

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Citlivost spirochet komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato
k lidskému komplementu: infekční potenciál vybraných druhů**

Diplomová práce

Bc. Lucie Tichá

školitelka: Maryna Golovchenko, MSc.

vedoucí práce: Nataliia Rudenko, PhD.

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

České Budějovice 2015

Tichá, L., 2015 Citlivost spirochet komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato k lidskému komplementu: infekční potenciál vybraných druhů. [Sensitivity of spirochetes from *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex to human complement: infection potential of selected species. Mgr. Thesis, in Czech.] – 42p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: Sensitivity of spirochetes from *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex to serum complement of humans of different age and sex was analyzed. Complement-mediated *Borrelia* killing was observed in different combination of serum and selected *Borrelia* genospecies. The obtained results confirmed that age itself does not influence the sensitivity of human to *Borrelia* infection. However, the females seem to be more vulnerable to it. Each of ten tested *Borrelia* species was proved to be potentially infective for human in different ratio. The clear separation of all ten checked *Borrelia* species into two groups was revealed after the reaction with human sera: species with low sensitivity to human serum complement (mortality below 1 percent) and species with higher sensitivity (mortality over 3-4 percent).

This study was supported by European FP7 project 278976 ANTIGONE (ANTicipating the Global Onset of Novel Epidemics) and by institutional support RVO: 60077344 from the Biology Centre, Institute of Parasitology Academy of Sciences of the Czech Republic. This study was also supported by Student Grant Agency (SGA) from Faculty of Science, University of South Bohemia.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval/a 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, 10. prosince 2015

Lucie Tichá

Na tomto místě bych ráda poděkovala svým školitelkám Marině Golovchenko a Natashe Rudenko za jejich trpělivost, ochotu, cenné rady a pomoc při zpracování této práce. Děkuji paní Heleně Langhansové a Jaroslavě Lieskovské za pomoc při práci v laboratoři a při řešení nejrůznějších otázek. Velký dík patří sestře Kateřině Volavkové (ordinace MUDr. Františka Součka) za pomoc s odběrem materiálu nezbytného pro tuto práci. Chtěla bych také poděkovat profesorovi Liborovi Grubhofferovi za umožnění práce v Laboratoři molekulární biologie vektorů a patogenů. Děkuji Studentské Grantové Agentuře PřF JU za finanční podporu projektu, který byl součástí této diplomové práce. Mým rodičům děkuji za jejich všestrannou dlouholetou podporu, které si nesmírně vážím.

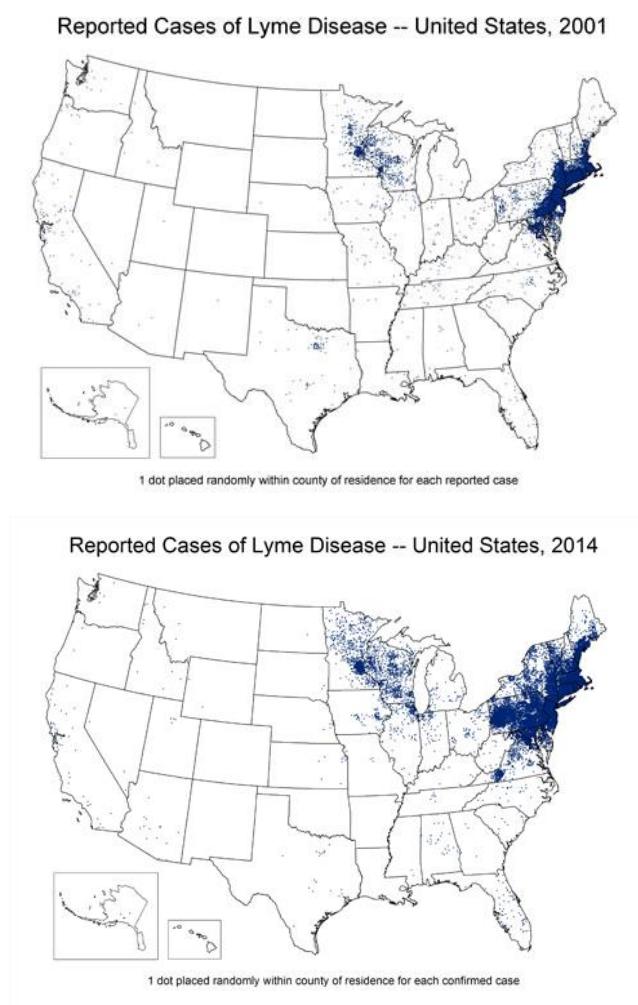
Děkuji

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
1.1 Původce onemocnění.....	2
1.2 Lymfská borelióza.....	5
1.3 Komplement.....	8
1.4 Interakce borelie – hostitel.....	9
2. CÍLE PRÁCE.....	11
3. MATERIÁLY A METODY.....	12
3.1 Použité materiály a chemikálie.....	12
3.2 Použité metody.....	14
3.2.1 Sběr vzorků lidské krve.....	14
3.2.2 Oddělení séra od krevní složky.....	15
3.2.3 Kontrola sér na přítomnost boreliových protilátek.....	15
3.2.4 Kultivace různých druhů borelií komplexu <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	15
3.2.5 Izolace genomové DNA.....	15
3.2.6 PCR (Polymerase Chain Reaction.....	15
3.2.7 Elektroforéza.....	16
3.2.8 Purifikace PCR produktů.....	17
3.2.9 Sekvence.....	17
3.2.10 Mikroskopie temného pole.....	17
3.2.11 Test citlivosti různých druhů borelií k lidskému komplementu.....	18
3.2.12 Průtoková cytometrie.....	18
4. VÝSLEDKY.....	21
4.1 Sběr vzorků.....	21
4.2 Kontrola sér na přítomnost boreliových protilátek.....	21
4.3 Kultivace různých druhů borelií komplexu <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	23
4.4 Vyhodnocení testu citlivosti borelií k lidskému komplementu pomocí průtokové cytometrie.....	24
5. DISKUSE.....	28
6. ZÁVĚR.....	31
7. LITERATURA.....	33

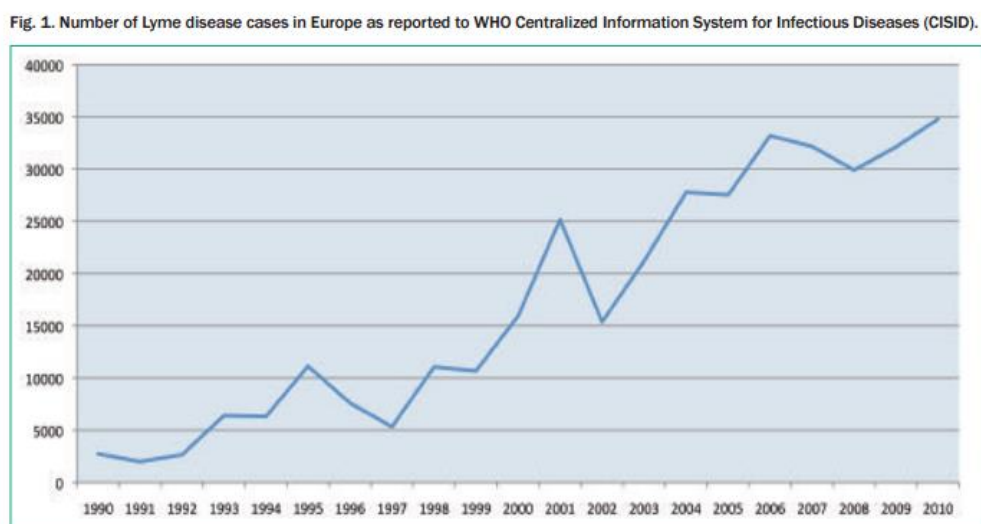
1. ÚVOD

Lymeská borelióza (též lymeská borelióza, dále jen LB) je nejčastější infekční onemocnění přenášené klíšťaty na člověka. Je rozšířeno zejména na severní polokouli. Způsobeno je spirochetami rodu *Borrelia*. Ročně je evidováno na 85 000 případů v Evropě a až 300 000 v USA (www.cdc.gov). S připočtením neohlášených případů tohoto onemocnění se může celkový počet za rok dostat až na 500 000 LB jen v USA (Nelson et al., 2015). Počet případů 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). Díky objevu nových druhů a přetrvávajícím analýzám infekčních schopností již popsanych borelií je možné, že se i další druhy borelií zapojí do skupiny infekčních patogenů člověka. Nárůst případů LB v USA mapuje americká vládní agentura CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (Obr. 1). V Severní Americe se navíc předpokládá rozšíření klíšťat a onemocnění i do Kanady (Brownstein et al., 2005).



Obr. 1: Nárůst případů onemocnění LB mezi lety 2001 až 2014 v USA (převzato z <http://www.cdc.gov> a upraveno).

Podobná situace je i v Evropě, kde se vektor, klíště obecné (*Ixodes ricinus*), rozšířil od roku 1980 do vyšších zeměpisných šířek a nadmořských výšek (Materna et al., 2005). Dá se tedy očekávat šíření LB stejným směrem (Lindgren a Jaenson, 2006). Nárůst zaznamenaných případů v Evropě mapuje světová zdravotnická organizace WHO Regional Office for Europe (World Health Organisation), nebo organizace ECDC (European Center for Disease Prevention and Control) (Obr. 2).



Obr. 2: Nárůst případů onemocnění LB v Evropě od roku 1990 do 2010 (převzato z <http://ecdc.europa.eu>).

1.1 Původce onemocnění

Lymfskou boreliózu způsobují Gram-negativní bakterie z komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Rod *Borrelia* je dělen do dvou skupin. První skupina zahrnuje spirochety způsobující návratnou horečku. Významnými zástupci této skupiny jsou *B. caucasica*, *B. crocidurae*, *B. duttoni*, *B. graingeri*, *B. hermsii*, *B. hispanica*, *B. latyschewii*, *B. mazzottii*, *B. parkeri*, *B. persica*, *B. recurrentis*, *B. turicatae*, *B. venezuelensis*. Vektory těchto borelií jsou klíšťáci rodu *Ornithodoros* a vši *Pediculus humanus* (Fensfeld, 1965). Do této skupiny se dále řadí druh *B. miyamotoi*, který je přenášen nejméně šesti druhy klíšťat, které jsou zároveň vektory spirochet způsobujících LB. Jsou to například klíšťata *Ixodes scapularis*, *I. ricinus*, *I. persulcatus*, *I. pacificus*, *I. pavlovski* (Krause et al., 2015).

Do druhé skupiny jsou řazeny spirochety komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato vyvolávající lymfskou boreliózu. Tyto borelie jsou většinou přenášeny klíšťaty rodu *Ixodes*. Nicméně mohou být přenášeny i dalšími druhy klíšťat, například *Haemaphysalis* (Chu et al., 2008). Do komplexu *B. burgdorferi* sensu lato se řadí v současné době dvacet druhů

spirochet (Rudenko et al., 2011; Ivanova et al., 2014; Casjens et al., 2011). Jsou to druhy *B. burgdorferi* sensu stricto (Baranton et al., 1992), *B. garinii* (Baranton et al., 1992), *B. afzelii* (Canica et al., 1993), *B. lusitaniae* (Le Fleche et al., 1997), *B. valaisiana* (Wang et al., 1997), *B. bissettii* (Postic et al., 1998), *B. spielmanii* (Richter et al., 2006), *B. americana* (Rudenko et al., 2009a), *B. bavariensis* (Margos et al., 2009), *B. kurtenbachii* (Margos et al., 2010), *B. japonica* (Kawabata et al., 1993), *B. andersonii* (Marconi et al., 1995), *B. tanukii* (Fukunaga et al., 1996), *B. turdi* (Fukunaga et al., 1996), *B. sinica* (Masuzawa et al., 2001), *B. californiensis* (Postic et al., 2007), *B. yangtzensis* (Chu et al., 2008, Margos et al., 2015), *B. carolinensis* (Rudenko et al., 2009b), *B. finlandensis* (Casjens et al., 2011) a *B. chilensis* (Ivanova et al., 2014). Tento komplex dvaceti druhů se dá rozdělit do tří podskupin na základě jejich infekčních potenciálů.

