

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Senzitivita spirochét komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato ke  
komplementu různých druhů domácích i divokých zvířat a  
člověka: vztah hostitel-patogen**

Bakalářská práce

**Lucie Tichá**

školicelka: Maryna Golovchenko, MSc.

vedoucí práce: Natalia Rudenko, PhD.

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

České Budějovice 2013

Tichá, L., 2013: Senzitivita spirochét komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato ke komplementu různých druhů domácích i divokých zvířat a člověka: vztah hostitel-patogen. [Sensitivity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex to complement of different wild, domestic animals and humans: host-patogen interaction. Bc. Thesis. in Czech.] – 57p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:** Sensitivity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato to serum complement from various animals and humans was analyzed. Complement-mediated *Borrelia* killing was observed in different combination of host serum and *Borrelia* genospecies. The obtained results revealed species-specific patterns of viability or mortality of spirochetes that is associated with host reservoir competence for *Borrelia* genospecies. The results confirmed the fact that parasite-host relationship determines the competent reservoir of *Borrelia* genospecies in nature. The complement of the host may have a key role in the global ecology of Lyme disease.

This study was supported by European FP7 project 278976 ANTIGONE (ANTicipating the Global Onset of Novel Epidemics) and with institutional support RVO:60077344 from Biology Centre, Institute of Parasitology (Czech Republic).

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím parametrů 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 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, 26. září 2013

Lucie Tichá

Část výsledků této práce byla použita pro přípravu vědeckého článku, který byl odeslán do časopisu Ticks and Tick Borne Diseases (IF:2,353) a nyní je ve fázi posuzování.

Celý text viz. příloha 1.

Širmarová, J., **Tichá, L.**, Golovchenko, M., Salát, J., Grubhoffer, L., Rudenko, N., Nowotny, N., Růžek, D. (2013): Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and tick-borne encephalitis virus in zoo animal species in the Czech Republic;

Ticks and Tick Borne Diseases

Na tomto místě bych ráda poděkovala svým školitelkám Marině Golovchenko a Natashe Rudenko za nekonečnou trpělivost, ochotu, cenné rady a pomoc při zpracování této práce.

Velký dík patří Heleně Horké, Janu Erhartovi, profesorovi Janu Kopeckému, Veronice Slavíkové a Ryanu Regovi za pomoc při práci v laboratoři a při řešení nejrůznějších otázek.

Také bych chtěla poděkovat profesorovi Liborovi Grubhofferovi za příležitost pracovat v Laboratoři molekulární biologie vektorů a patogenů. Pracovníkům zoologických zahrad bych ráda poděkovala za jejich vstřícnost a ochotu spolupracovat. Svým kamarádkám Evě Drskové a Haně Slabé děkuji nejen za podporu během celého studia, ale i za jejich ochotu poskytnout vzorky své vlastní krve pro účely mé práce.

Mým rodičům děkuji za lásku a všestrannou podporu.

## Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	1
1.1. ROD <i>BORRELIA</i> .....	1
1.1.1. MORFOLOGIE .....	1
1.1.2. TAXONOMIE .....	2
1.1.3. GENOM .....	3
1.2. LYMESKÁ BORELIÓZA .....	5
1.2.1. HISTORIE .....	5
1.2.2. PATOGENEZE .....	6
1.2.3. INTERAKCE BORELIE-HOSTITEL .....	7
1.3. KOMPLEMENT .....	9
<b>2. CÍL PRÁCE</b> .....	10
<b>3. MATERIÁL A METODY</b> .....	10
3.1. POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE .....	10
3.2. METODY .....	12
3.2.1. SBĚR VZORKŮ .....	12
3.2.2. USKLADNĚNÍ VZORKŮ .....	12
3.2.3. ELISA .....	12
3.2.4. LYMETOP TESTY .....	13
3.2.5. KULTIVACE BORELIÍ .....	13
3.2.6. IZOLACE GENOMOVÉ DNA .....	14
3.2.7. PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	14
3.2.8. ELEKTROFORÉZA .....	15
3.2.9. MIKROSKOPIE TEMNÉHO POLE .....	16
3.2.11. PŘÍPRAVA TESTU CITLIVOSTI BORELIÍ KE KOMPLEMENTU .....	17
3.2.12. PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE .....	18

<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	20
4.1. SBĚR VZORKŮ .....	20
4.2. KONTROLA SÉR NA PŘÍTOMNOST PROTILÁTEK METODOU ELISA A POMOCÍ LYMETOP+ <sup>®</sup> TESTU .....	20
4.4. KONTROLA DRUHOVÉ ČISTOTY A INFEKČNOSTI BORELIOVÝCH KULTUR .....	27
4.5. VYHODNOCENÍ TESTU CITLIVOSTI BORELIÍ KE KOMPLEMENTU POMOCÍ MIKROSKOPIE TEMNÉHO POLE A PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE .....	29
<b>5. DISKUSE</b> .....	35
<b>7. POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	39
<b>8. PŘÍLOHY</b> .....	48

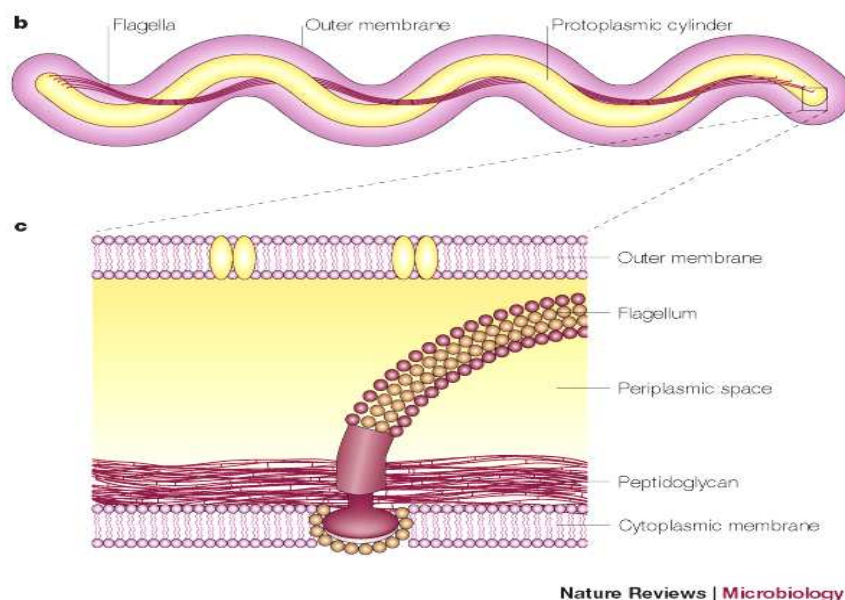
# 1. ÚVOD

## 1.1. ROD *BORRELIA*

### 1.1.1. MORFOLOGIE

Borelie jsou mikroaerofilní gramnegativní bakterie. Jsou v průměru 0,2- 0,5  $\mu\text{m}$  široké a 4-18  $\mu\text{m}$  dlouhé (Karami, 2012). Jejich tvar je protáhlý spirálovitý se čtyřmi až patnácti pravidelnými závity ve vzdálenosti 2,2  $\mu\text{m}$  (Goldstein et al., 1996). Buněčná stěna je tvořena třemi vrstvami, vnitřní peptidoglykanovou, střední lipopolysacharidovou a vnější lipoproteinovou. Pod vnější membránou je protoplazmatický válec skládající se z cytoplazmy a peptidoglykanu (Barbour a Hayes, 1986). Na povrchu protoplazmatického válce je buněčná stěna oddělena od cytoplazmatické membrány periplazmatickým prostorem (Bartůněk et al., 2001).

Pohyb borelií je umožněn bičíky, díky nimž se mohou pohybovat rotací kolem své osy nebo smršťováním a následným natahováním (Bartůněk et al., 2001). Bičíky pod vnější membránou v periplazmatickém prostoru obtáčejí tělo borelie a ta v důsledku vzájemného působení bičíků a buněčného cylindru získává spirálovitý tvar (Obr. 1) (Bartůněk et al., 2001; Motaleb et al., 2000). Tento spirálovitý tvar boreliím umožňuje typický šroubovitý pohyb, kterým mohou překonávat jak nízcce, tak i vysoce viskózní prostředí (Wolgemuth et al., 2006).



**Obr.1:** Schematický náčrt borelie- (b) a ukotvení bičíku-(c) (Rosa et al., 2005).

Bičičky se vypínají mezi bazálními disky umístěnými v cytoplazmatické membráně na obou koncích buňky. Jsou tvořeny flagelárními proteiny dvou tříd. Flagelin A (38 kDa) je protein typický pro spirochéty a nachází se v pochvě bičičků. Flagelin B (41 kDa) se nachází v dřeni (Ge et al., 1998). Cílená inaktivace genu kodujícího Flagelin B, způsobí ztrátu pohyblivosti spirochéty. Oba tyto proteiny jsou silně imunogenní, ale před imunitním systémem hostitele jsou chráněny lokalizací pod vnější membránou.

### 1.1.2. TAXONOMIE

Borelie jsou bakterie z kmene spirochét (*Spirochaetae*). Taxonomicky se řadí do třídy *Spirochaetes*, řádu *Spirochaetales* a čeledi *Spirochaetaceae*, do které mimo borelií patří i medicínsky významný rod *Treponema*, zahrnující původce syfilidy. Bakterie z rodu *Borrelia* způsobují řadu různých nemocí obratlovců včetně člověka. Podle toho lze rod rozdělit do dvou skupin a to na borelie způsobující návratnou horečku (např.: *B. duttoni*, *B. hermsii*, *B. recurrentis*) a komplex druhů *Borrelia burgdorferi* sensu lato, způsobující lymeskou boreliózu. Do tohoto komplexu se v současné době řadí již dvacet pojmenovaných druhů borelií (Rudenko et al., 2011; Ivanova et al., 2013; Casjens et al., 2011). Jedná se o druhy *B. afzelii* (Canica et al., 1993), *B. americana* (Rudenko et al., 2009a), *B. andersonii* (Marconi et al., 1995), *B. bavariensis* (Margos et al., 2009), *B. bissettii* (Postic et al., 1998), *B. burgdorferi* sensu stricto (Baranton et al., 1992), *B. californiensis* (Postic et al., 2007), *B. carolinensis* (Rudenko et al., 2009b), *B. garinii* (Baranton et al., 1992), *B. japonica* (Kawabata et al., 1993), *B. kurtenbachii* (Margos et al., 2010), *B. lusitaniae* (Le Fleche et al., 1997), *B. sinica* (Masuzawa et al., 2001), *B. tanukii* (Fukunaga et al., 1996), *B. turdi* (Fukunaga et al., 1996), *B. spielmanii* (Richter et al., 2006), *B. valaisiana* (Wang et al., 1997), *B. yangtze* (Chu et al., 2008), *B. finlandensis* (Casjens et al., 2011) a *B. chilensis* (Ivanova et al., 2013). Tento komplex dvaceti druhů může být dále rozdělen do tří skupin. Do první skupiny se řadí druhy *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* a *B. afzelii*, které jsou prokazatelnými původci lymeské boreliózy u člověka. Další skupinu tvoří druhy *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. kurtenbachii*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii* a *B. valaisiana*, které mají infekční potenciál, ale kvůli malému množství popsáných případů lymeské boreliózy u člověka, vyvolaných těmito druhy, nejsou doposud zařazeny do skupiny infekčních druhů.

Třetí skupinu tvoří druhy, které nebyly nikdy nalezeny v člověku ani z něho izolovány. Do této skupiny bychom řadili například *B. americana*, *B. andersonii*, *B. californiensis*, *B. carolinensis*, *B. chilensis*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. sinica* a *B. yangtze*.



Kromě velmi významné mezidruhové variability jsou borelie známé svou vnitrodruhovou genetickou variabilitou. Vědci z laboratoře v Rocky Mountain, kde Burgdorfer roku 1981 borelie objevil (Burgdorfer et al., 1982) zjistili, že genom borelie obsahuje minimálně šestkrát více genů, než je tomu u bakterie *Treponema pallidum*, spirochéty způsobující syfilidu. Dále dodávají, že velký rozdíl mezi *B. burgdorferi* a *T. pallidum* je ve struktuře jejich genomů. Ačkoli obě tyto spirochéty, mají malý genom v porovnání s mnoha jinými známými bakteriemi, jako například *Escherichia coli* nebo *Mycobacterium tuberculosis*, struktura genomu spirochety *B. burgdorferi* se zdá být jednou z nejsložitějších genomových struktur všech známých prokaryotických organismů (Porcella a Schwan, 2001).

### 1.1.3. GENOM

Jako první byl osekvenovaný genom *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (Fraser et al., 1997). Borelie má segmentovaný genom, skládající se z lineárního chromosomu a dalších 21 chromosomálních elementů- plazmidů. V jedné buňce je 12 lineárních (lp-linear plasmid) a 9 kruhových (cp-circular plasmid) plazmidů (Casjens et al., 2000).

Lineární chromosom je relativně malý. Má velikost 910 725 párů bazí (bp) a průměrný obsah G + C párů je 28,6%. Kódující sekvence představuje 93% chromosomu. Předpokládaných kódujících sekvencí (Open Reading Frame) je 853 a každá má průměrnou velikost 992 bp, podobně jako u jiných prokaryot. Z celkových 853 ORF jsou biologické funkce přiřazeny 59% genů. Geny lineárního chromosomu kódují základní proteiny pro replikaci DNA, transkripci, translaci, transport látek a energetický metabolismus. Co ale chybí, jsou geny pro syntézu nukleových kyselin, aminokyselin, mastných kyselin a kofaktorů enzymů. V důsledku tohoto nedostatku biosyntetických drah je pro růst borelií *in vitro* nezbytné speciální růstové médium BSK-H s přídavkem králíčího séra (Barbour a Hayes, 1986; Tilly et al., 2008).

Plazmidy kódují 535 genů a 90% z nich jsou unikátní pro rod *Borrelia*, což naznačuje jejich specializované funkce vztahující se k adaptaci spirochét k různým hostitelům. Plazmidy o celkové velikosti 610 644 bp mají poměr G + C mezi 23,1-32,3%. Obsahují celkem 430 předpokládaných ORF o průměrné velikosti 507 bp. Kódující sekvence představuje pouze 71% plazmidové DNA, což je o hodně méně než je tomu u chromosomu. Tento početní rozdíl naznačuje, že vzdálenosti mezi geny jsou větší na plazmidech, než na chromosomu, a že některé potencionální ORF obsahují posunutý čtecí rámec, nebo stop kodony. Doposud bylo identifikováno 76 (=16%) ORF. Přibližně 58% ORF reprezentuje geny nejasných funkcí,

kteře mohou kódovat proteiny definující jedinečné biologické a patogenní vlastnosti borelií. Na plazmidech jsou geny kódující povrchové proteiny, faktory virulence a geny nezbytné pro přežití. Některé plazmidy se ale v průběhu kultivace mohou ztrácet, což může vést ke ztrátě virulence a infekčnosti (Schwan et al., 1987). V důsledku ztráty plazmidu může dojít ke ztrátě některé funkce důležité pro přežití v hostiteli. Stejně tak může ke ztrátě dojít i bez vlivu na infekční cyklus. Pokud dojde ke ztrátě plazmidu, který nese gen *vlsE*, *adeC* nebo *pncA*, může borelie přestat být infekční (Lawrenz et al., 2004; Jewett et al., 2007; Purser et al., 2003). Borelie, které ztratily plazmid s jedním z těchto genů, mohou dále růst *in vitro*, ale nemají již schopnost způsobit persistentní infekci.

Zvláštností lineárních plazmidů je velké množství pseudogenů, které zřejmě vznikají v důsledku rychlých evolučních změn (Casjens et al., 2000). Některé lineární plazmidy mají podobné funkce jako lineární chromosom a mohou být považovány za „mini chromosomy“.

Neobvyklou složkou genomu *B. burgdorferi* je skupina úzce příbuzných 32kB kruhových plazmidů. Devět různých cp32 plazmidů bylo identifikováno jako profágy, které se podílí na horizontálním přenosu DNA u spirochét, sdílejících společné geografické a ekologické niky (Brisson et al., 2013).

Mnohotvárnost genomu borelie má zřejmě za následek vynikající adaptační schopnosti těchto spirochét při nepříznivých podmínkách. V genomu spirochety existuje neobvykle vysoký počet „adaptivních“ genů, které jsou připisovány probíhající evoluční kompetici mezi boreliemi a obrannými mechanismy jejich hostitelů (Casjens et al., 2000).

Borelie mají schopnost morfologické změny. Z pohyblivých spirálovitých tvarů se mohou změnit na cysty různých velikostí. Ty mohou být izolované nebo shromážděné do větších kolonií. Cysty vykazují velmi nízkou metabolickou aktivitu. Touto formou přežívají v nepřátelském prostředí až do doby, než přijdou příznivé podmínky a buňky se začnou opět dělit. Cysta vzniká skroucením jedné spirochety do klubíčka a vytvářením kokonu kolem sebe. Tvorba cyst může být vyvolána mnoha typy nepříznivých podmínek, např.: vysoká kyselost, zásaditost, salinita, složení plynu, změny koncentrací antibiotik, protilátek, sacharidů, aminokyselin nebo vitaminů, také změny viskozity a teploty. Hladovění (tedy růst v médiu bez přítomnosti králičího séra) a hrozba vysychání opět indukují tvorbu cyst.

