Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Detekce perzistentních borelií *Borrelia burgdorferi* sensu lato ve tkáních savců přeléčených antibiotiky

Bakalářská práce

Jakub Opelka

Školitelka: Mgr. Sehadová Hana Ph.D.

Konzultanti: MSc. Rudenko Natalie Ph.D.

MSc. Golovchenko Marina

RNDr. Vancová Marie Ph.D.

České Budějovice 2021

Opelka, J., (2021): Detekce perzistentních borelií *Borrelia burgdorferi* sensu lato ve tkáních savců přeléčených antibiotiky. [Detection of persistent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in mammalian tissues after antibiotic treatment. Bc. Thesis in Czech] – 40 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Lyme disease (LD) is a tick-borne illness caused by certain species of the spirochetes of *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex. LD in humans affects multiple organs and although it is reported rarely as a cause of the death, it reduces the life quality of millions people around the world. All stages of LD are mainly treated with antibiotics doxycycline and amoxiciline. In 10 – 20 % cases, the symptoms of the disease persist even after treatment, but majority of practical physicians attribute these symptoms to psychosomatic problems. In this thesis the results of immunohistochemical research have shown that persistent forms of borrelia with a frequency of 0,16 - 0,3 individuals per 1 mm^3 still exist in mammalian tissues after treatment with commonly prescribed antibiotics according to medical protocols. The ability to recultivate *B. burgdorferi* sensu lato from the tissues of antibiotic-treated mice confirmed their viability and suggest that relapse of infection can be caused by original infection.

Prohlášení:

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 14. dubna 2021 …….

Jakub Opelka

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat všem členům Střediska mikroskopie a histologie Entomologického ústavu Biologického centra Akademie věd v Českých Budějovicích. Jmenovitě především své školitelce Mgr. Haně Sehadové Ph.D. za její cenný čas, odborné vedení a trpělivost. Tímto bych také rád poděkoval svým konzultantkám MSc. Marině Golovchenko a MSc. Rudenko Natalii Ph.D. z Parazitologického ústavu Akademie věd v Českých Budějovicích za možnost naučit se molekulární metody, které jsem využil ve své bakalářské práci. Dále bych chtěl také poděkovat své konzultantce RNDr. Marii Vancové Ph.D. za další potřebné rady a vědomosti v oblasti imunohistochemické detekce. V neposlední řadě děkuji své přítelkyni a celé své rodině za neutuchající podporu a trpělivost.

Obsah

1 Úvod ..... - 1 -

1.1 Lymská borelióza ..... - 1 -

1.2 Morfologie borelií ..... - 1 -

1.2.1 Spirální forma ..... - 2 -

1.2.2 Cystické formy ..... - 3 -

1.2.3 Společenstva biofilmů ..... - 4 -

1.3 Klinický obraz ..... - 4 -

1.3.1 Časná lymská borelióza ..... - 4 -

1.3.2 Pozdní lymská borelióza ..... - 5 -

1.3.2.1 Postižení centrálního nervového systému ..... - 5 -

1.3.2.2 Srdce ..... - 6 -

1.3.2.3 Kůže ..... - 6 -

1.3.3 Chronická lymská borelióza ..... - 6 -

1.4 Léčba a diagnostické metody ..... - 7 -

2 Cíle práce ..... - 9 -

3 Materiál a metody ..... - 10 -

3.1 Kultury borelií ..... - 10 -

3.2 Myší linie C3H/HeN ..... - 10 -

3.3 Lidská tkáň ..... - 11 -

3.4 Isolace DNA ..... - 11 -

3.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR) ..... - 12 -

3.6 Fixace a preparace vzorků ..... - 14 -

3.6.1 Zhotovení paraplastových řezů ..... - 14 -

3.7 Imunohistochemie ..... - 14 -

3.7.1 Primární protilátka ..... - 14 -

3.7.2 Sekundární protilátky ..... - 15 -

3.8 Nepřímá imunofluorescence ..... - 15 -

3.9 Fluorescenční a konfokální mikroskopie ..... - 16 -

4 Výsledky ..... - 17 -

4.1 Detekce borelií v kulturách ošetřených antibiotiky DOX a AMOX. ..... - 17 -

4.2 Detekce borelií v tkáních myší *Mus musculus* linie C3H/HeN přeléčených antibiotiky DOX a AMOX ..... - 19 -

4.3 Detekce borelií v mozkové tkáni člověka přeléčeného běžně předepisovanými antibiotiky na lymskou boreliózu ..... - 21 -

5 Diskuze ..... - 24 -

6 Závěr ..... - 27 -

7 Seznam zkratek ..... - 28 -

8 Přehled použité literatury ..... - 29 -

9 Přílohy ..... - 35 -

1 Úvod

1.1 Lymská borelióza

Lymská borelióza je nejčastější zoonotické onemocnění vyskytující se na severní polokouli (Pritt et al., 2016). Ve střední Evropě se jedná o nejrozšířenější infekční chorobu, jejímž vektorem jsou klíšťata komplexu *Ixodes ricinus*. Toto multiorgánové onemocnění je způsobené patogenními spirochétami z komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Burgdorfer et al., 1982; Eisen et al., 2002). Zatím je popsáno nejméně 22 druhů, z nichž 3 jsou označované jako jistí původci onemocnění u lidí: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, a *Borrelia afzelii* (Rudenko et al., 2011). V evropských regionech se může prevalence jednotlivých druhů borelií lišit (Rauter et al., 2005). Nejčastěji je infekce způsobena druhem *B. garinii*, která častěji vyvolává problémy týkající se nervové soustavy a způsobuje onemocnění označované neuroborelióza. Dále pak *B. afzelii* která je příčinou častějšího výskytu atopického chronického ekzému (ACA) a *B. burgdorferi* sensu stricto napadající především klouby a srdeční sval. Mnoho dnešních studií naznačuje, že v Evropě jsou vzácně patogenní i druhy *Borrelia bissettii*, *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia valaisiana* a *Borrelia spielmani* (Derdáková et al., 2005; Murray et al., 2010; Biesiada et al., 2012; Rudenko et al., 2011). Všemi zmíněnými druhy jsou lidé ve střední Evropě infikováni při kousnutí klíštěte rodu *Ixodes*. Onemocnění začíná jako lokální zánět v místě kousnutí a následně se šíří lymfatickým a cévním systémem po těle (Wormser et al., 2005). Typicky postihuje kůži, srdce, nervový systém, klouby a pohybový aparát (Pfister et al., 1994).

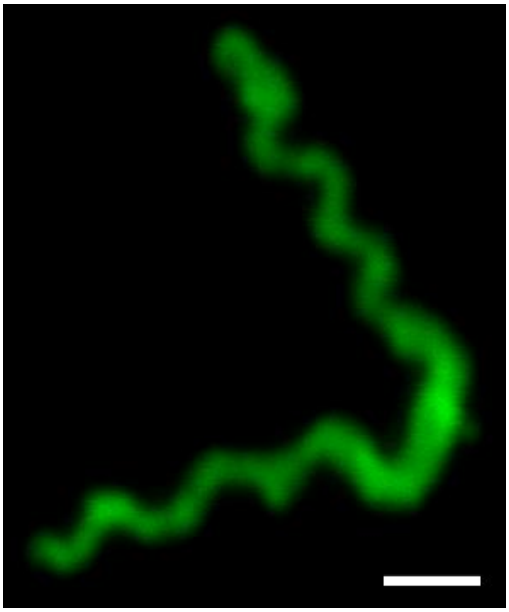
1.2 Morfologie borelií

Ve vhodném prostředí mají spirochéty z komlexu *B. burgdorferi* sensu lato spirální formu (Barbour et al., 1986). V reakci na nevhodné podmínky prostředí mohou změnit svou spirální formu na atypickou. K příčinám vyvolávajícím atypické změny morfologie v pokusech *in vitro* můžeme řadit nedostatek živin v séru, oxidační stres, fluktuace pH nebo teploty, změny koncentrace solí, cukrů nebo jiných organických sloučenin (Brorson et al., 1998; Rudenko et al., 2019). V neposlední řadě může být změna morfologie reakcí na antibiotickou léčbu (Lewis et al., 2007). Tyto změny morfologie byly pozorovány *in vitro* a byly detekovány také *in vivo* (Meriläinen et al., 2015). Předpokládá se, že jde o perzistentní formy, které byly popsány i u mnoha jiných bakteriálních onemocnění, jako jsou tuberkuloza nebo syphilis (Zhang, 2014). Přesto průběh změny z nativní formy do perzistentní a zpět

není stále zcela pochopen a objasněn. Studie na *B. burgdorferi* sensu stricto ukázaly, že za vznik atypických forem umožňujících přežití v nepřátelském prostředí je zodpovědná rozdílná regulace genové exprese (Feng et al., 2015). Perzistující subpopulace má nízkou metabolickou aktivitu a může přetrvávat i delší dobu bez replikace. Jedná se o morfologicky velmi heterogenní buňky, které se mohou měnit s okolním prostředím. Za základní atypické formy můžeme považovat cystické formy a společenství v biofilmu (Miklossy et al., 2008). Rozdělení však může být zavádějící, jelikož existuje celá řada dalších atypických forem, které nezapadají do žádné kategorie. Takovými útvary mohou být například smyčkové nebo prstencové formy, L-formy, formy anglicky označované „blebs“, a kulatá tělesa tzv. „round bodies“ (Barbour et al., 1986； Meriläinen et al., 2015). Výsledky *in vitro* experimentů ukazují na možnost, že tyto atypické formy jsou schopny se při příznivých podmínkách navrátit do nativní formy a opět se množit (Brorson et al., 1997； Gruntar et al., 2001).

1.2.1 Spirální forma

Borelie jsou charakterizovány jako pohyblivé bakterie s výraznou spirální nebo planární morfologií (Obr. 1). Délka borelií v typické spirální formě se pohybuje od 8 do 30 μm a šířka je 0,2 - 0,5 μm (Barbour et al., 1986). Jejich mobilita je velmi vysoká a jejich šroubovitý pohyb je vhodný především do viskózního prostředí mezibuněčné hmoty (Wolgemuth et al., 2015). Vnější membrána je lipidová dvojvrstva, která postrádá lipopolysacharidové molekuly přítomné u většiny gramnegativních bakterií. Vnitřní membrána je typická pro prokaryotické buňky a je obklopena tenkou peptidoglykanovou vrstvou, která poskytuje sílu a zároveň dostatečnou pružnost pro spirochetální pohyblivost. Borelie nemají bičíky umístěné externě jako většina gramnegativních bakterií, ale mají je umístěny v periplazmatickém prostoru, tj. mezi peptidoglykanovou vrstvou a vnější membránou. Každý periplazmatický bičík je připevněn k jednomu pólu buňky (Motaleb et al., 2015). Borelie mohou být snadno odlišeny od druhů bakterií, na základě jejich genomu, který se vyznačuje linearitou chromozomu a specifickými kruhovými či lineárními plazmidy. Počet plazmidů se v genomech jednotlivých druhů borelií liší (Casjens et al., 2012).

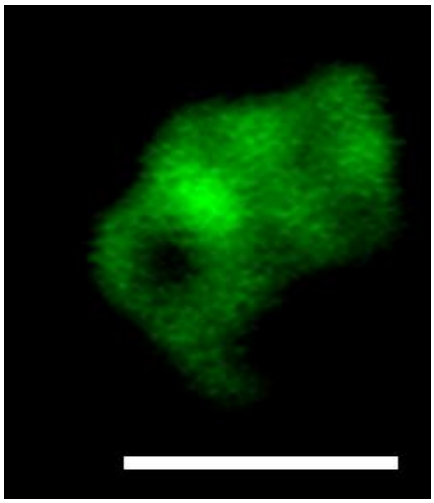


Obr. 1: Spirální forma borélie.
Měřítko: 1μm.

Kompletní sekvence genomu *B. burgdorferi* sensu stricto se skládá z 853 lineárních genů umístěných na chromozomu a v 21 plazmidech o celkové velikosti genomu 613 000 bází. Mezi všemi geny nebyly objeveny žádné sekvence potřebné pro syntézu aminokyselin, nukleonových kyselin a vyšších monokarboxylových kyseliny (Fraser et al., 1997). Pro získání těchto živin se dokáží borelie uchytit k hostitelské buňce a přinutit ji použít její vlastní trávicí enzymy ke svému samozničení a k uvolnění potřebných živin (Grier et al., 2000).

1.2.2 Cystické formy

Cystické formy mohou být morfologicky různorodé, přesto je lze charakterizovat jako vezikuly ohraničené vnější membránou (Obr. 2). Ve vezikulu může být jedna až několik stočených spirochét pokrytých pouze vnitřní membránou s peptidoglykanovou vrstvou. Dále obsahují bičíky a agregáty makromolekul (Gruntar et al., 2001). Velikost cystických forem je 1 - 5 μm (Brorson et al., 2001). Experimenty provedené O. Brorson a S. H. Brorson *in vitro* ukázaly, že transformace v cystickou formu při nedostatku živin v médiu může být reverzibilní proces (Brorson et al., 1998). Dále se ukazuje pravděpodobné, že cystické formy tzv. „blebs“ jsou pouze mezistupněm transformace mezi spirální a cystickou formou (Meriläinen et al., 2015). Vytvoření morfologicky podobných cyst bylo pozorováno v kulturách *B. burgdorferi* sensu stricto i po ošetření antibiotiky (Sharma et al., 2015).