V první podskupině jsou druhy prokazatelně způsobující LB člověka: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* a *B. afzelii*. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto je druh borelií vyskytující se na celém světě. Poprvé byla tato spirocheta izolována v USA v roce 1981 z klíštěte *Ixodes dammini*, dnes známého jako *Ixodes scapularis* (Burgdorfer et al., 1982; Oliver et al., 1993). Přenašečem této spirochety jsou klíšťata *Ixodes ricinus* v Evropě, *Ixodes persulcatus* v Asii, *Ixodes scapularis* a *Ixodes pacificus* v Severní Americe (Baranton et al., 1992). Tímto druhem borelie je způsobena většina nálezů lymfské boreliózy v Severní Americe (Foretz et al., 1997; Marti Ras et al., 1997). Zajímavostí je, že kmeny *B. burgdorferi* sensu stricto, které se vyskytují v Severní Americe, jsou více heterogenní než ty, které se vyskytují v Evropě (Postic et al., 1998; Wang et al., 1999). *B. burgdorferi* se považuje za „generalistu“, což znamená, že nemá zřejmé preference vůči hostitelům a je schopna nakazit velmi široké spektrum hostitelů. Dalším druhem borelií prokazatelně způsobujícím LB, a to v Evropě a Asii, je *Borrelia garinii*. Jeho vektorem mohou být klíšťata *I. ricinus*, *I. persulcatus*, *I. hexagonus* nebo také *I. nipponensis*. I když rezervoárovými hostiteli druhu *B. garinii* mohou být jak ptáci, tak i plazi a hlodavci, je většinou spojována hlavně s ptáky, a proto se považuje za „specialistu“ (Baranton et al., 1992). V Evropě a Asii se vyskytuje i třetí druh této skupiny. Je jím druh *Borrelia afzelii* přenášený klíšťaty *I. ricinus* a *I. persulcatus*, jehož rezervoárovými hostiteli jsou hlodavci (Canica et al., 1993).

V další podskupině jsou druhy, které mají pro člověka infekční potenciál, ale není dostatek popsáných případů LB vyvolaných těmito druhy: *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, *B. bissettii*, *B. spielmanii*, *B. americana*, *B. bavariensis* a *B. kurtenbachii*. Druh *Borrelia lusitaniae* byl popsán v roce 1997, kdy byl poprvé izolován z klíšťat *I. ricinus* v Portugalsku.

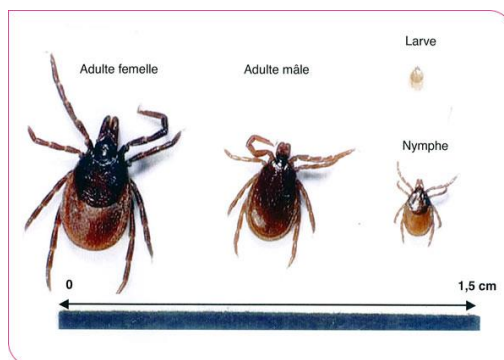
Jednalo se o druh *Borrelia lusitaniae* kmen PotiB2 (Le Fleche et al., 1997). Tento druh se vyskytuje v Evropě a severní Africe a jeho rezervoárovými hostiteli jsou hlodavci a plazi. V roce 2004 byla v Portugalsku tato spirocheta izolována z materiálu odebraného pacientovi s LB. Byla to zároveň v Portugalsku vůbec první izolovaná borelie z pacienta (Collares-Pereira et al., 20014). Ve Švýcarsku, Nizozemí a Velké Británii byla opět z klíštěte *I. ricinus* izolována borelie z genomické skupiny VS116 a MI9. Výsledkem další analýzy těchto borelií bylo uznání nového druhu *Borrelia valaisiana* typ VS116, přenášeného klíšťaty rodu *Ixodes* (Wang et al., 1997). Rezervoárovými hostiteli tohoto druhu jsou ptáci a plazi (Wang et al., 1997). Následně byla tato borelie nalezena v divokých hlodavcích na Taiwanském ostrově Kinmen (Masuzawa et al., 2000). V roce 2011 byla popsána souvislost mezi nákazou *B. valaisiana* a tvorbou skvrn erythema migrans a zároveň i chronickou LB u člověka. Dále byl z genomické skupiny, známé jako DN127, popsán druh *Borrelia bissettii* (Postic et al. 1998). Tato spirocheta je rozšířena v Evropě a v Severní Americe, kde je přenášena klíšťaty *I. ricinus*, *I. scapularis*, *I. pacificus* nebo *I. minor*. Rezervoárovými hostiteli tohoto druhu jsou hlodavci (Postic et al., 1998). DNA *B. bissettii* byla nalezena v sérech pacientů s LB v Jižních Čechách a v srdeční chlopni pacienta s endokarditidou (Rudenko et al., 2009c). V centrální Evropě byl v roce 2004 popsán druh *Borrelia spielmani* vázaný na rezervoárového hostitele, jímž je plech zahradní *Eliomys quercinus* (Richter et al., 2004). Název byl později opraven na *Borrelia spielmanii* a bylo stanoveno, že jeho hostitelem je více druhů hlodavců (Richter et al., 2006). Souvislost *B. spielmanii* s LB byla prokázána na pacientech trpících erythemou migrans z Nizozemska, Německa, Slovinska a Maďarska (Rudenko et al., 2011). V Jižní Carolině byl z klíšťat *I. minor* izolován další druh později pojmenovaný *Borrelia americana* (Rudenko et al., 2009a). Vektorem tohoto druhu jsou jak klíšťata, která běžně sají na lidech (*I. pacificus*), tak ta, která se na člověku nasají jen náhodně *I. minor* (Rudenko et al., 2009a). Následně byla DNA *B. americana* potvrzena ve vzorcích z pacientů, kterým byla diagnostikovaná LB (Clark et al., 2013). Ve stejném roce byl popsán další druh *Borrelia bavariensis* vyskytující se v Evropě, jehož přenašečem je klíště *I. ricinus* (Margos et al., 2009). Jednalo se o ekotyp *Borrelia garinii*, serotyp OspA kmene 4 vázaný na hlodavce (Wilske et al. 1993). Další druh z této skupiny byl popsán v roce 2010 a pojmenován na počest doktora Klause Kurtenbacha jako *Borrelia kurtenbachii* kmen 25015. Tento druh vznikl rozdělením *Borrelia bissettii* na dva druhy oddělené podle výsledků MLSA (multi locus sequence analysis) (Margos et al., 2010). Poprvé byla DNA spirochet *B. kurtenbachii* detekována v roce 1997 v pacientech ze Slovinska. Význam tohoto

objevu byl ale podceněn. V té době patřil druh *B. kurtenbachii* kmen 25015 do skupiny *B. bissettii* DN127 (Rudenko et al., 2011).

Třetí podskupina představuje druhy, které nebyly nikdy v pacientech nalezeny ani z nich izolovány: *B. japonica*, *B. andersonii*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. sinica*, *B. californiensis*, *B. yangtzensis*, *B. carolinensis*, *B. finlandensis* a *B. chilensis*. Nové studie ale ukazují, že některé tyto druhy by měly být také již řazeny do druhého oddílu mezi borelie potenciálně způsobující LB u člověka. Například *Borrelia andersonii* již byla identifikována v pacientech s příznaky LB (Clark et al., 2013).

1.2 Lymská borelióza

Lymská borelióza je zoonóza, onemocnění kolující v přírodě mezi vektory a hostiteli včetně lidí. Typickými vektory jsou klíšťata rodu *Ixodes* (Obr.3) (Tilly et al., 2008). Infikováno může být široké spektrum obratlovců od malých i velkých savců přes ptáky až po plazy, přičemž existuje jistá specifická spjitost mezi různými druhy borelií a různými hostiteli. Tento vztah je dán citlivostí nebo naopak odolností borelií vůči jednotlivým druhům hostitelských komplementů. Odolnost některých druhů borelií k určitým hostitelským komplementům má za následek vytváření přírodních rezervoárů onemocnění. Hostitelé, jejichž komplement nedokáže účinně eliminovat bakterie, mají v přírodě funkci rezervoárového hostitele. Například hlodavci představují rezervoárové hostitele pro druhy *B. afzelii*, *B. carolinensis*, *B. japonica* a *B. bissettii* (Kurtenbach et al., 2002; Postic et al., 1998, Rudenko et al., 2009a). Ptačí komplement nedokáže zabít druhy *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. americana* ani *B. turdi*, a proto představují ptáci rezervoárové hostitele těchto druhů borelií (Kurtenbach et al., 2002; Fukunaga et al., 1996, Rudenko et al., 2009b). Spirochety *B. burgdorferi* sensu stricto mohou být na klíšťata přenášeny z ptáků, z hlodavců, ale i z plazů. Všechny tyto skupiny obratlovců představují pro tento druh borelie rezervoárové hostitele (Kurtenbach et al., 2002).



Obr.3: Vývojová stádia klíštěte *Ixodes ricinus* (převzato z www.invs.sante.fr)

Člověk je pro borelie náhodným hostitelem. Spirochety do něj pronikají po přísátí nakaženého klíštěte v jakémkoli z jeho tří vývojových stadií- larva, nymfa, dospělec. Přenos infekce z klíštěte na člověka je možný až po sání dlouhém minimálně dvacet čtyři hodin. Tato prodleva je dána migrací borelií ze střeva do slinných žláz klíštěte, odkud společně s klíštěčímí slinami pronikají do těla hostitele (Hovius et al., 2007). Z tohoto důvodu je velmi důležité odstranit přisáté klíště co nejdříve.

Průnik borelií do těla nemusí ale vždy způsobit onemocnění, velmi časté je spontánní vyhojení. Lymská borelióza je komplexní onemocnění, které se obtížně diagnostikuje, ale v počáteční fázi se dá poměrně snadno vyléčit. Léčba je ovšem velmi obtížná v pokročilé chronické fázi onemocnění. Prevence ve formě spolehlivé vakcíny neexistuje. Vývoj účinné vakcíny je ztěžován velkou variabilitou povrchových antigenních proteinů borelií. Jedinou prevencí zůstává ochrana před klíštětem například pomocí repelentních přípravků a vhodných oděvů.

První fázi onemocnění LB je lokalizovaná kožní forma. Objevuje se jeden až dva týdny po nákaze. V místě kousnutí klíštětem se vytváří erythema migrans, typická červená skvrna s projasněným středem (Obr.4). Tato skvrna se neobjevuje u všech pacientů s LB, někdy také migruje po těle, nebo zmizí a objeví se na jiném místě. Tato fáze bývá doprovázena chřipkovými příznaky, jako jsou bolesti hlavy, zvýšená teplota, nevolnost, bolest kloubů a únava (Nau et al., 2009).



Obr.4: Typický příznak lymské boreliózy v první fázi- erythema migrans (převzato z <http://www.cdc.gov> a upraveno).

Po několika týdnech nastává druhá fáze onemocnění, kdy se borelie dostávají z kůže do dalších orgánů krevní i lymfatickou cestou. Dochází tedy k diseminaci. Borelie se usazují především v kloubech, srdci, v centrální i periferní nervové soustavě (Pfister et al., 1994). Klinických příznaků se v druhé fázi onemocnění může objevit celá řada. Na kůži se může vyskytnout vyrážka či kopřivka. U dětí se na ušním boltci může utvořit boreliový lymfocytom (*lymphocytoma borreliensis*), červenofialová papula s hladkým povrchem o velikosti několik mm až pět cm. Mezi neurologické projevy patří meningitida, neuritida i myelitida a u dětí léze kraniálních nervů (Parola a Rault, 2001). Napadení srdce boreliemi může způsobit myokarditidu nebo myoperikarditidu. V druhé fázi se dále může vyskytnout lehká artritida, konjunktivitida, lymfadenopatie, hepatitida, hematurie nebo i splenomegalie (Parola a Rault, 2001).

