

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Zapojení imunitních mechanismů do etiologie  
chronických komplikací boreliózy**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor: **Stanislav Číkl**  
Studijní program: B1406 Biochemie  
Studijní obor: Biochemie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **Mgr. Michal Křupka, Ph.D.**  
Rok: 2020

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....

.....

Chtěl bych moc poděkovat vedoucímu práce, panu Mgr. Michalovi Křupkovi, Ph.D. za poskytnutí literatury, cenné rady, trpělivost a ochotu, kterou mi věnoval během celé doby psaní mé bakalářské práce. Také bych rád poděkoval celému kolektivu Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za příjemné prostředí a cenné rady. Tato práce byla podpořena studentským grantem IGA\_LF\_2019\_014 a IGA\_LF\_2020\_016

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Stanislav Číkl
Název práce	Zapojení imunitních mechanismů do etiologie chronických komplikací boreliózy
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Ústav imunologie
Vedoucí práce	Mgr. Michal Křupka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

### Abstrakt

Ve své bakalářské práci jsem se nejdříve zabýval biologickou stránkou *Borrelia* a samotné bakterie *B. burgdorferi*. Následně jsem přešel k popisu povrchových antigenů a k samotné charakterizaci infekčního onemocnění Lymeská borelióza. Pomocí dostupné literatury jsem také popsal epidemiologickou situaci v České republice. V samém závěru jsem se zabýval dřívějšími přístupy k léčbě onemocnění a postupy při vyvíjení vakcín.

Pro praktickou část byly použity tři proteiny, konkrétně OspA, OspC a DbpA. Tyto tři proteiny byly laboratorně připraveny v rámci výzkumu. Celkově byly získány tři výsledky. Prvním výsledkem byla fotografie z fluorescenční mikroskopie. Dalším výsledkem bylo vyhodnocení testu Imunoblot. Posledním výsledkem bylo vyhodnocení metody Western blot. Pro tuto metodu byly použity tři vakcinační antigeny konkrétně OspA, OspC a celobuněčná vakcína *B. burgdorferi* (Bb). Námi bylo pozorováno, že bakterie *B. burgdorferi* má spirálovitý tvar, dále že OspC vykazuje vysokou reaktivitu za použití metody Imunoblot a dva konstrukty, konkrétně OspA a celobuněčná vakcína Bb mají nejvyšší intenzitu ve stejné oblasti molekulových hmotností.

Klíčová slova	Lymeská borelióza, <i>Borrelia burgdorferi</i> , <i>Ixodes ricinus</i> , <i>Spirochetes</i> , Osp antigeny, Dbp, VlsE, erytrema migrens, Westernblot, ELISA, LYMERix
Počet stran	61
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and Stanislav Číkl  
surname

Title Involvement of immune mechanisms into the etiology  
of chronic complications of borreliosis

Type of thesis Bachelor

Department Institute of Immunology

Supervisor Mgr. Michal Křupka, Ph.D.

The year of presentation 2020

### Abstract

In the teoretical part, I have dealt with *Borrelia*'s biology and characterizing of *B. burgdorferi* itself. Then, I have described surface antigens and infectious Lyme disease. Using the available literature I have also handled the epidemiological situation in the Czech Republic. Finally, I have discussed previous approaches to disease treatment and vaccine development procedures.

In the practical part, three proteins were used, specifically OspA, OspC and DbpA. These three proteins were laboratorally prepared for the research. Overall, three resultes were obtained. The first one was a photograph of fluorecence microscopy. The second one was Immunoblot evaluation. The last result was Western blot method evaluation, three vaccinal substances were used in this method, exactly OspA, OspC, and *B. burgdorferi* whole cell vaccine. *B. burgdorferi* were found to have a spiral shape, OspC showed high reactivity using the immunoblot method, I have also revealed, OspA and Bb constructs have the highest intensity in the same molecular weight region.

Keywords Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*, *Ixodes ricinus*, *Spirochets*, Osp antigens, Dbp, VlsE, erytrema migrans, Westernblot, ELISA, LYMERix

Number of pages 61

Number of appendices 0

Language Czech

# OBSAH

Obsah .....	6
Cíle práce .....	8
1. Úvod.....	9
2. Současný stav řešené problematiky .....	10
2.1. Biologie borélií.....	10
2.1.1. Outer surface proteins (Osp) .....	12
2.1.2. Dekorin vážící proteiny (Dbp) .....	14
2.2. Lymeská borelióza .....	16
2.2.1. Charakteristika onemocnění .....	16
2.2.2. Klinické příznaky onemocnění .....	17
2.2.2.1. První časná lokalizovaná fáze .....	17
2.2.2.2. Druhá časná diseminovaná forma .....	18
2.2.2.3. Třetí pozdní/chronická fáze.....	19
2.2.2. Diagnostika .....	19
2.2.3. Nespirální formy a Post boreliový syndrom .....	22
2.3. Epidemiologie .....	26
2.4. Léčba a vakcinace.....	28
3. Experimentální část.....	31
3.1. Biologický materiál .....	31
3.2. Chemikálie a roztoky.....	31
3.3. Materiál a přístroje .....	35
3.4. Metodika.....	37
3.4.1. Kultivace a purifikace .....	37
3.4.2. Diskontinuální SDS-PAGE elektroforéza .....	38
3.4.3. Příprava očkovací dávky, aplikace a odběr vzorku .....	39
3.4.4. Imunoblot LYMECHECK Optima IgG a IgM .....	39

3.4.5.	Western blot .....	40
3.4.6.	Vyhodnocení Westernblotu .....	40
3.4.7.	Fluorescenční mikroskopie .....	41
4.	Výsledky a diskuze .....	42
5.	Závěr .....	49
6.	Literatura.....	50

## CÍLE PRÁCE

- vyhledání odborné literatury a zpracování literární rešerše na téma Lymeská borelióza, její diagnostika, léčba a prevence, chronické následky prodělané boreliové infekce (post boreliový syndrom) a současné znalosti o jejich možných příčinách
- produkce hyperimunních myších sér pro testování interakce *Borrelia* a specifických protilátek – produkce rekombinantních antigenů *Borrelia burgdorferi* a jejich purifikace, příprava do vakcinační formy, vyhodnocení reaktivity s bakteriemi metodou nepřímé imunofluorescence a Western blot



## 1. ÚVOD

Lymeská borelióza je infekční onemocnění, která se vyskytuje v Americe, Evropě a některých částech Asie. Pro každou oblast je charakteristický určitý druh bakterie a její přenašeč. Onemocnění Lymeská borelióza je způsobeno komplexem bakterií *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Bbsl). V Evropě se nejčastěji vyskytujícími se bakteriemi z toho komplexu jsou *Borrelia afzelii* a *Borrelia garinni* a primárním přenašečem je klíště obecné (*Ixodes ricinus*).

V literárním přehledu své bakalářské práce se budu zabývat biologii rodu *Borrelia*, dále povrchovými proteiny bakterie *Borrelia burgdorferi* a komplexním popisem samotného onemocnění. Pokusím se charakterizovat a blíže přiblížit přetrvávající potíže po léčbě, možné příčiny těchto potíží a také popis nespirálních forem bakterií rodu *Borrelia*.

V praktické části se budu zabývat produkcí a purifikací rekombinantních antigenů, konkrétně OspA, OspC a DbpA, následným využitím těchto proteinů pro přípravu vakcinačních dávek a provedením metody Western blot pro vyhodnocení produkce protilátek a jejich detekce. V další části poté budou pořízeny fotografie z fluorescenční mikroskopie vzorku bakterií *B. burgdorferi* a bude proveden test Imunoblot na detekci protilátek.

V návaznosti na tento experiment budou provedeny výzkumy zabývající se typizací a expresí proteinů OspA a OspC v bakteriích rodu *Borrelia*.

## 2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1. Biologie borélií

Rod *Borrelia* patří společně s rody *Treponema* a *Leptospira* do kmene *Spirocheti*. Tyto rody jsou důležité zejména pro mikrobiologii (Votava, 2010).

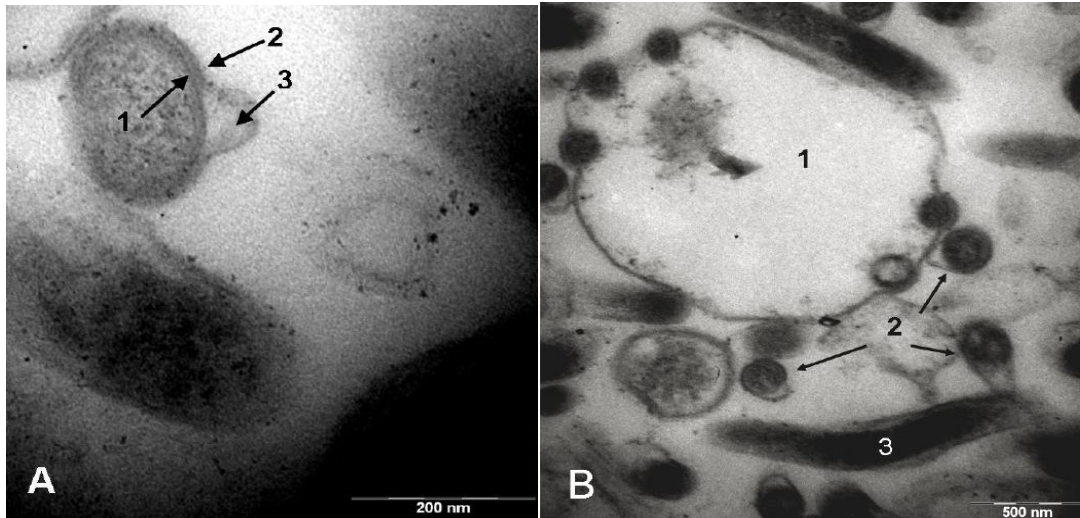
Bakterie rodu *Borrelia* jsou spirálovitého tvaru bez pevné buněčné stěny. Stavba celé buňky je vyobrazena na obr. 1. Délka těchto mikroorganismů se pohybuje v rozmezí 10–30  $\mu\text{m}$  a jejich průměr činí 0,2 – 0,3  $\mu\text{m}$ . Na obou jejich koncích se může nacházet 7–14 bičíků (amfitricha), které jsou zodpovědné za pohyb buňky. Obecně jsou bičíky lokalizovány v periplasmatickém prostoru. Výjimečná je ale v tomto ohledu bakterie stejného rodu, konkrétně *B. sinica*, což je bakterie, která podle dostupných informací obsahuje v periplasmě pouze 2–4 bičíky, jež jsou s největší pravděpodobností zodpovědné za její omezenou mobilitu (Masuzawa, 2001).