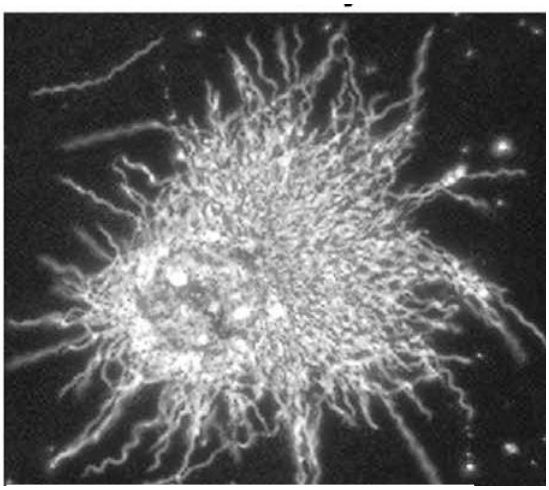


Obr. 2: Cystická forma borélie. Měřítko: 1μm.

Další cystická forma borelií, vytvořená v reakci na nepříznivé podmínky, se nazývá forma L nebo forma s deficiencí buněčné stěny. L-formy ztrácí povrchové proteiny, které představují antigenní signál pro lidský imunitní systém. V důsledku toho není imunitní systém schopný rozpoznat nové perzistentní formy (Mursic et al., 1996).

1.2.3 Společenstva biofilmů

Spirochéty mohou také často utvářet biofilm (Obr. 3). Biofilmy přestavují proteinové bariéry, které chrání bakterie před antibiotiky a jsou odolné vůči fagocytární imunitní odpovědi. Společenstva bakterií v biofilmech lépe snášejí změny pH a nedostatek živin. Dokáží hromadit kyslíkové radikály a jejich nejdůležitější vlastností je rezistence vůči antibiotikům (Jefferson et al., 2004； De la Fuente-Núñez et al., 2013； Sapi et al., 2012).



Obr. 3: Společenstvo biofilmu. (Sapi et al., 2012).

1.3 Klinický obraz

Podle evropské definice, přijaté na konferenci Světové zdravotnické organizace (WHO) v Serocku v roce 1995, je diagnóza lymské boreliózy stanovena u pacienta, který byl vystaven infikovanému klíštěti a který následně vyvinul typické příznaky způsobené lymskou boreliózou, mezi které patří problémy kožního či nervového systému, pohybového aparátu a srdce (Murray et al., 2010； Flisiak et al., 2000). K potvrzení diagnózy se využívá sérologický průkaz anti-boreliových protilátek. Definice onemocnění podle Asbrink a Hovmark má dvě stadia a to časné a pozdní (Asbrink et al., 1993).

1.3.1 Časná lymská borelióza

Při časné fázi onemocnění se přibližně u 10 – 15 % pacientů objeví na kůži ohraničená kožní léze *erythema migrans* (EM). Tento kožní projev nemusí být patognomický pro lymskou boreliózu (Nadelman et al., 2015). EM se obvykle objeví do 3 až 30 dnů po kousnutí klíštěte, nejčastěji na dolních končetinách (přibližně 54%) a trupu (přibližně 29%). Kožní projev se postupně rozšiřuje, vytvoří se centrální pole, které v průměru dosáhne více než 5 cm. Toto důležité znamení, umožňující snadnou diagnózu lymské boreliózy, u velkého počtu pacientů chybí. V časné fázi onemocnění je obzvláště důležitá antibiotická léčba, která bývá ve většině případů účinná (Müllegger et al., 2008； Aucott et al., 2009). V případě zpoždění léčby například vlivem špatné diagnostiky při chybějícím kožním projevu EM nemoc může přecházet do rozšířené pozdní fáze a ovlivňovat ostatní orgány (Nau et al., 2009).

1.3.2 Pozdní lymská borelióza

Pozdní fáze onemocnění nastává, pokud pacient nebyl léčen již v první fázi onemocnění. Borelie se postupně dostanou cévním a mízním systémem z místa infekce do dalších orgánů (Wormser et al., 2006). Typické pro lymskou boreliózu je napadení pohybového aparátu. Tato fáze infekce se objevuje po několika týdnech až letech po kousnutí klíštěte, ale obvykle po 6 měsících. V prvních týdnech od začátku onemocnění je infekce přibližně u 60 % pacientů omezena na migrující bolesti svalů. Někteří pacienti však hlásí i opakující se bolest v kostech, kloubech nebo periartikulárních měkkých tkáních. Typickým znakem je artritida s výpotkem, postihující velký kloub, kterým je velmi často kloub kolenní. Příznak je obvykle asymetrický a je doprovázen edémem kloubu bez erytému, obecně s několika týdny remisí a relapsů, které mohou způsobit dysfunkci kloubu (Murray et al., 2010; Stanek et al., 2012; Grygorczuk et al., 2008).

1.3.2.1 Postižení centrálního nervového systému

Postižení centrálního nervového systému (CNS) se může rozvíjet již v časné fázi při výskytu EM a neurologické příznaky jsou velmi variabilní. Typicky se objevují neurologické příznaky přibližně po několika měsících od infekce až několik let po infekci (Murray et al., 2010). V Evropě u 70 % pacientů s napadenou CNS se rozvíjí Bannwarthův syndrom, včetně lymfocytární meningitidy nebo obrny hlavových nervů (Halperin et al., 2007). Primárně ovlivněným nervem je VII, ale také VI, V, III a VIII. Meningitida je zpočátku omezena na spodní část mozku nejblíže míše a je spojena s mírnými bolestmi hlavy, při kterých nedochází k zvýšení tělesné teploty. Radikulární bolesti jsou výsledkem přímé invaze borelií do nervových kořenů. Bolesti se obvykle zvyšují během noci (Hansen et al., 2013). Pokud léčba nezačne během několika dnů nebo týdnů a pacient trpí takovýmto průběhem neuroboreliózy, tak se může onemocnění ještě zhoršit a vyskytnou se symptomy obrny a smyslové abnormality (Hildenbrand et al., 2009). Méně častou formou neuroboreliózy jsou projevy napodobující mozkovou ischemickou chorobu. Projevují se abnormalitou řeči, poruchami vizuálního pole, záchvaty, letargií a progresivní demencí (Sokolov et al., 2015; Garkowski et al., 2017; Kristoferitsch et al., 2018). V Evropě se neuroborelióza vyskytuje častěji, než ve Spojených státech amerických což je způsobeno geografickými rozdíly v prevalenci druhu *Borrelia garinii*. (Murray et al., 2010).

1.3.2.2 Srdce

Srdce je postiženo během několika týdnů po infekci přibližně u 4–8% infikovaných pacientů. Srdeční činnost vykazuje abnormality, zejména atrioventrikulární bloky různých stupňů, které se vyřeší spontánně u 95 % pacientů. Byly popsány případy karditidy, exsudativní perikarditidy a velmi zřídka se vyskytla také pankarditida (Rudenko et al., 2008; Tavora et al., 2008; Rovery et al., 2005).

1.3.2.3 Kůže

Atrofická chronická akrodermatitida (ACA) je zvláště zákeřná forma pozdní lymské boreliózy vyvíjející se u pacientů infikovaných *B. afzelii*. ACA se projevuje mnoho let po infekci, obvykle u starších osob. Léze jsou lokalizovány na dolních končetinách a postup onemocnění je pomalý (Vasudevan et al., 2013). ACA se však může vyvinout i bez dřívějších příznaků lymské boreliózy (Moniuszko-Malinowska et al., 2018). ACA pacienti mohou pociťovat bolesti, svědění nebo parestézie postižené kůže. Neléčené ACA postupuje do atrofické fáze, která je charakterizována epidermálním poškozením s viditelnými rozšířenými žilkami. Diagnóza může být obtížná a je založena na klinickém obrazu v kombinaci s pozitivním sérologickým a histologickým vyšetřením (Grab et al., 1996).

1.3.3 Chronická lymská borelióza

Chronická lymská borelióza je velmi kontroverzní téma mezi lékaři, vědci i veřejností. Lymská borelióza je jako chronická diagnostikována u pacientů, u kterých se i po léčbě antibiotiky proti lymské borelióze přetrvávají příznaky (Shor et al., 2019). Americké centrum pro kontrolu a prevenci nemocí (Centers for Disease Control and Prevention-CDC) uvádí, že příznaky přetrvávají přibližně u 10 – 20 % pacientů po léčení antibiotiky s doporučenou délkou léčby 2 – 4 týdny (Cdc.gov., 2019). Přesné mechanizmy vedoucí k přetrvání onemocnění i po antibiotické léčbě zatím nejsou dostatečně objasněny, a proto lékaři často používají spíše termín „postborreliový syndrom“. Postboreliový syndrom znamená pouze opakující se symptomy onemocnění způsobené psychogenními příčinami označovanými jako somatizace nebo psychosomatizace potíží. V takovém případě navrhne lékař pacientovi pouze symptomatickou léčbu (Bartůněk et al., 2013). Pacienti často zažívají epizody únavy, neklidného spánku, bolavé klouby, bolest nebo otoky kolen, mají sníženou krátkodobou paměť nebo problémy se soustředěním a s řečí. Mnoho studií ale naznačuje, že příznaky chronické boreliózy se mohou objevit na základě

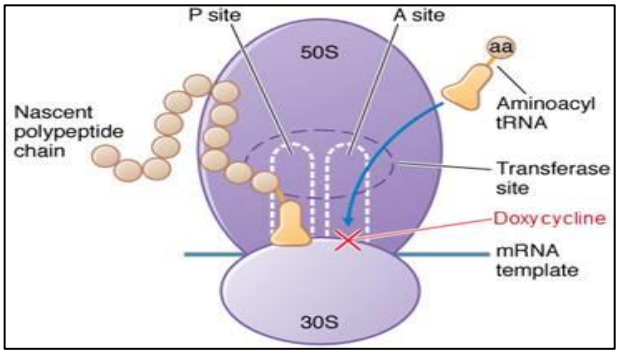
schopnosti borelií přežívat léčbu antibiotiky v nativní či perzistentní formě. Další možností vzniku chronické formy onemocnění může být i přetrvávajích imunitní reakce organismu na neživotaschopné borelie. Studie dokumentující atypické či spirální formy borelií u pacientů s chronickou lymskou boreliózou jsou však poměrně omezené (Brorson et al., 1997; Shor et al., 2019; Cdc.gov., 2019; Embers et al., 2012; Middelveen et al., 2018).

1.4 Léčba a diagnostické metody

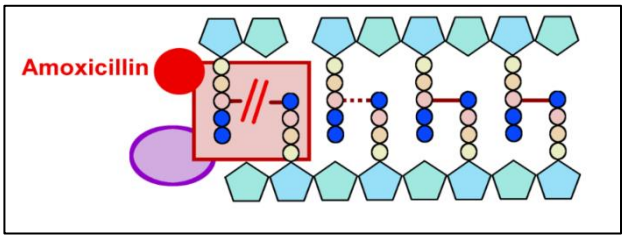
Diagnóza lymské boreliózy je založena na kombinaci anamnézy pacienta, klinických příznaků a laboratorních analýz. Nejběžnějším způsobem, jak detekovat přítomnost protilátek proti antigenům borelií z krve, jsou standartní sérologické testy, jako je Western blot a Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Tyto testy nepřímé detekce jsou náchylné k falešně negativním a falešně pozitivní výsledkům a zejména v průběhu onemocnění mohou být nepřesné (Garibyan et al., 2013; Bratton et al., 2008). Kultivace borelií se v klinické praxi nepoužívá, protože je časově náročná a má špatnou citlivost v klinických vzorcích (10 – 70%) a je náchylná ke kontaminaci. Přímá detekce pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) je časově efektivní, reprodukovatelná, citlivá a specifická metoda běžně používaná pro detekci bakterií a virů. PCR může sloužit jako doplněk k sérologii nebo k potvrzení a genotypizaci infikujících spirochét komplexu *B. burgdorferi* sensu lato (Garibyan et al., 2013; Lebech et al., 2000). Klinické testy vykazují nejvyšší citlivost PCR pro detekci *B. burgdorferi* sensu lato ve vzorcích biopsie kůže od pacientů s EM (36 – 88%) a ACA (54 – 100%), synoviální tekutiny od pacientů s lymskou artritidou (50 – 70%). Nejnižší citlivost PCR testů byla prokázána u vzorků mozkomíšní tekutiny (10 – 30%) a krve (10 – 20%) (Bunikis et al., 2002; Waddell et al., 2016). PCR diagnostika lymské boreliózy je založena na detekci jednoho nebo více cílových genů *B. burgdorferi* sensu stricto. Bylo publikováno více než 20 cílových genů používaných k detekci borelií např. gen pro *16S rRNA*, specifický gen bičíku *flagelinB* (*flaB*) a geny (*ospA, ospB, ospC)* kódující specifické membránové proteiny (Outer Surface Proteins A-C). Přesto žádný z nich nebyl dosud v laboratorní praxi široce implementován (Oksi et al., 1995). Pozitivní detekce DNA borelií ve tkáni pomocí PCR nemusí znamenat přítomnost životaschopných replikujících se spirochét (Iyer et al., 2013). Lymská borelióza navíc může napodobovat svými příznaky syndrom chronické únavy, roztroušenou sklerózu, amyotrofickou laterální sklerózu, Parkinsonovu a Alzheimerovu chorobu (AD) a více než 350 dalších nemocí, což diagnostiku komplikuje (Ablin et al., 2006). Přesná diagnóza časné boreliózy je obzvláště důležitá, protože opožděná

nebo zmeškaná diagnóza může mít za následek vážné komplikace (Tugwell et al., 1997; Waddell et al., 2016).