Už v roce 1997 Brorson a Brorson prokázali, že pokud jsou buňky *B. burgdorferi* inkubovány v BSK-H médiu bez králičího séra, mění se z pohyblivých spirochét na kulovité cysty (Brorson a Brorson, 1997). Po 24 hodinách inkubace v médiu bez séra byly všechny buňky nepohyblivé a 30-40% začínalo tvořit cysty. Po 48 hodinách inkubace těchto buněk

v médiu bez séra 90% z nich vytvořilo cysty. Vytvoření cysty je tedy v tomto případě odpověď aktivní buňky na nedostatek séra (Alban et al., 2000).

Je prokázáno, že cystické formy se mohou opět přeměnit na vegetativní spirochéty jak *in vitro*, tak *in vivo*. Gruntar a kolegové prokázali, že cysty vytvořené v destilované vodě jsou schopny se opět přeměnit na pohyblivé vegetativní spirochéty, a to kdykoli v průběhu měsíce při *in vitro* experimentech, dokonce i po zmrazení a opětovném rozmrazení. Stejně tak bylo prokázáno, že po intraperitoneálním vpravení cyst do 15 myší byly ze dvou úspěšně vyizolovány pohyblivé spirochéty. Tato skutečnost ukazuje, že i cysty jsou infekční formou (Gruntar et al., 2001).

Borelie mají unikátní schopnost vytvářet „bleby“. Jedná se o DNA materiál, který je uzavřený v útvaru vytvořeným sevřením bakteriální membrány. Skutečná role těchto jakýchsi „bublinek“ není jasná ([www.karlmcmannusfoundation.org.au](http://www.karlmcmannusfoundation.org.au)). Pokud se borelie vyskytuje v nepříznivém prostředí například s vysokým obsahem solí nebo s obsahem antibiotik, může vytvářet takzvané L-formy- reverzibilní formy bakterií. Vznikají například při malých dávkách antibiotik při léčbě (Mursic et al., 1996).

## 1.2. LYMESKÁ BORELIÓZA

### 1.2.1. HISTORIE

První zmínka o lymeské borelióze se objevila již v roce 1883, kdy dermatolog Buchwald popsal příznaky onemocnění, dnes známé jako acrodermatitis chronica atropicans-ACA (Buchwald, 1883). Během následujících let byly popsány další příznaky, které v současnosti přisuzujeme lymeské borelióze (Bartůněk et al., 2001).

K důležitému objevu došlo v osmdesátých letech dvacátého století, kdy byl ve městě Old Lyme (Connecticut) pozorován epidemický výskyt zánětlivé atropatie u dvanácti dospělých a třiceti devíti dětí. Přestože padesát devět procent dětí splňovalo kritéria juvenilní revmatoidní artritidy, pozornosti lékařů neunikl předcházející erytém a fakt, že v dané oblasti jsou rozšířena klíšťata typu *Ixodes scapularis* (Steere, 1989). Bylo tedy zřejmé, že revmatoidní artritida je pozdním projevem klíšťaty přenášeného onemocnění nazvaného lymeská borelióza. Nedlouho poté americký vědec Willy Burgdorfer v roce 1981 izoloval z klíštěte *Ixodes scapularis* spirochétu, později nazvanou *Borrelia burgdorferi* (Burgdorfer et al., 1982). Později byla tato spirochéta také kultivována z pacientů trpících lymeskou boreliózou. Tím se potvrdilo, že se jedná o původce tohoto onemocnění (Streere, 1989).

### 1.2.2. PATOGENEZE

Borelie pronikají do hostitelského organismu prostřednictvím přenašeče. Tím je nejčastěji klíště a to v jakémkoli ze tří vývojových stadií- larva, nymfa nebo dospělec. K infekci je zapotřebí delší doba kontaktu, protože spirochety se do slin klíštěte dostávají ve větším množství až po dvaceti čtyřech hodinách.

Základní klinicko-patologickou charakteristikou spirochét komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato je relativně velmi dobrá adaptace ve vnitřním prostředí hostitele. V důsledku jejich adaptačních schopností je klinický průběh infekce pomalý a inaparentní- spontánní vyhojení je častější než nutnost léčby.

Onemocnění je komplexní a postihuje řadu orgánů. Infekci boreliemi rozlišujeme na tři fáze. Jeden až dva týdny po infekci dochází v první fázi v typickém případě k primárnímu pomnožení v místě přisátí klíštěte. Jedná se o lokalizovanou kožní formu infekce projevující se vytvořením erythema migrans. V této fázi se u pacientů mohou vyskytnout chřipkové příznaky jako zvýšená teplota, nevolnost, nebo bolest kloubů (Nau et al., 2009). Pokud během tohoto stadia nedojde k eliminaci infekce, šíří se bakterie dál a to krevní i lymfatickou cestou a infekce tedy přechází ze stavu lokalizovaného do stadia diseminace (Bartůněk et al., 2001).

Několik týdnů po nákaze nastává druhá fáze, časné generalizované infekce. Při příznivých podmínkách jsou borelie schopny uchytit se především v centrálním i periferním nervovém systému, v kloubech, myokardu, kosterním svalstvu, některých očních tkáních a sekundárně i v kůži (sekundární erythema migrans). Ještě v druhé fázi může dojít k spontánnímu vyhojení (Bartůněk et al., 2001).

Třetí fáze je chronická či pozdní. Manifestuje se měsíce až roky po nákaze. Projevem chronické fáze bývá nejčastěji acrodermatitis chronica atrophicans (Satz, 2002), nebo artritida postihující nejčastěji kolenní a ramenní klouby. Artritida většinou přetrvává i po přeléčení antibiotiky, zřejmě jako důsledek zkřížené autoimunitní reakce (Steere a Glickstein, 2004). Klinické fáze jednotlivých stadií viz. příloha 2.

Je prokázáno, že lymeskou boreliózu u lidí způsobují tři z dnes známých dvaceti druhů komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*Bb* s.l.). Jsou to *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (*Bb* s.s.), *Borrelia afzelii* a *Borrelia garinii*. Dlouhou dobu byly *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* a *B. garinii* považovány za jediné původce onemocnění. Před nedávnem byly ale zapojeny do lymeské boreliózy i jiné druhy spirochét komplexu *Bb* s.l. Zapojení nových a neznámých druhů borelií do lymeské boreliózy změnilo drasticky pochopení a uznání klinických projevů onemocnění.

Jednotlivé druhy *Bb* s.l. způsobují různé klinické projevy lymeské boreliózy u člověka. V Severní Americe, kde převládá *Bb* s.s., je nejběžnější artritida, zatímco v Eurasii, kde je největší výskyt *B. garinii* a *B. afzelii* je nejvíce případů s neuroboreliózou a akrodermatitidou.

Geografické rozdíly v distribuci různých druhů *B. burgdorferi* sensu lato v regionech, kde je vektorem jen jeden druh klíštěte, např. v Evropě *Ixodes ricinus*, pravděpodobně souvisí s rozdílným přenosem spirochét mezi hostiteli a klíšťaty v závislosti na hostiteli.

### 1.2.3. INTERAKCE BORELIE-HOSTITEL

Všichni známí původci lymeské boreliózy kolují mezi klíšťaty (*Arachnida*, *Acari*, *Ixodoidea*) a širokým spektrem obratlovců (savci, ptáci, plazi). Cirkulace spirochét je modelem spleteného vztahu mezi hostitelem, přenašečem a vlastní bakterií.

Populace borelií jsou utvářeny na základě dynamiky a demografických procesů populací hostitelů a vektorů. Záleží ale také na imunitní odpovědi hostitele a vnějších abiotických faktorech, které mají vliv jak na hostitele, tak na populaci vektorů. Jsou to například kombinace teploty, vlhkosti a typu podnebí a krajiny (Margos et al., 2011).

Ve volné přírodě se vyskytuje rozdíl mezi specifitou a selektivitou různých druhů borelií k hostitelům. Citlivost nebo odolnost různých druhů borelií k hostitelskému komplementu je jedním z klíčových faktorů interakce mezi hostitelem a borelií. Tato citlivost různých druhů borelií ke komplementu hostitele přiřazuje mnoha druhům obratlovců status rezervoárového hostitele v přírodě.

Bylo prokázáno, že *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. japonica* a *B. bissettii* jsou rezistentní vůči komplementu hlodavců, což znamená, že jsou hlodavci rezervoárovými hostiteli pro tyto druhy borelií. *B. garinii* (kromě některých kmenů), *B. valaisiana* a *B. turdi* jsou rezistentní vůči ptačímu komplementu. *B. burgdorferi* s.s. vykazuje střední rezistenci ke komplementu ptáků i hlodavců a často se zdá být infekční pro obě skupiny (Kurtenbach et al., 2002).

Například současné studie ukazují, že malí hlodavci z rodů myšic (*Apodemus*) a norníků (*Myodes*), veverky obecné (*Sciurus vulgaris*) a veverky popelavé (*Sciurus carolinensis*) jsou obvykle infikovány *B. afzelii* a o něco méně *B. burgdorferi* s.s. Tyto druhy zvířat tedy přenášejí *B. afzelii* a *B. burgdorferi* s.s. na klíšťata, která se na nich nasají (Gern, 2009; Humair et al., 1998).

Jako další příklad rezervoárových hostitelů pro jeden z méně častých druhů borelie *B. lusitaniae* lze uvést *Psammmodromus algirus* (ještěrkovec alžírský) v Tunisku (Dsouli et al., 2006), *Podarcis muralis* (ještěrka zední) v Itálii (Amore et al., 2007), *Lacerta agilis* (ještěrka obecná středoevropská) v Německu (Richter a Matuschka, 2006).

Existuje jen málo studií, které by popisovaly ptáky jako kompetentní rezervoárové hostitele určitých druhů borelií. Kurtenbach a kol. došli k závěru, že bažanti a nepěvci představují kompetentní rezervoáry pro *B. valaisiana* a *B. garinii* a naopak nejsou rezervoárovými hostiteli pro *B. afzelii* (Kurtenbach et al., 2002). V další studii Humair uvedl, že v Eurasii je *B. garinii* výhradně spojena s ptáky, kteří hnízdí na zemi (Humair, 2002).

V Evropě je s ptáky spojována *B. valaisiana* a *B. burgdorferi* s.s. (Derdáková a Lenčáková, 2005). V severní Evropě byla u stěhovavých ptáků prokázána přítomnost *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s. a *B. miyamotoi* (Comstedt et al., 2006). Ve Švýcarsku byla analyzována klíšťata ze stěhovavých ptáků a v těchto klíšťatech byly zastoupeny druhy *B. valaisiana*, *B. garinii*, a *B. lusitaniae* přičemž *B. lusitaniae* bylo překvapivě velké množství (Poupon et al., 2006).

Na základě výše uvedeného je možné tvrdit, že spirochéty *B. garinii* a *B. valaisiana* jsou většinou přenášeny ptačími hostiteli, zatímco *B. afzelii* je šířena převážně hlodavci a některými hmyzožravci. *B. burgdorferi* s.s. je schopná infikovat jak hlodavce, tak i ptáky a další druhy zvířat.

Šíření borelií je závislé na migraci jejich hostitelů. Druhy borelií, které přežívají v hlodavcích, vykazují omezenější migraci, než druhy přežívající v ptácích. Sledování rozsahu geografického rozšíření různých druhů spirochét má velký význam pro celosvětové zdravotnictví a také poskytuje příležitost zkoumat ekologickou roli hostitele v epidemiologii vektorem přenášené zoonózy.

Tyto studie jsou velmi důležité pro určení kompletního spektra boreliových druhů, zodpovědných po celém světě za nákazu člověka lymeskou boreliózou, onemocněním s neznámými, vzácnými a neobvyklými klinickými manifestacemi.

### 1.3. KOMPLEMENT

Komplement je složkou humorální nespecifické imunitní odpovědi. Je to skupina zhruba třiceti sérových a membránových proteinů, které kooperují jak mezi sebou tak s dalšími imunitními mechanismy. Hlavními složkami komplementu je devět sérových proteinů označovaných C1-C9. Po různých podnětech se jednotlivé složky kaskádovitě aktivují. Ústřední složkou je protein C3, jehož fragment C3b se pevně váže na mikrobiální povrch. Meziprodukty této kaskádovité reakce mají významné funkce opsonizace a chemotaxe. Terminálním produktem kaskády je skupina proteinů C5b, C6, C7, C8, C9. Těchto pět proteinů je označováno jako MAC (Membrane Attack Complex). MAC perforuje cytoplazmatické membrány některých mikroorganismů, působí jejich lýzu, a tím je ničí. Hlavními funkcemi komplementu tedy jsou opsonizace (C3b), chemotaxe (C3a, C5a) a osmotická lýza (C5b-C9) (Hořejší a Bartůňková, 2005).

Rozeznáváme tři různé způsoby aktivace komplementového systému. Poprvé byla popsána cesta nyní označovaná jako klasická, později jiná, zvaná alternativní a teprve nedávno lektinová, která je vlastně určitou variantou cesty klasické (Hořejší a Bartůňková, 2005).

## 2. CÍL PRÁCE

1. Literární studie k tématu kompetence hostitelů k spirochétám druhového komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

2. Sběr vzorků sér v zoologických zahradách České Republiky pro analýzu senzitivity různých druhů *Borrelia burgdorferi* sensu lato ke komplementu zvířat a člověka. Plánování experimentů.

3. Zvládnutí techniky kultivace spirochét, izolace DNA, PCR, elektroforézy, ELISA, průtokové cytometrie, statistické vyhodnocení.

4. Interpretace výsledků a vytvoření druhově specifického modelu životaschopnosti/rozkladu spirochét v sérech různých zvířat. Účast na přípravě výsledků k publikaci.

## 3. MATERIÁL A METODY

### 3.1. POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE

Tab. 1: 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.	Damaerschack 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>	
pncA R	50°C	ACGCAAAAATCTAATGCCAATCCT	Purser et al., 2003	
pncA F	50°C	TAAAAACGGGGGCATTTGGC		
adeC R	55°C	TCGTGCCCATACCCTATTGC	Jewett et al., 2007	
adeC F	55°C	CTTCTTGTGTGCCGGCTTTG		
vlsE R	50°C	TTACATCCTTCAGCGCACCC	Liweris et al., 2008	
vlsE F	50°C	TGGTGCGAAGGCTGATAAGG		



Tab. 2: Seznam použitých chemikálií.

Metoda	Chemikálie	Složení
ELISA	vazebný roztok	32 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 68 mM NaHCO <sub>3</sub> , pH 9,6
	blokovací pufr	5% PTS v PBS
	promývací roztok TPBS	0,05% Tween v PBS
	ředící roztok	2% PTS v PBS
	substrátový roztok	Připraven těsně před použitím smícháním 5 ml fosfocitrátového pufru, 2 mg OPD, 2 µl 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	stop roztok	2M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	protilátka proti koni	vytvořeno v králíkovi, rozpuštěno v 0,01M PBS, pH 7,4; 1% BSA s 0,01%thiomersal (Sigma aldrich)
	protilátka proti králíkovi	vytvořeno v koze, rozpuštěno v 0,01M PBS, pH 7,4; 1% BSA s 0,01%thiomersal (Sigma aldrich)
	protilátka proti psovi	vytvořeno v králíkovi, rozpuštěno v 0,01M PBS, pH 7,4; 1% BSA s 0,01%thiomersal (Sigma aldrich)
protilátka proti turu	vytvořeno v králíkovi, rozpuštěno v 0,01M PBS, pH 7,4; 1% BSA s 0,01%thiomersal (Sigma aldrich)	
kultivace	BSK-H médium	BSK-H complete medium (Sigma aldrich) 6% králičí sérum
kultivace	Persteril	0,5% roztok
Izolace DNA	kit	DNeasy® Blood & Tissue Kit (250), (Qiagen)
PCR	2x Master mix	Taq DNA polymeráza [doplněno reakčním pufr (pH 8.5)] 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP, 3mM MgCl <sub>2</sub> (Promega)
DNA elektroforéza	50xTAE pufr	200mM Tris-HCl, 50mM EDTA
	Agaróza	1,5% 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)
test citlivosti	Marker	100 bp Gene Ruller (MBI Fermentas)
	EDTA	0,5 M EDTA (zásobní roztok)
	VBS	Veronal Buffer Saline (Lonza)
	EGTA ve VBS	10mM EGTA (Calbiochem) (zásobní roztok)
	MgCl <sub>2</sub> ve VBS	4mM MgCl <sub>2</sub> (Sigma chemical co) (zásobní roztok)
Průtoková cytometrie	PBS 1x	137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,8mM KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	Ředící roztok	2% BSA, 5,4mM glukóza v PBS steril. přefiltrováno přes 0,22 µm filtr. membránu
	propidiumiodid	1,5µM C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> I <sub>2</sub> N <sub>4</sub> (Sigma aldrich)

Tab. 3: Používaná zařízení a doplňkové materiály.

