

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Analýza infekčního potenciálu klonu „evropského“ druhu *B. garinii*
izolovaného ze severoamerických hlodavců s využitím laboratorních
modelů infikovaných savců**

Diplomová práce

Bc. Štěpánka Smolenová

Školitelka: Maryna Golovchenko, MSc.

Vedoucí práce: Nataliia Rudenko, PhD.

Fakultní garant: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.

České Budějovice 2017

Diplomová práce

Smolenová, Š., 2017: Analýza infekčního potenciálu klonu „evropského“ druhu *B. garinii* izolovaného ze severoamerických hlodavců s využitím laboratorních modelů infikovaných savců.

Mgr. Thesis, in Czech., 85 p., Faculty of Science, Univerzity of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The topic of this thesis is a logical continuation of the bachelor project. In our previous project, using the method of *Borrelia* cultivation on solid medium, we succeeded obtaining a monoclonal population of *B. garinii* from the american isolate in which the presence of more borrelia species was confirmed. By this we confirmed the presence so-called "european" *Borrelia* species in the southeastern United States (specifically in South Carolina). By multilocus analysis of eight housekeeping genes of american isolate it has been shown that the obtained strain of *B. garinii* is different from the previously described european and asian strains of this species.

The main objective of the proposed project, is the analysis of the pathogenic potential of the isolated clone of *B. garinii*. Validation of the pathogenic potential of American *B. garinii* isolate in laboratory mice model could be important for the public health of the southeast american population, as this will confirm the possibility of existence of Lyme disease, caused by this spirochete species, with significantly different clinical signs in this region.

For this purpose, the method of direct diagnosis (infecting laboratory animals and transferring of infection from infected animals to the tick and vice versa) was used. Laboratory mice were infected subcutaneously, and the spirochete infection was confirmed in ear tissue by PCR. Uninfected *Ixodes ricinus* larvae were fed on infected mice. After the confirmation of infection in newly hatched nymphs they were fed on naive mice. The ability of transmitted spirochetes to disseminate into different mice tissues was confirmed by PCR.

The presence another so-called "European" species, *B. afzelii*, was confirmed in original rodent associated American isolate. Another aim of the project was to obtain monoclonal populations *B. afzelii* from co-infected northamerican sample confirming by this way the transoceanic migration of spirochetes.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce.

Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 18. 4. 2018

.....
Štěpánka Smolenová

Poděkování:

Na prvním místě patří mé velké nepopsatelné děkuji mým školitelkám Maryně Golovchenko, MSc. a Natashe Rudenko, PhD. a to nejen za velmi zajímavé téma, veškerou pomoc v laboratoři a za ochotu mi odpovídat na veškeré dotazy, dále za stálou podporu, ale hlavně za nekonečnou trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Prof. RNDr. Liborovi Grubhofferovi, CSc, který mi umožnil pracovat v Laboratoři molekulární biologie vektorů a patogenů. Dále bych na tomto místě chtěla poděkovat Mgr. Zuzaně Vavruškové, která mi pomáhala při práci s myšmi. Neocenitelné děkuji, patří i mým rodičům za dlouholetou podporu, které si nesmírně vážím.

Obsah

1. ÚVOD.....	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
2.1 Geografické rozšíření různých druhů borelií	3
2.2 <i>Borrelia afzelii</i> a <i>Borrelia garinii</i>	4
2.2.1 Příznaky a onemocnění spojené s <i>B. afzelii</i> a <i>B. garinii</i>	6
2.3 Šíření patogenů migrací zvířat a lidí	6
2.4 Přenos borelie na hostitele	9
2.5 Migrace ptáků a hlodavců a s nimi spojená distribuce	9
2.5.1 Šíření <i>B. afzelii</i> prostřednictvím ptáků	11
2.5.2 Šíření <i>B. garinii</i> prostřednictvím hlodavců	14
2.6 Shrnutí.....	17
3. Cíl práce.....	18
4. MATERIÁLY A METODY.....	19
4.1 MATERIÁLY	19
4.2 METODY	22
4.2.1 Příprava tekutého média BSK – II.....	22
4.2.2 Příprava MKP média pro kultivaci borelie z tkání	22
4.2.3 Kultivace spirochét v tekutém médiu	23
4.2.4 Mikroskopie temného pole, počítání hustoty kultur borelie.....	23
4.2.5 Příprava tekutého média 1,5 x BSK ⁺ (pro pevnou půdu)	23
4.2.6 Kultivace spirochét na pevné půdě.....	24
4.2.7 Infikování laboratorního modelu savce (myši).....	25
4.2.8 Odběr tkání	25
4.2.9 Nasazování neinfikovaných larev a infikovaných nymf na myši.....	25
4.2.10 Částečné nasátí nymf klišťat na membráně (umělé sání klišťat na membráně)	26

4.2.11	Extrakce nukleových kyselin z borelií, z klíšťat a tkání modelového zvířete	26
4.2.12	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	27
4.2.13	Průkaz přítomnosti DNK borelií v klíšťatech a v myších tkáních (nested PCR).....	28
4.2.14	Zjištění druhu borelie pomocí PCR s druhově specifickými primery	29
4.2.15	Elektroforéza v agarózovém gelu	33
4.2.16	Purifikace PCR produktů.....	33
4.2.17	Sekvenování.....	33
4.2.18	Western Blot – prokázání přítomnosti boreliových protilátek v myších.....	34
4.2.19	Kultivace živých spirochét z tkání infikovaných myší.....	36
5.	VÝSLEDKY.....	37
5.1	Kultivace spirochét na pevné půdě	37
5.2	Kontrola druhové čistoty.....	38
5.3	Analýza vybraných úseků genomu amerického izolátu <i>B. afzelii</i> SCCH-7/22	39
5.3.1	Analýza částečného <i>fla</i> genu	39
5.3.2	Analýza částečné sekvence genu pro <i>ospA</i>	40
5.3.3	Analýza částečné sekvence genu pro 16S – 23S	40
5.3.4	MLST analýza	41
5.4	Průkaz přítomnosti DNA borelií v myších tkáních.....	42
5.5	Průkaz trans – stadiálního přenosu borelií z larev na nymfy	43
5.6	Průkaz přenou borelií z nymf na naivní myši	44
5.7	Fylogenetická analýza <i>B. garinii</i>	44
5.8	Fylogenetická analýza pro <i>B. afzelii</i>	50
6.	Diskuze	55
7.	ZÁVĚR.....	61
8.	LITERATURA	62
9.	POUŽITÉ ZKRATKY	71

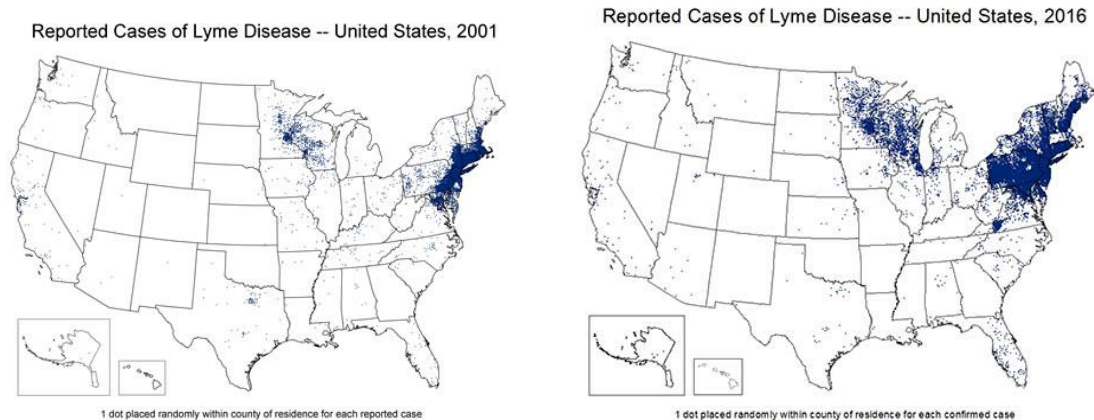
10. PŘÍLOHY	73
-------------------	----

1. ÚVOD

Mnoho patogenních bakterií vykazuje strukturu klonální populace, ale i v rámci jediného druhu může být genetická struktura dynamická a měnit se v prostoru a čase. Řada genetických procesů může být odpovědná za tuto variabilitu a může ovlivnit vznik nových variant patogenů. Například bakteriální výměna DNK a homologní rekombinace mohou vést k primárnímu promíchání a redukované vazebné nerovnováze s významnými důsledky pro vývoj patogenů a jeho populační demografii. Podobně také může geografická izolace nebo ekologická specializace vést k diferenciaci populace a k prostorovým nebo časovým rozdílům v distribuci a četnosti bakteriálních klonů. Vývoj odlišných bakteriálních evolučních variant s odlišnou ekologií a epidemiologickými charakteristikami je základní otázkou pro stanovení strategie v boji proti nemocem. Nicméně globální ekologická rozmanitost a populační struktura mnoha bakteriálních patogenů zůstává špatně srozumitelná a zvláště pak v případě vektorových patogenů, kde mnoho hostitelských a vektor-souvisejících faktorů může ovlivnit výskyt a četnost těchto diverzifikačních procesů (Gómez-Díaz et al., 2011). Geografické rozšíření ektoparazitů a patogenů v důsledku rozsáhlých klimatických změn a masivního cestování lidí po celém světě do různých zemí představuje v dnešní době neustálé riziko pro zdraví lidí a zvířat (Sparagano et al., 2015).

Lymeská borelióza (též lymeská borelióza, dále jen LB) je infekce způsobená spirochétami komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* s.l.), která je obecně přenášena kousnutím určitých druhů klíšťat rodu *Ixodes*. Původně byla objevena jako lymeská artritida v USA v sedmdesátých letech a město Old Lyme v Connecticutu v USA bylo uznáno počátečním epicentrem mladistvé revmatoidní artritidy. Poté se však ukázalo, že artritida byla pozdním projevem multisystémové nemoci přenášené klíšťaty, která byla již před 100 lety uznána nejen v USA, ale i v Evropě (Masuzawa, 2004). LB se vyskytuje s podobnými frekvencemi u mužů a žen a postihuje lidi všech věkových skupin. Stanovení přesného odhadu výskytu případů onemocnění LB v USA je komplikováno vysokou četností chybných diagnóz. Ročně je evidováno více než 85 000 případů v Evropě a více než 300 000 v USA (www.cdc.gov). Počet případů výskytu LB po celém světě každým rokem stoupá, což může být způsobeno globálním oteplováním Země, díky kterému se rozšiřuje ekologická nika přenašeče onemocnění – klíšťat rodu *Ixodes* (Brownstein et al., 2005). Nárůst případů LB v USA mapuje americká vládní agentura CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (Obr. 1). V roce 2015 se v USA jednalo

o LB jako šestou nejčastější chorobu hlášenou na vnitrostátní úrovni (www.cdc.gov). Onemocnění se vyskytuje na severovýchodě USA (od Maine po Maryland), na středním Východě (Wisconsin a Minnesota) a na západním pobřeží (severní Kalifornie a Oregon).



Obr. 1: Nárůst případů onemocnění LB mezi lety 2001 až 2016 v USA (převzato z <http://www.cdc.gov> a upraveno)

Nejvyšší výskyt případů onemocnění LB v Evropě je zaznamenán ve střední Evropě a ve Skandinávii, zejména v Německu (Černý les), Rakousku, Slovinsku, Švédsku a taktéž v České republice, a to především v zalesněných oblastech. Onemocnění LB je také hlášeno v Rusku, Číně a Japonsku. Austrálie, Afrika a Jižní Amerika, stejně jako jižní USA nejsou pro tuto infekci považovány za endemické.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

Komplex *Borrelia burgdorferi* s.l. můžeme rozdělit do tří skupin podle patogeneze pro člověka jako původce LB. Do první skupiny můžeme zařadit druhy široce uznávané jako patogenní pro člověka, a to *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. bissetii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*. Pouze *B. burgdorferi* s.s. způsobuje LB ve Spojených státech a v Evropě (Rudenko et al., 2011). *B. afzelii*, *B. bavariensis* a *B. garinii* jsou považované za druhy, které se vyskytují jen v Eurasii, zatímco *B. bissetii* je distribuována po celém světě. Do druhé skupiny můžeme zařadit druhy borelií jako např., *B. kurtenbachii*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii* a *B. valaisiana*. Tyto druhy borelií sice byly detekovány nebo i izolovány ve vzorcích člověka, ale v podstatně nižších počtech. Do třetí skupiny pak patří druhy jako např., *B. americana*, *B. andersoni*, *B. carolinensis*, *B. chilensis*, *B. sinica*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. yangtze*, které nikdy nebyly nalezeny u člověka a ani nebyly izolovány z lidských vzorků.

2.1 Geografické rozšíření různých druhů borelií

Komplex *B. burgdorferi* s.l. je skupina celosvětově rozšířené bakterie. Geografické rozdíly v distribuci různých druhů *B. burgdorferi* s.l. pravděpodobně souvisí s přítomností a spektrem klíšťových vektorů a hostitelů, ale taktéž i s rozdílným přenosem spirochét mezi hostiteli a klíšťaty v závislosti na hostiteli.

Dvanáct druhů z komplexu *B. burgdorferi* s.l., a to *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. japonica*, *B. lusitaniae*, *B. sinica*, *B. spielmanii*, *B. tukanii*, *B. turdi*, *B. valaisiana*, *B. yangtze* jsou spojena s Eurasií. *B. americana*, *B. andersonii*, *B. bissetii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. californiensis*, *B. carolinensis*, *B. kurtenbachii* jsou druhy spojené se Severní Amerikou (Clark et al, 2013), ačkoliv přítomnost *B. bissetii* a *B. carolinensis* byla zjištěna také v Evropě. Až do objevení a pojmenování *B. chilensis* v roce 2012 nebyla na území Latinské Ameriky zaznamenána přítomnost borelie. Šest druhů z komplexu *B. burgdorferi* s.l. bylo nalezeno na dálném východě Ruska a v asijských zemích: *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. yangtze*, *B. garinii* a *B. afzelii*. Taktéž byla prokázána přítomnost *B. burgdorferi* s.s. a *B. carolinensis* na pevnině Číny a Taiwanu (Wang et al., 1999). Případy onemocnění LB na jižní polokouli byly zaznamenány v Jižní Americe (Chile, Brazílie, Argentina, Kostarika), Africe (Maroko, Tunisko) a v Austrálii (Wang et al., 1999), i když tyto oblasti nejsou považovány za endemické pro LB.

Do nedávna byly pouze tři druhy borelie, *B. burgdorferi* s.s., *B. bissettii*, *B. carolinensis*, spojované jak se Starým tak i s Novým světem (Rudenko et al., 2011). Nicméně údaje získané v průběhu posledních deseti let vyžadují přehodnocení již dříve získaných představ. Například byly zveřejněny četné studie o zjištění dříve pouze „evropského“ druhu *B. garinii* v mořských ptácích a klíšťatech *Ixodes uriae* (*I. uriae*) na atlantickém pobřeží Severní Ameriky (Smith et al., 2006; Bunikis et al., 1996), v subarktické Eurasii (Comstedt et al., 2011), Arktidě (Larsson, 2007), u pobřeží Labradoru (Muzaffar et al., 2009), stejně jako na Gullských ostrovech Newfoundlandu (Baggs, 2011). Kromě toho, nedávné výsledky založené na analýze izolátů borelií získaných z klíšťat, ptáků a hlodavců z jihovýchodu Spojených států, potvrzují přítomnost více druhů borelií v jednotlivých izolátech v jižní části země, včetně těch „evropských“, jako je například *B. garinii* a *B. afzelii* (nepublikovaná data).

2.2 *Borrelia afzelii* a *Borrelia garinii*

B. afzelii je pojmenovaná po švédském lékaři Arvidu Afzeliusovi, který jako první, a to v roce 1909, informoval o kožních lézích, jež jsou charakteristické pro onemocnění LB. V předchozích studiích byla *B. afzelii* označována jako skupina VS461 a v roce 1993 byla poprvé popsána jako samostatný druh *Borrelia afzelii* sp. nov. (Canica et al., 1993).

Až doposud jsou k dispozici sekvence celkových genomů 11 kmenů *B. afzelii*. Z nichž je pouze 5 dokončeno a publikováno (data z online databáze Gold genomes). Jednou z dokončených sekvencí genomu je genom kmene *B. afzelii* K78, klinický izolát z Rakouska. Genom K78 obsahuje lineární chromozom (905, 949bp) a 13 plazmidů (8 lineárních a 5 kruhových), které společně představují 1 309 otevřených čtecích rámců, z nichž 496 je umístěno na plazmidech. S výjimkou Ip 28-8 byly sekvenovány všechny lineární replikony.

Srovnání genomu *B. afzelii* K78 s dokončenými genomy 4 dalších kmenů *B. afzelii*, ACA – 1, PKo, HLJ01 a TOM3107, stejně jako srovnání s *B. burgdorferi* s.s. (B31), potvrdilo vysoký stupeň konzervatismu v rámci lineárního chromozomu *B. afzelii*, zatímco geny kódované na plazmidech vykazovaly mnohem větší rozmanitost. Vzhledem k tomu, že v genomu *B. afzelii* chybí některé plazmidy, přítomné v genomu *B. burgdorferi*, odpovídající faktory virulence *B. burgdorferi* se u *B. afzelii* vyskytují na jiných plazmidech. Navíc byl identifikován druhově specifický úsek v kruhovém plazmidu, cp26, který by mohl být použit pro stanovení jednotlivých druhů borelie. V genomu *B. afzelii*

K78 byly také lokalizovány různé nekódující RNA, které předtím nebyly anotované v žádném z publikovaných genomů *Borrelia* (Schüler et al., 2005).

B. garinii byla pojmenována na počest francouzského lékaře Charlese Gariniho, který v roce 1922 popsal její neurologické a kožní příznaky, které se objevily u pacienta po přisátí klíštěte. Charles Garini předpokládal, že spirochěty jsou etiologické agens těchto příznaků. V předchozích studiích se tento druh borelie nazýval *Borrelie* 20047. Původní kmen 20047 (= CIP 103362T) byl izolován z klíštěte *I. ricinus* ve Francii (Baranton et al., 1992). Ve stejném roce *B. garinii* byla vědeckou skupinou vedenou Dr. Barantonem popsána jako samostatný druh (Baranton et al., 1992).

Podle databáze online genomů JGI byly genomy 8 kmenů *B. garinii* úplně nebo částečně sekvenované. Z 8 genomů byly dokončeny a publikovány pouze 4. *B. garinii* má jeden lineární chromozom a celkem kóduje 969 genů (Craig & Scherf, 2003). Stejně jako ostatní druhy borelií *B. garinii* obsahuje také jednu kopii různých typů lineárních a kruhových plazmidů. Lineární plazmidy jsou přibližně 10-56 kb, zatímco kruhové plazmidy jsou přibližně 8-40 kb (Saier et al., 2002).

V roce 2004 Glöckner a spol. publikoval srovnávací analýzu kompletního genomu kmene *B. garinii* izolovaného od pacienta s neuroborreliózou s genomem *B. burgdorferi* s.s. Tato analýza odhalila, že většina chromozomu u obou druhů je konzervativní (92,7% identita na DNK, stejně jako na úrovni aminokyselin) a nebylo pozorováno žádné chromozomální přeskupení nebo větší inserce/delece. Dále se zdá, že dva kolineární plazmidy (lp54 a cp26) patří do základního genomového souboru druhů rodu *Borrelia*. Tyto tři kolineární části genomu *Borrelia* kódují 861 genů, které jsou ortologicky ve dvou zkoumaných druzích. Většina jiných plazmidů *B. burgdorferi* s.s. je také přítomna v *B. garinii*, i když ortologii není snadné definovat v důsledku vysoké redundance plazmidové frakce. Přesto nebyly nalezeny protějšky plazmidů lp36 a lp38 *B. burgdorferi* s.s. nebo jejich příslušné genové spektrum v genomu *B. garinii* a tudíž mohou být fenotypové rozdíly mezi těmito dvěma druhy způsobeny přítomností nebo naopak nepřítomností těchto dvou plazmidů stejně jako potenciálně pozitivně vybranými geny (Glöckner et al., 2004).

B. garinii je považována za geneticky a antigeně nejvíce heterogenní druh mezi druhy borelií způsobující LB. Typizace s monoklonálními protilátkami specifickými pro vnější povrchový protein A (OspA) ukázala, že *B. garinii* představuje 4 z celkového počtu

7 OspA sérotypů nalezených mezi druhy borelií způsobujících LB (Comstedt et al., 2009) a byl také stanoven obsah G+C párů v genomu, a to 28mol%.

2. 2. 1. Příznaky a onemocnění spojené s *B. afzelii* a *B. garinii*

Je známo, že v závislosti na druhu rodu *Borrelia* se borelióza liší v klinických příznacích (Glöckner et al., 2004). *B. garinii* je nejvíce neurotropní ze tří druhů komplexu *B. burgdorferi* s.l. způsobující LB. Poměrně dlouhou dobu byla *B. garinii* považována za hlavní příčinu většiny neurologických onemocnění, zahrnující případy meningopolyneuritidy, meningoradikulitidy a zřídka encephalomyelitis (Smith et al., 2006; Ojaimi et al., 1994). Později Margos a spol. popsali *B. bavariensis* jako hlavní důvod lidské neuroboreliózy. V Německu je Bannwarthův syndrom nejběžnějším projevem neuroboreliózy. V tomto případě borelie napadají nervový systém pacienta a nejčastěji se usazují v kořenech nervů a mozkových obalech. Ve Spojených státech je nejčastějším projevem neuroboreliózy subakutní basilární meningitida s nebo bez jednostranné nebo oboustranné paralýzy obličeje (Busch et al., 1996).

B. afzelii je nejčastější etiologickou příčinou kožních projevů LB v Evropě (Heylen et al., 2016), kde je většinou spojována s mnoha častými a pozdními příznaky, jako jsou erythema migrans (EM), boreliální lymfocytom and acrodermatitis chronica atrophicans (ACA), které se mohou objevit i několik let po začátku onemocnění (Strle et al., 2006, Heymann et al., 2012; Canica et al., 1993). Nicméně v kmenové sbírce v Německém národním referenčním centru jsou početné izoláty *B. afzelii* od pacientů s neuroboreliózou, která byla dříve spojována spíše s *B. garinii* (Jungnick et al., 2015). Bylo zjištěno, že pacienti s *B. garinii* izolovanou z jejich mozkomíšního moku mají odlišné klinické projevy neuroboreliózy ve srovnání s pacienty s *B. afzelii*. Klinické projevy spojené s *B. afzelii* jsou mnohem méně specifické a mnohem méně diagnostikovatelné (Strle et al., 2006).

2.3 Šíření patogenů migrací zvířat a lidí

Po většinu lidské historie byly regionální a kontinentální populace lidí vzájemně izolovány. Poměrně nedávno došlo k rozsáhlému kontaktu mezi národy, flórou a faunou ze Starého i Nového světa. Pohyb onemocnění se ukázal jako hlavní síla při utváření světových dějin, neboť války, křížové výpravy, diaspory a migrace přinášejí infekce náchylnému obyvatelstvu. Zpočátku by se nové infekční nemoci mohly šířit jen tak rychle a daleko, jak daleko by lidé mohli dojít pěšky, poté tak rychle a tak daleko, jak se lodě

mohou plavit. S příchodem skutečného globálního cestování se v posledních pěti stoletích objevilo více nových nemocí, než kdy předtím. Současný dosah, objem a rychlost cestování jsou bezprecedentní, lidská pohyblivost se v zemích s vysokými příjmy zvýšila více než 1000 krát od roku 1800 (Tatem et al., 2006). Zvláště pak v době, kdy světová ekonomika narůstala, rychle vzrostla letecká doprava, ačkoli obavy z jejího potenciálu v šíření nemoci začaly až s příchodem komerčního letectví. Efektivita, rychlost a dosah moderních dopravních sítí ohrožuje lidi rozšířením nových kmenů známých onemocnění nebo vznikem zcela nových onemocnění. Navíc globální růst ekonomické aktivity, cestovního ruchu a lidské migrace vede k stále více případům pohybu jak chorobných vektorů, tak hostitelů patogenu, které způsobují onemocnění (Tatem et al., 2006).

Během posledních desetiletí vznik nových infekčních onemocnění a rostoucí invaze nemocí do nových oblastí vytvořila novou kategorii patogenů: vznikajících a znovu objevujících se patogenů. S lidmi a zvířaty spojené znovurozšíření některých patogenů a jejich zavedení do zcela nových a neočekávaných oblastí bylo podrobně popsáno na příkladu arbovirů (Pfeffer & Dobler, 2010).