Lymská borelióza v časné a pozdní fázi je léčena podáním antibiotik typu: doxycyklinu (DOX), amoxicilin (AMOX) nebo cefuroxim-axetil. DOX je širokospektrální antibiotikum. Inhibuje syntézu bakteriálních proteinů vazbou na 30S ribozomální podjednotku specifickou pro bakterie (Obr. 4). Inhibice je způsobena blokováním vazby tRNA na mRNA v ribozomální podjednotce. Růst bakterií se zastaví a imunitní systém má čas je zabít a odstranit. Účinek AMOX nastává ve chvíli, kdy dochází k syntéze lineárního polymeru peptidoglykanu v bakteriální buněčné stěně tj. v růstové fázi životního cyklu borelií (Obr. 5). V buněčné stěně baktérií jsou podélné trámce peptidoglykanu propojeny příčnými můstky tzv. transpeptidy. AMOX se vklíní do těchto můstků a znemožní tím spojení peptidoglykanu. (Schnappinger et al., 1996; Weber et al., 1984; Chopra et al. 2001).



Obr. 4: Grafické znázornění funkce DOX. http://www.antibiotics-info.org/doxycycline.html.



Obr. 5: Grafické znázornění funkce AMOX. http://www.animalresearch.info/en/drug-development/drug-prescriptions/amoxicillin/.

Nedávné studie *in vitro* ukazují, že monoterapeutická léčba antimikrobiálními léky (DOX, AMOX, tigecyklin, metronidazol a tinidazol) má odlišný potenciál pro vymýcení bakteriální infekce *B. burgdorferi* sensu lato a to převážně jejich perzistentních forem. Zatímco většina zmíněných antibiotik prokázala značnou účinnost v likvidaci replikujících se spirálních životaschopných borelií (85 – 90 %) a cystických forem (68 – 90 %), nebyl ani jeden ze studovaných léků schopen snížit tvorbu biofilmů na více než 55 %. V agregátech podobných biofilmům byla prokázána i přítomnost spirálních forem borelií (Sapi et al., 2011). Na druhou stranu existuje jen slabá evidence o přítomnosti životaschopných borelií po standardní léčbě *in vivo*. Každý další důkaz potvrzující tutu skutečnost by mohl přispět ke změně dosavadního přístupu a zkvalitnění léčby lymské boreliózy.

2 Cíle práce

1. Ověřit specificitu polyklonální primární protilátky namířené proti několika proteinům *B. burgdorferi* sensu lato a na její kultuře ošetřené antibiotiky DOX a AMOX stanovit afinitu primární protilátky k spirální i perzistentní formě.
2. Určit účinnost DOX a AMOX při léčbě borelií *in vitro* v kultivačním mediu.
3. Pomocí PCR a imunohistochemické detekce testovat přítomnost borelií v tkáních myší *Mus musculus*, které byly infikované borelií a následně přeléčené antibiotiky DOX a AMOX.
4. Pomocí PCR a imunohistochemické detekce testovat přítomnost borelií v mozku člověka (post mortem), který byl jako pacient přeléčen širokým spektrem antibiotik.

3 Materiál a metody

3.1 Kultury borelií

Pro kultivaci byl použit druh *B. burgdorferi* sensu stricto, kmen NE-5264, který byl kultivován v Kelly-Pettenkofer medium (MKP, připraveno podle protokolu Ružich-Sablič) Absence kontaminace a počet borelií byly hodnoceny použitím mikroskopie v temném poli. Výsledné množství spirochét bylo stanoveno pomocí počítací komůrky Petroff-Hausser. Bylo vybráno 5 kultur o koncentraci 10^6 borelií v 1 ml media, z nichž dvě kultury byly ošetřeny DOX (Sigma-Aldrich) a dvě AMOX (Sigma-Aldrich) antibiotiky běžně užívanými při léčbě boreliózy. Každé antibiotikum bylo aplikováno ve dvou koncentracích 50 μg/ml a 100 μg/ml. Jako pozitivní kontrola byla použita neléčená kultura. Po 14 dnech „léčby" antibiotiky byly kultury zahuštěny centrifugací a přeneseny do 2% agaru pro imunohistochemické zpracování.

3.2 Myší linie C3H/HeN

Pro experiment bylo použito 14 myší z imbreední linie C3H/HeN (Jackson Laboratory, Sulzfeld, Germany). Jednalo se o šestitýdenní samičky, bez specifických patogenů, pocházející ze zvěřince Parazitologického ústavu Akademie věd České republiky. Dvanáct myší bylo infikováno 150 μl kultury borelií NE-5264 o koncentraci 10^6 borelií v 1 ml a to subkutální injikací v oblasti trupu. Dvěma kontrolním jedincům bylo injikováno pouze MKP medium. Po třech týdnech od infekce byl myším proveden odběr krve a biopsie z ušního lalůčku. Odebrané tkáně byly testovány na přítomnost DNA borelií pomocí PCR. Jak infikovaní, tak kontrolní jedinci byli po čtyřech týdnech od injikace podrobeni 14denní antibiotické léčbě podle protokolu CDC (Obr. 6), který byl upraven pro použití na laboratorní myši. V protokolu jsou uvedeny dávky běžně předepisované při léčbě lymské boreliózy u člověka. Dávky 4,4 mg/kg DOX a 50 mg/kg AMOX, běžně podávány dětem, byly přepočítány na průměrnou hmotnost myši, což je 16 g. Na základě tohoto přepočtu byly aplikovány dávky 70 μg u DOX a dávka AMOX byla 800 μg. Pozitivní kontrolou byli tři neléčení jedinci. Dva týdny po ukončení léčby byly myši usmrceny oxidem uhličitým a odkrveny. Byly odebrány nekropsie orgánů, u kterých se předpokládá výskyt borelií. Těmi je močový měchýř, slezina, srdce a kolenní kloub. Každý orgán byl rozdělen na poloviny, jedena byla zmrazena v tekutém dusíku a skladována v – 80 °C pro izolaci DNA a jedna vložena do modifikované Bouin-Hollande fixáže (BHS - bez kys. octové, ale s 10% chloridem rtuťnatým) pro imunohistochemické zpracování.

Age Category	Drug	Dosage	Maximum	Duration, Days
Adults	Doxycycline OR	100 mg, twice per day orally	N/A	10-14
	Amoxicillin OR	500 mg, three times per day orally	N/A	14
	Cefuroxime	500 mg, twice per day orally	N/A	14
Children	Doxycycline OR	4.4 mg/kg per day orally, divided into 2 doses	100 mg per dose	10–14
	Amoxicillin OR	50 mg/kg per day orally, divided into 3 doses	500 mg per dose	14
	Cefuroxime	30 mg/kg per day orally, divided into 2 doses	500 mg per dose	14

Obr. 6: Protokol Centra pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC). Standartní dávkování antibiotické léčby lymské boreliózy pro DOX, AMOX a cefuroxime u dospělého a dítěte (https://www.cdc.gov/lyme/treatment/index.html).

3.3 Lidská tkáň

Zkoumaným orgánem byl lidský mozek odebraný post mortem pacientovi XY středního věku po třech dnech od úmrtí. Z mozku byly odebrány nekropsie z těchto částí: *Occipital lobe, Temporal lobe, Parietal lobe, Frontal lobe, Basal ganglium, Cerebellum, Plexus chorioideus, Varoli, Spinal cord, Medulla oblongata*. Každá nekropsie byla rozdělena na dva díly. Jeden z dílů byl nafixován 4 % formaldehydem pro další imunohistochemické zpracování a druhý byl zamražen pro následnou izolaci DNA. Podrobná diagnóza o pacientovi podléhá lékařskému tajemství. Lze jen uvést, že pacient dlouhodobě trpěl nevysvětlitelnými bolestmi hlavy, doprovázenými depresivními náladami a poruchami paměti. Pacient prodělal ve školním věku lymskou boreliózu, která byla přeléčena antibiotiky. Přestože před smrtí nebyla u pacienta potvrzena lymská borelióza, užíval pacient vysoké koncentrace různých antibiotik na tuto nemoc.

3.4 Isolace DNA

Zmražené vzorky myších orgánů a lidského mozku byly homogenizovány a byla z nich izolována a purifikována DNA podle níže uvedeného protokolu, který je založen na postupu v kitu DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Obr. 7).

1. K části orgánu o hmotnosti 10 – 25 mg přidat 180 µl ATL (lizačního) pufru, homogenizovat a resuspendovat vortexováním
2. Následovně přidat 20 µl proteinázy K a důkladně promíchat vortexováním
3. Inkubovat při 56 °C dokud nedojde k úplné lyzi tkáně (15 – 30 minut)
4. Vortexovat 15 sekund
5. Přidat 200 µl AL pufru do vzorku
6. Přidat 200 µl ethanolu a poté inkubovat 10 minut při 70 °C
7. Po 10 minutách přepipetovat celý objem do kolonky DNeasy mini spin umístěné ve 2 ml sběrné zkumavce
8. Centrifugovat při 8 000 rpm po dobu 1 minuty a vyměnit sběrnou zkumavku za novou
9. Přidat 500 µl AW1 pufru a znovu centrifugovat při 8 000 rpm po dobu 1 minuty a vyměnit sběrnou zkumavku za novou
10. Přidat 500 µl AW2 pufru a centrifugovat při 8 000 rpm po dobu 1 minuty
11. Umístit kolonku do čisté zkumavky 1,5 ml eppendorf, přidat 100 µl H_2O k eluci a inkubovat 1 minutu při pokojové teplotě
12. Centrifugovat po dobu 1 minuty při 8 000 rpm
13. Umístit izolované DNA do 4 °C do dalšího zpracování

Obr. 7: Izolace DNA. (Qiagen).

Na spektrofotometru (NanoDrop) byla zkontrolována čistota a koncentrace izolované DNA. Měření byla opakována třikrát pro každý vzorek a byla vypočtena průměrná hodnota. Takto izolovaná DNA byla použita jako templát pro následnou PCR.

3.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je technika, která umožňuje amplifikaci konkrétní oblasti DNA specifikované pomocí dvou krátkých úseků nacházejících se na vedoucím a opožděném vláknu tzv. primerů. Pro PCR reakci byl využit kit HotStarTaq Plus Master Mix Kit (1000) (Qiagen). PCR o objemu 20 µl se skládala z 10 µl HotStarTaq Plus Master Mix (2x), 5 µl Milli-Q-purified H_2O, 2 µl primerů forward a reverse (každý po 1 µl) a 3 µl DNA templátu (méně než 200 ng/na reakci).

Pro zvýšení specificity a senzitivity byla použita modifikace PCR označovaná jako „nested“ PCR. Tato metoda je dvoustupňová a skládá se ze dvou následně provedených PCR, kdy produkt první reakce je použit jako templát pro reakci následující. PCR byla prováděna se dvěma páry primerů cílených na gen *flagB* a pro borelie specifický membránový proteinn *ospC*. Obě skupiny primerů jsou popsané v tabulce níže. Teplota nasedání prvního vnějšího páru primerů byla 52 °C a teplota vnitřního páru 55 °C u obou genů. Primery a podmínky PCR amplifikace byly převzaty z (Clark et al., 2005) pro *flagB* a (Bunikis et al., 2004) pro *OspC* (Tab. 1). Všechny reakce zahrnovaly pozitivní kontrolu, kdy do reakce byla přidána DNA izolována z kultury borelií. Negativní kontrola spočívá v náhradě DNA za Milli-Q-purified H_2O. Výsledné produkty PCR byly rozděleny elektroforézou na 1 % agarózovém gelu. Všechny pozitivní produkty PCR byly přečištěny z gelu a odeslány na sekvenaci (Seqme.eu). Získaná data o sekvenování byla analyzována pomocí program DNAStar a odeslána k porovnání do GenBank. U vzorků z myší byla potvrzena infekce kmenem *B. burgdorferi* sensu stricto NE-5264 a u vzorku z lidského mozku byl identifikován druh borelie zodpovědný za infekci.