Centrifugy	Centrifuge 5415D (Eppendorf)
	Centrifuge 1415 R (Eppendorf)
	Centrifuge 5415 C (Eppendorf)
	Universal 32 R (Hettlich zentrifugen)
Elektroforéza	SHU6 (Sigma Aldrich)
	OVL Easycast <sup>TM</sup> 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
Zahřívač	Thermomixer (Eppendorf)
Fotosystém na focení gelů	Kodak
PCR box	DNA/RNA UV cleaner UVC/T-M-AR (Biosan)
Flow box	Gelaide
Průtokový cytometr	BD FACS Canto II
Filtrační papír	Syringe- Filter 0,22 μm (TPP <sup>®</sup> )
Lymetop <sup>+</sup> <sup>®</sup> testy	All. Diag Instruments, Exacto

## 3.2. METODY

### 3.2.1. SBĚR VZORKŮ

Pro sběr vzorků bylo kontaktováno několik zoologických zahrad a jiných organizací zabývajících se chovem zvířat. Při běžném lékařském vyšetření bylo zvířatům odebráno minimální množství krve veterinárním lékařem i pro účely této práce. Množství odebrané krve bylo přizpůsobeno stavu a velikosti zvířete. Odběr v žádném případě neměl ohrozit zdravotní stav zvířete. Žádné vzorky nebyly odebírány přímo pro tuto práci.

### 3.2.2. USKLADNĚNÍ VZORKŮ

Pro oddělení krevní složky od séra byly vzorky krve centrifugovány při 4°C po dobu 15 minut při 2000 rpm. Sérum bylo přefiltrováno přes 0,22 μm filtrační membránu pomocí stříkačky. Alikvóty po 50 μl byly uskladněny v kryozkumavkách při -80°C. Každý vzorek byl označen individuálním kódem.

### 3.2.3. ELISA

K detekci protilátek proti boreliím ve vzorcích zvířecích sér byla použita imunologická metoda nepřímá ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Byly použity 3 nejčastěji se vyskytující druhy borelií ve Střední Evropě, a to *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* a *B. garinii*. Boreliové antigeny o koncentraci 1% ve vazebném roztoku byly

po sloupcích nakoutovány na dno mikrotitračních destiček. Po inkubaci při 4°C po dobu 24 hodin ve vlhké komůrce byly mikrotitrační destičky vysušeny poklepem a filtračním papírem. Nespecifické vazby byly vyblokovány blokovacím pufrům po dobu 45 minut při 37°C ve vlhké komůrce. Destičky byly třikrát promyty promývacím roztokem TPBS. Testovaná zvířecí séra včetně kontrolních byla naředěna na 1% v ředícím roztoku a po 50 µl přidána do příslušných jamek. Každá reakce byla provedena ve dvou jamkách pro kontrolu správnosti postupu. Následovala inkubace 45 minut při 37°C ve vlhké komůrce. Po inkubaci byly destičky 3x promyty promývacím roztokem. Jako sekundární protilátky byly použity enzymaticky značené protilátky proti turu domácímu, králíkovi domácímu, psovi domácímu a koni domácímu. Všechny sekundární protilátky byly značené peroxidázou. Sekundární protilátky byly naředěny na 1% v ředícím roztoku a přidány po 50 µl do každé jamky. Inkubace probíhala 45 minut při 37°C ve vlhké komůrce. Po inkubaci byly destičky 3x promyty promývacím roztokem. Vlastní enzymová reakce byla vyvolána 100 µl substrátového roztoku připraveného těsně před použitím. Podle intenzity zbarvení negativní kontroly byla reakce zastavena přibližně po 10 minutách přidáním 100 µl stop roztoku.

#### 3.2.4. LYMETOP TESTY

Ke kontrole sér zvířat, která nebyla zkontrolována na přítomnost protilátek proti boreliím metodou ELISA z důvodu nedostupnosti specifických protilátek byly použity Lymetop<sup>+</sup> testy. Lymetop je rychlý komerční imunochromatografický test pro detekci Ig protilátek pro 3 druhy borelií, a sice *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* a *B. garinii* v sérech obratlovců. Podle protokolu byly testy použity při pokojové teplotě. Pomocí mikropipety bylo do okénka s označením S (Sample) přidáno 20 µl séra a po 30 sekundách 80 µl vyvíjecího pufru. Výsledky byly odečteny po 10 minutách.

#### 3.2.5. KULTIVACE BORELIÍ

Borelie byly kultivovány v kompletním BSK-H médiu ve sterilním prostředí. Při nasazování bakterií ze zmražených kultur bylo použito 5-10 µl zmražené kultury na 10 ml BSK-H média. Kultivace probíhala *in vitro* při 34°C. Vzorky byly pravidelně kontrolovány pod mikroskopem temného pole a po dosažení hustoty nad 10<sup>7</sup> buněk/ml byly pouze nekontaminované kultury použity pro další experimenty.

### 3.2.6. IZOLACE GENOMOVÉ DNA

Buňky byly odděleny od média pomocí centrifugy při 4°C po dobu 15 minut při maximální rychlosti. Supernatant byl opatrně odebrán a dekontaminován v 0,5% roztoku persterilu. Usazené bakterie byly zamraženy při -20°C nebo ihned zpracovány.

Izolace genomové DNA byla provedena pomocí kitu 'DNeasy® Blood & Tissue Kit, (Qiagen)'. Postup izolace byl veden přesně podle přiloženého protokolu pro izolaci DNA. Vyizolovaná DNA byla uchována při 4°C.

### 3.2.7. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Izolovaná DNA byla zkontrolována metodou PCR s použitím druhově specifických primerů k určení zastoupení jednotlivých druhů spirochét v narostlých kulturách. 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) (Damaerschallck et al., 1995).

Příprava reakční směsi:

celkový objem každé reakce = 20 µl

10x PCR pufr.....	2 µl
25mM MgCl <sub>2</sub> .....	2 µl
1mM Primer forward.....	1 µl
1mM Primer reverse.....	1 µl
10mM dNTPs.....	1 µl
Tag DNA polymeráza (Promega) (0,5 U).....	0,5 µl
DNA.....	1 µg

Pro negativní kontrolu byla DNA nahrazena deionizovanou vodou

Zbývající objem do 20 µl byl doplněn deionizovanou vodou.

Amplifikační reakce byla prováděna v přístroji *Mastercycler personal* (Eppendorf) v 0,2 ml tenkostěnných zkumavkách.

Podmínky amplifikační reakce:

- 1) Denaturace DNA..... 5 minut..... 95°C
- 2) 30 opakování
  - Denaturace DNA.... 5 minut..... 95°C
  - Nasedání primerů... 30sekund..... 55°C
  - Elongace..... 30 sekund..... 72°C
- 3) Závěrečná elongace..... 10 minut..... 72°C
- 4) Teplota po skončení reakce..... 4°C

Všechny narostlé kultury byly zkontrolovány pomocí metody PCR na přítomnost genů zodpovědných za infekčnost. Byla zjišťována přítomnost tří genů: *pncA* (PCR produkt 243bp), *adeC* (PCR produkt 496bp) a *vlsE* (PCR produkt 110 bp) (Purser et al., 2003; Jewett et al., 2007; Liweris et al., 2008). Reakční směs byla připravena stejným způsobem jako u předchozí reakce.

Podmínky amplifikační reakce:

- 1) Denaturace DNA..... 5 minut..... 95°C
- 2) 30 opakování
  - Denaturace DNA..... 5 minut..... 95°C
  - Nasedání primerů..... 30sekund..... 55°C pro primery *adeC* R, F  
50°C pro primery *pncA* R,F; *vlsE* R,F
  - Elongace..... 30 sekund..... 72°C
- 3) Závěrečná elongace... 10 minut..... 72°C
- 4) Teplota po skončení reakce..... 4°C

### 3.2.8. ELEKTROFORÉZA

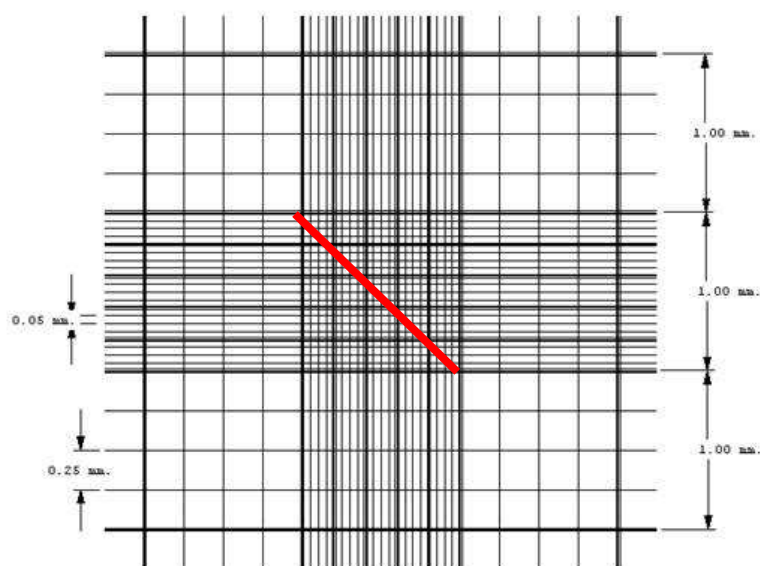
Analýza všech vzorků připravených metodou PCR byla prováděna na 1% agarózovém gelu v 1x TAE pufru. Pro vizualizaci vzorků byl použit vzorkový pufr. Jako marker byl použit standard molekulových hmotností 100 bp gene ruler. Elektroforéza probíhala při napětí 100V po dobu 20-35 minut. Výsledky byly odečteny pod UV zářením a uloženy.

### 3.2.9. MIKROSKOPIE TEMNÉHO POLE

Narostlé kultury borelií byly kontrolovány pod mikroskopem temného pole pro kontrolu čistoty kultur a k pozorování stavu borelií. Hustota kultur byla stanovena počítáním buněk pomocí Petroff- Hausserovy komůrky. Preparát byl pozorován se zvětšením 10x40. Pro stanovení koncentrace byl spočítán průměrný počet bakterií v úhlopříčce pěti větších čtverců Petroff- Hausserovy komůrky (Obr. 1). Koncentrace buněk v 1 ml kultury byla spočítána pomocí vzorku  $A \times 1,25 \cdot 10^6$ , kde A je průměrný počet bakterií ve větším čtverci počítací komůrky.

Pro kontrolování čistoty kultur byly v preparátu pozorovány jiné útvary, než ty, které vytváří borelie. Při kontaminaci kultury bylo nutné ji úplně zničit v roztoku persterilu.

Při posuzování mortality borelií po reakci s komplementem byly v zorném poli počítány struktury, známé jako indikátory mortality. Jsou to spirochéty imobilizované, vytvářející bleby a buňky lyzované (Van Dam et al., 1997). Pohyblivé spirochéty byly počítány jako živé. Počítáno bylo celkem v pěti zorných polích pro každý vzorek. V každém zorném poli byly spočítány všechny borelie a počet těch, co vykazují znaky mortality, byl převeden na %. Z těchto dat byl vypočten aritmetický průměr, a získán průměrný podíl mrtvých borelií v procentech v roztoku. Na základě těchto výpočtů bylo posouzeno, zda bakterie v daném vzorku prosperují, nebo naopak strádají.



Obr. 1: Schéma mřížky v Petroff- Hausserově počítací komůrce se zvýrazněním 5 úhlopříčných čtverců (převzato z [www.emsdiasum.com](http://www.emsdiasum.com) a upraveno).

### 3.2.11. PŘÍPRAVA TESTU CITLIVOSTI BORELIÍ KE KOMPLEMENTU

Test citlivosti borelií ke komplementu byl připraven podle publikace Kurtenbacha (Kurtenbach et al., 1998). Reakce borelií s komplementem byla připravena smícháním séra a kultury borelií o hustotě přibližně  $10^7$  buněk v 1 ml kultury v poměru 1:1. Hustota buněk v kultuře byla upravena pomocí BSK-H média. Reakce probíhaly v 1,5 ml eppendorf zkumavkách. Všechny vzorky byly inkubovány 6 hodin při 34°C (Bhide et al., 2005).

Ke každému experimentu byla připojena kontrola živých a mrtvých buněk. Kontrola živých buněk byla připravena z 50  $\mu$ l čisté kultury borelií, která byla inkubována 6 hodin při 34°C s ostatními vzorky. Jako kontrola mrtvých buněk byla použita kultura borelií bez jakýchkoliv přísad inkubovaná 30 minut při 56°C.

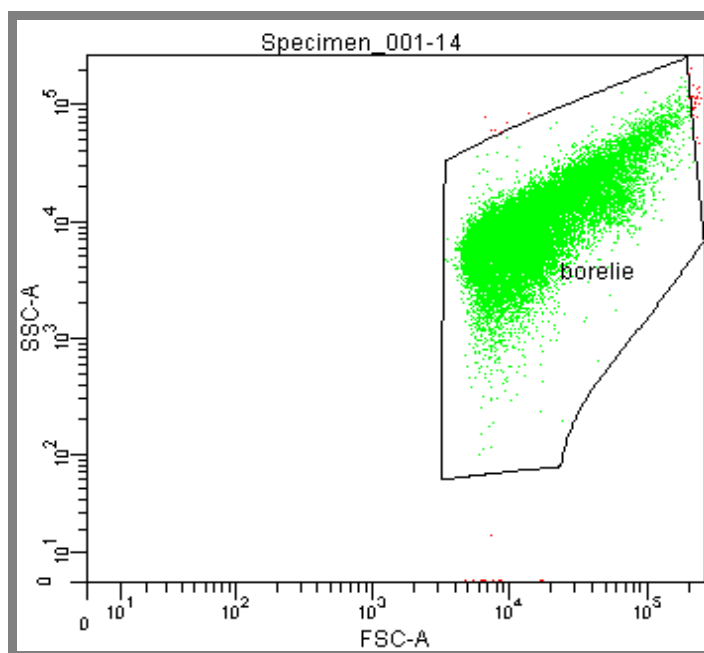
Do vybraných sér byla přidána 10mM EDTA. Po 30 minutách inkubace sér s EDTA při 37°C byla inhibována klasická i alternativní cesta aktivace komplementu. Po přidání odpovídajících objemů boreliových kultur k těmto sérům následovala inkubace 6 hodin při 34°C. Borelie v těchto vzorcích měly prosperovat bez jakýchkoli ztrát.

U stejných druhů sér byla provedena inaktivace komplementu zahříváním séra na 56°C po 30 minut. K těmto sérům byly také přidány boreliové kultury a vše bylo inkubováno s ostatními vzorky. Borelie v těchto vzorcích měly také prosperovat bez jakýchkoli ztrát.

K těmto druhům sér byla přidáním 4mM  $MgCl_2$  ve VBS a 10mM ve VBS a následnou inkubací 30 minut při 37°C inaktivována klasická cesta aktivace komplementu. Po přidání boreliových kultur byly směsi inkubovány 6 hodin při 34°C. V těchto vzorcích měly být pozorovány boreliacidní účinky sér stejné jako u vzorků obsahujících pouze sérum a borelie.

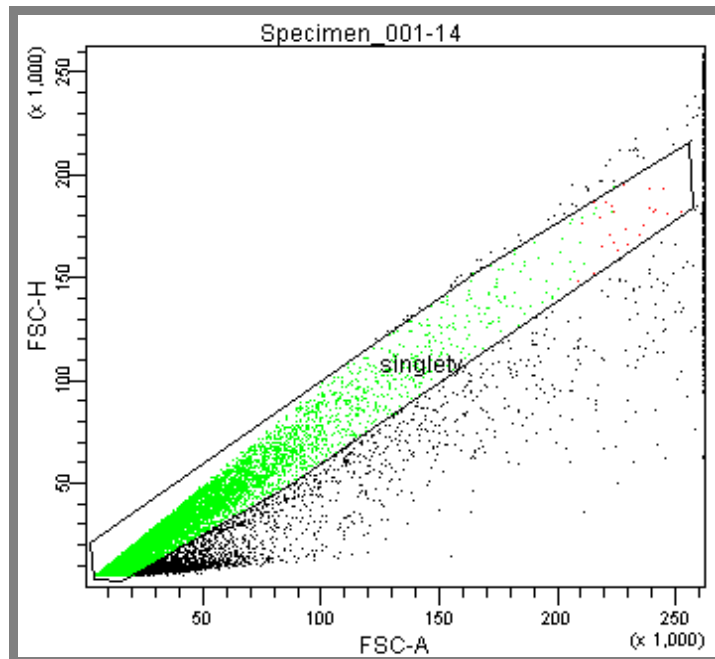
### 3.2.12. PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

Pro vyhodnocení mortality borelií ve všech připravených vzorcích byla použita metoda průtokové cytometrie. Všechny vzorky byly po inkubaci odstředěny pomocí centrifugy 15 minut při 10 000 rpm. Supernatant byl odebrán a dekontaminován. Odstředěné borelie byly rozředěny 200  $\mu$ l ředícího roztoku. Tato směs byla přenesena do 5 ml zkumavek BD Falcon™ s kulatým dnem, ve kterých probíhalo měření v průtokovém cytometru. Měřilo se 30 000 událostí. Bakterie byly od ostatních událostí odděleny na základě hodnoty měření v přímém a kolmém směru (Obr. 2). V dalším kroku byly z těchto vybraných buněk odseparovány shluky a tak vymezeny jednotlivé buňky (Obr. 3). U takto vymezených buněk byla měřena intenzita fluorescence propidiumiodidu v kanálu PE-Texas Red-A 616/23 a určena oblast P1 s výskytem mrtvých buněk (Obr. 4). Všechny vzorky byly změřeny stejným způsobem, aby bylo možné je porovnat.

