovázeno pestrou škálou klinických projevů, proto nemá u všech infikovaných pacientů stejný klinický průběh (Steere, 1989). Za tuto rozmanitost klinických projevů může také odlišné geografické zastoupení jednotlivých patogenních druhů rodu *Borrelia*. Z tohoto důvodu se některé klinické projevy liší napříč kontinenty (Stanek *et Strle*, 2008). Dle jednotlivých klinických projevů se lymeská borelióza rozděluje do tří stádií.

Prvním z nich je stádium časně lokalizované (Steere, 1989). Pro toto stádium je nejtypičtějším prvotním projevem kožní léze tzv. erythema migrans (EM), která se objevuje po 3 až 30 dnech v oblasti přisátí infikovaného klíštěte. Obvykle se však objevuje mezi 7. a 10. dnem po přisátí klíštěte (Nadelman *et Wormser*, 1995; Stanek *et al.*, 2002; Honegr, 2009). EM se nejdříve projevuje jako nesvědivá červená okrouhlá skvrna mající v průměru alespoň 5 cm a u níž může být přítomný i centrální výbled (Honegr, 2009; Stanek *et al.*, 2012). Toto stádium LB je také často doprovázeno nespecifickými, chřipce podobnými příznaky, jako je subfebrilie (Honegr, 2009), únava, bolest hlavy, kloubů, svalů atd. (Nadelman *et Wormser*, 1995). U přibližně 20 % infikovaných pacientů se EM neprojeví nebo zůstane pacientem nepovšimnuta (Nadelman *et Wormser*, 1995). Je pak těžší nákazu prokázat a bez příčné imunitní odpovědi nebo bez vhodné antibiotické léčby se spirochety mohou rozšířit

hematogenně či lymfogenně do okolních míst organismu a infekce tak může přejít do druhého tzv. časně diseminovaného stádia (Steere, 1989; Stanek *et al.*, 2012).

Druhé stádium následuje po několika týdnech až měsících od nakažení infikovaným klišťetem a může se projevit různými klinickými projevy od kožních (mnohočetná či sekundární EM a boreliový lymfocytom, který se vyskytuje jen v Evropě, a to zejména u dětí na ušním lalůčku, skrotu či prsní bradavce), neurologických (periferní paréza *n. facialis*, meningitidy, encefalitidy, akutní meningoradikuloneuritidy...), revmatologických (migrující artralgie, myalgie a akutní artritidy, které jsou častější u severoamerických pacientů), tak až po vzácné kardiální (lymeské karditidy a atrioventrikulární bloky), či zánětlivé oční projevy (Stanek *et al.*, 2008; Honegr, 2009; Stanek *et al.*, 2012). Během tohoto stádia jsou výše zmíněné klinické projevy také často doprovázeny subfebriliemi, celkovou slabostí a únavou (Steere, 1989).

K propuknutí třetího stádia (tzv. pozdního diseminovaného) dochází jen u malého počtu infikovaných pacientů (Stanek *et al.*, 2012). Projevuje se po několika měsících až letech od propuknutí infekce. K typickým projevům patří acrodermatitis chronica atrophicans (ACA), která se projevuje na akrálních částech končetin tím, že se kůže začíná zbarvovat do modro-červena a postižená místa nabývají těstovitého charakteru. V těchto postižených částech dochází také k postižení kloubů a periferních nervů. Následně v případě neléčení tyto léze atrofují a získávají vzhled papírové kůže (Honegr, 2009; Stanek *et al.*, 2012). ACA se však vyskytuje velmi zřídka u severoamerických pacientů, a to zejména proto, že je způsobena převážně spirochetami druhu *B. afzelii*, které se v Severní Americe nevyskytují (Stanek *et al.*, 2008). Dalšími klinickými projevy pozdního diseminovaného stádia jsou chronické artritidy postihující především velké klouby, kardiomyopatie a pozdní neuroboreliózy zahrnující encefalomyelitidy, encefalopatie a presenilní demenci (Honegr, 2009).

Diskutovaným a někdy i velmi kontroverzním tématem nadále zůstávají chronické obtíže spjaté s LB označované souhrnně jako tzv. post-Lyme disease syndrom, který se objevuje u 10 % až 20 % nakažených pacientů zhruba rok po terapii adekvátními antibiotiky proti LB. Jedná se o perzistenci či relaps nespecifických klinických příznaků, jako je bolest hlavy a kloubů, únava, kognitivní poruchy a parestezie (Marques, 2008; Adrion *et al.*, 2015).

3.2.2 Diagnostika

Mezi vysoce specifický klinický projev patří erythema migrans, která je sama o sobě dostačující ke stanovení diagnózy LB (Nadelman *et Wormser*, 1998). U ostatních klinických projevů, které nejsou natolik specifické, je nutné potvrdit diagnózu LB pomocí odpovídajících laboratorních metod. V klinické praxi se nejčastěji užívají metody nepřímé, lze však použít i metod přímých (Roháčová, 2012). K základním nepřímým sérologickým metodám patří ELISA rozpoznávající specifické protilátky IgM a IgG proti jednotlivým boreliovým antigenům. Tuto metodu je však nutné při výsledné pozitivitě anebo při získání mezních hodnot ověřit imunoblotem (Nadelman *et Wormser*, 1998; Honegr, 2009).

K přímým metodám patří kultivace v živném médiu Barbour-Stoenner-Kelly (BSK), mikroskopické metody – imunofluorescence, imunoelektronová mikroskopie (Wilske *et al.*, 2007; Honegr, 2009); dále pak často využívanou je PCR metoda prokazující DNA borelií v tělních tekutinách pacienta (Roháčová, 2012). Nevýhodou této metody je nemožnost rozlišit mezi živými a mrtvými spirochetami v organismu pacienta (Nadelman *et Wormser*, 1998) a zároveň i nižší citlivost této diagnostiky z krevních vzorků (Křupka *et al.*, 2008).

3.2.3 Terapie a prevence

Léčba LB je založena na podávání antibiotik, která jsou účinná pro všechna stádia onemocnění a typy manifestace. Nejefektivnější jsou však v případě stádií časných. Volba vhodných antibiotik se odvíjí od diagnostikovaného stádia LB, klinických projevů, věku pacienta a také od jeho případných alergií a dalších faktorů (např. těhotenství). U časně lokalizovaných a časně diseminovaných stádií je volbou antibiotikum doxycyklin, u dětí do 8 let a těhotných žen je indikován amoxicilin (Steere, 2001; Honegr, 2009). U kardiálních a neurologických projevů je indikován cefotaxim, ceftriaxon a případně penicilin G podávaný nitrožilně (Roháčová, 2012). Po léčbě je doporučeno pacienta dispenzarizovat po dobu 2 let (Vaňousová *et Hercogová*, 2008; Honegr, 2009).

Nejúčinnější prevence je vyhnutí se styku s klíštětem (Rizzoli *et al.*, 2011).

3.3 Bakteriální komplex *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Bbsl)

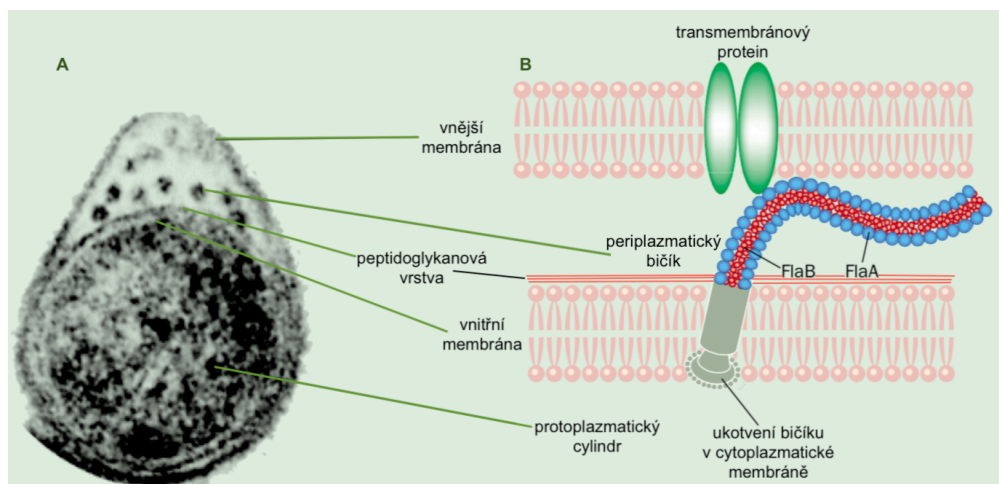
Bakteriální komplex Bbsl dnes zahrnuje nejméně dvacet jedna různých druhů rodu *Borrelia* jak patogenních pro člověka, tak i nepatogenních. Některé druhy se striktně vyskytují pouze v Eurasii, jsou to *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. spielmanii*, *B. finlandensis*, *B. bavariensis*, *B. yangtzensis*, *B. japonica*, *B. sinica*, *B. tanukii* a *B. turdi*. Druhy nacházející

se striktně pouze na severoamerickém kontinentě jsou *B. americana*, *B. kurtenbachii*, *B. andersonii*, *B. californiensis* a *B. carolinensis* (Margos *et al.*, 2009; Rudenko *et al.*, 2009; Margos *et al.*, 2010; Casjens *et al.*, 2011; Ivanova *et al.*, 2014; Margos *et al.*, 2015; Pritt *et al.*, 2016a). Za hlavní a prokazatelné patogenní druhy pro člověka jsou považovány druhy *B. burgdorferi sensu stricto* (Bbss), *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. bavariensis*. Z později objevených druhů rodu *Borrelia* mají pro člověka patogenní potenciál druhy *B. valaisiana*, *B. spielmani*, *B. lusitaniae* a také *B. mayonii* (Rudenko *et al.*, 2011; Pritt *et al.*, 2016b). V Evropě je lymeská borelióza zapříčiněna hlavně gramnegativními spirochetami *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. bavariensis* přenášené zejména klíštětem druhu *Ixodes ricinus* (Rizzoli *et al.*, 2011; Pritt *et al.*, 2016b).

3.3.1 Morfologie spirochet

Borrelia burgdorferi s. l. patří mezi gramnegativní mikroaerofilní spirochety. Mají tedy spirálovitě stočené tělo a ke svému růstu potřebují pouze nízké koncentrace přítomného kyslíku (ve větších koncentracích kyslíku nepřežívají). Nicméně Bbsl mají významné odlišnosti od jiných gramnegativních bakterií, např. postrádají lipopolysacharidy ve vnější membráně (Takayama *et al.*, 1987) a naopak disponují lipoproteiny ve vnější membráně, které mají stejně jako přítomné glykolipidy imunogenní charakter (Eiffert *et al.*, 1991; Křupka *et al.*, 2007; Kenedy *et al.*, 2012). Jejich délka se pohybuje v rozmezí 4–30 μm a tloušťka od 0,18 μm do 0,25 μm . Na každém konci buněk se nachází v průměru 7–14 periplazmatických bičíků (endoflagel), které jsou dostatečně dlouhé a překrývají se ve střední části bakterie. Bičíky jsou tak napnuty přes celou buňku bakterie (Hovind-Hougen, 1984; Johnson *et al.*, 1984; Yano *et al.*, 1997, Křupka *et al.*, 2007). Tyto bičíky jsou uvnitř tvořeny proteinem flagellinem B (FlaB) a vnější vrstvu bičíku tvoří protein flagellin A (FlaA). U *B. burgdorferi* se molekulová hmotnost proteinu FlaA rovná 38 kDa a proteinu FlaB 41 kDa (Ge *et al.*, 1998). Bičíky jsou ukotveny v cytoplazmatické membráně, obvíjí se kolem tzv. protoplazmatického cylindru a udávají tak bakterii tvar, ale hlavně ji umožňují pohyb (Rosa, 1997). Spirochetám je tak umožněna velmi dobrá pohyblivost ve vysoce viskózním prostředí (např. v extracelulární matrix či v pojivové tkáni) a zároveň jsou schopné unikat nejrychlejšími fagocytujícími buňkám v těle, a to neutrofilům, jelikož jsou Bbsl několikanásobně rychlejší. Díky těmto schopnostem je jim také umožněno překonávat jak epiteliální, tak i hematoencefalickou bariéru (Kimsey *et Spielman*, 1990; Křupka *et al.*, 2008; Malawista *et de Boisfleury Chevance*, 2008).

Nad cytoplazmatickou membránou se nachází vrstva peptidoglykanová tvořící buněčnou stěnu, která je fluidní povahy. Na samotném povrchu bakterie se nachází vnější membrána, která ohraničuje spolu s buněčnou stěnou periplazmatický prostor, kde se vinou bičíky (Johnson *et al.*, 1984). Tato vnější buněčná membrána Bbsl obsahuje více než 100 druhů polypeptidů (Luft *et al.*, 1989). Nejstudovanějšími z nich jsou lipoproteiny nazývané outer surface proteins (OspA–OspF), decorin binding proteins (DbpA a DbpB), variable major protein E (VlsE) a další. Některé z nich slouží v dnešní době pro detekci Bbsl při sérologických diagnostikách (Rosa, 1997; Kenedy *et al.*, 2012). Tyto povrchové lipoproteiny hrají klíčovou roli při prostupu Bbsl ze zažívacího traktu vektora (primárně se jedná o klíště rodu *Ixodes*) do jeho slinných žláz a odtud do hostitele (savce či ptáka), kde v závislosti na své proměnlivé expresi (závislé na době sání klíštěte, na teplotě a na fázi infekce hostitele) mohou zabránit vzniku imunitní reakce a rozšířit se tak až do cílových tkání (Anderson, 1989; Schwan *et al.*, 1991; Schwan *et al.*, 1995; Křupka *et al.*, 2007; Kenedy *et al.*, 2012). Souhrnná morfologie spirochet *B. burgdorferi* je demonstrována níže – viz Obrázek 1.



Obrázek 1: Morfologická stavba *B. burgdorferi* (Bb); A – snímek ultrastruktury příčného průřezu Bb z transmisního elektronového mikroskopu, B – schématický nákres struktury Bb na podélném průřezu (upraveno dle Singh *et Girschick*, 2004).

Lipoproteiny OspA (31 kDa), OspB (34 kDa) a OspC (22 kDa), které jsou plazmidově kódované, se nenachází pouze ve vnější buněčné membráně, ale nachází se i na vnitřní cytoplazmatické membráně, a to dokonce ve větším množství (Howe *et al.*, 1985; Fuchs *et al.*, 1992; Cox *et al.*, 1996; Kenedy *et al.*, 2012). OspA spolu s OspB jsou exprimovány při kolonizaci a perzistenci *B. burgdorferi* v zažívacím traktu nepřísatého klíštěte. OspA se specificky váže v zažívacím traktu klíštěte ke glykoproteinovému receptoru TROSPA (tick receptor for OspA). Tato vazba je nutná pro kolonizaci klíštěte boreliemi, tedy k adhezi

B. burgdorferi k epiteliálním buňkám zažívacího traktu klíštěte. Během sání na hostiteli dochází ke snížení exprese OspA, OspB a zároveň se zvyšuje exprese OspC. Díky tomuto dochází k přestupu *B. burgdorferi* ze zažívacího traktu do slinných žláz klíštěte (Pal *et al.*, 2004; Neelakanta *et al.*, 2007; Kennedy *et al.*, 2012). OspC je tedy exprimován recipročně vůči OspA a OspB po několika hodinách od přisátí klíštěte. Tento lipoprotein je faktorem virulence, který je nezbytný při časném stádiu infekce obratlovců a dle novějších výzkumů OspC není potřebný při migraci *B. burgdorferi* ze zažívacího traktu klíštěte do jeho slinných žláz (Grimm *et al.*, 2004; Křupka *et al.*, 2007; Kennedy *et al.*, 2012).

OspE a OspF (spolu s dalšími proteiny kódovanými různými *erp* geny) patří do skupiny tzv. OspEF related proteins (Erps) (Stevenson *et al.*, 1996). Dále bylo prokázáno, že do této skupiny proteinů patří i některé proteiny ze skupiny označující se jako CRASPs (complement regulator-acquiring surface proteins). Obě tyto výše zmíněné skupiny proteinů umí vázat lidský sérový faktor H či faktor H-like protein 1 (FHL-1), které jsou inhibičními proteiny C3b složky komplementu (Kraiczy *et al.*, 2004). Vazbu faktoru H či faktoru H-like protein 1 využívají tělu vlastní buňky pro svou ochranu před nespecifickou aktivací komplementu a zabraňují tak svému autoimunitnímu poškození komplementem. Tento stejný mechanismus patří k jednomu z mnohých, které Bbsl využívají pro únik před imunitním systémem hostitele. Díky tomuto je umožněna delší doba perzistence Bbsl v hostiteli a přechod do pozdního stádia LB (Hellwage *et al.*, 2001; Kraiczy *et al.*, 2001; Křupka *et al.*, 2007; Kennedy *et al.*, 2012).

K další strategii, která umožňuje Bb uniknout imunitnímu systému hostitele, je možnost opakovaných genových konverzí na lokusu *vls* genu probíhajících v konkrétním plazmidu Bb, kdy dochází k expresi variabilních antigenních proteinů VlsE (variable major protein-like sequence E) během infekce hostitele (Zhang *et al.*, 1997; Kennedy *et al.*, 2012).

DbpA a DbpB jsou tzv. decorin binding proteins A a B, které se účastní specifické adheze Bbsl k hostitelské buňce, konkrétně k proteoglykanu dekorinu asociovaného s kolagenem (Guo *et al.*, 1995). Bylo také prokázáno, že DbpA a DbpB hrají významnou roli při pozdních chronických stádiích lymeské boreliózy, ale že nejsou nezbytné pro propuknutí infekce u savců (Blevins *et al.*, 2008; Kennedy *et al.*, 2012).