U neléčených pacientů během první nebo druhé fáze onemocnění vzniká několik měsíců až let po nákaze fáze pozdní- chronická. Jedním z klinických projevů pozdní fáze je degenerace podkoží označovaná jako *acrodermatitis chronica atropicans* (Satz, 2002). Vyskytuje se na akrech a na plochách nad velkými klouby. Postižená kůže připomíná cigaretový papír. Pro chronickou fázi je dále typická artritida, která postihuje nejčastěji kolenní nebo ramenní klouby. Častou komplikací bývá přetrvávající artritida i po přeléčení antibiotiky, způsobená zřejmě zkříženou autoimunitní reakcí (Steere a Glickstein, 2004). Autoimunitní reakce vzniká z důvodu často se opakujících zánětů a léčí se hormonálními přípravky. Dalšími následky onemocnění jsou v pozdní fázi encefalomyelitida, demyelinizační syndrom nebo polyneuropatie jako následky neuroboreliózy, ale i keratitida (Parola a Rault, 2001). Jednou z příčin chronické boreliózy může být přežívání spirochet v pacientech s LB přeléčených antibiotiky. V průběhu léčby se mohou spirochety skrývat v tkáních pacienta a po ukončení podávání antibiotik se opět začínají zvedat hladiny protilátek, což je způsobeno pravděpodobně množením spirochet, které přežily a následnou reinfekcí (Preac-Mursic et al., 1989)

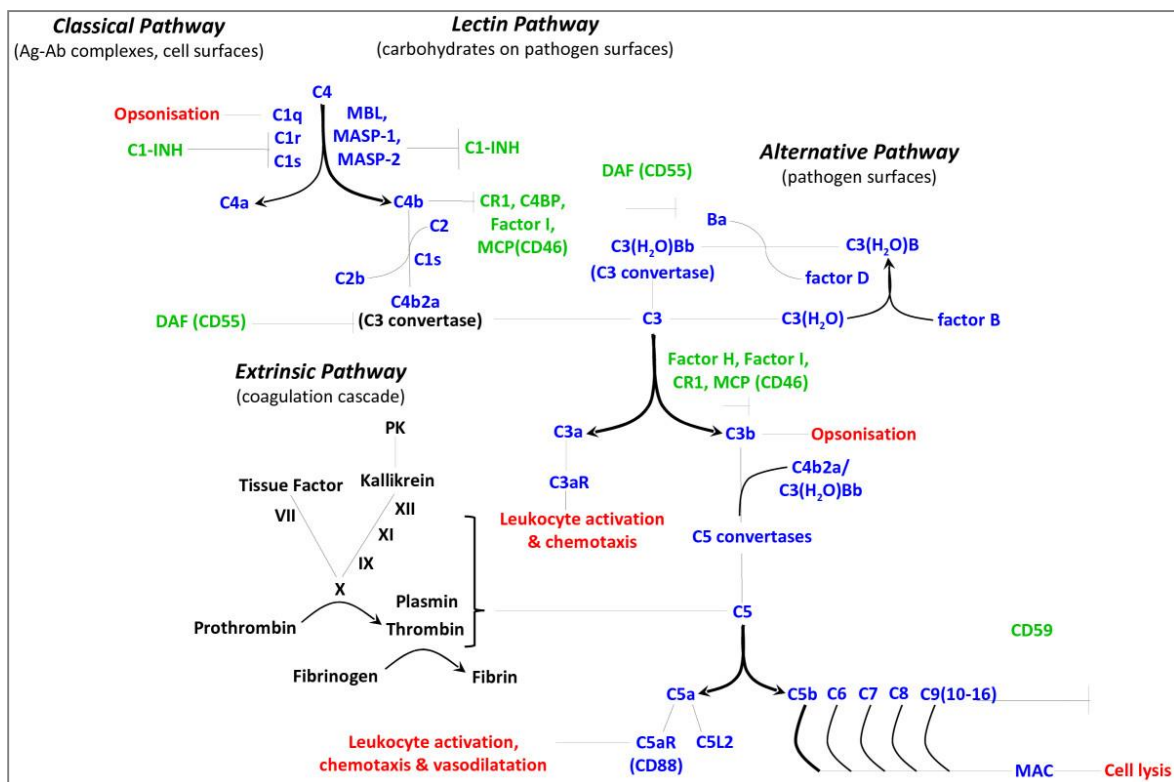
Bylo zjištěno, že nákaza různými druhy borelií vede k různým klinickým projevům onemocnění. Například artritida se rozvíjí při nákaze *B. burgdorferi* sensu stricto. V Severní Americe, kde je hlavním původcem LB tento druh, se artritida objevuje ve 35-40 procentech registrovaných případů a je na druhém místě hned za erythemou migrans (Bacon et al., 2008). Zatímco v Evropě, kde jsou zastoupeny hlavně druhy *B.afzelii* a *B.garinii*, se artritida vyskytuje jen v rozmezí tří až pěti procent (Oschmann et al., 1998). Ze všech případů artritidy u dětí je jejím nejčastějším důvodem právě LB, vzácně se objevuje i u dětí mladších čtyř let, ale je hlavně nemocí dětí školního věku. Objevuje se po celé Evropě,

hlavně ve střední Evropě a na jihu Skandinávského poloostrova kolem Baltského moře (Eiffert et al., 1998). Dále bylo prokázáno, že onemocnění neuroboreliózou je ve většině případů způsobeno druhem *B. garinii*, přičemž ale může být vyvoláno i druhy *B. afzelii* i *B. burgdorferi* sensu stricto, ale v podstatně menším počtu případů (Ornstein et al., 2001, 2002; Ružic-Sabljić et al., 2002). *Borrelia afzelii* nejčastěji infikuje kůži, kde způsobuje skvrnu erythema migrans, boreliový lymfocytom nebo i degeneraci podkoží acrodermatitis chronica atropicans (Garge et al., 2002; van Dam et al., 1993). *Borrelia afzelii* je hlavní původce acrodermatitis chronica atropicans, ale v malé míře jím je i *B. garinii* (Picken et al., 1998; Ružic-Sabljić et al., 2002).

1.3 Komplement

Komplement je složka humorální vrozené imunity. Jedná se o skupinu sérových a membránových proteinů, které kooperují jak mezi sebou, tak s dalšími imunitními mechanismy. Hlavními složkami komplementu je devět sérových proteinů C1 až C9, faktory B, D, P, inhibitory a inaktivátory H a I. Většina těchto složek je syntetizována v játrech, některé v makrofázích a fibroblastech. Jednotlivé složky se po různých podnětech kaskádovitě aktivují. Ústřední složkou komplementu je protein C3, jehož fragment C3b se pevně váže na mikrobiální povrch. Meziprodukty kaskádovité reakce mají významné funkce opsonizace nebo chemotaxe. Konečným produktem kaskádovité reakce je komplex proteinů C5b, C6, C7, C8 a C9. Tento komplex je označován jako MAC (membrane attack complex) a vytváří lytický pór na povrchu mikroorganismů, čímž způsobuje jejich lýzu a smrt.

K aktivaci komplementu vedou tři cesty, klasická, alternativní a lektinová (Obr.5). Klasická cesta se zahajuje na površích, které navázaly protilátku. Vazbou na povrch mikroorganismu se pozmění konformace protilátkové molekuly a odhalí se místo pro vazbu proteinu C1. Následuje kaskáda vedoucí k MAC. Lektinová cesta je obdobou cesty klasické, ale místo protilátky je iniciována navázáním sérového lektinu. Alternativní cesta aktivace komplementu je iniciována samovolně se štěpícím proteinem C3, jehož větší fragment se váže na mikrobiální povrch a spouští složitou kaskádu vedoucí k likvidaci mikroorganismu. V obraně proti boreliím se uplatňuje alternativní cesta aktivace komplementu (Hovius et al., 2007).



Obr.5: Tři cesty aktivace komplementu (převzato z www.jneuroinflammation.com)

1.4 Interakce borelie - hostitel

Borelie se dostávají do těla hostitele během sání klíštěte společně s jeho slinami a vyvolávají v něm silnou vrozenou i adaptivní imunitní odpověď. Klíčovou roli v obraně proti boreliím má komplement. Ten se podílí na degradaci borelií v počáteční fázi infekce, kdy povrchové antigeny borelií aktivují alternativní dráhu komplementu. Takto aktivovaný komplement vytvoří pomocí membránu atakujícího komplexu (MAC) lytický pór a dojde k likvidaci borelie (Hovius et al., 2007). Následně do místa infekce infiltrují makrofágy, neutrofilů, dendritické buňky a monocyty (Steere et al., 2004a). Na povrchu fagocytů jsou Toll-like receptory (TLR) 1 a 2, které po reakci s povrchovými lipoproteiny borelií způsobují aktivaci makrofágů (Hirschfeld et al. 1999, Wooten et al. 2002, Wang et al. 2004). Aktivované makrofágy produkují protizánětlivé cytokiny IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 a TNF- α , a adhezní molekuly (Randolph et al. 1995). Neutrofilů a makrofágů produkují superoxid a oxid dusný (Morrison et al., 1997). Tyto děje vedou k lýze spirochet.

U borelií se ale vyvinulo několik mechanismů, které umožňují únik před obrannými mechanismy hostitele nebo jejich potlačení. Borelie jsou schopny regulovat expresi některých povrchových proteinů. Jeden z těchto proteinů je kódován lineárním plasmidem lp28 a nazývá se VlsE (variable major protein-like sequence). Locus, kterým je tento protein

kódován, podléhá náhodné rekombinaci a výsledné modifikace proteinu mění jeho antigenní vlastnosti (Liang et al., 2004). Pod tlakem imunitního systému je také později v průběhu infekce snižována exprese dalšího povrchového proteinu OspC (outer surface protein C). Protilátky, namířené proti tomuto proteinu se proto uplatňují pouze na počátku infekce, ale při perzistentní infekci se neuplatňují (Liang et al., 2002). Dalším velmi důležitým mechanismem, který umožňuje boreliím v hostiteli přežít, a to hlavně na počátku infekce, je inhibice komplementu inaktivací složky C3b. Borelie na svém povrchu exprimují CRASP proteiny (complement regulator-acquiring surface proteins) z rodiny Erp proteinů (OspE/F related proteins). Tyto proteiny váží faktor H a faktor H-like protein (reconnectin), což jsou přirozené inhibitory komplementu (Helwage et al. 2001, Kraiczy et al. 2001). Bylo popsáno pět druhů těchto proteinů CRASP-1, CRASP-2, až CRASP-5. Schopnost inhibovat komplement se liší mezi jednotlivými druhy borelií (Kurtenbach et al., 1998).

2. CÍL PRÁCE

1. Literární studie k tématu.
2. Pozornost bude soustředěna na techniky kultivace spirochet, izolace DNA, PCR, elektroforézy, průtokové cytometrie, statistické analýzy a další.
3. S použitím výše zmíněných metod bude provedena analýza citlivosti různých druhů spirochet k lidskému komplementu a zjištěn infekční potenciál vybraných druhů borelií.
4. Bude provedena analýza citlivosti různých skupin pacientů k boreliím a tak určena skupina s nejvyšším rizikem vzniku nákazy.
3. Interpretace výsledků a vytvoření modelu životaschopnosti/rozkladu různých druhů a kmenů spirochet v séru představitelů různých skupin lidské populace.

3. MATERIÁLY A METODY

3.1 Použité materiály a chemikálie

Tab. 1: Seznam použitých chemikálií

Metoda	Chemikálie	Složení chemikálie
kultivace	BSK-H médium	BSK-H complete medium (Sigma Aldrich) 6% králičí sérum
	Persteril	0,5% roztok
Izolace DNA	Kit	DNeasy® Blood & Tissue Kit (250), (Qiagen)
Purifikace PCR produktů z gelu	Kit	Ultrafree DA DNA extraction from agarose gels (Millipore)‘
PCR	2x Master mix	Taq DNA polymeráza [doplněno reakčním pufrem (pH 8.5)] 400μM dATP, 400μM dGTP, 400μM dCTP, 400μM dTTP, 3mM MgCl ₂ (Promega)
DNA elektroforéza	50xTAE pufr	200mM Tris-HCl, 50mM EDTA
	modifikovaný TAE pufr	40mM Tris-acetate, pH 8,0; 0,1 mM Na ₂ EDTA
	Agaróza	1,5% nebo 1% agarosa (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)
Průtoková cytometrie	PBS 1x	137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8mM KH ₂ PO ₄
	Ředící roztok	2% BSA, 5,4mM glukóza v PBS steril. přefiltrováno přes 0,22 μm filtr. membránu
	Propidiumiodid	1,5μM C ₂₇ H ₃₄ I ₂ N ₄ (Sigma Aldrich)

Tab. 2: Seznam použitých primerů

Primer (Generi biotech)	Použitá teplota nasedání	Sekvence 5' → 3'	Specifita primerů	Citace
GI F	55°C	AACAAAGACGGCAAGTACGATCTAATT	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Damaerschalck et al., 1995
GI R	55°C	TTACAGTAATTGTTAAAGTTGAAGTGCC	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	
GII F	55°C	TGATAAAAAC AACGGTTCTG GAAC	<i>B. garinii</i>	
GII R	55°C	GTAAC TTTCAATGTTGTTTGGCC	<i>B. garinii</i>	
GIII F	55°C	TAAAGACAAAACATCAACAGATGAAAG	<i>B. afzelii</i>	
GIII R	55°C	TTCCAATGTTACTTTATCATTAGCTAC	<i>B. afzelii</i>	
ospC F	52°C	ATGAAAAAGAATACATTAAGTGC	všechny druhy	Bunikis et al., 2004
ospC R	52°C	ATTAATCTTATAATATTGATTTTAATTAA GG	všechny druhy	
Fla out F	52°C	AARGAATTGGCAGTTCAATC	všechny druhy	Clark et al., 2005
Fla out R	52°C	GCATTTTCWATTTTAGCAAGTGATG	všechny druhy	