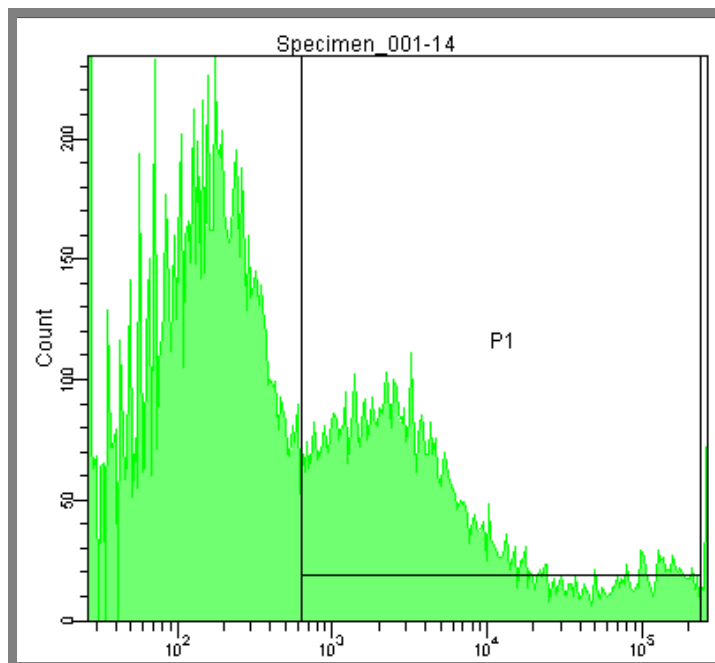


Obr. 2: Vymezení borelií měřením v přímém a kolmém směru (DK71+*B. afzelii*).





Obr. 3: Odseparování shluků a vymezení jednotlivých buněk (DK71+*B. afzelii*).



Obr. 4: Intenzita fluorescence propidiumiodidu v kanálu PE-Texas Red-A 616/23 a vymezení oblasti P1 s výskytem mrtvých buněk (DK71+*B. afzelii*).

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. SBĚR VZORKŮ

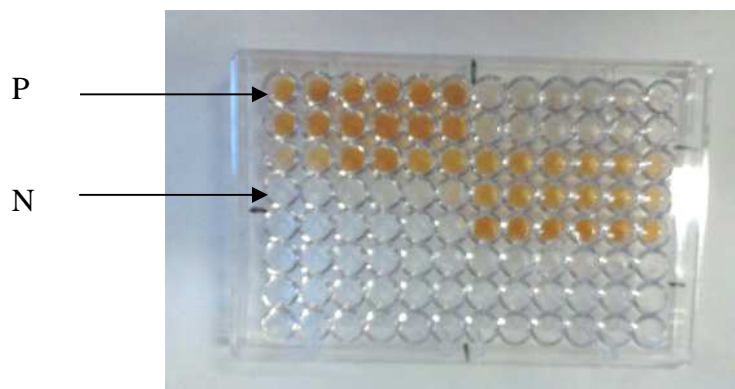
Vzorky krve divokých a domestikovaných zvířat byly získány ze Zooparku Vyškov, Zoo Dvůr Králové nad Labem, Zoo a BZ města Plzeň, ZOO Ohrada Hluboká nad Vltavou, Zoo Olomouc, ze zvěřince Biologického centra AV a dvou členů naší laboratoře (příloha 3). Celkem bylo získáno 137 vzorků sér (Tab. 4).

Tab. 4: Počty vzorků získaných z jednotlivých zoologických zahrad.

Původ vzorků sér	Počet vzorků
Zoo Dvůr Králové nad Labem	84
Zoo Olomouc	6
Zoopark Vyškov	21
Zvěřinec Biologického Centra AV ČR	2
Zoo Ohrada, Hluboká nad Vltavou	1
Zoo a BZ města Plzeň	21
Lidské sérum	2

### 4.2. KONTROLA SÉR NA PŘÍTOMNOST PROTILÁTEK METODOU ELISA A POMOCÍ LYMETOP<sup>+</sup> TESTU

Všechna séra byla zkontrolována na přítomnost protilátek k *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* a *B. garinii* pomocí metody ELISA a dále kvůli nedostupnosti specifických protilátek pomocí komerčního Lymetop<sup>+</sup> testu. Při vyhodnocování výsledků metodou ELISA byly oranžově zbarvené výsledky vyhodnoceny jako pozitivní na boreliové protilátky (Obr. 5,P), bezbarvý výsledek jako negativní (Obr. 5, N).



Obr. 5: Příklad vyhodnocování výsledků získaných metodou ELISA: (P- pozitivní na protilátky, N- negativní na protilátky).

Při vyhodnocování výsledků Lymetop<sup>+</sup> testů bylo sérum vyhodnoceno jako pozitivní na boreliové protilátky pokud se objevil proužek v testovací oblasti T (Test) i v kontrolní oblasti C (Control (Obr. 6 vpravo). Pokud se proužek v oblasti T neobjevil do 20. minuty bylo sérum vyhodnoceno jako negativní (Obr. 6 vlevo).



Obr. 6: Příklad vyhodnocování Lymetop<sup>+</sup> imunochromatografických testů pro detekci Ig protilátek, (vpravo- pozitivní výsledek, vlevo- negativní výsledek).

Výsledky testů ELISA a Lymetop<sup>+</sup> testů byly shrnuty do tabulky včetně celkové informace o každém získaném vzorku (Tab. 5).

Tab. 5: Séra zkontrolovaná na přítomnost protilátek. P- pozitivní na protilátky, N- negativní na protilátky.

Číslo vzorku	Druh	Pohlaví	Datum narození	Objem(ml)	Výsledek
<b>ZOO DVŮR KRÁLOVÉ NAD LABEM</b>					
79	adax nubijský	♀	21.12.2008	1,70	P
44	adax nubijský	♀	30.12.2006	2,00	P
49	adax nubijský	♂	5.8.2003	1,50	P
47	adax nubijský	♀	12.1.2001	1,00	P
48	adax nubijský	♀	24.11.2000	1,50	P
57	antilopa koňská	♀	29.1.1998	1,50	P
22	antilopa skákavá	♀	29.12.2008	1,50	N
93	antilopa vraná	♀	15.11.2011	1,50	N
56	antilopa vraná	♀	6.11.2006	1,50	P
91	antilopa vraná	♀	9.10.2006	2,00	P
90	antilopa vraná	♀	22.5.2004	0,60	P
5	bahnivec horský	♀	19.6.2009	1,00	N
82	bongo lesní	♀	22.12.2010	2,00	P
80	buvol kaferský	♂	30.9.2012	0,50	N
66	gazela dama	♀	17.2.2010	0,50	N
52	gazela dama	♀	5.11.2008	0,60	P
51	gazela dama	♀	2.10.2004	0,50	P
29	gazela dama	♂	2.10.2004	0,70	N
50	gazela dama	♀	14.6.2003	0,80	P
4	gazela thomsonova	♂	2010	1,50	P
3	gazela thomsonova	♂	2009	0,50	P
63	hyena skvrnitá	♂	6.8.1989	3,50	P
62	impala jihoafrická	♂	7.3.2011	0,70	N
69	impala jihoafrická	♂	2.1.2009	0,70	N
67	impala jihoafrická	♀	23.1.2004	1,20	N
30	kudu malý	♂	6.12.2006	1,50	P
68	kudu malý	♀	20.5.2004	1,50	P
46	kudu velký	♀	24.7.2012	1,00	P
18	lev indický	♀	12.3.2000	1,00	N
20	nosorožec černý	♀	22.9.2010	2,70	N
14	nosorožec černý	♀	13.12.2009	0,20	N
21	nosorožec černý	♂	19.2.2006	1,50	N
53	nosorožec černý	♀		1,50	N
19	nosorožec černý	♂	3.12.1992	1,50	N
13	nosorožec černý	♂	18.3.1979	0,90	N

15	nosorožec černý	♂	3.11.1977	0,40	N
73	nyala nížinná	♀	17.6.2012	0,50	N
54	nyala nížinná	♀	26.1.2007	0,80	P
89	oryx jihoafrický	♂	25.4.2011	0,70	P
58	oryx jihoafrický	♀	13.2.2000	2,00	P
43	osel somálský	♂	4.6.2010	0,90	P
55	pakuň běloocasý	♀	20.8.2012	1,50	N
28	pakuň běloocasý	♂	7.7.2012	1,50	N
26,25	pakuň běloocasý	♀	27.5.2007	1,50	P
94,96	paovce hřivnatá	♂	25.6.2012	2,00	P
8	paovce hřivnatá	♂	13.3.2010	1,00	P
9	paovce hřivnatá	♂	13.3.2010	0,70	P
6	paovce hřivnatá	♂	16.2.2010	1,50	P
7	paovce hřivnatá	♂	4.7.2009	1,00	N
23	paovce hřivnatá	♂	12.10.2007	2,00	P
16	pes hyenový	♀	25.9.2005	0,50	P
17	pes hyenový	♀	25.9.2005	1,00	N
35	prase savanové	♀	10.4.2008	0,50	N
2	přímorožec šavlorohý	♂	21.6.2012	1,50	P
32	přímorožec šavlorohý	♀	10.4.2012	1,50	N
76	přímorožec šavlorohý	♂	10.3.2011	1,50	N
75	přímorožec šavlorohý	♂	4.3.2011	0,50	P
65	přímorožec šavlorohý	♀	25.1.1999	0,70	P
71	pštros africký		21.8.2012	0,50	N
72	pštros africký		21.8.2012	0,80	N
64	serval	♂	17.10.1996	0,20	N
36	skot charolais	♀		1,50	N
34	skot dahome	♂	25.1.2011	1,00	N
85	voduška jelenovitá	♂	19.8.2004	1,50	N
78	voduška znamenná	♂	5.2.2012	2,00	N
11	voduška znamenná	♀	15.7.2011	1,50	N
84	voduška znamenná	♂	11.1.2011	0,60	N
83	voduška znamenná	♂	30.12.2010	0,70	N
42	zebra bezhřívá	♂	24.4.2011	1,50	P
41	zebra böhmova	♂	4.1.2012	0,60	N
40	zebra böhmova	♂	22.9.2011	2,00	P
39	zebra böhmova	♂	29.8.2011	2,00	P
38	zebra böhmova	♂	13.8.2011	0,70	P
37	zebra böhmova	♂	1.5.2011	2,00	P
31	zebra böhmova	♀	4.2.2006	1,50	P
88	zebra damarská	♂	20.5.2007	0,70	P

59	zebra hartmannové	♂	31.7.2011	0,50	P
61	zebra hartmannové	♀	14.7.2011	1,70	P
60	zebra hartmannové	♀	27.6.2011	1,50	N
70	zebra hartmannové	♀	2.11.1997	2,00	P
1	zebra hartmannové	♂	26.11.1997	3,00	P
12	žirafa rothschildova	♂	22.6.2012	1,50	N
74	žirafa rothschildova	♀	6.2.1990	1,50	N
45	žirafa síťovaná	♀	24.7.2012	0,50	N
<b>ZOO OLOMOUC</b>					
1	gepard štíhlý		14.8.2001	0,40	N
2	koza šrouborohá		2011	1,50	P
6	kozorožec kavkazský		15.8.2009	1,10	P
4	levhart mandžurský	♀	12.7.1996	3,00	N
5	los evropský		2010	0,20	P
3	sob polární	♀		0,80	P
<b>ZOOPARK VYŠKOV</b>					
20	koza hnědá	♀	13.2.2009	0,70	P
8	koza kamerunská	♀	1.2.2012	2,00	P
17	koza karpatská	♀	12.4.2010	0,80	P
22	koza kašmírská	♂	15.4.2010	1,70	P
6	kůň fjordský	♀	15.8.1995	2,00	P
9	kůň fjordský	♀	25.5.1995	1,00	P
3	kůň tarpan	♀	16.1.2012	0,80	P
5	kůň tarpan	♂	10.2.1990	3,50	P
4	kůň shirský	♀	28.5.2010	1,50	P
11	kůň shirský	♀		0,20	P
12	kůň shirský	♀	26.7.2004	2,30	P
15	lama krotká	♂	28.6.2010	0,50	P
1	osel balkánský	♀	1992	2,50	P
10	osel balkánský	♂	6.5.2003	0,50	P
24	ovce cápová	♀	6.3.2007	1,80	P
7	ovce kamerunská	♀	23.3.2009	1,30	P
19	ovce suffolk	♀	1.2.2012	2,10	N
23	ovce valašská	♀	7.2.2011	0,50	P
21	ovce vřesovištní	♀	15.3.2007	3,50	N
2	pony shetlandský	♀	29.9.1997	1,50	P
13	pony shetlandský	♂	6.5.2003	1,60	P
<b>ZVĚŘINEC BIOLOGICKÉHO CENTRA AV ČR</b>					
26	morče domácí			2,50	N
25	králík domácí			4,00	N

ZOO OHRADA HLUBOKÁ NAD VLTAVOU					
27	plameňák			0,50	N
ZOO A BZ MĚSTA PLZEŇ					
36	buvolovec běločelý			2,30	P
33	gibon lar	♀		1,50	P
49	goral horský			3,00	N
50	goral horský			2,50	N
38	guereza angolská			0,01	N
28	jelen wapiti	♂		1,00	P
29	kamzík bělák			0,50	P
30	kamzík bělák			0,20	P
31	kamzík bělák			1,00	P
39	kamzík bělák	♂		2,00	P
32	krajta tmavá			0,50	N
45	krokodýl siamský			1,50	N
46	krokodýl siamský	♂		0,50	N
47	krokodýl siamský			0,50	N
37	lev pustinný			1,00	N
40	šakal čabrákový	♀		1,00	P
41	vlk obecný	♀	2006	0,50	P
42	vlk obecný	♀	2006	2,30	P
43	vlk obecný	♀	2006	2,50	P
27	voduška lečve			2,00	P
35	želva paprscitá			1,00	N
LIDSKÉ SÉRUM					
1	člověk moudrý (Eva Drsková)	♀	1.3.1991	3,00	N
2	člověk moudrý (Hana Slabá)	♀	29.1.1991	2,50	N

Celkem bylo zkontrolováno 137 vzorků sér. Pozitivní výsledek na přítomnost boreliových protilátek byl zjištěn u 57,7% všech vzorků a negativní u 42,3% (Tab. 6).

Tab. 6: Shrnutí výsledků kontrol vzorků sér na boreliové protilátky.

<b>Metoda</b>	<b>Počet vzorků celkem pro danou metodu</b>	<b>Pozitivní výsledek</b>	<b>Negativní výsledek</b>
ELISA	35	28	7
Lymetop <sup>®</sup> test	102	51	51
celkem	137	79 (57,7%)	58 (42,3%)

Největší zastoupení vzorků pozitivních na boreliové antigeny bylo v Zooparku Vyškov (Tab. 7). Z celkového počtu 21 vzorků bylo 90,5% pozitivních. V Zoo Olomouc, Zoo BZ města Plzeň a v ZOO Dvůr Králové nad Labem bylo zastoupení pozitivních vzorků mezi 52,4 a 66,7%.

Tab. 7: Shrnutí výsledků kontrol na boreliové protilátky podle původu sér.

<b>Původ vzorků sér</b>	<b>Počet vzorků celkem</b>	<b>Pozitivní výsledek</b>	<b>Negativní výsledek</b>
Zoo Dvůr Králové nad Labem	84	44 (52,4%)	40 (47,6%)
Zoo Olomouc	6	4 (66,7%)	2 (33,3%)
Zoopark Vyškov	21	19 (90,5%)	2 (9,5%)
Zvěřinec Biol. Centra AV ČR	2	0 (0,0%)	2 (100,0%)
Zoo Ohrada Hluboká nad Vltavou	1	0 (0,0%)	1 (100,0%)
Zoo a BZ Města Plzeň	21	12 (57,1%)	9 (42,9%)
Lidské sérum	2	0 (0,0%)	2 (100,0%)



U živočišných tříd plazi a ptáci bylo zastoupení pozitivních vzorků 0,0%, u třídy savci 64,2% (Tab. 8).

Tab. 8: Shrnutí výsledků kontrol sér na boreliové antigeny podle taxonomického rozdělení zvířat.