K dalším adhezivním molekulám Bbsl patří tzv. fibronectin binding protein (konkrétně BBK32), který se v hostitelích váže na extracelulární protein fibronectin (Szczepanski *et al.*, 1990; Kennedy *et al.*, 2012) a glykosaminoglykany (Fischer *et al.*, 2006).

3.3.2 Genom spirochet Bbsl

První genetická mapa kmene *B. burgdorferi sensu stricto* B31 byla získána v roce 1997 (Fraser *et al.*, 1997; Křupka *et al.*, 2007) a kompletně byla doplněna v roce 2000 o další nukleotidové sekvence deseti plazmidů (Casjens *et al.*, 2000). Genom Bbsl je druhově jedinečný. Liší se jak strukturálně, organizačně, tak i v počtu kopií jednotlivých genů (Rosa, 1997). Genom Bb je velký 1,5 Mb a je zastoupený jediným unikátním lineárním chromozomem přibližné délky 1 Mb a devíti lineárními (lp) a kruhovými plazmidy (cp), kterých je dvanáct (Fraser *et al.*, 1997; Casjens *et al.*, 2000). Na obou koncích lineárního chromozomu a lineárních plazmidů se nachází kovalentně uzavřené vlásenky (Barbour *et Garon*, 1987; Casjens *et al.*, 1997). Lineární chromozom obsahuje převážně kódující sekvence genů zabezpečující správnou vitální funkčnost spirochety a homology známých housekeeping genů. Plazmidy mají naopak menší počet kódujících sekvencí, ale i toto malé množství kódujících sekvencí kóduje velmi důležité proteiny, které se účastní během různých fází životního cyklu Bb (Iyer *et al.*, 2003; Rosa *et al.*, 2005; Margos *et al.*, 2009). Tyto bakterie ovšem nekódují všechny potřebné proteiny s buněčnou biosyntetickou aktivitou, tudíž se z nich stávají organismy na hostiteli či vektoru závislé. To je také důvod, proč jsou při kultivaci spirochet Bb v *in vitro* podmínkách potřeba komplexní kultivační média doplněná savčím krevním sérem (Fraser *et al.*, 1997).

3.3.3 Další morfologické formy Bbsl

Již od roku 1905 se předpokládalo, že *Borrelia burgdorferi* má i odlišné formy, než jen formu spirální (Miklossy *et al.*, 2008). Dnes je již známo, že je spirocheta Bb schopna vlivem nevhodných podmínek prostředí transformovat svou morfologii pohyblivé spirochety do různých nepohyblivých sférických tělísek (RBs – „round bodies“), které jsou vůči těmto nevhodným podmínkám odolnější (Brorson *et al.*, 2009; Meriläinen *et al.*, 2016). Při fyziologické *in vitro* kultivaci se *B. burgdorferi* vyskytuje nejčastěji jako spirocheta. V malém množství lze však najít i formy odlišné, nejčastěji membránové vezikuly a agregáty Bb – „biofilm-like“ kolonie (Meriläinen *et al.*, 2015).

Kvůli nesjednocené klasifikaci a názvosloví je obtížné rozdělit jednotlivé formy do určitých skupin a je velmi matoucí přiřazovat jednotlivé hovorové pojmy k daným formám. V této práci se tedy budu držet souhrnného rozdělení, které uveřejnil se svými spolupracovníky výzkumník Lantos v roce 2014 (viz Tabulka 1 níže). V další části se tak zaměřím především na formy cystické, granulární vezikuly označované jako „blebs“, či sférické formy bez buněčné

stěny – tzv. L-formy (Lantos *et al.*, 2014). A v neposlední řadě se také zmíním o agregátech Bb („biofilm-like“ koloniích).

Tabulka 1: Souhrnná terminologie jednotlivých morfologických variant *Borrelia burgdorferi* (upraveno dle Barbour *et Hayes*, 1986; Lantos *et al.*, 2014; Meriläinen *et al.*, 2015).

Název morfologické formy	Další užívané pojmy
„Blebs“	„coccoid bodies“ „gemmae“ granula vezikuly
L-forma	„cell wall-deficient form“ „round bodies“ sféroplast či protoplast
Cysta	„round bodies“

Nevhodné podmínky pro spirochety Bb mohou nastat například při změně pH prostředí (Murgia *et Cinco*, 2004), při osmotických změnách (Brorson *et Brorson*, 1998a), při expozici různým antibiotikům (Kersten *et al.*, 1995), či při depleci potřebných metabolitů. Také ale může docházet k morfologickým změnám v důsledku stáří spirochet nezávisle na podmínkách prostředí (Burgdorfer *et Hayes*, 1989). Kromě toho byla prokázána indukce morfologických změn spirochet také v mozkomíšním moku a v lidském krevním séru (Brorson *et Brorson*, 1998b; Meriläinen *et al.*, 2015). V *in vitro*, ale i v *in vivo* podmínkách byla také dokázána návratnost sférických forem do původní spirochetální podoby (Brorson *et Brorson*, 1998a; Brorson *et Brorson*, 1998b; Gruntar *et al.*, 2001). Tyto sférické formy Bb jsou odlišně fagocytovány diferencovanými makrofágy, a tudíž indukují jinou imunitní odpověď (produkcí jiných cytokinů a chemokinů) než spirochety při *in vitro* kultivaci (Meriläinen *et al.*, 2016). Bylo také potvrzeno, že jednotlivé morfologické formy spirochet Bb se liší v expresi membránových proteinů, a tak mají i odlišné antigenní vlastnosti (Alban *et al.*, 2000; Meriläinen *et al.*, 2016).

I přes málo informací o přesném průběhu transformace spirochet Bb do sférických forem bylo pomocí elektronové mikroskopie zjištěno, že změna do cystických tvarů probíhá počátečním vypoulením membrány a následným složením protoplazmatického cylindru uvnitř vnější membrány (Murgia *et Cinco*, 2004). Prokázáno také bylo, že bičíky spirochet s deficientním hlavním proteinem FlaB nijak neovlivnily tvorbu sférických forem (Al-Robaiy *et al.*, 2010).

Jelikož je známo velmi málo o jednotlivých sférických formách Bb, existuje mnoho kontroverzních názorů týkajících se významu jednotlivých pleomorfních forem Bb v patogenezi LB (Lantos *et al.*, 2014; Meriläinen *et al.*, 2015).

Jedním z dnes uvažovaných názorů je, že díky morfologickým změnám disponují Bb dalším možným mechanismem, který jim umožňuje uniknout imunitnímu systému hostitele a prodlužuje tak jejich perzistenci v hostitelově těle i během nevhodných podmínek (Miklossy *et al.*, 2008; Meriläinen *et al.*, 2016). Mohou tedy být jednou z možných příčin chronických infekcí (Kersten *et al.*, 1995; Brorson, 2009). I když nejsou závěry jednotlivých výzkumů ještě zcela přijaty, je však již dnes evidentní, že určitou roli v patogenezi LB tyto sférické formy zastávají (Meriläinen *et al.*, 2016).

„Blebs“

Jedná se o různě velké extracelulární vezikuly, které Bbsl produkuje v nevhodných kultivačních podmínkách ve velkém počtu (jak *in vitro*, tak i *in vivo*), např. při osmotických a teplotních změnách, při změnách pH, při expozici anti-boreálními protilátkami, komplementu a antibiotikům. Tato tvorba je taky závislá na stáří boreální kultury (Barbour *et Hayes*, 1986; Garon *et al.*, 1989; Dorward *et al.*, 1991; Radolf *et al.*, 1994). Tyto formy Bb byly nalezeny jak v mozkomíšním moku, tak i ve vzorcích krve pacientů (Hulínská *et al.*, 1994). Jsou to odškrabované vezikuly ze spirochetální formy (viz Obrázek 2B níže), kdy každá vezikula disponuje vnější membránou a některé mohou obsahovat i cytoplazmatickou membránu (Radolf *et al.*, 1994). Uváděnou průměrnou velikostí vezikul je 1,3 μm (Meriläinen *et al.*, 2015). Dalšími výzkumy bylo také prokázáno, že žádná z indukovaných vezikul neobsahovala 41kDa FlaB (Dorward *et al.*, 1991; Bergström *et al.*, 2002). Naopak obsahovaly jak lineární, tak i kruhovou plazmidovou DNA, a to převážně tu, která obsahovala geny *osp* (Garon *et al.*, 1989; Persing *et al.*, 1994; Radolf *et al.*, 1994; Bergström *et al.*, 2002). V jejich membráně tak byly detekované jak OspA, OspB, adhezivní molekuly k endoteliím hostitele, tak i další nízkomolekulární lipoproteiny neznámé funkce (Dorward *et al.*, 1991; Katona *et al.*, 1992; Shoberg *et Thomas*, 1993; Shoberg *et Thomas*, 1995). Nelze tedy popřít možnou úlohu vezikul Bb v procesu výměny genetické informace (Garon *et al.*, 1989; Alban *et al.*, 2000).

V prvotních studiích byla tato sférická forma mylně považována za jedno z vývojových stádií Bb (Barbour *et Hayes*, 1986). Dnes je již známo, že se o žádné vývojové stádium Bb nejedná, ale že jsou to subcelulární formy schopné vyvolat imunitní odpověď (Miklossy *et al.*, 2008). Jsou považovány za silné B-lymfocytové mitogeny (látky indukující buněčnou

proliferaci polyklonálních B-lymfocytů) a indukují sekreci IgM protilátek (Whitmire *et Garon*, 1993; Meriläinen *et al.*, 2015). Jedním z uvažovaných důvodů tvorby je i ochrana spirochet před jejich detekcí imunitním systémem, jelikož se část antigenů nachází ve vezikulách (Hulínská *et al.*, 1994).

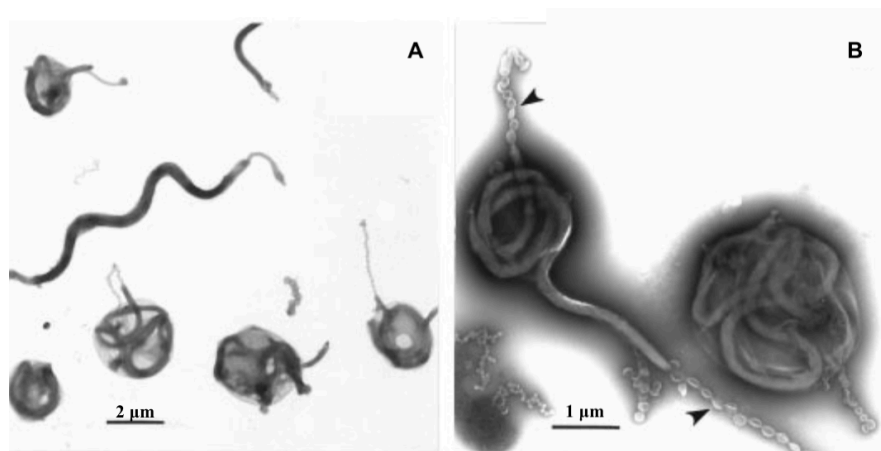
I dnes však není zcela jasné k čemu tyto vezikuly slouží (Meriläinen *et al.*, 2015). Na rozdíl od cystických forem však nejsou vezikuly metabolicky aktivní a jsou tudíž neschopné další kultivace či přeměny zpět do spirochetální podoby (Alban *et al.*, 2000).

Cysty

Cysty *B. burgdorferi* vznikají změnou buněčné integrity a následnou změnou tvaru spirochet do (nejčastěji nepravidelně) sférické formy, která je nepohyblivá (Brorson *et Brorson*, 1997; Alban *et al.*, 2000). Tyto cystické formy jsou opět indukovány při nepříznivých podmínkách prostředí (např. při vystavení antibiotikům, protilátkám, oxidativnímu stresu, depleci metabolitů, změně pH a teploty), ale i stáří bakteriální kultury hraje roli (Kersten *et al.*, 1995; Brorson *et Brorson*, 1997; Brorson *et Brorson*, 1998b; Alban *et al.*, 2000; Murgia *et Cinco*, 2004). Významnou studií byla práce P. S. Albana, který se svými spolupracovníky indukoval cysty při *in vitro* podmínkách v médiu RPMI-1640 bez přídavku králičího krevního séra. Spirochety tak neměly žádný zdroj mastných kyselin a tuků. Docházelo tak tedy k tvorbě cyst (transformováno přibližně 90 % spirochet během prvních 48 hodin), která mohla být zastavena přídavkem antibiotika tetracyklinu. Po přidání králičího krevního séra či BSK II média ke kultuře došlo k přeměně cystické formy do formy spirochetální (během 2 dnů přibližně u poloviny cyst). V průběhu hladovění došlo k syntéze více než 20 proteinů, z nichž některé byly antigenní pro savčího hostitele. Tyto proteiny byly označeny jako „serum-starvation proteins“ (SSPs) a některé z nich byly identifikovány jako homology k spirochetálnímu VlsE a OspA proteinu. Hladovění tak indukovalo změny v syntéze proteinů a došlo ke změně tvaru spirochety (Brorson *et Brorson*, 1998b; Alban *et al.*, 2000).

Tvorba cyst začíná stočením spirochety do uzlů. Uvnitř cysty se pak nachází buď stočený protoplazmatický cylindr s bičíky a makromolekuly (může také docházet ke vzniku cyst z více spirochet), nebo uvnitř cysty vzniká zfúzovaná jednolitá hmota („jádro“) tvořící se u starších cyst. Velikost jednotlivých cyst se odvíjí od počtu obsažených spirochet v této cystě. Stočený protoplazmatický cylindr má obvyklou trilaminární membránu (neztrácí tak ani vrstvu peptidoglykanovou) (Brorson *et Brorson*, 1997; Brorson *et Brorson*, 1998b; Miklossy *et al.*, 2008; Meriläinen *et al.*, 2015), ačkoliv má zároveň odlišnou architekturu.

Postrádá některé povrchové lipoproteiny nacházející se u spirochetální formy. Na povrchu živých cyst se nachází OspA, naopak u mrtvých cyst se OspA nachází uvnitř buňky (Hulínská *et al.*, 1994; Hulínská, 2013; Meriläinen *et al.*, 2015). Tento OspA je v případě cyst exprimován ve větší míře (Alban *et al.*, 2000). Na Obrázku 2 viz níže je pomocí transmisní elektronové mikroskopie zaznamenán obecný tvar transformované spirochety po 48hodinové kultivaci v RPMI-1640 médiu bez přítomného krevního séra. Tímto typickým tvarem je tedy okrouhlá částice s často jedním koncem stočené spirochety vyčnívajícím z povrchu této sférické formy. U některých cyst je také patrné odškrcování vezikul označujících se jako „blebs“ (Alban *et al.*, 2000; Al-Robaiy *et al.*, 2010).



Obrázek 2: Zachycení morfologických struktur *B. burgdorferi* (Bb) pomocí transmisní elektronové mikroskopie po dvoudenní kultivaci v RPMI-1640 médiu bez přídavku krevního séra; A – snímek spirochet a cystických forem Bb, B – detailní struktura cystické formy Bb s odškrcoujícími se váčky označenými šipkami (upraveno dle Alban *et al.*, 2000).

Tvorba cystických forem je pomalý, ale aktivní proces vyžadující syntézu proteinů a nejedná se tedy o degenerativní formy spirochet bez metabolické aktivity (Alban *et al.*, 2000). Návratnost do mobilní spirochetální formy byla prokázána jak *in vitro*, tak i *in vivo*. Cysty se po vystavení vhodným *in vitro* podmínkám navracejí během 10 sekund do neporušených nepohyblivých spirochet, které svou pohyblivost získávají po 12–15 hodinách po rozbalení. Množství retransformovaných spirochet a doba trvání konverze se liší dle délky kultivace v nevhodných podmínkách. Cystické formy byly nalezeny v určitých tkáních a nachází se tedy jak extracelulárně, tak i intracelulárně. Intracelulární výskyt v neuronech a gliových buňkách, tedy v imunologicky privilegovaných tkáních, by mohl vysvětlit dlouhou perzistenci Bb v hostiteli (Hulínská *et al.*, 1994; Brorson *et Brorson*, 1997; Brorson *et Brorson*, 1998b; Alban *et al.*, 2000; Miklossy *et al.*, 2008).

Mělo se za to, že cystické formy nejsou patogenními, ale že se jedná jen o degenerativní formy spirochet a jsou rezistentní vůči antibiotikům (Brorson *et Brorson*, 1997). Dnes se již jejich patogenita připouští, a to hlavně díky výsledkům studie *in vivo* konverze cyst do původní spirochetální formy (Gruntar *et al.*, 2001). Toto stádium je považované za stádium „klidové“ s nízkou metabolickou aktivitou, které umožňuje spirochetě přežít nepříznivé podmínky. Tyto formy tak mohou vysvětlit relapsující problémy pacientů s LB (Brorson *et Brorson*, 1997).

Někteří autoři se také zmiňují o spojitosti výskytu cystických forem Bb v mozkomíšním moku s neurodegenerativními onemocněními (Allan *et al.*, 2009). Tento výskyt cystických forem byl prokázán jak u čtyř pacientů s Alzheimerovou chorobou, tak i u osmi pacientů s roztroušenou sklerózou. Z těchto studií však nebylo patrné, zdali tito pacienti prodělali LB bez nebo s vhodnou antibiotickou léčbou. Další studie pacientů s těmito neurodegenerativními poruchami tuto spojitost nepotvrdily a tato teorie je stále diskutabilní (Marques *et al.*, 2000; Miklossy *et al.*, 2008; Lantos *et al.*, 2014).