Primer	Sekvence	Nasedací teplota	Velikost (bp)
flagellin forward (out)	AARGAATTGGCAGTTCAATC	52°C	497
flagellin reverse (out)	GCATTTTCWATTTTAGCAAGTGATG		
flagellin forward(in)	ACATATTCAGATGCAGACAGAGGTTCTA	55°C	388
flagellin reverse (in)	GAAGGTGCTGTAGCAGGTGCTGGCTGT		
ospC forward (out)	ATGAAAAAGAATACATTAAGTGC	52°C	657
ospC reverse (out)	ATTAATCTTATAATATTGATTTTAATTAAGG		
ospC forward (in)	TATTAATGACTTTATTTTTATTTATATCT	55°C	617
ospC reverse (in)	TTGATTTTAATTAAGGTTTTTTTGG		

Tab. 1: Specifikace využitých primerů. (Clark et al., 2005; Bunikis et al., 2004).

3.6 Fixace a preparace vzorků

Myší části orgánů byly fixované v BHS celou noc při 4 °C. Fixáž byla vymývána 70% ethanolem po dobu dvou dnů, kdy byl ethanol 5 – 6 x vyměněn. Následně byly promyty ve fosfátovém pufru (PBS). Části mozkové tkáně fixované ve 4 % formaldehydu byly několikrát promyty v PBS. Všechny orgány i tkáně byly rozděleny na menší kousky tvaru krychle o rozměru 2,5 - 5 mm. Tyto kousky byly převedeny do paraplastu.

3.6.1 Zhotovení paraplastových řezů

Zhotovení paraplastových řezů bylo provedeno dle protokolu (Sauman a Reppert, 1996). Vzorky byly odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou: 70%, 96%, 100% ethanol vždy 2 x 40 minut. Poté byly 2 x 30 minut promyty v 100% chloroformu, zality do paraplastu a ponechány dvě noci při 60 °C, aby došlo k proniknutí paraplastu do tkáně. Po vyndání byly vzorky ponechány dvě hodiny při pokojové teplotě zpolymerizovat. Paraplastové bločky byly krájené na mikrotomu na řezy o tloušťce 10 μm, které byly naskládány do kapky vody na podložní sklíčka potažená vrstvou polylysinu (Menzel-Glaser). Sklíčka s řezy byla přenesena na ploténku o teplotě 40 °C. Poté kdy vlivem vyšší teploty došlo k natažení řezů, byla přebytečná voda odsáta a sklíčka byla ponechána dva dny na ploténce, aby řezy dostatečně přilnuly. Vzorky byly skladovány při 4 °C do imunohistochemického značení.

3.7 Imunohistochemie

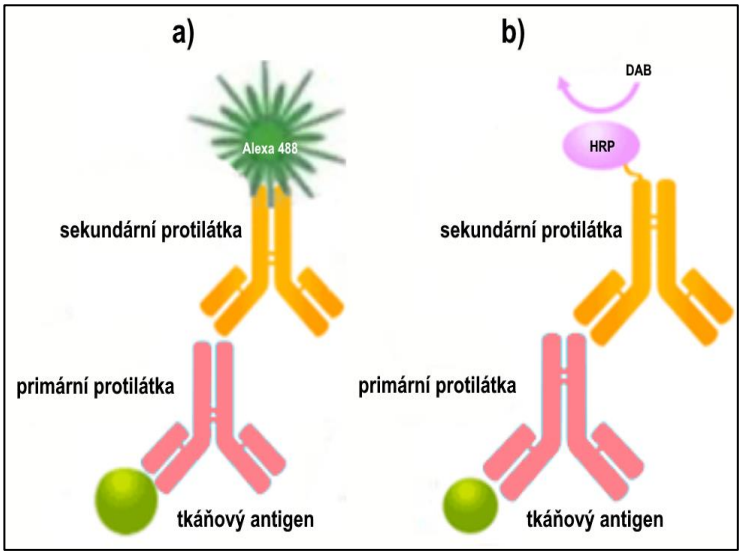
Principem je zviditelnění proteinů pomocí specifické protilátky, která reaguje s epitopy hledaného antigenu. V experimentech byla použita nepřímá imunohistochemická detekce, která využívá značenou sekundární protilátku k detekci neznačené primární protilátky.

3.7.1 Primární protilátka

K detekci borelií byla použita komerčně připravená králičí polyklonální protilátka namířená proti několika různým proteinům specifickým pro komplex *B. burgdorferi* sensu lato (*Borrelia burgdorferi* Polyclonal Antibody, Invitrogen, katalogové číslo PA1-73004). Rozpoznává jednak membránový vesikální protein o velikosti 83 kDa, dále protein bičíku FlagB s velikostí 41 kDa a specifické membránové proteiny OspA a OspB s molekulární hmotností 34 kDa a 31kDa. Primární protilátka byla ředěna v poměru 1:200 v blokovacím médiu tvořeném 5 % kozím sérem v PBS s 0,3 % Tween20 (PBS-Tw).

3.7.2 Sekundární protilátky

Pro zviditelnění navázané primární protilátky byly využity dvě sekundární protilátky namířené proti králičím imunoglobulinům (Obr. 8.) Kozí protilátka s konjungovanou fluorescenční značkou (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed, Alexa Fluor 488, Invitrogen) a kozí protilátka značená enzymaticky pomocí křenové peroxidázy (Goat anti-Rabbit Highly Cross-Adsorbed HRP, Invitrogen). Protilátky byly ředěny v blokovacím médiu v poměru 1:500.



Obr. 8: Schéma imunohistochemického značení. (a) Značení sekundární protilátkou s flourescenční značkou Alexa 488. (b) Značení sekundární protilátkou s konjungovanou křenovou peroxidázou (HRP). DAB - 3,3'-diaminobenzidine substrát pro HRP.

3.8 Nepřímá imunofluorescence

Před imunohistochemickým značením na paraplastových řezech je nutné nejprve odstranit paraplast a řezy na skle zavodnit sestupnou alkoholovou řadou. Poté se z nich odstraní těžké kovy obsažené v BHS dvojicí roztoků Lugolůva a thiosíranu sodného (Na_2SO_4). Před aplikací primární protilátky je nutné vysytit nespecifická vazebná místa pomocí „normálního“ kozího séra a následně vymýt nenavázanou primární protilátku. Navázaná primární protilátka je detekováná pomocí sekundární protilátky značené fluorescenčně nebo enzymaticky. Zatímco fluorescenční značení můžeme sledovat ve fluorescenčním mikroskopu, vizualizace sekundární protilátky značené křenovou peroxidázou vyžaduje přítomnost substrátu, kterým je 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Ten produkuje sraženinu hnědé barvy, kterou lze pozorovat ve světelném mikroskopu. Na závěr se řezy odvodní vzestupnou alkoholovou řadou a zamontují do uzavíracího media dibutylphthalate polystyrene xylene (DPX, Fluka). Přesný protokol i s časy jednotlivých kroků je uveden níže.

1. Promýt v xylenu…2 x 10 min
2. Promýt v 100% ethanolu… 5 min
3. Promýt v 96% ethanolu…10 min
4. Promýt v 70% ethanolu…15 min
5. Promýt v H_2O…3 min
6. Promýt v Lugolově roztoku…3 min
7. Promýt v Na_2SO_4…7 min
8. Promýt v H_20…5 min
9. Promýt v PBS-Tw…10 min
10. Inkubovat s 5 % kozím sérem v PBS-Tw…60 min při pokojové teplotě
11. Inkubovat s primární protilátkou…24 hod ve 4°C
12. Promýt v PBS-Tw…3 x 20 min
13. Inkubovat se sekundární protilátkou…90 min při pokojové teplotě
14. Promýt PBS-Tw…2 x 20 min

    Pouze při použití enzymatické sekundární protilátky značené HRP:

    a. Promýt v 0,05M Tris-HCl pH 7,5 s 0,005% H_2O_2…10 min
    b. Inkubace v 10% roztoku DAB v 0,05M Tris-HCl pH 7,5 s 0,005% H_2O_2…10 min
    c. Zastavit reakci v H_2O…5 min

15. Promýt v 70% ethanolu…5 min
16. Promýt v 96% ethanolu…5 min
17. Promýt v 100% ethanolu…2 min
18. Promýt v xylenu…2 x 2 min
19. Zalití do DPX

3.9 Fluorescenční a konfokální mikroskopie

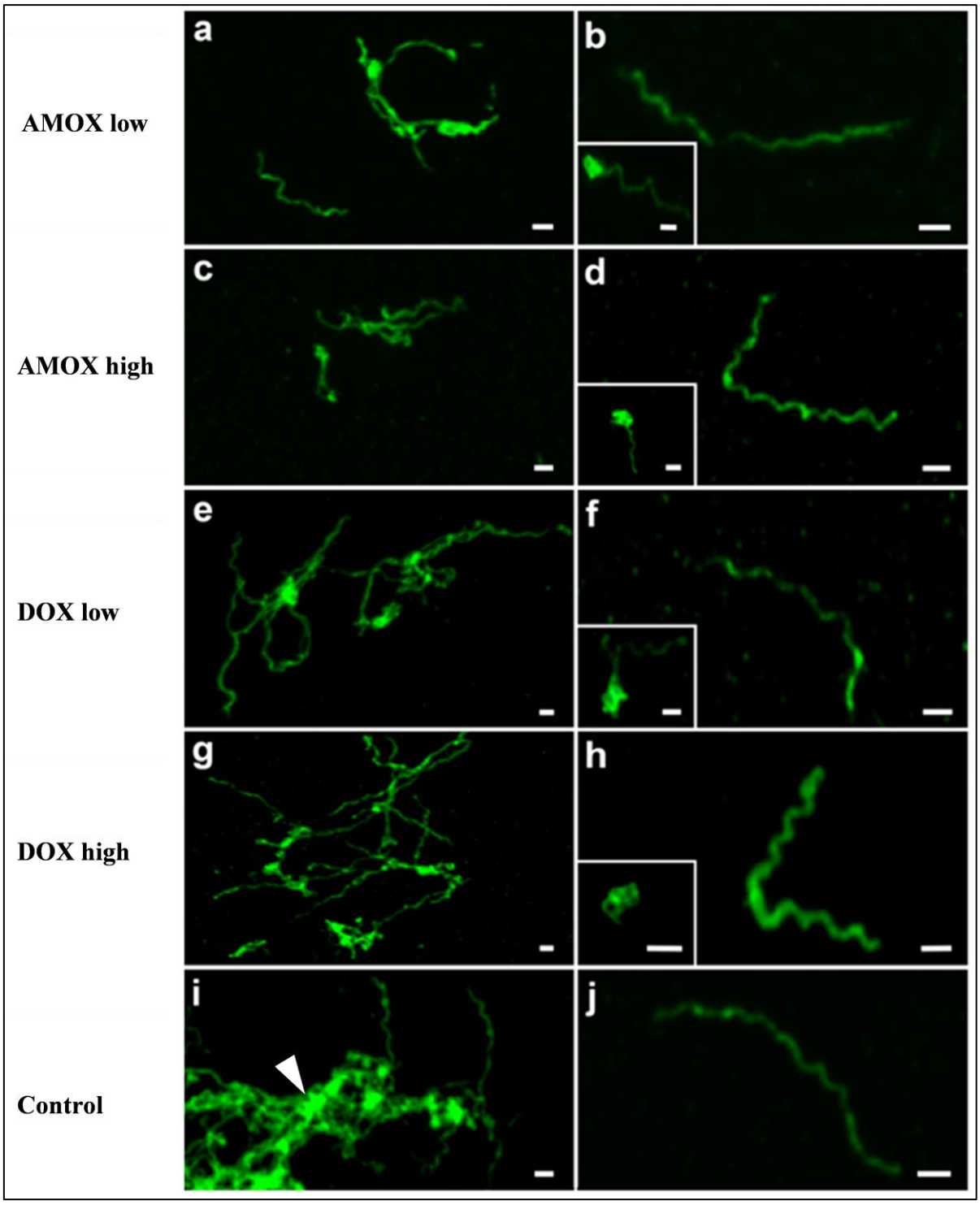
Vzorky byly analyzovány ve světelném mikroskopu (BX51 Olympus) vybaveném CCD kamerou (DP80 Olympus) a v konfokálním mikroskopu (FluoView™ FV 3000 Olympus), který umožnil získání série snímků s rozlišením 1024 x 1024. V programu Imaris verze 6.3.1 (Bitplane) byly jednotlivé vrstvy poskládány do 3D obrazu. Takto složený obraz ve formátu TIF byl následně graficky upraven (korekce jasu a kontrastu) v programu Adobe Photoshop (Adobe Systems).