Třída	Řád	Pozitivní výsledek	Negativní výsledek
savci	sudokopytníci	49	30
	lichokopytníci	23	9
	šelmy	6	6
	zajícovci	0	1
	primáti	1	3
	hlodavci	0	1
savci celkem		79	50
ptáci		0	3
plazi		0	5

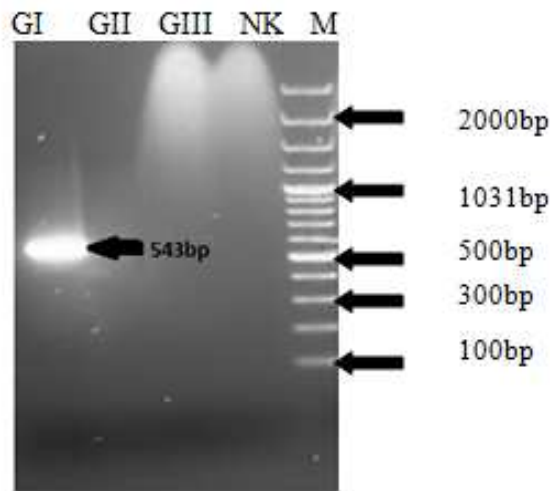
Vzorky negativní na přítomnost boreliových protilátek byly použity pro další experimenty.

#### 4.4. KONTROLA DRUHOVÉ ČISTOTY A INFEKČNOSTI BORELIOVÝCH KULTUR

U všech kultur použitých v experimentech bylo předem zjištěno, zda v nich nejsou zastoupeny další druhy borelií v jednom vzorku. Kontrola byla provedena metodou PCR s použitím druhově specifických primerů GI (*B. burgdorferi* s. s.), GII (*B. garinii*) a GIII (*B. afzelii*). Bylo zkontrolováno 11 boreliových kultur (Tab. 10). K další práci byly použity jen „čisté“ kultury obsahující jen jeden druh borelií. Z 11 zkontrolovaných vzorků, bylo k použití vhodných 5. Vzorek 1 obsahující pouze druh *B. burgdorferi* s. s. (Obr. 7), vzorek 4 a 9 obsahující pouze druh *B. garinii*, a vzorek 3 a 11 obsahující pouze *B. afzelii* (Tab. 9).

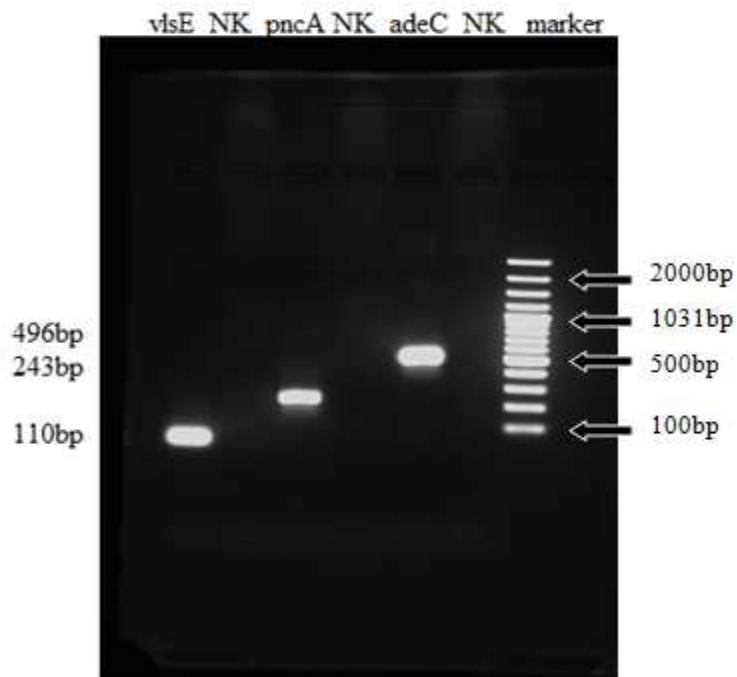
Tab. 9: Výsledky PCR reakcí pro zjišťování zastoupení jednotlivých druhů borelií v různých vzorcích. ■- pozitivní výsledek (přítomnost druhu) □- negativní výsledek (nepřítomnost druhu)

Primery	Specifita primerů	Označení vzorků										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
GI	<i>Bb s.s.</i>	■	□	□	□	□	□	■	■	□	■	□
GII	<i>B.g.</i>	□	■	□	■	■	■	□	■	■	■	□
GIII	<i>B.a.</i>	□	■	■	□	■	■	■	■	□	□	■



Obr. 7: PCR reakce s druhově specifickými primery GI (*B. burgdorferi* s.s.), GII (*B. garinii*), GIII (*B. afzelii*), NK (negativní kontrola, M (marker). Zkoumaný vzorek je *B. burgdorferi* s.s. kmen B31.

Kultury obsahující jen jeden druh borelií byly zkontrolovány pomocí metody PCR na přítomnost genů zodpovědných za infekčnost (Tab. 10), (Obr. 8).



Obr. 8: Potvrzení přítomnosti genů *vlsE* (110bp), *pncA* (243bp), *adeC* (496bp), v kultuře číslo 1- *B. burgdorferi* s.s. kmen B31, (NK-negativní kontrola).

Tab. 10: Výsledek kontrol kultur na přítomnost 3 genů zodpovědných za infekčnost (■- přítomnost genu, □- nepřítomnost genu).

Kultura	vlsE	pncA	adeC
1	■	■	■
3	■	□	□
4	■	■	■
9	□	■	■
11	■	■	■

Byly získány 3 kultury ,které obsahovaly všechny 3 geny zodpovědné za infekčnost. Byly to kultury *B. burgdorferi* s.s. kmen B31, *B. garinii* a *B. afzelii* kmen CB43. Tyto kultury byly použity pro další experimenty.

#### 4.5. VYHODNOCENÍ TESTU CITLIVOSTI BORELIÍ KE KOMPLEMENTU POMOCÍ MIKROSKOPIE TEMNÉHO POLE A PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

Výsledné hodnoty z oblasti P1 (Obr. 4, 9) naměřené průtokovým cytometrem udávají procentuální zastoupení mrtvých buněk v pozorovaných vzorcích (Tab. 11, 12,).

Experiment Name: EXP3			
Specimen Name: Specimen_001			
Tube Name: 14			
Record Date: Nov 15, 2013 8:32:35 AM			
\$OP: Administrator			
GUID: 6bd6ce34-d263-45d9-85c4-1104c6f4d001			
			PE-Texas Red-A
Population	#Events	%Parent	Mean
<span style="color:red;">■</span> singlety	25,358	84.5	6,506
<span style="color:green;">■</span> borelie	25,313	99.8	6,495
<input checked="" type="checkbox"/> P1	7,174	28.3	18,090

Obr. 9: Výsledek vygenerovaný průtokovým cytometrem (DK71+B. afzelii).

V tabulkách 11, 12, 14, 15: u označení vzorku číslo značí číslo vzorku totožné s číslování v tabulce 5, následující 2 písmena značí z jaké organizace/zoologické zahrady vzorky pocházejí (DK- Zoo Dvůr Králové nad Labem, VY- Zoopark Vyškov, HL- Zoo Ohrada Hluboká nad Vltavou, PL- Zoo a BZ města Plzeň, OL- Zoo Olomouc, AV- Zvěřinec Biologického Centra AV ČR, HU- lidské sérum)

Tab. 11: Test citlivosti borelií ke komplementu- CSA (Complement Sensitivity Assay).  
Výsledky měření pomocí průtokového cytometru. Výsledek uveden v % mrtvých buněk P1  
(Obr. 9).

<b>Třída</b>	<b>Řád</b>	<b>Druh zvířete</b>	<b>označení vzorku</b>	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>	<i>Borrelia garinii</i>	<i>Borrelia afzelii</i> CB43
				mrtvých buněk (%)		
savci	sudokopytníci	antilopa skákavá	DK22	17,3	12,9	8,6
		antilopa vraná	DK93	8,0	11,5	12,4
		bahnivec horský	DK5	14,5	11,6	9,1
		buvol kaferský	DK80	0,7	1,3	0,6
		gazela dama	DK66	8,0	9,9	11,0
			DK29	5,0	6,0	7,3
		goral horský	PL49	2,2	10,7	9,2
			PL50	2,4	9,3	8,3
		impala jihoafrická	DK62	17,2	12,5	10,1
			DK67	12,9	16,6	16,1
			DK69	15,8	15,1	18,6
		nyala nížinná	DK73	0,8	3,0	1,5
		ovce suffolk	VY19	5,3	12,8	6,2
		ovce vřesovištní	VY21	6,8	18,5	5,4
		pakůň běloocasý	DK55	2,8	12,4	2,7
			DK28	3,1	15,3	1,7
		paovce hřivnatá	DK7	6,9	4,7	6,9
		prase savanové	DK35	1,4	3,6	4,3
		přímorožec šavlorohý	DK32	9,2	13,2	9,4
			DK76	9,7	13,0	13,3
		skot charolais	DK36	2,9	11,9	9,2
		skot dahome	DK34	1,9	10,3	8,1
		voduška jelenovitá	DK85	3,3	3,9	12,3
		voduška znamenná	DK11	5,5	8,0	10,2
			DK78	8,5	11,3	11,7
			DK83	7,2	9,8	8,9
			DK84	5,7	10,8	11,6
		žirafa rothschildova	DK12	7,1	12,4	19,0
			DK74	5,4	23,3	19,3
		žirafa síťovaná	DK45	5,1	14,0	22,7
	lichokopytníci					
		nosorožec černý	DK13	6,8	8,9	18,8
			DK14	6,4	6,9	7,5
			DK15	5,6	8,1	8,5
			DK19	5,6	14,4	7,8
			DK20	4,9	9,5	13,0

			DK21	3,2	9,3	12,6
			DK53	6,9	12,8	9,6
		zebra böhmová	DK41	2,5	12,4	10,2
		zebra hartmannové	DK60	2,3	14,5	13,9
	šelmy					
		gepard štíhlý	OL1	3,0	3,1	2,8
		lev indický	DK18	0,8	5,8	3,5
		lev pustinný	PL37	1,1	4,1	2,0
		levhart mandžurský	OL4	2,6	3,3	2,7
		pes hyenový	DK17	3,0	2,5	2,9
		serval	DK64	1,3	-	-
	zajícovci					
		králík domácí	AV25	12,1	27,1	21,6
	primáti					
		člověk moudrý	HU1	3,1	4,9	1,7
			HU2	2,8	5,7	2,5
	hlodavci					
		morče domácí	AV26	2,9	3,3	1,4
ptáci	plameňáci					
		plameňák růžový	HL27	5,0	2,3	16,5
	pštrosi					
		pštros africký	DK71	-	-	28,3
			DK72	5,1	-	-
plazi	šupinatí					
		krajta tmavá	PL32	16,0	20,0	12,9
	želvy					
		želva paprscitá	PL35	21,0	31,9	21,9
	krokodýli					
		krokodýl siamský	PL45	1,5	1,0	0,0
			PL46	0,5	0,1	0,0
			PL47	0,0	0,1	0,1

Průměrné procentuální zastoupení borelií vykazujících znaky mortality ve vzorcích bylo porovnáno s hodnotami z průtokového cytometru (Tab.12).

Tab. 12: Porovnání výsledků z průtokového cytometru s pozorováním pod mikroskopem s temným polem. (Použita *B. burgdorferi* s. s.)

Označení vzorku	Druh zvířete	Průtoková cytometrie % mrtvých buněk	Darkfield mikroskop % mrtvých buněk
DK18	lev indický	0,8	5,8
DK20	nosorožec černý	4,9	46,3
HL27	plameňák růžový	5,0	50,9
DK55	pakůň běloocasý	2,8	9,0
PL49	goral horský	2,2	15,2
OL4	levhart mandžurský	2,6	13,1
VY21	ovce vřesovištní	6,8	67,8
AV25	králík domácí	12,1	93,8

Podle tabulky 12 byly vyhodnoceny výsledky z průtokového cytometru. Hodnoty 0,0 až 3,0 jsou vyhodnoceny jako séra bez boreliacidních účinků, hodnoty 3,1 až 5,0 jako séra se slabě boreliacidním účinkem, 5,1 až 10,0 jako séra se středně boreliacidním účinkem a hodnoty 10,1 a více jako silně boreliacidní séra.

### **Shrnutí výsledků:**

Mezi zástupci **sudokopytníků** byla velká variabilita ve schopnosti zabíjet různé druhy borelií prostřednictvím séra. Nedá se jednoznačně určit vzor platný pro skupinu sudokopytníků. Pouze u druhu *B. burgdorferi* s.s. byl pozorován průměrně nižší boreliacidní účinek než u dvou ostatních druhů.

Séra antilop skákavých, bahnivce horského a gazel dam vykazovala středně až silně boreliacidní účinky ke všem třem zkoumaným druhům borelií. Séra buvola kaferského a nyaly nížinné nejevila žádné známky reakcí s boreliemi. *B. burgdorferi* s.s. v séru gorala horského přežívá, naopak na *B. garinii* a *B. afzelii* má toto sérum středně boreliacidní účinek. Sérum impaly jihoafrické ničí všechny 3 druhy borelií. Sérum ovcí suffolk a vřesovištní bylo středně boreliacidní pro *B. burgdorferi* s.s. a *B. afzelii*, silně pro *B. garinii*. Pakůň běloocasý má sérum s nulově boreliacidním účinkem u *B. burgdorferi* s.s. a *B. afzelii*, pro *B. garinii* má ale silný boreliacidní účinek. Sérum paovce hřivnaté má ke všem 3 druhům střední boreliacidní účinek. Sérum prasete savanového nemělo žádný vliv na *B. burgdorferi* s.s. a slabě zabíjelo *B. garinii* a *B. afzelii*. Přímorozec šavlorohý má sérum slabě boreliacidní k *B. burgdorferi* s.s. a silně k *B. garinii* a *B. afzelii*. V sérech skotu charolais a dahome nepřežíval druh *B. garinii*, a na druh *B. afzelii* měla tato séra středně boreliacidní účinky. *B. burgdorferi* s.s. v séru skotu přežívají. borelie. Voduška jelenovitá a znamenná, žirafa rothschildova a síťovaná mají sérum se středně boreliacidním účinkem na *B. burgdorferi* s.s. a se silným boreliacidním účinkem na *B. garinii* a *B. afzelii*.

Ze skupiny **lichokopytníků** byly pozorovány boreliacidní účinky sér nosorožců a zeber. Na *B. burgdorferi* s.s. mělo sérum nosorožců středně silné boreliacidní účinky a sérum zeber, nepůsobilo žádné změny v životnosti borelií. Na *B. garinii* a *B. afzelii* měla séra zeber i nosorožců silné boreliacidní účinky.

U šesti pozorovaných zvířat z řádu **šelem** byly pozorovány velmi slabé až žádné boreliacidní účinky pro *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* i *B. garinii*.

Sérum **králíka** silně zabíjelo všechny druhy borelií. V séru **morčete** naopak všechny druhy přežívaly.

V **ptačím** séru přežíval druh *B. garinii*. Druh *B. burgdorferi* s.s. byl středně silně zabíjen a druh *B. afzelii* byl zabíjen silně.

Mezi **plazy** mělo nejvíce boreliacidní účinky sérum želvy paprscíté, ketré zabíjelo všechny 3 druhy borelií. Sérum krajty tmavé mělo téměř srovnatelné účinky, jen *B. burgdorferi* byly středně boreliacidní. V séru krokodýlů siamských přežívaly všechny 3 druhy borelií.

**Lidské** sérum nemělo na *B. burgdorferi* s.s. a *B. afzelii* žádný vliv. Na *B. garinii* mělo lidské sérum středně boreliacidní účinky. Všechny 3 pozorované boreliové druhy v lidském séru přežívaly.

Ke každému experimentu byly přidány jako kontroly mrtvých a živých buněk vzorky připravené z čisté kultury bez přísad inkubované s ostatními vzorky a z kultury zahřívané na 56°C po 30 minut pro usmrcení buněk (Tab. 13).

Tab. 13: Výsledky kontrol v experimentech. Hodnoty z průtokové cytometrie % mrtvých buněk.

	<b>Borrelia burgdorferi sensu stricto</b>	<b>Borrelia garinii</b>	<b>Borrelia afzelii</b>
mrtvé borrelie zahřátí na 56°C na 30 min	<b>47,2</b>	<b>34,4</b>	<b>49,3</b>
živé borelie	<b>3,0</b>	<b>2,2</b>	<b>2,3</b>

Inkubací sér 30 minut při 37°C s EDTA došlo ve vzorcích k inaktivaci alternativní i klasické cesty aktivace komplementu. Výsledky tohoto testu z průtokového cytometru ukazují nulový boreliacidní účinek těchto upravených sér (Tab. 14, 15). Pro ujištění správnosti výsledků byla jako druhá varianta použita metoda inaktivace těchto obou cest aktivace komplementu zahříváním 30 minut při 56°C. Při porovnání výsledků z průtokového cytometru je patrné, že obě tyto metody komplement opravdu inaktivují (Tab. 14).