V dnešní době je také hodně diskutovaným onemocněním Baggio-Yoshinari syndrom (Brazilian LD-like illness – dle místa původu identifikace), který je přenášen klíštětem rodu *Amblyomma*, *Dermacentor* a *Rhipicephalus*. Toto onemocnění se vyskytuje převážně v Brazílii a možná je přítomné i v dalších zemích Jižní Ameriky. Za původce tohoto onemocnění je pokládána atypická morfologická forma spirochety *B. burgdorferi sensu stricto*.

Baggio-Yoshinari syndrom má totožné klinické příznaky jako lymeská borelióza. Odlišuje se pouze svou velmi častou rekurencí, a to i po vhodné antibiotické terapii, tedy reaktivací symptomů, které jsou často obtížně diagnostikovatelné a léčitelné. Odlišnost tohoto onemocnění od LB je vysvětlována odlišným vektorem, podnebím i odlišnou biodiverzitou (Yoshinari *et al.*, 2010; Mantovani *et al.*, 2012; Miziara *et al.*, 2018).

L-forma bakterií *Borrelia burgdorferi*

Jedná se o transformované spirochetální formy bez buněčné stěny, které poprvé popsal roku 1993 Margulis se svými spolupracovníky. První zprávou o provedené transformaci spirochet Bb do sféroplastických forem byla roku 1995 práce výzkumníka Davida Brucka a jeho spolupracovníku, kteří ve svém výzkumu popsali průběh transformace a také ultrastrukturu vzniklých sféroplastů. Z těchto sféroplastů na konci transformace vyčnívaly shluky bičíku, nejspíše kvůli minimálnímu mechanickému narušení spirochety. Touto studií se jim tedy také nabídl pohled na možný mechanismus imunitního systému hostitele, který

se tyto bičičky snaží vystavit vně bakterie, kvůli přítomnosti velmi imunogenních epitopů (Bruck *et al.*, 1995).

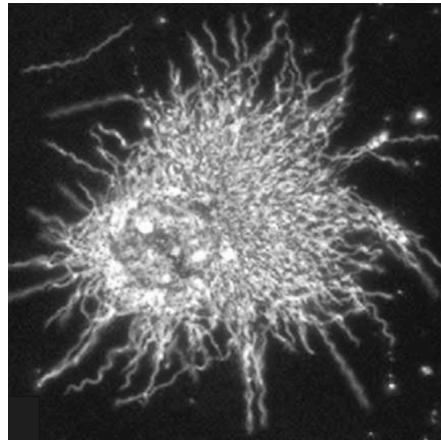
Rok poté Preac-Mursic se svými kolegy uveřejnila výsledky své studie věnující se indukci a kultivaci L-formy Bb (Preac-Mursic *et al.*, 1996; Stricker *et al.*, 2011). Výsledkem tedy bylo, že tyto L-formy jsou bez či s částečně zachovalou buněčnou stěnou a k jejich indukci může docházet jak enzymatickým trávením, tak i částečnou či úplnou inhibicí syntézy bakteriální buněčné stěny. Při *in vitro* kultivaci se tyto L-formy tvoří za výše zmíněných nevhodných podmínek, tedy v nevhodném kultivačním médiu, při změnách pH, při vystavení spirochet enzymatické aktivitě, komplementu či účinkům antibiotik. Významným objevem bylo, že tyto L-formy mohou být nejsilněji indukovány *in vivo* při terapii penicilinem, tedy po podání β -laktamových antibiotik. Díky tomuto mechanismu by Bb mohly přispívat k chronickým obtížím.

Tyto nemotilní L-formy jsou považovány za geneticky identické spirochétám a bylo prokázáno, že sféroplasty Bb jsou jak metabolicky, tak i translačně aktivní, jsou odolnější vůči změnám prostředí, ale zároveň postrádají funkci se dělit. Proto jejich návrat zpět do spirochetální formy při kultivaci ve vhodném médiu je často velmi dlouhodobý či úplně nemožný. Význam tvorby těchto L-form je opět velmi kontroverzním tématem diskuzí. Jedním z názorů je, že díky tomuto mechanismu Bb mohou déle perzistovat v hostiteli a mít určitou roli v patogenezi LB. Tento názor podporuje i výskyt těchto L-form v odebraných vzorcích pacientů léčených adekvátními antibiotiky (Bruck *et al.*, 1995; Preac-Mursic *et al.*, 1996; Allan *et al.*, 2009).

„Biofilm-like“ kolonie (BFL)

Mnoho bakterií se shlukuje do tzv. biofilmů (spleť bakterií obalené vlastní vyprodukovanou polymerní matrix), které bakterie chrání před účinky nepříznivého prostředí (Costerton *et al.*, 1999; Sapi *et al.*, 2012). První studie, která se zabývala koloniemi *B. burgdorferi*, byla studie výzkumníka T. J. Kurtiho, který se svými spolupracovníky pozoroval kolonie dvou kmenů Bb kultivovaných na BSK mediu s příměsí agarózy (Kurti *et al.*, 1987). Pozdějšími studiemi bylo potvrzeno, že Bb je schopná tvořit biofilmu-podobné kolonie (BFL; viz Obrázek 3 níže), a to jak na biotických i abiotických substrátech, tak je schopná tvořit i disperzní agregáty (Sapi *et al.*, 2012). U Bb byly tyto struktury prokázány nejen při *in vitro* kultivaci, ale byly přítomny i v klišťeti během a po sání krve hostitele (Srivastava *et de Silva*, 2009). Nejedná se tedy o pouhé agregáty buněk, ale jsou to shluky

bakterií s charakteristickou buněčnou architekturou pro mnoho bakteriálních biofilmů. V tomto případě jsou tedy kolonie tvořeny různými morfologickými formami Bb (spirochetami, cystami a vezikulami), což bylo prokázáno jak v *in vitro*, tak i v *in vivo* podmínkách (Sapi *et al.*, 2012; Meriläinen *et al.*, 2015).



Obrázek 3: Snímek „biofilm-like“ kolonie kmene *B. burgdorferi* B31 v časně fázi vývoje (po dvoudenní *in vitro* kultivaci) pozorované pomocí světelné mikroskopie v temném poli, zvětšení 400x (upraveno dle Sapi *et al.*, 2012).

Vysoká odolnost těchto agregátů je zprostředkována unikátní ochrannou vrstvou extracelulárních polymerních látek (EPS), které jsou vylučovány agregovanými buňkami (Sapi *et al.*, 2012; Meriläinen *et al.*, 2015). Tvorba BFL je podporována vysokou hustotou buněk při *in vitro* kultivaci, není to však jediný faktor, který tuto tvorbu podporuje. Tvorba je dále pozitivně ovlivněna také vyšší teplotou a nízkým pH (Srivastava *et de* Silva, 2009; Meriläinen *et al.*, 2015). V *in vitro* podmínkách bylo také prokázáno, že zvýšená exprese OspC nemá vliv na agregaci Bb (Srivastava *et de* Silva, 2009). Suspendované biofilmy disponují stejnými vlastnostmi jako biofilmy přisedlé k povrchu. Mají tedy ochranu extracelulární polymerní vrstvou, která obsahuje především polysacharid alginát s přítomným vápníkem a nepostradatelnou extracelulární DNA. Extracelulární DNA v tomto případě zastává několik funkcí, jednou z nich je počáteční substrátové upevnění a stabilizace extracelulární matrix (Whitchurch *et al.*, 2002; Sapi *et al.*, 2012; Di Domenico *et al.*, 2018). Bylo také prokázáno, že součástí EPS suspendovaných kolonií Bb jsou proteiny podobné kolagenu (Meriläinen *et al.*, 2015). Součástí biofilmů jsou i struktury podobné kanálkům, které dle autorů nejspíše slouží k přísunu živin a kyslíku k agregovaným buňkám a zároveň také odvádí metabolity (Costerton *et al.*, 1999; Sapi *et al.*, 2012; Di Domenico *et al.*, 2018).

Není mnoho prací zabývajících se biofilmy Bb a jejich klinickými důsledky. Obecně však lze říci, že mnohé bakteriální biofilmy (například biofilmy tvořené bakteriemi

Pseudomonas aeruginosa, *E. coli* a dalšími) s jejich rezistencí k antibiotikům a imunitním reakcím hrají nemalou roli v chronických a perzistentních infekcích (Costerton *et al.*, 1999). U *Borrelia burgdorferi* ovšem není úplně objasněna funkce těchto agregátů. Je například možné přemýšlet, že díky tvorbě těchto biofilmů Bb dochází ke zlepšení přilnavosti bakterie k hostitelské buňce a vyvarování se tak fagocytózy, v čem by mohla dopomoci právě přítomnost kolagenu-podobných proteinů v EPS (Barbour, 1984; Srivastava *et de Silva*, 2009; Meriläinen *et al.*, 2015).

Pro sjednocení jednotlivých informací ohledně výše zmíněných morfologických formách Bb jsem níže zařadila jejich přehlednou charakteristiku (viz Tabulka 2).

Tabulka 2: Souhrnný popis jednotlivých morfologických forem *B. burgdorferi* (upraveno dle Meriläinen *et al.*, 2015).

Název morfologické formy	Popis morfologie	Průměrná velikost
Spirocheta	podlouhlý spirální tvar	20 μm (= průměrná délka)
„Blebs“	malé, sférické váčky nebo na spirochetě přisedlé	1,3 \pm 0,43 μm *
Cystické formy („round bodies“)	větší, sférický tvar	2,8 \pm 0,46 μm *
„Biofilm-like“ kolonie	agregát spirochet (často i vezikul a cystických forem) chráněný EPS	obsahuje více než 10 spirochet/vezikul/„RBs“

* znamená \pm směrodatná odchylka (SD)

RBs – „round bodies“

EPS – extracelulární polymerní vrstva

Terapie odlišných forem spirochet *Borrelia burgdorferi*

Jelikož zatím neexistují přesvědčivé důkazy, které by naprosto vyvracely úlohu například cystických forem v patogenezi lymeské boreliózy, je tedy nutné připustit i možnost, že by tyto morfologické formy mohly být zodpovědné za chronické obtíže pacientů. Pro nejefektivnější eradikaci všech morfologických forem *B. burgdorferi* je tedy nezbytné studovat účinnost různých antibiotik na jednotlivé morfologické formy Bb. Zároveň také pozorovat vliv jednotlivých antibiotik na indukci těchto morfologických změn a předcházet jim. Různá senzitivita odlišných morfologických forem k jednotlivým antibiotikům by tak mohla odůvodnit delší perzistenci Bb v hostiteli. V roce 2011 byla provedena studie v *in vitro* podmínkách na nejvíce rezistentních formách Bb, a to na biofilmech a na cystických formách. Tato studie pozorovala účinek pěti antibiotik (doxycyklinu, amoxicilinu, tigecyklinu, metronidazolu a tinidazolu) na třech různých morfologických formách bakterie *B. burgdorferi* (spirochetálních, cystických a na biofilmech). Výsledky byly překvapující, jelikož v dnešní

době se lymeská borelióza léčí především doxycyklinem či amoxicilinem. Doxycyklin eradikoval přibližně 90 % spirochet Bb, zároveň však dvojnásobně zvyšoval výskyt sférických forem Bb. Amoxicilin naproti tomu eradikoval přibližně 85 % až 90 % spirochet a účinnost eradikace sférických forem byla přibližně 68%. Metronidazol snížil počet spirochet o 90 % a sférických forem až o 80 %. Tigecyklin a tinidazol vykazovaly 80% až 90% eradikační účinnost, a to jak na spirochetální, tak i sférickou formu Bb. Tinidazol však jako jediný snížil až 90 % životaschopných Bb v biofilmech. U ostatních čtyř antibiotik se účinnost pohybovala mezi 30 % až 55 % (Brorson *et Brorson*, 1999; Honegr, 2009; Sapi *et al.*, 2011). Je však nutné vzít v úvahu, že některá z výše jmenovaných antibiotik jsou antibiotika bakteriostatická a nelze tak předpokládat 100% eliminaci Bb při *in vitro* kultivaci. Efektivnost eradikace Bb těmito antibiotiky při *in vivo* podmínkách je totiž zvýšena imunitním systémem hostitele.

Při porovnání těchto výsledků s *in vivo* antibiotickou terapií provedenou na myších však jednotlivé výsledky spolu nesouhlasí. Například antibiotikum tigecyklin bylo neúčinné v pozdních fázích LB při *in vivo* kultivaci. Existují ale mnohá vysvětlení, která by tento nesoulad mohla ozřejmit. Například intracelulární výskyt Bb či výskyt rezistentních biofilmů v pozdních fázích LB na které toto antibiotikum příliš účinné není (Brorson *et al.*, 2009; Sapi *et al.*, 2011).

V následujících letech byla provedena další studie, která pozorovala účinek různě kombinovaných antibiotik na odlišné morfologické formy Bb. Tato studie poskytuje dalších 23 kandidátních léčiv, které jsou účinnější na spirochetální formu než amoxicilin či doxycyklin. A jedenáct z nich bylo také účinnějších proti RBs než metronidazol a tinidazol (Feng *et al.*, 2016).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

4.1.1 Bakteriální kultura použitá v experimentu

Bakteriální kultura kmene *Borrelia burgdorferi sensu stricto* B31 (ATCC 35210) byla poskytnuta paní doktorkou M. J. Caimano, UConn Health, Farmington, Connecticut, USA. Tyto bakterie se uchovávaly zamražené při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po rozmražení se spirochety Bb kultivovaly v komplexním médiu BSK-H complete, které již obsahuje 6 % králíčího krevního séra. Bylo tedy jen nutné do něj přidat před každou kultivací antibiotický roztok obsahující rifampicin, fosfomycin a amfotericin B v poměru 1:100 (k BSK-H médiu). Bakteriální kultura pak byla kultivována v termostatu při $34\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Nárůst bakteriální kultury bylo možné vizuálně hodnotit dle změny barvy kultivačního média díky tomu, že BSK-H complete médium obsahuje fenolovou červeň, což je acidobazický indikátor. Při neutrálním pH je kultivační médium zbarveno do červeno-oranžova při acidifikaci kultivačního média dochází ke změně barvy, a to do žluté. Tato změna indikuje, že bakteriální kultura se rozrůstá (Rosa *et al.*, 2010). Potvrzení však musí být provedeno mikroskopickými metodami.

4.1.2 Buněčná linie použitá v experimentu

Suspenzní lidská (*Homo sapiens sapiens* L.) buněčná linie U937 (Human Caucasian histiocytic lymphoma cell line; ECACC 85011440). Tato buněčná linie byla poprvé izolována v roce 1976 z difúzního histiocytárního lymfomu 37letého kavkazského pacienta. Jedná se tedy o nediferenciované nádorové buňky monocytárního typu. Tyto buňky se mohou diferencovat do fagocyticky aktivní monocyto-makrofágové linie (Sundström *et Nilsson*, 1976). Buněčná linie byla zakoupena z firmy Sigma-Aldrich, USA.

Buňky se uchovávaly zamražené v tekutém dusíku ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Po rozmražení byly tyto eukaryotické buňky převedeny do kultivační láhve pro suspenzní buňky obsahující předpřipravené kultivační médium RPMI-1640 s 10% fetálním bovinním sérem (FBS) a roztokem streptomycinu s penicilinem v poměru 1:100 (ke kultivačnímu médiu s FBS). Buňky se poté kultivovaly v inkubátoru při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a v atmosféře s 5 % CO_2 . Tyto buňky bylo také nutné pasážovat nejlépe 2x týdně.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie

- Deionizovaná voda
- Complete BSK-H médium (Sigma-Aldrich)
- RPMI-1640 médium (Biosera)
- 5 mmol·l⁻¹ roztok CFSE – fluorescenční barvivo karboxyfluorescein sukcinimidyl ester (Sigma Aldrich)
- Fetální bovinní krevní sérum – FBS (Gibco)
- Roztok antibiotik pro kultivaci eukaryotických buněk – Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich) – označen jako antibiotický roztok A
- Rifampicin (Serva)
- Amfotericin B (Sigma-Aldrich)
- Fosfomycin (Sigma–Aldrich)
- Chlorid sodný (Lach-Ner)
- Chlorid draselný (Lach-Ner)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Lach-Ner)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner)
- Trypanová modř (Sigma-Aldrich)
- Roztok paraformaldehydu (Electron Microscopy Sciences)
- Lak na nehty (běžně dostupný)

4.2.2 Použité soupravy

- LIVE/DEAD® *BacLight*[™] Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, L7007)
- VECTASHIELD® Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (Vector Laboratories, Inc., H-1200)

4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava

- 10x PBS pufr (zásobní roztok):
 - 240 g chloridu sodného
 - 6 g chloridu draselného
 - 40 g hydrogenfosforečnanu disodného dodekahydrátu
 - 6 g dihydrogenfosforečnanu draselnéhoRozpustit ve 3 l deionizované vody.

- 1x PBS pufr (pracovní roztok):
Na přípravu 1 l tohoto roztoku je potřeba důkladně smíchat 900 ml deionizované vody se 100 ml zásobního roztoku 10x PBS.
- antibiotický roztok pro kultivaci Bb – označen jako antibiotický roztok B:
 - 5 mg rifampicinu
 - 2 mg fosfomycinu
 - 250 µg amfotericinu B
 Rozpustit v 5 ml BSK-H média. Řádně promíchat a ke kultivaci Bb ředit v poměru 1:100 (ke kultivačnímu médiu).