Co se týče struktury bičíků, tak jsou složeny převážně ze dvou typů proteinů – minoritně se jedná o FlaA, což je protein, jehož molekulová hmotnost je 38 kDa ( $M_r=38\ 000$ ), a majoritně zastoupeném FlaB o molekulové hmotnosti 41 kDa ( $M_r=41\ 000$ ) (Ge, 1998).

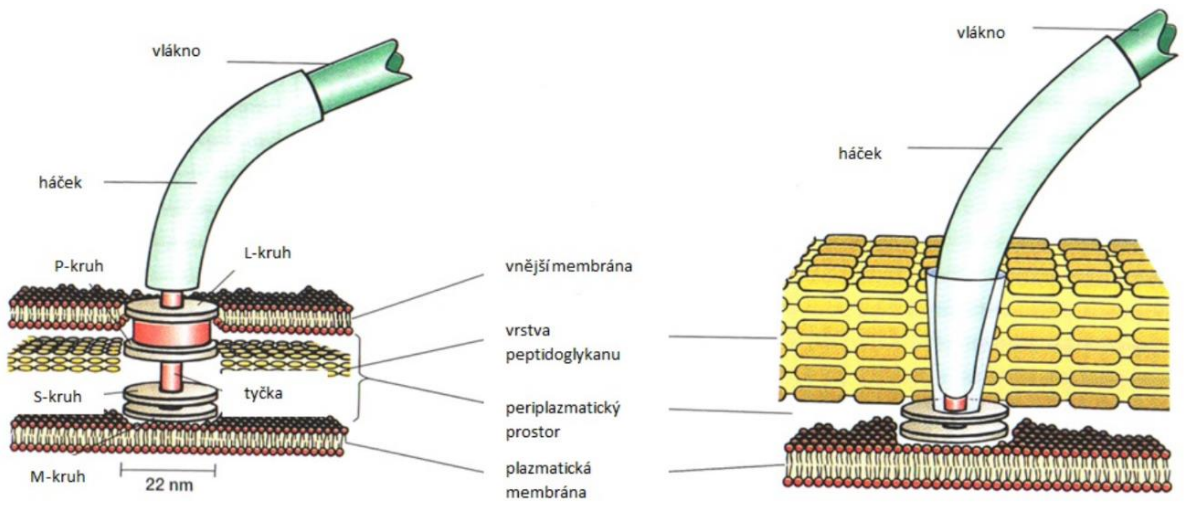
Samotný tvar bakterií rodu *Borrelia* je dán bičíky, jež jsou stočené kolem protoplasmatického válce. Ve srovnání s ostatními bakteriemi buněčná stěna bakterií rodu *Borrelia* nemá aktivní roli ve tvarové rozdílnosti. Inaktivace genů pro FlaB indukuje snížení mobility a tyčinkovou formu mutovaných bakterií (Motaleb, 2000).

Struktura celé bakteriální buňky (Obr. 1) je podobná struktuře Gram negativních buněk ( $G^-$ ), což znamená, že obsahují periplasmatický prostor, který se nachází mezi cytoplasmatickou membránou a buněčnou stěnou. Celá buněčná stěna je u takovýchto bakterií poté tvořena dvouvrstvým fosfolipidovým filmem. Na vnější straně jsou poté navázány lipopolysacharidy. Detailní popis struktury buněčné stěny je vyobrazen na Obr. 2. U buněk rodu *Borrelia* se ale vyskytují určité anomálie, které jsou pro tuto skupinu i charakteristické. Například se jedná o absenci lipopolysacharidů a také nadbytek lipoproteinů ve vnější membráně (Fraser, 1997; Bergstrom, 2002).

Jako dvě hlavní lipidické složky membrán těchto bakterií byly identifikovány dva fosfolipidy, konkrétně se jedná o fosfatidylcholin a fosfatidylglycerol a také dva atypické glykolipidy, konkrétně 1-O-palmitoyl-2-O-oleyl-3-O- $\alpha$ -D-galaktopyranosyl-sn-glycerol a cholesterol 6-O-palmitoyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid. Oba výše zmíněné glykolipidy jsou schopné vyvolat produkci specifických protilátek při imunizaci myší (Krupka, 2007).



Obr. 1: Struktura buňky *B. burgdorferi* z elektronového transmisního mikroskopu. A- transverzální řez. 1 – vnitřní membrána, 2 – vnější membrána, 3 – periplazmatický prostor. B. 1 – cystická forma *Borrélii*, 2 – transversální řez, spirální forma, 3 – podélný řez, spirální forma (Krupka, 2007).



Obr. 2: Stavba buněčného bičíku a struktura buněčné stěny bakterií. Vlevo buněčná stěna G- bakterie, vpravo buněčná stěna G<sup>+</sup> bakterie (Prescott, 1996, upraveno).

## **Struktura genomu**

Spirochety rodu *Borrelia* jsou velice unikátní bakterie i co se genomu týče. Jeden za základních charakteristických znaků těchto mikroorganismů je mimořádně složitý genom obsahující jeden lineární chromozom s velikostí přibližně jedné mega báze a několik cirkulárních i lineárních plasmidů (Krupka, 2007).

Chromozom *Borrelii* je relativně malý, pokud jeho velikost budeme porovnávat s ostatními bakteriálními chromozomy, jejichž velikost genomu se pohybuje v rozmezí 580-9 300 kpb (Brisson, 2012).

### **2.1.1. Outer surface proteins (Osp)**

#### **Outer surface protein A (OspA)**

Tento protein byl prvním popsáným proteinem ze skupiny Osp u *Borrelii* (Barbour, 1983). OspA je protein, jehož relativní molekulová hmotnost je podle literatury 31 kDa (Mr=31 000). Gen pro tento protein je součástí bicistronního operonu na plasmidu lp54 a je exprimován společně s geny pro další povrchový protein – OspB (Howe, 1985). Exprimování těchto proteinů probíhá například ve střední části gastrointestinálního traktu klíštěte a jejich exprese je regulována během přenosu do vnímavého hostitele (Templeton, 2004).

Hlavní funkce OspA spočívá ve vazbě ke glykoproteinům TROSPA, které se vyskytují se střevním epitelu klíštěte. Biologická funkce tohoto glykoproteinu v klíštěti ale zatím nebyla objasněna (Lähteenmäki, 2001).

Garcia ve svém článku z roku 2005 dokázal, že OspA a OspB se přímo váží komplementový receptor CR 3 (CD11b/CD18) u hostitelů (obratlovců), čímž vyvolávají aktivaci buněk imunitního systému (Garcia, 2005). OspA aktivuje imunitní systém tím, že se přichytí k vhodným receptorům (Singh, 2006). To může být jeden z důvodů snížené exprese OspA/OspB během přenosu na hostitele (obratlovce), což minimalizuje zánětlivou imunitní reakci v časném stádiu infekce. Na druhou stranu ale Crowley objevil, že exprese OspA v hostiteli je stimulována v zánětlivém prostředí, částečně po zymosanem indukovaném zánětu (Crowley, 2003).

Není zcela jasné, zda zvýšení exprese OspA během chronické infekce je pouze odpověď bakterií na zánětlivou imunitní odpověď proti těmto bakteriím, nebo zda exprese OspA je pro bakterie *Borrelii* nutná k vytvoření chronické infekce. Jedno z vysvětlení na

aktivaci exprese OspA u *Borelii* během chronické fáze infekce je takové, že OspA může mít potenciální ochrannou funkci buněk *Borrelie* (Orndorff, 1999).

### **Outer surface protein B (OspB)**

Molekulová hmotnost tohoto lipoproteinu je podle literatury 31 kDa ( $M_r=31\ 000$ ), avšak jeho zdánlivá hmotnost podle SDS-PAGE elektroforézy je 34 kDa ( $M_r=34\ 000$ ). Tento protein je kódován jedním operonem lokalizovaným na 54-kb lineárním plasmidu *B. burgdorferi*. OspA i OspB jsou syntetizovány bakterií *B. burgdorferi* v infikovaných nenakrmených klíšťatech a regulace jejich syntézy probíhá během sání klíštěte (Becker, 2005).