Inkubací těchto sér 30 min. při 37°C s 4mM MgCl<sub>2</sub> a 10mM EGTA došlo k inaktivaci klasické cesty aktivace komplementu (Tab. 15). Výsledky tohoto testu byly srovnatelné s výsledky testu citlivosti borelií ke komplementu-CSA (Tab. 15). Na zabíjení borelií se tedy podílí alternativní cesta aktivace komplementu.

Tab. 14: Porovnání výsledků inaktivace komplementu zahříváním a přidáním EDTA z průtokového cytometru.

Označení vzorku	Inaktivace komplementu zahřátím 56°C 30 min	Inaktivace komplementu přidáním 10mM EDTA
DK22	2,8	2,1
DK93	1,1	2,5
DK5	2,4	2,8
DK80	1,0	1,8
DK66	1,5	1,0
DK62	3,0	0,6

Tab. 15: Porovnání výsledků z průtokového cytometru. (EDTA- inkubace sér 30 min. při 37°C s 10mM EDTA, CSA- výsledky z Tab. 11, Mg-EGTA- inkubace sér 30 min. při 37°C s 4mM MgCl<sub>2</sub> a 10mM EGTA)

Označení vzorku	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>			<i>Borrelia garinii</i>			<i>Borrelia afzelii</i>		
	EDTA	CSA	Mg-EGTA	EDTA	CSA	Mg-EGTA	EDTA	CSA	Mg-EGTA
DK18	0,7	0,8	1,1	1,1	5,8	5,9	1,8	3,5	4,8
DK20	2,2	4,9	8,1	2,3	9,5	10,1	3,9	13,0	14,4
DK55	2,5	2,8	3,8	1,8	12,4	15,9	2,4	2,7	3,1
PL49	3,5	2,2	3,4	3,0	10,7	13,7	2,9	9,2	10,1
OL4	2,2	2,6	3,6	3,1	3,3	8,4	2,7	2,7	6,1
VY21	3,9	6,8	7,2	2,9	18,5	12,3	1,6	5,4	6,3
HL27	2,1	5,0	4,8	1,5	2,3	1,6	2,8	16,5	14,6
AV25	1,5	12,1	12,5	2,5	27,1	21,1	1,1	21,6	11,0
AV26	3,1	2,9	3,3	2,3	3,3	3,4	1,5	1,4	2,9



## 5. DISKUSE

Rozložení positivity zvířat na boreliové protilátky je velmi různorodé. Ve vzorcích ze Zooparku Vyškov na Jižní Moravě bylo zjištěno 90,5% zvířat pozitivních na boreliové protilátky. Toto vysoké číslo může být dáno buď vysokým výskytem klíšťat infikovaných boreliemi nebo druhy, na kterých byly testy provedeny. Jsou to 4 zástupci koz, 5 ovcí a 11 druhů z čeledi **koňovitých**. Ze 14 zvířat z čeledi koňovitých ze Zoo ve Dvoře Králové nad Labem na severovýchodě Čech byly pouze 2 negativní na boreliové protilátky, a to 2 zebry narozené v letech 2011 a 2012. Sérum těchto 2 **zeber** při testu citlivosti borelií ke komplementu vykazovalo boreliacidní účinky na druhy *B. garinii* a *B. afzelii*. Druh *B. burgdorferi* s.s. v koňském séru přežívá. Tento fakt dělá z čeledi koňovitých druhů rezervoárové hostitele pro druh *B. burgdorferi* s.s. Toto zjištění odpovídá výsledkům Kurtenbachovy práce, který prokázal, že koňské sérum má boreliacidní účinky na druhy *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. afzelii* a *B. japonica* (Kurtenbach et al., 1998). Zebry použité v testu byly mladé a pravděpodobně ještě nepřišly do kontaktu s infikovaným klíštětem.

Všech 5 druhů získaných **kozích** sér bylo na protilátky pozitivní. Z toho 1 pocházel ze Zoo Dvůr Králové nad Labem a 4 ze Zooparku Vyškov. Ve studii z roku 1996 Ciceroni uvádí, že poměr sér s výskytem boreliových protilátek ke všem zkoumaným kozím sérum-133 (seroprevalence) byl 36,8%. Ve stejné studii byla zkoumána seroprevalence ovčích sér a bylo zjištěno 14,1% pozitivních sér z 269 zkoumaných (Ciceroni et al., 1996). **Ovčí** séra ze Zooparku Vyškov vykazovala v testu citlivosti středně boreliacidní účinky k druhům *B. burgdorferi* s.s a *B. afzelii*. K *B. garinii* bylo ovčí sérum silně boreliacidní, stejně jako bylo zjištěno v Kurtenbachově studii (Kurtenbach et al., 1998). Ve studii z roku 1997 byla také zjištěna větší seroprevalence u kozích sér (5%) než u ovčích (0%) a psích (0%) (Ciceroni et al., 1997). Druhy koz jsou v průměru častěji nakaženy než druhy ovcí, proto jsou pravděpodobnějšími rezervoárovými hostiteli borelií.

Séra **šelem**, která byla testovaná zahrnovala 5 vzorků z čeledi kočkovitých a 1 sérum z čeledi hyenovitých. Žádné z těchto sér nebylo schopno účinně zabít borelie z druhu *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* ani *B. afzelii*. Resistence těchto druhů borelií v séru kočkovitých šelem je ve shodě se zjištěním, ke kterému došli v roce 2005 Bhide a kolektiv. Naše měření potvrzuje jejich hypotézu, že domestikovaná zvířata z čeledi kočkovitých šelem hrají roli v koloběhu těchto spirochét mezi hostiteli a přenašeči (Bhide et al., 2005). Lze tvrdit, že tyto druhy jsou rezervoárovými hostiteli pro druhy *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* a *B. afzelii* v přírodě.

U získaných sér z čeledi **psovitých** šelem nebyly provedeny testy na citlivost borelií ke komplementu, protože všechna 4 získaná séra (3x vlk obecný, 1x šakal čabrakový) byla pozitivní na boreliové protilátky. Borelie *B. afzelii* a *B. burgdorferi* s.s. *B. garinii* v sérech psovitých šelem přežívají s mírnými ztrátami a tak psovité šelmy představují rezervoárové hostitele pro tyto druhy (Bhide et al., 2005; Hovius et al., 2000).

U sér **nosorožců** černých byla pozorována střední boreliacidní aktivita k druhu *B. burgdorferi* s.s. a silná k *B. garinii* a *B. afzelii*. Všech 7 získaných sér nosorožců bylo na boreliové protilátky negativní i přesto, že jejich věk byl 3, 4, 7, 11, 34 a dokonce i 36 let. Hypotéza že tato negativita mohla být způsobena jejich tvrdou kůží, kterou klíště *Ixodes ricinus* vyskytující se v Evropě neprokousne, ale nemůže být pravdivá, protože v roce 2003 byl publikován výsledek studie seroepidemiologie lymeské boreliózy v zoologických zahradách v Německu. Tato studie ukazuje že v Německu, ze 3 testovaných nosorožců bílých byli 2 pozitivní na boreliové protilátky (Stoebel et al., 2003).

Séra **krokodýlů** siamských měla nulové boreliacidální účinky pro všechny 3 zkoumané druhy borelií. Vliv séra tohoto zvířecího druhu na spirochéty rodu *Borrelia* ještě nebylo testováno ([www.aseanbiodiversity.info](http://www.aseanbiodiversity.info)).

Mezi komplementovým systémem **savců** a ektotermních živočichů, kam patří **plazi** je výrazný rozdíl (Koppenheffer, 1987). Sérum želvy paprscité, která patří do skupiny plazi vykazovalo silné boreliacidní účinky na všechny 3 zkoumané druhy borelií. Podobně jako sérum **krajty** tmavé, které bylo také boreliacidní pro všechny 3 druhy borelií. Sérum ještěrky druhu *Sceloporus occidentalis* je boreliacidní pro druh *B. burgdorferi* s.s. stejně jako aligátorec sanmartinský (*Elgaria multicarinata*). Oba tyto živočichové jsou řazeni do řádu šupinatí (Kuo et al., 2000).

Odlišnost ve výsledcích uvnitř třídy **plazi** může být dána další odlišností komplementových systémů mezi jednotlivými řády šupinatí, krokodýli a želvy. Žádná taková data ale zatím publikována nebyla.

Námi potvrzená rezistence *B. garinii* k séru **ptáků**, je v souladu s tvrzením, že *B. garinii* je spojena především s ptačími hostiteli. Hodně publikovaných prací popisují izolace *B. garinii* z klíšťat sebraných z mořských ptáků, kosů a bažantů. Tak, například, zjišťování prevalence různých druhů borelie v klíšťatech *I. ricinus* na stěhovavých ptácích v jižním Norsku ukázalo, že nejvíce převládajícím druhem byla *B. garinii*, a to v 77.8% (Kjelland et al., 2010). Zjištění, že ptačí sérum má schopnost eliminovat *B. afzelii*, dělá ze skupiny ptáků inkompetentní rezervoárové hostitele tohoto druhu borelií.

Sérum **králíka** mělo silný boreliacidní účinek na všechny druhy borelií, což stoprocentně odpovídá výsledkům Kurtenbacha, který testoval sérum zajíce (Kurtenbach et al., 1997). V séru **morčete** naopak podle našich výsledků všechny druhy přežívaly, jen na *B. garinii* se projevily velmi slabé boreliacidní účinky. Výsledkem Kurtenbacha pro sérum **křečka** byly stoprocentně boreliacidní účinky na *B. burgdorferi* s.s. a *B. afzelii*, i když *B. garinii* podle jeho dat se komplementem křečka zabijí (Kurtenbach et al., 1977).

Největší množství zkoumaných sér bylo ze skupiny **sudokopytníků**. I tady naše výsledky potvrzují již existující data o významu sudokopytníků jako rezervoárových hostitelů spirochét komplexu *B. burgdorferi* s.l. v přírodě. Podle Kurtenbacha měly silně boreliacidní účinky zkoumané krávy, jeleni a skot ke třem druhům borelií. Podle našich výsledků většina sér velkých sudokopytníků ničí úplně nebo má silně boreliacidní účinky ke všem třem zkoumaným druhům borelií, jako například u antilop skákavých, impaly jihoafrické, bahnivce horského a gazel dam. Sérum paovce hřivnaté má ke všem 3 druhům střední boreliacidní účinek a v sérech skotu charolais a dahome byly *B. garinii* silně hubeny a *B. afzelii* středně silně hubeny i když *B. burgdorferi* s.s. přežívala.

Existují studie, které ukazují na rozdílnou citlivost *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* a *B. afzelii* (Van Dam et al., 1997; Kurtenbach et al., 1997). Tyto výsledky souhlasí s výsledky této práce a společně tak vysvětlují různou patogenitu a klinické projevy lymeské boreliózy vyvolané různými druhy borelie. Určení dalších rezistentních druhů borelie, hlavně těch, které patří mezi takzvané potenciálně patogenní, jako například *B. bissettii* nebo *B. valaisiana*, ke komplementu člověka, by přineslo cennou informaci ohledně pravděpodobnosti jejich patogenního charakteru.

Pomocí postupné inaktivace klasické i alternativní cesty aktivace komplementu bylo prokázáno, že zabíjení borelií je zprostředkováno alternativní cestou aktivace komplementu. Naše výsledky a ostatní studie potvrzují, že různé druhy borelií se liší v jejich schopnosti aktivovat alternativní cestu aktivace komplementu (Kraiczy et al., 2002; Van Dam et al., 1997; Brade et al., 1992). To je zároveň způsob, kterým „rezistentní“ borelie odolávají zabíjení boreliacidní aktivitou komplementu (Bhide et al., 2005). Je nezbytné studovat molekulární podstatu tohoto jevu u zvířat a člověka. Ačkoli jsou k dispozici některé publikace o člověku, studie na různých zvířatech stále chybí. Z tohoto hlediska je naše práce velmi důležitá. Žádná práce tohoto druhu s použitím sér exotických druhů zvířat nebyla dosud publikována.

Naše práce prokazuje zajímavý fakt, že výsledky zjištěné u těchto exotických zvířat se shodují s výsledky prokázanými u zvířat typických pro střední Evropu, podle rozdělení do

skupin. Výsledky této práce ukazují, že citlivost různých druhů spirochét komplexu *B. burgdorferi* s.l. ke komplementu obratlovců je pravděpodobně základní podmínkou pro určení rezervoárových hostitelů mezi domestikovanými zvířaty i zvířaty v přírodě. Interakce mezi spirochétou a komplementem hostitele, která se odehrává přímo v klíštěti při sání krve zničením citlivých spirochét v žaludku klíštěte ještě před přenosem na dalšího hostitele, hraje zásadní roli v dynamice globálního přenosu borelií. Spektrum hostitelů spirochét je určeno citlivostí borelií ke komplementu určeného druhu obratlovců a distribuce těchto rezervoárových hostitelů hraje zásadní roli v ekologii spirochét v České Republice, Evropě i v globálním měřítku.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- Alban, P.S., Johnson, P.W., Nelson, D.R. (2000): Serum-starvation-induced changes in protein synthesis and morphology of *Borrelia burgdorferi*; *Microbiology*, 146, 119-127
- Amore, G., Tomassone, L., Grego, E., Ragagli, C., Bertolotti, L., Nebbia, P., Rosati, S., Mannelli, A. (2007): *Borrelia lusitaniae* in immature *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) feeding on common wall lizards in Tuscany, central Italy; *J. Med. Entomol.*, 44, 303-307
- 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
- Barbour, A.G., Hayes, S.F. (1986): Biology of *Borrelia* species; *Microbiol. Rev.* 50, 381-400
- Bartůněk, P., Bojar M., Calda P., Diblík P., Hančil J., Herzogová J., Hoza J., Hulínská D., Janovská D., Pícha D., Valešová M. *Lymeská borrelióza*. 2. vyd. Praha: Grada Publishing, spol. s.r.o. (2001). 96 s. ISBN 80-7169-686-2
- Bhide, M.R., Travnicek, M., Levkutova, M., Curlik, J., Revajova, V., Levkut, M. (2005): Sensitivity of *Borrelia* genospecies to serum complement from different animals and human: a host-pathogen relationship; *Imun. Med. Microbiol.*, 43, 165-172
- Brade, V., Kleber, I., Acker, G. (1992): Differences of two *Borrelia burgdorferi* strains in complement activation and serum resistance; *Immunobiol.*, 185, 453-465
- Brisson, D., Zhou, W., Jutras, B.L., Casjens, S., Stevenson, B. (2013): Distribution of cp32 prophages among Lyme disease-causing spirochetes and natural diversity of their lipoprotein-encoding *erp* loci; *Appl. Environ. Microbiol.*, 79, 4115-4128
- Brorson, O., Brorson, S.H. (1997): Transformation of cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to normal, mobile spirochetes; *Infection.*, 25, 240-246

Buchwald, A. (1883): Ein fall von diffuser idiopatischer Haut-Atrophie. Arch. Dermatol. Syph.; Berlin, 15, 553-556

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

Casjens, S.R., Palmer, N., van Vugt, R., Huang, W.M., Stevenson, B., Rosa, P., Lathigra, R., Sutton, G., Peterson, J., Dodson, R.J., Haft, D., Jockey, E., Gwinn, M., White, O., Fraser, C. M. (2000): A bacterial genom in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*; Mol. Microbiol. 35, 490-516

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

Ciceroni, L., Simeoni, J., Pacetti, A., Ciarrocchi, S., Cacciapuoti, B. (1996): Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in sheep and goats. Alto Adige-South Tyrol, Italy; New. Microbiol., 19, 171-174.

Ciceroni, L., Bartoloni, A., Ciarrocchi, S., Pinto, A., Guglielmetti, P., Valdez, Vasquez, C., Gamboa, Barahona, H., Roselli, M., Paradisi, F. (1997): Serologic survey for antibodies to *Borrelia burgdorferi* in sheep, goats and dogs in Cordillera Province, Bolivia; Zentralbl. Veterinarmed B., 44, 133-137

Comstedt, P., Bergström, S., Olsen, B., Garpmo, U., Marjavaara, L., Mejlom, H., Barbour, A.G., Bunikis, J. (2006): Migratory passerine birds as reservoirs of Lyme borreliosis in Europe; *Emerg. Infect. Dis.*, 12, 1087-1095

Damaerschallck, 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. Microbio.*, 33, 602-608

Dedráková, M., Lenčáková, D. (2005): Association of genetic variability within the *Borrelia burgdorferi* sensu lato with the ecology, epidemiology of Lyme borreliosis in Europe; *Ann. Agric. Environ. Med.*, 12, 165-172

Dsouli, N., Younsi-Kabachii, H., Postic, D., Nouira, S., Gern, L., Bouattour, A. (2006): Reservoir role of lizard *Psammotomus algirus* in transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Spirochaetaceae) in Tunisia; *J. Med. Entomol.*, 43, 737-742

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., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J.F., Fleischmann, R.D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A.R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M.D., Gocayne, J., Weidman, J., Utterback, T., Wathney, L., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Garland, S., Fuji, C., Cotton, M.D., Horst, K., Roberts, K., Hatch, B., Smith, H.O., Venter, J.C. (1997): Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*; *Nature* 390, 580-586.