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

Z důvodu modernizace prostor a zařízení v laboratoři Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci jsou některé zařízení níže zmíněné dvakrát (jak původní, tak i přístroj nově pořízený):

- laminární box biohazard LC2.12 (Jouan)
- laminární box biohazard SafeFAST Top (FASTER)
- laminární box aura-VF48 (EuroClone® BioAir®)
- termostat mikrobiologický BT 120M (Laboratorní přístroje Praha)
- inkubátor pro eukaryotické buňky – CO₂ Incubator MCO-19AIC (SANYO)
- CO₂ inkubátor MCO-170AIC-PE CO₂ Incubator (PANASONIC)
- centrifuga stolní chlazená – MIKRO 22 R ZENTRIFUGEN (HETTICH)
- běžné počítačové vybavení
- fluorescenční mikroskop Axioskop (Opton) s kamerou DP70 (Olympus)
- mikroskop inverzní DMIL (Leica)
- chladnička (LIEBHERR)
- kompaktní cytocentrifuga s 12 pozicemi – StatSpin Cytofuge 12 (Iris)
- sada jednonábových automatických mikropipet s různými objemovými rozsahy (minimální rozsah 0,2 µl a maximální 1000 µl) – Thermo Scientific™ Finnpiquette™
- výrobce deionizované vody – AQUAL® 29 (Aqual s.r.o.)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

Všechny praktické úkony provádět za aseptických podmínek (v laminárních boxech), kromě centrifugování a mikroskopování. Samozřejmostí je také dodržování postupů a zásad práce s infekčním a biologickým materiálem.

4.4.1 Kultivace a barvení bakterií *B. burgdorferi* s. s. pro pozorování ve fluorescenčním mikroskopu

K barvení vzorku bakteriální kultury bylo použito dvou technik. První z nich využívala fluorochrom CFSE a při druhé technice fluorescenčního barvení byla využita souprava LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, L7007).

Barvení za použití fluorochromu CFSE je univerzální fluorescenčně barvicí metodou pro intracelulární značení živých buněk. Principem tohoto barvení je využití nepolární látky 5(6)-karboxyfluorescein diacetát *N*-sukcinimidyl esteru (CFDA-SE), který proniká přes cytoplazmatickou membránu všech buněk do cytosolu, kde je v živých buňkách deacetylován intracelulárními esterázami. V živých buňkách tak vzniká polární karboxyfluorescein sukcinimidyl ester (CFSE), který minimálně prostupuje cytoplazmatickou membránou a dochází tak k hromadění CFSE v cytosolu buněk, kde má čas se kovalentně navázat k volným aminoskupinám proteinů. Dává tak vzniknout velmi stabilním amidovým vazbám. CFSE vykazuje fluorescenci na rozdíl od CFDA-SE. Vlnová délka potřebná k excitaci tohoto fluorochromu je 491 nm, emisní vlnová délka je pak 518 nm. Fluorochrom CFSE tedy vykazuje ve fluorescenčním mikroskopu zelený signál (Parish, 1999).

Barvení za použití soupravy LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, L7007) je vhodné pro rychlé kvantitativní určení bakteriální viability. Tato souprava obsahuje totiž dvě fluorescenční sondy, které mají různou prostupnost do bakterií, afinitu k nukleovým kyselinám a různé spektrální vlastnosti. Jedním z nich je interkalační barvivo propidium jodid (PI), které penetruje pouze do bakterií s porušenou plazmatickou membránou a interkaluje se mezi báze nukleových kyselin. Jeho fluorescence se v mikroskopu jeví jako červený signál (maxima $\lambda_{\text{ex}} = 490$ nm a $\lambda_{\text{em}} = 635$ nm). Druhé interkalační barvivo, které je součástí tohoto kitu, je barvivo SYTO[®] 9. Tento fluorochrom prostupuje jak do buněk s porušenou, tak i do buněk s intaktní cytoplazmatickou membránou. PI však disponuje větší afinitou k nukleové kyselině, proto dochází v mrtvých bakteriích k redukci fluorescence barviva SYTO[®] 9. SYTO[®] 9 vykazuje zelený fluorescenční signál,

maxima $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$ a $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$ (Boulos *et al.*, 1999; Molecular Probes, 2004). Při mém experimentu byla použita směs těchto dvou fluorochromů v poměru 1:1.

Postup barvení Bb za použití fluorochromu CFSE

1. Kultivovat bakteriální suspenzi při 34 °C v BSK-H médiu s přidavkem antibiotického roztoku B (roztok rifampicinu, fosfomycinu a amfotericinu B).
2. Poté připravit dvě mikrozkušavky obsahující každá 2 ml takto kultivované bakteriální suspenze, následně zcentrifugovat při 6000 rpm a 26 °C po dobu 10 min.
3. Po zcentrifugování slít supernatant z obou mikrozkušavek a sedimenty promýt od zbytků BSK-H média resuspendováním v 500 μl 1x PBS pufru.
4. Takto resuspendované sedimenty spojit do jedné 2ml mikrozkušavky a opět vzorek centrifugovat za stejných podmínek popsaných výše, viz 2. krok tohoto postupu (v případě nutnosti opakovat znovu promytí vzorku 1 ml 1x PBS pufru viz 3.–4. krok).
5. Po řádném promytí supernatant opět slít a sediment resuspendovat v 1 ml PBS pufru.
6. K takto připravenému vzorku přidat ještě 2 μl fluorochromu CFSE (5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), ten je nutno před použitím rozmrazit na pokojovou teplotu. Poté obarvený vzorek inkubovat ve tmě po dobu 30 min.
7. Po 30min kultivaci si připravit mikroskopický preparát s 10 μl tohoto obarveného vzorku a pozorovat jej ve fluorescenčním mikroskopu při 400x zvětšení.

Postup barvení Bb za použití LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, L7007)

Postup tohoto barvení je shodný s postupem barvení Bb za použití fluorochromu CFSE (viz výše 1.–7. krok) s tím rozdílem, že se místo 2 μl fluorochromu CFSE přidávají 2 μl směsi fluorochromů SYTO® 9 a propidium jodidu (1:1) z výše jmenované soupravy (nutno směs před použitím rozmrazit na pokojovou teplotu). Po 30min kultivaci výsledky opět vyhodnotit pomocí fluorescenční mikroskopie.

4.4.2 Osmotická indukce odlišných morfologických forem *B. burgdorferi*

1. Kultivovat bakteriální suspenzi při 34 °C v BSK-H médiu s přidavkem antibiotického roztoku B.
2. Poté připravit dvě mikrozkušavky obsahující každá 2 ml takto kultivované bakteriální suspenze, následně centrifugovat 10 min při 6000 rpm a 26 °C.
3. Po centrifugaci slít supernatant z obou mikrozkušavek a sedimenty promýt od zbylého BSK-H média resuspendováním v 500 µl 1x PBS pufru.
4. Takto resuspendované sedimenty spojit do jedné 2ml mikrozkušavky a opět vzorek centrifugovat za stejných podmínek popsanych výše, viz 2. krok (v případě nutnosti opakovat znovu promytí vzorku 1 ml 1x PBS pufru).
5. Následně po řádném promytí supernatant opět slít, sediment resuspendovat ve 2 ml deionizované vody a nechat 30 min kultivovat při pokojové teplotě.
6. Po 30 min dobře promíchat tuto bakteriální kulturu a odebrat 30 µl do nové mikrozkušavky. Do této mikrozkušavky přidat ještě 1,5 µl směsi fluorochromů z výše jmenovaného kitu a inkubovat 15 min ve tmě.
7. Poté mikroskopovat ve fluorescenčním mikroskopu při 400x zvětšení.

4.4.3 Kultivace spirochet *B. burgdorferi* s. s. společně s buňkami buněčné linie U937

Kultivace spirochet Bb v koncentračním gradientu 2 různých médií ke stanovení jejich vhodného poměru.

1. Přepasážovat 1 ml bakteriální suspenze do 12 ml BSK-H média s přidavkem antibiotického roztoku B 1:100 (do média tedy přidat 120 µl tohoto roztoku).
2. Kultivovat v inkubátoru 10 dní při 34 °C.
3. Po 10denní kultivaci si připravit jedenáct 1,5ml mikrozkušavek s postupně rostoucím koncentračním gradientem BSK-H média k RPMI-1640 médiu a do každé mikrozkušavky přidat 10 µl antibiotického roztoku B. V první mikrozkušavce tak bude 0 µl BSK-H média, 1000 µl RPMI-1640 média a 10 µl antibiotického roztoku B (v jedenácté mikrozkušavce pak bude 1000 µl BSK-H média, 0 µl RPMI-1640 média a 10 µl antibiotického roztoku B).
4. Do každé takto připravené mikrozkušavky s narůstající koncentrací BSK-H média napipetovat 50 µl Bb, které byly kultivované 10 dní.
5. Nechat kultivovat 5 dnů v inkubátoru při 34 °C.

6. Po 5denní kultivaci vizuálně zhodnotit změnu barvy kultivačního média a poté všechny mikroskopické s bakteriální suspenzí zcentrifugovat při 6000 rpm po dobu 10 min. Supernatanty slít a sedimenty promýt v 500 µl 1x PBS pufru a opět zcentrifugovat za stejných podmínek.
7. Po promytí opět supernatanty slít a sedimenty resuspendovat ve 250 µl 1x PBS pufru a do každé mikroskopické připipetovat 1 µl směsi fluorochromů z výše jmenovaného kitu.
8. Kultivovat ve tmě po dobu 30 min, poté připravit z jednotlivých vzorků mikroskopické preparáty (10 µl vzorku na sklíčko) a následně mikroskopovat jednotlivé vzorky ve fluorescenčním mikroskopu při 200–400x zvětšení.

Kultivace lidské buněčné linie U937 ke stanovení vhodného poměru kultivačních médií

1. Po rozmrazení eukaryotické buňky převést do kultivačního média RPMI-1640 obsahující 10% fetálním bovinním sérum (FBS) s přidavkem antibiotického roztoku A 1:100 (roztok streptomycinu s penicilinem). Nechat kultivovat 4 dny při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂.
2. Po 4denní kultivaci buněčnou kulturu promíchat a odebrat 20 µl do mikroskopické s 20 µl trypanové modři (1:1) pro stanovení koncentrace buněčné kultury v Bürkerově komůrce. Buňky počítáme v inverzním mikroskopu při 100–200x zvětšení.
3. Koncentraci buněk v 1 ml bakteriální suspenze (P) pak vypočteme na základě tohoto vzorce:

$$P = 2,5 \cdot 10^5 \cdot \frac{\text{celkový počet bb v n čtvercích}}{n} \cdot \text{ředění}$$

P – počet buněk v 1 ml, n – počet počítaných čtverců, ředění (1:1) = 2

4. Připravit si v mikrotitrační destičce s 24 jamkami 5 jamek s koncentračním gradientem 2 médií a to tak, že v první jamce bude 1000 µl RPMI-1640 média s 10 µl antibiotického roztoku A, ve druhé jamce bude 800 µl RPMI-1640 média, 200 µl BSK-H média a 10 µl antibiotického roztoku A atd. V poslední jamce pak bude 200 µl RPMI-1640 média, 800 µl BSK-H média a 10 µl antibiotického roztoku A (získání ředící řady 100% RPMI-1640 až 20% RPMI-1640).
5. Do každé jamky pak napipetovat odpovídající množství důkladně promíchané buněčné kultury tak, aby bylo přibližně 5000 buněk na jednu jamku (100 µl, pokud má buněčná kultura koncentraci 50 000 bb·ml⁻¹).

6. Nechat kultivovat 7 dnů (při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂) a poté vyhodnotit nárůst buněk v jednotlivých jamkách v inverzním mikroskopu při 100–200x zvětšení ke stanovení nejvhodnějšího poměru kultivačních médií.

Kultivace lidské buněčné linie U937 a bakteriální kultury Bb ve shodných kultivačních podmínkách

1. Do mikrotitrační destičky s 96 jamkami napipetovat 2 stejné řady koncentračního gradientu 2 médií pod sebe. Celkově tedy 11 jamek ve dvou řadách (do prvních jamek napipetovat 200 µl RPMI-1640, do druhých jamek napipetovat 180 µl RPMI-1640 média a 20 µl BSK-H média, v jedenácté jamce pouze 200 µl BSK-H).
2. Do jamek první řady koncentračního gradientu médií napipetovat vždy 10 µl buněčné kultury U937 a do jamek druhé řady koncentračního gradientu napipetovat 20 µl bakteriální kultury spirochet Bb.
3. Do každé jamky (22 jamek celkově) pak připipetovat 2 µl antibiotického roztoku B používaného při kultivaci Bb.
4. Takto kultury kultivovat 7 dní při 37 °C a v kontrolované atmosféře s 5 % CO₂. Po 7 dnech experiment vyhodnotit na základě nárůstu a zvolit nejvhodnější poměr jednotlivých médií pro obě kultury.

Společná kultivace lidské buněčné linie U937 s bakteriální kulturou Bb

1. Obarvit 4 ml bakteriální suspenze Bb fluorescenčním barvivem CFSE dle návodu výše (Postup barvení Bb za použití fluorochromu CFSE).
2. Během 30min kultivace Bb s CFSE zcentrifugovat 5–10 ml eukaryotické kultury, supernatant slít a sediment resuspendovat v 1 ml média složeného z 50 % BSK-H média a z 50 % RPMI-1640 média (poměr ředění médií 1:1).
3. Z takto naředěné eukaryotické kultury poté odebrat 20 µl do nové mikrozkuřavky s 20 µl trypanové modři. Po řádném promíchání aplikovat na Bürkerovu komůrku a v inverzním mikroskopu spočítat 20 velkých čtverců Bürkerovy komůrky.
4. Vypočítat potřebnou koncentraci bb·ml⁻¹ dle výše zmíněného vzorce (viz Kultivace lidské buněčné linie U937 ke stanovení vhodného poměru kultivačních médií).
5. Poté napipetovat odpovídající množství neobarvené euk. kultury do kultivační láhve tak, aby ve výsledném vzorku bylo přibližně 1,1·10⁶ bb·ml⁻¹. A toto množství eukaryotické kultury doplnit do výsledných 6 ml kombinovaným médiem BSK-H s RPMI-1640 (1:1).

6. Obarvené Bb po 30min kultivaci zcentrifugovat a promýt 2x za sebou ve 2 ml 1x PBS pufru (nutné k vymytí CFSE). Tedy supernatant odlít, sediment resuspendovat ve 2 ml 1x PBS pufru a zcentrifugovat při 6000 rpm, 26 °C po dobu 10 min a provést ještě jednou.
7. Po druhém promytí sediment resuspendovat v 1 ml média složeného z BSK-H a RPMI-1640 (1:1).
8. Z takto zředěného vzorku obarvených Bb poté odpipetovat 0,5 ml do kultivační láhve s 6 ml eukaryotických buněk v kombinovaném médiu (z 5. kroku tohoto postupu).
9. K takto připravenému 6,5ml vzorku připipetovat 65 µl antibiotického roztoku B a nechat kultivovat 3 dny v inkubátoru při 37 °C a kontrolovanou atmosférou s 5 % CO₂.
10. Po 3denní kultivaci zcentrifugovat 4 ml (2 mikroskopické zkumavky každá po 2 ml) této kultury při 1620 rpm, 21 °C a po dobu 10 minut (dojde k usazení pouze eukaryotických buněk s adherovanými Bb).
11. Po centrifugaci supernatant odlít a sediment resuspendovat ve 2 ml 1x PBS pufru za stejných podmínek jako výše (viz 10. krok tohoto postupu). Toto promytí zopakovat ještě jednou.
12. Po druhém promytí supernatant slít a sediment resuspendovat ve 2 ml 1x PBS pufru.
13. Takto resuspendovaného vzorku aplikovat vždy 200 µl na podložní sklíčko pomocí filtrových koncentrátorů s klipsou a cytocentrifugy (StatSpin Cytofuge 12). Vzorky nanášet při 1000 rpm a po dobu 3 min. Takto připravit 8 mikroskopických preparátů.
14. Po cytocentrifugaci vzorky zakápnout 200 µl paraformaldehydu a nechat fixovat po dobu 15 min. Poté preparáty opláchnout v 1x PBS pufru a usušit.
15. V posledním kroku preparáty zakápnout montovacím médiem VECTASHIELD® Mountig Medium for Fluorescence with DAPI (Vector Laboratories), který byl ředěn 1:2 s 1x PBS puftrem. Preparáty přikrýt krycími sklíčky, otřít jejich okraje a ty pak obtáhnout lakem na nehty.
16. Mikroskopovat ve fluorescenčním mikroskopu při 400x zvětšení a určit procentuální zastoupení Bb, které byly buňkami fagocytovány (spočítat 10 zorných polí).

5 Výsledky

Všechny praktické úkony byly provedeny za aseptických podmínek (v laminárních boxech), kromě centrifugování a mikroskopování, v laboratořích Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Samozřejmostí také je, že jsem vždy pracovala v souladu s postupy a zásadami práce s infekčním a biologickým materiálem.