Tab. 3: Seznam použitých přístrojů

Centrifugy	Centrifuge 5415D (Eppendorf)
	Centrifuge 1415 R (Eppendorf)
	Centrifuge 5415 C (Eppendorf)
	Universal 32 R (Hettlich zentrifugen)
Elektroforéza	SHU6 (Sigma Aldrich)
	OVL Easycast TM B2 (Thermo scientific)
PCR cycler	Mastercycler <i>personal</i> (Eppendorf)
Mikroskop s temným polem	Leica DM 1000 LED (Leica)
Petroff - Hausserova počítací komůrka	hloubka: 0,02 mm, Hausser Scientific, PA, USA
Inkubátor	Thermomixer (Eppendorf)
Fotosystém na focení gelů	Kodak
PCR box	DNA/RNA UV cleaner UVC/T-M-AR (Biosan)
Flow box	ESCO Class II BSC
Průtokový cytometr	BD FACS Canto II
Filtrační papír	Syringe- Filter 0,22 μm (TPP [®])
Lymetop ^{+®} testy	All. Diag Instruments, Exacto

3.2 Použité metody

3.2.1 Sběr vzorků lidské krve

Za účelem získání vzorků lidské krve bylo kontaktováno několik ordinací praktických lékařů a primářů na různých odděleních v několika nemocnicích. Při pravidelné preventivní prohlídce, kdy se pacientům odebírá krev, byli pacienti seznámeni s možností poskytnout vzorek své krve, společně s údajem o jejich pohlaví a roku narození. Pacientovi byl dán k přečtení dopis, ve kterém se mohl seznámit s účelem tohoto odběru. Odběr materiálu pro účely této práce byl proveden pouze u pacientů, kteří s ním souhlasili.

3.2.2 Oddělení séra od krevní složky

Sérum bylo od krevních složek odděleno pomocí centrifugace při 2000 rpm, která probíhala při pokojové teplotě po dobu 15 minut. Získané sérum bylo odebráno a pomocí stříkačky a 0,22 µm filtrační membrány přefiltrováno. Alikvóty po 0,5 ml byly pečlivě označeny a uskladněny v -80°C.

3.2.3 Kontrola sér na přítomnost boreliových protilátek

Protilátky proti boreliím byly ve vzorcích sér detekovány pomocí komerčních Lymetop+® imunochromatografických testů. Postup byl veden podle přiloženého protokolu od výrobce.

3.2.4 Kultivace různých druhů borelií komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Kultivace borelií probíhala v kompletním BSK-H médiu ve sterilním prostředí, *in-vitro* při 34°C. U kultur borelií byla postupně kontrolována jejich čistota a hustota. Po dosažení hustoty 10⁷ buněk v ml byly tyto kultury použity pro další experimenty.

3.2.5 Izolace genomové DNA

Genomová DNA byla izolována pomocí komerčního kitu 'DNeasy® Blood & Tissue Kit, (Qiagen)'. Nejdříve byly odděleny borelie od média pomocí centrifugace při maximální rychlosti po dobu 15 minut při 4°C. Supernatant byl opatrně odebrán a dekontaminován v 0,5% roztoku persterilu. Takto získané borelie byly ihned použity k izolaci DNA. Samotná izolace genomové DNA byla prováděna přesně podle přiloženého protokolu pro izolaci DNA od výrobce. Získaná DNA byla uchována při 4°C, nebo ihned použita v dalších experimentech.

3.2.6 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Ke zjištění přítomnosti druhů borelií v každé narostlé kultuře byla genomová DNA získaná izolací pomocí kitu v předchozím kroku kontrolována metodou PCR. K tomuto účelu byly použity druhově specifické primery GI až GIII. Primery GI byly použity pro *B. burgdorferi* s.s. (PCR produkt 543bp), GII pro *B. garinii* (PCR produkt 344bp) a GIII pro *B. afzelii* (PCR produkt 189bp) (Damaerschack et al., 1995).

Příprava reakční směsi:

celkový objem každé reakce = 20 μ l

10x PCR pufr.....	2 μ l
25mM MgCl ₂	2 μ l
1mM Primer forward.....	1 μ l
1mM Primer reverse.....	1 μ l
10mM dNTPs.....	1 μ l
Tag DNA polymeráza (Promega) (0,5 U).....	0,5 μ l
DNA.....	1 μ g

Zbývající objem byl doplněn do 20 μ l deionizovanou vodou. Amplifikační reakce byla prováděna v přístroji *Mastercycler personal* (Eppendorf) a probíhala v 0,2 ml tenkostěnných zkumavkách. Ke každé reakci byla přiřazena pozitivní a negativní kontrola. Jako pozitivní kontrola byla použita již ověřená DNA patřícího druhu borelie. Negativní kontrola byla připravena nahrazením DNA deionizovanou vodou.

Podmínky amplifikační reakce:

- 1) Denaturace DNA..... 5 minut..... 95°C
- 2) 30 cyklů
 - Denaturace DNA..... 5 minut..... 95°C
 - Nasedání primerů..... 30 sekund..... viz. Tab.2
 - Elongace.....30 sekund..... 72°C
- 3) Závěrečná elongace..... 10 minut..... 72°C
- 4) Teplota po skončení reakce..... 4°C

Ke zjištění zastoupení jednotlivých druhů v dalších kulturách byla kvůli absenci druhově specifických primerů prováděna sekvenace dvou úseků genomu: částečné sekvence genu pro *flagellin* a *ospC* gen.

3.2.7 Elektroforéza

Fragmenty DNA získané metodou PCR byly analyzovány pomocí elektroforézy. Analýza byla prováděna na 1,5% (pro primery GIII) nebo 1% (pro ostatní primery) agarózovém gelu v 1x TAE pufru. Pro vizualizaci výsledků byl použit vzorkový pufr s barvivem SyberGreen. Jako marker byl použit DNA standard molekulových hmotností

100 bp Gene Ruller. Elektroforéza probíhala při napětí 100V po dobu 20-35 minut. Výsledky byly odečteny pod UV zářením.

3.2.8 Purifikace PCR produktů

Pro účely sekvenování byly PCR produkty z agarózového gelu přečištěny. Extrakce byla provedena pomocí kolon kitu 'Ultrafree DA DNA extraction from agarose gels (Millipore)' přesně podle přiloženého protokolu od výrobce. V takovém případě byl pro elektroforetickou reakci použit gel o nižší koncentraci agarózy (<0,9%) v modifikovaném TAE pufru.

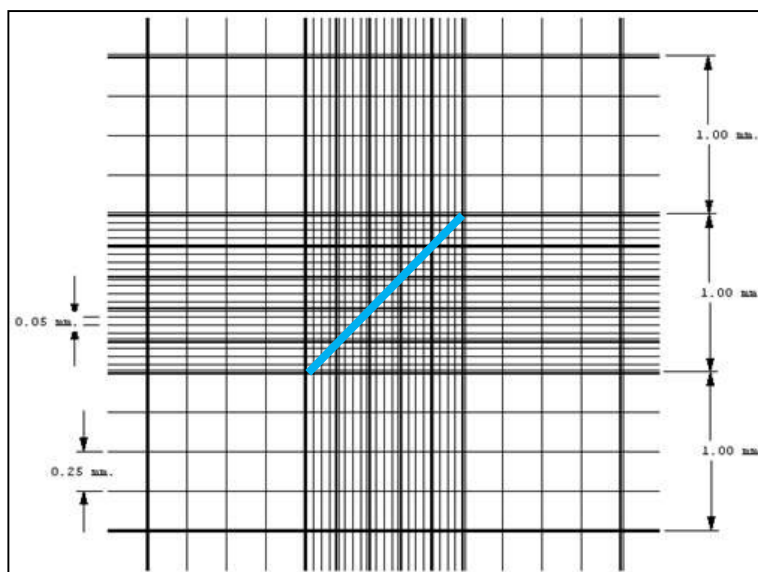
3.2.9 Sekvenace

Vzorky získané purifikací z agarózových gelů byly sekvenovány v sekvenační laboratoři firmy SeqMe (www.seqme.eu) se specifickými primery vždy z obou konců (primer Forward a primer Reverse). Vzorky byly připravené podle návodu ze sekvenační laboratoře (50 ng přečištěného PCR produktu + 25 pmol primeru).

3.2.10 Mikroskopie temného pole

Kultury borelií byly pozorovány pod mikroskopem s temným polem. Průběžně byla kontrolována čistota kultury, stav a kondice borelií. Hustota kultur byla stanovena počítáním buněk pomocí Petroff- Hausserovy komůrky (Obr.6). Mikroskopický preparát byl pozorován se zvětšením 10x40. Pro stanovení koncentrace byl spočítán průměrný počet bakterií v úhlopříčce pěti větších čtverců Petroff- Hausserovy komůrky. Koncentrace buněk v 1 ml kultury byla spočítaná pomocí vzorce $A \times 1,25 \times 10^6$, kde A je průměrný počet bakterií ve větším čtverci počítací komůrky.

Při kontrolování čistoty kultur byly v mikroskopickém preparátu pozorovány jiné útvary, než ty, které vytváří borelie. Kontaminované kultury byly ihned zničeny, a to v 0,5% roztoku persterilu.



Obr.6: Schéma mřížky Petroff- Hausserovy počítací komůrky se zvýrazněním 5 úhlopříčných čtverců (převzato z www.emsdiasum.com a upraveno).

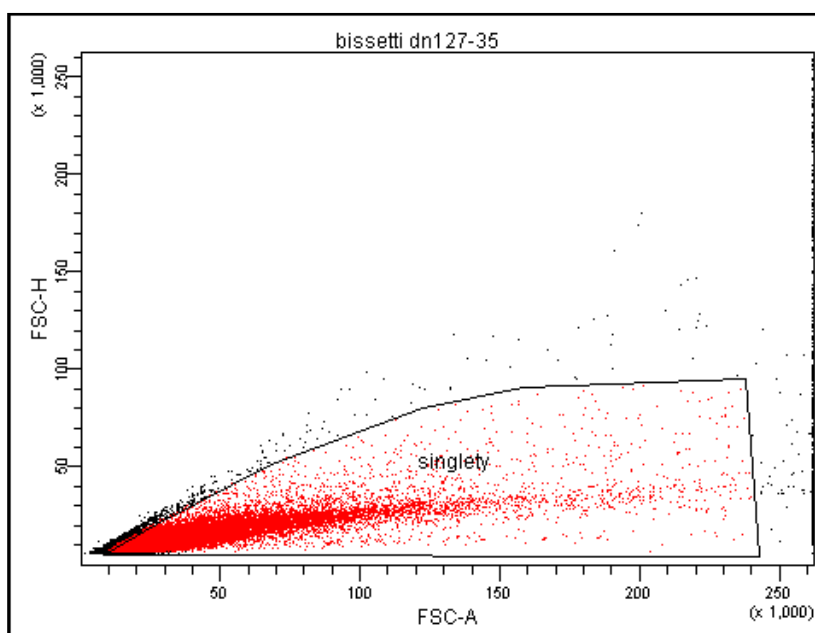
3.2.11 Test citlivosti různých druhů borelií k lidskému komplementu

Test citlivosti borelií ke komplementu byl proveden podle publikace doktora Kurtenbacha z roku 1998 (Kurtenbach et al., 1998). Narostlá kultura borelií o hustotě 10^7 buněk v ml byla přidána k jednotlivým sérum v poměru 1:1. Hustota buněk v kultuře byla podle potřeby upravena pomocí BSK-H média. Reakce probíhala ve 100 μ l mikrotitračních destičkách s kulatým dnem. Všechny vzorky byly inkubovány 24 hodin při 34°C ve vlhké komůrce. Ke každému experimentu byla připojena kontrola živých a mrtvých buněk. Jako kontrola živých buněk byla použita čistá narostlá kultura, stejná jako ta, která byla použita v reakci se sérum. Jako kontrola mrtvých buněk byla použita kultura borelií bez jakýchkoli přísad zahřívána 30 minut na 56°C.