Sigma faktory jsou iniciované faktory, které podporují vazby RNA *polymeras* ke specifickým iniciačním pozicím a následně jsou uvolněny. RpoS ( $\sigma(S)$ ) faktor je hlavní transkripční regulátor hlavní stresové odpovědi. Řídí pozitivně nebo negativně expresi několika stovek genů, které jsou většinou zapojeny do metabolismu, transportu, regulačním a stresovém řízení. Druhým sigma faktorem je RpoN ( $\sigma(54)$ ), který je zodpovědný za expresi enzymů zapojených v argininovém metabolismu (RpoS, 2020; RpoN, 2020).

Exprese OspA a OspB v bakterii *B. burgdorferi* započne následně po vstupu a usídlení spirochet v přenašečích. Během transmise z přenašeče do hostitele *B. burgdorferi* se snižuje exprese OspA a OspB a zároveň se zvýší exprese jiných proteinů, jako OspC nebo DbpA. Tato selektivní a časová exprese OspA a OspB v klíšťeti předpokládá, že tyto dva proteiny mohou fungovat během časně spirochetální kolonizace a pobytu spirochet v klíšťeti. Je ale málo informací o roli tohoto proteinu a jeho životním cyklu v samotné bakterii *B. burgdorferi* (Neelakanta, 2007).

### **Outer surface protein C (OspC)**

Dalším vnějším proteinem je OspC (dříve pC) s molekulovou hmotností 23 kDa ( $M_r=23\ 000$ ). Geny pro tento protein jsou lokalizovány na plasmidu cp26. Tento protein je syntetizován během pozdní fáze infekce u savců (Marconi, 1993). Pochopení funkce tohoto proteinu nastalo s objevem Salp15, což je ligand pro OspC a je to imunopresivní protein (Zhang, 1997).

Salp15 je rozpustný protein ve slinách přenašeče (klíštěte) a potlačuje imunitní odpověď hostitele proti komponentám z klíštěčích slin. Salp15 inhibuje proliferaci  $CD4^+$  T lymfocytů tím, že se naváže na extracelulární doménu  $CD4^+$  molekuly a inhibuje

vápenaté kanály. Tyto kanály jsou nutné k aktivaci transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B a NF-AT během doby, kdy receptory T lymfocytů zprostředkovávají signalizaci (Garg, 2006; Anguita, 2002).

### **Outer surface protein D (OspD)**

OspD je dalším povrchově exprimovaným proteinem bakterie *B. burgdorferi* a jeho molekulová hmotnost je 28 kDa ( $M_r=28\ 000$ ). Gen, který kóduje tento protein se nachází na lineárním plasmidu 38 (lp38) (Li, 2007). Je zajímavé, že při změně teploty, konkrétně z 23°C na 35°C exprese OspD v bakterii *B. burgdorferi* klesne asi 13x (Ojaimi, 2013).

Existuje několik hypotéz o roli tohoto proteinu, například že nemusí být zásadní pro samotný přenos spirochet během sání klíštěte. Všechny tyto existující hypotézy je nutné blíže ověřit (Xi, 2007).

### **Outer surface protein E/F (OspE/F)**

Gen pro syntézu proteinu OspE se nachází na 5'-konci operonu a obsahuje 513 nukleotidů kóduje protein o 171 aminokyselinách s vypočítanou molekulovou hmotností 19,2 kDa ( $M_r=19\ 200$ ). Gen pro OspF se nachází na genu pro syntézu proteinu OspE, skládá se z 690 nukleotidů a kóduje protein o 230 aminokyselinách s molekulovou hmotností 26,1 kDa ( $M_r=26\ 100$ ) (Barbour, 1984). Většina paralogů OspE se váže na FH (faktor H), což je jeden z regulátorů alternativních drah (Zipfel, 1999).

Díky výše zmíněným podobnostem a také podobností k vazbě na faktor H jsou proteiny OspE a OspF řazeny pod termín Erps (Brissette, 2008). Jejich role v přežití spirochet během infekce není ještě zcela známá (Siegel, 2010; Hammerschmidt, 2012).

### **2.1.2. Dekorin vážící proteiny (Dbp)**

Dekorin je proteoglykan, který se skládá z jádra o molekulová hmotnost je 36 kDa ( $M_r=36\ 000$ ), obvykle substituovaného jedním GAG řetězcem chondroitin dermatan sulfátového typu. GAG jsou dlouhé, nerozvětvené, disacharidové opakující se řetězce, které jsou extrémně heterogenní skupinou. Dermatan sulfát, heparin, heparin sulfát a chondroitin sulfát jsou různé třídy GAG vyznačující se jejich částečnou disacharidovou opakující se jednotkou a/nebo rozdílností v jejich stupni modifikace. GAG a proteoglykany jsou také základními stavebními kameny savčích tkání a jsou cílem mnoha bakteriálních patogenů (Rostand, 1997).

DbpA a DbpB jsou lipoproteiny o molekulové hmotnosti 20 kDa ( $M_r=20\ 000$ ), respektive 18kDa ( $M_r=18\ 000$ ). Jsou kódovány operonem na lp54 a byly identifikovány jako dekorin vazebné proteiny v gelových testech. Navzdory jejich 56 % sekvenční podobnosti, DbpA se od DbpB v některých vlastnostech liší:

1. schopností účinněji vázat dekorin
2. schopností inhibovat vazby bakterie *B. burgdorferi* k imobilizovanému dekorinu
3. schopností vyvolat obrannou imunitní odpověď proti *B. burgdorferi* kultivované *in vitro*
4. vysokým stupněm polymorfismu se sekvenční podobností tak nízkou jako 58 % mezi alelami (Feng, 1998)

Zdá se, že DbpA a DbpB zřejmě nejsou exprimovány v přenašeči také to vypadá, že jejich exprese se zvýší během infekce více než při kultivaci *in vitro* (Hagman, 2000).

Přestože DbpA/DbpB není zásadní pro schopnost *B. burgdorferi* způsobit infekci u laboratorních myší, zakódované proteiny mají role, které je třeba blíže zkoumat (Leong, 2010).

## **VlsE**

Tento protein má molekulovou hmotnost rovnu 36 kDa ( $M_r=36\ 000$ ) a vyskytuje se na povrchu vnější buněčné stěny pro člověka patogenních *Borrelia*. Transkripční část tohoto lipoproteinu je lokalizována v místě vls, které obsahuje šest různých (VRs) oblastí se střídajícími se sedmi oblastmi nízké variability (IR). Předpokládá se, že nepřerušovaný rekombinant v regionu vysoké variability výrazně brání efektivní odpovědi hostitelského imunitního systému, což umožňuje vznik chronických infekcí a přežití samotných spirochet v savcích (Bubeck-Martinez, 2005). Protein VlsE je kódovaný *vlsE* genem, který tvoří část tak zvané vls lokusu, a je lokalizován blízko telomeru lineárního plasmidu lp28-I (Vink, 2012).

Navzdory přítomnosti variabilních regionů (VR) a přizpůsobení terciárních proteinů, což částečně potlačí neměnné oblasti, vykazuje protein VlsE vysokou imunogenitu a proto je také běžně užíván při serologických testech na onemocnění Lymeská borelióza. Podle novějších studií, je tento protein silně exprimován pouze v podmínkách *in vivo*, takže jedinou cestou, jak získat pravý antigen pro konstrukci diagnostických testů, je spolehnout se na genetické inženýrství (Sung, 2001).

Jak bylo ale prokázáno v několika nezávislých studiích, obohacení diagnostických testů na přítomnost protilátek proti *B. burgdorferi* proteinem VlsE značně zvyšuje citlivost a spolehlivost prováděného sérologického testu (Krzemień, 2017).

## 2.2. Lymeská borelióza

### 2.2.1. Charakteristika onemocnění

Lymeská borelióza je nemoc, která je způsobena bakteriemi náležícími do druhového komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Bbsl), což je komplex 10 druhů bakterií patogenních pro člověka - *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. kurtenbachii*, *B. lusitaniae*, *B. mayonii*, *B. spielmanii* a *B. valaisiana*. U dalších 12 druhů, které patří do stejného komplexu, zatím patogenita prokázána nebyla. Jedná se o *B. americana*, *B. andersonii*, *B. californiensis*, *B. carolinensis*, *B. chilensis*, *B. finlandensis*, *B. japonica*, *B. lanei*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. sinica* a *B. yangtzensis* (Krupka, 2007; Rudenko, 2011).

Onemocnění je rozšířeno v Americe, Evropě a částečně i v Asii. Mezi přenašeče tohoto onemocnění patří klíšata rodu *Ixodes*. V USA se jedná nejčastěji o druhy *I. scapularis* a *I. pacificus*, v Evropě je typickým přenašečem tohoto onemocnění *I. ricinus* (Obr. 3), přičemž nejvíce zamořené jsou oblasti Střední a Severovýchodní Evropy (Mead, 2015).



Obr. 3: Vlevo samice, vpravo samec *I. ricinus* (převzato z: scalibor.cz; 2020)



## 2.2.2. Klinické příznaky onemocnění

### 2.2.2.1. První časná lokalizovaná fáze

V této fázi je charakteristický výskyt erythremy migrans, jež bude blíže popsána dále. Ta se objevuje u většiny pacientů v prvních týdnech od napadení přenašečem (různé druhy klíšťat) (Borchers, 2015)

#### **Erytrema migrans**

Mezi nejčastěji vyskytující se kožní projevy patří erytrema migrans (Obr. 4), která se projevuje asi u 70-95 % pacientů během prvních tří týdnů po nákaze a prezentuje se jako červená, kulatá nebo oválná skvrna s centrálním vyblednutím. Některé léze mají terčovitou morfolonii. Může měřit 5 nebo i více centimetrů, ačkoliv maximum se může měnit. Co se týče výskytu, tak se erytrema migrans u dětí nachází nejčastěji na hlavě a krku. U dospělých je napadenou částí těla například okolí pánve (Borchers, 2015).