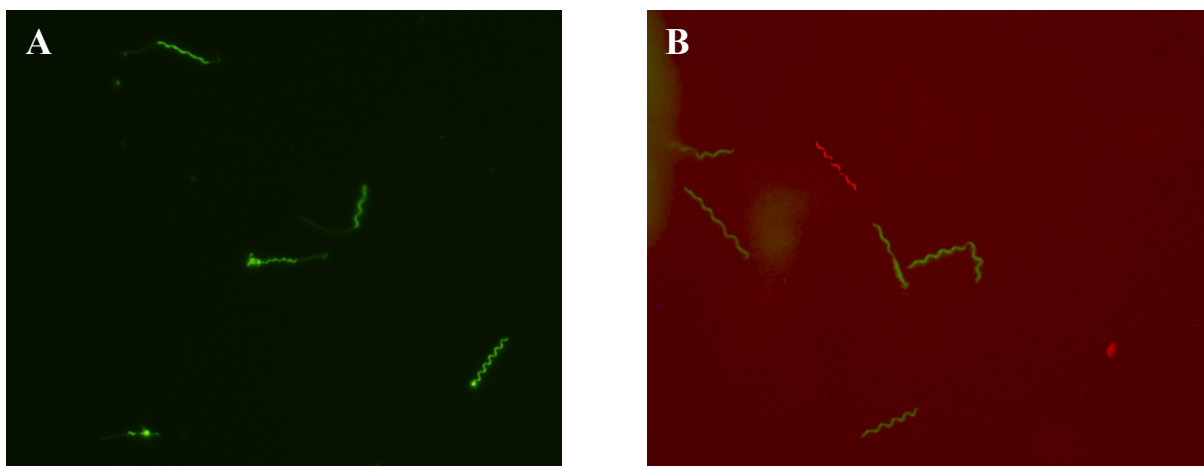
Kultivace a barvení bakterií *B. burgdorferi* s. s. pro pozorování ve fluorescenčním mikroskopu

V první části svého experimentu jsem se věnovala správnému zvládnutí kultivačních a barvicích metod, které mi v další části umožnily pozorovat odlišné morfologické formy bakterií *B. burgdorferi* ve fluorescenčním mikroskopu.

Bakterie *B. burgdorferi* disponují velmi malým genomem, který nekóduje všechny potřebné proteiny s biosyntetickou aktivitou, je tedy nutné metabolity dodávat v komplexním živném médiu BSK-H, zároveň je také nutné do média přidat kombinovaný antibiotický roztok obsahující rifampicin, fosfomycin a amfotericin B proto, aby nedocházelo ke kontaminaci kultury jinými bakteriemi.

K barvení vzorku bakteriální kultury jsem používala dvou různých metod barvení. První z nich využívala fluorochrom CFSE u druhé pak byla použita souprava LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, L7007).

Výsledky byly vyhodnoceny za využití fluorescenčního mikroskopu Opton Axioskop při 400x zvětšení a snímky byly poté pořízeny kamerou Olympus DP70 (viz Obrázek 4 níže).



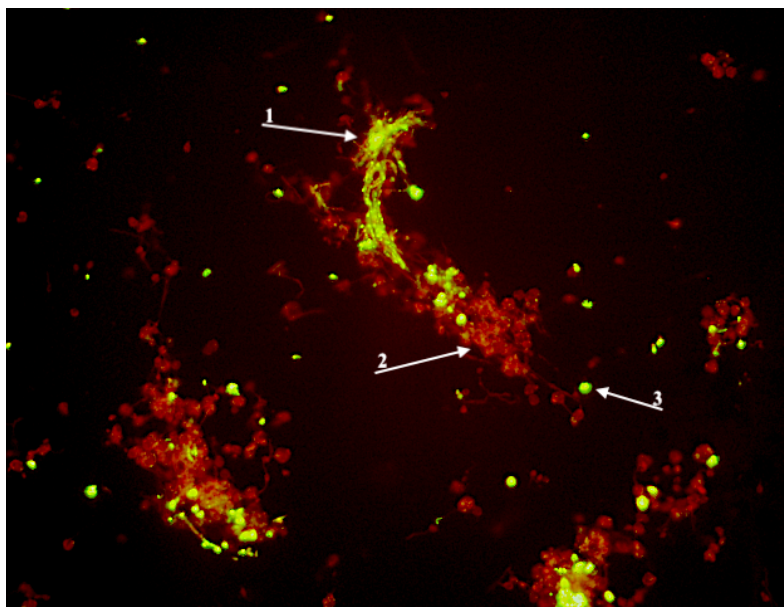
Obrázek 4: Snímky spirochet rodů *Borrelia* pořízené z fluorescenčního mikroskopu při zvětšení 400x. A – barveno fluorochromem CFSE, B – barveno za využití soupravy LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (foto: Adéla Rubešová).

Jak již bylo zmíněno výše v metodice, fluorochrom CFSE barvil pouze bakterie, které byly metabolicky aktivní (viz Obrázek 4A výše). Naproti tomu propidium jodid, který je součástí výše zmíněného kitu, barví pouze bakterie s porušenou plazmatickou membránou (červená fluorescence). Druhý fluorochrom, který je součástí tohoto kitu, je barvivo SYTO® 9. Tento fluorochrom vyzařuje zelenou fluorescenci a značí buňky s neporušenou buněčnou membránou (viz Obrázek 4B výše). Výhodou obou těchto barvicích technik je nenáročnost a velmi rychlé provedení. Nevýhodou je pak poměrně rychlé vysvícení fluorochromů.

Osmotická indukce odlišných morfologických forem *B. burgdorferi s. s.*

V mém experimentu jsem osmoticky indukovala změny morfologických forem spirochet *B. burgdorferi s. s.* Bb byly po ovlivnění změnou vnějších podmínek fluorescenčně obarveny za využití soupravy LIVE/DEAD® *BacLight*™ Bacterial Viability Kit. Bylo tak možné rovnou vyhodnotit viabilitu jednotlivých morfologických forem Bb indukovaných osmoticky.

Při osmotické indukci byla patrná tvorba sférických forem Bb, které se shlukovaly spolu se spirochetami s neporušenou buněčnou membránou do mikrokolonií. Sférické formy měly ve větší míře porušenou buněčnou membránu, což značí, že se již jedná o mrtvé bakteriální formy (viz Obrázek 5 níže).

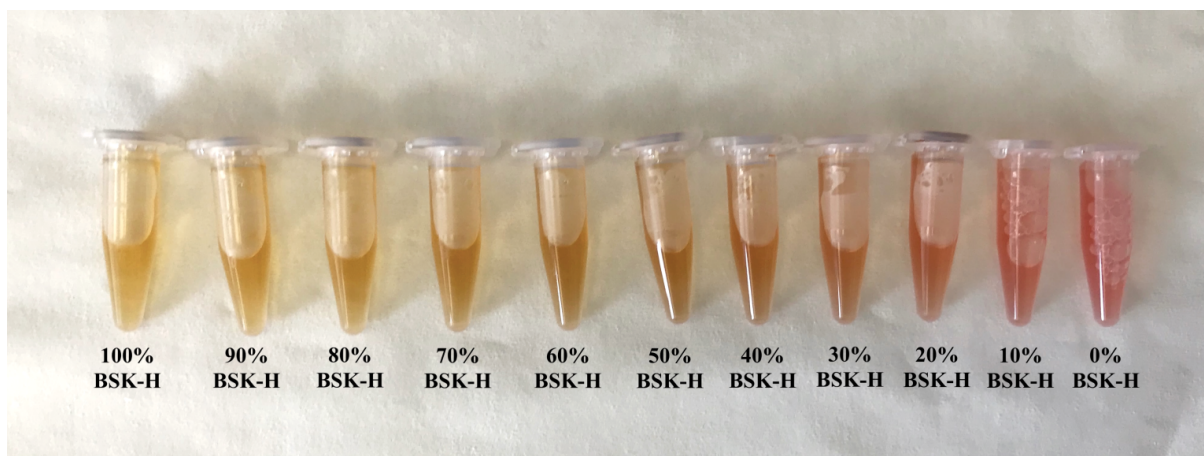


Obrázek 5: Snímek osmoticky indukovaných morfologických forem bakterie *B. burgdorferi* (Bb) pořízený z fluorescenčního mikroskopu při 400x zvětšení. Barveno za použití soupravy LIVE/DEAD® *BacLight*™ Bacterial Viability Kit. Šipka 1: mikrokolonie spirochet s neporušenou cytoplazmatickou membránou (CM), šipka 2: cystické formy s porušenou CM součástí mikrokolonie, šipka 3: cystická forma Bb s neporušenou CM (foto: Adéla Rubešová).

Společná kultivace spirochet *B. burgdorferi sensu stricto* s buňkami buněčné linie U937

V druhé části tohoto experimentu jsem se věnovala zavedení nové kultivační metody pro sledování chování patogenní bakterie Bb vůči lidským leukemickým buňkám (U937). Cílem tedy bylo vytvořit nenáročnou metodu (jak finančně, tak i časově), která by umožňovala společnou kultivaci těchto buněk pro využití při dalších studiích. U kultivace Bb bylo důležité, aby nedocházelo k indukci jiných morfologických forem vlivem nevhodných kultivačních podmínek. Proto bylo nutností určit vhodný poměr médií a vhodné kultivační podmínky pro růst obou kultur zároveň, jelikož jsou obě kultury kultivované v jiných živných médiích a za jiných kultivačních podmínek.

K vyhodnocení nejvhodnějšího poměru kultivačních médií pro Bb jsem brala jako kritérium tvorbu mikrokolonií (mikrofilmů) těchto bakterií, při kterém mi sloužila jako kontrola kultivace ve 100% komplexním BSK-H médiu (viz Obrázek 7 níže). Nárůst mikrokolonií byl nejdříve zhodnocen vizuálně na základě změny barvy kultivačních médií (viz Obrázek 6 níže).



Obrázek 6: Výsledky 5denní kultivace *B. burgdorferi* v koncentračním gradientu 2 kultivačních médií, a to BSK-H a RPMI-1640 (foto: Adéla Rubešová).

Součástí obou kultivačních médií (BSK-H i RPMI-1640) je acidobazický indikátor (fenolové červeně), který při změně pH mění barvu. Okyselením tedy z červeného neutrálního kultivačního média vzniká nažloutlé. Lze tak rychle vizuálně vyvodit, zdali k nárůstu bakterií došlo. Z Obrázku 6 je patrné, že viditelné snižování pH kombinovaného kultivačního média nastalo od 40% BSK-H. Z Obrázku 6 je také patrné, že pod 20% BSK-H nedošlo ke změně barvy média a dá se tedy odvodit, že bakteriální nárůst bude minimální či žádný. Tyto závěry však musely být potvrzeny pomocí fluorescenční mikroskopie (viz Tabulka 3 a Obrázek 7 níže).

Za využití směsi fluorochromů ze soupravy LIVE/DEAD® *BacLight*™ Bacterial Viability Kit, fluorescenčního mikroskopu Opton Axioskop při 200x a 400x zvětšení a kamery Olympus DP70, byl stanoven nárůst Bb v jednotlivých koncentracích BSK-H média (viz Tabulka 3 a Obrázek 7 níže).

Tabulka 3: Nárůst mikrokolonií Bb v jednotlivých koncentracích BSK-H k RPMI-1640 médiu.

Koncentrace BSK-H média	100% BSK	90% BSK	80% BSK	70% BSK	60% BSK	50% BSK	40% BSK	30% BSK	20% BSK	10% BSK	0% BSK
Nárůst Bb (mikrofilmů)	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-

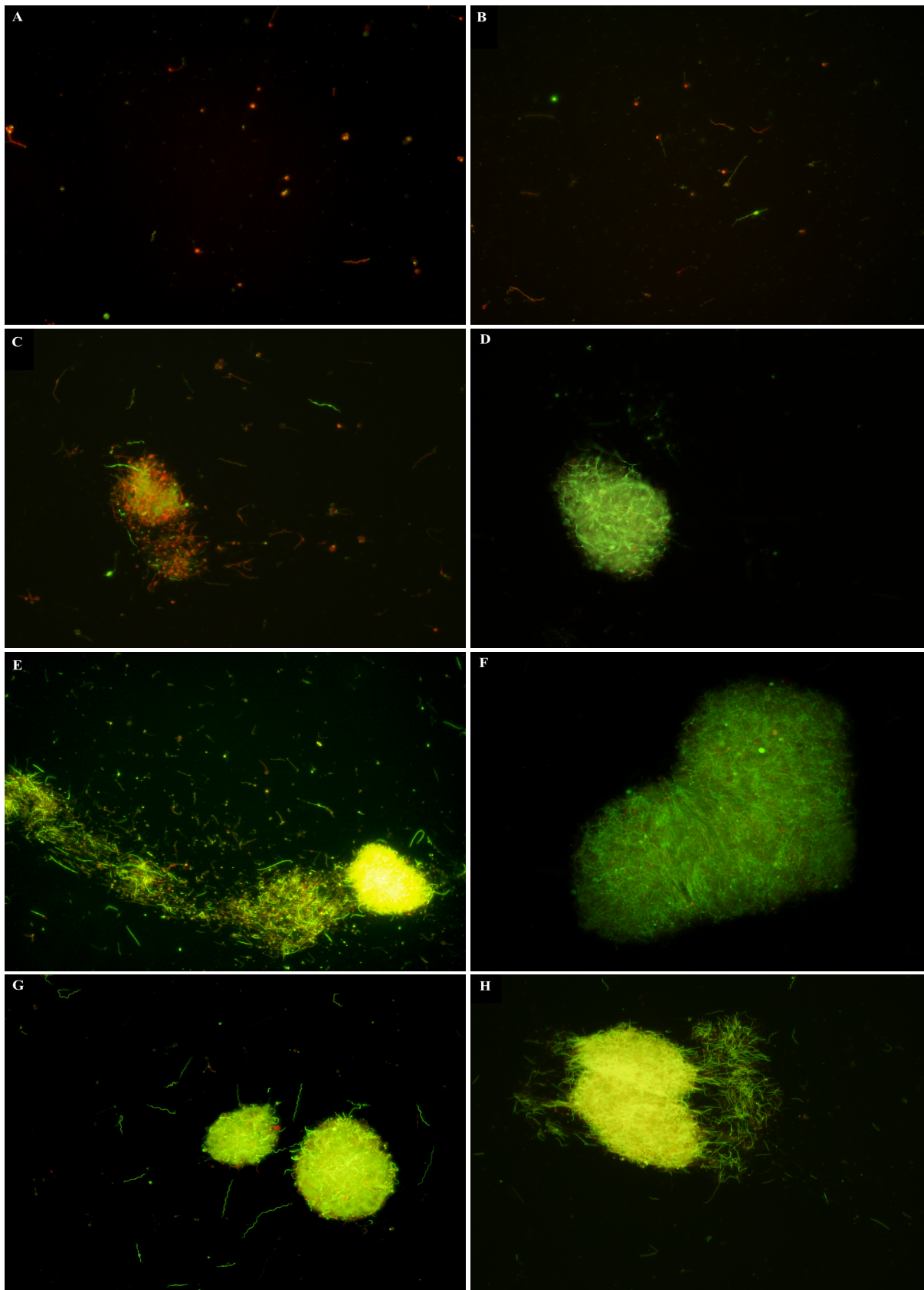
++ tvorba shodných mikrofilmů s kontrolními mikrofilmy vytvořenými ve vhodných podmínkách (ve 100% komplexním BSK-H médiu, kultivace při 34 °C), ++ určeno jako nejvhodnější poměr médií pro Bb

+ tvorba menších mikrofilmů, než jsou mikrofilmy kontrolní či výskyt suspendovaných cystických forem

- nedošlo k tvorbě žádných mikrofilmů

Na Obrázku 7 (viz níže) lze tyto nárůsty vidět na mikroskopických snímcích (A–H). Obrázek 7A zastupuje koncentraci 0% BSK-H (100% RPMI-1640) ve které je patrné, že dochází k úhynu borelií a tvorbě cystických forem. Podobně na tom byla i kultivace v 10% BSK-H médiu (viz Obrázek 7B), došlo k tvorbě mrtvých cystických forem a velmi malé množství borelií bylo s neporušenou membránou, ale na těchto již byla patrná tvorba cystických forem. První koncentrací, kde docházelo k tvorbě mikrokolonií, byla koncentrace 20% BSK-H média. Tvořily se mikrokolonie, které však byly tvořeny především mrtvými cystickými formami a jen velmi malým počtem živých spirochet (viz Obrázek 7C). Tvorba srovnatelných mikrokolonií (ne však velikostně) se nacházela v kultivaci s 30% BSK-H kombinovaným médiem. Byly zde viditelné mikrokolonie stočených spirochet Bb, které neměly porušenou plazmatickou membránu (Obrázek 7D). Na Obrázku 7E je znázorněn nárůst mikrokolonie ve 40% BSK-H médiu do srovnatelných velikostí s mikrokoloniemi vytvořenými ve 100% BSK-H médiu (viz Obrázek 7H). Odlišností však je, že při kultivaci ve 40% BSK-H médiu bylo viditelné větší množství cystických forem a bakterií s porušenou buněčnou membránou.

Mikrokolonie srovnatelné jak velikostně, tak i životaschopností bakterií tvořících příslušné kolonie s mikrokoloniemi vytvořenými ve 100% BSK-H médiu, byly kolonie narostlé při kultivaci v 50% BSK-H médiu (viz Obrázek 7F níže). Při kultivaci v takto kombinovaném médiu (1:1) nedocházelo ani ke tvorbě cystických forem, proto byl tento poměr médií zvolen jako nejvhodnější. Na obrázku 7G je zaznamenána kultivace v 60% BSK-H médiu, bez tvorby cystických forem a na Obrázku 7H pak tvorba mikrokolonií při kultivaci ve 100% BSK-H médiu (0% RPMI-1640). Tvorba mikrokolonií v 70% až 90% BSK-H médiu byla srovnatelná s mikrokoloniemi vytvořenými ve 100% BSK-H médiu (nejsou zde znázorněny).



Obrázek 7: Snímky nárůstu *B. burgdorferi* po 5denní kultivaci v koncentračním gradientu 2 médií (BSK-H a RPMI-1640), barveno propidium jodidem a SYTO[®] 9. Snímky pořízené fluorescenčním mikroskopem při zvětšení 200x (E, F a H) a 400x (A–D a G) (foto: Adéla Rubešová).