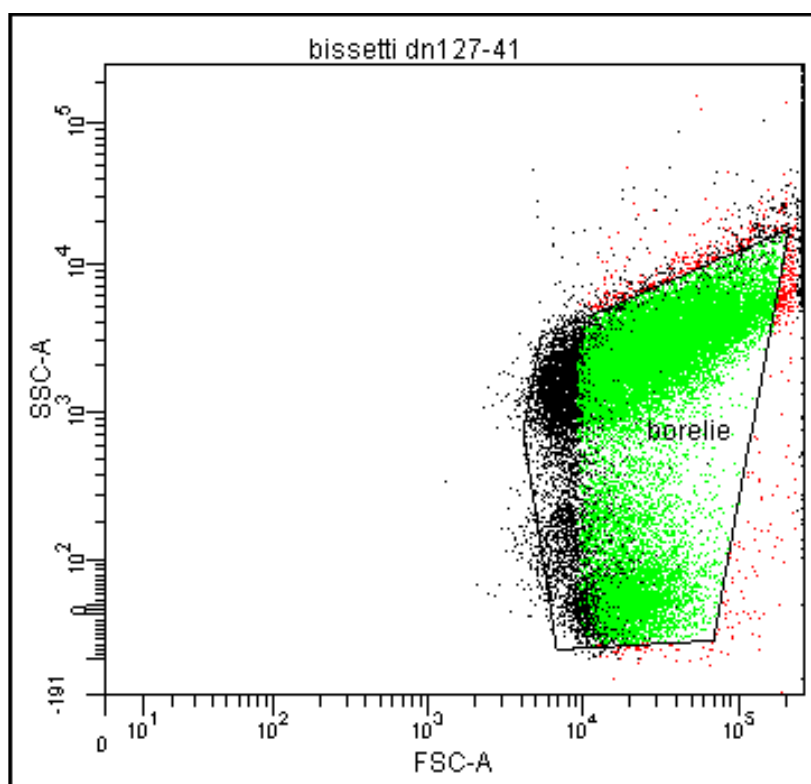
3.2.12 Průtoková cytometrie

K vyhodnocení testu citlivosti borelií byla použita metoda průtokové cytometrie. Ke směsi borelií a séra bylo přidáno 100 μ l ředícího roztoku. Celý objem každé jamky z mikrotitrační destičky byl přenesen do 5 ml zkumavek BD Falcon™ s kulatým dnem, ve kterých probíhalo měření v průtokovém cytometru. Do každé zkumavky byl přidán 1 μ l propidium-iodidu. Následně byla zkumavka se vzorkem umístěna do tmy na 15 min. V průtokovém cytometru bylo měřeno 30 000 událostí. Nejdříve byly na základě měření v přímém a kolmém směru odseparovány shluky bakterií (Obr.7). V dalším kroku byla vymezena oblast s boreliemi (Obr.8). U takto vymezených buněk byla měřena intenzita

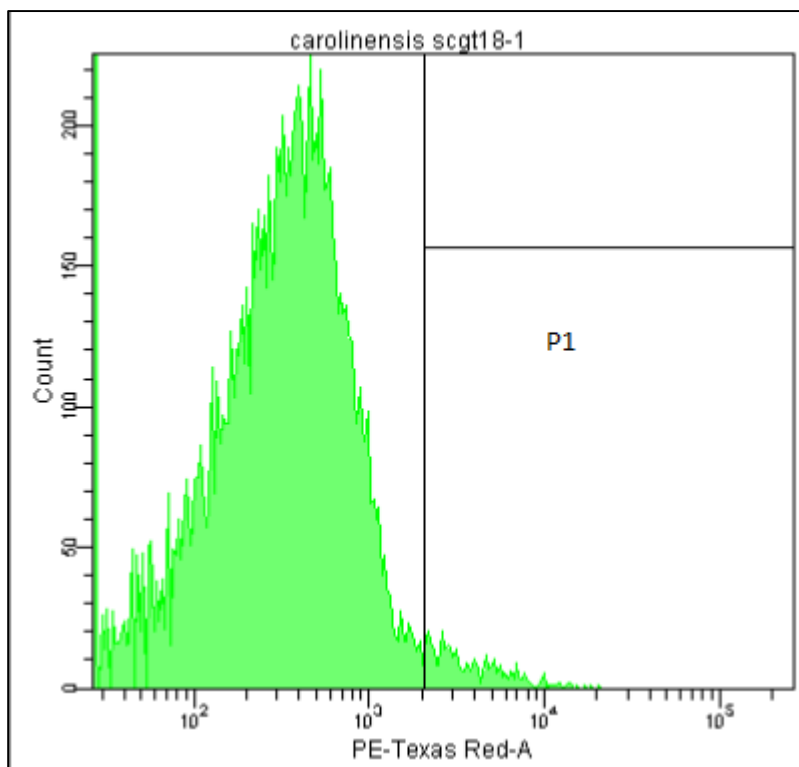
fluorescence proprium-iodidu v kanálu PE-Texas Red-A 616/23 a určena oblast P1 s výskytem mrtvých buněk (Obr.9). Všechny vzorky i kontroly byly měřeny stejným způsobem, aby bylo možné je porovnat.



Obr.7: Odseparování shluků bakterií v průtokovém cytometru



Obr.8: Vymezení oblasti s výskytem borelií v průtokovém cytometru



Obr.9: Intenzita fluorescence proprium-iodidu v kanálu PE-Texas Red-A 616/23 a oblast s výskytem mrtvých buněk

4. VÝSLEDKY

4.1 Sběr vzorků

Ve spolupráci s ordinací MUDr. Františka Součka bylo získáno celkem 148 vzorků lidské krve se souhlasem pacienta, kterému byl odběr krve zdravotní sestrou prováděn. Získané vzorky krve byly rozděleny do 6 věkových kategorií. Do kategorie 1 byli řazeni pacienti ve věku 21 až 30 let, do kategorie 2 pacienti ve věku 31 až 40 let, do kategorie 3 pacienti ve věku 41 až 50 let, do kategorie 4 pacienti ve věku 51 až 60 let, do kategorie 5 pacienti ve věku 61 až 70 let a do kategorie 6 se řadili pacienti ve věku nad 71 let. Věkové kategorie byly vytvořeny na základě věku, kterého pacienti dosáhli v roce 2014, kdy byly odběry prováděny. Každá věková kategorie byla dále rozdělena podle pohlaví.

4.2 Kontrola sér na přítomnost boreliových protilátek

Všech 148 vzorků sér bylo testováno na přítomnost protilátek proti boreliím. Z celkového počtu bylo na protilátky pozitivních 8 mužských a 2 ženské vzorky (Tab.3).

Tab.4: Seznam všech sér rozdělených do kategorií a výsledky testů na boreliové protilátky

Kategorie 1: věk 21-30 let						Kategorie 2: věk 31-40 let					
Ženy			Muži			Ženy			Muži		
Číslo vz.	Rok narození	P/N	Číslo vz.	Rok narození	P/N	Číslo vz.	Rok narození	P/N	Číslo vz.	Rok narození	P/N
1	1985	N	30	1992	N	13	1981	N	2	1981	N
18	1985	N	40	1984	N	16	1977	N	14	1979	N
20	1990	N	44	1986	N	25	1974	N	28	1976	N
35	1987	N	47	1985	N	34	1981	N	32	1981	N
39	1991	N	55	1988	N	42	1983	N	37	1980	N
41	1984	N	57	1987	N	59	1976	N	67	1982	N
76	1984	N	152	1990	N	73	1981	N	71	1981	N
95	1986	N	156	1986	N	75	1976	N	72	1974	N
112	1987	N	161	1984	N	90	1977	N	87	1978	P
113	1987	N	177	1987	N	91	1983	N	85	1978	N
122	1985	N				96	1975	N	94	1982	N
125	1985	N				103	1979	N	97	1977	N
									100	1982	N
									104	1975	N
									109	1982	N
									110	1975	N
									128	1980	N

Kategorie 3: věk 41-50 let						Kategorie 4: věk 51-60 let)					
Ženy			Muži			Ženy			Muži		
Číslo vz.	Rok narození	P/N	Číslo vz.	Rok narození	P/N	Číslo vz.	Rok narození	P/N	Číslo vz.	Rok narození	P/N
3	1964	N	14	1969	N	9	1962	N	15	1956	N
11	1968	N	5	1964	N	17	1959	N	22	1956	N
12	1965	N	7	1965	N	27	1959	N	26	1962	N
45	1965	N	8	1973	N	48	1956	N	52	1958	N
50	1966	N	10	1967	N	65	1954	N	53	1963	N
54	1967	N	23	1967	N	66	1961	N	78	1958	P
61	1970	P	31	1971	N	74	1962	N	83	1955	N
62	1972	N	51	1965	P	101	1956	N	107	1957	N
68	1966	N	58	1972	N	114	1961	N	117	1956	P
69	1965	N	70	1973	N	119	1959	N	136	1962	N
80	1969	N	77	1966	N	121	1962	N	145	1960	N
111	1972	N	81	1973	N	125	1985	N	147	1959	N
118	1965	N	108	1967	N				162	1961	P
127	1973	N	123	1965	P				163	1958	N
									172	1955	N
Kategorie 5: věk 61-70 let						Kategorie 6: věk 71 a více let					
Ženy			Muži			Ženy			Muži		
Číslo vz.	Rok narození	P/N	Číslo vz.	Rok narození	P/N	Číslo vz.	Rok narození	P/N	Číslo vz.	Rok narození	P/N
6	1952	N	19	1951	N	43	1943	N	46	1939	N
21	1947	N	33	1945	N	56	1937	N	93	1940	N
24	1944	N	38	1944	N	60	1942	N	137	1934	N
29	1946	N	92	1949	N	82	1940	P	151	1924	N
36	1945	N	86	1952	N	99	1935	N	155	1938	N
49	1944	N	98	1951	N	116	1937	N	188	1942	N
64	1950	N	102	1946	N	141	1930	N	190	1932	N
88	1950	N	106	1946	P	185	1941	N			
89	1950	N	115	1949	N	195	1930	N			
105	1947	N	120	1944	P						
132	1951	N	126	1948	N						
154	1953	N	129	1953	N						
159	1944	N	153	1951	N						

Z celkového počtu 148 vzorků sér bylo 72 ženských a 76 mužských. Na protilátky bylo pozitivních 7% ze všech pacientů. Ze všech na protilátky pozitivních pacientů představovali muži 80%, zatímco ženy jen 20%. Výsledky byly přepočteny na počet na protilátky pozitivních případů na 10 pacientů (Tab.4). Nejvíce pacientů s protilátkami bylo v kategoriích 3 a 4, tedy ve věku mezi 41 a 60 lety (Tab.4).

Tab.4: Počet získaných sér v jednotlivých věkových kategoriích a výsledky testů na protilátky

	Ženy	Muži	Ženy pozitivní	Muži pozitivní	pozitivita na 10 pacientů
Kategorie 1 věk 21-30let	12	10			0
Kategorie 2 věk 31-40 let	12	17		1	0,34
Kategorie 3 věk 41-50 let	14	14	1	2	1,07
Kategorie 4 věk 51-60 let	12	15		3	1,11
Kategorie 5 věk 61-70 let	13	13		2	0,77
Kategorie 6 věk 71 a více let	9	7	1		0,63
Celkem	72	76	2 (20%)	8 (80%)	0,68

4.3 Kultivace různých druhů borelií komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato*

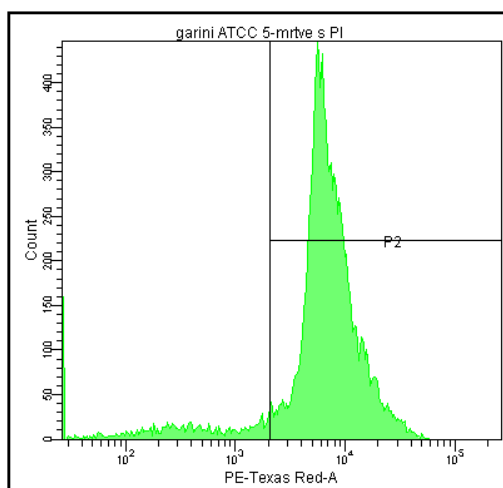
Pro test citlivosti borelií k lidskému komplementu byly použity pouze kultury prvních pasáží (max. do 4.), u kterých byla prokázána přítomnost pouze jednoho druhu borelií. Použito bylo deset různých druhů borelií (Tab.5).