V posledních letech se objevilo několik arbovirů v nových oblastech světa, jako je například virus západonilské horečky (WNV) v Americe, virus Usutu (USUV) ve střední Evropě nebo horečka údolí Rift (RVFV) na Arabském poloostrově. Ve většině případů nejsou způsoby zavedení arbovirů do nových oblastí známy. Virus by mohl být přenesený lidmi pocházejícími z tropických zemí, nebo doprovázejícími domácími zvířaty, či hematofágními ektoparazity, kteří mohou být na zvířatech stále přichyceni.

Naprosto stejný vzorec by mohl být uznán pro jiné patogeny, zejména pro klíšťaty přenášené patogeny a spirochéty borelií. V podstatě je třeba diskutovat o dvou mechanismech přenosu, a to o přenosu nakaženými hostiteli-obratlovci anebo vektory-členovci.

Zvířata mohou být přiváděna do nových oblastí záměrně nebo při jejich aktivních migracích, která se přirozeně liší v závislosti na ročních migračních schématech jednotlivých druhů. Není pravděpodobné, že by migrační cesty některých malých savců mohly být transoceánské, nicméně velké množství myší a potkanů by mohlo „cestovat“ se zbožím v transoceánských obchodních linkách a lodích. Obchod se zvířaty by navíc mohl hrát významnou roli v celosvětovém šíření zoonotických chorob.

Doposud byl obchod se zvířaty zřídka spojován s „importem“ patogenů. Nicméně se zvířaty se obchoduje z různých důvodů po celém světě, například pro potravu, potravinářskou výrobu, pro vědecké účely, ze vzdělávacích a ochranných důvodů. Zvířata fungují jako společníci anebo domácí mazlíčci, jako v případě gambijských obřích krys, a také z turistických důvodů (Bengis et al., 2004; Marano et al., 2007; Pavlin et al., 2009). Velikost globálního pohybu zvířat je obrovská. Od roku 2000 do roku 2004 byla do Spojených států amerických legálně dovezena více než miliarda zvířat ze 163 zemí (Jenkins et al., 2007). Toto množství se rovná téměř 600 000 zvířat denně, ale „screening“ nemocí a patogenů v importovaných zvířatech je povinný pouze v omezených případech, a proto hematofagní ektoparaziti na dovezených zvířatech, kteří mohou působit jako přenašeči nebo kteří jsou již infikováni, mohou pravděpodobně zůstat bez povšimnutí. Nejvýznamnějším příkladem dovozu patogenů prostřednictvím zvířat a obchodu se zvířaty přispívající k celosvětovému šíření zoonotických chorob, by mohlo být zavedení viru opičích neštovic do Severní Ameriky v roce 2003 prostřednictvím gambijské krys obrovské z Afriky (Anonymus 2003, CDC).

Dalším důležitým aspektem je vytvoření a udržování přenosového cyklu nově zavedeného patogenu na novém místě. Je dobře známo, že k vytvoření a udržení klíšťaty přenášeného patogenu jsou nezbytné tři faktory: patogen samotný, vektor-členovec a hostitel-obratlovec. Obvykle mají tyto tři složky poměrně složitý vztah včetně různých faktorů, jako je vektorová kompetence pro daný patogen a citlivost obratlovčího hostitele pro něj.

Vezmeme-li v úvahu všechny tyto skutečnosti dohromady, šance na takový scénář, tzn. zavedení nového endemického přenosového cyklu, jsou obecně velmi nízké a zprávy o novém „vetřelci“ jsou vzácné. Nicméně nedávné rozšíření např. viru západonilské horečky (WNV) do Ameriky, viru Chikungunya do Itálie nebo viru Usutu do Rakouska, jsou příklady nedostatku našich moderních znalostí a pochopení mechanismů adaptace různých mikroorganismů, stejně tak i celkové zranitelnosti naší společnosti pro mikroby (Sutherst R., 2004).

Ve většině případů nově vznikajících zoonotických chorob zůstávají způsoby jejich šíření nejasné. Budoucí výzkum by se měl zaměřit na zkoumání okolností těchto událostí. Lepší pochopení toho, jak patogeny cestují a proč se usazují v jiných zeměpisných

oblastech, bude velkým přínosem pro lidské veřejné zdraví a veterinární medicínu, neboť může pomoci zabránit ničivým vypuknutím chorob lidí a zvířat.

Jak už bylo řečeno, nedávné výsledky založené na analýze izolátů borelií získaných z klíšťat, ptáků a hlodavců z jihovýchodu Spojených států, potvrzují přítomnost „evropských“ druhů borelie, *B. garinii* a *B. afzelii* v místních izolátech. Cílem této práce je pomocí metod molekulární biologie charakterizovat tyto izoláty a objasnit jejich přítomnost v celkem neočekávané lokalitě stejně jako potvrdit vytvoření a udržování přenosového cyklu nově zavedeného patogenu na novém místě.

2.4 Přenos borelie na hostitele

Vztah mezi hostitelem, vektorem a patogenem je velmi složitý. Borelie jsou přenášeny na hostitele klíšťaty rodu *Ixodes* (Clark, 2001). Klíšťata někdy mohou být nakažena i více než jedním druhem spirochét z komplexu *B. burgdorferi* s.l. (Rauter et al, 2005). Hlavním vektorem borelií je v Evropě *I. ricinus*, *I. persulcatus* v Asii, a *I. scapularis* a *I. pacificus* v Severní Americe (Gern & Humair 2002; Gern et al., 1993). Borelie byly detekovány i u jiných hematofágních členovců, např. komárů rodu *Culex*, *Aedes*, mouchy rodu *Tabanidae*, blechy a muchničky, ale přenos na člověka nebyl doposud stoprocentně prokázán (Kosik-Bogacka et al., 2007; Magnarelli & Anderson 1988; Netušil et al., 2013). Některé druhy borelie *Borrelie* mají své typické hostitele, vyskytují se pouze na určitých místech nebo jen v určitých vektorech. Jiné druhy jsou přizpůsobené i většímu množství hostitelů (Karami, 2012). Například *B. afzelii*, *B. japonica*, *B. bissettii* preferuje malé hlodavce, např. myšice, hraboše, potkany, krysy. *B. garinii* je převážně detekována v ptacích (např. u bažantů, kosů a ostatních druhů zpěvných ptáků). *B. burgdorferi* s.s. se vyskytuje jak u hlodavců, tak u ptáků (Hanincova et al., 2003; Janovská, 2006). Tato hostitelská specificita je dána citlivostí nebo odolností různých druhů *Borelií* ke komplementu hostitele. Díky této citlivosti se různé druhy obratlovců stávají rezervoárovými hostiteli v přírodě (Kurtenbach et al., 2002).

2.5 Migrace ptáků a hlodavců a s nimi spojená distribuce

Nedávné studie naznačují, že druhy *B. burgdorferi* s.l. jsou propagovány různým spektrem hostitelů, jako jsou ptáci, hlodavci a plazi. Ptáci jsou jedním ze způsobů přenosu různých druhů *Borelií* dobře zavedených na jednom místě, do nových lokalit a invaze nemocí do nových oblastí. Migrující ptáci mohou hrát významnou roli při globálním

rozšíření, přepravě a šíření klíšťat a klíšťaty přenášených patogenů, při jejich migraci na kontinentech nebo mezi nimi, a tudíž mohou přispívat k rozšíření infikovaných klíšťat na dlouhé vzdálenosti i přes geografické bariéry při jejich migračních cestách (Geller et al., 2013; Lommano et al., 2014). Ptáci mohou přenášet klíšťata infikovaná virem klíšťové encefalitidy (TBEV), *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp. anebo *Borrelia burgdorferi* s.l. (Geller et al., 2013; Kjelland et al., 2010). V přírodě množství klíšťat napadá více různých obratlovců a to včetně klíšťat infikovaných spirochétami, které pravděpodobně získaly patogen od stejných nebo i jiných hostitelů (Richter et al., 2000). Kvůli odlišnému původu a různým migračním cestám hostitelů je těžké určit místo původu těchto klíšťat (Kjelland et al., 2010). Klíšťata se mohou na hostitele přichytit po dobu 24 hodin nebo až 7 dní, což je dostatek času na to, aby někteří ptáci uletěli stovky nebo i tisíce kilometrů na jejich migračních cestách předtím, než klíšťata dokončí svá sání a odpadnou. Společnou strategií migrujících ptáků na jejich trasách je využití různých zastávek. Na těchto místech, kde se ptáci krmí a odpočívají, se mohou klíšťata a další ektoparaziti přichytit a později oddělit při migračních cestách nebo v chovných oblastech (Olsén et al., 1995). Rozšíření infikovaných klíšťat ptáky do nových oblastí může umožnit vznik nových endemických ložisek onemocnění, v případě kdy jsou biotické a abiotické podmínky příznivé pro udržování patogenů v klíšťatech a obratlovčích hostitelích (Lommano et al., 2014). Ale tento způsob není jediný.

Dalším ze způsobu přenosu různých druhů *Borelii* mohou být i hlodavci. Hlodavci také přenášejí celou řadu nemocí jako například mor, leptospirózu, Weilovu žloutenku, tularémii, leishmaniózu, klíšťovou encefalitidu, toxoplazmózu a nejrůznější horečnatá onemocnění. Tyto nemoci dodnes lidstvo trápí, a to i v rozvinutých zemích (www.ekolist.cz). Hlodavci požírají zásoby potravin, a co nesežerou, kontaminují svými výkaly a močí. Tím rozšiřují řadu škodlivých virů a bakterií (www.nytimes.com).

Nejneoblíbenější „přítel“ obyvatel města je potkan obecný (*Rattus norvegicus*), který způsobuje každý rok škody na celém světě. Potkan obecný a jeho menší příbuzní, jako je krysa obecná (*Rattus rattus*) a myš domácí (*Mus musculus*), jsou třemi nejúspěšnějšími invazními savci na Zemi. Přestože krysy obecné a myši domácí po tisíciletí následovaly lidskou zemědělskou expanzi, potkani obecní se po stovky let nešířili z původní Číny a Mongolska. Než se stali našimi společníky, na chladných otevřených pláních se živili divokými rostlinami a malými zvířaty a v určitém okamžiku přešli na život na farmách a na vesnicích (www.nytimes.com; www.popsci.com).

Genomová analýza jejich vzorků odhalila příběh stěhování potkanů obecných, který následoval po pěti hlavních trasách z východní Asie. První vlna, probíhající kolem roku 1500, opatrně prorazila cestu do jihovýchodní Asie. Další vlna cestovala po Hedvábné stezce přes střední Asii až do Evropy a dvě další vlny překročily Tichý oceán do západní Severní Ameriky. První skupina se dostala za pomoci ruských lodí na aljašské Aleutské ostrovy a druhá skupina se taktéž lodí přepravila přes obrovskou plochu oceánu přímo na západní pobřeží Severní Ameriky. A nakonec skupina, která se usadila v Evropě, se rozšířila s expanzí koloniálních mocností do východní a jižní Ameriky, Afriky a Austrálie. Nežádoucí hosté s sebou přinesli další nežádoucí hosty (www.popsoci.com).

2.5.1 Šíření *B. afzelii* prostřednictvím ptáků

B. afzelii je většinou přenášena klíšťaty rodu *Ixodes ricinus* v Evropě a *Ixodes persulcatus* v Asii a je známá svojí adaptací k hlodavcům jako k rezervoárovým hostitelům. U těchto hostitelů vytváří *B. afzelii* dlouhodobou systémovou infekci, která usnadňuje velkou měrou přenos z hostitele na klíště (Heylen et al., 2017; Ishiguro et al., 2000). Studie o *B. afzelii* zjistily, že rychlost přenosu hostitel-klíště je vysoká, a to po celou dobu trvání infekce (Tonetti et al., 2015).

Je známo, že ptáci jsou kompetentními rezervoárovými hostiteli konkrétních druhů borelií jako *B. garinii* a *B. valaisiana*. *B. afzelii* byla do nedávna spojována jen s hlodavci (Franke et al., 2010). Bylo považováno, že ptáci nejsou kompetentními rezervoáry pro *B. afzelii*, protože spirochéty *B. afzelii* jsou citlivé na ptačí sérum. Mnoho druhů ptáků je často vystaveno kousnutím *I. ricinus* infikovaných *B. afzelii*, avšak nedávné terénní studie o ptácích zpochybnily skutečnost, že je *B. afzelii* přísně neslučitelná s ptačími hostiteli. Například studie Sparagano a spol. 2015 dospěla, při posuzování úlohy různých druhů ptáků při přenosu a rozšiřování borelie k výsledkům, že ve více než z 27 vzorků pozitivních na přítomnost *Borelie* byla identifikována *B. afzelii*. Skutečnost, že 11 klíšťat (6 larev a 5 nymf) bylo infikováno *B. afzelii*, což naznačuje, že ptáci mohou sloužit jako rezervoároví hostitelé pro tento druh borelie (Sparagano et al., 2015).

B. afzelii byla detekována ve 3 nymfách *I. ricinus* ze dvou sýkor koňader (*Parus major*) (Geller et al., 2013). Jedna z pozitivních nymf byla infikovaná dvěma kmeny *B. afzelii*. Jeden z těchto kmenů byl také detekován v jiné nymfě, která se krmila na stejné sýkoře. Sdílením stejného kmene *B. afzelii* dvěma nymfami naznačuje možný přenos *B. afzelii* společným krmením („co-feeding“) na ptačím hostiteli. V této studii byla zjištěna *B.*

afzelii u nymf z ptáků, a tak lze předpokládat, že byla získána larvami klíšťat během jejich přechozího krmení na hlodavcích. Je však zajímavé, že podle analýzy 5S – 23S IGS sekvencí těchto vzorků *B. afzelii*, dvě nymfy, odstraněné ze stejné sýkory koňadry, měly odlišnou kombinaci kmenů *B. afzelii*. Jedna nymfa měla pouze *B. afzelii* kmen PGau, zatímco u druhé nymfy byla detekována směs *B. afzelii* kmenů PGau a Tom 1503. Toto zjištění může naznačovat přenos *B. afzelii* kmene PGau z jedné nymfy na další při společném krmení. Nicméně, je taky teoreticky možné, i když s velmi malou pravděpodobností, že jedna nymfa získala směs dvou kmenů *B. afzelii* v larválním stádiu od hlodavce, a poté se začala krmit na stejném ptačím hostiteli s další infikovanou nymfou *B. afzelii* kmenem PGau (Geller et al., 2013).

Ve studii Kjelland a spol. 2010, která se zabývala analýzou přítomnosti borelií v klíšťatech z migrujících ptáků v Norsku, dospěli k závěru, že ptáci, obzvláště krmící se na zemi, jsou více ohroženi napadením klíšťat a jsou považováni za důležitý faktor v globálním šíření klíšťat a patogenů přenášených klíšťaty. V této práci bylo prokázáno, že migrující ptáci přenášejí velké množství klíšťat do Norska. Kromě přenosu infikovaných klíšťat mohou některé druhy ptáků přenášet *B. burgdorferi* s.l. jako aktivní infekci v sobě. Ačkoli podobné studie byly provedeny v jiných severských zemích, toto byl první popis prevalence a genotypů *B. burgdorferi* s.l. u klíšťat *I. ricinus* krmených na ptácích během jarní a podzimní migrace v Norsku. V této studii byla také zjištěna *B. afzelii* (8,3%), která byla detekována v klíšťatech ze střízlíka obecného (*Troglodytes troglodytes*) (1 larva), červanky obecné (*Erithacus rebecca*) (1 nymfa) a z pěvušky modré (*Prunella modularis*) (1 nymfa) (Kjelland et al., 2010).

Později studie Lammano a spol. 2014 potvrdila přítomnost *B. afzelii* v klíšťatech krmících se na migrujících ptácích, a to v lindušce lesní (*Anthus trivialis*) (4 nymfy), pěnkavě obecné (*Fringilla coelebs*) (1 larva a 2 nymfy), pěnici hnědokřídle (*Sylvia communis*) (1 nymfa), drozdu cvrčalovi (*Turdus iliacus*) (2 nymfy), kosu černém (*Turdus merula*) (4 nymfy), drozdu zpěvném (*Turdus philomelos*) (2 nymfy) a drozdu brávníkovi (*Turdus viscivorus*) (1 nymfa). Druhy ptáků patřící do rodu drozdovitých byly nejčastěji napadeny klíšťaty a také nejčastěji přenášely infikovaná klíšťata (Lommano et al., 2014).

V roce 2017 Heylen a spol., publikoval přehled, ve kterém byli analyzováni ptáci jako rezervoároví hostitelé pro různé druhy borelií. V tomto přehledu ve 13 z 19 analyzovaných studií byla *B. afzelii* detekována v klíšťatech *I. ricinus* krmených na

zpěvných ptácích. Až sedm druhů zpěvných ptáků by mohlo podle Heylen hrát roli při přenosu *B. afzelii* na klíšťata *I. ricinus* a to červenka obecná, pěnkava obecná, konipas horský (*Motacilla cinerea*), sýkora koňadra, střízlík obecný, drozd cvrčala a kos černý. Hostitelé, u nichž se nejčastěji vyskytovaly larvy infikované *B. afzelii*, byly červenka obecná a sýkora koňadra. Při zkoumání ptáků, kteří nosili nymfy klíšťat infikovaných *B. afzelii*, bylo nalezeno 20 různých druhů ptáků, z nichž nejčastěji byli hlášeni kos černý, drozd zpěvný, pěvuška modrá, červenka obecná a sýkora koňadra (Heylen et al., 2017).

Ještě důležitější je fakt, že z většího množství druhů ptáků byly získané larvy infikované *B. afzelii*. Vzhledem k tomu, že vertikální přenos patogenů LB v klíšťatech *I. ricinus* není možný, tato pozorování naznačují, že larvy klíšťat získaly *B. afzelii* z ptačích hostitelů, kteří buď byli nakaženi, nebo larvy byly infikované „co – feeding“.

Takzvaný „co-feeding“ je jednou ze strategií, pomocí níž by mohla *B. afzelii* infikovat larvální stádia klíšťat, která se krmí na ptačích hostitelích. Tento přenos nastává, když se infikovaná a neinfikovaná klíšťata krmí v blízkosti na stejném hostiteli. Řada studií dokumentuje „co-feeding“ přenos *B. afzelii* na kompetentních hostitelských rezervoárech jako jsou hlodavci. Tento způsob přenosu se může vyskytnout v nepřítomnosti systémové infekce, a tím pádem vyvolal hypotézu, že „co-feeding“ přenos by mohl umožnit *BoRrelia* se vyhnout imunitnímu systému jinak nekompetentních hostitelů (Heylen et al., 2017). Dubska a spol. 2009, například ve své studii dospěla k závěru, že úroveň infekce *B. afzelii* byla přibližně stejná u klíšťat krmících se na sýkorách koňadrách, pěvuškách modrých, drozdech zpěvných a na kosích černých. Ačkoli nebyla *B. afzelii* nalezená u společně se krmících nymf na stejném hostiteli, byla zjištěna *B. afzelii* v jedné larvě ze sýkory koňadry a v jedné larvě z konipase horského (Dubska et al., 2009). Taktéž studie Hasle a spol. 2011, jejímž cílem bylo vyhodnotit prevalenci *BoRrelia* spp. u klíšťat přenášených ptáky pomocí PCR, zjistila přítomnost DNA *BorRelia* spp. v 70 (13,6%) z 513 vyšetřených nymf *I. ricinus*, z nich 19 bylo potvrzeno jako *B. afzelii*. Toto zjištění je v souladu s tím, že *B. afzelii* byla nalezena pouze v nymfách, které mohly získat *B. afzelii* od předchozího hostitele. Nicméně přítomnost *B. afzelii* v 11 z 56 vyšetřovaných larev *I. ricinus* shromážděných z červenek a drozdů může znamenat, že buď ptáci mohou být infikováni *B. afzelii*, anebo přítomnost *B. afzelii* v larvách mohou také vysvětlit „co-feeding“ nymf infikovaných *B. afzelii* na stejném hostiteli (Hasle et al., 2011).

Dřívější prohlášení o nekompatibilitě druhů *B. afzelii* a ptáků, by mohlo být případně vysvětleno odlišnou kompetentní citlivostí pro *B. afzelii* u různých druhů ptáků, která byla již dříve pozorována. Už předtím bylo prokázáno, že např. domácí kuřata jsou pouze dočasně kompetentní pro *B. afzelii*, zatímco evropští kosi černí a kanáři divocí (*Serinus canaries*) se vůbec neinfikují. Důkazy o nespecificitě u ptačích hostitelů poskytují pozorování ve Skandinávii, kde spirochéty tří druhů infikují larvy klíšťat, které se živily na různých ptačích (Richter et al., 1999).

Detekce *B. afzelii* z nymf a dokonce larev krměných na ptačích naznačuje, že mohou ptáci sloužit jako rezervoároví hostitelé pro tento druh borelie. Na základě výše popsaných analýz je zřejmé, že ptáci hrají důležitou roli při přenosu spirochét LB, včetně *B. afzelii*. Různé druhy ptáků by mohly být přenašeči a zároveň kompetentními rezervoáry pro *B. afzelii* díky jejich vysoké míře napadení klíšťaty. Navíc během migračních období mohou přenášet ptáci miliony klíšťat infikovaných boreliemi, přemísťovat je na stovky kilometrů, a tak vytvářet nová endemická ložiska LB po celém světě. V Evropě se *B. afzelii* vyskytuje v klíšťatech krmících se na ptačích ještě mnohem častěji než *B. burgdorferi*, zatímco v Severní Americe jsou ptáci hostitelé pro *B. burgdorferi*.

2.5.2 Šíření *B. garinii* prostřednictvím hlodavců

Stejně jako jiné druhy spirochet i *B. garinii* spoléhají na hematofágní členovce pro přenos a jsou asociované většinou s ptáky jako hostiteli (Rahn D. & Evans J., 1998). *B. garinii* je v Evropě a západním Rusku přenášena klíšťaty *I. ricinus*, kteří se krmí na ptačích a hlodavcích. V Rusku, Číně a Japonsku *B. garinii* přenáší *I. persulcatus*, které se krmí na stejných hostitelých. *B. garinii* nebyla izolována pouze z ptáků žijících výhradně na kontinentu, ale také z ptáků mořských. V Evropě, východním Rusku, v západní a východní části Severní Ameriky, severním Pacifickém oceánu, Arktidě a v sub-arktických ostrovech je *B. garinii* přenášena klíšťaty *I. uriae* pomocí mořských ptáků (Smith et al., 2006; Comstedt et al., 2008). Klíšťata *I. uriae* udržují toto agens ve „skrytém“ enzootickém cyklu u mořských ptáků na jejich místech hnízdění v širokém, ale také diskontinuálním prostoru. Ačkoliv tyto dva enzootické cykly, pozemní a mořský, jsou obecně geograficky a ekologicky odděleny, výměna kmenů *B. garinii* může nastat v místech, kde se oba cykly překrývají (Smith et al., 2006).

V roce 2014 Margos a spol. popsali nový druh borelie v rámci *B. garinii* a pojmenovali ho *B. bavariensis* (Margos et al., 2014). *B. garinii* byla jedním z prvních

druhů rodu *Borrelia*, která měla být definována DNA-DNA hybridizací (Baranton et al., 1992). Pomocí této typizační metody byl kmen PBi, původně izolovaný z pacienta s neuroborreliózou v roce 1984, zařazen do druhu *B. garinii*. Bylo však poznamenáno, že kmen PBi a blízké příbuzné kmeny mají v rámci *B. garinii* odlišný typ vnějšího povrchového proteinu A (*ospA*) a to typ 4. RFLP analýza ukázala, že kmeny *ospA* typu 4 jsou geneticky vysoce homogenní. Navíc kmeny *ospA* typu 4 tvoří v rámci *B. garinii* zřetelný ekotyp (nový druh – *B. bavariensis*) a využívají hlodavce jako rezervoárové hostitele, zatímco jiné typy *B. garinii* jsou známé jako druhy přenášené ptáky. Další studie ukázala, že *B. bavariensis* je široce rozšířená ve všech částech Evropy a Asie a vyskytuje se i v Kanadě (Munro et al., 2017). Nicméně se objevují fakta také potvrzující přenos kmenů patřících k druhu *B. garinii* ne ptačími hostiteli ale hlodavci, zejména v Asii.

B. garinii kmen NT29, například, a také příbuzné kmeny vyskytující se v Asii jsou asociovány pouze s hlodavci, ale jejich vztah k *B. bavariensis* z Evropy zůstal nejasný, protože evropské a asijské *B. garinii* se nejen lišily v *ospA* typu, ale také vykazovaly rozdíly v RFLP 5S-23S mezigenových úseků (Miyamoto & Masuzawa, 2002).