Na základě jednotlivých výsledků, jak vizuálních, tak i mikroskopických, byl jako nejvhodnější poměr médií BSK-H a RPMI-1640 pro kultivaci Bb při 34 °C stanoven poměr 1:1 (BSK-H k RPMI-1640 médiu).

Pro stanovení nejvhodnějšího poměru živných médií pro kultivaci lidské buněčné linie U937 byla opět využita kultivace ve společném koncentračním gradientu obou médií, ale nyní při 37 °C a v atmosféře s 5 % CO₂. Před napipetováním kultury eukaryotických buněk do jamek s postupně vzrůstající koncentrací RPMI-1640 média bylo nutné stanovit počet buněk v 1 ml bakteriální kultury. Pro stanovení koncentrace eukaryotických buněk nám posloužila buněčná kultura obarvena trypanovou modří v poměru 1:1 a Bürkerova komůrka. Trypanová modř proniká jak do živých, tak i do mrtvých buněk. Živé buňky ji však aktivně transportují vně přes buněčnou membránu, jsou tedy průhledné, zatímco mrtvé buňky se jeví jako modré. Spočítala jsem tedy jen neobarvené buňky (živé) a stanovila jejich počet v 1 ml původní buněčné suspenze pomocí níže uvedeného vzorce:

$$P = 2,5 \cdot 10^5 \cdot \frac{\text{celkový počet bb v n čtvercích}}{n} \cdot \text{ředění} = 2,5 \cdot 10^5 \cdot \frac{1}{10} \cdot 2 = 50000 \text{ bb} \cdot \text{ml}^{-1}$$

P – počet buněk v 1 ml, n – počet počítaných čtverců, ředění (1:1) = 2

Výsledná koncentrace tedy byla 50000 buněk v 1 ml buněčné kultury. Já ve svém experimentu potřebovala koncentraci 5000 buněk v jedné jamce, proto jsem do jednotlivých jamek pipetovala 100 µl. Eukaryotické buňky byly kultivované po dobu 7 dnů při 37 °C v atmosféře s 5 % CO₂. Poté jsem vyhodnotila nárůst buněk v jednotlivých jamkách pomocí inverzního mikroskopu při 100–200x zvětšení, abych mohla stanovit nejvhodnější poměr kultivačních médií tak, aby nedocházelo k přerůstání. Po porovnání výsledků i z předešlé kultivace Bb byl za nejvhodnější poměr BSK-H a RPMI-1640 média zvolen poměr 1:1. Následně již stačilo obě kultury kultivovat při shodných kultivačních podmínkách a potvrdit tyto závěry.

Kultivovala jsem tedy obě kultury ve shodných koncentračních gradientech a při stejných kultivačních podmínkách, tedy po dobu 7 dní při 37 °C a v kontrolované atmosféře s 5 % CO₂. Po 7 dnech jsem experiment vyhodnotila na základě nárůstu obou kultur a potvrdila závěry předešlých kultivací.

Pro stanovení nárůstu eukaryotických buněk jsem znova stanovila koncentraci buněk v 1 ml kultury, kdy jsem se zaměřila pouze na stanovení nárůstu ve 100% koncentraci jak BSK-H, tak i RPMI-1640 média.

$$P_{100\% \text{ BSK}} = 2,5 \cdot 10^5 \cdot \frac{\text{celkový počet bb v n čtvercích}}{n} \cdot \text{ředění} = 2,5 \cdot 10^5 \cdot \frac{28}{20} \cdot 2 = 700000 \text{ bb} \cdot \text{ml}^{-1}$$

$$P_{100\% \text{ RPMI}} = 2,5 \cdot 10^5 \cdot \frac{\text{celkový počet bb v n čtvercích}}{n} \cdot \text{ředění} = 2,5 \cdot 10^5 \cdot \frac{19}{20} \cdot 2 = 475000 \text{ bb} \cdot \text{ml}^{-1}$$

Po stanovení nárůstu eukaryotických buněk v BSK-H médiu a RPMI-1640 je patrné, že na podmínkách společné kultivace bude nejvíce záležet na výsledcích kultivace Bb, jelikož eukaryotické buňky rostou v obou médiích, a dokonce v BSK-H médiu ještě lépe. Při tomto stanovení se tedy kladl větší důraz na výsledky kultivací spirochet Bb v kombinovaných médiích.

Pro další krok bylo tedy zvoleno médium 1:1 (BSK-H k RPMI-1640) a kultivační podmínky odpovídající kultivaci euk. buněk (37 °C a kontrolovaná atmosféra s 5 % CO₂).

Posledním krokem experimentu pak byla společná kultivace bakteriální kultury *B. burgdorferi* s lidskou buněčnou linií U937. Nejdříve jsem obarvila bakteriální kulturu fluorochromem CFSE a nechala 30 min inkubovat, během této doby jsem si stanovila koncentraci buněčné linie U937 opět vystavením kultury trypanové modři a počítáním neobarvených buněk v Bürkerově komůrce. Koncentrace buněk v 1 ml buněčné kultury byla stanovena výpočtem (viz níže) na 1,575 · 10⁶ bb · ml⁻¹. K další kultivaci však byla nutná přibližná koncentrace 1,1 · 10⁶ bb · ml⁻¹. Proto bylo napipetováno 0,7 ml (viz výpočet níže) této buněčné kultury U937 do kultivační láhve s 5,3 ml kombinovaného média (1:1).

$$P_{U937} = 2,5 \cdot 10^5 \cdot \frac{\text{celkový počet bb v n čtvercích}}{n} \cdot \text{ředění} = 2,5 \cdot 10^5 \cdot \frac{63}{20} \cdot 2 = 1,575 \cdot 10^6 \text{ bb} \cdot \text{ml}^{-1}$$

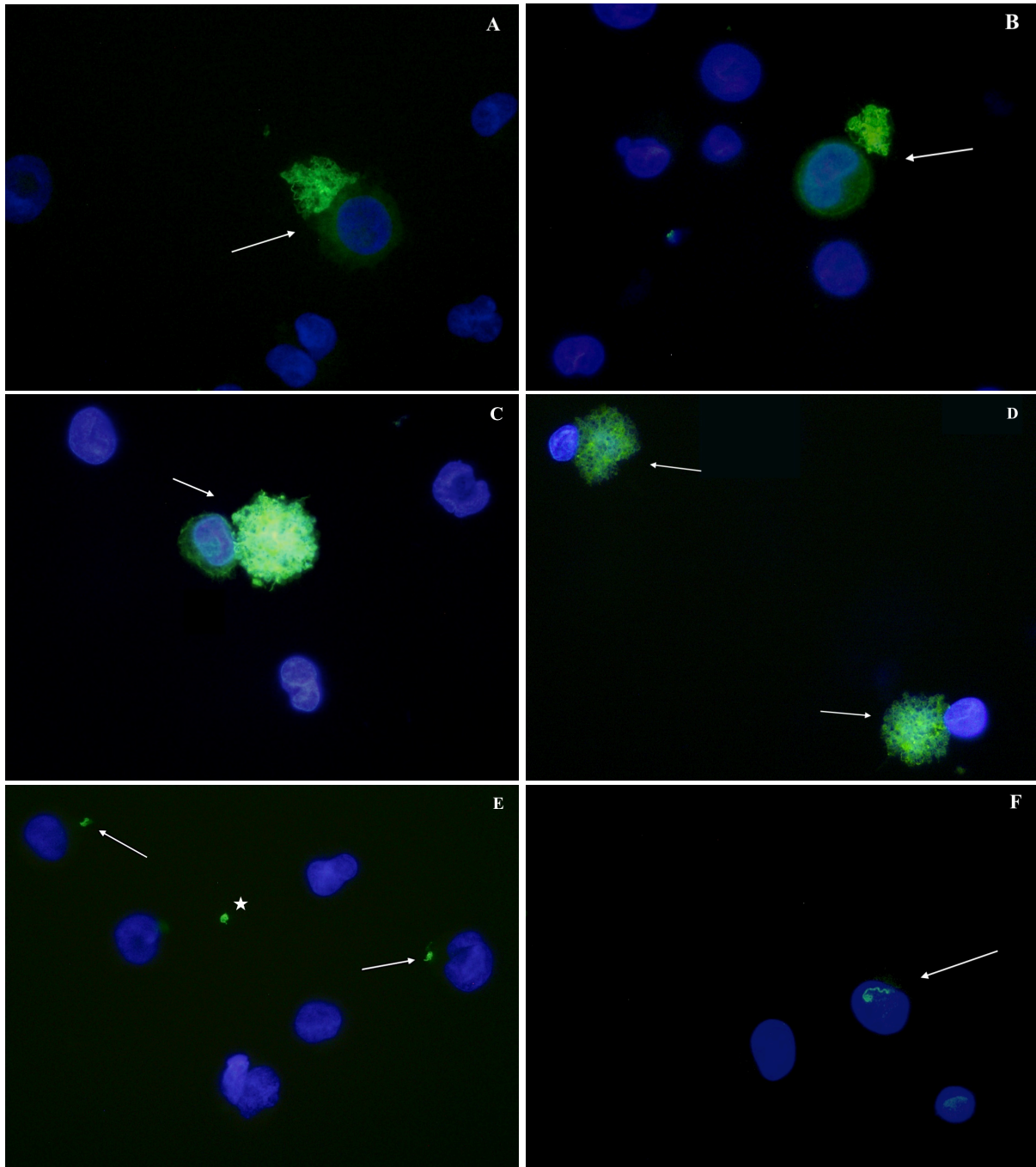
$$1,575 \cdot 10^6 \text{ bb} \dots \dots \dots 1 \text{ ml}$$

$$1,100 \cdot 10^6 \text{ bb} \dots \dots \dots x \text{ ml} \rightarrow x = 0,698 \text{ ml} \cong 0,7 \text{ ml}$$

K 6 ml této buněčné kultury byla poté připipetována fluorescenčně obarvená bakteriální kultura (0,5 ml) a antibiotický roztok B 1:100 (65 μl). Takto se kultury nechaly společně kultivovat 3 dny při 37 °C v kontrolované atmosféře s 5 % CO₂. Po 3denní kultivaci jsem si připravila mikroskopické preparáty a eukaryotická jádra byla obarvena fluorochromem DAPI, který byl součástí montovacího média VECTASHIELD® Mountig Medium for Fluorescence with DAPI (Vector Laboratories). Výsledky kultivace jsem pozorovala ve fluorescenčním mikroskopu Opton Axioskop při 400x zvětšení a snímky byly poté pořízeny kamerou Olympus DP70 (viz Obrázek 6 níže).

Eukaryotická linie U937 je odvozená od histiocytárního lymfomu a jedná se tak o nediferenciované nádorové buňky monocytárního typu. Při mém experimentu však došlo u některých buněk této monocyto-makrofágové linie k diferenciaci do aktivovaných buněk

schopných fagocytózy (viz Obrázek 6A–C níže). Spirochety Bb při kultivaci s eukaryotickými buňkami začaly tvořit shluky stočených spirochet a ty adherovaly k eukaryotickým buňkám. U některých mikrokolonií došlo k adhezenci bez zjevné fagocytózy (viz Obrázek 6D), další mikrokolonie pak byly eukaryotickou buňkou fagocytovány (viz Obrázek 6A–C níže). Zelená cytoplazma eukaryotických buněk tedy značí, že dochází k fagocytóze bakterií Bb.



Obrázek 8: Snímky adherovaných morfologických forem bakterie *B. burgdorferi* (barveno za využití CFSE) k eukaryotickým buňkám linie U937 (barveno za využití DAPI) pořízené pomocí fluorescenčního mikroskopu při 400x zvětšení. Šipky označují formy adherované, hvězdičkou je pak označena extracelulární cystická forma (foto: Adéla Rubešová – A, D a E; Michal Křupka – B, C a F).

Na Obrázku 6E a 6F je viditelná další forma Bb tvořící se při kultivaci s eukaryotickými buňkami linie U937, a to forma cystická. Na Obrázku 6E je patrná adherence cystických forem k eukaryotickým buňkám, na rozdíl od mikrokolonií však tyto cysty nejsou fagocytovány. Z tohoto experimentu nelze s úplnou určitostí říci, že se spirocheta transformovala do cystické formy až po navázání k eukaryotické buňce, jelikož se tvořily i cystické formy, které adherované k těmto buňkám nebyly (viz Obrázek 6E označeno ★). Na Obrázku 6F je však patrné, že nejdříve dochází k adherenci spirochety k eukaryotické buňce a poté k transformaci v cystickou formu Bb.

Při odečítání výsledků z mikroskopických preparátů bylo určeno procentuální zastoupení jak eukaryotických buněk, které bakterie fagocytovaly, tak i procentuální zastoupení eukaryotických buněk, ke kterým byly bakterie Bb navázané (adherované) a nebyly zjevně fagocytovány. Tyto jednotlivé eukaryotické buňky byly počítány v 10 zorných polích (viz Tabulka 4 níže).

Tabulka 4: Počet jednotlivých eukaryotických buněk linie U937 vzhledem k lokalizaci bakterií *B. burgdorferi* (Bb) po 3denní kultivaci s touto bakteriální kulturou. Počítáno v 10 zorných polích.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	Součet
Počet všech euk. buněk	17	20	13	12	9	18	15	13	16	10	143
Počet fagocytujících euk. buněk (x_1)	1	4	3	4	0	1	4	0	3	2	22
Počet euk. buněk s adherovanými Bb (x_2)	0	1	0	0	2	3	1	2	0	1	10

Výpočet procentuálního zastoupení:

$$x_1 = \frac{22 \cdot 100}{143} = 15,38 \cong 15,4 \%$$

$$x_2 = \frac{10 \cdot 100}{143} = 6,99 \cong 7,0 \%$$

Ze získaných výsledků lze tedy shrnout, že více než 15 % eukaryotických buněk linie U937 bakterie Bb fagocytovalo, a to hlavně ve formě mikrokolonií (viz Obrázek 6A–C výše). Menší procento eukaryotických buněk (přesněji 7 %) bakterie Bb nefagocytovalo, ale bakterie byly k eukaryotickým buňkám adherované (viz Obrázek 6D–F výše).

6 Diskuze

Bakterie druhové komplexu *B. burgdorferi sensu lato* disponují mnohými mechanismy, které jim umožňují vyhýbat se imunitnímu systému hostitele. Mezi tyto mechanismy patří například antigenní variabilita, která umožňuje boreliím tvořit neustále hostiteli neznámé antigeny. Bb také využívají molekulární mimikry, pomocí kterých se snaží napodobit hostiteli vlastní molekuly a tyto molekuly poté vystavit na svůj povrch. Dalším z mechanismů je intracelulární lokalizace těchto bakterií v imunologicky privilegovaných buňkách. V neposlední řadě je také jedním z možných mechanismů tvorba odlišných morfologických forem, které disponují různými antigenními vlastnostmi a různou rezistencí k podmínkám organismu hostitele. Všechny tyto mechanismy dle některých autorů vedou k delší perzistenci Bb v organismu hostitele (Schwan *et al.*, 1991; Miklossy *et al.*, 2008).

Transformace spirochet Bb byly již v minulosti studovány experimenty při kultivaci bakteriální kultury v neoptimálních kultivačních podmínkách pro růst (Gilmore, 2012). Byla také potvrzena návratnost těchto sférických forem zpět do původní spirochetální podoby jak při *in vitro* kultivacích, tak i *in vivo* (Brorson *et Brorson*, 1998a; Brorson *et Brorson*, 1998b; Gruntar *et al.*, 2001).

V mém experimentu jsem využila jednu z nejrychlejších metod indukce odlišných morfologických forem Bb, a to transformaci vyvolanou osmoticky (Brorson *et Brorson*, 1998a). Při srovnání mých výsledků s výsledky publikovaných studií lze říci, že při osmotické indukci došlo ke shodným morfologickým změnám jako ve studii publikované v roce 2008 (Miklossy *et al.*, 2008), kde je popsán vznik agregátních forem tvořených cystickými formami a stočenými spirochetami. V mém experimentu však bylo zároveň patrné díky použití soupravy LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, L7007), které z těchto forem mají, či nemají porušenou cytoplazmatickou membránu a jsou tudíž živými, či mrtvými formami Bb (viz Obrázek 5 výše). Tato část mého experimentu mi tedy umožnila rozeznat jak formy cystické, tak i mikrokolonie tvořené z cystických i spirálních forem Bb.

Při *in vitro* kultivaci eukaryotických buněk linie U937 s Bbss byl viditelný jak extracelulární výskyt neadherovaných, tak i výskyt adherovaných cystických forem Bb k těmto eukaryotním buňkám (viz Obrázek 8E výše). Při využití fluorochromu CFSE bylo patrné, že minimálně některé cystické formy mají aktivní intracelulární esterázy a nejedná se tak pouze o degenerativní formy spirochet Bb (viz Obrázek 4A a 8 výše), což již bylo jinými výzkumníky i potvrzeno (Alban *et al.*, 2000).

Optimální teplotní podmínky pro růst bakterie *B. burgdorferi sensu stricto* jsou v rozmezí 30 °C až 34 °C. Bylo však prokázáno, že i při vyšších teplotách rostou velmi dobře, a to hlavně při 37 °C (Veinović *et al.*, 2016), což jsem mohla pozorovat i při svém experimentu.