Tab.5: Seznam použitých druhů borelií a jejich zkratky

<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i> B31	Bb ss	<i>Borrelia carolinensis</i> SCGT18	Bcar
<i>Borrelia afzelii</i> CB43	Bafz	<i>Borrelia americana</i> SCW30F	Bam
<i>Borrelia garinii</i> ATCC	Bgar	<i>Borrelia bavariensis</i> 20047	Bbav
<i>Borrelia bissettii</i> DN127	Bbis	<i>Borrelia valaisiana</i> VS116	Bval
<i>Borrelia kurtenbachii</i> 25015	Bkurt	<i>Borrelia andersonii</i> 21038	Band

4.4 Vyhodnocení testu citlivosti borelií k lidskému komplementu pomocí průtokové cytometrie

Bylo analyzováno celkem 1200 reakcí komplementu s boreliemi. U každého druhu borelie bylo testováno 6 věkových kategorií mužů a žen zvlášť po 10 vzorcích séra 10 různých pacientů (Tab.6). U každého analyzovaného druhu borelií byla také měřena kontrola živých a mrtvých buněk (Obr.10).



Obr.10: Výsledek měření intenzity fluorescence propidium-iodidu kontrolu mrtvých buněk druhu *B. garinii* ATCC

Tab.6: Množství reakcí borelií jednoho druhu s komplementem

Kategorie	Ženy	Muži
1	10	10
2	10	10
3	10	10
4	10	10
5	10	10
6	10	10
Celkem	60	60
	120	

Výsledné hodnoty naměřené pomocí průtokového cytometru udávají procentuální zastoupení mrtvých borelií v jednotlivých měřených vzorcích (Obr.11). V každé z jednotlivých skupin po 10 vzorcích (např. kategorie 1 ženy) bylo získáno 10 čísel, která

udávala procentuální vyjádření mrtvých borelií. Z těchto 10 čísel bylo pomocí aritmetického průměru spočítáno jedno číslo, udávající průměrnou mortalitu v dané skupině (Tab.7).

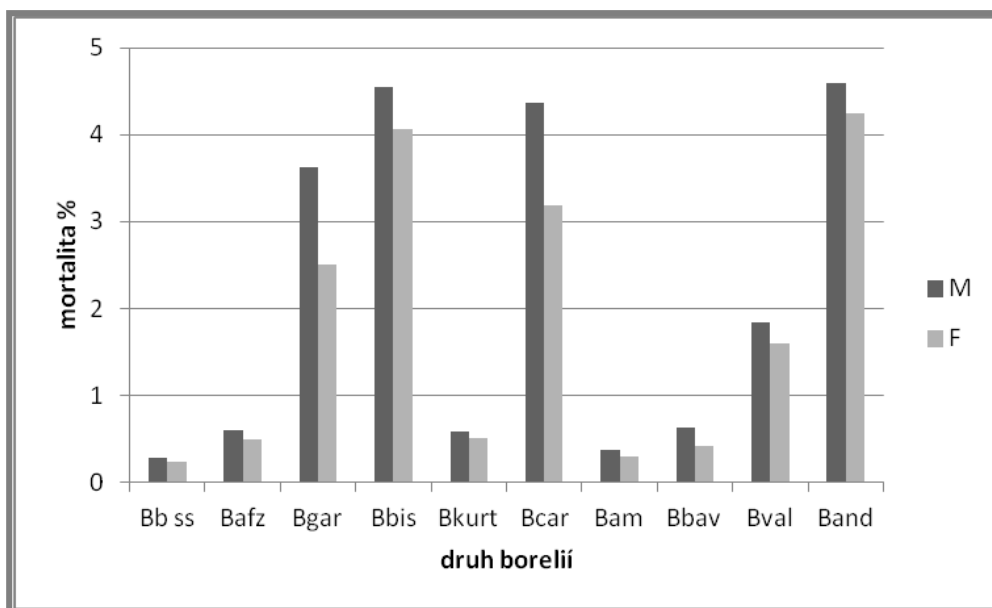
Tube: mrtve s PI			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	32,301	####	100.0
■ singlety	16,334	50.6	50.6
■ borelie	10,475	64.1	32.4
☒ P1	8,996	85.9	27.9

Obr.11: Výsledek mortalita borelií v měřeném vzorku vygenerovaný průtokovým cytometrem

Tab.7: Průměrná mortalita jednotlivých druhů borelií ve skupinách rozdělených podle pohlaví (F=ženy, M=muži)

Druh borelií	Bb ss		Bafz		Bgar		Bbis		Bkurt	
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
kategorie 1	0,38	0,50	0,56	0,73	4,10	3,60	4,80	3,98	0,32	0,47
kategorie 2	0,21	0,42	0,72	0,55	2,40	3,83	2,10	4,49	0,38	0,43
kategorie 3	0,42	0,45	0,33	0,51	0,50	3,85	3,90	9,30	0,38	0,32
kategorie 4	0,13	0,17	0,44	0,38	1,10	1,97	4,60	1,80	0,63	0,65
kategorie 5	0,07	0,09	0,37	0,76	3,73	4,58	3,50	3,35	0,66	0,61
kategorie 6	0,23	0,06	0,50	0,68	3,20	3,88	5,50	4,40	0,70	1,06
průměr	0,24	0,28	0,49	0,60	2,51	3,62	4,07	4,55	0,51	0,59
Druh borelií	Bcar		Bam		Bbav		Bval		Band	
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
kategorie 1	2,23	5,73	0,62	0,51	0,34	0,57	1,30	1,87	3,51	3,67
kategorie 2	3,70	3,43	0,36	0,56	0,40	0,59	1,25	1,96	3,8	4,01
kategorie 3	2,90	4,10	0,32	0,44	0,50	0,61	1,72	1,95	4,23	4,87
kategorie 4	4,53	6,03	0,21	0,22	0,63	0,89	2,01	2,29	5,20	5,60
kategorie 5	2,86	3,06	0,20	0,37	0,47	0,78	1,79	1,99	4,97	5,38
kategorie 6	2,86	3,84	0,07	0,16	0,21	0,35	1,55	1,01	3,8	4,01
průměr	3,18	4,37	0,30	0,38	0,42	0,63	1,60	1,85	4,25	4,59

U všech 10 testovaných druhů borelií byla naměřena mortalita do 5% při zvolených experimentálních podmínkách. Výsledky z tabulky 7 byly převedeny do grafu (Obr.6). Mortalita borelií, které reagovaly s ženským sérem, byla u všech druhů borelií nižší než mortalita borelií, které reagovaly s mužským sérem.



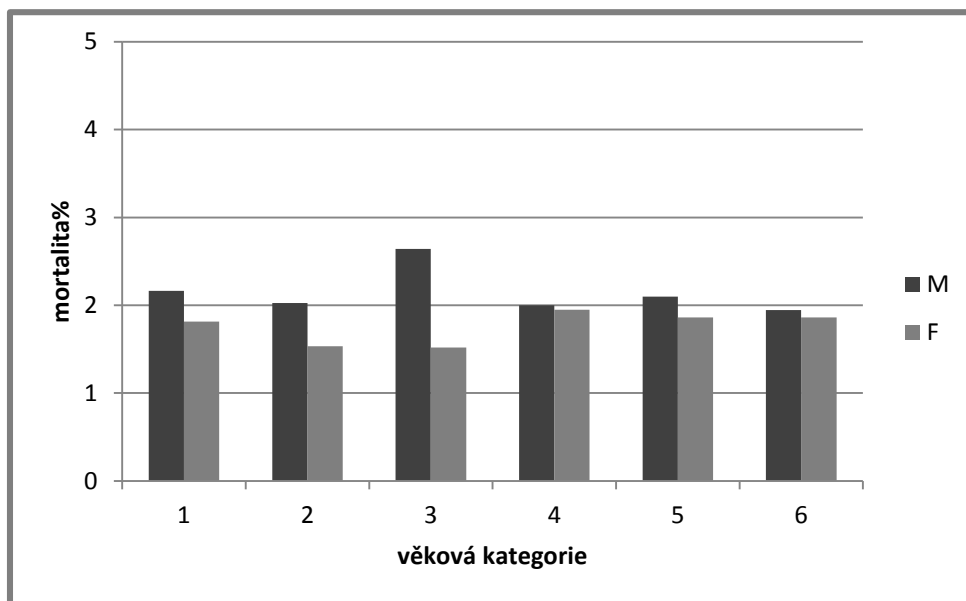
Obr.6: Porovnání mortality jednotlivých druhů borelií mezi oběma pohlavími

Dále byly z tabulek 7 vypočítány pomocí aritmetického průměru hodnoty udávající průměrnou mortalitu všech druhů borelií v jednotlivých věkových kategoriích v mužském a ženském séru zvlášť. Z těchto hodnot pak byl dále vypočítán průměr mortality všech druhů borelií pro jednotlivé věkové kategorie (Tab.9).

Tab.9: Průměrná mortalita všech druhů borelií podle věkových kategorií a pohlaví

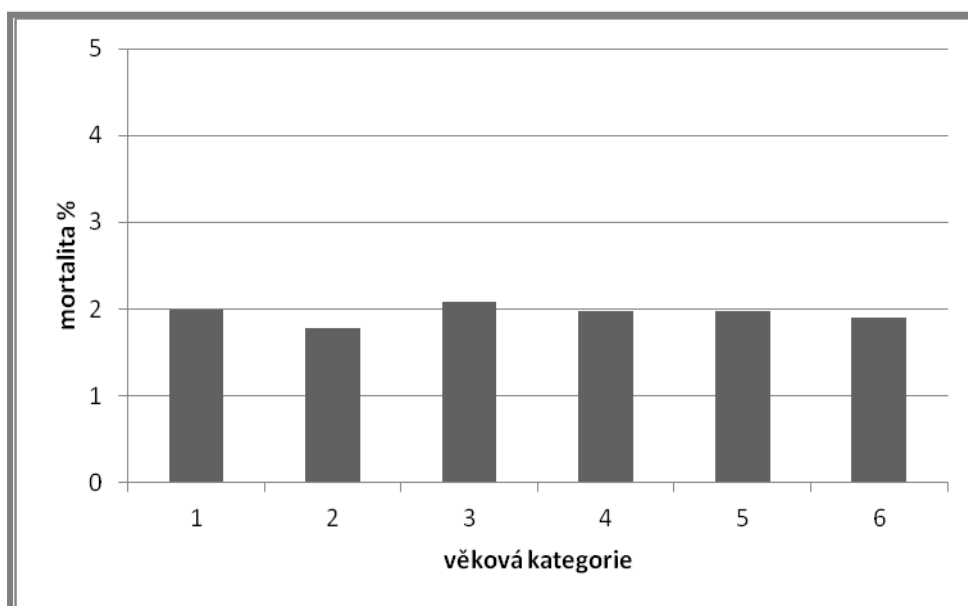
	Ženy(M)	Muži(M)	Průměr
kategorie 1	1,82	2,16	1,99
kategorie 2	1,53	2,03	1,78
kategorie 3	1,52	2,64	2,08
kategorie 4	1,95	2,00	1,97
kategorie 5	1,86	2,10	1,98
kategorie 6	1,86	1,95	1,90

Výsledky uvedené v tabulce 9 jsou zobrazeny v následujících grafech (Obr.7,8).



Obr.7: Mortalita všech testovaných druhů borelií podle věkových kategorií a pohlaví

Z grafu na obrázku 7 je vidět, že mortalita borelií, které reagovaly s ženským sérem, byla u všech druhů borelií nižší než mortalita borelií, které reagovaly s mužským sérem.



Obr.8: Mortalita všech testovaných druhů borelií ve věkových kategoriích 1 až 6

Porovnáním průměrné mortality všech testovaných druhů borelií v rámci jednotlivých věkových kategorií bylo zjištěno, že žádná z věkových skupin nemá jednoznačně vyšší nebo nižší náklonnost k nákaze (Obr.8).

5. DISKUSE

Všechny druhy zvířat slouží v přírodě v různé míře jako hostitelé klíšťat čeledi Ixodidae (ve střední Evropě hlavně *I. ricinus*). Proto mohou být infikováni širokým spektrem patogenů, které klíšťata přenášejí, jako jsou protozoa, viry nebo bakterie. Ačkoli je člověk pouze náhodným hostitelem klíšťat, je LB nejčastější vektorem přenášené onemocnění v Evropě i v USA.