V Japonsku byl první případ LB zaznamenán Kawabata a spol., v roce 1987. Poté byly spirochéty izolovány z pacientů a také dvou druhů klíšťat a to *I. persulcatus* a *I. ovatus* v severní části Japonska. *I. persulcatus* je považováno za nejdůležitější vector LB v Japonsku (Fukunaga et al., 1993). *I. persulcatus* je také rozšířen v Rusku na Dálném východě a v Asii, napadá jak hlodavce, tak i ptáky a byl uznán jako vektor několika lidských patogenů včetně původce LB (Murase et al., 2013; Takano et al., 2011).

Ve studii Ishiguro a spol. (2000) bylo pomocí analýzy 5S-23S mezigenového úseku zkontrolováno 30 izolátů *B. garinii* z Koreje, Mongolska a Číny a jejich porovnáním s dalšími izoláty z Evropy a Asie stanoveno schéma rozšíření *B. garinii* na Dálném Východě. Obdržené výsledky naznačují, že existuje postupná cesta zavádění druhu *B. garinii* způsobujícího LB ze severovýchodní Číny přes Koreu do Japonska pomocí šíření klíšťat, které se živí na migrujících ptácích především, rodu drozdovitých. Migrace ptáků je možná jedním vysvětlením toho, proč *B. garinii* je nejheterogennější ze všech dosud studovaných druhů borelií způsobujících LB (Comstedt et al., 2011).

Ve studii Takano a spol. 2011 bylo za pomoci metody MLST analyzováno větší množství izolátů *B. garinii* v Japonsku. Devatenáct kmenů spirochet pocházelo od pacientů s LB. MLST 40 izolátů pocházelo z klíšťat, přičemž z klíšťat *I. persulcatus* bylo izolováno

18 kmenů, které byly sebrány z Japonska (15 kmenů) a z Ruska (3 kmeny). Dvacet dva kmenů bylo izolováno z hlodavců, z nichž bylo 10 z norníka šedivého (*Myodes rufocanus*) a 8 z myšice (*Apodemus speciosus*), (Japonsko) a 4 byly z myšice malooké (*Apodemus uralensis*) (Čína).

MLST analýzou byly analyzované kmeny *B. garinii* rozděleny do dvou fylogenetických skupin. Jedna skupina *B. garinii* ST skupina B, převládala mezi izoláty jak klinickými tak i od hlodavců v Japonsku. Tyto výsledky naznačují, že hlodavci jsou kompetentními rezervoáry pro většinu patogenních izolátů *B. garinii* pro lidi v Japonsku. Bylo také zjištěno, že japonské klinické izoláty mohou být odlišné od většiny evropských izolátů. To může být způsobeno různými vektory *B. garinii* v Asii a Rusku proti Evropě. Lze tedy předpokládat, že patogenní bakterie *B. garinii* pro lidi v Japonsku je udržována hlodavci na rozdíl od evropských kmenů *B. garinii*, které jsou spojené s ptáky (Takano et al., 2011). Japonský typ *B. garinii* může být rozdělen do dvou podtypů: euroasijský typ (20047) nacházející se v Evropě a Asii a asijský typ (varianta NT29 typu) nacházející se jen v Asii.

Izoláty *B. garinii* z *I. persulcatus* původem z východních oblastí Ruska, vnitřního Mongolska severovýchodní a západní Číny, severní části Jižní Koreje byly identifikované jako euroasijský typ *B. garinii* (typ 20047), a asijský typ (varianta NT29). Izoláty získaných od druhů hlodavců, jako jsou myšice – korejská zemní myš (*Apodemus peninsulae*) zachycené v Khabarovsku (Rusko) a v oblastech vnitřního Mongolska, nebo myšice temnopásá (*Apodemus agrarius*) a bělozubka velká (*Crocidura lasiura*) ze severní části Jižní Koreje, byly identifikovány jen jako asijský typ *B. garinii* nebo *B. afzelii*. asijský typ *B. garinii* a *B. afzelii* jsou přirozeně udržovány mezi *I. persulcatus* a divokými savci.

Turecko představuje most mezi evropskými zeměmi a Asií. K objasnění distribuce a šíření klíšťat a borelií mezi Evropou a Asií byl provedený průzkum na pobřeží Černého moře na evropské straně Turecka. Dvanáct z 299 klíšťat *I. ricinus* bylo infikováno spirochétami borelií. Deset čistých kultur bylo podrobena charakterizaci pomocí sekvenačních analýz jejich 5S-23S mezigenových úseků, *rrs* a *flaB* genu. Byly identifikovány druhy: *B. burgdorferii* s.s., *B. garinii* euroasijského typu, *B. afzelii*, *B. lusitaniae* a *B. valaisiana*. Nicméně nebyl nalezen žádný asijský typ *B. garinii*. Také asijský typ *B. garinii* nebyl nalezen mezi evropskými izoláty *I. ricinus* (Masuzawa, 2004).

2.6 Shrnutí

V dnešní době dochází k rozsáhlému kontaktu mezi národy, faunou a flórou z nového a starého světa. S příchodem cestování mezi kontinenty díky moderní letecké a lodní dopravě dochází při těchto cestách k rozšiřování některých patogenů a jejich osídlení úplně nových a zcela neočekávaných oblastí. Na přemístění a rozšiřování patogenů do těchto oblastí se také podílí klimatické změny. Pohyb zvířat do nových oblastí může být záměrný, způsobený člověkem, nebo je součástí jejich migrace. Například je známo, že velmi důležitou roli v rozšiřování *B. burgdorferi* s.l., hraje ptactvo a to díky své migraci do různých lokalit, překonáváním velkých vzdáleností a různých bariér. Ptactvo se zásadně podílí na rozšiřování infikovaných klíšťat, a to i těch, která mohou být nakažena i více než jedním druhem spirochét z komplexu *B. burgdorferi* s.l. Nejen ptáci, ale také hlodavci hrají důležitou roli při přenosu a rozšiřování LB po celém světě. Na rozdíl od ptáků u kterých migrace představuje přírodní jev, migrace hlodavců je většinou způsobena člověkem. To vše vede k rozšíření patogenů do nových lokalit. Na základě nových dat je třeba přehodnotit nynější stereotyp o striktním geografickém rozšíření některých druhů, především *B. afzelii* a *B. garinii*, a stejně tak i jejich asociaci jen s určitými druhy hostitelů.

3. Cíl práce

1. Literární studie k problematice.
2. Analýza infekčního potenciálu amerického klonu *B. garinii* na laboratorních modelech zvířat (myši).
 - a. Infikování myši a jistění přítomnosti protilátek na borelie v myších (Western Blot).
 - b. Detekce DNK *B. garinii* v hostitelských tkáních pomocí PCR.
 - c. Kultivace spirochét z orgánů infikovaných myši.
3. Interpretace výsledků s důrazem na objasnění infekčního potenciálu amerického izolátu *B. garinii* původem z hlodavců a jeho vliv na veřejné zdraví.
4. Získání monoklonálních kultur *B. afzelii* a tím prokázání přítomnosti dalšího evropského druhu borelie na území Spojených Států.
5. Charakterizace amerického izolátu *B. afzelii* s cílem porovnání s evropskými izoláty tohoto druhu borelie a zjištění jeho původu.
6. Charakterizace amerického izolátu *B. afzelii* s cílem porovnání s evropskými izoláty tohoto druhu borelie a zjištění jeho původu.

4. MATERIÁLY A METODY

4.1 MATERIÁLY

V tabulce 1 a 2 je sepsán seznam použitých chemikálií, kitů a přístrojů v různých metodách.

Tab. 1: Seznam použitých chemikálií a kitů

Kultivace	
BSK – II médium, MKP médium	kompletní BSK – II (MKP) medium + 6% králičí sérum
Persteril - roztok kyseliny peroxyoctové, peroxidu vodíku a kyseliny octové (Acidum peraceticum)	0,5 % roztok
Izolace DNA	
Kit na izolace genomové DNA	DNeasy® Blood & Tissue Kit (250), (Qiagen)
Kit na purifikace PCR produktů (kolony)	Centrifugal Filter Units DNA extraction form agarose (Millipore)
PCR	
PCR 2x Master Mix	Taq DNA polymeráza [doplněno reakčním pufrém (pH 8.5)] 400μM dATP, 400μM dGTP, 400μM dCTP, 400μM dTTP, 3mM MgCl ₂ (Promega)
DNA Elektroforéza	
50x TAE pufr	200mM Tris-HCl, 50mM EDTA
Agaróza	0,8 – 2 % agaróza (Serva) pro DNA ELFO v 1xTAE pufru
6x vzorkový pufr	Blue/Orange 6x loading dye, (0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 0.4% orange G, 15% Ficoll™ 400, 10mM Tris-HCl (pH 7.5) a 50mM EDTA (pH 8.0) (MBI Fermentas)
PCR Marker	Gene Ruller 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)

Western Blot	
Lyzační protein	Kultura borelií minimálně 10 ⁹ /ml, HN- Buffer, B-PER-Bacterial protein, 2x Laemmli sample buffer, 1β – mE Capto
12% SDS gel	30% AA, Separation (1,5 M Tris-HCl, 10% APS)/Stacking buffer (2 M Tris-HCl, 10% SDS), dH ₂ O, 10% APS, TEMED
1x Running buffer	10×Running buffer + dH ₂ O
5× SDS Loading Buffer	2M Tris-HCl (pH 6,8), SDS, glycerol, β-merkptoethanol, 0,5% bromfenolová modř, dH ₂ O
1x Blotovací pufr	10× Blotovací pufr (Tris base, glycin, dH ₂ O) + Met-OH + dH ₂ O
Blotovací roztok	5% mléko v TBS pH 7,4
1x TBS	10x TBS (NaCl, Tris Base, Tween 20, dH ₂ O) + dH ₂ O
Vyvolávací roztok	1 ml Detection Reagent A a 1 ml Decetion Reagent B

Tab. 2: Seznam použitých zařízení

Zařízení	Typ
Centrifugy	Centrifuga 5415 C (Eppendorf)
	Centrifuga 5415D (Eppendorf)
	Centrifuga 1415 R (Eppendorf)
	Centrifuga Universal 32 R (Hettlich zentrifugen)
Elektroforéza	SHU6 (Sigma Aldrich)
	OVL Easycast TM B2 (Thermo scientific)
Mikroskop s temným polem	Leica DM 1000 LED (Leica)
PCR cycler	Mastercycler <i>personal</i> (Eppendorf)
Zahříváč	Thermomixer (Eppendorf)
Petroff - Hauserova počítací komůrka	hloubka: 0,02 mm, Hauser Scientific, PA, USA
Fotosystém na focení gelů	Kodak
Flow box	Gelaire
Box pro pěstování borelie na pevné půdě	BD GasPak TM EZ
PCR box	DNA/RNA UV cleaner UVC/T-M-AR (Biosan)
Vortex	Heidolph REAX top
Blotovací aparát	Trans-Blot [®] SD Semi-Dry Transfer Cell

4.2 METODY

4.2.1 Příprava tekutého média BSK – II

Příprava byla prováděna podle protokolu Dr. P. Rosa (USA). Seznam použitých složek pro výrobu 1 litru média je zobrazen v tabulce 3. První tři sloučeniny ze seznamu byly v patřičném množství ponechány za stálého míchání v 800 ml vody na magnetickém míchadle, dokud se tyto sloučeniny nerozpustily. Poté byly přidány ostatní složky uvedené v tabulce 11 a následně byl celý roztok připraven při stálém míchání. Želatina byla rozpuštěna v horké vodě a přidána k ostatním složkám. Po rozpuštění všech složek bylo pH dovedeno do 7.6 pomocí NaOH. Po dovedení objemu do 1l a zahřátí na 55°C byl roztok přefiltrován přes 0,22 µm filtr. Filtrace probíhala ve sterilním boxu. Přefiltrovaný roztok byl poté při sterilních podmínkách rozdělen do zkumavek po 50 ml a do každé zkumavky byly přidány 3 ml králičího séra. Médium bylo uloženo do mrazáku na – 20°C.

Tab. 3: Složky pro výrobu BSK – II.

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

Králičí sérum – 60ml na 1 litr média

4.2.2 Příprava MKP média pro kultivaci borelie z tkání

MKP médium bylo připraveno podle protokolu Prof. E. Ruzic – Sabljic (University of Ljubljana, Institute of Microbiology and Immunology, Slovinsko). Základní médium bylo připraveno následujícím způsobem: látky (Tab. 5) ve formě prášku, byly rozpuštěny v 750 ml destilované vodě, následně bylo přimícháno 100 ml 10x CMRL. pH roztoku bylo upraveno na 7.6 pomocí NaOH a médium bylo doplněno destilovanou vodou pro konečný objem 1 litr. Želatina, králičí sérum a BSA (Tab. 6) byly zahřáty na 33 °C a po zahřátí byly

přidány k základnímu médiu. Médium bylo filtrováno přes 2,2 µm filtr. Takto připravené médium se nezmrazuje, uschovává se v ledničce maximálně po dobu jednoho měsíce.

Tab. 5: Složení základního MKP média

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

Tab. 6: Složení kompletního MKP média

Látka	Množství g/l
Základní médium MPK	1l
Želatina 7%	200ml
Králičí sérum	72ml
BSA	35ml

4.2.3 Kultivace spirochét v tekutém médiu

Kultivace spirochét probíhala v kompletním BSK – II médiu nebo v kompletním MPK médiu. Ve sterilních podmínkách pomocí očkovací kličky byly jednotlivé kultury ze zmražených zásobních kultur nasazeny do 10 ml BSK – II nebo MPK média. Kultivace borelií probíhala *in vitro* při 34°C. V pravidelných intervalech byl růst kultury pozorován pod mikroskopem temného pole. Pouze nekontaminované a dobře narostlé kultury (do požadované hustoty spirochét 10^7 buněk/ml), byly použity pro další experimenty.

4.2.4 Mikroskopie temného pole, počítání hustoty kultur borelie

Během kultivace borelií v tekutém médiu byly kultury kontrolovány pod mikroskopem temného pole z důvodu kontroly životnosti, nárůstu a čistoty (kontaminace) kultury. Koncentrace spirochét (hustota kultury) byla určena pomocí Petroff – Hausserovy komůrky. Množství vzorku (10 µm) bylo přeneseno pipetou do komůrky. Pro stanovení koncentrace byl spočítán průměrný počet bakterií v úhlopříčce pěti větších čtverců Petroff-Hausserovy komůrky. Koncentrace buněk v 1 ml kultury byla pak spočítána pomocí vzorku $A \times 1,25 \times 10^6$, kde A je průměrný počet bakterií ve větším čtverci počítací komůrky.

4.2.5 Příprava tekutého média 1,5 x BSK⁺ (pro pevnou půdu)

Tekuté médium pro pevnou půdu bylo připraveno podle protokolu Dr. P. Rosa (USA). Do 400 ml milliQ vody bylo přidáno 34,7 g BSA. Tato směs byla následně jemně míchána na magnetickém míchadle do té doby, dokud se zcela nerozpustila. Poté byly

přidány zbývající složky uvedené v tabulce 7. NaOH bylo použito k dovedení pH do 7.5. Celý objem byl doplněn MilliQ vodou do 500 ml. Médium bylo přefiltrováno přes 0,22 µm sterilní membránu a bylo do něj přidáno 20 ml sterilního králíčího séra. Médium bylo rozděleno při sterilních podmínkách do potřebných objemů a uskladněno při - 20°C.

Tab. 7: Složení tekutého média 1,5 x BSK⁺

Složky	Množství na 500 ml [g]
BSA (Millipore Probumin 81-033)	34,7
Neopeptone (BD 211681)	3,45
Hepes acid (Calbiochem 391338)	4,15
Glucose (Sigma C – 7021)	3,45
Sodium citrate (Sigma C – 7254)	0,5
Sodium pyruvat (Sigma P – 5280)	0,55
N – acetyl glukosamine (Sigma A – 3286)	0,3
Sodium bicarbonate (Sigma S- 3817)	3,2
Yeastolate (BD 255772)	1,75
10 x CMRL powder (US Biological C5900 – 5)	6,35

4.2.6 Kultivace spirochét na pevné půdě

B. burgdorferi s.l. je většinou pěstována v tekutém médiu, ale jsou známé metody podporující růst kolonií na pevné půdě. V našich experimentech pro kultivaci na pevné půdě byly použity takto naředěné kultury: 1000 borelií/ml, 500 borelií/ml, 200 borelií/ml a 100 borelií/ ml.

4. 2. 6. 1. Kultivace spirochét na pevné půdě v bodech

1. 150 ml BSK⁺ rozehřátého ve vodní lázni při 55°C bylo smícháno se 100 ml horké 1,7% agarózy rozpuštěné ve vodě.
2. Získaný roztok byl rozdělen do Petriho misek po 10 ml a byl ponechán ztuhnout, zbytek média s agarózou byl udržován ve vodní lázni při 55°C.
3. 40 ml média smíchané s agarózou bylo odpipetováno do 45 ml zkumavek a následně do nich byla přidána kultura borelií (1 ml), naředěná podle požadovaného počtu.
4. Na Petriho misky, které byly připraveny v bodě 2, bylo přidáno 20 ml připraveného média s naředěnou kulturou podle požadovaného počtu spirochét a ponecháno 5 - 10 minut ztuhnout.

5. Tímto způsobem zhotovené Petriho misky byly uloženy do boxu (BD GasPakTM EZ) s 2,5% obsahem CO₂ a nechané při teplotě 34°C růst po dobu několika týdnů.
6. Po 4 týdnech byly jednotlivé narostlé kolonie pipetou přendány do 2 ml tekutého BSK – II média. Kultury byly dány růst do termoboxu při teplotě 34°C. Růst spirochét byl průběžně kontrolován pod mikroskopem temného pole.
7. Z narostlé kultury se po 1 – 2 týdnech odebral 1 ml do kriozkumavky a byl uschován na - 80°C.
8. Zbýlý 1 ml se doplnil BSK – II médiem a nechal se růst při teplotě 34°C pro další experimenty.

4.2.7 Infikování laboratorního modelu savce (myši)

K inokulování laboratorních myši byla použita čistá, nekontaminovaná dobře narostlá kultura (*Borrelia garinii* vzorek SCCH – 7 (138)). Tato kultura byla naředěna na požadovanou koncentraci 1×10^5 spirochét v 100 μ l média.

K inokulaci byly použity naivní C3H laboratorní myši z chovu Parazitologického ústavu. Myši byly infikovány stejným množstvím borelie ($10^5/100 \mu$ l) podkožně mezi lopatky injekční jehlou. K inokulaci bylo celkem použito 6 myši (4 myši *Borrelia garinii*, 1 myš čistým BSK – II médiem bez borelií, která sloužila jako negativní kontrola, 1 myš *Borrelia burgdorferi* s.s., která sloužila jako pozitivní kontrola).

4.2.8 Odběr tkání

Týden po infikování myši spirochétami proběhl první odběr kousku myšního ucha. Kousek tkáně z ucha se odebíral ještě dvakrát ve druhém a šestém týdnu pro následnou analýzu pomocí PCR na přítomnost DNK borelie.

4.2.9 Nasazování neinfikovaných larev a infikovaných nymf na myši

Všem myším byla na hřbetu holicím strojkem oholena srst, na oholené místo byl následně připevněn klobouček za pomoci lepidla a náplast'ové lepící pásky. Do každého kloboučku byl pinzetou vložen určitý počet neinfikovaných larev klíšťat *I. ricinus*, které byly ponechány se nasát. V případě *B. garinii* stejným způsobem na neinfikované myši byly nasazené artifiálně infikované nymfy klíšťat.

4.2.10 Částečné nasátí nymf klíšťat na membráně (umělé sání klíšťat na membráně)

Pro tuto metodu bylo odebráno dvakrát po 24 ml lidské krve. Krev byla při pokojové teplotě přendána do sterilních 50 ml zkumavek s kuličkami, které napomáhaly vytvořit krevní sraženinu. Tři ml defibrinové krve bylo dále použito pro následné umělé sání 3 samic klíšťat na membráně. Samice se nechaly sát přes noc, druhý den ráno k nim byly přidány nymfy (Obr. 2). Po krátkém sání nymf na membráně, bylo do defibrinované krve přidáno 50 μ l koncentrované kultury spirochet borelií (10^{12} / ml). Po 12 hodinách byla defibrinovaná krev se spirochétami vyměněna za novou. Výměna krve se opakovala 3 krát. Pak byly částečně nasáté nymfy přendány na nastrojené myši s kloboučkem a ponechány sát na neinfikovaných – naivních myších. Po nasátí a odpadnutí byly nymfy nechány pro vylíhnutí do dalšího stádia – dospělce, a samotné myši byly ponechány ve zvěřinci Parazitologického ústavu AV ČR po dobu šesti týdnů pro vyvíjení případné infekce. Po uplynutí šesti týdnů byly myši usmrceny s následným provedením pitvy. Při pitvě byla každé myši odebrána krev a tkáň – ucho, srdce, močový měchýř, slezina a kloub.



Obr. 2: Membránové sání nymf a samic klíštěte *I. ricinus*.

4.2.11 Extrakce nukleových kyselin z borelií, z klíšťat a tkání modelového zvířete

Borelie byly odděleny centrifugací od média při maximálních otáčkách po dobu 10 minut při 4°C. Supernatant byl následně opatrně odpipetován a dekontaminován. Buňky byly ihned zpracovány nebo uschovány v mrazáku při – 20°C. Genomová DNK (gDNK) u všech vzorků byla získána pomocí kitu DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen). Při izolaci se postupovalo striktně podle protokolu výrobce (Qiagen).

Tkáně z myši byly rozděleny podle jednotlivých orgánů do mikrozkušavek. Vzorky byly rozřezány za sterilních podmínek ve flow boxu na malé kousíčky pomocí sterilních skalpelů. Dále se postupovalo podle protokolu od výrobce kitu (Qiagen).

Klíšťata byla řádně rozdělena podle vývojových stádií - larva, nymfa a označena v mikrozkušavkách (typ Eppendorf). Vzorky klíšťat byly uchovány v lednici při + 4°C do zpracování. Homogenizace vzorků a následná izolace gDNK byla provedena stejným způsobem jako u vzorků tkání z myši. Po izolaci gDNK všech vzorků proběhlo pro kontrolu měření koncentrace. Všechna vyizolovaná DNK byla uchována v lednici při + 4°C.

4.2.12 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Přítomnost DNK borelií ve vzorcích byla kontrolována pomocí PCR, kde vyizolovaná celková gDNK byla použita jako templát. DNK myši/klíšťat byla z počátku kontrolována pomocí primerů na aktin a následně na přítomnost DNK borelií pomocí primerů pro *flagellin* nebo *ospC*. Celá příprava vzorků pro PCR probíhala v boxu na ledu, kromě přidání DNK, to bylo vždy přidáno mimo box na ledu na pracovním stole. Celkový objem každé reakční směsi byl 20 μ l. Amplifikace probíhala v přístroji Master cycler personal (Eppendorf).

V tabulce 8 je sepsáno složení reakční směsi na 20 μ l PCR reakce.

Tab. 8: Přehled složení reakce pro PCR.

10x Pufř	2 μ l	} 2x Master mix (Promega)
25 mM MgCl ₂	2 μ l	
Taq DNA polymeráza(250U/ml)	0,5 μ l	
10 mM dNTPs	1 μ l	
1 mM Primer reverse	1 μ l	
1 mM Primer forward	1 μ l	
DNA (templát)	1-5 μ g	
H ₂ O	Závisí na objemu templátu	

U každé reakce byla provedena pozitivní a negativní kontrola. Pro negativní kontrolu byla použita deionizovaná voda. Jako pozitivní kontrola byla použita ověřená DNK z borelie (*B. burgdorferi* s.s.). Vzorky byly dostatečně promíchány. Amplifikační reakce probíhala v přístroji Master cycler personal (Eppendorf).

Tabulka 9 obsahuje sekvence použitých primerů pro reakci PCR.

Tab. 9: Přehled použitých primerů.

Název Primer	Teplota nasedání (C°)	Velikost PCR produktu (bp)	Sekvence F/R (5' → 3')	Citace
Flagellin out	52	497	AARGAATTGGC AGTTCAATC	Clark et al., 2005
			GCATTTTCWATTTTAGCAAGTGATG	
Flagellin inn	55	389	ACATATTCAGA TGCAGACAGA GGTTCTA	Clark et al., 2005
			GAAGGTGCTGTA GCAGGTGCTGGC TGT	
OspC out	52	635	ATGAAAAAGAATACATTAAGTGC	Bunikis et al., 2004
			ATTAATCTTATAATATTGATTTTAATTAAG G	
OspC inn	55	589	TATTAATGACTTTATTTTATTTATATCT	Bunikis et al., 2004
			TTGATTTTAATTAAGGTTTTTTTGG	
Tick actin	60	120	CGACATCAAGGAGAAGCTCTG	Tato práce
Tick actin	60	120	GTCGGGAAGCTCGTAGGAC	Tato práce
Mouse beta – actin	60	218	CTGTCCCTGTATGCCTCTG	Spandidos et al., 2010
Mouse beta – actin	60	218	ATGTCACGCACGATTTC	Spandidos et al., 2010

4.2.13 Průkaz přítomnosti DNK borelií v klíšťatech a v myších tkáních (nested PCR)

Pro zvýšení citlivosti PCR a zároveň pro snižování inhibice reakce cizorodou DNK (DNK myši/klíštěte) byla použita tzv. nested PCR (Tab. 10), kde pro druhý krok bylo jako templát použito 5 µl z předchozí reakce. Tato metoda byla použita s primery pro *flagellin*.