Obr. 4: Erytrema migrans (Cardenas-de la Garza, 2019).

### **2.2.2.2. Druhá časná diseminovaná forma**

Jedná se o druhou fázi, která nastupuje týdny až měsíce po vystavení nákaze a jejím projevem je například celotělový výskyt erytremy migrans, dále Lymeská artritida, Lymeská neuroborelióza a vzácněji Lymeská karditida (Borchers 2015).

#### **Lymeská artritida**

Je to druhý nejběžnější příznak u amerických pacientů. Artritida je asymetrická, monoartikulární (postižení jednoho kloubu) nebo oligoartikulární a může být současně v přerušované nebo trvalé formě. Nejčastěji postiženým kloubem je koleno (Arvikar, 2015). Zánět drobných kloubů nemoc přímo nevylučuje, i když se v tomto případě může jednat o revmatologické onemocnění. Typicky jsou klouby oteklé, mohou být i zarudlé, synoviální tekutina obsahuje leukocyty, především polymorfonukleární buňky (Pícha, 2013).

#### **Lymeská neuroborelióza**

Lymeská borelióza postihuje nervový systém u 10–15 % infikovaných pacientů, jak v Evropě, tak i v USA. Pokud bychom se na tento příznak podívali z patofyziologického hlediska, tak zjistíme, že infekce způsobuje multifokální zánět periferních nervů, zánět pavučnice a ojediněle může zasáhnout mozek, či míšní parenchym. Mnohem běžněji ale dochází k postižení kraniálních a periferních nervů. Zdaleka nejčastěji ale způsobuje kraniální neuropatii – obrna IV. obličejového nervu – slabost jedné části obličeje, zahrnující ztížené zavírání očí a sevření rtů. Dlouho se předpokládalo, že radikulární symptomy způsobují dermatom na místě, kde došlo ke kousnutí klíštětem, novější práce ale ukázaly, že to bylo mylné (pojmem radikulitida se myslí zánět míšních nervů) (Ogrinc, 2016).

Pokud Lymeská neuroborelióza (LNB) zasáhne CNS, pak je pro ni typická cerebrospinální fluidní pleocytóza a snížená hladina CSF proteinu (až 100krát nižší). CSF glukóza se pohybuje v rozmezí normálních hodnot, nebo může být lehce snižena. Studie předpokládají, že spirochety vstupují do CNS brzy po infekci, stimulují lokální produkci CXCL1, chemokinu přitahujícího B-buňky, což vede k migraci a následné proliferaci pro *B. burgdorferi* specifických buněk. Dalším diagnostickým markerem, který se zkoumá,

je koncentrace CXCL13 v CSF. Tento marker je také využíván při diagnostice. (Halperin, 2019).

### **Lymeská karditida**

Klinické projevy jsou nejasné, respektive nespecifikované, odpovídající širokému spektru srdečních obtíží. Obvykle ale zahrnuje mdloby, ztrátu vědomí, slabost, dýchací obtíže, bušení srdce anebo i bolest na hrudi (Krause, 2014). Podle dostupných dat v literatuře je Lymeská karditida obvykle spojována s vyrážkou, neurologickými symptomy nebo artritidou (Scheffold, 2015).

O tomto příznaku se začalo poprvé psát již v roce 1980 a představuje velmi vzácný projev Lymeské boreliózy (Stanek, 2011). Odhaduje se, že k postižení srdce dochází, v případě evropských pacientů, u 0,3-4 % pacientů infikovaných Lymeskou boreliózou. V Americe se tento příznak vyskytuje u 1,5-10 % pacientů bez odpovídající antibiotické léčbě (Rostoff, 2010).

### **2.2.2.3. Třetí pozdní/chronická fáze**

Třetí fáze onemocnění je spojena s chronickým kožním onemocněním, Lymeskou artritidou a neurologickými symptomy (Borchers, 2015).

### **Další dermatologické projevy**

Jinou formou erytremy migrans je tzv. druhotná erytrema migrans, která se dá popsat jako erytrema migrans s rozdílnou morfologií. Nejvíce zasaženou oblastí bývá obličej. Šíření spirochetální infekce probíhá přes krevní oběh a lymfu (Vasudevan, 2013).

Acrodermatitis chronica atropicans (ACA) je vzácné kožní onemocnění spojené s pozdní fází Lymeské boreliózy. Většinou se vyskytuje v Evropě, a to asi jen u 10 % všech infikovaných pacientů (Steere, 2016).

## **2.2.2. Diagnostika**

Podle Hulínské (2013) je možné diagnostické metody rozdělit do dvou kategorií:

1. Přímé diagnostické metody
2. Nepřímé diagnostické metody

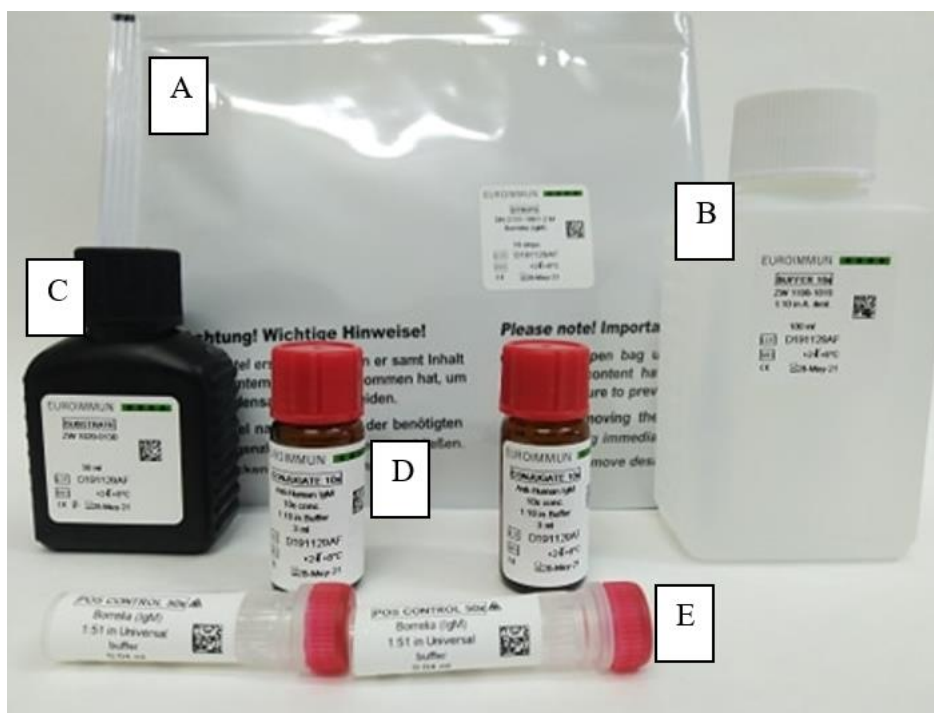
Mezi nepřímé diagnostické metody průkazu tohoto onemocnění patří zjišťování specifických antiboreliových protilátek metodou ELISA, nepřímou imunofluorescencí IFA a dále Westernblot. Tyto metody slouží k průkazu protilátek IgG a IgM.

K přímým diagnostickým metodám zase patří například světelná mikroskopie v zástinu, kultivace *Borrelii* pomocí Barbour-Stoenner-Kellyho kultivační média (BSK), histologický průkaz (roztěry po barvení Giemsou a toluidinovou modří nebo stříbrem s 1-2 % dusičnanem stříbrným po natrávení amylázou), DNA-hybridizace či PCR. Níže budou popsány jen vybrané metody.

### Blotové metody

Principem této metody je nejdříve provést diskontinuální SDS-PAGE elektroforézu vzorku proteinů, následně blotting proteinů z gelu na membránu a poté detekce proteinů. Přítomnost daných proteinů je na membráně detekována použitím primární protilátky, na kterou se v dalším kroku váže značená sekundární protilátka (fluorescenčně, chemiluminiscenčně). (převzato z: labguide.cz)

Jako příklad uvádím složení detekční sady Anti-Borrelia EUROLINE-RN-AT (IgG) firmy EUROIMMUN. Obsah balení kitu je zachycen na Obr. 5. Všechny roztoky jsou připraveny k okamžitému použití.