Spirochety komplexu *B. burgdorferi* sensu lato jsou schopny se vyhýbat účinkům komplementu hostitele. Ve střevě klíštěte jsou nejspíš chráněny faktory z klíštěcích slin, které inhibují hostitelský komplement. Tento účinek slin má významný efekt při přenosu různých patogenů, včetně borelií (Nuttall et al., 2000). V klíštěcích slinách je řada molekul, které ovlivňují imunitní systém hostitele a umožňují klíšťatům úspěšné sání. Sliny klíšťat obsahují především molekuly zabraňující srážení krve a molekuly s vazodilatačními, protizánětlivými a imunomodulačními vlastnostmi (Wikel a Bergman 1997). Aby spirochety po přenosu do hostitele přežily, mají vyvinut ještě systém, jak unikat komplementu, a to nejen na počátku infekce a při lokalizované či chronické fázi LB, ale i ve střevě klíštěte po nasátí. Schopnost unikání účinkům komplementu má význam při dynamice přenosu patogenu. Jednotlivé druhy borelií se liší v jejich schopnosti inaktivace komplementu. Je to dáno schopností vázat faktor H a Faktor H- like 1 (FHL-1) proteiny (Kurtenbach et al., 2002; Stevenson et al., 2002). Díky této rozdílnosti mohou být borelie děleny do skupin citlivých k séru (serum-sensitive) a odolných (serum-resistant).

Podle našich výsledků je při zvolených podmínkách úroveň mortality borelií všech testovaných druhů po inkubaci s lidským sérem spíše nižší, což by vysvětlovalo rychlé rozšíření LB po celém světě a výrazný nárůst počtu případů. Lze ale pozorovat dvě skupiny borelií: druhy s velmi nízkou mortalitou (<1%) a druhy s mírně vyšší mortalitou (>3-4%). Skupina s vyšší mortalitou borelií zahrnuje druhy *B. garinii*, *B. bissetii*, *B. carolinensis* a *B. andersonii*. Všechny ostatní testované druhy vykazovaly mortalitu do 1%. Pouze *B. valaisiana* je svým výsledkem umístěna mezi tyto dvě skupiny druhů borelií.

Tyto výsledky souhlasí například s poznatky publikovanými v roce 2001 dvěma různými skupinami vědců. Jejich práce prokázaly, že izoláty *B. garinii* byly ke komplementu citlivé, zatímco *B. afzelii* byly vůči komplementu odolné. (Alitalo et al., 2001; Kraiczy et al., 2001).

Skutečnost, že kmeny *B. garinii* jsou ke komplementu více citlivé, může souviset s preferencí tohoto druhu k působení LB v centrálním nervovém systému, kde jsou účinky komplementu mnohem slabší, než v ostatních částech lidského těla.

Rozložení séropozitivity mezi pacienty ukázalo, že nejvíce pacientů s protilátkami proti boreliím bylo v kategoriích 3 a 4, tedy ve věku 41 až 60 let. V tomto věku byl největší podíl všech na protilátky pozitivních pacientů i v přepočtu na deset pacientů.

Ačkoli žádná z věkových skupin neměla podle našich výsledků vyšší sklon k nákaze, podle Nelsonovy publikace se více případů nakažení LB vyskytuje mezi 40 a 64 lety věku (Nelson et al., 2015). To je pravděpodobně způsobeno tím, že se jedná o jedince v produktivním věku a lidé z této věkové kategorie se zároveň častěji vystavují riziku nákazy v přírodě (Nelson et al., 2015). Tato skutečnost je v souladu s naším výsledkem testů na boreliové protilátky, kde vyšlo nejvíce na protilátky pozitivních pacientů v přepočtu na 10 jedinců ve věku mezi 41 a 60 lety.

Ve skupině pacientů, kterou jsme testovali, se jeví ženy jako více citlivé k nákaze než muži, přestože podle našich výsledků 80% všech na protilátky pozitivních pacientů byli muži. Tato data se shodují s výsledky Nelsona a jeho kolegů, kteří tvrdí, že muži představují větší část všech infikovaných pacientů ve zkoumané populaci (Nelson et al., 2015). Tento fakt je zdůvodňován skutečností, že se pravděpodobně častěji v přírodě pohybují muži, než ženy. Například častěji pracují v lesích jako myslivci, na stavbách, na těžbě dřeva, nebo jsou na lovu a podobně.

V roce 2009 publikovali Wormser and Shapiro práci „Implications of Gender in Chronic Lyme Disease“, ve které uvádějí, že mezi pacienty s příznaky chronické boreliózy výrazně převažují ženy. Podle jejich dat bylo ze 490 antibioticky přeléčených pacientů s chronickou LB 338 žen, tedy 69,0% (Wormser a Shapiro, 2009). Autoři této publikace uznávají oficiální politiku americké CDC, která zastává názor, že chronická LB vůbec neexistuje. Také proto je jejich vysvětlením, že většina z těchto pacientů s chronickou LB nebyla nikdy infikována boreliemi a jejich symptomy jsou výsledkem spojení mnoha jiných onemocnění, často psychických, která se zároveň častěji projevují u ženských pacientů. Toto tvrzení bylo kritizováno v následně publikovaném dopise editorovi stejného časopisu (Stricker a Johnson, 2009). V dopise byly zdůrazňovány předsudky v diagnostice chronické boreliózy u žen, ve srovnání s diagnostikou stejného onemocnění u mužů. Každopádně to, že naše výsledky potvrzují jejich analýzu, by mohlo být faktem k zamyšlení.

Dalším podstatným faktorem, který může vysvětlit větší procento nakažených mužů v lidské populaci a zároveň objasnit výsledky Wormsera a Shapira je, že primární diagnostika LB se provádí metodou ELISA podle standartního protokolu bez ohledu na pohlaví. V roce 2010 publikovali Schwarzwaldler a kolektiv své výsledky ohledně velkého množství možných nediodagnostikovaných LB případů u žen, kvůli méně robustní IgG

odpovědi u žen ve srovnání s muži. Autoři tvrdí že standartní interval čtyř týdnů, během kterého se potvrzuje diagnóza LB, není dostatečný pro ženské pacienty a měl by být prodloužen pro dosažení lepší kvality výsledků. (Schwarzwalder et al., 2010)

V tomto tématu je dalším důležitým faktem skutečnost, že ženský imunitní systém je ovlivněn menstruačním cyklem. Pohlavní hormon estrogen stimuluje imunitní systém, zatímco testosteron má opačný, tedy suprimující účinek. Po nástupu menopauzy u ženy klesá hladina estrogenu v krvi a zároveň s ním se tedy snižuje i stimulační účinek a dochází ke změnám imunitního systému. Tento fakt by mohl vysvětlovat, proč dochází častěji u žen k reinfekci boreliemi (Jarefors et al., 2006).

6. ZÁVĚR

Na základě analýzy interakce vybraných druhů borelií s lidským komplementem pacientů různých věkových skupin a pohlaví, se nám podařilo prokázat:

- a) Všech deset testovaných druhů borelií je pro člověka potenciálně infekčních, což nabádá k dalšímu zkoumání a zjišťování infekčních potenciálů druhů spirochet nezahrnutých do klasické první podskupiny borelií prokazatelně způsobujících LB. Je důležité zmínit, že se běžně testují protilátky v krvi proti třem druhům borelií tradičně uznávaným jako původce LB a to, *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* a *B. garinii*. Nicméně již byly prokázány infekce pacientů jinými, „netradičními“ druhy spirochet z komplexu *B. burgdorferi sensu lato*. Naše výsledky nasvědčují, že nákaza LB může být způsobena až deseti testovanými druhy borelií. Je proto možné, že pacienti s nevysvětlenými potížemi nebo netypickými klinickými projevy LB, jsou infikováni méně obvyklým druhem borelie.
- b) Ačkoli úmrtnost všech zkoumaných druhů borelií při reakci s lidským komplementem za zvolených podmínek nebyla vysoká, naše výsledky jasně poukazují na rozdělení všech zkoumaných spirochet na dvě skupiny: spirochety s větší rezistencí a spirochety s menší rezistencí k lidskému komplementu. Toto rozdělení je v souladu s dříve publikovanými analýzami.
- c) Na základě výsledků získaných pomocí průtokové cytometrie bylo zjištěno, že infekční potenciál *B. americana*, *B. bavariensis*, a *B. kutrenbachii* se pohybuje ve stejné hladině jako infekční potenciál uznaných původců LB *B. burgdorferi sensu stricto* a *B. afzelii*.
- d) Podle výsledků získaných pomocí průtokové cytometrie bylo dále zjištěno, že *B. andersonii*, *B. bissetii* a *B. carolinensis* jsou druhy schopné infikovat hostitele stejně úspěšně jako *B. garinii*.
- e) Podle našich výsledků jsou ženy méně odolné vůči nákaze boreliemi oproti mužům. I v případech chronické boreliózy je počet nemocných žen podstatně vyšší, než u mužů. Pro toto tvrzení je hned několik důvodů (viz. diskuse). Naše výsledky mohou být jedním z nich.

- f) Podle výsledků naší práce a také podle oficiálních statistik je počet případů onemocnění LB u mužů vyšší než u žen. Vysvětlení je nejspíš v rozdílu aktivit, které muži a ženy stejných věkových kategorií provozují. Dal by se předpokládat vyšší pohyb mužů aktivního věku v přírodě, například při práci, lovu, rybolovu nebo turistice.

7. LITERATURA

Alitalo, A., Meri, T., Ramo, L., Jokiranta, T. S., Heikkila, T., Seppala, I. J., Oksi, J., Viljanen, M., Meri, S. (2001): Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: serum-resistant strains promote C3b inactivation; *Infect. Immun.*, 6, 3685-91

Bacon, R. M., Kiersten, M. S., Kugeler, J., Paul, M. P. H. S., Mead, M. D. (2008): Surveillance for Lyme Disease --- United States, 1992—2006; Division of Vector-Borne Infectious Diseases, National Center for Zoonotic Vector-Borne and Enteric Diseases, 57, 1-9

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

Brownstein, J.S., Holford, T.R., Durland Fish, (2005): Effect of Climate Change on Lyme Disease Risk in North America; *Ecohealth*, 2(1): 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; *Microbiol.*, 150, 38-46

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

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

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

- Chu, C. Y., Liu, W., Juany, B. G., Wang, D. M., Juany, W. J., Zhao, Q. M., Zhang, P. H., Wang, Z. X., Tang, G. P., Yang, H., Cao, W. C. (2008): Novel genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks in southwestern China; *J. Clin. Microbiol.* 46,3130-3133
- 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, K. L., Leydet, B., Hartman, S. (2013): Lyme Borreliosis in Human Patients in Florida and Georgia, USA; *Int. J. Med. Sci.*, 10(7), 915-931
- Collares-Pereira, M., Couceiro, S., Franca, I., Kurtenbach, K., Schafer, S. M., Vitorino, L., Goncalves, L., Baptista, S., Vieira, M. L., Cunha, C. (2004): First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient; *J. Clin. Microbiol.*, 3, 1316-1318
- Damaerschalck, 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
- Eiffert, H., Karsten, A., Reiner Thomssen, Christen, H. J. (1998): Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains in Lyme arthritis; *Scandinavian Journal of Inf. Dis.*, 30, 265-268
- Fensfeld, O. (1965): *Borreliae*, human relapsing fever and parasite-vector-host relationships; *Bacteriol. Rev.*, 29, 46-74
- Foretz, M., Postic, D., Baranton, G. (1997): Phylogenetic analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by arbitrarily primed PCR and pulsed-field gel electrophoresis; *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 11-18
- Fukunaga, M., Hamase, A., Okada, K., Nakao, M. (1996): *Borrelia tanukii* sp. nov. And *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis; *Microbiol. Immunol.* 40, 877-881

Grange, F., Wechsler, J., Guillaume, J. C., Tortel, J., Tortel, M. C., Audhuy, B., Jaulhac, B., Cerroni, L. (2002): *Borrelia burgdorferi*-associated lymphocytoma cutis simulating a primary cutaneous large B-cell lymphoma; *J. Am. Acad. Dermatol.*, 47, 530-534

Hellwage, J., Meri, T., Heikkilä, T., Alitalo, A., Panelius, J., Lahdenne, P., Seppälä, I. J., Meri, S. (2001): The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*; *J. Biol. Chem.* 276, 8427-8435

Hirschfeld, M., Kirchning, C. J., Schwandner, R., Wesche, H., Weis, J. H., Wooten, R. M., Weis, J. J. (1999): Cutting edge: Inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by Toll-like receptor; *J. Immunol.* 163, 2382-2386

Hovius, J. W. R., van Dam, A. P., Fikrig, E. (2007) Tick- host-pathogen interactions in Lyme borreliosis; *Trends. Parasitol.*, 23, 434-438