V prvním kroku byla využita sada primerů *flagellin out* R/F, v druhém *flagellin inn* R/F.

Tab. 10: Jednotlivé kroky amplifikační reakce nested PCR

Jednotlivé kroky		Teplota	Čas
Počáteční denaturace		95°C	5 min
Denaturace DNA		94°C	30 sekund
Nasedání primerů	Flagellin out	52°C	30sekund
	Flafellin inn	55°C	
Elongace (extension)		72°C	1 minuta
Závěrečná elongace		72°C	10 minut
Teplota po skončení reakce		4°C	∞

* Bod 2-4 se 35x opakoval

4.2.14 Zjištění druhu borelie pomocí PCR s druhově specifickými primery

K určení jednotlivých druhů borelií byly použity primery GI pro *B. burgdorferi* s.s. (PCR produkt 543 bp), GII pro *B. garinii* (PCR produkt 344 bp), GIII pro *B. afzelii* (PCR produkt 189 bp) (Damaerschalc et al., 1995). Reakce probíhala v 0,2 µl tenkostěnných zkumavkách a celkový objem reakční směsi každé reakce byl 20 µl.

Tab. 11: Přehled použitých druhově specifických primerů GI, GII, GIII.

Název primeru	Teplota nasedání	Sekvence 5' → 3'	Specifita primeru	Citace
GI R	50°C	TTACAGTAATTGTTAAAGTTGAAGTGCC	<i>B. burgdorferi</i>	Demaerschalc et al., 1995
GI F	50°C	AACAAAGACGGCAAGTACGATCTAATT	<i>B. burgdorferi</i>	
GII R	50°C	GTAACCTTCAATGTTGTTTTGCC	<i>B. garinii</i>	
GII F	50°C	TGATAAAAAC AACGGTTCTG GAAC	<i>B. garinii</i>	
GIII R	50°C	TAAAGACAAAACATCAACAGATGAAAG	<i>B. afzelii</i>	
GIII F	50°C	TTCCAATGTTACTTTATCATTAGCTAC	<i>B. afzelii</i>	

Tab. 12: Jednotlivé kroky pro amplifikační reakci pro GI, GII, GIII

Jednotlivé kroky	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	95°C	5 minut
Denaturace DNA	95°C	1minuta
Nasedání primerů	55°C	30 sekund
Elongace (extension)	72°C	1 minuta
Závěrečná elongace	72°C	5 minut
Teplota po skončení reakce	4°C	∞

Kroky 2 – 4 se opakovaly 30 krát.

4. 2. 14. 1. Charakterizace amerického kmenu *B. afzelii*

Další PCR reakce nutné pro charakterizaci amerického izolátu *B. afzelii* byly provedené na vzorcích, u nichž s použitím primeru GIII byla potvrzena přítomnost *B. afzelii* bez ko – infekce jinými druhy borelie.

Čistá DNK *B. afzelii* byla analyzována pomocí PCR s použitím primerů pro *flagellin*, *ospA*, *ospC* a 8 sad primerů pro „housekeeping“ geny – MLST analýzy (*clpA*, *cplX*, *nifS*, *pepX*, *pyrG*, *recG*, *rplB* a *uvrA*) (Tab. 13). V případě „housekeeping“ genů byla provedena už výše popsaná „nested“ PCR.

Tab. 13: Přehled použitých primerů pro *flagellin*, *ospA*, *ospC* a „housekeeping“ genů.

Název primeru	Teplota nasedání	Sekvence 5' → 3'	Citace
<i>clpX</i> Outer R	50°C	GATTGATTTTCATATAACTCTTTTG	Margos et al., 2008
<i>clpX</i> Outer F	50°C	GCTGCAGAGATGAATGTGCC	
<i>cplX</i> Inner R	48°C	TTAAGAAGACCCTCTAAAATAG	
<i>clpX</i> Inner F	48°C	AATGTGCCATTTGCAATAGC	
<i>clpA</i> Outer R	50°C	TTCATCTATTA AAAAGCTTTCCC	
<i>clpA</i> Outer F	50°C	GATAGATTTCTTCCAGACAAAG	
<i>clpA</i> Inner R	48°C	CAAAAAAACATCAAATTTTCTATCTC	
<i>clpA</i> Inner F	48°C	GACAAAGCTTTTGATATTTTAG	
<i>nifS</i> Outer R	50°C	GTTGGAGCAAGCATTTTATG	
<i>nifS</i> Outer F	50°C	GTTGGAGCAAGCATTTTATG	
<i>nifS</i> Inner R	48°C	TCACAGCCAATTTTTTTAAC	
<i>nifS</i> Inner F	48°C	ATGGATTTCAAACAAATAAAAAG	
<i>pepX</i> Outer R	50°C	GTTCCAATGTCAATAGTTTC	
<i>pepX</i> Outer F	50°C	ACAGAGACTTAAGCTTAGCAG	
<i>pepX</i> Inner R	48°C	TGTGCCTGAAGGAACATTTG	
<i>pepX</i> Inner F	48°C	TTATTCCAAACCTTGCAATCC	
<i>pyrG</i> Outer R	50°C	CAAACATTACGAGCAAATTC	
<i>pyrG</i> Outer F	50°C	GATTGCAAGTTCTGAGAATA	
<i>pyrG</i> Inner R	48°C	AAACCAAGACAAATCCAAG	
<i>pyrG</i> Inner F	48°C	GATATGGAAAATATTTTATTATTG	
<i>recG</i> Outer R	50°C	GAAAGTCCAAAACGCTCAG	
<i>recG</i> Outer F	50°C	CCCTTGTTGCCTTGCTTTC	
<i>recG</i> Inner R	48°C	CAAGTTGCATTTGGACAATC	
<i>recG</i> Inner F	48°C	CTTAATTGAAGCTGGATATC	
<i>rplB</i> Outer R	50°C	GCTGTCCCCAAGGAGACA	
<i>rplB</i> Outer F	50°C	TGGGTATTAAGACTTATAAGC	
<i>rplB</i> Inner R	48°C	GCTGTCCCCAAGGAGACA	
<i>rplB</i> Inner F	48°C	CGCTATAAGACGACTTTATC	
<i>uvrA</i> Outer R	50°C	CCTATTGGTTTTTGATTTATTTG	
<i>uvrA</i> Outer F	50°C	GCTTAAATTTTAAATTGATGTTGG	
<i>uvrA</i> Inner R	48°C	CAAGGAACAAAACATCTGG	
<i>uvrA</i> Inner F	48°C	GAAATTTTAAAGGAAATTAAGTAG	
Flag R	50°C	GACGCTTGAGACCCTGAAAG	Picken, 1992
Flag F	50°C	TTCAATCAGGTAACGGCACA	
<i>ospA</i> R	50°C	GACTCAGCACCTTTTTG	Bunikis et al., 2004
<i>ospA</i> F	50°C	TATTTATTGGGAATAGGTC	
<i>ospC</i> R	50°C	ATTAATCTTATAATATTGATTTTAATTAAGG	
<i>ospC</i> F	50°C	ATGAAAAGAATACATTAAGTGC	

Tab. 14: Podmínky 1. amplifikační reakce 1 („spacer“) pro *clpX*, *clpA*, *nifS*, *pepX*, *pyrG*, *rplB* geny (primery „Outer“).

Jednotlivé kroky	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	95°C	15 minut
Denaturace	94°C	30 sekund
Nasedání primerů (anealing)	55°C – 48°C	30sekund – s každým cyklem po 30s se teplota snížila o 1 stupeň
Elongace (extension)	72°C	30 sekund
Denaturace	94°C	30 sekund
Anealing	48°C	30 sekund
Elongace	72°C	30 sekund
Cykly 5-7 se opakovaly 20x		
Závěrečná elongace	72°C	5 minut
Teplota po skončení reakce	15°C	∞

Tento PCR cyklus, kde se teplota nasedání primerů s každým cyklem snížila o 1 stupeň, se odborně nazývá „touchdown PCR“.

Druhá reakce „housekeeping“ 2 („nested“) s primery „inner“ následovala ihned po skončení první reakce („spacer“).

Tab. 15: Podmínky 2. amplifikační reakce pro reakci „housekeeping“ 2 („nested“) s primery *clpX*, *clpA*, *nifS*, *pepX*, *pyrG*, *rplB* (inner).

Jednotlivé kroky	Teplota	Čas
Počáteční denaturace	95°C	15 minut
Denaturace	94°C	30 sekund
Nasedání primerů (anealing)	50°C	30 sekund
Elongace (extension)	72°C	30 sekund
Závěrečná elongace (extension)	72°C	5 minut
Teplota po skončení reakce	15°C	∞

Kroky 2 – 4 se opakovaly 35 krát.

Reakce s primery pro „housekeeping“ gen *recG* měla jiné podmínky pro amplifikaci (podmínky jsou uvedeny níže v tab. 16). Reakční směs byla připravena stejně jako u ostatních reakcí.

Tab. 16: Podmínky 1. amplifikační reakce pro gen *recG*

Jednotlivé kroky	Telota	Čas
Počáteční denaturace	95°C	15 minut
Denaturace	94°C	30 sekund
Nasedání primerů (anealing)	55°C	30 sekund
Elongace (extension)	72°C	30 sekund
Závěrečná elongace (extension)	72°C	5 minut

Kroky 1 – 4 se opakovaly 30 krát.

Podmínky 2. reakce („nested“ s primery „inner“) pro gen *recG* byly stejné jako v 1. amplifikační reakci, jen počáteční denaturace při 95°C trvala 7 minut.

4.2.15 Elektroforéza v agarózovém gelu

Výsledky PCR reakcí byly kontrolovány na agarózovém gelu, jehož koncentrace byla závislá na velikosti PCR produktu (od 0,8% do 2% agarózy). Před nanášením na gel do 20 µl vzorků bylo přidáno 3,3 µl 6x koncentrovaného vzorkového pufru (6x Orange DNA Loading Dye, Thermo Scientific, 50x SYBR GreenI). Pro upřesnění velikostí PCR produktu byl použit marker 100 bp gene ruler (MBI Fermentas). Elektroforéza probíhala v 1x TAE pufru při napětí 110 V po dobu 30 – 40 minut. Výsledky byly vizualizovány pod UV zářením, fotograficky zdokumentovány a fotografie byla uložena.

4.2.16 Purifikace PCR produktů

Z agarózového gelu (>1 %) byly vyříznuty PCR produkty vizualizované pod UV zářením. Kousky gelu byly vloženy do kolony (Millipore) a centrifugované po dobu 10 minut při 5,000 otáčkách/min. Takto purifikované PCR produkty byly sekvenovány z obou stran pomocí gen - specifických primerů.

4.2.17 Sekvenování

Vzorky byly sekvenovány v laboratoři BIOGEN Praha, s.r.o. ve dvou směrech s gen - specifickými primery F (forward) a R (reverse). Do dvou 200 µl mikrozkušavek (typ Ependorf) bylo přidáno 5-20 ng PCR produktu, dále byly přidány gen - specifické primery F a R (2,5 pmol/µl). Celkový objem reakcí byl 10 µl. Získané výsledky pak byly zpracovány v DNASTar a sekvenace byly porovnané z informací v GenBanku (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.2.18 Western Blot – prokázání přítomnosti boreliových protilátek v myších

Western blot se používá pro kvantitativní nebo semikvantitativní detekci proteinu ve vzorku. Metoda je tvořena třemi základními kroky: 1. elektroforetickou separací proteinů, 2. přenosem separovaných proteinů, 3. detekcí proteinů.

4.2.18.1 Příprava lyzačního proteinu v bodech

1. Kultura borelií musí být nekontaminovaná a velmi hustá (minimálně 10^9 /ml).
2. Kultura byla centrifugována na 8 000 otáčkách po dobu 10 minut při teplotě 20 °C.
3. Poté byl odebrán supernatant, k peletu byl přidán 1 ml HN- Buffer, vše bylo velmi dobře promícháno.
4. Celý objem byl přendán do 1,5 ml zkumavek.
5. Znovu byl lyzát odstředován po dobu 10 minut při teplotě 20 °C a 8 000 otáčkách.
6. Supernatant byl odebrán a k peletu byl opět přidán 1 ml HN- Buffer.
7. Opět byl lyzát odstředován za stejných podmínek a poté odebrán supernatant.
8. K peletu bylo přidáno 200 μ l B-PER-Bacterial protein, vše bylo dobře promícháno.
9. Lyzát byl ponechán stát při pokojové teplotě po dobu 10 minut.
10. Po 10 minutách byla změřena koncentrace proteinu.
11. Dále bylo k lyzátu přidáno 190 μ l 2x Laemmli sample buffer a 10 μ l β – mE Cpto, tyto dvě složky byly smíchány v boxu.

Lyzát byl zmražen na – 20 °C.

4.2.18.2 Western Blot v jednotlivých krocích

Pro separaci proteinů se nejčastěji využívá SDS-PAGE elektroforáza.

- a. Příprava separačního gelu: Bylo smícháno 2 ml 30% AA, 1,25 ml separačního puferu, 1,7 ml dH₂O, 50 μ l 10% APS, 2 μ l TEMED. Celý objem byl odpipetován do předem složené aparatury, kde se nechal gel stuhnout. Po stuhnutí separačního gelu byl připraven „koncentrující“ gel.
 - b. Příprava „koncentrující“ gelu: Bylo smícháno 0,165 ml 30% AA, 0,25 ml „stacking“ bufferu, 0,575 ml dH₂O, 10 μ l 10% APS, 1 μ l TEMED. Takto připravený „stacking“ gel byl přidán k separačnímu gelu a byl do něj vložen hřebínek s 0,75mm hřebínky.
1. Mezitím byly vzorky (lyzační protein) smíchány se vzorkovým puferem a denaturovány při 100°C po dobu 10 – 15 minut.

2. Po složení aparatury, rozdělovací byla zalita 1x Running puferem až po okraj, do první jamky v gelu bylo odpipetováno 8 μ l proteinových markeru, do ostatních jamek bylo odpipetováno 15 μ l proteinového vzorku. Gelová elektrofozéra trvala při 120V 60 minut nebo dokud proužky nedosáhly na spodní okraj gelu.
3. PVDF membrána byla vložena do blotovacího pufru po dobu 15 minut. Gel byl opláchnut v destilované vodě, poté vložen do blotovacího pufru. Blotovací papírky byly takéž namočený v blotovacím pufru. Dále byl složen „sendvič“ (blotovací papír, membrána, gel a blotovací papír) a vytlačeny bublinky skleněnou tyčkou.
4. Takto složený „sendvič“ byl blotován při 20V po dobu 30 minut v blotovacím aparátu.
5. Po přeblotování byly označeny jamky na membráně, membrána byla opláchnuta v destilované vodě.
6. Mezitím byl připraven blotovací roztok (5% mléko v TBS pH 7,4). Po 30 minutách byla otevřena aparatura, vyjmut gel a blotovací membrána byla inkubována na třepačce v blokovacím roztoku po dobu 2 hodin.
7. Přibližně 20 minut před skončením blokování, bylo připraveno myší sérum s blokovacím puferem (smícháno 995 μ l blotovacího roztoku s 5 μ l séra v 1,5 ml zkumavce).
8. Po uplynutí 2 hodin byla membrána označena a rozstříhána na proužky.
9. Každý proužek byl vložen do označeného igelitového pytlíku a bylo k němu přidáno 1 ml vzorku (995 μ l blotovacího roztoku s 5 μ l séra). Pytlíčky s membránou byly vloženy do plastového boxu, který se nechal přes noc v lednici.
10. Druhý den se membrána inkubovala na třepačce po dobu 1 hodiny.
11. Poté byly jednotlivé proužky membrány vyndány z igelitových pytlíčků a 3x promyty v 1x TBS + tween pufer po dobu 15 minut.
12. Mezitím byly připraveny sekundární protilátky (5 μ l „antimousee IgG“ protilátky přidány do 50 ml blokovacího roztoku, ředění 1: 10 000).
13. Po promytí byl k proužkům membrány přidán blokovací roztok s myšími protilátkami, vše bylo ponecháno 1 hodinu na třepačce.
14. Po 1 hodině byl zopakován krok 12, 3x promytí v 1x TBS + tween pufer po dobu 15 minut.

15. Poté byl připraven vyvolávací roztok (1 ml Detection Reagent A a 1 ml Decetion Reagent B z kitu Pierce[®] ECL Western Blotting Substrate (Thermo)), vše bylo dobře promícháno.
16. Po třech promytích byl přidán vyvolávací roztok a ponecháno na třepačce po dobu 5 minut.
17. Jednotlivé proužky byly vloženy na transparentní folii podle toho, jak šly jednotlivé vzorky za sebou, byly přiklopeny druhou horní folií a byly odstraněny bubliny.
18. Z takto zhotovené membrán\ byla pořízena fotka.

4.2.19 Kultivace živých spirochét z tkání infikovaných myší

Během pitvy myší byla odebrána krev, dále byly odebrány také tkáně – ucho, močový měchýř, slezina, srdce a kloub. Uši byly před kultivací promyty v 1 ml 100% etanolu na třepačce při maximálních otáčkách po dobu 5 minut. Poté byly opláchnuty v destilované vodě a osušeny. Po uschnutí byly rozkrájeny na menší kousky a přidány do 2 ml MPK média s 20 µl antibiotik a ponechány v termoboxu při teplotě 34 °C ke kultivaci. Vše probíhalo za sterilních podmínek ve flow boxu.

Ostatní tkáně byly taktéž za sterilních podmínek rozříznuty na menší kousky a dány do 2 ml MPK média s 20 µl antibiotik a ponechány v termoboxu při teplotě 34 °C ke kultivaci. Krev byla přivedena na pokojovou teplotu. Poté byla odstředována po dobu 7 minut při 2000 otáčkách. Centrifugací bylo odděleno krevní sérum od krevních destiček. Krevní sérum bylo odebráno do 1,5 ml zkumavek a uchováno při teplotě – 20 °C pro další použití v metodě Western Blot.

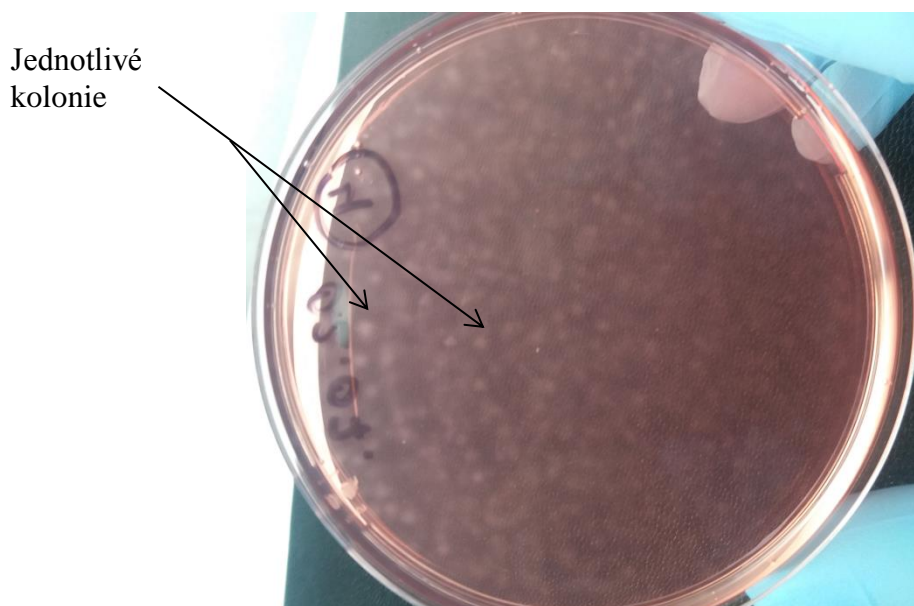
5. VÝSLEDKY

V průběhu molekulární analýzy různých izolátů *B. burgdorferi* s.l. získaných z klíšťat, hlodavců a ptáků z jihovýchodu Spojených států, několik izolátů odhalilo přítomnost dvou a více různých kmenů borelií, včetně „evropských“ kmenů *B. garinii* a *B. afzelii* (nepublikovaná data).

Předmětem analýzy byl izolát SCCH – 7, který byl kultivován z biopsie tkání (kousek ucha) křečka bavlíkového (*Peromyscus gossypinus*) chyceného ve městě Mt. Pleasant, Charleston County, stát Jižní Karolína v USA. Na základě předběžné analýzy vzorků pomocí RLB (Reverse Line Blot hybridizace) byl izolát SCCH – 7 charakterizován jako ko – infekce třech kmenů *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* a *B. afzelii*. Cílem tohoto projektu bylo od sebe oddělit *B. garinii* a *B. afzelii* a získat čistou monoklonální kulturu obou kmenů s cílem jejich částečné charakterizace.

5.1 Kultivace spirochét na pevné půdě

Po rekultivaci SCCH – 7 v tekutém BSK – II médiu ze zmrazeného zásobního roztoku, byly borelie přeneseny na pevnou půdu na Petriho miskách. Narostlé samostatné kolonie byly na miskách viditelné přibližně za 3 týdny po nasazení (Obr. 3). Jednotlivé kolonie (klony), které byly odebrány z Petriho misek (Obr. 4), se nechaly narůst v tekutém BSK – II médiu.



Obr. 3: Pevné medium BSK – II porostlé koloniemi borelií.

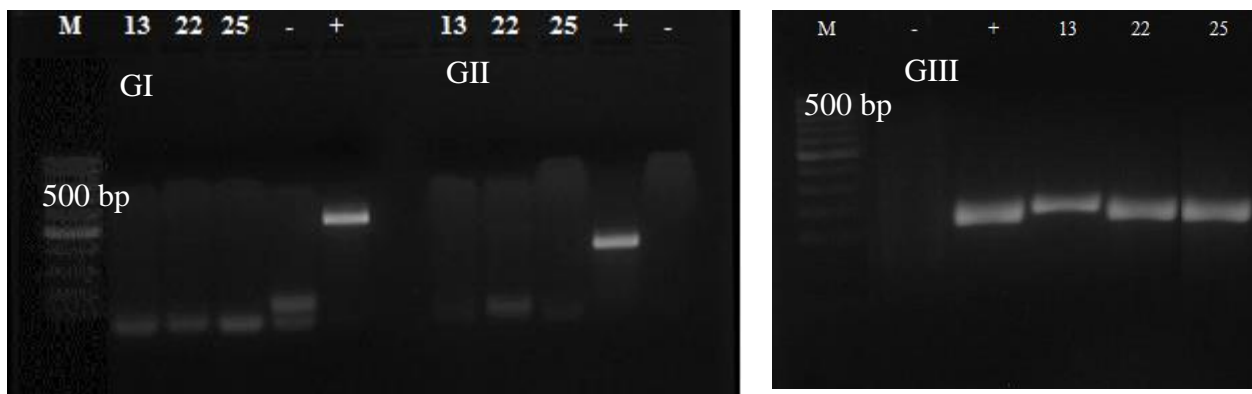


Obr. 4: Odebrané jednotlivé kolonie (selekcce).

5.2 Kontrola druhové čistoty

Monoklonální kultury borelií byly kontrolovány metodou PCR s použitím druhově specifických primerů. Z 200 zkontrolovaných vzorků kultur, všechny až na tři byly identifikovány jako *B. burgdorferi* s.s. Tři izoláty SCCH – 7 (číslo 13, číslo 22 a číslo 25), v druhově specifické PCR reakci s primery GIII (specifických pro *B. afzelii*) daly specifický *B. afzelii* PCR produkty, odpovídající velikosti 190bp (Obrázek 5).

Demonstrační obrázek – jeden z gelů s výsledky „skreeningu“ jednotlivých kolonií. Vzorky s číslem 13, 22, 25 vykazují přítomnost *B. afzelii*.