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

Ge, Y., Li, Ch., Corum, L., Slaughter, C.A., Charon, N.W. (1998): Structure and expression of the FlaA periplasmic flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*; *J. Bacteriol.* 180, 2418-2425

Gern, L. (2009): Life cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and transmission to humans; *Curr Probl Dermatol.*, 37, 18-30

Goldstein, S.F., Buttle, K.F., Charon, N.W. (1996): Structural analysis of the Leptospiraceae and *Borrelia burgdorferi* by high-voltage electron microscopy; *J. Bacteriol.*22, 6539-6545

Gruntar, I., Malovrh, T., Murgia, R., Cinco, M. (2001): Conversion of *Borrelia garinii* cystic forms to motile spirochetes in vivo; *APMIS*, 109, 383-388

Hořejší, V., Bartůňková, J. *Základy imunologie*. 3. vyd. Praha: Triton s.r.o. (2005). 279 s. ISBN 80-7254-686-4

Hovius, J.W., Hovius, K.E., Oei, A., Houwers, D.J., Van Dam, A.P. (2000): Antibodies against specific proteins of and immobilizing activity against three strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato can be found in symptomatic but not in infected asymptomatic dogs; *J. Clin. Microbiol.*, 38, 2611-2621

Humair, P.F., Gern, L. (1998): Relationship between *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. *Acta Trop.*, 69, 213- 227

Humair, P.F. (2002): Birds and *Borrelia*; *Int. J. Med. Microbiol.*, 291, 70-74

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. (2013): *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

Jewett, M.W., Lawrence, K., Bestor, A.C., Tilly, K., Grimm, D., Shaw, P., VanRaden, M., Gherardini, F., Rosa, P.A. (2007): The critical role of the linear plasmid lp36 in the infectious cycle of *Borrelia burgdorferi*; *Mol. Microbiol.* 64, 1358-1374

Karami, A. *Lyme Disease*. Karami, A. (Ed.), InTech. (2012). ISBN 978-953-51-0057-7



- 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
- Kjelland, V., Stuen, S., Skarpaas, T., Slettan, A. (2010): *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected from migratory birds in Southern Norway; *Acta. Vet. Scand.*, 52, 59
- Koppenheffer, L.T. (1987): Serum complement systems of ectothermic vertebrates; *Develop. Comparat. Immunol.*, 11, 279-286
- Kraiczy, P., Skerka, C., Kirschfink, M., Zipfel, P.F., Brade, V. (2002): Immune evasion of *Borrelia burgdorferi*: insufficient killing of the pathogens by complement and antibody; *Int. J. Med. Microbiol.*, 291, 141–146
- Kuo, M.M., Lane, S.R., Giclas, P.C. (2000): A comparative study of mammalian and reptilian alternative pathway of complement-mediated killing of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*); *J. Parasit.*, 6, 1223-1228
- Kurtenbach, K., Sewell, H.S., Ogden, N.H., Randolph, S.E. and Nuttall, 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
- Lawrenz, M.B., Wooten, R.M., Norris, S.J. (2004): Effects of *vlsE* complementation on the infectivity of *Borrelia burgdorferi* lacking the linear plasmid *lp28-1*; *Infect. Immun.* 72, 6577-6585
- 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

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., Vollmer, S.A., Ogden, N.H. Fish, D. (2011): Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato; *Infect. Genet. Evol.*, 11, 1545-1563

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

Motaleb, M. A., Corum, L., Bono, J. L., Elias, A. F., Rosa, P., Samuels, D. S., Charon, N. W. (2000): *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 10899-10904

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

Nau, R., Christen, H.J., Eiffert, H. (2009): Lyme disease – current state of knowledge; *Dtsch. Arztebl. Int.*, 106, 72-82

- Parola, P., Raoult, D. (2001): Ticks and tick-borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat; *Clin. Infect. Dis.*, 32, 897–928
- Porcella, S.F., Schwann, T.G. (2001): *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum*: a comparison of functional genomics, environmental adaptations, and pathogenic mechanisms; *J. Clin. Invest.* 107, 651-656
- Postic, D., Ras, N.M., Lane, R.S., Hendson, M., Baranton, G. (1998): Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127); *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
- Poupon, M.A., Lommano, E., Humair, P.F., Douet, V., Rais, O., Schaad, M., Jenni, L., Gern, L. (2006): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland; *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 976-979
- Purser, J.E., Lawrenz, M.B., Caimano, M.J., Howell, J.K., Radolf, J.D., Norris, S.J. (2003): A plasmid-encoded nicotinamidase (PncA) is essential for infectivity of *Borrelia burgdorferi* in a mammalian host; *Mol. Microbiol.*, 48, 753-764
- Richter, D., Postic, D., Sertour, N., Livey, I., Matushka, 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
- Richter, D., Matuschka, F.R. (2006): Perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia lusitaniae* by lizards; *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 4627-4632
- Rosa, P.A., Tilly, K., Stewart, P.E. (2005): The burgeoning molecular genetics of Lyme disease spirochaete; *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 129-143

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., 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

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

Schwan, T.G., Burgdorfer, W. (1987): Antigenic changes of *Borrelia burgdorferi* as a result of in vitro cultivation; J. Infect. Dis.,156, 852-853

Steere, A.C. (1989): Lyme disease; N. Engl. J. Med., 321, 586-596

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

Stoebel, k., Schoenberg, A., Streich, J.W. (2003): The seroepidemiology of Lyme borreliosis in zoo animals in Germany; Epidemiol. Infect., 131, 975-983

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., Oei, A., Jaspars, R., Fijen, C., Wilske, B., Spanjaard, L., Dankert, J. (1997): Complement-mediated serum sensitivity among spirochetes that cause Lyme disease; Infect. Immun., 65:1228–1236.

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

Wolgemuth, C.W., Charon, N.W. , Goldstein, S.F., Goldstein, R.E. (2006): The flagellar cytoskeleton of the spirochetes; *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 11, 221-227

### **Internetové zdroje:**

EU2009.CZ. Česká Republika [online]. © 2013 [cit. 2013-8-11]. Dostupné z: <http://www.eu2009.cz/cz/czech-republic/ceska-republika-376/>

Electron Microscopy Sciences. Petroff-Hausser Counting Chamber [online]. © 2013 [cit. 2013-9-12]. Dostupné z: <http://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/63512-20.aspx>

Karl MC Manus Foundation. What is Lyme Disease? [online]. © 2013 [cit. 2013-8-12]. Dostupné z: <http://www.karlmcm Manusfoundation.org.au/lyme-information/what-is-lyme-disease>

Complement Activity of Thai Freshwater Crocodile (*Crocodylus siamensis*) Serum [online]. © 2013 [cit. 2013-12-10]. Dostupné z: <http://www.aseanbiodiversity.info/Abstract/53004924.pdf>

## 8. PŘÍLOHY

Příloha 1: text článku

### Ticks and Tick-borne Pathogens - Short Communication

#### Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and tick-borne encephalitis virus in zoo animal species in the Czech Republic.

Jana Širmarová,<sup>1</sup> Lucie Tichá,<sup>2</sup> Marina Golovchenko,<sup>3</sup> Jiří Salát,<sup>1,3</sup> Nataliia Rudenko,<sup>3</sup> Libor Grubhoffer, Norbert Nowotny,<sup>4,5</sup> and Daniel Růžek<sup>1,2,3\*</sup>

(1) Department of Virology, Veterinary Research Institute, Hudcova 70, CZ-62100 Brno, Czech Republic

(2) Faculty of Science, University of South Bohemia, Branišovská 31, CZ-37005 České Budějovice, Czech Republic

(3) Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, Branišovská 31, CZ-37005 České Budějovice, Czech Republic

(4) Department of Pathobiology, University of Veterinary Medicine, Veterinärplatz 1, A-1210 Vienna, Austria

(5) Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine and Health Sciences, Sultan Qaboos University, Muscat, Oman

\*Author for correspondence:

Daniel Růžek, Department of Virology, Veterinary Research Institute, CZ-62100 Brno, Czech Republic

E-mail: ruzekd@paru.cas.cz

phone: +420-38-777-5451

fax: +420-38-531-0388

**Key words:** tick-borne encephalitis virus; *Borrelia burgdorferi* sensu lato; Lyme disease; seroprevalence; zoo animals

#### Abstract

This study was conducted to evaluate the prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* (Bb) s.l. and tick-borne encephalitis virus (TBEV) in zoo animals in the Czech Republic. We collected 133 serum samples from 69 animal species from 5 zoos located in different parts of the country. The samples were obtained from even-toed ungulates (n=78; 42 species), toed ungulates (n=32; 11 species), carnivores (n=13; 9 species), primates (n=2, 2 species), birds (n=3; 2 species), and reptiles (n=5; 3 species). A high antibody prevalence of 60 % (n=80) was observed for Bb s.l. On the other hand, only two animals exhibited TBEV-specific antibodies, i.e. markhor (*Capra falconeri*) and reindeer (*Rangifer tarandus*), both from the same zoo, located in an area endemic for TBEV. Both of these animals were also positive for Bb s.l. antibodies. Our results indicate that a high number of animal species in Czech zoos were exposed to Bb s.l., and TBEV infection occurred at least in one of the investigated zoos. Considering the pathogenic potential of these two tick-borne microorganisms, clinical and serological monitoring should be continued, and therapeutic and preventive measures, respectively, should be taken when necessary.

## Introduction

Tick-borne diseases are frequent and widespread in the Czech Republic (Süss, 2011). Despite the medical importance of tick-borne zoonotic pathogens, very few reports have been published on the prevalence of such infections in zoo animals. In 2007, a severe tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection was observed in a monkey (*Macaca sylvanus*) kept in an outdoor enclosure of a monkey park in a TBEV-endemic area in Germany. The monkey developed staggering paresis of the hind legs, incoordination, and intermittent opisthotonos (Süss et al., 2007). A subsequent serological survey demonstrated that 2.6% of monkeys and 9% of sheep grazing on nearby meadows were seropositive for TBEV (Klaus et al., 2010). Clinically manifest tick-borne encephalitis (TBE) has been predominantly reported in humans, occasionally in dogs, and rarely in horses and monkeys (Süss et al., 2007). For continuous circulation of TBEV in natural foci, the maintenance hosts (small rodents and insectivores) are of primary importance. However, for the evaluation of natural foci, also accidental hosts and indicator animals are important. TBEV infection in indicator animals does not result in a significant level of viremia but it induces an immunological response. Thus, a serological survey on indicator animals may be used as a diagnostic tool to identify natural foci of infection (Grešíková, 1972).

Despite the increasing importance of TBE and Lyme disease (LD) in humans and certain species of pet animals, there is only very limited information available on these infections in wildlife and in - mostly exotic - animal species kept in zoos (Stoebel et al., 2003; Klaus et al., 2010). The aim of this study was therefore to investigate the seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* (Bb) s.l. and TBEV in zoo animals in the Czech Republic with the purpose of identifying potential Bb s.l. or TBEV active foci in zoological gardens and determining potential risk of exposure of exotic animals to these important tick-borne pathogens.

## Methods

Serum samples were collected in 2013 in five zoos located in different regions of the Czech Republic, i.e. ZOO Dvůr Králové nad Labem, ZOO Olomouc, Zoopark Vyškov, ZOO Hluboká nad Vltavou, and ZOO and Botanical Garden Plzeň (Fig. 1). The blood samples had been taken for different medical reasons, not for the purpose of this study, strictly observing zoo and animal ethics regulations. The majority of the animals have been hosted in open fenced areas, close to natural surroundings. In these areas tick populations have been well established since long time, and Bb s.l. and TBEV have been endemic in these areas at variable degrees. Blood samples were centrifuged at 2,500 x g for 10-15 minutes, and the sera were collected and stored at -20°C and subsequently at -80°C until analyses.

The presence of antibodies against Bb s.l. was investigated by the LYMETOP+Vet test (Promevet, Italy), which detects IgG antibodies against Bb sensu stricto, *B. garinii* and *B. afzelii*, according to the manufacturer's instructions. The IMMUNOZYM FSME IgG all-species kit (Progen GmbH) was used for the detection of TBEV antibodies. Samples exhibiting less than 63 Vienna Units (VIEU)/ml were considered negative, 63-126 VIEU/ml borderline, and more than 126 VIEU/ml positive. The borderline and positive samples were subsequently retested by the 'gold-standard' plaque reduction neutralization test (PRNT) as described by Bárdoš et al. (1983) with slight modifications: sera (including positive and negative controls) were diluted 1:4 in Leibowitz L-15 medium (Sigma-Aldrich, Germany) supplemented with 1% antibiotics (penicillin, streptomycin, amphotericin B; Sigma-Aldrich, German) and 3% fetal bovine serum. After heat inactivation of the sera at 56°C for 30 min, two-fold serial dilutions of the samples in L-15 medium were incubated with  $10^3$  pfu of TBEV strain Hypr (the virus dose was adjusted to cause almost confluent plaques with 90-95% cytolysis) for 90 min at 37°C.  $5 \times 10^4$  porcine kidney stable (PS) cells were added to each well. After 4 days of incubation, the cell supernatant was removed and cells were

fixed and stained as described previously (De Madrid and Porterfield, 1969). The highest serum dilution that caused a 90% reduction of plaques was regarded the endpoint titre.

### Results and Discussion

Infectious diseases can seriously disrupt efforts to preserve endangered animal species (Stoebel et al., 2003). Information on incidence, distribution and risk of diseases in captive populations is often limited (Stoebel et al., 2003). Here, we present the first epidemiological study on Bb s.l. and TBEV exposure of zoo animals in endemic areas in the Czech Republic, and assess the distribution of Bb s.l. and TBEV infections in Czech zoos and wildlife parks. In the present study, 60% (n=80) of all samples tested positive for antibodies against Bb s.l. These included even-toed ungulates (n=48; 28 species), toed ungulates (n=23; 10 species), carnivores (n=7; 4 species), primates (n=1; 1 species), and birds (n=1; 1 species). All investigated reptiles (n=5; 3 species) were negative (Table 1).

A serological survey carried out in zoo animals in St. Louis represented the first study evaluating the exposure of a broad range of zoo animals in different age classes to Bb s.l. (Feir et al., 1993). In German zoos and wildlife parks, 10.4% of animals were seropositive for Bb s.l. and 11.3% reacted borderline. The percentage of seropositive individuals was related to species and origin (zoo), and increased with age of the animals. Sex and season did not affect the seroprevalence (Stoebel et al., 2003). Ticks are ectoparasites of most types of terrestrial and arboreal vertebrates, respectively. In Europe, LD endemic areas are maintained through complex interactions between tick vectors, a variety of spirochetes belonging to the Bb s.l. complex, and a large number of vertebrate hosts. While some tick species show a host-specificity or host-preference for blood feeding (*Ixodes hexagonus* feeds mainly on carnivores, while *I. uriae* is associated with seabirds (Gern et al., 1997; Olsen et al., 1993), *I. ricinus*, the main tick vector for Bb in Europe, is considered to be a generalist in feeding. It feeds on numerous mammalian, avian and reptilian host species in the European woodlands, thereby supporting natural transmission of *Borrelia*. This generalist's feeding habit of *I. ricinus* contributes significantly to the persistence of spirochetes within endemic areas. Recently, Gern (2008) showed that more than 240 vertebrate species are important in the maintenance of the European populations of *I. ricinus*. Today, the reservoir role of small rodents and various species of birds, especially ground-nesting, ground-foraging and migratory birds, for the circulation of *Borrelia* in nature has been unanimously accepted. Nevertheless, little information is available on the significance of most animal hosts as sources for infecting *I. ricinus* with B.b. s.l. and TBEV, respectively. Tick xenodiagnosis is the only way to really demonstrate the infectivity of a vertebrate species. However, xenodiagnosis is a very fastidious method, as hosts have to be captured, maintained in captivity, and pathogen-free laboratory colonies of ticks must be available. While small and medium-sized animals like hares, hedgehogs or squirrels might contribute to Bb s.l. infection of ticks (Gern et al., 1997; Humair, 2002), the role of large mammals like ungulates in infecting ticks with Bb s.l. was denied. Large vertebrates such as deer are neither considered susceptible to Bb s.l. infection (Telford et al., 1988, Margos et al., 2011) nor serving as reservoir hosts for Bb s.l. When leaving a possible transmission by co-feeding apart, large mammals are often a dead end for Bb s.l. and thus irrelevant for the pathogen's maintenance, although their role as hosts for ticks, particularly adult ticks, might be rather significant (Gern, 2008).

ELISA and Western Blot are the most commonly used tests for the diagnosis of Bb antibodies. However, the detection of antibodies against Bb does not necessarily confirm the presence of active spirochete infection in the vertebrate; it might just reflect the immune response to the germ. Even the detection of spirochete DNA in the host by PCR does not allow conclusions whether a specific animal species is a competent reservoir host for Bb, and whether the bacteria are alive or viable.

DNA fragments from dead bacteria can be detected many months after the pathogen was killed by the host complement (Kurtenbach et al., 2002).