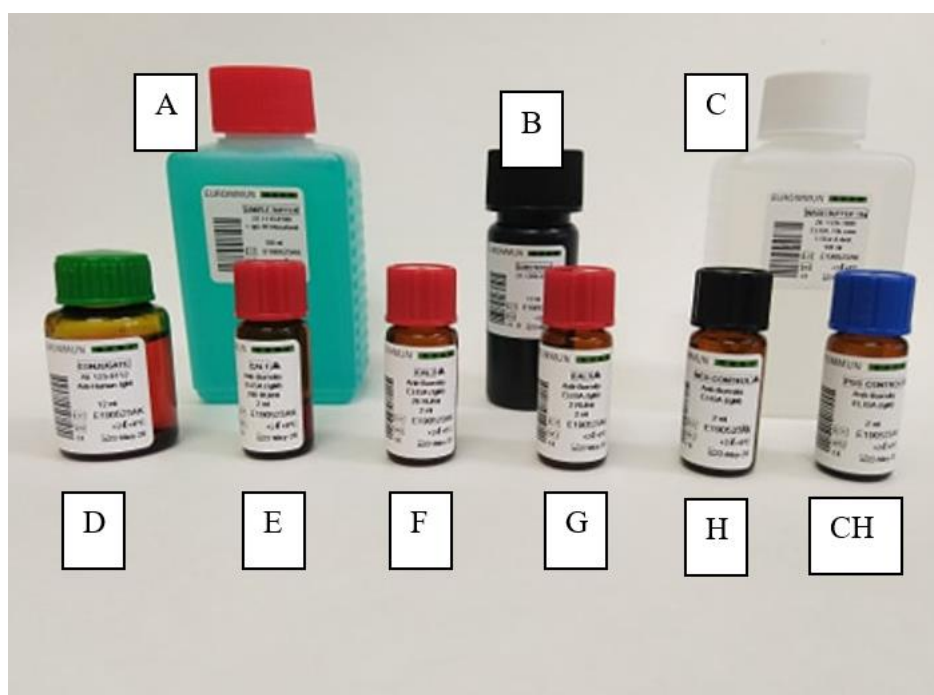


Obr. 5: Komerčně zakoupená sada na provedení testu Wetsern blot. A – zabalená destička na provedení testu, B – pufr 10x, C – substrát, D – konjugát 10x, E – pozitivní kontrola 50x; autor: Stanislav Číkl

## ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

Tato metoda patří vedle metody RIA a Luminiscenční imunoanalýzy do skupiny heterogenních imunoanalýz. Metoda využívá jako značku sekundární protilátky enzym (nejčastěji křenová peroxidasa, alkalická fosfatasa).

Pro tento test se využívají mikrotitrační destičky potažené protilátkou. K detekci se používá vertikální fotometr pro mikrotitrační destičky (reader). Jedna z nevýhod této metody je použití vícebodové kalibrační závislosti při každém měření (Beňovská, 2011). Obsah kitu firmy EUROIMMUN na provedení této metody je vyobrazen na Obr. 6 a 7.



Obr. 6: Vybavení komerčně dostupného kitu na provedení ELISA. A – pufr na promytí vzorků, B – substrát, C – promývací pufr 10x, D – konjugát, E – protilátka 200 RU/ml, F – protilátka 20 RU/ml, G–2 RU/ml, H – negativní kontrola, CH – pozitivní kontrola; autor: Stanislav Číkl



Obr. 7: Obsah balení komerčního kitu obsahujícího testovací desku na provedení metody ELISA.  
Autor: Stanislav Číkl

### PCR (Polymerase Chain Reaction)

Při této metodě je využíváno podobného principu, na jakém dochází k syntéze DNA během replikace v buňce. Dříve se používal enzym DNA polymerasa izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*, což je termostabilní bakterie. Dnes nachází využití široké spektrum reakčních rekombinantních polymeras (i DNA polymerasa z *T. aquaticus*). Jednotlivé fáze zahrnují denaturaci, nasednutí primerů (annealing) a polymeraci DNA. Všechny tyto kroky probíhají při jiných teplotách. Produkty PCR se mohou analyzovat jednoduchou elektroforézou, nebo značenými oligonukleotidy, nebo pomocí značené protilátky (PCR, 2019).

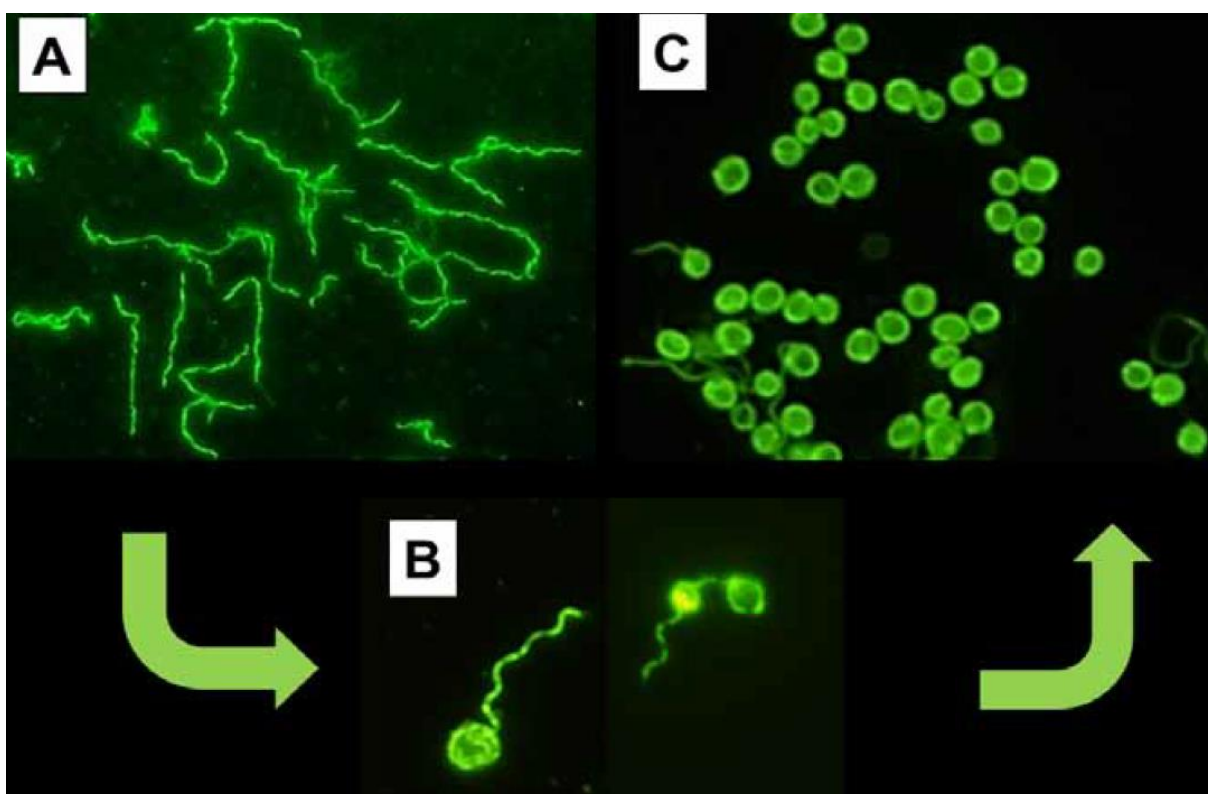
### 2.2.3. Nespirální formy a Post boreliový syndrom

Termín post-treatment Lyme disease syndrome (PTLDS) byl vytvořen pro klasifikaci pacientů, u kterých i přes léčbu přetrvávaly nějaké z výše uvedených příznaků. Společnost IDSA (Infectious Diseases Society of America) popisuje subjektivní symptomy PBS jako únavu, rozšíření muskuloskeletální bolesti a kognitivní obtíže, které mají za následek snížení pracovních, studijních nebo jiných aktivit (Wormser, 2006).

Podle nejruznějších odhadů se míra těchto příznaků pohybuje v rozmezí 0-23,4 % (evropské studie) či 0-40,8 % (americké studie) u všech nakažených pacientů (Cerar, 2010).

Konkrétní příčiny přetrvávajících potíží nejsou zatím známy, ale uvažuje se o několika možnostech.

1. Perzistence bakterií, živých, nebo neživotaschopných forem, v organismu, které si ale mohou zachovat imunogenní potenciál. Silně je ale v dnešních dnech diskutována možnost, že určitou úlohu mohou mít atypické morfologické formy borélií. Přejít mezi možnými formami je vidět na Obr. 8. Tyto formy mohou za nepříznivých podmínek přecházet v různé nespirální formy. U stárnoucích struktur byl in vitro pozorován vznik agregátů. Je možné, že by tyto formy mohly například stimulovat imunitní systém, avšak důkaz této myšlenky není (Křupka, 2019).



Obr. 8: Přejít mezi spirálními a nespirálními formami borélií indukovaný hypotonickým prostředím; spirální formy; přechodné formy; nespirální kulovité formy, občas nepřesně nazývané jako cysty. Vitální barvení karboxyfluoresceinem sukcinimidyl esterem. Foto: Mgr. Michal Křupka, Ph.D., použité zvětšení 400x. Přejato z Křupka, 2019.

2. Autoimunitní reakce. U pacientů s dlouhodobými potížemi byla pozorována zvýšení hladiny protilátek, například růstovému faktoru ECGF, apolipoproteinu B-100 nebo annexinu A2 (Křupka, 2019).
3. Koinfekce dalšími infekce přenášenými klíšťaty, kam patří například infekce bakteriemi rodu *Anaplasma*, *Bartonella* nebo *Babesia* (Horowitz, 2013).

Existují i další možné příčiny jako například poškození tkání, nebo aktivace imunitního systému přetrvávající i po eliminaci kauzálních bakterií. Žádná z těchto hypotéz ale nebyla potvrzena a není ani jasnou, do jaké míry se tyto mechanismy podílejí na přetrvávajících potížích. Dá se ale počítat i s tím, že se tyto mechanismy kombinují (Křupka, 2019).