4 Výsledky

4.1 Detekce borelií v kulturách ošetřených antibiotiky DOX a AMOX.

Kultury *B. burgdoferi* sensu stricto ošetřené antibiotiky DOX nebo AMOX o koncentraci 50 μg/ml byly použity k ověření specificity primární polyklonální protilátky anti-*B. burgdoferi* sensu lato (Invitrogen) namířené proti několika specifickým proteinům (bližší specifikace viz Materiál a metody). Borelie zahuštěné centrifugací byly přeneseny do 2% agaru a zality do paraplastu. Imunohistochemická detekce na paraplastových řezech o tloušťce 10 μm prokázala přítomnost jak perzistentních tak spirálních forem borelií. Obě formy vykazovaly stejnou intenzitu signálu, což ukazuje, že změna morfologie nemá vliv na afinitu primární protilátky (Obr. 9.) V kontrolních vzorcích byla specificita pozitivního signálu ověřena záměnou primární protilátky za „normální“ kozí sérum, které bylo aplikováno ve stejném ředění jako primární protilátka.

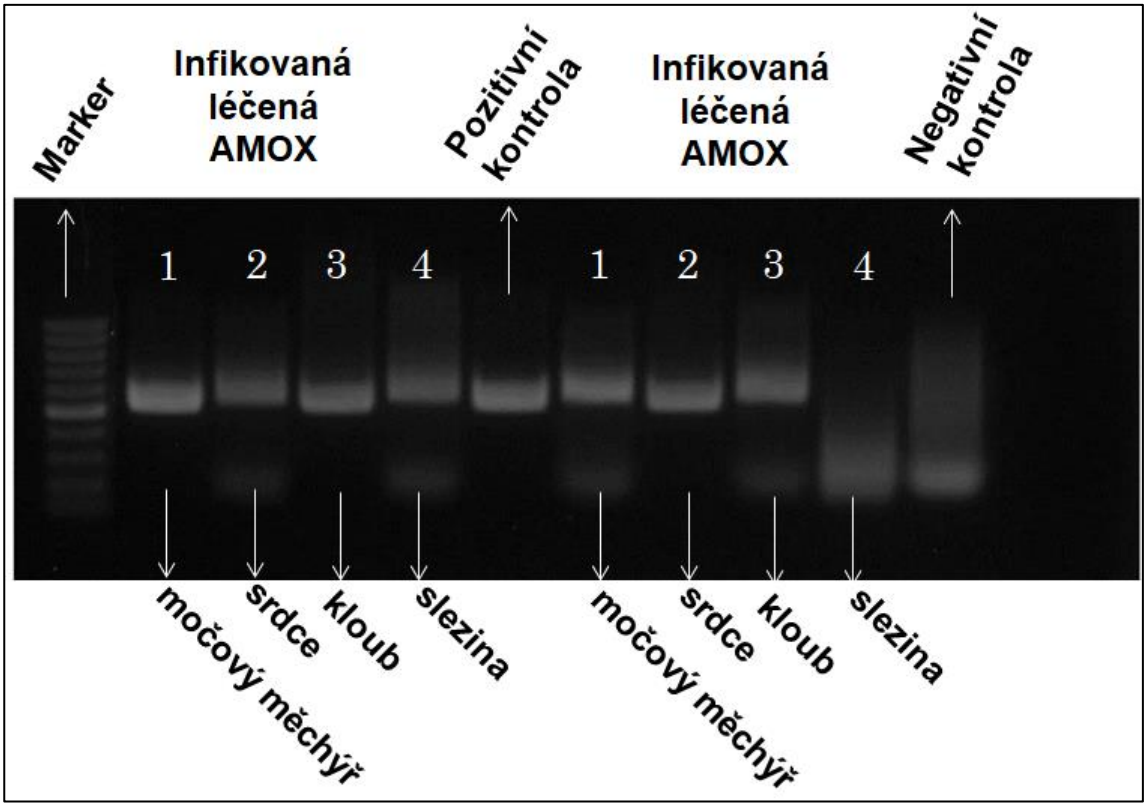
Účinnost antibiotik byla stanovena jejich aplikací na kultury borelií ve dvou rozdílných koncentracích a to 50 μg/ml a 100 μg/ml pro každé antibiotikum (Obr. 9 a - h). Perzistentní i spirální formy byly detekovány i při ošetření kultury borelií vysokými dávkami antibiotik. Stanovit procentuální zastoupení jednotlivých forem nebylo možné z důvodu tvorby agregátů (Obr. 9i).



Obr. 9: Detekce *B. burgdorferi* sensu stricto v kultuře přeléčené antibiotiky.
(a - h) Borelie v kultuře přeléčené antibiotiky AMOX a DOX o koncentracích 50 µg/ml (low) a 100 µg/ml (high). **(i, j)** Borelie v neléčené pozitivní kontrole. V levém sloupci jsou fotografie částí kultur při malém zvětšení. Pravý sloupec ukazuje detailní záběry spirálních forem borelií. Perzistentní formy borelií jsou ukázány v insertech v právého sloupce. Šipka ukazuje na agregát borelií. Měřítko: 1µm.

4.2 Detekce borelií v tkáních myší *Mus musculus* linie C3H/HeN přeléčených antibiotiky DOX a AMOX

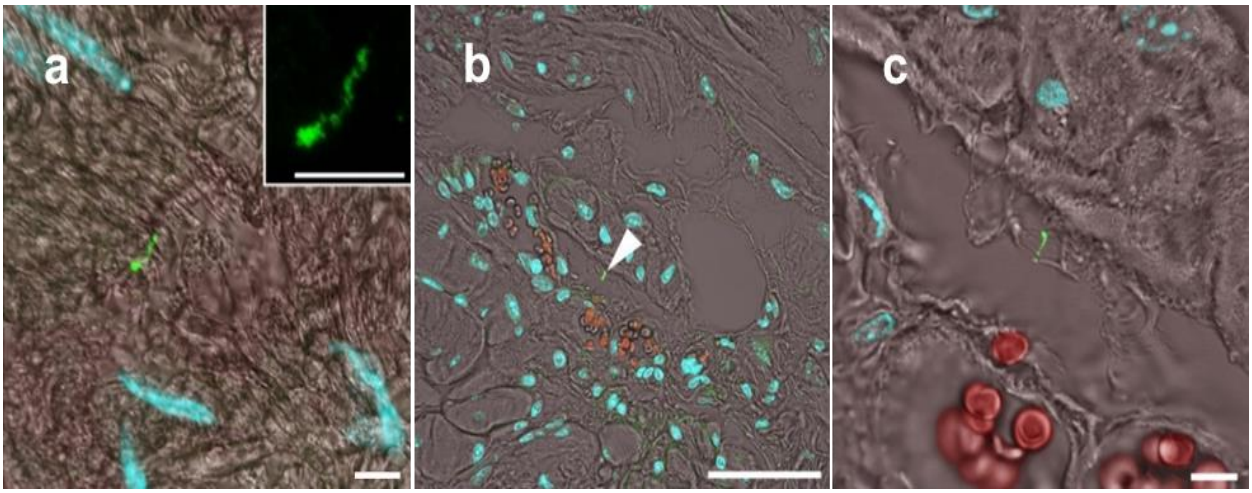
Jedinci inbrední myší linii C3H/HeN byli infikováni kulturou *B. burgdorferi* sensu stricto NE-5264 a následně léčeni antibiotiky DOX, AMOX a jejich kombinací podle protokolu CDC. Koncentrace antibiotik byla 70 μg DOX a AMOX 800 μg na jedince. Každá skupina obsahovala tři jedince. Přeléčené myši byly usmrceny a byly jim odebrány následující orgány: močový měchýř, srdce, kloub a slezina. Tyto orgány byly zvoleny na základě dřívějších studií, které u nich prokázaly vyšší míru výskytu borelií (Golovchenko et al., 2016). V laboratoři prof. RNDr. Libora Grubhoffera, Molekulární ekologie vektorů a patogenů, Parazitologický ústav Akademie věd České republiky Rudenko a kolektiv vzorky zpracovaly a podrobily analýze „nested" PCR, která testuje přítomnost DNA spirochét, genů *flagB* a *ospC* (obr. 10). Většina testovaných vzorků ať už přeléčených jednotlivými antibiotiky nebo jejich kombinací vykazovala přítomnost genů *flagB* a *ospC*, přičemž nejčastěji byly pozitivní vzorky kloubů a močových měchýřů (Příloha A). Sekvenace pozitivních PCR produktů potvrdila přítomnost DNA stejného kmene *B. burgdorferi* sensu stricto, kterým byly myši infikovány. Přestože pozitivní výsledky PCR odhalily přítomnost DNA borelií, nejednalo se o důkaz přítomnosti životaschopných forem.



Obr. 10: Příklad detekce genu *flagB* u dvou zastupců myší linie C3H/HeN přeléčených AMOX pomocí nested PCR. Marker**:** 100bp.

Přítomnost spirálních nebo perzistentních forem borelií, které by mohly vést k relapsu onemocnění, byla testována imunohistochemicky za použití protilátky anti-*B. burgdorferi* sensu lato, jejíž specificita byla prokázána *in vitro* v kulturách borelií. Imunohistochemická detekce byla provedena na paraplastových řezech všech orgánů, u kterých byla prokázána přítomnost DNA borelií pomocí „nested" PCR. Útvary připomínající tvarem a velikostí (v průměru 1 – 10 μm) morfologii perzistentních forem borelií byly nalezeny zejména v močovém měchýři a v kloubech (obr. 11). Vyskytovaly se ojediněle s frekvencí 0,16 – 0,3 kusy v 1 mm^3 tkáně.

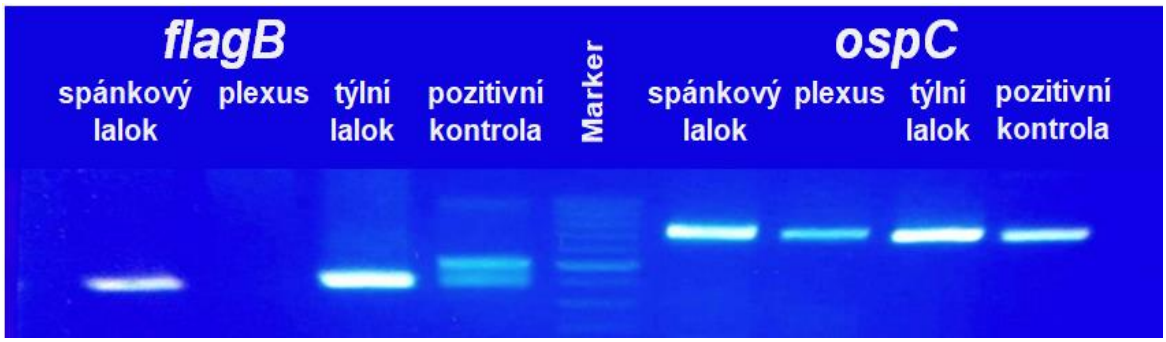
Přestože byla zjištěna přítomnost perzistentních forem, nelze vizuálně stanovit, zda se jedná o životaschopné borelie. Rudenko a kolektiv potvrdily výskyt životaschopných forem borelií v testovaných tkání pomocí rekultivace vzorků v kultivačním mediu, kde byly mikroskopicky pozorovány spirální formy borelií.



Obr. 11: Detekce perzistentních forem *B. burgdorferi* sensu stricto v myší linii C3H/HeN přeléčené antibiotiky DOX a AMOX. (**a)** Perzistentní forma borelie v močovém měchýři, detailní záběr v insertu. (**b)** Perzistentní forma v kolenním kloubu vyznačená šipkou. **(c)** Detailní záběr perzistentní formy z obrázku b. modře jsou značena jádra buněk, červeně erytrocyty. Měřítko: a, c 10 μm, b 100 μm.

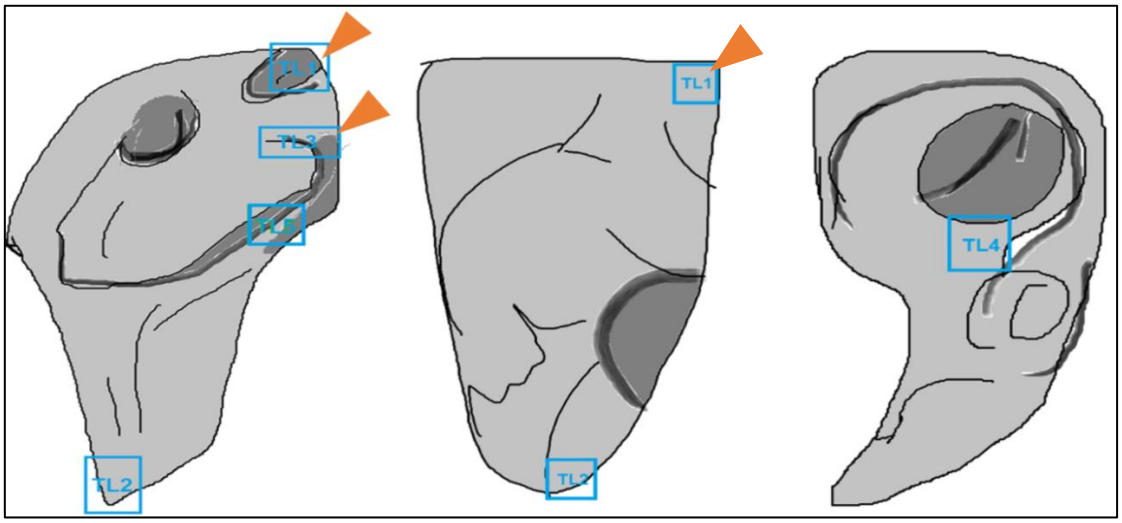
4.3 Detekce borelií v mozkové tkáni člověka přeléčeného běžně předepisovanými antibiotiky na lymskou boreliózu

Části lidského mozku odebrané patology po smrti pacienta (viz. Materiál a metody) byly Rudenko a kolektivem nejprve zpracovány a testovány na přítomnost genů *flagB* a *ospC* pomocí „nested“ PCR (obr. 12). Kromě těchto genů byla pomocí PCR stanovena i přítomnost 8 „housekeeping“ genů charakteristických pro borelie. Ve všech vzorcích byla potvrzena přítomnost alespoň jednoho z hledaných genů (Příloha B). Přítomnost největšího počtu genů borelie byla odhalena ve vzorcích z týlního laloku. Sekvenace produktů PCR odhalila přítomnost dvou kmenů *B. Burgdorferi* sensu stricto a *B. garinii*.