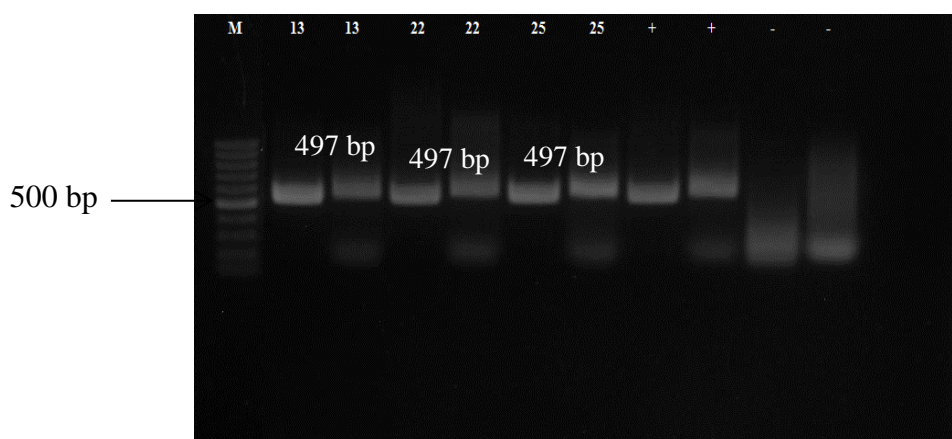
Obr. 5: M – 100 bp DNK maker, vzorky 13, 22, 25 jednotlivých kolonií s primery GI, GII, GIII, „-“ negativní kontrola, „+“ pozitivní kontrola (DNK *B. burgdorferi* s.s. pro GI, DNK *B. garinii* pro GII, DNK *B. afzelii* pro GIII).

5.3 Analýza vybraných úseků genomu amerického izolátu *B. afzelii* SCCH-7/22

Čistá monoklonální kultura *B. afzelii* byla dále kultivována v tekutém médiu MKP, k získání materiálu pro další analýzu. Všechny sekvence analyzované v této práci jsou představené v Příloze č. 1. Všechny sekvence byly zaslány do GenBank.

5.3.1 Analýza částečného *fla* genu

Dále byla s těmito třemi klony provedena PCR reakce s primery pro *flagellin*. Na obrázku 6 je výsledek PCR reakce s primery pro *flagellin* (497bp).

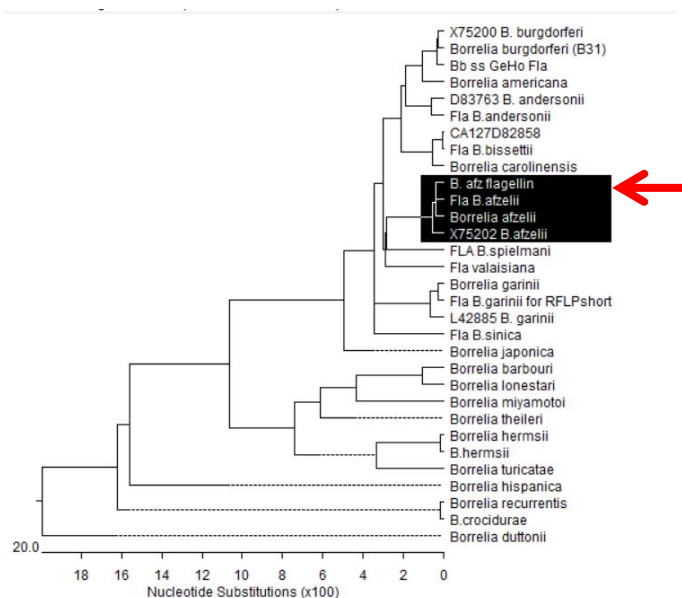


Obr. 6: M – 100 bp DNK marker, vzorky 13, 22, 25 jednotlivých kolonií, „+“ pozitivní kontrola (DNK *B. afzelii*), „-“ negativní kontrola.

PCR produkty byly sekvenovány a porovnávány mezi sebou a s GenBank. Protože byly tyto 3 klony identické, byl vybrán 1 klon pro další charakterizaci.

Částečná sekvence *fla* genu z našeho vzorku (409bp) odhalila nejvyšší homologii (99%) s nekultivovaným klonem *Borrelia afzelii* Ba_V1a *flagellin* (*flaB*) gene, partial cds izolovaným z Polska (číslo v GenBank MF 150047).

Částečná sekvence *fla* genu izolátu SCCH-7/22 byla porovnána se sekvencemi *flagellinů* různých druhů borelií představených v GenBank. Schématické znázornění porovnání (pomocí MagAlign) je představeno na obrázku 7. Izolát SCCH-7/22 jak je vidět na obrázku, se řadí k *B. afzelii*



Obr. 7: Schématické znázornění porovnání různých druhů kmenů borelií s izolátem SCCH-7 (22).

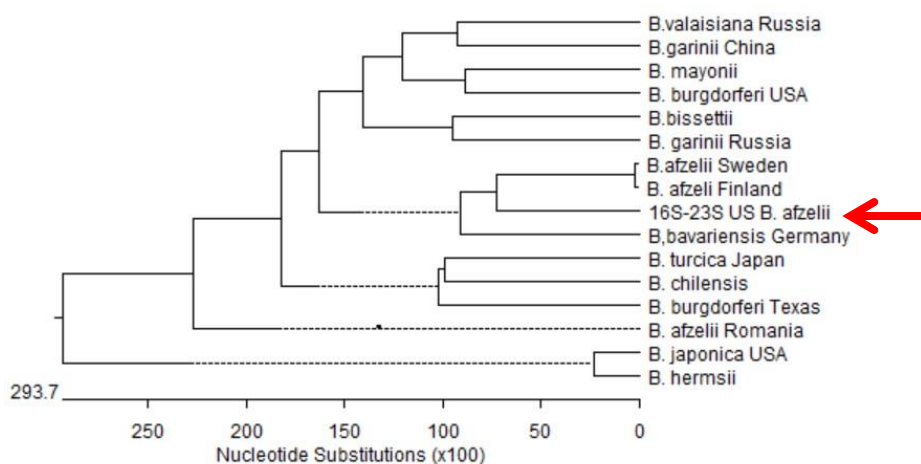
5.3.2 Analýza částečné sekvence genu pro *ospA*

Částečná sekvence *ospA* ampliconu vzorku SCCH-7/22 (331 bp) odhalila nejvyšší homologii (99%) s nekultivovaným klonem *Borrelia afzelii* subtype 2d1 outer surface protein A gene izolovaným z Rakouska (číslo v GenBank KM069329).

5.3.3 Analýza částečné sekvence genu pro 16S – 23S

Částečná sekvence (480 bp) mezigenového úseku pro 16S-23S izolátu SCCH-7/22 byla porovnána se sekvencemi 16S-23S různých druhů borelií představených v GenBank odhalila nejvyšší homologii (99%) s nekultivovaným klonem *Borrelia afzelii* K78, původem z Rakouska (číslo v GenBank CP009058).

Schématické znázornění porovnání (pomocí MagAlign) je představeno na obrázku 8.



Obr. 8: Schématické znázornění porovnání různých kmenů borelií s izolátem SCCH-7/22.

Izolát SCCH-7/22 jak je vidět na obrázku, je ve skupině s *B. afzelii*.

5.3.4 MLST analýza

Multilokusová analýza 8 „housekeeping“ genů amerického izolátu *B. afzelii* odhalila 100% shodu jen s jedním izolátem z MLST databáze (ST 70) a to s izolátem *B. afzelii* VS461 ze Švýcarska (100% shoda po 7 genech, a 97% shoda v genu *pyrG*, kde nejbližší homologie také odpovídá izolátu ze Švýcarska). Výsledky analýzy jsou představené na obrázku 10.

Search or browse *Borrelia* isolates database

Enter search criteria or leave blank to browse all records. Modify form parameters to filter or enter a list of values.

Isolate provenance/phenotype fields: id = Enter value... +

Alele designations/scheme fields: ST (MLST) = 70 +

Display/sort options: Order by: id ascending, Display: 25 records per page

1 record returned. Click the hyperlink for detailed information.

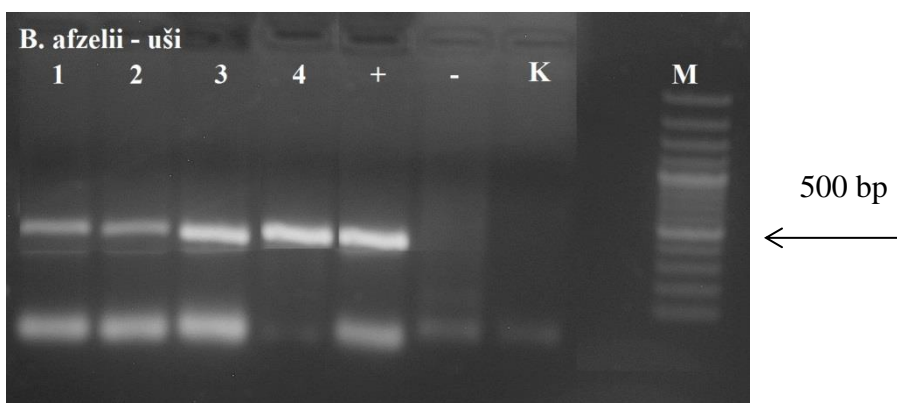
Isolate fields				MLST												
id	isolate	aliases	country	species	year	source	clpA	clpX	nifS	pepX	pyrG	recG	rplB	uvrA	ST	
138	VS461	Ba_type strain	Switzerland	<i>Borrelia afzelii</i>		tick	35	23	22	28	20	27	22	28	70	

Obr. 10: Výsledky MLT analýzy.

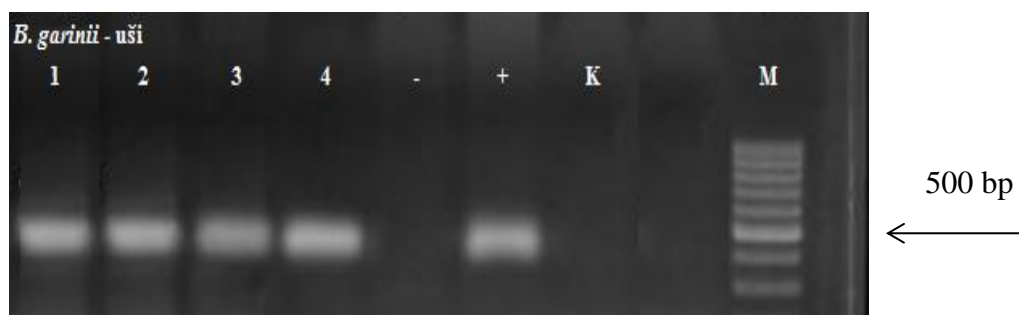
Jako výsledek této analýzy můžeme konstatovat, že náš izolát a) definitivně patří k druhu *B. afzelii* b) americký izolát *B. afzelii* je geneticky unikátní, liší se od evropských kmenů *B. afzelii* a při MLT analýze dává homologii jen s jediným izolátem ze Švýcarska.

5.4 Průkaz přítomnosti DNA borelií v myších tkáních

Čistá kultura amerických izolátů *B. garinii* a *B. afzelii* byla použita pro infikování myší. Po šesti týdnech po inokulaci byla odebraná tkáň zkontrolována na přítomnost DNK borelie. PCR analýzy s použitím primerů pro *flagellin* potvrdila přítomnost specifického PCR produktu (497 bp) v ušní tkáni experimentálně infikovaných myší jak v případě infikování myší *B. afzelii* tak i v případě infikování myší *B. garinii* (Obr. 11 a 12).



Obr. 11: Vzorky 1 – 4 experimentální myši, „+“ pozitivní kontrola, „-“ negativní kontrola, K – kontrolní neinfikovaná myš, M – 100 bp DNK marker.

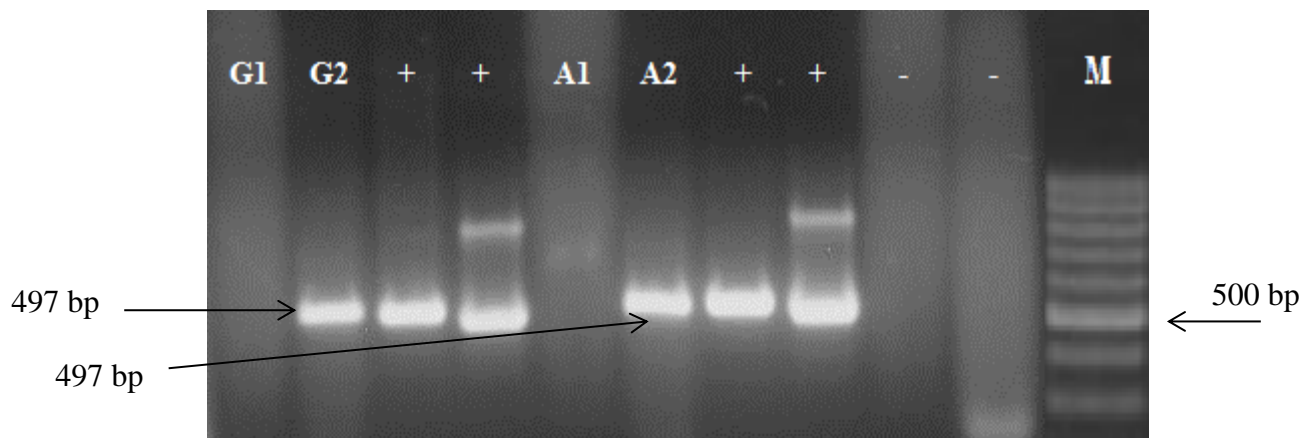


Obr. 12: Vzorky 1 – 4 experimentální myši, „+“ pozitivní kontrola, „-“ negativní kontrola, K – kontrolní neinfikovaná myš, M – 100 bp DNK maker.

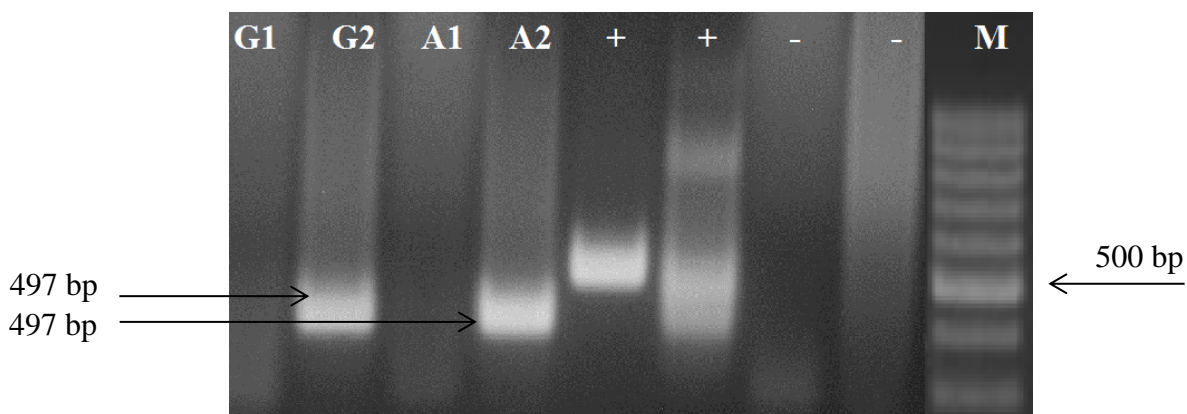
Všechny myši se podařilo infikovat oběma kulturami - *B. afzelii* a u *B. garinii*. Na tyto infekční myši se nasázely čisté larvy klíšťat *I. ricinus*, které se po nakrmení ponechaly vylíhnout do dalšího vývojového stádia – nymf.

5.5 Průkaz trans – stadiálního přenosu borelií z larev na nymfy

Na demonstračních obrázcích 13 a 14 jsou uvedeny výsledky přítomnosti DNK *B. garinii* a *B. afzelii* v nasátých larvách a dále ve vylíhnutých nymfách klíšťat *I. ricinus*. Byla použita citlivější metoda „nested“ PCR s primery pro *flagellin* (out a inn). Všechny larvy klíšťat *I. ricinus* byly infekční a infekčnost si ponechaly i do dalšího vývojového stádia – nymfy.



Obr. 13: G1, G2 – larvy infikované *B. garinii* reakce „spacer“ a „nested“, A1, A2 – larvy infikované *B. afzelii* reakce „spacer“ a „nested“, „+“ pozitivní kontrola (DNA *B. garinii* a *B. afzelii*), „-“ negativní kontrola, M – 100 bp DNK maker.



Obr. 14: G1, G2 – nymfy infikované *B. garinii* reakce „spacer“ a „nested“, A1, A2 – nymfy infikované *B. afzelii* reakce „spacer“ a „nested“, „+“ pozitivní kontrola (DNA *B. garinii* a *B. afzelii*), „-“ negativní kontrola, M – 100 bp DNK maker.

5.6 Průkaz přenou borelií z nymf na naivní myši

Výsledky testování přítomnosti DNK borelií v orgánech myši (4 týdny po krmení infekčních nymf na naivních myších) jsou uvedeny v Tab. 17. Analýza proběhla pomocí metody „nested“ PCR s primery pro *fla* out a *fla* inn.

Tab. 17: Přítomnost DNA *B. garinii* v orgánech u myši 1-6.

<i>B. garinii</i>					
Myš	Ucho	Močový měchýř	Slezina	Srdce	Kloub
1	-	-	+	+	+
2	-	+	+	+	+
3	-	+	+	+	+
4	-	+	+	-	-
5	-	+	+	+	+
6	-	+	+	+	+
Kontrolní	+	+	+	+	+
Negativní	-	-	-	-	-

Byl prokázán přenos borelie druhu *B. garinii* z nymf *I. ricinus* do všech testovaných naivních myši. Pro ověření výsledků proběhlo následné sekvenování PCR produktů.

5.7 Fylogenetická analýza *B. garinii*

Ze získaných sekvencí „housekeeping“ genů byla provedena fylogenetická analýza, kde byl porovnáván americký izolát *B. garinii*, již charakterizovaný v bakalářské práci, s dalšími sekvencemi 8 „housekeeping“ genů pro *B. garinii* a *B. bavariensis*. Pro tuto analýzu bylo k dispozici 476 unikátních setů sekvencí z různých geografických oblastí, které byly nalezeny v MLST databázi a po spojení dávaly celkovou velikost 4785 nt. Fylogenetická analýza byla provedena pomocí programu RAxML. Na obrázku 15 a 16 je znázorněn výsledek fylogenetické analýzy pro *B. garinii*.

RAxML analysis of
B. bavariensis+*B. garinii*



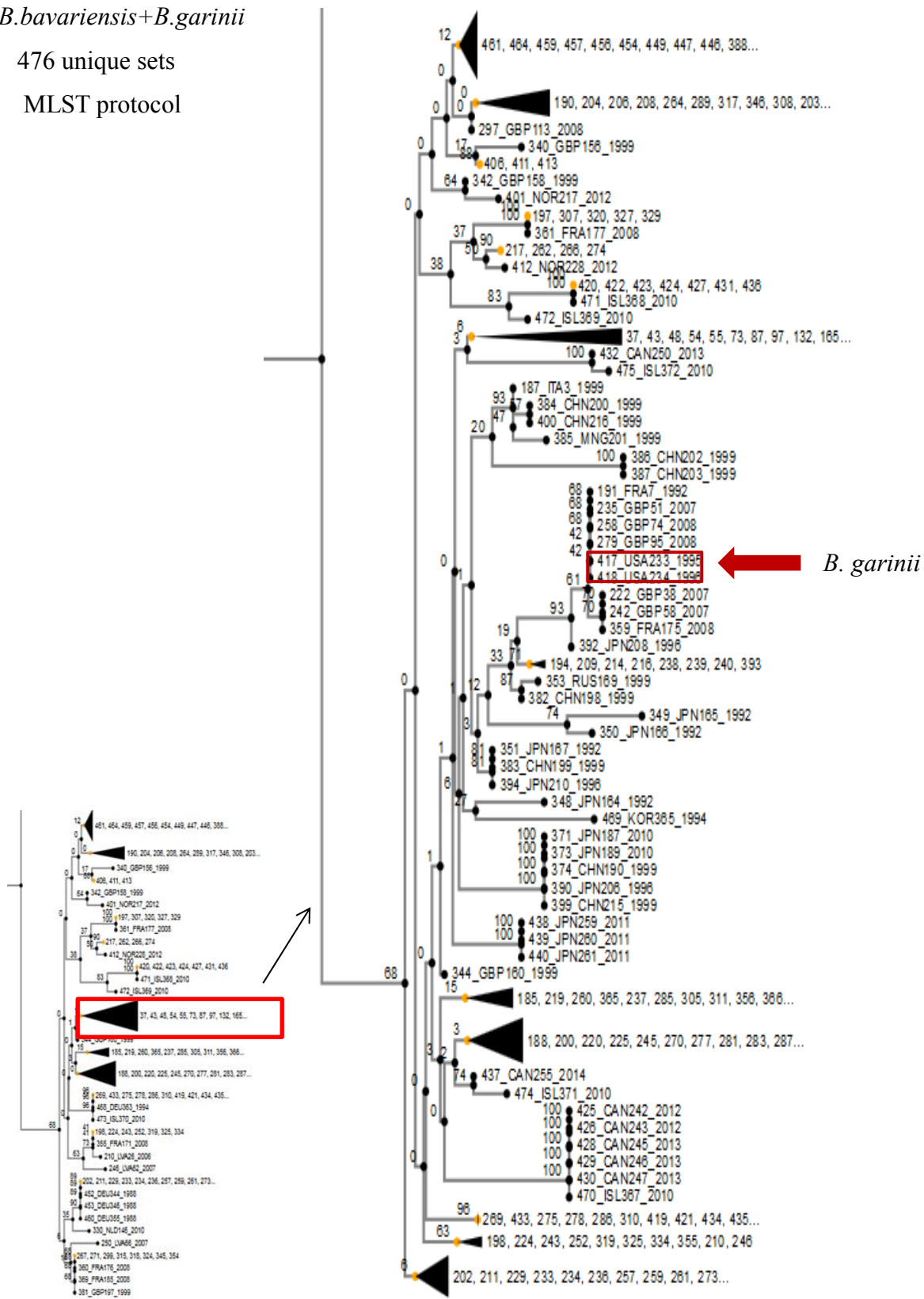
Obr. 15: Fylogenetický strom 8 „housekeeping“ genů pro *B. garinii* a *B. bavariensis*.
V červeně orámovaném obdelníku se nachází americký izolát *B. garinii*.

RAxML analysis of

B.bavariensis+*B.garinii*

476 unique sets

MLST protocol



Obr. 16: Fylogenetický strom 8 „housekeeping“ genů pro *B. garinii*.

Fylogenetická analýza potvrdila, že americký izolát *B. garinii* izolovaný z hlodavců prokazatelně patří k druhu *B. garinii* a který je zároveň blízce příbuzný kmenům z Japonska, Velké Británie a Číny.

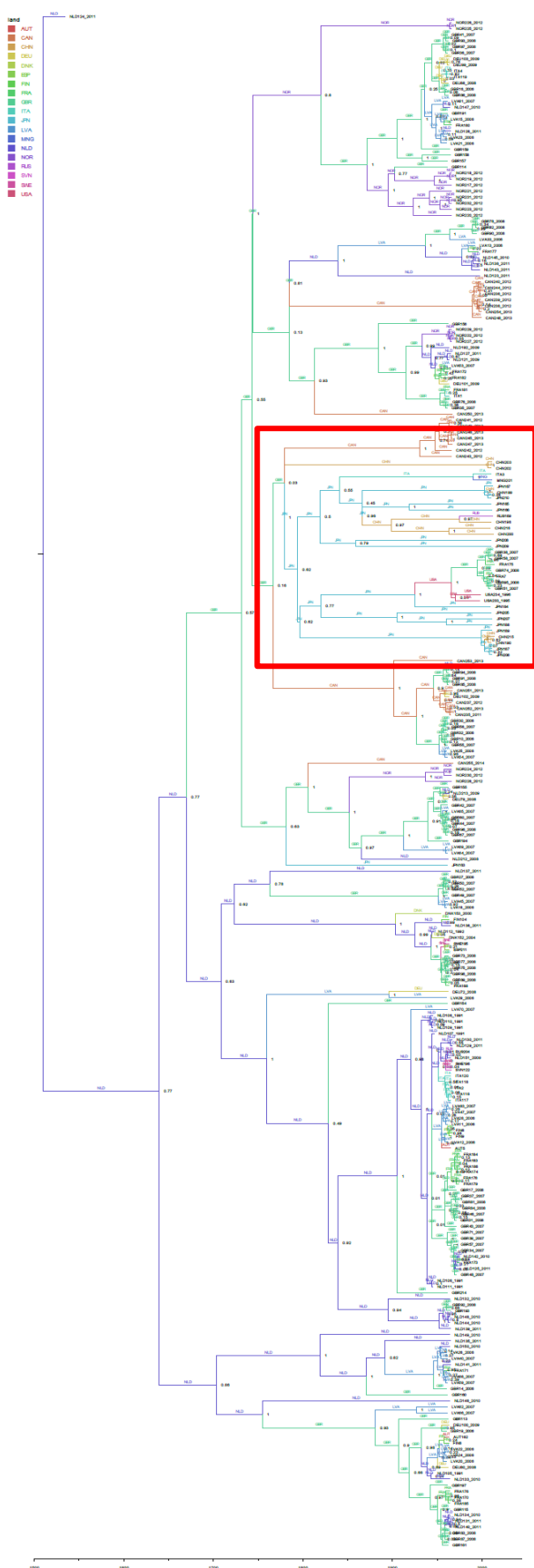
Dále jsme provedly další analýzu, která potvrdila příbuznost a geografické rozšíření amerického izolátu *B. garinii*. Za pomoci programu BEAST (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees) byla provedena analýza, 382 unikátních setů sekvencí 8 „housekeeping” genů různých kmenů *B. garinii* rozšířených po celém světě. Na obrázku 17 a 18 je znázorněn výsledek BEAST analýzy pro *B. garinii*.