Termín chronické Lymeské boreliózy (CLD) byl obecně předmět debat napříč vědeckou literaturou, lékařskou obcí a společností. CLD byla klinicky popsána jedním zdrojem jako přetrvávající bolest, únava a neurokognitivní zhoršení u pacientů, kteří neměli předchozí záznamy o Lymeské borelióze (Feder, 2007). V dnešní době je ale CLD nejvíce využívána jako všeobecný pojem, který popisuje jedince trpící zdlouhavou nemocí s podezřením či důkazem na Lymeskou boreliózu, kteří nespádají do jiné kategorie. V různých článcích byla navrhována i jiná označení pomáhající analyzovat komplexnost případů CLD. Tyto popisy také prokázaly rozsáhlé možné pohledy na klasifikaci CLD. Jedná se například o ADCLS (alternatively diagnosed CLD), což jsou pacienti, kteří byli diagnostikováni na klinickém základě a také měli pozitivní výsledků testů z neakreditované laboratoře. Další skupinou je například skupina seronegativní Lymeská borelióza, která zahrnuje pacienty s diagnostickými příznaky, ale onemocnění nebylo prokázáno kvůli teprve propukající infekci (Patrcik, 2015). Obecně se ale tento termín nedoporučuje (Nemeth, 2016).

Aby mohla být potvrzena diagnóza PTLDS, tak podle švýcarské společnosti musí být splněna tato kritéria:

- klinicky a laboratorně dokumentované prodělání Lymeské boreliózy
- absolvování dokumentované a kompletní antibiotické terapie adekvátní ke konkrétní fázi onemocnění
- perzistentní či rekurentní potíže, jako jsou únava artralgie, myalgie, kognitivní dysfunkce či kořenová bolest po dobu delší než 6 měsíců po prodělání terapie
- pravděpodobná časová návaznost mezi dokumentovanou boreliovou infekcí a nástupem symptomů PTLDS – potíže přetrvávající, nebo nastupující do 6 měsíců od ukončení antibiotické terapie a jsou přítomny po dobu delší než 6 měsíců



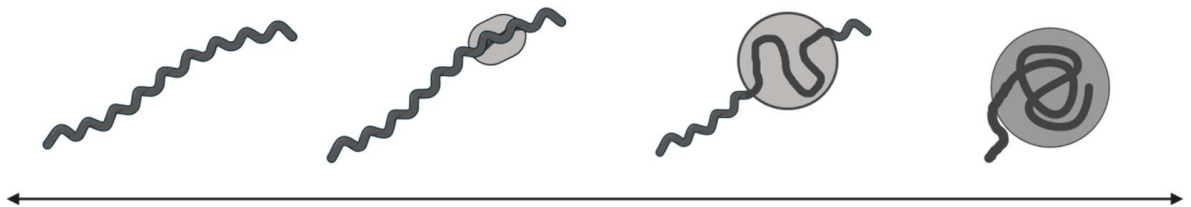
- objektivní klinický nález není požadován

Vylučující kritéria jsou podle stejného článku:

- průkaz aktivní infekce
- souběh jiného onemocnění, jako jsou aktivní revmatologické, neurologické nebo psychiatrické choroby (Křupka, 2019).

Dle dostupných informací a poznatků jsou spekulace, že pleomorfismus hraje roli v patologii Lymeské boreliózy a tyto různé morfologické formy mohou přispět nebo prodloužit trvání v lidském hostiteli (Bamm, 2019).

Jedním z relativně běžných způsobů indukce kulovitých tělísek bakterií *B. burgdorferi* je nedostatek živin, zvláště pak chybění sérových faktorů v kultivačním mediu. *Borrelia* spp je známá tím, že má nedostatek potřebných požadavků pro *de novo* syntézu aminokyselin. Tyto aminokyseliny poté tvoří z látek obsažených ve vektorech nebo hostitelích (Groshong, 2017; Fraser, 1997). Mechanismus transformace do kulovitých tělísek zahrnuje v prvním kroku expanzi vnější membrány a následně ve druhém kroku obtočení protoplasmatického cylindru a na Obr. 9 je výše popsané schéma vzniku těchto struktur (Schwarzbach, 2015).



Obr. 9: Schéma vzniku kulovitých tělísek bakterie *B. burgdorferi*. Převzato z Bamm, 2019.

Pleomorfické formy *Borrelie* spp byli detekovány během enzootického životního cyklu spirochet, konkrétně ve středním střevu klíšťat (Dunham-Ems, 2012). Tyto formy byly volně popsány jako sferuly, granuly, cysty, kokoidy nebo kulovitá tělíska (Bamm, 2019).

*Borrelie* se mohou vyskytovat také ve formě klastrů nebo agregátů. Tyto klastry jsou zodpovědné za formování mnoha biotických a abiotických povrchů a existují informace, že obsahují extracelulární DNA, alginát a kalcium. To jsou známé komponenty extra polymerických substancí (EPS). Následně vyvstaly dohady, zda forma biofilmu může být mechanismem, jakým spirochety mohou odolávat v hostiteli. (Bamm, 2019).

### 2.3. Epidemiologie

Jako hlavní přenašeč Lymeské boreliózy se uvádí klíště obecné (*Ixodes ricinus*), které dokáže tuto nemoc přenést na člověka i na zvířata. Bakterie rodu *Borelia* přežívají ve střevě infikovaného klíštěte a v okamžiku přisátí klíštěte k postiženému objektu se přemísťují do slinných žláz. Riziko přenosu infekce se tedy zvyšuje s dobou přisátí klíštěte (Lymeská borelióza, 2015).

*Ixodes ricinus* má čtyřstupňový vývojový cyklus, který zahrnuje stádia vajíčka, larvy, nymfy a dospělého jedince. Délka tohoto cyklu se pohybuje mezi třemi a šesti lety a závisí na klimatických podmínkách. Pro nalezení hostitele si klíště vybralo strategii přepadení, které zahrnuje to, že klíště vyleze na vrcholek rostliny a čeká na vhodného hostitele. (Randolph, 2004).

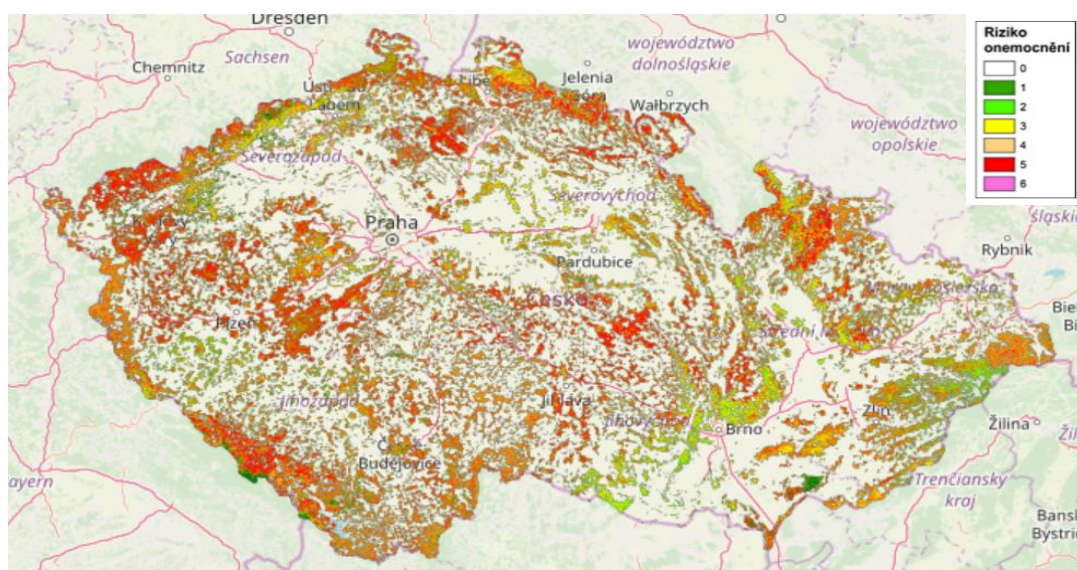
Pár dní po nasycení se klíště pustí hostitele a spadne na zem. Několik měsíců trvá, než klíště přejde do své další vývojové fáze, nebo, jedná-li se o dospělou samičku, začne klást několik tisíc vajíček a následně zemře. Jen malá část klíšťat dokončí svůj vývojový cyklus: okolo 10 % larev se vyvine do nymfy a pouze kolem 10 % nymf je schopno dosáhnout stupně dospělého jedince (Hofmeester, 2016).

Klíště tráví většinu svého života ve vegetaci. Teplota a relativní vlhkost jsou klíčové předpoklady pro vývoj, přežití a aktivitu klíštěte. Panuje shoda, že právě to jsou limitující faktory geografického rozšíření klíšťat (Sprong, 2018). Klimatické změny posledních dekád pak mají za důsledek prodloužení aktivity klíšťat (Sprong, 2012).

Výše zmíněné předpoklady implikují, že klíště je více rozšířené v oblastech opadavých lesů, kde žijí malí savci a vysoká zvěř, nicméně i v některých oblastech s dostatečnými srážkami, se může vyskytnout velká populace *I. ricinus* na otevřených stanovištích jako

například: na loukách a v rašeliníštích (Van Duijvendijk, 2015). Nicméně některá ohniska nízké intenzity byla zaznamenána i v městské zeleni, jako třeba v parcích či na zahradách (Guy, 1991).

Epidemiologickou situaci v Česku vystihuje Obr. 10. Na něm zřetelné, že červené oblasti znázorňují nejvyšší míru infikovanosti přenašečů onemocnění. Naopak bílé a zeleně jsou vyznačeny relativně bezpečné zóny. V těchto oblastech je riziko onemocnění menší, avšak nemusí být nulové.