Otázkou, která však již dlouho dobu zůstává nezodpovězena navzdory probíhajícím výzkumům, je, zdali jsou cystické formy Bb příčinou přetrvávajících infekcí, které se vyskytují u 10 % až 20 % pacientů i po odpovídající antibiotické léčbě. Tyto chronické potíže, někdy označované také jako post-Lyme disease syndrom, se projevují ospalostí, slabostí, bolestí kloubů či svalů a narušením kognitivních funkcí (Feng *et al.*, 2016). Díky malému počtu studií zabývajících se jednotlivými morfologickými formami spirochet Bb *in vivo* není zcela jasné, jakou roli jednotlivé morfologické formy této bakterie zastávají v patogenezi LB, nebo zdali vůbec nějakou roli v patogenezi LB mají. Například studie publikována v roce 2010 naznačuje, že sférické formy opravdu roli v perzistentních infekcích mají (Al-Robaiy *et al.*, 2010). U již tak málo publikovaných studií zabývajících se *in vivo* výskytem sférických forem *B. burgdorferi* také nelze opomenout, že v jednotlivých studiích byla použita jiná terminologie jednotlivých sférických forem. Nelze tak jednoznačně vyvodit jednotné závěry z těchto dílčích studií (Lantos *et al.*, 2014). Další významným krokem by v této oblasti tedy bylo sjednocení názvosloví a zavedení přesných charakteristik různých morfologických forem Bb. Zároveň by bylo vhodné provést další studie i na jiných patogenních druzích rodu *Borrelia* (Křupka *et al.*, 2007).

Z těchto závěrů je tedy patrné, že je víc než důležité dále tyto odlišné morfologické formy spirochet Bb studovat, a to hlavně v *in vivo* podmínkách. Zároveň je taky potřeba se zaměřit na zefektivnění eradikace veškerých morfologických forem Bb v organismu hostitele již v počáteční fázi infekce, a to nejen forem spirochetálních. Při léčbě lymeské boreliózy také zamezit možné indukci morfologických změn spirochet v těle pacienta (Sapi *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2016).

Dosavadní studie zatím neprokázaly významný vliv jak kombinované, tak i prodloužené antibiotické léčby při terapii chronických obtíží pacientů (Feng *et al.*, 2016). Studie, které se zaměřují především na léčbu chronických obtíží prodlouženou aplikací antibiotik, a to po dobu nejméně 6 nepřetržitých měsíců, doposud zcela neprokázaly účinnost této léčby jako klinicky přínosnou pro pacienta s chronickými obtížemi (Klempner *et al.*, 2001; Feder *et al.*, 2007; Berende *et al.*, 2016). Některé studie však u pacientů „údajně“ zlepšení nespecifických symptomů uvádí. Toto zlepšení ovšem u pacientů netrvalo po vysazení několikaměsíční antibiotické léčby dlouho a došlo k relapsům dřívějších obtíží (Krupp *et al.*,

2003; Stricker, 2007; Fallon *et al.*, 2008). Za pozornost také stojí i ti pacienti, kteří si díky dlouhodobé antibiotické terapii přihodily symptomy nové, způsobené příslušnou antibiotickou léčbou (Ettestad *et al.*, 1995; Feder *et al.*, 2007; Ljøstad *et al.*, 2008).

Na závěr je ještě vhodné zmínit, že díky vzniku různých morfologických forem Bb je také obtížnější diagnostika lymeské boreliózy (Brorson *et Brorson*, 1997), kdy by opět lepší porozumění těmto odlišným morfologickým formám mohlo vést ke zlepšení diagnostických metod lymeské boreliózy, například založených na základě rozdílnosti produkovaných cytokinů či rozdílné antigenicity těchto odlišných morfologických forem Bb (Cerar *et al.*, 2013; Meriläinen *et al.*, 2016).

7 Závěr

Přestože je původce lymeské boreliózy znám více než 30 let zůstává tento patogen zahalen mnohými nejasnostmi. Jednou z nich je klinický význam jednotlivých morfologických forem této bakterie. Proto jsem se ve své bakalářské práci na tuto problematiku zaměřila a snažila jsem se jí co nejlépe porozumět.

V teoretické části své práce jsem se ze začátku krátce zmínila o obecné historii, kde jsem se zaměřila pouze na pro mne významné mezníky ve výzkumu jak už lymeské boreliózy, tak především spirochet *Borrelia burgdorferi*. Na tuto kapitolu jsem následně navázala popisem onemocnění, které je těmito spirochetami zapříčiněno. Popsala jsem tedy patogenezi, diagnostiku, léčbu a samotnou prevenci lymeské boreliózy. V poslední teoretické kapitole jsem se věnovala bakteriálnímu komplexu *B. burgdorferi sensu lato*, u kterého jsem popsala charakteristickou morfologii spirochety *B. burgdorferi s. l.* a poté jsem charakterizovala jednotlivé formy, které je tato spirocheta schopna vytvářet.

V praktické části své bakalářské práce jsem za využití několika fluorochromů a fluorescenční mikroskopie byla schopna detekovat různé morfologické formy gramnegativní bakterie *B. burgdorferi s. s.*, která dokáže za nepříznivých podmínek změnit svou spirochetální formu do odolnějších morfologických forem.

Ve svém experimentu jsem se tak soustředila na indukci těchto odolnějších morfologických forem vystavením bakteriální kultury osmotickým vlivům a eukaryotickým buňkám buněčné linie U937. Posledním krokem mého experimentu bylo zavedení nové metody, která by umožnila společnou kultivaci spirochet *B. burgdorferi s. s.* s eukaryotickými buňkami linie U937 a mohla by tak sloužit při dalších studiích v laboratoři Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci ke kultivaci bakterií rodu *Borrelia* s eukaryotickými buňkami.

Shrnu tedy, že významným krokem, který by mohl ulehčit objasnění této problematiky, by bylo sjednocení názvosloví a zavedení přesných charakteristik různých morfologických forem bakterie *Borrelia burgdorferi*. Zároveň by také bylo vhodné provést další studie i na jiných patogenních druzích rodu *Borrelia* než jen na druhu *B. burgdorferi s. s.* (jediný patogenní druh severoamerického kontinentu). V neposlední řadě by se další studie měly rovněž zaměřit na klinický význam odlišných morfologických forem a věnovat pozornost léčbě lymeské boreliózy kombinovanými antibiotiky v časných fázích tohoto onemocnění, a to za účelem eradikace veškerých forem *B. burgdorferi s. l.* v organismu hostitele.

8 Literatura

- Adrion E. R., Aucott J., Lemke K. W. *et* Weiner J. P. (2015): Health Care Costs, Utilization and Patterns of Care following Lyme Disease. *PloS ONE* 10(2): 1–14.
- Al-Robaiy S., Dihazi H., Kacza J., Seeger J., Schiller J., Huster D., Knauer J. *et* Straubinger R. K. (2010): Metamorphosis of *Borrelia burgdorferi* organisms – RNA, lipid and protein composition in context with the spirochetes' shapes. *Journal of Basic Microbiology* 50: 5–17.
- Alban P. S., Johnson P. W. *et* Nelson D. R. (2000): Serum-starvation-induced changes in protein synthesis and morphology of *Borrelia burgdorferi*. *Microbiology* 146: 119–127.
- Allan E. J., Hoischen C. *et* Gumpert J. (2009): Bacterial L-Forms. *Advances in Applied Microbiology* 68: 1–39.
- Anderson J. F. (1989): Epizootiology of *Borrelia* in *Ixodes* Tick Vectors and Reservoir Hosts. *Reviews of Infectious Diseases* 11(6): 1451–1459.
- Barbour A. G. (1984): Isolation and Cultivation of Lyme Disease Spirochetes. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 57: 521–525.
- Barbour A. G. *et* Garon C. F. (1987): Linear Plasmids of the Bacterium *Borrelia burgdorferi* Have Covalently Closed Ends. *Science* 237(4813): 409–411.
- Barbour A. G. *et* Hayes S. F. (1986): Biology of *Borrelia* Species. *Microbiological Reviews* 50(4): 381–400.
- Berende A., ter Hofstede H. J. M., Vos F. J., van Middendorp H., Vogelaar M. L., Tromp M., van den Hoogen F. H., Donders A. R. T., Evers A. W. M. *et* Kullberg B. J. (2016): Randomized Trial of Longer-Term Therapy for Symptoms Attributed to Lyme Disease. *The New England Journal of Medicine* 374(13): 1209–1220.
- Bergström S., Noppa L., Gylfe Å. *et* Östberg Y. (2002): Molecular and Cellular Biology of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. In: Gray J., Kahl O., Lane R. S. *et* Stanek G. (eds.): *Lyme borreliosis: Biology, Epidemiology and Control*, pp. 47–90, CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK.
- Blevins J. S., Hagman K. E. *et* Norgard M. V. (2008): Assessment of decorin-binding protein A to the infectivity of *Borrelia burgdorferi* in the murine models of needle and tick infection. *BMC Microbiology* 8: 82.
- Boulos L., Prévost M., Barbeau B., Coallier J. *et* Desjardins R. (1999): LIVE/DEAD® *BacLight*™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods* 37: 77–86.
- Brorson Ø. (2009): *Borrelia burgdorferi* – en unik bakterie. *Tidsskrift for den Norske Laegeforening* 129(20): 2114–2117.

- Brorson Ø. *et* Brorson S.-H. (1997): Transformation of cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to normal, mobile spirochetes. *Infection* 25(4): 240–246.
- Brorson Ø. *et* Brorson S.-H. (1998a): A rapid method for generating cystic forms of *Borrelia burgdorferi*, and their reversal to mobile spirochetes. *APMIS* 106: 1131–1141.
- Brorson Ø. *et* Brorson S.-H. (1998b): *In vitro* conversion of *Borrelia burgdorferi* to cystic forms in spinal fluid, and transformation to mobile spirochetes by incubation in BSK-H medium. *Infection* 26(3): 144–150.
- Brorson Ø. *et* Brorson S.-H. (1999): An *in vitro* study of the susceptibility of mobile and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to metronidazole. *APMIS* 107: 566–576.
- Brorson Ø., Brorson S.-H., Scythes J., MacAllister J., Wier A. *et* Margulis L. (2009): Destruction of spirochete *Borrelia burgdorferi* round-body propagules (RBs) by the antibiotic Tigecycline. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106(44): 18656–18661.
- Bruck D. K., Talbot M. L., Cluss R. G. *et* Boothby J. T. (1995): Ultrastructural characterization of the stages of spheroplast preparation of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Microbiological Methods* 23(2): 219–228.
- Burgdorfer W. (2001): Arthropod-Borne Spirochetoses: A Historical Perspective. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 20(1): 1–5.
- Burgdorfer W., Barbour A. G., Hayes S. F., Benach J. L., Grunwaldt E. *et* Davis J. P. (1982): Lyme disease – A Tick-Borne Spirochetosis? *Science* 216(4552): 1317–1319.
- Burgdorfer W. *et* Hayes S. F. (1989): Vector-spirochete relationships in Louse-borne and tick-borne borrelioses with emphasis on Lyme disease. In: Harris K. F. (ed.): *Advances in Disease Vector Research* (6), pp. 127–150, Springer Verlag, New York, Inc.
- Casjens S., Fraser-Liggett C. M., Mongodin E. F., Qiu W.-G., Dunn J. J., Luft B. J. *et* Schutzer S. E. (2011): Whole Genome Sequence of an Unusual *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Isolate. *Journal of Bacteriology*, 193(6): 1489–1490.
- Casjens S., Murphy M., DeLange M., Sampson L., van Vugt R. *et* Huang W. M. (1997): Telomeres of the linear chromosomes of Lyme disease spirochaetes: nucleotide sequence and possible Exchange with linear plasmid telomeres. *Molecular Microbiology* 26(3): 581–596.
- Casjens S., Palmer N., van Vugt R., Huang W. M., Stevenson B., Rosa P., Lathigra R., Sutton G., Peterson J., Dodson R. J., Haft D., Hickey E., Gwinn M., White O. *et* Fraser C. M. (2000): A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology* 35(3): 490–516.
- Cerar, T., Ogrinc K., Lotrič-Furlan S., Kobal J., Levičnik-Stezinar S., Strle F. *et* Ružić-Sabljić E. (2013): Diagnostic Value of Cytokines and Chemokines in Lyme Neuroborreliosis. *Clinical and Vaccine Immunology* 20(10): 1578–1584.

Costerton J. W., Stewart P. S. *et* Greenberg E. P. (1999): Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* 284(5418): 1318–1322.

Cox D. L., Akins D. R., Bourell K. W., Lahdenne P., Norgard M. V. *et* Radolf J. D. (1996): Limited surface exposure of *Borrelia burgdorferi* outer surface lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93(15): 7973–7978.

Di Domenico E. G., Cavallo I., Bordignon V., D'Agosto G., Pontone M., Trento E., Gallo M. T., Prignano G., Pimpinelli F., Toma L. *et* Ensoli F. (2018): The Emerging Role of Microbial Biofilm in Lyme Neuroborreliosis. *Frontiers in Neurology* 9:1048.

Dorward D. W., Schwan T. G. *et* Garon C. F. (1991): Immune capture and detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in urine, blood or tissues from infected ticks, mice, dogs and humans. *Journal of Clinical Microbiology* 29(6): 1162–1170.

Dutton J. E. *et* Todd J. L. (1907): A note on the morphology of *Spirochaeta duttoni*. *The Lancet* 2(4396): 1523–1525.

Eiffert H., Lotter H, Jarecki-Khan K. *et* Thomssen R. (1991): Identification of an immunoreactive non-proteinaceous component in *Borrelia burgdorferi*. *Medical Microbiology and Immunology* 180(5): 229–237.

Ettestad P. J., Campbell G. L., Welbel S. F., Genese C. A., Spitalny K. C., Marchetti C. M. *et* Dennis D. T. (1995): Biliary Complications in the Treatment of Unsubstantiated Lyme Disease. *The Journal of Infectious Diseases* 171(2): 356–361.

Fallon B. A., Keilp J. G., Corbera K. M., Petkova E., Britton C. B., Dwyer E., Slavov I., Cheng J., Dobkin J., Nelson D. R. *et* Sackeim, H. A. (2008): A randomized, placebo-controlled trial of repeated IV antibiotic therapy for Lyme encephalopathy. *Neurology* 70(13): 992–1003.

Feder H. M., Johnson B. J., O'Connell S., Shapiro E. D., Steere A. C., Wormser G. P. *et* the Ad Hoc International Lyme Disease Group (2007): A Critical Appraisal of “Chronic Lyme Disease”. *The New England Journal of Medicine* 357(14): 1422–1430.

Feng J., Shi W., Zhang S., Sullivan D., Auwaerter P. G. *et* Zhang Y. (2016): A Drug Combination Screen Identifies Drugs Active against Amoxicillin-Induced Round Bodies of *In Vitro Borrelia burgdorferi* Persists from an FDA Drug Library. *Frontiers in Microbiology* 7(743): 1–12.

Fischer J. R., LeBlanc K. T. *et* 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.

Fraser C., Casjens S., Huang W., Sutton G., Clayton R., Lathigra R., White O., Ketchum K., Dodson R., Hickey E., Gwinn M., Dougherty B., Tomb J., Fleischmann R., Richardson D., Peterson J., Kerlavage A., Quackenbush J., Salzberg S., Hanson M., van Vugt R., Palmer N., Adams M., Gocayne J., Weidman J., Utterback T., Wathley L., McDonald L., Artiach P., Bowman C., Garland S., Fujii C., Cotton M., Horst K., Roberts K., Hatch B., Smith H. *et* Venter J. (1997): Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390(6660): 580–586.

- Fuchs R., Jauris S., Lottspeich F., Preac-Mursic V., Wilske B. et Soutschek E. (1992): Molecular analysis and expression of a *Borrelia burgdorferi* gene encoding a 22 kDa protein (pC) in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 6(4): 503–509.
- Garon C. F., Dorward D. W. et Corwin M. D. (1989): Structural Features of *Borrelia burgdorferi* – the Lyme Disease Spirochete: Silver Staining for Nucleic Acids. *Scanning Microscopy Supplement* 3: 109–115.
- Ge Y., Li Ch., Corum L., Slaughter C. A. et Charon N. W. (1998): Structure and Expression of the FlaA Periplasmic Flagellar Protein of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Bacteriology* 180(9): 2418–2425.
- Gilmore R. D. (2012): Immunoseclusion and Chronic Infection by *Borrelia burgdorferi*. In: Embers M. E. (ed.): *The Pathogenic Spirochetes: Strategies for Evasion of Host Immunity and Persistence*, pp. 19–39, Springer, New York.
- Grimm D., Tilly K., Byram R., Stewart P. E., Krum J. G., Bueschel D. M., Schwan T. G., Policastro P. F., Elias A. F. et Rosa P. A. (2004): Outer-surface protein C of the Lyme disease spirochete: a protein induced in ticks for infection of mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101(9): 3142–3147.
- Gruntar I., Malovrh T., Murgia R. et Cinco M. (2001): Conversion of *Borrelia garinii* cystic forms to motile spirochetes *in vivo*. *APMIS* 109: 383–388.
- Guo B. P., Norris S. J., Rosenberg L. C. et Höök M. (1995): Adherence of *Borrelia burgdorferi* to the Proteoglycan Decorin. *Infection and Immunity* 63(9): 3467–3472.
- Hellwage J., Meri T., Heikkilä T., Alitalo A., Panelius J., Lahdenne P., Seppälä I. J. T. et Meri S. (2001): The Complement Regulator Factor H Binds to the Surface Protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of Biological Chemistry* 276(11): 8427–8435.
- Honegr K. (2009): Lymeská borrelióza. In: Beneš J.: *Infekční lékařství*, pp. 289–292, Galén, Praha.
- Hovind-Hougen K. (1984): Ultrastructure of Spirochetes Isolated from *Ixodes ricinus* and *Ixodes dammini*. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 57: 543–548.
- Howe T. R., Mayer L. W. et Barbour A. G. (1985): A single recombinant plasmid expressing two major outer surface proteins of the Lyme disease spirochete. *Science* 227: 645–646.
- Hulínská D. (2013): Mikrobiologie. In: Bartůněk P., Bojar M., Calda P., Diblík P., Hergocogová J., Hoza J., Hulínská D., Janovská D., Pícha D., Valešová M.: *Lymeská borelióza*, 4. přepracované a doplněné vydání, p. 24, Grada Publishing, a.s., Praha.
- Hulínská D., Barták P., Hercogová J., Hančil J., Bašta J. et Schramlová J. (1994): Electron microscopy of Langerhans cells and *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease patients. *Zentralblatt für Bakteriologie* 280(3): 348–359.