BEAST analysis of *B.garinii*
(Bayesian Evolutionary Analysis
Sampling Trees)

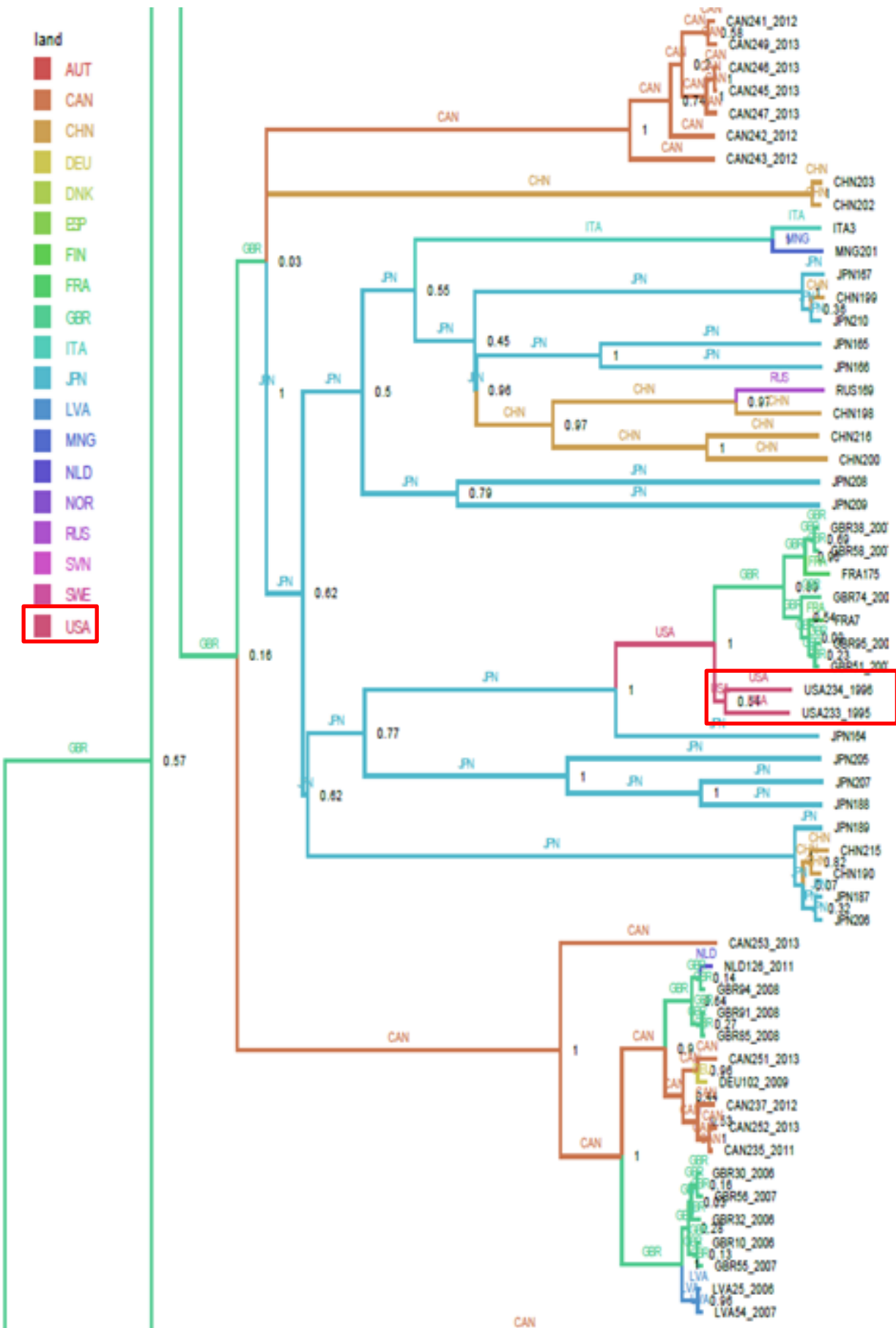
382 unique sets of sequences

MLST protocol

4875 nt

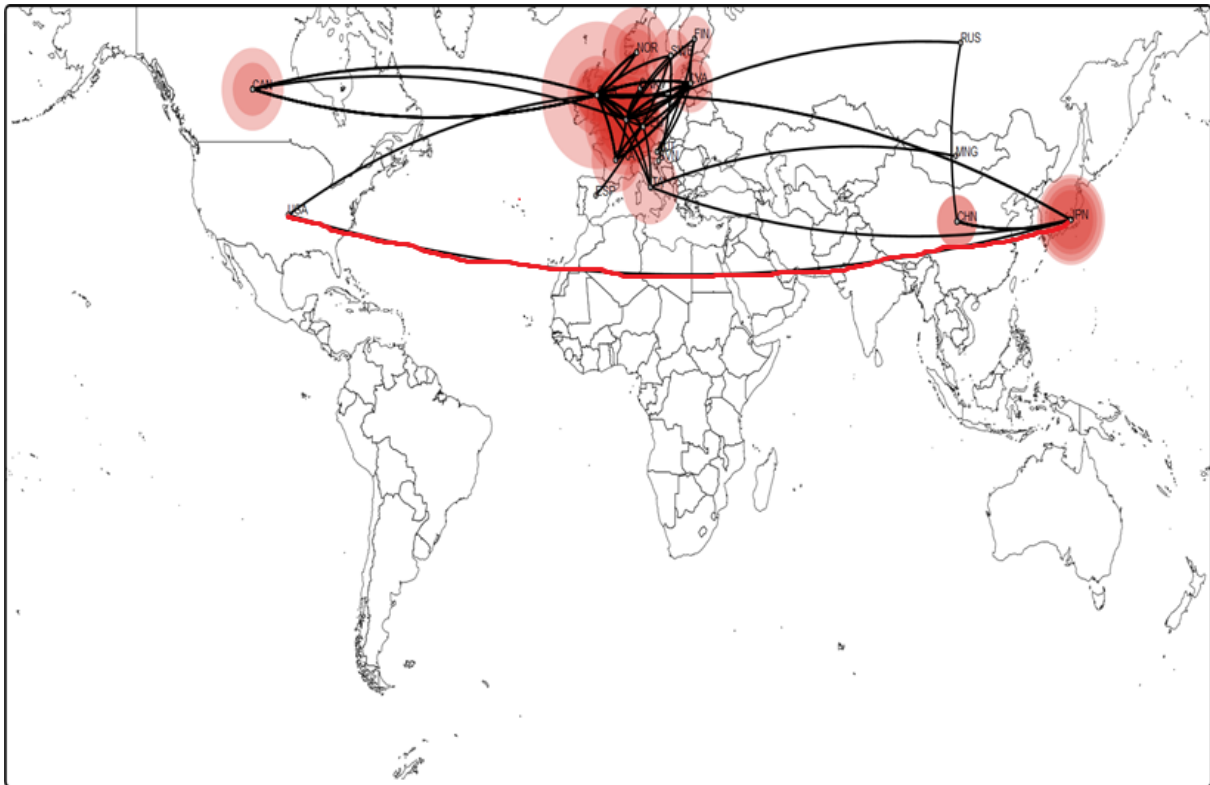


Obr: 17: Základní fylogenetický strom zhotovený pomocí BEAST analýzy 8 „housekeeping“ genů z 382 unikátních sad *B. garinii* sekvencí.



Obr. 18: BEAST analýza 8 „housekeeping“ genů pro *B. garinii* (zvětšení úseku obr 17).

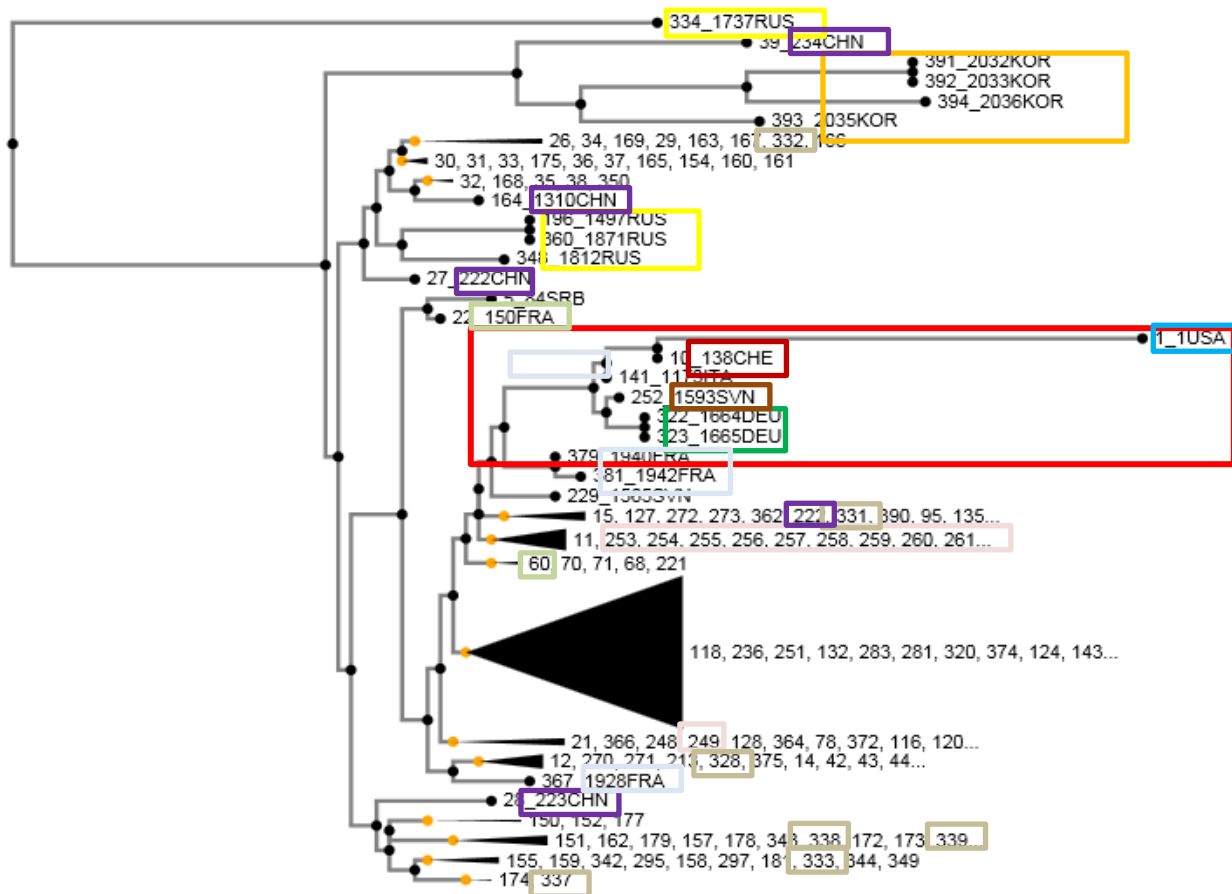
Na obrázku 19 je znázorněna předpokládaná cesta rozšíření a přenosu *B. garinii* po celém světě. Červeně vyznačená trasa, ukazuje na přenos amerického izolátu z Japonska do USA. V tomto případě se jedná o jediný možný přesnos a to pomocí hlodavců, kteří se nacházeli v dopravních lodích z Japonska do Ameriky v době mezi rokem 1750 a 1760.



Obr. 19: Geografické znázornění cest přenosu *B. garinii* po celém světě.

5.8 Fylogenetická analýza pro *B. afzelii*

Dále byla také provedena fylogenetická analýza 8 „housekeeping“ genů amerického izolátu *B. afzelii*, která potvrdila, že americký izolát *B. afzelii* je příbuzný s dalšími izoláty *B. afzelii* z Evropy (obr. 20).



Obr. 20: Fylogenetický strom 8 „housekeeping“ genů pro *B. afzelii*.

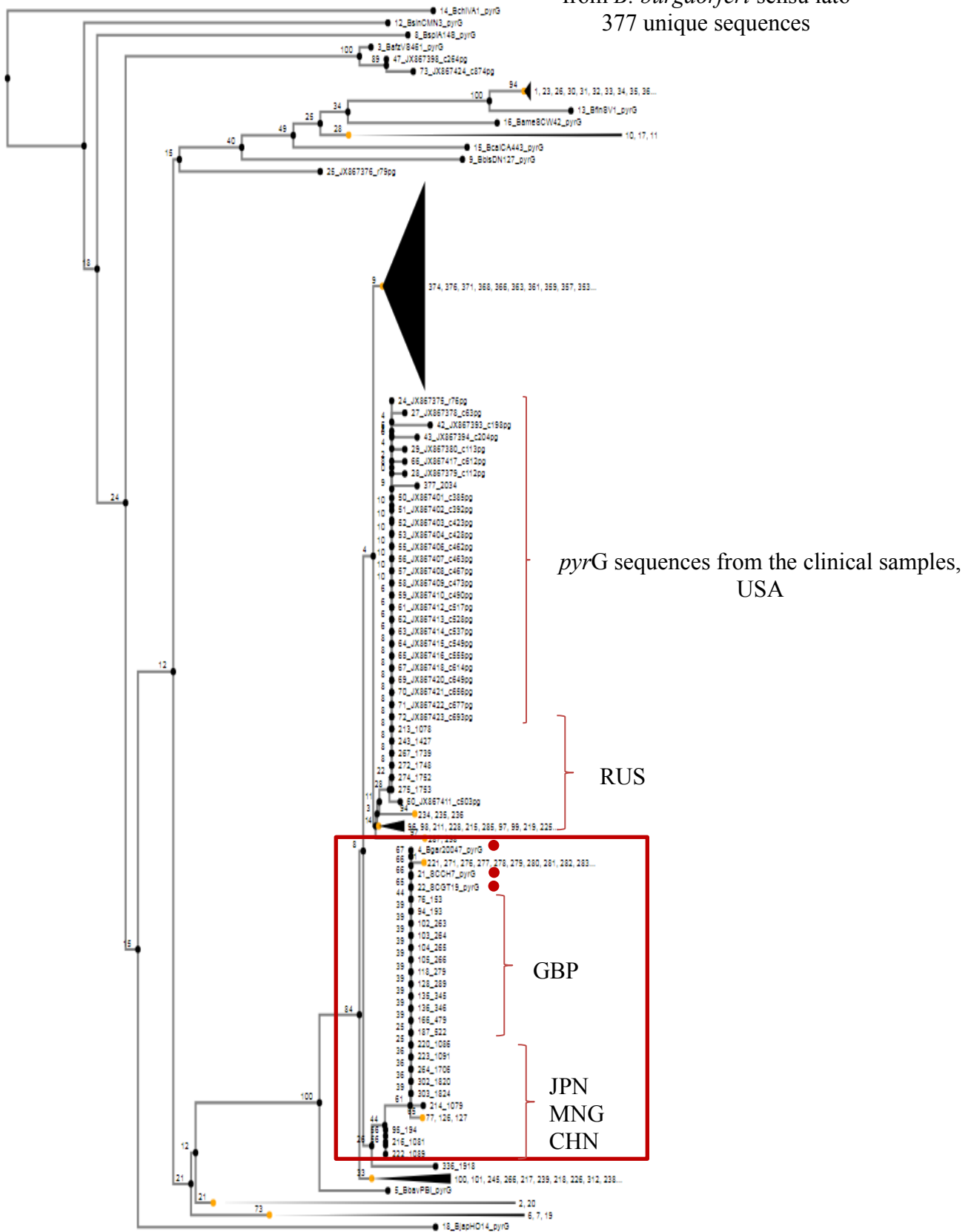
Odpovídající jednotlivé země viz. Tabulka č. 18.

1USA	259GBP	1031GBP	1289MNG	1502NOR	1592SVN	1643DEU	1823SRB
60SRB	260GBP	1032GBP	1290MNG	1503NOR	1593SVN	1644DEU	1830DEU
61SRB	261GBP	1033GBP	1291RUS	1504NOR	1594DEU	1645DEU	1831RUS
82SRB	262GBP	1034GBP	1292RUS	1505NOR	1595DEU	1646DEU	1832RUS
84SRB	320LVA	1035GBP	1293RUS	1506NOR	1596DEU	1647DEU	1833RUS
89SRB	321LVA	1036GBP	1294RUS	1507NOR	1597DEU	1648DEU	1834RUS
93SRB	322LVA	1037GBP	1295RUS	1508NOR	1598DEU	1649DEU	1835RUS
100SRB	323LVA	1038GBP	1296RUS	1514NOR	1599DEU	1650DEU	1836RUS
120SRB	324LVA	1039GBP	1297RUS	1515NOR	1600UNKNOWN	1651DEU	1837RUS
138CHE	325LVA	1040GBP	1298RUS	1516NOR	1601DEU	1652DEU	1871RUS
139CHE	326LVA	1052GBP	1299RUS	1517NOR	1602DEU	1653DEU	1887CHE
140DEU	327LVA	1056GBP	1300RUS	1546SVN	1603DEU	1654DEU	1888AUT
141FRA	328LVA	1057GBP	1308CHN	1547SVN	1604DEU	1655DEU	1924FRA
142FRA	329LVA	1058GBP	1310CHN	1548SVN	1605DEU	1656DEU	1925FRA
143FRA	330LVA	1139ITA	1315CHN	1549SVN	1606DEU	1657DEU	1926FRA
144FRA	331LVA	1140ITA	1317JPN	1550SVN	1607DEU	1658DEU	1927FRA
145FRA	332LVA	1141ITA	1330JPN	1551SVN	1608DEU	1659DEU	1928FRA
146FRA	333LVA	1142ITA	1331JPN	1554SVN	1609DEU	1660DEU	1929FRA
147FRA	334LVA	1143ITA	1336JPN	1555SVN	1610DEU	1661DEU	1930FRA
148FRA	335LVA	1144ITA	1342CHN	1556SVN	1611DEU	1662DEU	1931FRA
149FRA	336LVA	1145ITA	1430RUS	1557SVN	1612DEU	1663UNKNOWN	1932FRA
150FRA	337LVA	1146AUT	1432RUS	1558SVN	1613DEU	1664DEU	1933FRA
151FRA	338LVA	1147ITA	1433RUS	1559SVN	1614DEU	1665DEU	1934FRA
152FRA	339LVA	1148ITA	1435RUS	1560SVN	1615DEU	1666DEU	1935FRA
220CHN	340LVA	1149ITA	1438RUS	1561SVN	1616DEU	1667DEU	1936FRA
221CHN	478GBP	1155AUT	1439RUS	1562SVN	1618DEU	1668DEU	1937FRA
222CHN	483DEU	1156AUT	1441RUS	1563SVN	1619DEU	1669DEU	1938FRA
223CHN	484DEU	1158AUT	1443RUS	1564SVN	1620DEU	1670DEU	1939FRA
224CHN	488GBP	1159ITA	1444RUS	1565SVN	1621DEU	1671DEU	1940FRA
225CHN	489GBP	1160ITA	1445RUS	1566SVN	1622DEU	1672DEU	1941FRA
226CHN	498GBP	1161ITA	1447RUS	1567SVN	1623DEU	1673DEU	1942FRA
227CHN	502GBP	1162AUT	1474NOR	1568SVN	1624DEU	1718RUS	1944CHE
228CHN	506DEU	1163AUT	1475NOR	1569SVN	1625DEU	1734RUS	1945FRA
229CHN	507GBP	1165ITA	1476NOR	1570SVN	1626DEU	1737RUS	1946FRA
230CHN	512GBP	1166ITA	1482NOR	1571SVN	1627DEU	1751RUS	1947FRA
231CHN	520GBP	1167ITA	1483NOR	1572SVN	1628DEU	1763RUS	1948FRA
232CHN	521GBP	1168AUT	1484NOR	1573SVN	1629DEU	1764RUS	1961FIN
233CHN	527GBP	1169AUT	1485NOR	1574SVN	1630AUT	1768RUS	2024FRA
234CHN	528DEU	1170AUT	1486NOR	1575SVN	1631DEU	1773RUS	2025FRA
245SRB	529DEU	1171ITA	1489NOR	1576SVN	1632DEU	1774RUS	2026FRA
248SRB	530DEU	1173ITA	1490NOR	1577SVN	1633DEU	1775RUS	2032KOR
250GBP	531DEU	1174ITA	1493NOR	1578SVN	1634POL	1776RUS	2033KOR
251GBP	532DEU	1175AUT	1494NOR	1579SVN	1635DEU	1777RUS	2035KOR
252GBP	533DEU	1176ITA	1495NOR	1580SVN	1636DEU	1778RUS	2036KOR
253GBP	534DEU	1177AUT	1496NOR	1581SVN	1637RUS	1779RUS	
254GBP	535DEU	1178AUT	1497RUS	1587SVN	1638DEU	1780RUS	
255GBP	536DEU	1179AUT	1498NOR	1588SVN	1639RUS	1811RUS	
256GBP	1026GBP	1249SRB	1499NOR	1589SVN	1640DEU	1812RUS	
257GBP	1027GBP	1251SRB	1500NOR	1590SVN	1641DEU	1813RUS	
258GBP	1028GBP	1288MNG	1501NOR	1591SVN	1642RUS	1814RUS	

Tab. 18: Seznam vzorků a jejich zemí původu použitých pro fylogenetickou analýzu.

Multilokusová analýza 8 „housekeeping“ genů amerického izolátu *B. garinii* pomocí databáze MLST odhalila 100% shodu s jedním izolátem z MLST databáze v genu *pyrG*. Za pomoci RAxML analýzy byla vytvořena analýza, 377 unikátních setů sekvencí genu *pyrG* z komplexu *B. burgdorferi* s.l. Na obrázku 21 je zobrazen fylogenetický strom genu *pyrG* amerického izolátu *B. garinii*.

RAxML analysis of *pyrG* genes
from *B. burgdorferi* sensu lato
377 unique sequences



Obr. 21: Fylogenetický strom pro gen *pyrG* amerického izolátu *B. garinii*.

6. Diskuze

V USA jsou státy středního západu, severovýchodu a severní Kalifornie tradičně uznávány jako tři hlavní oblasti endemické pro LB. Jihovýchod Spojených států se vždy povžoval za region, kde se LB nevyskytuje. Navzdory tomu před pár lety během analýzy vzorků z hlodavců obývajících pobřežní oblasti jihovýchodu USA bylo zjištěno, že až 69% hlodavců bylo přirozeně infikováno *B. burgdorferi* s.l., což naznačuje, že pobřežní státy na jihovýchodě USA mohou také být považované za endemické a představovat riziko nákazou LB pro obyvatelstvo (Oliver et al., 2000).

V souladu s dogmatem amerického CDC (Center for Disease Control and Prevention), *B. burgdorferi* s.s. byla a je za jediného uznávaného původce LB v epidemických oblastech Spojených států, považován druh *Borrelia burgdorferi* s.s. Přirozeně, pokud další druhy borelií nejsou hledány a testovány ve Spojených státech, pak jejich prevalence zůstává neznámá. Ovšem během posledních deseti let další druhy borelie, které jsou odlišné od tradičně uznávaných v USA (např. *B. americana*, *B. andersonii*, *B. bissetii*, *B. carolinensis*), byly nalezené a popsané společně s dříve nepopsanými druhy na jihovýchodě Spojených států (Georgia, Florida a Jižní Karolína) (Oliver, 1996). Tím pádem dochází v současné době k rozšiřování nejen dříve uznávaných oblastí s výskytem spirochét LB na území Spojených států, ale také k rozšiřování existujícího spektra druhů borelií, které zde mohou být nalezeny.

Přítomnost, pro Severní Ameriku, netradičních druhů borelií v jižních státech USA, byla již dříve diskutována (Oliver et al., 2003), a je zřejmé, že rozmanitost druhu spirochét je zde větší než v severních oblastech. Jak už bylo řečeno, nedávné výsledky založené na analýze izolátů borelií získaných z klíšťat, ptáků a hlodavců z jihovýchodu Spojených států, potvrdily přítomnost „evropských“ druhů borelií, *B. garinii* a *B. afzelii* v místních izolátech.