Obr. 10: Mapa výskytu *I. ricinus* k 29.1.2020. Převzato z: [Www.web.natur.cuni.cz](http://www.web.natur.cuni.cz)

Státní zdravotnický ústav (SZÚ) nepravidelně vydává data o výskytu infekčního onemocnění Lymeská borelióza na území ČR. Nejaktuálnější data jsou z roku 2016. Ve zprávě z května roku 2017 je možné sledovat vývoj a počet pacientů nakažených daným infekčním onemocněním. Počet infikovaných obyvatel byl vyšší v roce 2016 než v roce 2015. Co se týče věkových skupin, tak nejvíce zasaženou skupinou jsou malé děti ve věku 5/9 let a také starší lidé ve věku 55/64 a 65/74 let.

Dále jdou vysledovat další informace, jako například že nejvyšší hodnoty výskytu tohoto onemocnění se vyskytují v letech 2015 a 2016 v 16–37 kalendářním týdnu. Toto období odpovídá i aktivitě přenašečů a také teplým počasím. Do tohoto období ale mohou spadat i případy, které jsou chronické, či identifikované v pozdějších stádiích onemocnění (Kříž, 2017).

## 2.4. Léčba a vakcinace

V poslední třetině 20. století proběhl v Severní Americe pokus porovnávající penicilin G, erytromycin a tetracyklin, léčivé látky běžně předepisované k léčbě Lymeské boreliózy. Z tohoto pokusu vyplynulo, že penicilin a tetracyklin jsou vhodné k potlačení trvání erytremy migrans (Steere, 1980). Pacienti s Lymeskou boreliózou byli léčeni antibiotiky (primárně penicilinem G) s různým stupněm úspěchu. Tento způsob se využívá i dnes (Steere, 1985).

Tabulka 1a Shrnutí léčby vybraných příznaků onemocnění Lymeská borelióza (Stanek, 2018, upraveno)

Klinické projevy	Antibiotikum	Aplikace	Délka (dny)
Erytremia migrans, Boreliový lymfocytom	Doxycyklin	Orální	10-14
	Amoxicilin	Orální	14
	Cefuroxim	Orální	14
	Fenoxymethyl penicilin	Orální	14
	Azitromycin	Orální	1/4/6
	Eritromycin	Orální	14
	Ceftriaxon	I.v.	14
	Penicilin G	I.v.	14

Tab. 1b Shrnutí léčby vybraných příznaků onemocnění Lymeská borelióza (Stanek, 2018, upraveno)

Neuroborelióza a srdeční problémy	Ceftriaxon	I.v.	14-28
	Penicilin G	I.v.	14-28
	Doxycyklin	Orální	14-28
Acrodermatitis chronica atropicans	Doxycyklin	Orální	21 (21-28)
	Amoxicilin	Orální	21 (14-28)
	Ceftriaxon	I.v.	21 (14-28)
	Penicilin G	I.v.	21 (14-28)

Jak je možné vidět v Tab. 1, tak pro různá stádia Lymeské boreliózy se používají různé léčivé látky, které zvyšují úspěšnost vyléčení pacientů. Je ale důležité uvést, že například antibiotikum doxycyklin se nesmí podávat dětem, těhotným ženám a také lidem s alergií na dané antibiotikum, penicilin G je nevhodný pro pacienty s alergií na betalaktamová antibiotika (Stanek, 2018).

### Vakcinace

Úplně první vakcína proti Lymeské borelióze LYMERix byla registrována roku 1998 v USA, ale o 5 let později byla stažena z trhu pro nedostatek zájmu (Plotkin, 2011; Poland, 2011). Tato vakcína byla založena na rekombinantním povrchovém proteinu A (OspA) bakterie *B. burgdorferi* (kmen ZS7) a byla vyvíjena evropskou společností GlaxoSmithKline (Fikrig, 1992). Na vývoji druhé vakcíny ImmuLyme se podíleli Pasteur Mérieux Connaght (Nesich, 2020).

Vakcína LYMERix byla určena pacientům ve věku 15–70 let, ale ImmuLyme pro pacienty ve věku 18–92 let. Tyto vakcíny byly ale nevhodné jak pro těhotné ženy, tak pro pacienty s nízkým věkem. Obecně byla vakcína určena zejména pro osoby žijící nebo pracující v lesích nebo travnatých oblastech. Samozřejmě ale mohla být vakcína využita i pro pacienty, kteří se nějakým způsobem pohybovali v rizikových oblastech (Hughes, 1999).

Přesto ale musíme zmínit, že tato vakcína byla testována a dostupná pouze v USA, kde byl zaznamenán jeden konkrétní patogenetický poddruh. Z tohoto důvodu jsou vakcíny vyrobené v USA pravděpodobně neefektivní pro použití v Evropě. Mezi kmeny bakterií vyskytujících se v různých geografických oblastech byly nalezeny významné serologické rozdíly, které mohou mít mnoho příčin. Vakcína vyvíjená pro použití v Evropě by měla

obsahovat směs proteinů *B. burgdorferi* majících antigenní vlastnosti, které byly získány na základě izolace materiálu z kmenů *B. burgdorferi* vyskytujících se v Evropě (Skotarczak, 2015).

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. Biologický materiál

Byly použity bakteriální kmeny *Escherichia coli* BL21, které obsahovaly rekombinantní geny pro produkci výše zmíněných antigenů (OspA, OspC, DbpA). Pro vakcinaci byly použity myši kmene Balb/C (kvalita SPF).

#### 3.2. Chemikálie a roztoky

Albumin (Calbiochem)

Antibiotikum ampicilin (Sigma)

Bromfenolová modř (Roth)

CGSE (Sigma)

Deionizovaná voda

FBS (Fetal bovine serum) (SERVA)

IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid) (OmniPur)

LB-Médium (modifikace média Barbour-Soner-Kelly pod komerčním názvem BSK-H) (VWR)

Methanol (VWR)

n-butanol (Lach-Ner)

Nikel-trioctová agarosa (Ni-NTA) (Quiagen)

10 % roztok Sava

Standard používaný pro elektroforézu: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder 250  $\mu$ l

Tween 20 (SERVA)

#### Barvicí roztok

Coomasie brilliant blue v 50% ethanolu (VWR) a 10% kyseliny octové (VWR)

#### Elektrodový pufr:

45,3 g Tris (AMRESCO)

216 g glycinu (VWR)

15 g SDS (Roth)

doplnit destilovanou vodou do 3 l

**Eluční pufr:**

Základní roztok: 500 ml

3,9 g dihydrátudihydrogenfosforečnanu sodného (VWR)

8,77 g chloridu sodného (Lach-Ner)

17,02 g imidazolu (Calbiochem)

Přidavky: 10 ml

20 µl phenylmethylsulfonylfluoridu (SERVA)

4 µl leupeptinu (SERVA)

5,25 µl aprotininu (SERVA)

Úprava na pH 8

**Fixační roztok:**

750 ml isopropanolu (VWR)

300 ml kyseliny octové (VWR)

doplnit destilovanou vodou do 3 l

**Gely pro elektroforézu**

Dělicí gel (15 %)

7,5 ml 30 % A/B (akrylamid-bisakrylamid) (SERVA)

3,75 ml 4xTris pufr pH 8,8

3,75 ml ddH<sub>2</sub>O

75 µl 10 % vodného roztoku persíranu amonného (SERVA)

15 µl N, N, N', N'-tetramethylendiamin (TEMED) (SERVA)

Zaostřovací gel (4 %)

1,3 ml 30 % A/B (akrylamid-bisakrylamid) (SERVA)

2,5 ml 4xTris pufr pH 6,8

6,2 ml ddH<sub>2</sub>O

50 µl 10 % vodného roztoku persíranu amonného (SERVA)

10 µl N, N, N', N'-tetramethylendiamin (TEMED) (SERVA)

**Loadovací pufr pro elektroforézu**

0,755 g Tris (AMRESCO)

7,95 ml glycerolu (VWR)



2,3 g SDS (Roth)  
5 ml 2-merkaptoethanolu (Calbiochem)  
rozpustit v 37,5 ml deionizované vody  
obarvit bromfenolovou modří (Roth)  
upravit na pH 6,8  
doplnit deionizovanou vodou na 50 ml

### **Lyzační roztok**

#### Základní roztok: 100 ml

0,780 g Tris (AMRESCO)  
1,754 g chloridu sodného (mikroChem)  
0,068 g imidazolu (Calbiochem)

#### Přídavky: 10 ml

Phenylmethylsulfonylfluoride (SERVA)  
20 µl EtOH 11,14 g/250 ml (VWR)  
4 µl leupeptinu (SERVA)  
5,25 µl aprotininu (SERVA)  
+  
10 µl Triton X100 (Sigma)  
5 mg lysozymu (SERVA)  
10 µl EDTA (Sigma-Aldrich)  
Úprava na pH 8 – cca 2,5 ml konc. kyseliny chlorovodíkové (36 %) (VWR)

### **Očkovací dávka (na 100 ml)**

10 mg proteinu (rekombinantní antigen OspA/OspC)  
Hydroxid hlinitý (VAC 20)  
rozpustit v PBS

### **Odbarvovací roztok:**

150 ml metanolu (VWR)  
210 ml kyseliny octové (VWR)  
doplnit destilovanou vodou do 3 l

**Pracovní roztok 1x PBS**

900 ml deionizované vody

100 ml zásobního roztoku 10x PBS

**Towbinův transferový pufr**

9 g Tris (AMRESCO)