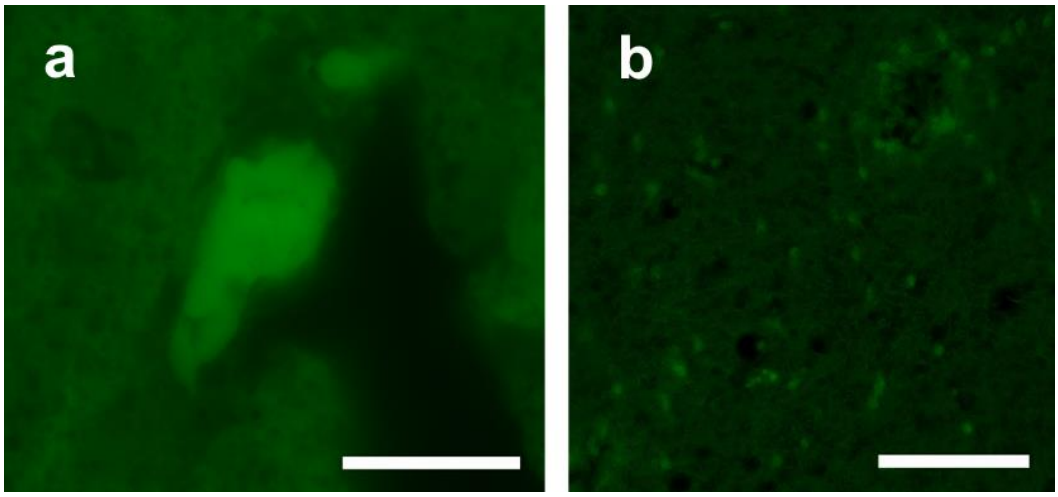
Obr. 12: Detekce genu *flagB* a *ospC* ve třech částech lidského mozku pomocí nested PCR. Marker**:** 100bp.

Nekropsie odebraná z týlního laloku o rozměrech 6 x 4 x 3 cm byla použita pro imunohistochemickou detekci borelií. Z velkého kusu tkáně byla náhodně vybrána screeningová místa o průměrné velikosti 125 mm^3, která byla odvodněna, převedena do paraplastu a pokrájena na řezy o tloušťce 10 µm (Obr. 13).



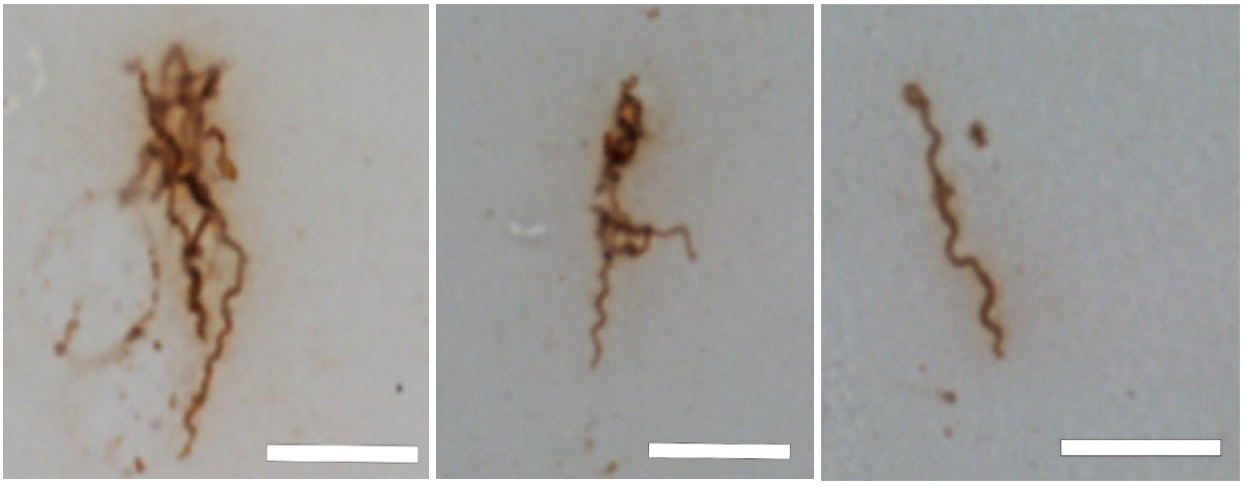
Obr. 13: Nekropsie lidského mozku o rozměrech 6x4x2x cm. Modré rámečky vyznačují 5 screeningových míst použitých pro zhotovení parafínových řezů. Šipky ukazují na místa, ve kterých byl nalezen pozitivní signál.

Na řezy byla aplikovaná primární protilátka anti-*B. burgdorferi* sensu lato. Obdobně jako v kulturách borelií nebo myších tkáních byla k vizualizaci použita sekundární protilátka fluorescentní značkou (Alexa 488). Během její detekce ve fluorescenčním mikroskopu byla však zaznamenána výrazná autofluorescence mozkové tkáně patrně způsobena lipofuscinem (Obr. 14).



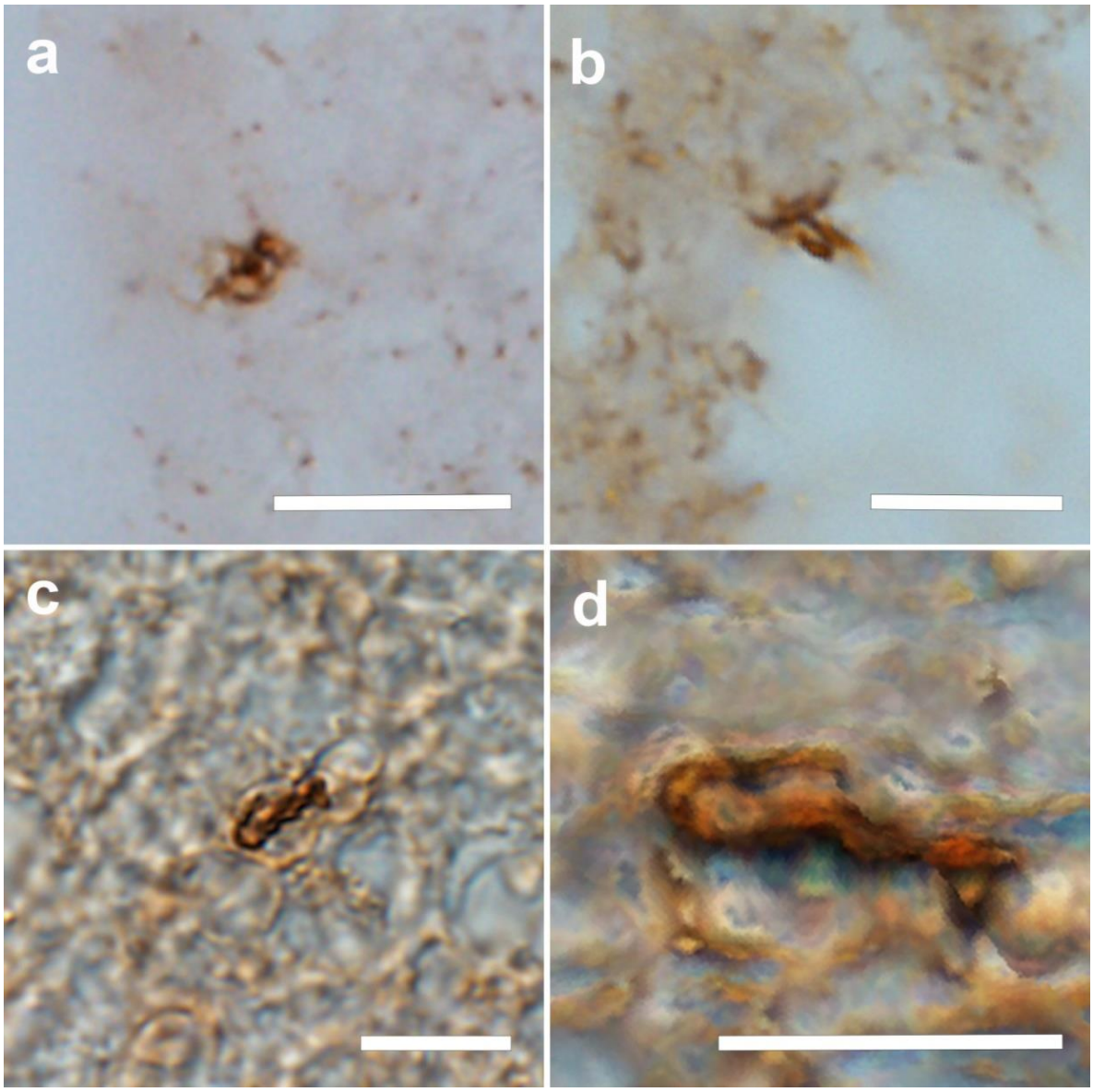
Obr. 14: Autofluorescence v paraplastových řezech týlního laloku lidského mozku. Poznámka: Autofluorescence může být způsobena lipofuscinem. Tento lipoprotein se v lidském mozku vyskytuje ve velké míře. Jeho hromadění se zvyšuje se stářím a při patologických stavech nebo úmrtí. Měřítko: a 10 μm, b 50 μm.

Z tohoto důvodu byla použita sekundární protilátka značená enzymaticky křenovou peroxidázou (HRP). Jejíž funkčnost byla nejprve ověřena na řezech z kontrolní kultury borelií (Obr. 15).



Obr. 15: Detekce borelií pomocí sekundární protilátky značené HRP. Snímky zachycují borelie v kultuře nepřeléčené antibiotiky. Měřítko: 10 μm.

Pomocí kombinace specifické primární protilátky a sekundární protilátky značené enzymaticky byly v lidském mozku objeveny útvary, které svými rozměry a morfologií odpovídají atypickým formám borelií (Obr. 16). Tyto útvary byly často stočené do cystické formy o rozměrech 1 - 10 μm. Jejich velikost odpovídala rozměru perzistentních forem borelií pozorovaných v antibiotiky ošetřených kulturách. Útvary se vyskytovaly ojediněle, přičemž z 5 screeningových míst byly detekovány atypické formy pouze u dvou (Obr. 13) s frekvencí 0,16 - 0,3 kusy v 1 mm^3 tkáně.



Obr. 16: Detekce borelií v týlním laloku lidského mozku. (**a-c)** Snímky ze světelného mikroskopu znázorňující atypické formy borelie. (**d)** Fotografie **c** byla upravena pomocí obrazové analýzy v programu Image J FIJI. Měřítko: 10μm.