Ivanova, L. B., Tomova, A., González-Acuña, D., Murúa, R., Moreno, C. X., Hernández, C., Cabello, J., Cabello, C., Daniels, T. J., Godfrey, H. P., Cabello, F. C. (2014): *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere; *Environ. Microbiol.* 22, 10.1111/1462-2920.12310

Jarefors, S., Bennet, L., You, E., Forsberg, P., Ekerfelt, C., Berglund, J., Ernerudh, J. (2006): Lyme borreliosis reinfection: might it be explained by a gender difference in immune response?; *Immunology*, 2, 224-232

Kawabata, H., Masuzawa, T., Yanagihara, Y. (1993): Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan; *Microbiol. Immunol.* 37, 843-848

Kraiczy, P., Skerka, C., Kirschfink, M., Brade, V., Zipfel, P. F. (2001): Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconectin and factor H; *Eur. J. Immunol.* 31, 1674-1684

Krause, P. J., Fish, D., Narasimhan, S., Barbour, A. G. (2015): *Borrelia miyamotoi* infection in nature and in humus; *Clin. Microbiol. Infect.*, 7, 631-639

Kurtenbach, K., Sewel, H. S., Ogden, N. H., Randolph, S. E., Nuttal, P. A. (1998): Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology; *Infect. Immun.* 66, 1248-1251

Kurtenbach, K., Schäfer, S. M., Sewell, H. S., Peacey, M., Hoodless, A., Nuttall, P. A., Randolph, S. E. (2002): Differential survival of Lyme borreliosis spirochetes in ticks that feed on birds; *Infect. Immun.*, 70, 5893-5895

Le Fleche, A., Postic, D., Girardet, K., Péter, O., Baranton, G. (1997): Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis; *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 921-925

Liang, F. T., Nelson, F. K., Fikrig, E. (2002): Molecular adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the murine host; *J. Exp. Med.* 196, 275-280

Liang, F. T., Yan, J., Mbow, M. L., Sviat, S. L., Gilmore, R. D., Mamula, M., Fikrig, E. (2004): *Borrelia burgdorferi* changes its surface antigenic expression in response to host immune responses; *Infect. Immun.* 72, 5759-5767

Lindgren, E., Jaenson, T. G. T., Lyme borreliosis in Europe. Influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. World Health organisation (2006). 34s. ISBN 92 890 2291 4

Marconi, R. T., Liveris, D., Schwartz, I. (1995): Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates; *J. Clin. Microbiol.* 33, 2427-2434

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

- Margos, G., Hojgaard, A., Lane, R. S., Cornet, M., Fingerle, V., Rudenko, N., Ogden, N., Aanensen, D. M., Fish, D., Piesman, J. (2010): Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissettii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*; Ticks Tick Borne Dis., 1, 151-158
- Margos, G., Chu, C. Y., Takano, A., Jiang, B. G., Liu, W., Kurtenbach, K., Masuzawa, T., Fingerle, V., Cao, W. C., Kawabata, H. (2015): *Borrelia yangtzensis* sp. nov. a rodent associated species in Asia is related to *B. valaisiana*; Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 10.1099
- Marti Ras, N., Postic, D., Foretz, M., Baranton, G. (1997): *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, a bacterial species made in U.S.A.?; Int. J. Syst. Bacteriol., 47, 1112-1117
- Masuzawa, T., Pan, M. J., Kadosaka, T. (2000): Characterization and identification of *Borrelia* isolates as *Borrelia valaisiana* in Taiwan and Kinmen Islands; Microbiol. Immunol, 44, 1003-1009
- Masuzawa, T., Takada, N., Kudaken, M., Fukui, T., Yano, Y., Ishiguro, F., Kawamura, Y., Imai, Y., Ezaki, T. (2001): *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China; Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 1817-1824
- Materna, J., Daniel, M., Danielová, V. (2005): Altitudinal distribution limit of the tick *Ixodes ricinus* shifted considerably towards higher altitudes in central Europe: results of three years monitoring in the Krkonose Mts. (Czech Republic); Cent. Eur. J. Public. Health., 13, 24-8
- Morrison, T. B., Weis, J. H., Weis, J. J. (1997): *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A (OspA) activates and primes human neutrophils; J. Immunol. 158, 4838-4845
- Nau, R., Christen, H. J., Eiffert, H. (2009): Lyme disease – current state of knowledge; Dtsch. Arztebl. Int., 106, 72-82
- Nelson, C. A., Saha, S., Kugeler, K. J., Delorey, M. J., Shankar, M. B., Hinckley, A. P. (2015): Incidence of clinician-diagnosed Lyme disease, United States, 2005–2010; Emerg. Infect. Dis, 21, 9

Nuttall, P. A., Paesen, G. C., Lawrie, C. H., Wangh, H. (2000): Vector-host interactions in disease transmission; *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2, 381-386

Oliver Jr. J. H., Owsley, M. R., Hutcheson, H. J., James, A. M., Chunsheng Chen, Irby, W., Dotson, E. M., Mclain, D. K. (1993): Conspecificity of the Ticks *Ixodes scapularis* and *I. dammini*(Acari: Ixodidae); *J. Med. Ent.*, 54, 54-63

Ornstein, K., Berglund, J., Bergstrom, S., Norrby, R., Barbour, A. G. (2002): Three major Lyme *Borrelia* genospecies (*Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*) identified by PCR in cerebrospinal fluid from patients with neuroborreliosis in Sweden; *Scand. Infect. Dis.*, 34, 341-346

Ornstein, K., Berglund, J., Nilsson, I., Norrby, R., Bergstrom, S. (2001): Charakterization of Lyme borreliosis isolates from patients with erythema migrans and neuroborreliosis in southern Sweden; *J. Clin. Microbiol.*, 39, 1294-1298

Oschmann, P., Dorndorf, W., Hornig, C., Schafer, C., Wellensiek, H. J., Pflughaupt, K. W. (1998): Stages and syndromes of neuroborreliosis; *J. Neurol.*, 245, 262-272

Parola, P., Raoult, D. (2001): Ticks and tick-borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat; *Clin. Infect. Dis.*, 32, 897-928

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

Picken, R. N., Strle, F., Picken, M. M., Ružic-Sabljić, E., Maraspin, V., Lotrič-Furlan, S., Cimperman, J. (1998): Identification of three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*) among isolates from acrodermatitis chronica atropicans lesions; *J. Invest. Dermatol.*, 110, 211-214

Postic, D., Ras, N. M., Lane, R. S., Hendson, M., Baranton, G. (1998): Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formely *Borrelia* group DN127); *J. Clin. Microbiol.* 36, 3497-3504

- Postic, D., Garnier, M., Baranton, G. (2007): Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates – description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 263-271
- Preac-Mursic, V., Weber, K., Pfister, H. V., Wilske, B., Gross, B., Baumann, A., Prokop, J. (1989): Survival of *Borrelia burgdorferi* in antibioticly treated patients with Lyme borreliosis; *Infection*, 17(6), 355-9
- Randolph, G. J., Furie, M. B. (1995): A soluble gradient of endogenous monocyte chemoattractant protein-1 promotes the transendothelial migration of monocytes *in vitro*; *J. Immunol.* 155, 3610-3618
- Richter, D., Schlee, D. B., Allgover, R., Matuschka, F. R. (2004): Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe; *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 6414-6419
- Richter, D., Postic, D., Sertour, N., Livey, I., Matuschka, F. R., Baranton, G. (2006): Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov.; *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56, 873-881
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Lin, T., Gao, L., Grubhoffer, L., Oliver Jr., H. J. (2009a): Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, *Borrelia americana* sp. nov.; *J. Clin. Microbiol.* 47, 3875-3880
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Oliver Jr., H. J. (2009b): *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from the southeastern region of the United States; *J. Clin. Microbiol.* 47, 134-141
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Růžek, D., Piskunova, N., Mallatova, N., Grubhoffer, L. (2009c): Molecular detection of *Borrelia bissettii* DNA in serum samples from patients in Czech Republic with suspected borreliosis; *FEMS Microbiol. Lett.*, 2, 274-81

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

Ružic-Sabljić, E., Maraspin, V., Lotric-Furlan, S., Jurca, T., Logar, M., Pikelj-Pečnik, A., Strle, F. (2002): Charakterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from human material in Slovenia; Wien. Klin. Wochenschr., 114, 544-550

Satz, N. Klinik der Lyme-Borreliose. Verlag Hans Huber 2.vyd. Bern. (2002). 279 s. ISBN 3-456-83430-6

Schwarzwalder, A., Schneider, M. F., Ldecker, A., Aucott, J. N. (2010): Sex Differences in the Clinical and Serologic Presentation of Early Lyme Disease: Results From a Retrospective Review; Gender Medicine, 7, 320-329

Steere, A. C., Coburn, J., Glickstein, L. (2004a): The emergence of Lyme disease; J. Clin. Invest. 113, 1093-1101

Steere, A. C., Glickstein, L. (2004): Elucidation of Lyme arthritis; Nat. Rev. Immunol., 4, 143-152

Stevenson, B., El Hage, N., Hines, M. A., Miller, J. C., Babb, K. (2002): Differential binding of host complement inhibitor factor H by *Borrelia burgdorferi* Erp surface proteins: a possible mechanism underlying the expansive host range of Lyme disease spirochetes; Infect. Immun., 70:491-497

Stricker, R. B., Johnson, L. (2009): Gender bias in chronic Lyme disease; J. Womens Health (Larchmt), 18, 1717-1718

Tilly, K., Rosa, P. A., Stewart, P. E. (2008): Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*; Infect. Dis. Clin. North. Am., 22, 217-234

van Dam, A. P., Kuiper, H., Vos, K., Widjojokusumo, A., de Jongh, B. M., Spanjaard, L., Ramselaar, A. C., Kramer, M. D., Dankert, J. (1993): Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis; *J. Clin. Infect. Dis.*, 17, 708-717

Wang, G., van Dam, A. P., Le Fleche, A., Postic, D., Péter, O., Baranton, G., de Boer, R., Spanjaard, L., Dankert, J. (1997): Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia genomic* groups VS116 and M19); *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 926-932

Wang, G., van Dam, A. P., Schwartz, I., Dankert, J. (1999): Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications; *Clin. Microbiol. Rev.*, 12(4), 633-53.

Wang, G., Ma, Y., Buyuk, A., McClain, S., Weis, J. J., Schwartz, I. (2004): Impaired host defense to infection and Toll-like 2 receptor independent killing of *Borrelia burgdorferi* clinical isolates in TLR 2-deficient C3H/HeJ mice; *FEMS Microbiol. Lett.* 231, 219-225

Wikel, S. K., Bergman, D. (1997): Tick-host immunology: significant advances and challenging opportunities; *Parasitol. Today.*, 13, 383-389

Wilske, B., Preac-Mursic, V., Gobel, UB et al. (1993): An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis; *J. Clin. Microbiol.*, 31, 340-350

Wooten, R. M., Ma, Y., Yoder, R. A., Brown, J. P., Weis, J. H., Zachary, J. F., Kirschning, C. J., Weis, J. J. (2002): Toll-like receptor 2 is required for innate, but not acquired, host defense to *Borrelia burgdorferi*; *J. Immunol.* 168, 348-355

Wormser, G. P., Shapiro, E. D. (2009): Implications of gender in chronic Lyme disease; *J. Womens Health*, 6, 831-4

Internetové zdroje:

Centers for Disease Control and Prevention. Signs and Symptoms of Untreated Lyme Disease [online]. © 2015 [cit. 2015-10-18]. Dostupné z: http://www.cdc.gov/lyme/signs_symptoms/index.html

World Health Organisation Regional Office for Europe. Lyme borreliosis in Europe [online]. © 2015 [cit. 2015-10-12]. Dostupné z: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/world-health-day-2014/Documents/factsheet-lyme-borreliosis.pdf>

Centers for Disease Control and Prevention. Data and statistics [online]. © 2015 [cit. 2015-11-10]. Dostupné z: <http://www.cdc.gov/lyme/stats/index.html>

Electron Microscopy Sciences. Petroff-Hausser Counting Chamber [online]. © 2013 [cit. 2015-10-12]. Dostupné z: <http://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/63512-20.aspx>

Journal of Neuroinflammation statistics. Common pathways for complement activation. [online]. © 2015 [cit. 2015-11-17]. Dostupné z: <http://www.jneuroinflammation.com/content/9/1/137/figure/F1?highres=y>

Borrélioze de lyme. Le vecteur. [online]. © 2015 [cit. 2015-11-17]. Dostupné z: <http://www.invs.sante.fr/fr./layout/set/print/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-transmission-vectorielle/Borrelioze-de-lyme/Le-vecteur>