However, the detection of antibodies against Bb s.l. in 60% of the samples confirms that zoo-housed animals (local and exotic species) have been exposed to tick bites and Bb s.l. similarly to free-ranging wild vertebrates. The reservoir competence for Bb s.l. of each zoo-housed animal species needs to be analyzed individually and will be subject of a separate study. Hardly any study focused on the TBEV seroprevalence in zoo animals. In Germany, 2.6% of monkeys kept in an outdoor enclosure of a monkey park and 9% of sheep grazing on nearby meadows were seropositive for TBEV (Klaus et al., 2010). In our study, only two individuals showed TBEV-specific antibodies: one markhor (*Capra falconeri*) and one reindeer (*Rangifer tarandus*). Both animals were kept in the same zoo (ZOO Olomouc, no. 4 in Fig. 1), located in a TBEV-endemic area. Since two other samples reacted borderline in the TBEV antibody ELISA, it was important that all samples prescreened by ELISA were retested by the neutralization assay (PRNT) as “gold standard test” to exclude false-positive results (Klaus et al., 2010; Rushton et al., 2013). The neutralization assay confirmed the presence of anti-TBEV antibodies only in the two samples (Table 1). No TBEV-associated clinical signs have been observed in these two animals. It is well-known that several species of ruminants are susceptible to TBEV infection, however TBEV-associated central nervous system disease in ruminants is rare (e.g., Bagó et al., 2002). Both animals were also positive for antibodies to Bb s.l. The seroprevalence rates for TBEV and Bb s.l. in zoo animals add further information to the ecoepidemiological status in this unique environment, where a large variety of exotic animal species are living in close proximity. Preventive measures should aim to minimise tick infestation of zoo animals. The risk of infection can further be reduced by avoiding habitats with high tick density, such as wooded areas with scrub and dense vegetation (Stoebel et al., 2003). However, visitors of zoos are not at higher risk of exposure to tick-borne pathogens than outside the zoo.

#### **Acknowledgements**

We thank Prof. Jan Kopecký for general support of the study. We acknowledge financial support by the Czech Science Foundation project no. P502/11/2116, and grant Z60220518 from the Academy of Sciences of the Czech Republic, and the Admire Vet project no. CZ.1.05./2.1.00/01.006 (ED006/01/01).

#### **References:**

- Bagó, Z., Bauder, B., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Weissenböck, H., 2002. Tickborne encephalitis in a mouflon (*Ovis ammon musimon*). *Vet Rec.* 150(7),218-220.
- Bárdoš, V., Sixl, W., Wisidagama, C.L., Halouzka, J., Stünzner, D., Hubálek, Z., Withalm, H., 1983. Prevalence of arbovirus antibodies in sera of animals in Sri Lanka. *Bull. World Health Organ.* 61, 987-990.
- De Madrid, A.T., Porterfield, J.S., 1969. A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bull. World Health Organ.* 40, 113-121.
- Gern, L., Rouvinez, E., Toutoungi, L.N., Godfroid, E., 1997. Transmission cycles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato involving *Ixodes ricinus* and/or *I. hexagonus* ticks and the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*, in suburban and urban areas in Switzerland. *Folia Parasitol.* 44, 309-314.
- Gern, L., 2008. *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the agent of lyme borreliosis: life in the wilds. *Parasite.* 15, 244-247.
- Grešíková, M. 1972. Studies on tick-borne arboviruses isolated in central Europe. *Biological Works XVIII/2*, 111 pp.

Humair, P.F., 2002. Birds and *Borrelia*. Int. J. Med. Microbiol. 291, 70-74.

Klaus, C., Hoffmann, B., Beer, M., Müller, W., Stark, B., Bader, W., Stiasny, K., Heinz, F.X., Süss, J., 2010. Seroprevalence of tick-borne encephalitis (TBE) in naturally exposed monkeys (*Macaca sylvanus*) and sheep and prevalence of TBE virus in ticks in a TBE endemic area in Germany. Ticks Tick-Borne Dis. 1, 141-144.

Kurtenbach, K., De Michelis, S., Etti, S., Schäfer, S.M., Sewell, H.S., Brade, V., Kraiczy, P., 2002. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-the key role of host complement. Trends Microbiol. 10, 74-79.

Feir, D., Lau, C., Junge, R., 1993. Protein A and protein G in the diagnosis of diseases in zoo animals. Transactions of the Missouri Academy of Science 27, 9-14.

Margos, G., Vollmer, S.A., Ogden, N.H., Fish, D., 2011. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Infect. Genet. Evol. 11, 1545-1563.

Olsen, B., Jaenson, T.G., Noppa, L., Bunikis, J., Bergström, S., 1993. A Lyme borreliosis cycle in seabirds and *Ixodes uriae* ticks. Nature. 362, 340-342.

Rushton, J.O., Lecollinet, S., Hubálek, Z., Svobodová, P., Lussy, H., Nowotny, N., 2013. Tick-borne encephalitis virus in horses, Austria, 2011. Emerg Infect Dis. 19(4), 635-637.

Stoebel, K., Schoenberg, A., Streich, W.J., 2003. The seroepidemiology of Lyme borreliosis in zoo animals in Germany. Epidemiology and Infection. 131, 975-983. Epidemiol. Infect. 131, 975-983.

Süss, J., 2011. Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-an overview. Ticks Tick Borne Dis. 2(1), 2-15.

Süss, J., Gelpi, E., Klaus, C., Bagon, A., Liebler-Tenorio, E.M., Budka, H., Stark, B., Müller, W., Hotzel, H., 2007. Tickborne encephalitis in naturally exposed monkey (*Macaca sylvanus*). Emerg. Infect. Dis. 13, 905-907.

Telford, S.R. 3rd, Mather, T.N., Moore, S.I., Wilson, M.L., Spielman, A., 1988. Incompetence of deer as reservoirs of the Lyme disease spirochete. Am. J. Trop. Med. Hyg. 39, 105-109.

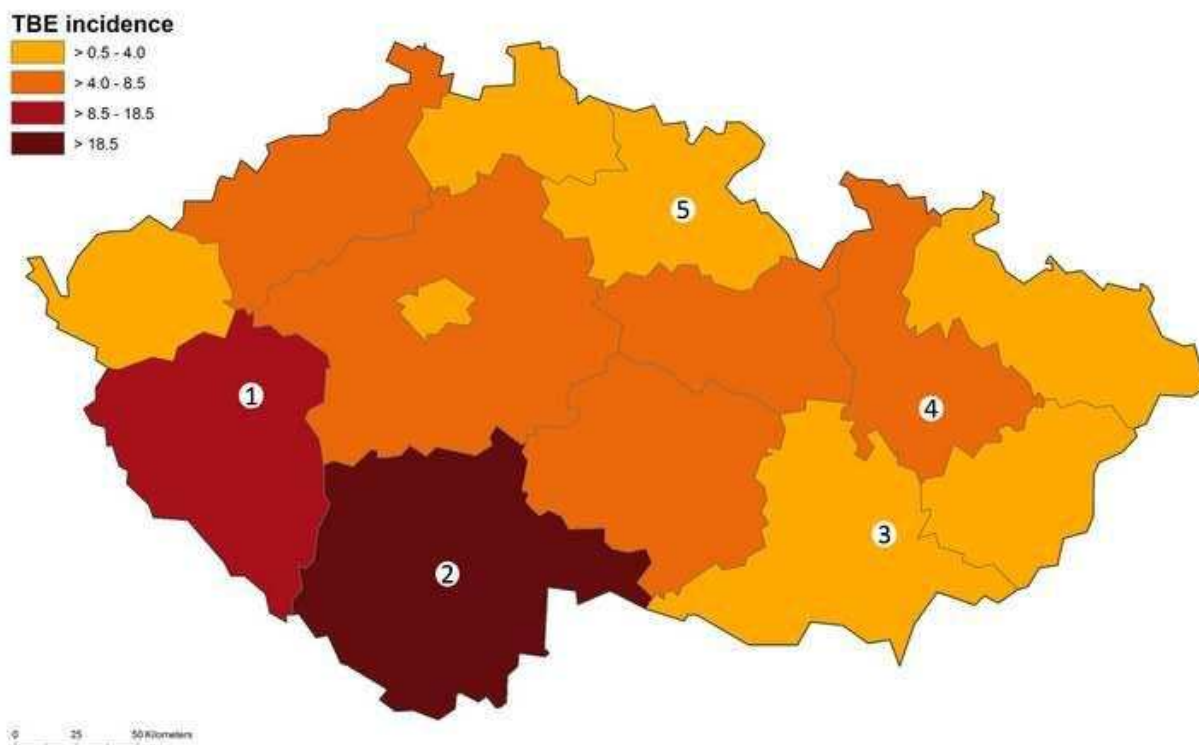
## Figure and Table legends

**Figure 1** Geographical locations of the zoos included in the study shown in a TBE incidence map(2000-2010) of the Czech Republic (ECDC; [http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/emerging\\_and\\_vectorborne\\_diseases/tick\\_borne\\_diseases/tick\\_borne\\_encephalitis/country-profiles/PublishingImages/Czech-TBE-incidence-high-res.jpg](http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/emerging_and_vectorborne_diseases/tick_borne_diseases/tick_borne_encephalitis/country-profiles/PublishingImages/Czech-TBE-incidence-high-res.jpg)): 1. ZOO and Botanical Garden Plzeň, 2. ZOO Hluboká nad Vltavou, 3. Zoopark Vyškov, 4. ZOO Olomouc, 5. ZOO Dvůr Králové nad Labem. Colour code of the TBE average annual incidence rate per 100,000 inhabitants: yellow: > 0.5 – 4.0; orange: > 4.0 – 8.5; red: > 8.5 – 18.5; brown: > 18.5.

**Table 1** Detection of antibodies against *Borrelia burgdorferi* s.l. and tick-borne encephalitis virus in sera of captive animals from Czech zoos: detailed results.

	animal species		<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.		TBEV		
			No. positive	No. negative	ELISA	neutralization test	
Mammals even toed ungulates	white antelope	<i>Addax nasomaculatus</i>	5	0	negative	negative	
	roan antelope	<i>Hippotragus equinus</i>	1	0	negative	negative	
	springbok	<i>Antidorcas marsupialis</i>	0	1	negative	negative	
	sable antelope	<i>Hippotragus niger</i>	3	1	negative	negative	
	mountain reedbuck	<i>Redunca fulvorufula</i>	0	1	negative	negative	
	lowland bongo	<i>Tragelaphus eurycerus</i>	1	0	negative	negative	
	african buffalo	<i>Syncerus caffer</i>	0	1	negative	negative	
	blesbuck	<i>Damaliscus pygargus phillipsi</i>	1	0	negative	negative	
	dama gazelle	<i>Nanger dama</i>	3	2	negative	negative	
	Thomson's gazelle	<i>Eudorcas thomsonii</i>	2	0	1 borderline (95 VIEU/ml); 1 negative	negative	
	long-tailed goral	<i>Naemorhedus caudatus</i>	0	2	negative	negative	
	impala	<i>Aepyceros melampus</i>	0	3	negative	negative	
	elk	<i>Cervus canadensis</i>	1	0	negative	negative	
	mountain goat	<i>Oreamnos americanus</i>	2	0	negative	negative	
	domestic goat	<i>Capra aegagrus hircus</i>	3	0	negative	negative	
	Carpathian goat	<i>Capra aegagrus hircus</i>	1	0	negative	negative	
	Cashmere	<i>Capra aegagrus hircus</i>	1	0	negative	negative	
	markhor	<i>Capra falconeri</i>	1	0	positive (145 VIEU/ml)	positive (1:16)	
	West Caucasian tur	<i>Capra caucasica</i>	1	0	negative	negative	
	lesser kudu	<i>Ammelaphus imberbis</i>	2	0	negative	negative	
	greater kudu	<i>Tragelaphus strepsiceros</i>	1	0	negative	negative	
	guanaco	<i>Lama guanicoe</i>	1	0	negative	negative	
	Eurasian elk	<i>Alces alces</i>	1	0	negative	negative	
	nyala	<i>Tragelaphus angasii</i>	1	1	negative	negative	
	gemsbuck	<i>Oryx gazella</i>	2	0	negative	negative	
	Racka sheep	<i>Ovis orientalis aries</i>	1	0	negative	negative	
	Cameroon sheep	<i>Ovis orientalis aries</i>	1	0	negative	negative	
	Suffolk sheep	<i>Ovis orientalis aries</i>	0	1	negative	negative	
	Valachian sheep	<i>Ovis orientalis aries</i>	1	0	negative	negative	
	German Grey Heath	<i>Ovis orientalis aries</i>	0	1	negative	negative	
	black wildebeest	<i>Connochaetes gnou</i>	1	2	negative	negative	
	Barbary sheep	<i>Ammotragus lervia</i>	5	1	negative	negative	
	warthog	<i>Phacochoerus africanus</i>	0	1	negative	negative	
	scimitar oryx	<i>Oryx dammah</i>	3	2	negative	negative	
	Charolais cattle	<i>Bos primigenius taurus</i>	0	1	negative	negative	
	Dahomey dwarf cattle	<i>Bos primigenius taurus</i>	0	1	negative	negative	
	reindeer	<i>Rangifer tarandus</i>	1	0	positive (414 VIEU/ml)	positive (1:64)	
	waterbuck	<i>Kobus ellipsiprymnus</i>	0	1	negative	negative	
	southern lechwe	<i>Kobus lechwe</i>	1	0	negative	negative	
	waterbuck	<i>Kobus ellipsiprymnus ellipsiprymnus</i>	0	4	negative	negative	
	Rothschild's giraffe	<i>Giraffa camelopardalis rothschildi</i>	0	2	negative	negative	
	reticulated giraffe	<i>Giraffa camelopardalis reticulata</i>	0	1	negative	negative	
	toed ungulates	Fjord horse	<i>Equus ferus caballus</i>	2	0	negative	negative
		Shire horse	<i>Equus ferus caballus</i>	3	0	negative	negative
		Tarpan horse	<i>Equus ferus ferus</i>	2	0	negative	negative
		black rhinoceros	<i>Diceros bicornis</i>	0	7	negative	negative
		Balkan donkey	<i>Equus asinus asinus</i>	2	0	1 borderline (63 VIEU/ml); 1 negative	negative
		Somali wild donkey	<i>Equus africanus somaliensis</i>	1	0	negative	negative
		Shetland pony	<i>Equus ferus caballus</i>	2	0	negative	negative
		maneless zebra	<i>Equus quagga borensis</i>	1	0	negative	negative
		Bohmová Grant's zebra	<i>Equus quagga boehmi</i>	5	1	negative	negative
		Burchell's zebra	<i>Equus quagga burchellii</i>	1	0	negative	negative
Hartmann's mountain zebra		<i>Equus zebra hartmannae</i>	4	1	negative	negative	
carnivore		cheetah	<i>Acinonyx jubatus</i>	0	1	negative	negative
		spotted hyena	<i>Crocuta crocuta</i>	1	0	negative	negative
		Indian lion	<i>Panthera leo persica</i>	0	1	negative	negative
		lion	<i>Panthera leo</i>	0	1	negative	negative
		Amur leopard	<i>Panthera pardus orientalis</i>	0	1	negative	negative
		African Wild Dog	<i>Lycan pictus</i>	1	1	negative	negative
		serval	<i>Leptailurus serval</i>	0	1	negative	negative
	black-backed jackal	<i>Canis mesomelas</i>	1	0	negative	negative	
	grey wolf	<i>Canis lupus</i>	4	0	negative	negative	
	lar gibbon	<i>Hylobates lar</i>	1	0	negative	negative	
primates	Angola colobus	<i>Colobus angolensis</i>	0	1	negative	negative	
	greater flamingo	<i>Phoenicopterus roseus</i>	1	0	negative	negative	
birds	ostriches	<i>Struthio camelus</i>	0	2	negative	negative	
reptiles	squamates	Burmese Python	0	1	negative	negative	
	turtles	radiated tortoise	0	1	negative	negative	
	crocodiles	Siamese crocodile	0	3	negative	negative	

Figure



Příloha 2: Klinická charakteristika lymeské boreliózy (Parola a Raoult, 2001).

Klinická charakteristika podle stadia infekce			
časná			
druh symptomu	lokalizovaná	diseminovaná	chronická
kožní	erythema migrans	erythema migrans, sekundární léze, vyrážka, lymfocytom, kopřivka	acrodermatitis chronica atrophicans
neurologické		meningitida, neuritida, myelitida	encefalomyelitida, demyelinizační syndrom, polyneuropatie
srdeční		myokarditida, myoperikarditida	
revmatické		lehká artritida	chronická artritida
oční		konjunktivitida	keratitida
lymfatické	lokalizovaná lymfadenopatie	lokalizovaná nebo generalizovaná lymfadenopatie	
různé	chřipkové příznaky	hepatitida, splenomegalie, hematurie, proteinurie	

Příloha 3: Geografické rozložení zoologických zahrad odkud byly získány vzorky sér (převzato z <http://www.eu2009.cz/cz/czech-republic/ceska-republika-376/> a upraveno).