5 Diskuze

Tato práce se zaměřuje na průkaz přítomnosti borelií v kulturách a tkáních hostitelů přeléčených běžně předepisovanými antibiotiky na lymskou boreliózu jako je DOX a AMOX. *In vitro* experimenty jasně prokázaly, že i vysoké dávky antibiotik nemají 100% účinnost na potlačení životaschopnosti borelií. V kulturách ošetřených 100 μg/ml byly kromě perzistentních forem pozorovány dokonce i formy spirální (Obr. 9), tudíž kultura pravděpodobně zůstávala i nadále životaschopná. Naše pozorování potvrzuje výsledky předchozích studií na kulturách *B. burgdorferi* sensu lato, kdy po ošetření sadou antibiotik (DOX, AMOX, tigecyklin, metronidazol a tinidazol) roste zastoupení perzistentních forem oproti formám spirálním a schopnost přežití obou forem závisí na použitém antibiotiku (Sapi et al., 2011). Tři dny po aplikaci DOX (500 μg/ml) klesl počet spirálních forem na 10 % a vzrostl počet perzisteních forem na 275 %, z nichž pouze 5 % nebylo životaschopných (procenta jsou uvedena vzhledem ke stavu kultury). Tři dny po aplikaci AMOX (500 μg/ml) se snížil počet spirálních forem na 30 % a perzistentních forem na 68 %, z nichž 30 % nebylo životaschopných. Největší účinnek byl pozorován po aplikaci tinidazolu (500 μg/ml) a tigecyklinu (20 μg/ml), které snižují počet forem spirálních o 94 % a 95 %, perzistentních na 6 % a 4 %, z nichž 2 % a 1 % nebyly životaschopné. Tinidazol se běžně používá proti protozoovým infekcím a tigecyklin při bakteriálních infekcích způsobených rezistentními bakteriemi, kdy jiná antibiotika selhávají (Sapi et al., 2011). V našem případě nebylo vyhodnoceno procentuální zastoupení jednotlivých forem jednak z důvodu tvorby agregátů a jednak proto, že kultury borelií byly využity zejména k ověření specificity námi používané primární protilátky. Pozorované shluky borelií mohly být zapříčiněny centrifugací během zpracování kultury pro imunohostochemickou detekci na paraplastových řezech popřípadě i stářím kultury. Nicméně při analýze imunohistochemické reakce nebyly pozorovány výrazné rozdíly v zastoupení cystických forem po ošetření DOX a AMOX, což lze vysvětlit použitím výrazně nižších koncentrací antbiotik než bylo použito ve výše uvedené práci (Sapi et al., 2011).

K ověření, zda běžně užívaný postup při léčbě lymské boreliózy tj. aplikace DOX a AMOX vede k úplnému potlačení infekce, byly studovány tkáně savců přeléčených *in vivo* dle protokolu CDC. Imunohistochemická detekce odhalila přítomnost borélií v kolenním kloubu a v močovém měchýři myší přeléčených antibiotiky AMOX, DOX a jejich kombinací a v týlním laloku lidského mozku (post mortem). Ve všech případech se jednalo

o atypické formy borelií s rozměry 1 - 10 μm a morfologií odpovídající cystickým perzistentním formám. Vzhledem k nízké frekvenci jejich výskytu tj. 0,16 - 0,3 kusy v 1 mm^3 tkáně, nelze vyloučit, že spirální formy, které se v ošetřených kulturách borelií vyskytují ve výrazně nižším procentuálním zastoupení (Sapi et al., 2011), zůstaly v tkáních neodhaleny. Životaschopnost borelií v přeléčených jedincích ověřená jejich úspěšnou rekultivací z myších tkání, může být zapříčiněna buď existencí replikujících se forem borelií, které se nepodařilo detekovat nebo změnou atypické formy borelií zpět do spirální formy při navrácení do příznivých podmínek. Schopnost perzistentních forem borelií vrátit se do své spirální replikující se formy byla již dříve prokázána *in vitro* (Brorson et al., 1998). Tyto kultivační pokusy však neberou v úvahu možnost, že kultura perzistentních borelií mohla obsahovat replikujících se spirální jedince, kteří unikli detekci. Reverze cystických forem borelií na replikující se formy nikdy přímo pozorována nebyla. Tento fenomén je však dobře známý u jiných spirochét například původce onemocnění syfilis, (spirochéta rodu *Treponema pallidum*), která po přeléčení antibiotiky přechází do perzistentní formy vyvolávající chronické onemocnění (Miklossy et al., 2008).

Chronická lymská borelióza je stále kontroverzním tématem a není lékařskou společností akceptována. To má negativní vliv na pacienty, kterým se nedostává vhodné léčby. Dlouhodobé užívání antibiotik však nemusí být účinné a navíc může mít negativní vliv na zdraví. Důkazů prokazujících přetrvání onemocnění na základě přítomnosti atypických forem borelií není mnoho. Existují jen ojedinělé studie podporující existenci borelií v přeléčených jedincích. Jedná se o závěry z lékařských kazuistik prokazujících přítomnost borelií v tkáních z přeléčených pacientů, většinou na základě výsledků PCR testů, které ovšem nepotvrzují přítomnost životaschopných borelií (Lantos et al., 2013). Imunohistologické testování biopsií nebo nekropsií bylo provedeno sporadicky (kvůli vzácnosti analyzovaných vzorků) a navíc velikost i popis forem borelií byly nejednotné. U některých studií byla zpochybněna specifita použité monoklonální protilátky, u které se prokázala zkřížená reaktivita s dalšími lidskými antigeny (Lantos et al., 2013; Yu et al., 1997).

Podobně jako je tomu u chronické lymské boreliózy, se v současné době množí důkazy o tom, že jedním z původců Alzheimrovy choroby (AD) mohou být atypické formy spirochét. Důkazem mohou být patologické procesy vyskytující se u AD, které jsou v několika aspektech shodné se záněty mozku, zpusobenými perzistentními bakteriemi.

Těžce zničitelné perzistentní formy spirochét mohou být spouštěčem silného zánětu vedoucího až k apoptóze neuronů či k amyloidóze. (Miklossy, 2008; Miklossy et al., 2005)

Přestože lymská borelióza ještě není uznána jako nemoc přímo působící úmrtí pacienta, snižuje kvalitu života milionům lidí po celém světě. Důkazů potvrzujících chronicitu lymské boreliózy přibývá, což vede k nutnosti pochopení její příčiny a k nalezení vhodného způsobu léčby. Tato studie prokazuje schopnost borelií přežít v hostiteli po antibiotické léčbě a to jak rekultivací spirochet z tkání přeléčených hlodavců, tak imunohistochemickou detekcí borelií pomocí specifické protilátky. Předkládá tak pádný důkaz toho, že běžná monoterapeutická léčba lymské boreliózy není dostačující ke kompletnímu odstranění infekce.

6 Závěr

Léčba lymské boreliózy spočívá v eliminaci replikujících se forem spirochét aplikací různých druhů antibiotik. Nejčastěji se používá krátkodobá monoterapie antibiotiky doxycyklin a amoxicilin. V mnoha případech však příznaky nemoci přetrvávají i po opakované léčbě. Výsledky imunohistochemického šetření ukázaly, že se ve tkáních savců přeléčených dle zavedených postupů stále nachází perzistentní formy borelií s frekvencí výskytu 0,16 – 0,3 jedinců na 1 mm^3. Schopnost rekultivace borelií z tkání přeléčených myší prokázala přítomnost životaschopných forem borelií. Relaps infekce by mohl být způsoben reverzí perzistentních forem zpět do forem replikujících poté, co se zmírní či ustoupí účinek antibiotik. Nelze však vyloučit, že vzhledem k nízké frekvenci výskytu borelií v přeléčených tkáních se jen nepodařilo zachytit spirální formy, které se v ošetřených kulturách borelií vyskytly v mnohem nižším zastoupení než formy perzistentní.

7 Seznam zkratek

16SrRNA	gen 16S ribozomální podjednotky
ACA	atopický chronický ekzém
AD	Alzheimerova choroba
AMOX	amoxicilin
BHS	Bouin-Hollande fixáž
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CNS	centrální nervový systém
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DOX	doxycyclyne
DPX	dibutylphthalate polystyrene xylene medium
EM	*erythema migrans*
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
flaB	gen bičíku *flagelinB*
HRP	křenová peroxidáza
LD	Lyme disease
MKP	Kelly-Pettenkofer medium
PBS	fosfátový pufr
PCR	Polymerázová řetězová reakce
ospA	Outer Surface Proteins A
ospB	Outer Surface Protein B
ospC	Outer Surface Protein C
WHO	Světová zdravotnická organizace

8 Přehled použité literatury

Ablin, J. N., Shoenfeld, Y. and Buskila, D., (2006). Fibromyalgia, infection and vaccination: two more parts in the etiological puzzle. Journal of autoimmunity, 27(3), pp.145-152.

Amoxicillin - an antibiotic | ari.info | ari.info. 302 Found [online]. Copyright © (2021)., Understanding Animal Research [cit. 08.04.2021]. Dostupné z: http://www.animalresearch.info/en/drug-development/drug-prescriptions/amoxicillin/

Antibiotic Drugs, Information, Description on Doxycycline. Antibiotics use and resistance. Information on Antibiotics. [online]. Copyright © (2016)., antibiotics [cit. 08.04.2021]. Dostupné z: http://www.antibiotics-info.org/doxycycline.html

Asbrink, E., Hovmark, A., (1993). Classification, geographic variations, and epidemiology of Lyme borreliosis. Clin Dermatol; 11: 353-7.

Aucott, J., Morrison, C., Munoz, B., Rowe, P. C., Schwarzwalder, A. and West, S. K., (2009). Diagnostic challenges of early Lyme disease: lessons from a community case series. BMC Infectious Diseases, 9(1), p.79.

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

Bartůněk, P., et. al., (2013). Lymeská borelióza. Praha : Grada Publishing, a.s., ISBN 978-80-247-4355-4.

Biesiada G., Czepiel J., Leśniak M. R., Garlicki A., Mach T., (2012). Lyme disease: review. Arch Med Sci.; 8(6):978-82.

Bratton R. L., Whiteside J.W., Hovan M. J., Engle R. L., Edwards F. D., (2008). Diagnosis and treatment of Lyme disease. Mayo Clin Proc.; 83(5):566-71.

Brorson Ø, Brorson S. H., Henriksen T. H., Skogen P. R., Schoyen R., (2001). Association between multiple sclerosis and cystic structures in cerebrospinal fluid. Infection.; 29:315–9.

Brorson, Ø. & Brorson, S. H., (1998a). In vitro conversion of *Borrelia burgdorferi* to cystic forms in spinal fluid, and transformation to mobile spirochetes by incubation in BSK-H media. Infection 26, 144±150.

Brorson, Ø. and Brorson, S. H., (1997). Transformation of cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to normal, mobile spirochetes. Infection, 25(4), pp.240-246.

Brorson Ø, Brorson S. H., (1998). A rapid method for generating cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and their reversal to mobile spirochetes. APMIS.;106:1131–41.

Bunikis, J.; Barbour, Alan G., (2002). Laboratory testing for suspected lyme disease. , 86(2), 311–340.

Bunikis, J., (2004). Sequence typing reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents *Borrelia burgdorferi* in North America and *Borrelia afzelii* in Europe. Microbiology, 150(6), 1741–1755.

Burgdorfer, W., Barbour, A. G., Hayes, S. F., Benach, J. L., Grunwaldt, E., Davis, J. P., (1982).Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? Science 216, 1317–1319.

Casjens S. R., Mongodin E. F., Qiu W. G., Luft B. J., Schutzer S. E., Gilcrease E. B., Huang W. M., Vujadinovic M., Aron J. K., Vargas L. C., Freeman S., Radune D., Weidman J. F., Dimitrov G. I, Khouri H. M., Sosa J. E., Halpin R. A., Dunn J. J., Fraser C. M., (2012). Genome stability of Lyme disease spirochetes: comparative genomics of *Borrelia burgdorferi* plasmids. PLoS One.;7(3)

Clark, K., Hendricks, A. and Burge, D., (2005). Molecular identification and analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lizards in the southeastern United States. Appl. Environ. Microbiol., 71(5), pp.2616-2625.

De la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fernández, L. and Hancock, R. E., (2013). Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. Current opinion in microbiology, 16(5), pp.580-589.

Derdáková M., Lencáková D., (2005). Association of genetic variability within the *Borrelia burgdorferi* sensu lato with the ecology, epidemiology of Lyme borreliosis in Europe. Ann Agric Environ; 12: 165-72.

Eisen L., Lane R. S. Vectors of Borrelia burgdorferi sensu lato. In: Gray JS, Kahl O, Lane RS, Stanek G, editors. Lyme Borreliosis Biology, Epidemiology and Control. CABI Publishing; New York: 2002.

Embers, M. E., Barthold, S. W., Borda, J. T., Bowers, L., Doyle, L., Hodzic, E., Philipp, M. T. (2012). Persistence of *Borrelia burgdorferi* in *Rhesus Macaques* following Antibiotic Treatment of Disseminated Infection. PLoS ONE, 7(1)

Feng J., Shi W., Zhang S., Zhang Y. P., (2015). Persister mechanisms in *Borrelia burgdorferi*: implications for improved intervention. EMI.;4:e51.

Flisiak R., Prokopowicz D., (2000). Antibodies against *Borrelia garinii* in diagnosis of Lyme borreliosis [Polish]. Przegl Lek; 57: 147-9.

Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M., Sutton, G. G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K. A., Dodson, R., Hickey, E. K. and Gwinn, M., (1997). Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. Nature, 390(6660), p.580.

Garkowski A., Zajkowska J., Zajkowska A., et al., (2017). "Cerebrovascular manifestations of lyme neuroborreliosis-A systematic review of published cases," Frontiers in Neurology, vol. 8, p. 146.

Garibyan, L. and Avashia, N., (2013). Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). The Journal of investigative dermatology, 133(3), p.e6.

Grab D. J, Kennedy R, Philipp M. T., (1996). *Borrelia burgdorferi* possesses a collagenolytic activity. FEMS Microbiol Lett. Oct 15;144(1):39-45.

Grier, T.M., (2000). The complexities of Lyme disease. A microbiology tutorial, Lyme Disease Survival Manual.