Výše představená práce je logickým pokračováním bakalářského projektu, zabývajícího se přípravou monoklonálních populací *B. garinii* z ko-infekčních severoamerických izolátů s cílem prokázání přítomnosti tohoto druhu borelie běžně se vyskytujících v Evropě, na teritorii Spojených Statů. V bakalářském projektu se nám podařilo získat čistou kulturu *B. garinii* z amerického izolátu a tím prokázat přítomnost „evropského“ druhu borelie na severoamerickém kontinentu (konkrétně v Jižní Karolíně).

Spekulovali jsme, že *B. garinii* mohla být zanesená na pevninu stěhovavými ptáky, a to buď přímo z evropského kontinentu, nebo z mořských ptáků hnízdících na pobřeží Atlantiku.

Jak už bylo řečeno dříve, během posledních deseti let byly zveřejněny četné studie o nálezech *B. garinii* u mořských ptáků a s nimi asociovaných klíšťatech *I. uriae*, v subarktické Eurasii (Comstedt et al., 2009), Arktidě (Larsoo, 2007) u pobřeží Labradoru (Muzaffar et al., 2009), na Gullských ostrovech Newfoundlandu (Baggs, 2011), stejně tak jako na pobřeží Atlantiku u Severní Ameriky (Smith et al., 2006; Bunikis et al., 1996). Mořské klíště *I. uriae* má nejrozsáhlejší geografické rozšíření ze všech druhů klíšťat včetně afro-tropických, australasijských, nearktických, neotropických a paleoarktických zoogeografických oblastí včetně několika ostrovních lokalit v oceánech severního a jižního Tichého oceánu. Navíc tento druh klíšťat parazituje širokou škálu mořských ptáků a žije ve spojení s hostitelskými hnízdy, proto je hostitelem několika virových či bakteriálních činitelů (Muñoz-Lea et al., 2015).

Nicméně, analyzovaný americký izolát *B. garinii* je původem z Jihovýchodního pobřeží Spojených států amerických, kde klíště *I. uriae* nebylo dosud lokalizováno (viz obr. 22).



Obr. 22. Geografické rozložení klíštěte *I. uriae* v Severní Americe (Muñoz-Lea et al., 2015).

Takže se předpokládá, že *B. garinii* nemohla být zanesená na toto pobřeží *I. uriae* mořskými ptáky, jak jsme se domnívali dříve. Nicméně, infikované ptáky samotné bychom neměli vyloučit jako zdroj nákazy. Jak jsme zjistili, americký izolát *B. garinii* je spíše bližší k japonským izolátům *B. garinii* nežli k evropským. Detailní fylogenetická analýza, kterou jsme provedly v této práci, ukazuje, že americký izolát *B. garinii* patří ke skupině *B. garinii*, která je spojena s hlodavci. BEAST analýza 8 housekeeping genů dále potvrdila příbuznost analyzovaného izolátu *B. garinii* s japonskými izoláty, spojenými s hlodavci jako hostitele a ne ptáky, tradičně uznávané rezervoáry tohoto druhu spirochét. Takže v tomto případě se mohlo jednat o jediný možný trans-oceánský přenos a to pomocí hlodavců, kteří se nacházeli v dopravních lodích plujících z Japonska do Ameriky společně s lidmi při jejich cestách před pár stoletími.

V této práci jsme se zabývali zkoumáním patogenního potenciálu zjištěného kmenu na modelu laboratorních myši. Samozřejmě je ještě brzy na diskuzi o důležitosti těchto zjištění z hlediska vlivu na veřejné zdraví, ale námi prokázaná schopnost amerického klonu *B. garinii* nakazit laboratorní myši a taktéž průkaz trans-stadiálního přenosu spirochét z larev do nymf a schopnost nakazit čisté myši by mohly být prvním krokem v prokázání patogenního potenciálu amerického izolátu *B. garinii* pro člověka.

Podařilo se nám prokázat, že americký izolát *B. garinii* po nákaze nymf *I. ricinus* a přenosu na naivní myši se mohl rozšířit do různých myších orgánů. Toto zjištění osvědčuje patogenní potenciál tohoto izolátu. Prokázaná schopnost amerického *B. garinii* šířit se do hostitelských tkání hostitelů stejným způsobem jako kontrolní invazivní kmen *B. burgdorferi* s.s. (B31), o němž je známo, že je odpovědný za závažné onemocnění u lidí na celém světě, zvyšuje riziko možného onemocnění lidí v jihovýchodní USA, v regionu, kde jsou studované kmeny rozšířeny.

Dále jsme se zabývali izolací a charakterizací dalšího „evropského“ druhu borelie nalezeného ve stejné lokalitě jihovýchodních Spojených států, *B. afzelii*. Podařilo se nám rozdělit původní izolát – směsici (ko – infence) tří druhů borelií, a to *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (dobře známého druhu ve Spojených státech) a „evropské“ *B. afzelii* a *B. garinii*.

Dr. Lubbe a spol. před časem uveřejnil zprávu o izolaci kmene *B. afzelii* ze vzorku 32 letého pacienta z Kalifornie (USA), který vykazoval příznaky *acrodermatitis chronica atrophicans*. Tyto příznaky jsou běžné u pacientů s chronickou boreliózou v Evropě, ale jsou velice zvláštní u pacientů v Severní Americe. Serologické vyšetření potvrdilo infekci *B. burgdorferi* s.l. Další analýzy prokázaly přítomnost *B. afzelii* v kloubním fibroidu (Lubbe et al., 1995). Bylo to první potvrzení přítomnosti *B. afzelii* u amerického pacienta. Přičemž pacient nikdy nehlásil, že cestoval do Evropy, ale také nikdy neměl přísáté klíště, což znemožnilo přesné určení místa nákazy. Jelikož byl ale pacient HIV-pozitivní a přiznával homosexuální styky s několika partnery, je zde možnost předání těchto spirochét touto cestou.

Nicméně, později, v roce 2013, skupina Evy Sapi z Univerzity v New Haven (USA) opublikovala výsledky fylogenetické analýzy genu kodujícího CTP syntáze (600 bp) z 51 izolátů borelie z krve amerických pacientů. Spolu s velkým množstvím *B. burgdorferi* s.s. DNK *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. kurtenbachii* byly také zjištěné (*B. garinii* + (N=5); *B.*

afzelii + (N+1); *B. kurtenbachii* + (N=3), z čehož můžeme vyvodit výsledek, že oba „čistě evropské“ druhy borelie již mohly být usazené na americkém kontinentu, což potvrzují i naše výsledky. (Sapi et al., 2013).

Už dříve bylo prokázáno, že *B. afzelii* původně asociovaná jen s hlodavci, může být také přenášena i ptáky (Sparagano et al., 2015, Geller et al., 2013, Kjelland et al., 2010, Lommano et al., 2014). Kromě toho, v poslední době se stále častěji objevují zprávy o výskytu v oblastech hnízdění mořských ptáků různých teplokrevných obratlovců, kteří můžou působit jako celoroční rezervoáry pro borelie v oblastech hnízdění mořských ptáků. Například, na ostrovech Newfoundland a Labrador byl nedávno potvrzen výskyt velkého počtu křečka dlouhoocasého (*P. maniculatus*) a dalších malých savců, kteří by mohli být možnými hostitelskými rezervoáry jak pro *B. garinii*, tak i *B. afzelii* (Baggs et al., 2011). To znamená, že spirochéty borelií, které byly zjištěné u mořských ptáků hnízdících v blízkosti nebo přímo na pobřeží Severní Ameriky, mohou být zanesené na pevninu infikovanými stěhovavými ptáky, nebo infikovanými hlodavci. Eventuálně, mohla *B. afzelii* přistěhovat do Spojených států stejným způsobem, jako *B. garinii*, a to s lidmi. Další detailní analýza amerického izolátu *B. afzelii* je zapotřebí ke zjištění jeho původu a „cesty“ do Ameriky.

Oba americké izoláty „evropských“ druhů borelie byly získané z hlodavců volně žijících v USA. Znamená to, že tyto druhy borelie již nějakou dobu kolují mezi vektory a hostitele a jsou udržované v přírodě. Jak bylo zmíněno v úvodu práce, k vytvoření a udržení klíšťaty přenášeného patogenního cyklu jsou nezbytné tři faktory: patogen samotný, vektor a hostitel. Obvykle mají tyto tři složky poměrně složitý vztah včetně faktorů, jako je vektorová kompetence pro daný patogen. Kompetence přenašeče amerického klíštěte *I. scapularis* pro *B. garinii* v hlodavcích již byla potvrzena (Dolan et al., 1998). Co se týče *B. afzelii*, nikdy nebylo jednoznačně prokázáno, že americké klíšťata *I. scapularis* nebo *I. pacificus* nemohou zachovávat a předávat *B. afzelii*. Takže pokud se nikdy neprokázalo, že klíšťata, která se běžně vyskytují ve Spojených státech, nemohou zachovávat a předávat *B. afzelii*, pak stále tato možnost existuje a přirozeně, pokud nejsou tyto druhy *Borrelia* hledány nebo testovány v USA, pak by jejich prevalence zůstala neznáma.

Už dříve bylo naznačeno, že zařazení *B. garinii* a *B. afzelii* do cyklu zahrnujícího klíšťata *I. scapularis* a jejich potenciální udržení v tomto cyklu, bude záviset na genetické

populaci a rozmanitosti kmenů těchto „evropských“ druhů borelií (Smith et al., 2006). V tomto ohledu má objevení *B. garinii* a *B. afzelii* v izolátech z hlodavců z Jižní Karolíny velký význam. Zdá se, že uvedení *B. garinii* a *B. afzelii* do populace amerických savců a ptáků už může být v současnosti probíhajícím procesem, a to v důsledku klimatických změn a jiných přírodních a globalizačních faktorů.

Na laboratorních modelech myši jsme prokázali, že oba americké izoláty „evropských“ druhů *B. garinii* a *B. afzelii* byly schopné nakazit myši a larvální stadia nasátých klíšťat si ponechaly infekci do dalšího vývojového stadia nymf. Námi získané důkazy o existenci a cirkulaci *B. garinii* a *B. afzelii* na severoamerickém kontinentu mají velký význam nejen pro pochopení složité ekologie borelií na jihovýchodě Spojených států, ale také pro přehodnocení stávajícího dogmatu o přesném rozdělení kmenů LB borelií na americké a čistě evropské. Bylo jen otázkou času, než některý z „evropských“ kmenů borelie se objeví ve Spojených státech a vzhledem k této situaci nalezení ko – infekce v izolátech borelií s „evropskými“ druhy na jihovýchodě států je pouze logickým pokračováním v rozvíjejícím se trendu.

Samozřejmě je ještě stále brzy na diskuze o důležitosti těchto zjištění z hlediska vlivu na veřejné zdraví. To bude záviset na patogenním potenciálu zjištěných kmenů pro člověka. Tento patogenní potenciál musí být předmětem dalších výzkumů, jelikož popsane druhy se vyskytují v prostředí, kde jsou lidé vystaveni riziku infekce. Pokud se prokáže, že popsane americké izoláty mají patogenní potenciál pro člověka, mohlo by to vést k potvrzení existenci v Severní Americe LB s významně odlišnými příznaky.

7. ZÁVĚR

- Pomocí metody kultivace borelie na pevné půdě se nám podařilo úspěšně separovat dva „evropské“ druhy borelie z ko – infekčního izolátu, a to *B. garinii*. a *B. afzelii*.
- Poprvé se nám podařilo získat monoklonální kulturu *B. afzelii* z amerického izolátu a tím prokázat přítomnost tohoto druhu borelie na jihovýchodě Spojených států Amerických (konkrétně v Jižní Karolíně).
- Pomocí multilokusové typizace vybraných úseků genomu amerického izolátu *B. afzelii* SCCH – 7/22 se nám podařilo úspěšně prokázat, že charakterizovaný americký izolát definitivně patří k druhu *B. afzelii*.
- *B. afzelii* mohla být zanesená na pevninu stěhovavými ptáky z evropského kontinentu, nebo mohla být zanesená společně s hlodavci.
- Bezpochybná přítomnost *B. afzelii* v jihovýchodních Spojených státech Amerických může mít velký dopad na veřejné zdraví lidské populace v regionech, kde je tenhle druh rozšířen.
- Dále se nám povedlo prokázat, že infikované larvy klíšťat, a to kompetentního pro *B. burgdorferi* s.l. vektoru *I. ricinus* přenášejí infekci *B. garinii* a *B. afzelii* do dalšího vývojového stádia (nymfy), které pak jsou schopné infikovat laboratorní myši. Schopnost obou druhů spirochét proniknout do vnitřních orgánů hostitele a vyvolat systémovou infekci potvrzuje infekční potenciál amerických klonů *B. afzelii* a *B. garinii*.
- Fylogenetická analýza potvrdila příbuznot amerického izolátu *B. garinii* pocházejícího z hlodavce izoláty z Japonska a Číny a potvrdila, že zemí původu tohoto klonu je Japonsko.
- Fylogenetická analýzy potvrdila příbuznost amerického izolátu *B. afzelii* s jinými izoláty *B. afzelii* z Evropy.

8. LITERATURA

Baggs E. M., Stack S. H., Finney-crawley J. R., & Simon N. P. P. (2011): *Peromyscus maniculatus*, a Possible Reservoir host of *Borrelia garinii* from the Gannet Islands off Newfoundland and Labrador; *J. Parasitol.* 97, 792–794.

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

Bengis G., Leighton F. A., Fischer J. R., Artois M., Mörner T., Tate C. M. (2004): The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses; *Rev. Sci. Tech.* 23, 497-511.

Brownstein J. S., Holford T. R., Fish D. (2005): Effect of Climate Change on Lyme disease Risk in North America; *Ecohealth.* 2, 38-46.

Bunikis J., Garpmo U., Tsao J., Berglund J., Fish D., Barbour A. G. (2004): Sequence typing reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents *Borrelia burgdorferi* in North America and *Borrelia afzelii* in Europe; *J. Clin. Microbiol.* 150, 1741–1755.

Bush U., Hizo-Teufel H., Boehmer R., Fingerle V., Nitschko H., Wilske B., Preac-Mursic V. (1996): Three Species of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato (*B. burgdorferi* Sensu Stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*) Identified from Cerebrospinal Fluid Isolates by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and PCR; *J. Clin. Microbiol.* 34, 1072-1078.

Canica M. M., Nato F., du Merle L., Mazie J. C., Baranton G., Postic D. (1993): Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis; *Scand. J. of Infect. Dis.* 25, 441-448.

Center for Disease Control and Prevention (CDC) (2003): Multistate outbreak of monkey-illness, Indiana, Kansas, Missouri, Ohio, and Wisconsin; *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 13, 537-540.

Clark L. K., James H. O., John M. G., Angela M. J., Lance A. D., Craig W. B. (2001): Host associations of tick parasitizing rodents at *Borrelia burgdorferi* enzootics sites in south Carolina; J. Parasitol. 87, 1379 – 1386.

Clark K., Hendricks A., Burge D. (2005): Molecular identification and analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lizards in the southeastern United States; Appl. Environ. Microbiol. 71, 2616-2625.

Clark L. K., Leydet B., Hartman S. (2013): Lyme Borreliosis in Human Patients in Florida and Georgia, USA; Int. J. Med. Sci. 10, 915 – 931.

Comstedt P. (2008): Biology of *Borrelia garinii* Spirochetes; 1161, ISSN 0346-6612.

Comstedt P., Asokliene L., Eliasson I., Olsen B., Wallensten A., Bunikis J. (2009): Complex population structure of Lyme borreliosis group spirochete *Borrelia garinii* in subarctic Eurasia; PLoS One. 4, 5841.

Comstedt P., Jakobsson T., Bergstro S. (2011): Global ecology and epidemiology of *Borrelia garinii* spirochetes; Infection Ecology and Epidemiology. 1, 9545.

Craig A., Scherf A. (2003): Antigenic Variatin. ISBN: 9780121948511.

Damaerschack I., Ben Messaoud A., De Kesel M., Hoyois B., Lobet Y., Hoet P., Bigaignon G., Bollen A., Godfroid E. (1995): Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of lyme disease patients; J. Clin. Microbiol. 33, 602-608.

Dolan M. C., Piesman J., Mbow M. L., Maupin G. O., Péter O., Brossard M., Golde W. T. (1998): Vector competence of *Ixodes scapularis* and *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) for three genospecies of *Borrelia burgdorferi*; J. Med. Entomol. 35, 465–470.

Dubska L., Litera I., Kocianova E., Taragelova V., Synchron O. (2009): Differential Role of Passerina Birds in Distribution of *Borrelia* Spirochetes, Based on Data from Ticks Collected from Birds during the Postbreeding Migration Period in Central Europe; Appl. Environ. Microbiol. 75, 596-602.

Franke J., Moldenhauer A., Hildebrandt A., Dorn W. (2010): Are birds reservoir hosts for *Borrelia afzelii*?; Ticks and Tick-Borne Dis. 1, 109-112.

- Fukunaga M., Sohnaka M., Takahashi Y., Nakao M., Miyamoto K. (1993):** Antigenic and Genetic Characterization of *Borrelia* Species Isolated from *Ixodes persulcatus* in Hokkaido, Japan; J. Clin. Microbiol. 31, 1388-1391.
- Geller J., Nazarova L., Katargina O., Levits A., Järvekülg L., Golovljova I. (2013):** Tick-Borne Pathogens in Ticks Feeding on Migratory Passerines in Western Part of Estonia; Vector Borne Zoonotic Dis. 13, 443-448.
- Gern L., Siegentaler M., Hu C. M., Leuba-Garcia S., Humair P. F., Moret J. (1993):** *Borrelia burgdorferi* in rodents (*Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus*): Duration and enhancement of infectivity for *Ixodes ricinus* ticks; Eur. J. Epidemiol. 10, 75-80.
- Gern L., Humair P. F. (2002):** Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. Lyme borreliosis biology, epidemiology and control; CAB International. 149-174.
- Glöckner G., Lehman R., Romualdi A., Pradel S., Schulte-Spechtel U., Schilhabel M., Wilske B., Sühnel J., Platzer M. (2004):** Comparative analysis of the *Borrelia garinii* genome; Nucleic Acids Res. 32, 6038-6046.
- Gómez-díaz E., Boulonier T., Sertour N., Cornet M., Ferquel E., McCoy K. D. (2011):** Genetic structure of marine *Borrelia garinii* and population admixture with the terrestrial cycle of Lyme borreliosis; Environ. Microbiol. 13, 2453–2467.
- Hanincova K., Taragelova V., Koci J., Schafer S. M., Hails R., Ullman A. J. (2003):** Associated of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia; Appl. Environ. Microbiol. 69, 2825-2830.
- Hasle G., Bjune A. G., Midthjell L., Røed H. K., Leinaas P. H. (2011):** Transport of *Ixodes ricinus* infected with *Borrelia* species to Norway by northward-migrating passerine birds; Ticks Tick-Borne Dis. 2, 37-43.
- Heylen D., Tijssse E., Fonville M., Matthysen E., Sprong H. (2012):** Transmission dynamics of *Borrelia burgdorferi* s.l. in a bird tick community; Environ. Microbiol. 15, 663-673.
- Heylen D., Sprong H., Krawczyk A., Van Houtte N., Genné D., Gomez-Chamorro A., van Oers K., Voodrouw M. J. (2017):** Inefficient co-feeding transmission of *Borrelia afzelii* in two common European songbirds; Sci. Rep. 10, 1038.

Ishiguro F., Takada N., Masuzawa T., Fukui T. (2000): Prevalence of Lyme Disease *Borrelia* sp. In Ticks from Migratory Birds on the Japanese Mainland; Appl. Environ. Microbiol. 66, 982-986.

Janovská D. (2006): Epidemiologická situace v České republice, pp14-22, In Bartůněk P., Lymeská borrelióza, Grada Publishing, Praha. 3. vyd.

Jenkis P. T., Genovese K., Ruffer H. (2007): Broken Screens: the Regulation of live animal transportation in the United States; Defenders of Wildlife. pp 56.

Jungnick S., Margos G., Rieger M., Dzaferovic S., Overzier E., Silaghi C., Walder G., Wex F., Koloczek J., Sing A., Fingerle V. (2015): *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii*: population structure and differential pathogenicity; Inter. J. Med. Microbiol. 305, 673-681.

Kamari A. (2012): Lyme disease. In Tech. 2, 27-30.

Kjelland V., Stuen S., Skarpaas T., Slettan A. (2010): *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected from migratory birds in Southern Norway; Acta Vet. Scand. 52, 59.

Kosik-Bogacka D. I., Kuźna-Grygiel W., Jaborowka M. (2007): Tick and mosquitoes as vectors of *Borrelia burgdorferi* sl in the forested areas of Szczecin; Folia Biologica. 55, 143-146.

Kurtenbach K., De Michelis S., Etti S., Schäfer M. S., Sewell H. S., Brade V., Kraiczky P. (2002): „Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato – the key role of host complement; Trends in Microbiology. 10, 74-79.

Larsson C., Comstedt P., Olsen B., Bergstrom S. (2007): First record of Lyme disease *Borrelia* in the Arctic; Vector Borne Zoonotic Dis. 7, 453–456.

Lommano E., Dvořák Ch., Vallotton L., Jenni L., Gern L. (2014): Tick-borne pathogens in ticks collected from breeding and migratory birds in Switzerland; Ticks Tick-borne Dis. 5, 871-882.

Lubbe J., Schüpen E. M., Fierz W. (1995): Identification of *Borreallia afzelii* in a Juxta-articular Fibroid Nodule from a Human Immunodeficiency Virus-Positive Patient With Acrodermatitis Chronica Atrophicans; Arch. Dermatol. 131, 1341-1342.

Magnarelli L. A., Anderson J. F. (1988): Ticks and biting insects infected with the etiologic agent of Lyme disease: *Borrelia burgdorferi*; J. Clin. Microbiol. 26, 1482-1486.

Margos G., Gatewood A. G., Aanensen D. M., Hanincová K., Terekhova D., Vollmer S. A., Cornet M., Piesman J., Donaghy M., Bormane A., Hurn M. A., Feil E. J., Fish D., Casjens S., Wormser G.P., Schwartz I., Kurtenbach K. (2008): MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105, 8730-8735.

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

Masuzawa T. (2004): Terrestrial Distribution of the Lyme Borreliosis Agent *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in East Asia; Jpn. J. Infect. Dis. 57, 229-235.

Miyamoto K., Masuzawa T. (2002): Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Japan and East Asia; Lyme borreliosis biology, epidemiology and control; CAB International. 201-222.

Munro J. H., Ogden H. N., Lindsay L. R., Robertson J. G., Whitney H., Lang A. S. (2017): Evidence for *Borrelia bavariensis* Infections of *Ixodes uriae* within Seabird Colonies of the North Atlantic Ocean; Appl. Environ. Microbiol. 83, 1087-2017.

Murase Y., Konnai S., Githaka N., Hidano A., Taylor K., Ito T., Takano A., Ando S., Kawabata H., Tsubota T., Murata S., Ohashi K. (2013): Prevalence of Lyme *Borrelia* in *Ixodes persulcatus* Ticks from an Area with a Confirmed Case of Lyme Disease; J. Vet. Med. Sci. 75, 215-218.

Muñoz-Leal S., González-Acuña D. (2015): The tick *Ixodes uriae* (Acari: Ixodidae): Hosts, geographical distribution, and vector roles; Tick Tick-Borne Dis. 6, 843-868.

Muzaffar S. B. (2009): Helminths of Murres (Alcidae: *Ura* spp): Markers of Ecological Change in the Marine Environment; J. Wildl. Dis. 45, 672-683.

Netušil J., Žáková A., Vostal K., Norek A., Stanko M. (2013): The occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in central ectoparasites (Mesostigmata, Siphonaptera) of

Apodemus flavicollis and *Myodes glareolus* in chosen localities in the Czech Republic; Acta Parasitol. 58, 337-341.

Ojaimi C., Davidson B. E., Saint Girons I., Old I.G. (1994): Conservation of gene arrangement and an unusual organization of rRNA genes in the linear chromosomes of the Lyme disease spirochaetes *Borrelia burgdorferi*, *B. garinii* and *B. afzelii*; Microbiology. 140, 2931-2940.

Oliver Jr., J. H. (1996): Lyme borreliosis in the southern United States: A Review; J. Parasitol. 82, 926–935.