- Ivanova L. B., Tomova A., González-Acuña D., Murúa R., Moreno C. X., Hernández C., Cabello J., Cabello C., Daniels T. J., Godfrey H. P. *et* 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.
- Iyer R., Kalu O., Purser J., Norris S., Stevenson B. *et* Schwartz I. (2003): Linear and Circular Plasmid Content in *Borrelia burgdorferi* Clinical Isolates. *Infection and Immunity* 71(7): 3699–3706.
- Johnson R. C., Schmid G. P., Hyde F. W., Steigerwalt A. G. *et* Brenner D. J. (1984): *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: Etiologic Agent of Lyme Disease. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34(4): 496–497.
- Katona L. I., Beck G. *et* Habicht G. S. (1992): Purification and Immunological Characterization of a Major Low-Molecular-Weight Lipoprotein from *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 60(12): 4995–5003.
- Kelly R. (1971): Cultivation of *Borrelia hermsi*. *Science* 173: 443.
- Kenedy M. R., Lenhart T. R. *et* Akins D. R. (2012): The role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 66(1): 1–19.
- Kersten A., Poitschek C., Rauch S. *et* Aberer E. (1995): Effects of Penicillin, Ceftriaxone, and Doxycycline on Morphology of *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(5): 1127–1133.
- Kimsey R. B. *et* Spielman A. (1990): Motility of Lyme Disease Spirochetes in Fluids as Viscous as the Extracellular Matrix. *The Journal of Infectious Diseases* 162: 1205–1208.
- Klempner M. S., Hu L. T., Evans J., Schmid C. H., Johnson G. M., Trevino R. P., Norton D., Levy L., Wall D., McCall J., Kosinski M. *et* Weinstein, A. (2001): Two Controlled Trials of Antibiotic Treatment in Patients with Persistent Symptoms and a History of Lyme Disease. *The New England Journal of Medicine* 345(2): 85–92.
- Kraiczy P., Hartmann K., Hellwage J., Skerka Ch., Kirschfink M., Brade V., Zipfel P. F., Wallich R. *et* Stevenson B. (2004): Immunological characterization of the complement regulator factor H-binding CRASP and Erp proteins of *Borrelia burgdorferi*. *International Journal of Medical Microbiology Supplements* 293(37): 152–157.
- Kraiczy P., Skerka Ch., Kirschfink M., Brade V. *et* Zipfel P. F. (2001): Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and Factor H. *The European Journal of Immunology* 31(6): 1674–1684.
- Krupp L. B., Hyman L. G., Grimson R., Coyle P. K., Melville P., Ahn S., Dattwyler R. *et* Chandler B. (2003): Study and treatment of post Lyme disease (STOP-LD): A randomized double masked clinical trial. *Neurology* 60(12): 1923–1930.

- Křupka M., Raška M., Běláková J., Horynová M., Novotný R. *et* Weigl E. (2007): Biological aspects of Lyme disease spirochetes: unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky in Olomouc 151(2): 175–186.
- Křupka M., Raška M. *et* Weigl E. (2008): Lymeská borelióza – biologie, patogeneze, diagnostika a léčba. Dermatologie pro praxi 2(5–6): 236–239.
- Kurtti T. J., Munderloh U. G., Johnson R. C. *et* Ahlstrand G. G. (1987): Colony formation and morphology in *Borrelia burgdorferi*. Journal of Clinical Microbiology 25(11): 2054–2058.
- Lantos P. M., Auwaerter P. G. *et* Wormser G. P. (2014): A Systematic Review of *Borrelia burgdorferi* Morphologic Variants Does Not Support a Role in Chronic Lyme Disease. Clinical Infectious Diseases 58(5): 663–671.
- Ljøstad U., Skogvoll E., Eikeland R., Midgard R., Skarpaas T., Berg Å. *et* Mygland Å. (2008): Oral doxycykline versus intravenous ceftriaxone for European Lyme neuroborreliosis: a multicentre, non-inferiority, double-blind, randomised trial. The Lancet Neurology 7(8): 690–695.
- Luft B. J., Jiang W., Munoz P., Dattwyler R. J. *et* Gorevic P. D. (1989): Biochemical and Immunological Characterization of the Surface Proteins of *Borrelia burgdorferi*. Infection and Immunity 57(11): 3637–3645.
- Malawista S. E. *et* de Boisfleury Chevance A. (2008): Clocking the Lyme Spirochete. PLoS ONE 3(2): e1633.
- Mantovani E., Marangoni R. G., Gauditano G., Bonoldi V. L. N. *et* Yoshinari N. H. (2012): Amplification of the *flgE* gene provides evidence for the existence of a Brazilian borreliosis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 54(3): 153–157.
- Margos G., Hojgaard A., Lane R. S., Cornet M., Fingerle V., Rudenko N., Ogden N., Aanensen D. M., Fish D. *et* Piesman, J. (2010): Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissettii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. Ticks and Tick-Borne Diseases 1(4): 151–158.
- Margos G., Chu Ch.-Y., Takano A., Jiang B.-G., Liu W., Kurtenbach K., Masuzawa T., Fingerle V., Cao W.-Ch. *et* Kawabata H. (2015): *Borrelia yangtzensis* sp. no., a rodent-associated species in Asia, is related to *Borrelia valaisiana*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 65: 3836–3840.
- Margos G., Vollmer S. A., Cornet M., Garnier M., Fingerle V., Wilske B., Bormane A., Vitorino L., Collares-Pereira M., Drancourt M. *et* Kurtenbach K. (2009): A New *Borrelia* Species Defined by Multilocus Sequence Analysis of Housekeeping Genes. Applied and Environmental Microbiology 75(16): 5410–5416.
- Marques A. R. (2008): Chronic Lyme Disease: A Review. Infectious Disease Clinics of North America 22(2): 341–360.

- Marques A. R., Weir S. C., Fahle G. A. et Fischer S. H. (2000): Lack of evidence of *Borrelia* involvement in Alzheimer's disease. *The Journal of Infectious Diseases* 182: 1006–1007.
- Meriläinen L., Brander H., Herranen A., Schwarzbach A. et Gilbert L. (2016): Pleomorphic forms of *Borrelia burgdorferi* induce distinct immune responses. *Microbes and Infection* 18(7–8): 484–495.
- Meriläinen L., Herranen A., Schwarzbach A. et Gilbert L. (2015): Morphological and biochemical features of *Borrelia burgdorferi* pleomorphic forms. *Microbiology* 161: 516–527.
- Miklossy J., Kasas S., Zurn A. D., McCall S., Yu S. et McGeer P. L. (2008): Persisting atypical and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and local inflammation in Lyme neuroborreliosis. *Journal of Neuroinflammation* 5: 40.
- Miziara C. S. M. G., Gelmeti Serrano V. A. et Yoshinari N. (2018): Passage of *Borrelia burgdorferi* through diverse Ixodid hard ticks causes distinct diseases: Lyme borreliosis and Baggio-Yoshinari syndrome. *Clinics (Sao Paulo)* 73: e394.
- Molecular Probes, Inc. (2004): LIVE/DEAD® *BacLight*™ Bacterial Viability Kit for microscopy product information.
- Murgia R. et Cinco M. (2004): Induction of cystic forms by different stress conditions in *Borrelia burgdorferi*. *APMIS* 112: 57–62.
- Nadelman R. B. et Wormser G. P. (1995): Erythema migrans and early Lyme disease. *The American Journal of Medicine* 98(4): 15–24.
- Nadelman R. B. et Wormser G. P. (1998): Lyme borreliosis. *The Lancet* 352(9127): 557–565.
- Neelakanta G., Li X., Pal U., Liu X., Beck D. S., DePonte K., Fish D., Kantor F. S. et Fikrig E. (2007): Outer surface protein B is critical for *Borrelia burgdorferi* adherence and survival within *Ixodes* ticks. *PloS Pathogens* 3(3): 312–322.
- Pal U., Li X., Wang T., Montgomery R. R., Ramamoorthi N., deSilva A. M., Bao F., Yang X., Pypaert M., Pradhan D., Kantor F. S., Telford S., Anderson J. F. et Fikrig E. (2004): TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell* 119(4): 457–468.
- Parish CH. R. (1999): Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunology and Cell Biology* 77: 499–508.
- Persing D. H., Rutledge B. J., Rys P. N., Podzorski D. S., Mitchell P. D., Kurt D. R., Liu B., Fikrig E. et Malawista, S. E. (1994): Target Imbalance: Disparity of *Borrelia burgdorferi* Genetic Material in Synovial Fluid from Lyme Arthritis Patients. *The Journal of Infectious Diseases* 169(3): 668–672.
- Preac-Mursic V., Wanner G., Reinhardt S., Wilske B., Busch U. et Marget W. (1996): Formation and cultivation of *Borrelia burgdorferi* spheroplast L-form variants. *Infection* 24(3): 218–226.

- Pritt B., Mead P., Johnson D., Neitzel D., Respicio-Kingry L., Davis J., Schiffman E., Sloan L., Schriefer M., Replogle A., Paskewitz S., Ray J., Bjork J., Steward Ch., Deedon A., Lee X., Kingry L., Miller T., Feist M., Theel E., Patel R., Irish C. *et* Petersen J. (2016a): 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.
- Pritt B., Respicio-Kingry L., Sloan L., Schriefer M., Replogle A., Bjork J., Liu G., Kingry L., Mead P., Neitzel D., Schiffman E., Hoang J., Davis J., Paskewitz S., Boxrud D., Deedon A., Lee X., Miller T., Feist M., Steward Ch., Theel E., Patel R., Irish C. *et* Petersen J. (2016b): *Borrelia mayonii* sp. nov., a member of the *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex, detected in patients and ticks in the upper midwestern United States. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66(11): 4878–4880.
- Radolf J. D., Bourell K. W., Akins D. R., Brusca J. S. *et* Norgard M. V. (1994): Analysis of *Borrelia burgdorferi* membrane architecture by freeze-fracture electron microscopy. *Journal of Bacteriology* 176(1): 21–31.
- Rizzoli A., Hauffe H. C., Carpi G., Vourc'h G. I., Neteler M. *et* Rosà R. (2011): Lyme borreliosis in Europe. *Eurosurveillance* 16(27): 1–8.
- Roháčová H. (2012): Lymeská borrelióza. *Interní medicína pro praxi* 14(5): 203–205.
- Rosa P. A. (1997): Microbiology of *Borrelia burgdorferi*. *Seminars in Neurology* 17(1): 5–10.
- Rosa P. A., Cabello F. *et* Samuels S. D. (2010): Genetic Manipulation of *Borrelia burgdorferi*. In: Samuels D. S. *et* Radolf J. D. (eds.): *Borrelia: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis*, pp. 189–220, Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Rosa P. A., Tilly K. *et* Stewart P. E. (2005): The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. *Nature Reviews Microbiology* 3(2): 129–143.
- Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L. *et* 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., Lin T., Gao L., Grubhoffer L. *et* Oliver J. H. (2009): Delineation of a New Species of the *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Complex, *Borrelia americana* sp. nov. *Journal of Clinical Microbiology* 47(12): 3875–3880.
- Sapi E., Bastian S. L., Mpoy C. M., Scott S., Rattelle A., Pabbati N., Poruri A., Burugu D., Theophilus P. A., Pham T. V., Datar A., Dhaliwal N. K., MacDonald A., Rossi M. J., Sinha S. K. *et* Luecke D. F. (2012): Characterization of biofilm formation by *Borrelia burgdorferi in vitro*. *PLoS ONE* 7(10): e48277.
- Sapi E., Kaur N., Anyanwu S., Luecke D. F., Datar A., Patel S., Rossi M. *et* Stricker R. B. (2011): Evaluation of *in-vitro* antibiotic susceptibility of different morphological forms of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Drug Resistance* 4: 97–113.

- Shoberg R. J. *et* Thomas D. D. (1993): Specific Adherence of *Borrelia burgdorferi* Extracellular Vesicles to Human Endothelial Cells in Culture. *Infection and Immunity* 61(9): 3892–3900.
- Shoberg R. J. *et* Thomas D. D. (1995): *Borrelia burgdorferi* Vesicle Production Occurs via a Mechanism Independent of Immunoglobulin M Involvement. *Infection and Immunity* 63(12): 4857–4861.
- Schwan T. G., Karstens R. H., Schrupf M. E. *et* Simpson W. J. (1991): Changes in antigenic reactivity of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete, during persistent infection in mice. *Canadian Journal of Microbiology* 37: 450–454.
- Schwan T. G., Piesman J., Golde W. T., Dolan M. C. *et* Rosa P. A. (1995): Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92: 2909–2913.
- Singh S. K. *et* Girschick J. (2004): Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *The Lancet Infectious Diseases* 4(9): 575–583.
- Srivastava S. Y. *et* de Silva A. M. (2009): Characterization of *Borrelia burgdorferi* Aggregates. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 9(3): 323–329.
- Stanek G. *et* Strle F. (2008): Lyme Disease – European Perspective. *Infectious Disease Clinics of North America* 22(2): 327–339.
- Stanek G., Strle F., Gray J. *et* Wormser G. P. (2002): History and Characteristics of Lyme Borreliosis. In: Gray J., Kahl O., Lane R. S. *et* Stanek G. (eds.): *Lyme borreliosis: Biology, Epidemiology and Control*, pp. 1–28, CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK.
- Stanek G., Wormser G. P., Gray J. *et* Strle F. (2012): Lyme borreliosis. *The Lancet* 379(9814): 461–473.
- Steere A. C. (1989): Lyme Disease. *New England Journal of Medicine* 321(9): 586–596.
- Steere A. C. (2001): Lyme Disease. *New England Journal of Medicine* 345(2): 115–125.
- Steere A. C., Hardin J. A. *et* Malawista S. E. (1977a): Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: cryoimmunoglobulins and clinical activity of skin and joints. *Science* 196(4294): 1121–1122.
- Steere A. C., Malawista S. E., Snyderman D. R., Shope R. E., Andiman W. A., Ross M. R. *et* Steele F. M. (1977b): An epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis & Rheumatism* 20(1): 7–17.
- Stevenson B., Tilly K. *et* Rosa P. A. (1996): A Family of Genes Located on Four Separate 32-Kilobase Circular Plasmids in *Borrelia burgdorferi* B31. *The Journal of Bacteriology* 178(12): 3508–3516.
- Stricker R. B. (2007): Counterpoint: Long-Term Antibiotic Therapy Improves Persistent Symptoms Associated with Lyme Disease. *Clinical Infectious Diseases* 45(2): 149–157.

- Stricker R. B. *et* Johnson L. (2011): Lyme disease: the next decade. *Infection and Drug Resistance* 4: 1–9.
- Sundström Ch. *et* Nilsson K. (1976): Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *International Journal of Cancer* 17(5): 565–577.
- Swellengrebel N. H. (1907): Sur cytology compare des spirochetes et des Spirilles (part 2). *Ann Inst Past* 21: 562–584. In: Wright D. J. M., (2009): Borrel's accidental legacy. *Clinical Microbiology and Infection* 15(5): 397–399.
- Szczepanski A., Furie M. B., Benach J. L., Lane B. P. *et* Fleit H. B. (1990): Interaction between *Borrelia burgdorferi* and endothelium *in vitro*. *The Journal of Clinical Investigation* 85(5): 1637–1647.
- Takayama K., Rothenberg R. J. *et* Barbour A. G. (1987): Absence of Lipopolysaccharide in the Lyme Disease Spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 55(9): 2311–2313.
- Vaňousová D. *et* Hercogová J. (2008): Lyme borreliosis treatment. *Dermatologic Therapy* 21(2): 101–109.
- Veinović G., Ružić-Sabljić E., Strle F. *et* Cerar T. (2016): Comparison of Growth of *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* and *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto at Five Different Temperatures. *PLoS ONE* 11(6): e0157706.
- Weber K. (2001): Aspects of Lyme borreliosis in Europe. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 20(1): 6–13.
- Whitchurch C. B., Tolker-Nielsen T., Ragas P. C. *et* Mattick J. S. (2002): Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295(5559): 1487.
- Whitmire W. M. *et* Garon C. F. (1993): Specific and Nonspecific Responses of Murine B Cells to Membrane Blebs of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 61(4): 1460–1467.
- Wilske B., Fingerle V. *et* Schulte-Spechtel U. (2007): Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 49(1): 13–21.
- Yano Y., Takada N. *et* Ishiguro F. (1997): Location and Ultrastructure of *Borrelia japonica* in Naturally Infected *Ixodes ovatus* and Small Mammals. *Microbiology and Immunology* 41(1): 13–19.
- Yoshinari N., Mantovani E., Bonoldi V. L. N., Marangoni R. G. *et* Gauditano G. (2010): Brazilian Lyme-like Disease or Baggio-Yoshinari Syndrome: Exotic and Emerging Brazilian Tick-borne Zoonosis. *Revista da Associação Médica Brasileira* 56(3): 363–369.
- Zhang J.-R., Hardham J. M., Barbour A. G. *et* Norris S. J. (1997): Antigenic Variation in Lyme Disease *Borreliae* by Promiscuous Recombination of VMP-like Sequence Cassettes. *Cell* 89: 275–285.