Gruntar, I., Malovrh, T., Murgia, R. and Cinco, M., (2001). Conversion of *Borrelia garinii* cystic forms to motile spirochetes in vivo Note. Apmis, 109(5), pp.383-388.

Grygorczuk S., Pancewicz S., Zajkowska J., Kondrusik M., Moniuszko A., (2008). Articular symptoms in Lyme borreliosis. Pol Merk Lek; 24: 542-4.

Golovchenko M., Šíma R., Hajdušek O., Grubhoffer L., Oliver J.H., Rudenko N.(2014) Invasive potential of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto ospC type L strains increases the possible disease risk to humans in the regions of their distribution. Parasites & Vectors 7:538.

Halperin J. J., Shapiro E. D., Logigian E., et al., (2007). Practice parameter: treatment of nervous system Lyme disease (an evidence- based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. Neurology; 69: 91-102.

Hansen K., Crone C., Kristoferitsch W., (2013). Lyme neuroborreliosis. Handb Clin Neurol.;115:559-75.

Hildenbrand P., Craven D. E., Jones R., Nemeskal P., (2009). Lyme neuroborreliosis: manifestations of a rapidly emerging zoonosis. AJNR Am J Neuroradiol.:1079-87.

Chopra I., Roberts M., (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol Mol Biol Rev 65:232-260

Iyer R., Mukherjee P., Wang K., Simons J., Wormser G. P., Schwartz I., (2013). Detection of *Borrelia burgdorferi* nucleic acids after antibiotic treatment does not confirm viability. J Clin Microbiol 51:857-862.

Jefferson, K. K., (2004). What drives bacteria to produce a biofilm?. FEMS mikrobiology letters, 236(2), pp.163-173.

Kristoferitsch, W.; Aboulenein-Djamshidian, F.; Jecel, J.; Rauschka, H.; Rainer, M.; Stanek, G.; Fischer, P., (2018). Secondary dementia due to Lyme neuroborreliosis. Wiener klinische Wochenschrift

Lantos, P. M., Auwaerter, P. G., & Wormser, G. P., (2013). A Systematic Review of *Borrelia burgdorferi* Morphologic Variants Does Not Support a Role in Chronic Lyme Disease. Clinical Infectious Diseases, *58(5), 663–671.*

Lebech A. M., Hansen K., Brandrup F., et al: (2000). Diagnostic value of PCR for detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in clinical specimens from patients with erythema migrans and Lyme neuroborreliosis. Mol Diagn 5:139–150.

Lewis K., (2007) Persister cells, dormancy and infectious disease. Nature Reviews Microbiology 5: 48–56.

Margos, G.; Gatewood, A. G.; Aanensen, D. M.; Hanincova, 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*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105(25), 8730–8735.

Meriläinen, L., Herranen, A., Schwarzbach, A. and Gilbert, L., (2015). Morphological and biochemical features of *Borrelia burgdorferi* pleomorphic forms. Microbiology, 161(Pt3), p.516.

Middelveen, M., Sapi, E., Burke, J., Filush, K., Franco, A., Fesler, M. and Stricker, R., (2018). Persistent *Borrelia* infection in patients with ongoing symptoms of Lyme disease. In Healthcare (Vol. 6, No. 2, p. 33).

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

Miklossy, J., Khalili, K., Gern, L., Ericson, R. L., Darekar, P., Bolle, L., Paster, B. J., (2005). *Borrelia burgdorferi* persists in the brain in chronic lyme neuroborreliosis and may be associated with Alzheimer disease. Journal of Alzheimer's Disease, 6(6), 639–649.

Miklossy, J., (2008). Chronic Inflammation and Amyloidogenesis in Alzheimer's Disease -- Role of Spirochetes1. Journal of Alzheimer's Disease, 13(4), 381–391.

Moniuszko-Malinowska A., Czupryna P., Dunaj J., Pancewicz S., Garkowski A., Kondrusik M., Grygorczuk S., Zajkowska J., (2018). Acrodermatitis chronica atrophicans: various faces of the late form of Lyme borreliosis. Postepy Dermatol Alergol. 35(5):490-494.

Motaleb M. A., Liu J., Wooten R. M., (2015). Spirochetal motility and chemotaxis in the natural enzootic cycle and development of Lyme disease. Curr Opin Microbiol. 28:106-13.

Murray T. S., Shapiro E. D., (2010). Lyme disease. Clin Lab Med; 30: 311-28.

Mursic, V. P., Wanner, G., Reinhardt, S., Wilske, B., Busch, U., and Marget, W., (1996). Formation and cultivation of *Borrelia burgdorferi* spheroplast-L-form variants. Infection 24, 218–226.

Müllegger R. R., Glatz M., (2008). Skin manifestations of lyme borreliosis: diagnosis and management. Am J Clin Dermatol; 9: 355-68.

Nadelman R. B., (2015). *Erythema migrans*. Infect Dis Clin North Am. 211-39.

Nau R., Christen H. J., Eiffert H. (2009). Lyme disease – current state of knowledge. Dtsch Arztebl Int; 106: 72-81.

Oksi J., Uksila J., Marjamaki M., et al: (1995). Antibodies against whole sonicated *Borrelia burgdorferi* spirochetes, 41-kilodalton flagellin, and P39 protein in patients with PCRor culture-proven late Lyme borreliosis. J Clin Microbiol 33:2260–2264.

Pfister H. W., Wilske B., Weber K., (1994). Lyme borreliosis: basic science and clinical aspects. Lancet. 343:1013–6

Pritt B. S., Mead P. S., Johnson D. K. H., Neitzel D. F., Respicio-Kingry L. B., Davis J. P., et al., (2016). Identification of a novel pathogenic *Borrelia* species causing Lyme borreliosis with unusually high spirochaetaemia: a descriptive study. Lancet Infect Dis.;16:556–64.

Rauter, C., & Hartung, T., (2005). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Genospecies in *Ixodes ricinus* Ticks in Europe: a Metaanalysis. Applied and Environmental Microbiology, 71(11), 7203–7216.

Rovery, C., Greub G., Lepidi H., Casalta J. P., Habib G., Collart F., and Raoult D., (2005). PCR detection of bacteria on cardiac valves of patients with treated bacterial endocarditis. J. Clin. Microbiol. 43:163–167.

Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L. and Oliver Jr, J.H., (2011). Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. Ticks and tickborne diseases, 2(3), pp.123-128.

Rudenko N., Golovchenko M., Kybicova K., Vancova M., (2019). Metamorphoses of Lyme disease spirochetes: phenomenon of *Borrelia* persisters. Parasit Vectors. 12(1):237.

Rudenko, N., Golovchenko, M., Mokrácek, A., Piskunová, N., Ruzek, D., Mallatová, N.,Grubhoffer, L., (2008). Detection of *Borrelia bissettii* in cardiac valve tissue of a patient with endocarditis and aortic valve stenosis in the Czech Republic. J. Clin. Microbiol. 46, 3540–3543.

Sapi E., Bastian S. L., Mpoy C. M., Scott S., Rattelle A., Pabbati N., Poruri A., Burugu D., Theophilus P. A., Pham T. V., Datar A., Dhaliwal N. K., MacDonald A., Rossi M. J., Sinha S. K., Luecke D. F., (2012). Characterization of biofilm formation by *Borrelia burgdorferi* in vitro. PLoS One. 2012;7(10).

Sapi E., Kaur N., Anyanwu S., Luecke D. F., Datar A., Patel S., et al., (2011). Evaluation of in-vitro antibiotic susceptibility of different morphological forms of *Borrelia burgdorferi*. Infect Drug Resist.;4:97–113.

Sauman, I., Reppert, S. M., (1996). Circadian Clock Neurons in the Silkmoth *Antheraea pernyi*: Novel Mechanisms of Period Protein Regulation. Neuron, 17(5), 889–900.

Sharma, B.; Brown, A. V.; Matluck, N. E.; Hu, L. T.; Lewis, K., (2015). *Borrelia burgdorferi*, the Causative Agent of Lyme Disease, Forms Drug-Tolerant Persister Cells. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 59(8), 4616–4624.

Shor, S.; Green, Ch.; Szantyr, B.; Phillips, S.; Liegner, K.; Burrascano, J.; Bransfield, R.; Maloney, E. L., (2019). Chronic Lyme Disease: An Evidence-Based Definition by the ILADS Working Group. Antibiotics, 8(4)

Schnappinger D., Hillen W., (1996). Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. Arch Microbiol. Jun;165(6):359-69.

Sokolov A. A., Lienhard R., Du Pasquier R. and Erard V., (2015). "Acute Lyme neuroborreliosis with transient hemiparesis and aphasia," Annals of Emergency Medicine, vol. 66, no. 1, pp. 60–64.

Stanek G., Wormser G. P., Gray J., (2012). Strle F., Lyme borreliosis. Lancet; 379: 461-73.

Vasudevan B., Chatterjee M., (2013). Lyme borreliosis and skin. Indian J Dermatol. 58(3):167-74.

Tavora, F., Burke A., Li L., Franks T. J. and Virmani R., (2008). Postmortem confirmation of Lyme carditis with polymerase chain reaction. Cardiovasc. Pathol. 17:103–107

Treatment for *erythema migrans* | Lyme Disease | CDC. *Centers for Disease Control and Prevention* [online]., 2019, Dostupné z: https://www.cdc.gov/lyme/treatment/index.html

Tugwell, P., Dennis, D. T., Weinstein, A., Wells, G., Shea, B., Nichol, G., Hayward, R., Lightfoot, R., Baker, P. and Steere, A. C., (1997). Laboratory evaluation in the diagnosis of Lyme disease. Annals of Internal Medicine, 127(12), pp.1109-1123.

Waddell, L. A., Greig, J., Mascarenhas, M., Harding, S., Lindsay, R., & Ogden, N., (2016). The Accuracy of Diagnostic Tests for Lyme Disease in Humans, A Systematic Review and Meta-Analysis of North American Research. PLOS ONE, 11(12), e0168613.

Weber D. J., Tolkoff-Rubin N. E., Rubin R. H., (1984). Amoxicillin and potassium clavulanate: an antibiotic combination. Mechanism of action, pharmacokinetics, antimicrobial spectrum, clinical efficacy and adverse effects. Pharmacotherapy. 4(3):122-36.

Wolgemuth, C. W., (2015). Flagellar motility of the pathogenic spirochetes.In Seminars in cell & developmental biology, Vol. 46, pp. 104-112.

Wormser G. P., Dattwyler R. J., Shapiro E. D., Halperin J. J., Steere A. C., Klempner M. S., Krause P. J., Bakken J. S., Strle F., Stanek G., Bockenstedt L., Fish D., Dumler J. S., Nadelman R. B., (2006). The clinical assessment, treatment, and prevention of lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2006 Nov 1;43(9):1089-134.

Wormser G. P., McKenna D., Carlin J., et al., (2005). Brief communication: hematogenous dissemination in early Lyme disease. Ann Intern Med. 142:751–5

Yu Z., Tu J., Chu Y. H., (1997). Confirmation of cross-reactivity between Lyme antibody H9724 and human heat shock protein 60 by a combinatorial approach. Anal Chem; 69:4515–8.

Zhang Y., (2014). Persisters, persistent infections and the Yin-Yang model. Emerg Microbes Infect. 3(1):e3.

9 Přílohy

A.

	m2 negativní 1A	m3 pozitivní 2A	m4 pozitivní 2B	m5 pozitivní 2C	m6 Dox 3A	m7 Dox 3B	m8 Dox 3C
m. měchýř	flagB /ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ ospC
slezina	flagB /ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ospC
srdce	flagB /ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB /ospC
kloub	flagB /ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ospC
	m1 negativní 1B	m9 Amox 4A	m10 Amox 4B	m11 Amox 4C	m12 A/D 5A	m13 A/D 5B	m14 A/D 5C
m. měchýř	flagB /ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB /ospC	flagB /ospC
slezina	flagB /ospC	flagB /ospC	flagB/ospC	flagB /ospC	flagB/ospC	flagB/ ospC	flagB/ospC
srdce	flagB /ospC	flagB /ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ ospC
kloub	flagB /ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ospC	flagB/ospC

Příloha A: Tabulka výsledků PCR analýzy z myších tkání. Červená barva znamená pozitivitu. A/D je zkratka pro kombinaci antibiotik (AMOX/DOX). Negativní 1A a 1B jsou neinfikované myši. Pozitivní 2A - 2C jsou neléčené myši.

B.

	spánkový lalok	plexus	týlní lalok	čelní lalok	temenní lalok	bazální ganglium	mozeček
uvrA	+	+	+	+	+	+	+
clpA		+	+	+	+		
pepX	+	+	+	+	+	+	+
rplB	+	+	+	+	+	+	+
pyrG		+	+	+	+	+	+
clpX					+		
nifS	+		+	+	+	+	

Příloha B: Tabulka výsledků PCR analýzy 8 housekeeping genů ve vzorcích lidského mozku. Pozitivní signál označen symbolem +.