Oliver Jr., J. H., Clark K. L., Chandler, F. W., Jr., Lin T., James A. M., Banks C. W., Huey L. O., Banks A. R., Williams D. C. & Durden L. A. (2000): Isolation, Cultivation, and Characterization of *Borrelia burgdorferi* from Rodents and Ticks in the Charleston Area of South Carolina; J. Clin. Microbiol. 38, 120 – 124.

Oliver Jr., J. H., Lin T., Gao L., Clark K. L., Banks C. W., Durden L. A., James A. M., Chandler F. W. Jr. (2003): An enzootic transmission cycle of Lyme borreliosis spirochetes in the southeastern United States; Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 100, 11642–11645.

Olsén B., Jaenson T. G., Bergström S. (1995): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infected ticks on migrating birds; Appl. Environ. Microbiol. 61, 3082–3087.

Pavlin B. I., Schoegel L. M., Daszak P. (2009): Risk of importing zoonotic disease through wildlife trade; Emerg. Infect. Dis. 15, 1721-1726.

Picken R. N. (1992): Polymerase chain reaction primers and probes derived from *flagellin* gene sequences for specific detection of the agents of Lyme disease and North American relapsing fever; J. Clin. Microbiol. 30, 99-114.

Pfeffer M., Dobler G. (2010): Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration; Parasites & Vectors. 3, 35.

Oennis D: Epidemiology, ecology, and prevention of Lyme disease, in Rahn D, Evans J (eds): Lyme Disease. Philadelphia: American College of Physicians, 1998:7-34.

Rahn D., Evans J. (1998): Lyme Disease. Philadelphia, PA: American College of Physicians.

Rauter C., Hartung T. (2005): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a Metaanalysis; Appl. Environ. Microbiol. 71, 7203-7216.

Richter D., Matuschka F. R. (2006): Perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia lusitaniae* by lizards; Appl. Environ. Microbiol. 72, 4627-4632.

Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L., Oliver Jr., H. J. (2011): Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health; Ticks and tick-borne Dis. 2, 123-128.

Ruzic – Sabljic E.: Cultivation of *Borrelia* from clinical samples. Institute of Microbiology and Immunology. Ljubljana. Slovenia. Protocol.

Saier M. H., Garcia-Lara J. (2002): The Spirochetes: Molecula and Cellular Biology; Int. Microbiol. 5, 43-44.

Sappi E., Pabbati N., Datar A., Davies E. M., Rattelle A., Kuo B. A (2013): Improved Culture Conditions for the Growth and Detection of *Borrelia* from Human serum; Int. J. Med. Sci. 10, 362-376.

Schüler W., Bunikis I., Weber-Lehman J., Comstedt P., Kutschan-Bunikis S., Stanek G., Huber J., Meinke A., Bergström S., Lundberg U. (2015): Complete Genome sequence of *Borrelia afzelii* K78 and Comparative genome Analysis; Plos One. 10, 1371.

Spandidoa A., Wang X., Wang H., Seed B. (2010): PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification; Nucleic Acids Res. 38, D792-D799.

Saragano O., George D., Giangaspero A., Špitalská E. (2015): Arthropods and associated arthropod-borne disease transmitted by migrating birds. The case of ticks and tick-borne pathogens; Vet. Parasitol. 213, 61-66.

Smith Jr., R. P., Muzaffar S. B., Lavers J., Lacombe E. H., Cahill B. K., Lubelczyk C. B., Rand P. W. (2006): *Borrelia garinii* in seabird ticks (*Ixodes uriae*) from the Atlantic coast of North America; Emerg. Infect. Dis. 12, 1909–1912.

Strele F., Ružić-Sabljić E., Cimperman J., Lotrič-Furlan S., Maraspin V. (2006): Comparison of findings for patients with *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* isolated from cerebrospinal fluid. Clin. Infect. Dis. 43, 704-710.

Sutherst W. R. (2004): Global Change and Human Vulnerability to Vector-Borne Disease; Clin. Microbiol. Rev. 17, 136-173.

Takano A., Nakao M., Masuzawa T., Takada N., Yano Y., Ishiguro F., Fujita H., Ito T., Ma X., Oikawa Y., Kawamori F., Kumagai K., Mikami T., Hanaoka N., Ando S., Honda N., Taylor K., Tsubota T., Konnai S., Watanabe H., Ohnishi M., Kawabata H. (2011): Multilocus Sequence Typing Implicates Rodents as the Main Reservoir Host of Human-Pathogenic *Borrelia garinii* in Japan; J. Clin. Microbiol. 49, 2035-2039.

Tatarn A. J., Rogers D. J., Hay S. I. (2006): Global Transport Networks and Infectious Disease Spread; Adv. Parasitol. 62, 293-343.

Tonetti N., Voordouw M., Durand J., Monnier S., Gern L. (2015): Genetic variation in transmission success of the Lyme borreliosis pathogen *Borrelia afzelii*; Ticks Tick-Borne Dis. 6, 334-343.

Wang G., Alje P., van Dam P. A., Schwartz I., Dankert J., (1999): Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato: Taxonomic, Epidemiological, and Clinical Implications; J. Clin. Microbiol. 12, 633 – 653.

Internetové zdroje:

Centers for Disease Control and Prevention. Data and statistics ©: Dostupné z: <http://www.cdc.gov/lyme/stats/index.html>. Citováno 4. 1. 2018.

Rosa, P.: NIAID, Laboratory of Molecular Genetics; web page: http://www.niaid.nih.gov/LabsAndResources/labs/aboutlabs/lzp/molecularGeneticsSection/Documents/lzp_recipes.pdf. Citováno 14. 2. 2018.

BLAST®: Basic Local Alignment Search Tool; web page: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Citováno 20. 3. 2018.

MLST: Multi Locus Sequence Typing web page: <http://www.mlst.net/>. Citováno 4. 4. 2018.

RAxML: Randomized Axelerated Maximum Likelihood; web page: <https://sco.hits.org/exelixis/web/software/raxml/index.html>. Citováno 13. 4. 2018

BEAST: Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees; web page: <http://beast.community/>. Citováno 15. 4. 2018.

9. POUŽITÉ ZKRATKY

LB – lymeská borelióza

bp – báze

BSK – Barbour – Starry – Kelly medium

MKP – Modified Kelly-pettenkofer medium

B. burgdorferi s.l. – *Borrelia burgdorferi* sensu lato

B. burgdorferi s.s. – *Borrelia burgdorferi* sensu stricto

ospA, *ospC*, – vnější povrchové proteiny A, C,

EM – erythema migrans

ACA - acrodermatitis chronica atrophicans

DNK – deoxyribonukleová kyselina

gDNK – genomová DNA

I. ricinus – *Ixodes ricinus*

I. scapularis – *Ixodes scapularis*

I. persulcatus - *Ixodes persulcatus*

I. uriae – *Ixodes uriae*

TBE - Tick – Borne Encephalitis/ klíšťová encefalitida

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

WHO – World Health Organization

RFLP - Restriction fragment length polymorphism

USA - United States of America

MLST- Multilokusová sekvenační typizace

PCR - Polymerase Chain Reaction

TAE – Tris – acetate - EDTA

BSA – bovin serum albumin

TBS - Tris-Buffered Saline

AA – akrylamid

APS – amonumpersulfát

TEMED – tetramethyletenyl – enediamine

ml – mililitr

μ l – mikrolitr

HCl – kyselina chlorovodíková

NaOH – chlorid sodný

IgG – imunoglobín G

10. PŘÍLOHY

Přílohy č. 1

Nukleové sekvence izolátu SCCH -7/22:

1. Částečná sekvence genu pro ospA

AAGAGCTTAAAGGAACTTCTGATAAAGACAATGGTTCTGGAGTGCTTGAAGGT
ACAAAAGATGACAAAAGTAAAGCAAAATTAACAATTGCTGACGATCTAAGTA
AAACCACATTCGAACTTTTCAAAGAAGATGGCAAAACATTAGTGTCAAGAAAA
GTAAGTTCTAAAGACAAAACATCAACAGATGAAATGTTCAATGAAAAAGGTG
AATTGTCTGCAAAAACCATGACAAGAGAAAATGGAACCAAACCTGAATATAC
AGAAATGAAAAGCGATGGAACCGGAAAAGCTAAAGAAGTTTTAAAAAAGCTTT
ACTCTTGAAGGAAAAGT – 331 pb

2. Částečná sekvence genu pro p66

CTTGATCAAAACGAAGATACTCAATCTGTAATTGCAGAAACACCTTTTGAATT
AAACTTTGGCTTATCAGGAGCTTATGGAAATGAAACATTCAATAATTCATCAA
TAACATACTCTTTAAAAGATAAATCCCTAATTGGTAACGATTTATTAAGCCCAA
CTTTATCAAATTCTGCAATTTTGGCATCTTTTGGAGCTCAATATAAGCTTGGAT
TAACAAAATCAATAATAAAAATACCTATCTTATTTACAAATGGGTACTGATT
TTGGAATAGATCCTTTTGGCAAGCGATTTTCTGTATTTGGACACATCTCAAAG
CAGCAAATTTGAAAAAAGGAATATCCTTAGATCCTAGTAAAAAAGCCGAGGAT
ATATTTGATCCAAATGGCAATGCCCTTAATTTCAATAAAAATACAGAACTAGG
CA – 430 bp

3. Částečná sekvence genu pro flagellin

ACTCAGACAGAGGTTCTATACAGATTGAAATAGAGCAACTTACAGACGAAATT
AATAGAATTGCTGATCAGGCTCAATATAACCAAATGCACATGTTGTCAAACAA
ATCTGCTTCCCAAATGTAAAACAGCTGAAGAGCTTGGAAATGCAGCCTGCAA
AAATTAACACACCAACATCACTTTCAGGGTCTCAGGCTTCTTGGACTTTAAGAG
TTCATGTGGGAGCAAATCAAGATGAAGCAATTGCTGTAAATATTTATTCAGCT
AATGTTGCAAATCTTTTGGCTGGTGAGGGAGCTCAAGCTGCTCAGGCTGCACCT

GTTCAAGAGGGTGCTCAAGAAGAAGGAGCTCAGCAACCAACACCTGCTACAG
CACCTACTCAAGGTGGAGTTAATTCTCCTGTTAATGT – 409 bp

4. Částečná sekvence genu pro 16S-23S

TGAAGGTGCTGTAGCAGGTGCTGGCTGTTGAGCTCCTTCCTGTTGAACACCCTC
TTGAACCGGTGCAGCCTGAGCAGTTTGAGCTCCCTCACCAGAGAAAAGATTTG
CAACATTAGCTGCATAAATATTTACAGCAATAGCTTCATCTTGGTTTGCTCCAA
CATGAACTCTTAAAGTCCAAGACGCTTGAGACCCTGAAAGTGATGCTGGTGTG
TTAATTTTTGCAGGCTGCATTCCAAGCTCTTCAGCTGTTCTTACATTTTGAGAA
GCAGATTTGTTTGATAACATGTGCATTTGGTTATATTGGGCTTGATCAGCAATT
CTATTAATTTTCGTCTGTAAGTTGCTCTATTTCAATTTGTATAGAACCTCTGTCTG
CATCTGAATATGT–390 bp

5. Částečná sekvence genu pro clpA

GATTTCTTCCAGACAAAGCTTTTGATATTTTAGATGAACTGGGTCTAAGTTTA
AGCTTGAAAACATAAAAAGGATCATAACAAAAGATGATGTTTGTGATCTGATT
AAGTCTATTGTTGGCTCTAATATTTTTAATTTTGAAGAGTATAATAGCGAATTG
TTAATTAATTTGGAAAATAGAATAAAAAAAGAATTCATTATACATGATAGTTT
AGTATTTGATTTGATATTAATATAAAATTATTAATAATTCAATTTACTTGCCAA
TAGAAGTACTATTGGCATATTTGCTTTTATTGGTGCTTCTGGAGCGGAAAATG
CAAATTGACGGATATTTTATCAGAAGAGTTTAAAATTCCGAAATTTAATCTTAA
TATGGGCGAGTATAGTGATTTTACTTCTCTTGATAGATTGATTGGCCCTGTTTT
AAGTAATGATGGGTATTATGAATCTACTAGATTTTTCAAATTTTTAAACAAATC
TTCTAATTCTATTATTTTCCATCAGATTTTGATAAATGTAATAAAAGGGTTTTA
GATTTTTTTTTAGAGGGGTTTAGAACTGGCAAGCTTTTTGATGGTCTTGGGAAA
AAGGTGAGCTTGTCAGAAAGTTTAATAGTAATAAGTGTCAATGCTGAGAGTAA
TGAGCTTAATAGTATTGGCTTTAAAATAAAAATGGCAGGGGAAAATGATTTTG
ATCTTATCTTAGAGAAGAGATCCCCAATGAATTTTTAGAGTTAATAGATTATG
TGTTTGTATTTAAATCTATTGATGAGTTAGATTTTGAAAAAATCATTTTTAATG
AGCTTAATCGTTTTGCTAGAATGTTAAGAGATAGAAAATTTGATGTTTTTTTTG
AAAAAAGTGTGTTGATTATATTCGGGAAAAGATTTCTGGAAAAGGTTATGGA
TTAAAAGTGTTAAAAG – 923 bp

6. Částečná sekvence genu pro *clpX*

CTGCAGAGATGAATGTGCCATTTGCAATAGCAGATGCTACAACCTTTGACAGAA
GCTGGATATGTTGGTGAGGATGTAGAAAATATTTTACTTAAATTGATACATGCT
GCTCATGGGGATGTTAGTCTAGCTGAGAAAGGGATTATTTATATAGATGAAAT
AGATAAAATTGCTAAAAAAAATGAAAACGTTTCAATAACAAGAGATGTGTCTG
GAGAAGGGGTTCAACAAGCTTTGTTAAAGATAATCGAGGGTACTATTGCTAAT
GTTCCCCCAAGAGGTGGTAGGAAACATCCTTATGAGGATACTATTGAAATTAA
TACTCAAATATACTCTTTATATGTGGTGGTGCTTTTGTGGGCTTGAAAATAT
TGTTAAGAATCGAATAAATAAAAGTTCTATTGGGTTTTTCAGCAATTGAAAAAA
AGAATATAAGAGATGACTTCATTAAGTATTTGGAAATGGAAGATTTGATT
AAATTTGGTTTAATACCAGAGTTTGTGGTAGACTTCCTGTGCATTCGTATCTT
GAAAAGCTAAGTAAAGAAGATTTGATTAAAATATTAGTTGATCCTCAAATTC
TATTGTTAAGCAGTATTATCATATGTTTAAAATGGACAATGTTGAATTAGTCTT
TGAAAAAGATGCTTTAGAATCAATTGTAGATGAGGCTATTTTAAAAAATACTG
GAGCAAGAGGCCTTAGATCTATTTTAGAGGGTCTTCTTAAAGATGTTATGTTTG
AGGTTCCCTTCGATTAGTAAGACTAAGAAGGTTATTGTTACAAAAGAATCTGTTT
TGAATGCAGATATTAACCCATTAATTTTGGTGGGGAATGC – 841 bp

7. Částečná sekvence genu pro *nifS*

CACAAATAAAAAGCAATACTGAAAAGGTCAAGTTTTTAAGACAAGATTTTCCT
ATTTTAAATAAACAGTTTGACAATAAGCATATAATTTATTTTGACAATGCAGCA
ACATCTCAAAAACCCAAAAAAGTAATTTATTCAAGCATTGAATATTATGAAAA
TTATAACGCAAATGTACACAGAAGCGGTCACAAATTTGCAATTCAATCTAGCA
TAAAAATAGAAAAACAAGAGAACTTGTGAAAAATTTTCAATTAATGCAGAATCT
GCAAAAAATATAATATTTACCTCTGGAACCTACAGATGGAATTAATTCTGTTGC
AAACTCATTTTTTTACTCAAATACTTTAAAAAAAAGATGAAATTATTCTTAC
AACTCTCGAACATAATAGTAATTTGCTCCCGTGGGCAAATCTTGCAAATTTAGC
TAATCTAACAAATTAATTTGCTAAATTTAATGAAATGGGAATTATTACTCCTGA
AGAAATTGAAAAACTTATTACAGAAAAACAAAGCTCATCAGTATTTTCAGGAA
TAAATAATACCTTGGGAACCATTAATGATCTAGAATCTATTGGAAAAATCGCA
AAAAAATACAATATAAGTCTTTTTGTAGATGCTGCGCAAATGGCACCTCATAT

GAAAATAGATGTTAAAAAATTGGCTGTGACTTCTTGGTATTTTCTGGACATAA
AATG – 698 bp

8. Částečná sekvence genu pro pepX

ACATTAATTCAAATTAATCAATATTGAAAACATAGGAATTATTCCAAACCTT
GCAATCCATTTAAACCGACAAATTAACGAAGGATTTGGATATAATACTCATGA
CAATTTAACAGTAATCAACAGCACTAAAAAACAATAAAAGAAAATATCTTAG
AACAACTTGAATAAAAATATGAAAATTTTCTATCTTGTGATTTAATATTCACAG
AATCACAACCTCTCAAAAATAATAGGAACTGAAGGAGAATTTTTAGCTTCTAAA
AATCTTGATAATAAATCGGGATGCCATGCAATCATGAACTCTTATGTTTCATACA
AGTAATAATAAAAATAAAAATAGCTGTATTTTTTGGATAATGAAGAAGTAGGATC
TTAACATCAAGGGGCGCTGATTCCAATTTTTTATCAGAAGTTTTAGAAAGAAT
CGATCTTGCCCTTAACCTAACCAGAGAAGAGCATTTAATAAAAACAAACAAT
CATTTAATATATCGATTGACAGCGTTCACGGAATTCATCCAGGATATGCATTCA
AACATGATCCAACTATCAAGCGACTCTAAGTAAAGGTGTAGTTGTAAAAAAT
AGCGCCAATTTTAGATATGCAACAACCTTCAACGGGATTTGCAAAATTAAAAA
CTTAGCTATTGAAAATAATATTAATAATTCAAGAAATAATAATGAAAGCAAATG
TTCCTTCAGGCACAACAATTGGTCC – 698 bp

9. Částečná sekvence genu pro pyrG

ATGGAAAATATTTTATTTATTGAGACAGTAAGGCAAATAAGACATGAGGTTGG
AAGTGGTAATATTGCTTTTATTCATTTAACCTATGTACCAAGTCCAGTTGGAAT
TAATGAGCAAAAATCTAAACCCACTCAACAAAGTGTTAAACTTTAAATAAAG
CAGGTATTTTCCCTGATTTGATTACTGCTAGAAGTTCTCAAGTACTGACAGATC
AAATCAGAAAAAAGTGGCAATGTTTTGCAATGTTGAGAGCACTTCTATTATT
GACAATGTTGATGTTTCTACTATTTATGAAATTCCCATATCTTTTTACAGACAA
GGTGTGCATGAGATTTTAAGCTCTAAGTTAAATATTAAGGTTGATCCAAAAT
AGAAGAGCTTTCAAAGCTTGTAGGGATTATAAAATCTAATTTTTTTGCGCCTAA
AAAAATTATTAATATTGCTATTTGTGGTAAGTATGCTGAACTTGATGATTCTTA
TGCGTCAATTAGAGAGTCTTTGGTTCATGTTGCAGCTAATTTGGATTTGCTTAT
TAAAAGCACTATCATTGATTCTAATGATTTAAATGAAAGCTGTTTGAAGGATTT
TGACGGCATTATTGTTCCCGGCGGCTTTGGAGGTAAAGGATATGAGGGCAAGA

TTATTGCTATTAATATGCTCGCGAGAATAATATTCCCTTTCTTGGA – 690 bp

10. Částečná sekvence genu pro recG

CTTGTTTGCCTTGCTTTCGGGGATTCCTTTAATTGAAGCTGGATATCAGGTAGC
ATTTATGGCTCCTACTGATCTTTTGGCTCGTCAACATTATGATAATTTATCCAAC
ATATTGTCCTCTTTTAACATTTTCAGTGACTCTTTTGGACTGGTAGTTTGAAAAAG
AGGGATAAGGAGCAAGCGTTAGAAAAGTATTA AAAAGCGGAGCTTCTGGTTTATA
GTTGGAACACATGCTATTTTTTATGAAAGCACAGAATTTAAAAGATTAGCATA
TGTTATTATTGACGAGCAGCATAAATTTGGAGTTGTTCAAAGGGAAGAGCTTA
AAAACAAAGGAGAAGGGGTAGATATGCTTTTAATGTCTGCAACACCTATTCCT
AGAAGCTTTGCGTTAACTCTTTTTGGGGATCTTGAAATTTCAATTTATTAAGACC
TTACCTAAGGGGCGTTTACCTATTACTACTTATTTAGCAAAGCATGGCAATGAA
GATAAAGTTTATGAGTTTTTAAGAAAAGAACTTGCAAAGGGTCATCAGGTTTA
TTTTGTTTATCCATTAATTTTCATCTTCGGAAAAATTTGAATTA AAAAGACGTAA
TAATATGTGTTTAAAATTA AAAAGAAGTGTTTGGCGAATATGTTGTTGACATGCT
TCATTCTAAGTTGCCATCTGATTTGAAAGAAGAAATTATGAAAAATTTTTATTC
TAAAAAAGTAGATATTTTTGGTGGCTACTAGTGTTATTGAGGTTGGAATTGATGT
CCAAATGCAA – 762 bp

11. Částečná sekvence genu pro rplB

GGGGTATTAAGACTTATAAGCCAAAACTTCTTCTTTGCGCTATAAGACGACTT
TATCTTTTGATGATTTGAGCAAAGGTAATGATCCTTTGAAATCTTTAACAAAAG
GTAAAAAATTTAAATCGGGCAGAGATTCTTCTGGTAGGATTAGTATTAGAAGA
AGAGGTGGTGGGCATAAGAGAAAGTATAGGTTGATTGATTTTAATCGAAGAGA
TAAATTTAGCATTCCCGCTCGAGTTGCTTCTATTGAATATGATCCTAATAGAAG
TGCTAATATAGCTTTGCTTGTTTATAAAGATGGAGAAAAAAGGTATATTATTC
TCCTAAAGACATTAAGTTGGAGATGTTTTGGAAAGTGGTCCAAATGCCCAA
TTAAAATTGGTAATGCCTTGCCCCTTGAAAACATTCCTATTGGAAGA ACTGTTC
ACAATATCGAACTTAATGTAGGAAAGGGTGGGCAGCTTGTAAGAAGTGCTGGG
GGGTATGCTATGATACTTGCTTCTGATGGGAATTATGTTACTGTAAAATTGTCA
TCTGGTGAGGTGAGGTTAATTTTTCAAAAAATGCATTGCAACAATTGGTGAAAT

TGGAAATGAAGATTATGTCAATGTTTCTATAGGAAAAGCTGGTAAAAGTAGGT
GGCTTGGTAGAAGACCTAAGGTTAGAGGTGTTGCCATGAATCCTGTTGACCAT
CCGCATGGTGGTGGTGAA – 713 bp

12. Částečná sekvence genu pro uvrA

TTGATGTTGGTCTTTCTTATCTGTATTTAAATAGAATATCAGGTAGTTTATCCGG
GGGTGAGGCTCAGCGTATTAGGCTTGCTACTCAAATAGGGTCAGCACTTTCGG
GTGTTATTTATGTTCTTGATGAGCCAAGCATTGGCCTTCATCAAAGAGATAATG
AAAAATTAATCTCTACTCTTGTTAATCTTAAAAATCTTGGCAATACGGTAATTG
TTGTTGAGCATGATGAGCAAACCTTTGCGTACCGCAGATTATATTATTGATATGG
GCCCTGGTGCTGGAATTCTTGGAGGGGAAATAGTTGCAAAGGGAACCTTAATA
GATATTTTAAATAGTAAAAATAGTTTAACTGGTCAATATTTGAGTGGTGAGTTT
AAAATAGATGTTCCAAGTTCTAGAAGAAAGACAGATAAGGGAGAGATTTTGCT
TTTAGGTTCTAATAAAAACAATCTTAAAAATATAGACGTAAGTATTCCTTTGGG
AGTTTTCACTGTAATAACAGGTGTTTCTGGTAGTGGAAAAAGTACTTTGCTTAA
CGAAGTGTTATATCCAGCTCTTGACAGCAGATTAAAGCTTGATAGAAAGTATT
GTGATGGCTTTAAAGACATTATTGGGTATGAAAGAATCGATAAAATTATTCAA
ATAAATCAAAAACCAATAGGAAGA ACTTCAAGGTCAAACCCAGCAACGTATG
TTGGATTTTTTACAGAAATTAGGGAACCTTTTTGCTAAGCTTCCGGATGCAAAGT
CAAGAGGTTTTAAGGCCGGTAGATTTTCTTTAATGTTAAAGGTGGAAGGTGT
GAGAAATGTCAAGGAGATGGGTATC – 828 bp