43,2 g glycinu (VWR)

600 ml methanolu (VWR)

doplnit destilovanou vodou do objemu 3 l

**Tris promývací pufr:**

Základní roztok: 1 l

6,06 g Tris (AMRESCO)

17,54 g chloridu sodného (MikroChem)

1,36 g imidazolu (Calbiochem)

Přidavky: 10 ml

20 µl phenylmethylsulfonylfluoridu (SERVA)

4 µl leupeptinu (SERVA)

5,25 µl aprotininu (SERVA)

Úprava na pH 8

**Zásobní roztok PBS 10x:**

240 g chlorid sodný (MikroChem)

6 g chlorid draselný (Lach-Ner)

40,08 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného (VWR)

6 g dihydrogenfosforečnanu draselného (Lach-Ner)

doplnit do 3 l deionizovanou vodou

### 3.3. Materiál a přístroje

Blotovací papír

Centrifuga sálová (Jouan)

Centrifuga stolní chlazená (Hettich Mikro 22 R)

Dialyzační střívko (Spectra Por)

Digitální váhy (KERN EMB200-2)

Drtič ledu

Elektroforetická nádoba (Bio-Rad)

Elektroforetická skla (Bio-Rad)

Erlenmayerovy baňky skleněné (2 l)

Filtrační papír

Fluorescenční mikroskop (Opton)

Hřebínek na jamky (Bio-Rad)

Kádinky

Kity

Kit pro Imunoblot (LYMECHECK Optima IgG a IgM)

Kit pro vyvolání chemiluminiscence u Westernblot: Supersignal WestPico PLUS

Chemiluminiscent Substrate

Kolona (SIGMA)

Kyvety (250 ml)

Laminární box (TRIGON-PLUS)

Lednice

Magnetická míchačka (HOTPLATE STIRRER SB 162-3)

Mikrozkumavky plastové (2 ml, 5 ml, 50 ml)

Petriho misky

pH-metr (HANNA pH210)

Pipety a pipetovací špičky

Rovnoramenné váhy (CHIXARA)

Sonikátor (Hielscher UP200S)

Spektrofotometr (Lasany)

Stojánek na skla pro elektroforézu (Bio-Rad)

Termoblok (HOEFER TE77X)

Třepačka na gely (IKA KS 130 BASIC)

Třepačka při 4°C (HEIDOPH TITPA MAX)

Třepačka včetně inkubátoru (Edmund Buhler)

Ultrazvukový homogenizátor pro sonikaci

Zdroj napětí (Bio-Rad)

### 3.4. Metodika

#### 3.4.1. Kultivace a purifikace

1. Napipetovat 1000  $\mu$ l bakteriální kultury do 100 ml zkumavky s LB médiem a nechat inkubovat přes noc. Poté přelit celý obsah zkumavky do 1000 ml LB média v 2 l Erlenmayerovy baňky. Následně inkubovat při teplotě 37 °C a třepat do dosažení  $O.D._{600} = 0,6$ . Následně přidat IPTG a nechat 4 hodiny
2. Následně postupně roztoky z Erlenmayerových baněk slévat do předem označených kyvet o objemu 250 ml. Kyvety vyvážit proti sobě buď na lékárnických vahách, nebo pomocí vah digitálních. Vyvážené kyvety centrifugovat 15 min při 4°C a 9000xg. Získaný supernatant odlít do přichystané nádoby s desinfekčním roztokem Sava.
3. Po posledním zcentrifugování supernatant odlít do nádoby s roztokem Sava, rozmíchat pelety v roztoku 1x PBS. Všechny takto rozmíchané pelety slít do jedné kyvety a vyvážit pomocí lékárnických vah nebo vah digitálních proti destilované vodě. Tyto kyvety poté centrifugovat 15 min při 4°C a 9000xg.
4. Vzniklý pelet rozsuspendovat v lyzačním pufru, kdy na 1 gram peletu připadá 10 ml lyzačního pufru
5. Po zcentrifugování odlít supernatant do připravené mikrozukavky o objemu 50 ml.
6. Nadrtit ledové kostky pomocí drtiče a vytvořit ledové šupiny. Na tyto šupiny v kádince umístit mikrozukavky s připraveným supernatantem.
7. Provést sonikaci při 15 opakování po dobu 15 sekund s pauzami 2-3 minuty mezi jednotlivými opakováními. Po ukončení sonikace směs vyvážit proti destilované vodě pomocí lékárnických vah nebo vah digitálních a centrifugovat 15 min při 4°C a 9000xg.
8. Supernatant po centrifugaci slít do vyautoklávované a uzavíratelné nádoby. Přidat Ni-NTA agarosu v poměru 1:10. Takto připravenou směs inkubovat na třepačce 10 min při 4°C.
9. Mezitím upevnit malou kolonu pomocí svorek na stojan do chladničky při 4°C. Do kolony nejdříve nalít 10 ml destilované vody.
10. Po uplynutí doby pro navázání Ni-NTA agarosu tuto směs vlít do připravené kolony. Roztok poté jímat do připravené kádinky o objemu 100 ml. Po protečení celého roztoku, roztok vrátit zpět do nádoby a poté opět nechat protéct přes kolonu.
11. Po protečení směs vrátit zpět do nádoby. Kolonu promýt pomocí 100 ml Tris promývacího pufru. Poté kolonu promýt 100 ml elučního pufru a jímat frakce 1–5,

kdy frakce č. 1-4 jímat do mikrozkušavky o objemu 2 ml a frakci č. 5 do mikrozkušavky o objemu 5 ml.

12. Získané frakce poté umístit do chladničky a přejít k přípravě skel pro diskontinuální SDS-elektroforézu.

### **3.4.2. Diskontinuální SDS-PAGE elektroforéza**

1. Připravit si stojan na umístění skel, která je nutné důkladně umýt ethanolem a destilovanou vodou a osušit.
2. Správně umístit skla do stojanu a připravit si dělicí gel podle návodu.
3. Dělicí gel nalít 1 cm pod vrchní okraj a převrstvit n-butanolem.
4. Po ztuhnutí gelu n-butanol vylít a převrstvit destilovanou vodou. Destilovanou vodu poté odsát pomocí proužků filtračního papíru.
5. Připravit zaostřovací gel podle návodu a převrstvit dělicí gel. Poté vložit hřebínek tak, aby nevznikly bublinky.
6. Vzorky pro elektroforézu smíchat v poměru 1:1 s SDS loadovacím pufr. Takto připravené vzorky umístit do termostatu (95°C) po dobu 10 minut.
7. Do elektroforetické komůrky vložit připravená skla, vyjmout hřebínek a nalít elektrodotový pufr.
8. Vzorky dávkovat podle pořadí: 14 µl barvivo, 4 µl standard, 10 µl vzorek (frakce 1-5), 14 µl barvivo.
9. Poté elektroforetickou komůrku uzavřít, nastavit 180 V po dobu 60 minut.
10. Po uplynutí 60 minut zhodnotit průběh elektroforézy a podle potřeby čas upravit.
11. Vypnout elektroforetickou komůrku, vyjmout skla a připravit fixační roztok.
12. S největší opatrností převést gel do fixačního roztoku a umístit na rolující třepačku na dobu 30 minut.
13. Poté přenést gel do barvicího roztoku na dobu 30 minut a opět umístit na rolující třepačku.
14. Následně gel přenést do odbarvovacího roztoku, kde gel ponechat přes noc na třepačce v chladové místnosti přes noc.
15. Poté provést dialýzu a to tak, že dialyzační střevo nejprve namočit do vody na dobu 10 minut. Poté napipetovat získané vzorky, střevo uzavřít a ponechat v roztoku PBS po dobu 6 hodin. Poté celý postup provést znovu, jen s novou dávkou pufru.

### **3.4.3. Příprava očkovací dávky, aplikace a odběr vzorku**

1. Připravit očkovací dávku podle výše zmíněného návodu.
2. Aplikaci provést na vzorku myši subkutánně při dodržení všech bezpečnostních opatřeních.
3. Po 14 dnech odebrat první vzorek krve z myšního ocasu. Myší ocas umístit pod infralampu a poté ocas naříznout sterilním skalpelem. Vzorek krve poté jímat do označené mikrozkušavky, další potřebné vzorky odebrat stejným postupem, ale v jiných časových intervalech.

### **3.4.4. Imunoblot LYMECHECK Optima IgG a IgM**

1. Nejdříve všechny reagenty 30 minut ponechat temperovat při laboratorní teplotě
2. Mezitím diagnostické proužky umístit do plastové nádoby, jež byla součástí balení a proužky přelít 2 ml ředícího pufru.
3. Poté přidat 20  $\mu$ l neředěného vzorku (krevné sérum z vakcinovaných myší) na každý testovaný proužek a inkubovat 1 hodinu na třepačce.
4. Po 1 hodině plastovou nádobu odstranit z třepačky, opatrně sejmut plastový kryt a roztok odpipetovat do odpadu.
5. Následně přidat 2 ml připraveného promývacího roztoku A, plastovou nádobu opět uzavřít plastovým víkem a po dobu 5 minut ponechat na třepačce, tento postup zopakovat ještě dvakrát.
6. Mezi tím připravit 2 ml konjugátu, kdy na jeden proužek připadá 20  $\mu$ l konjugátu IgG a 2 ml promývacího roztoku A.
7. Po třetím promytí promývacím roztokem A, který byl odpipetován do odpadu, přidat 2 ml připraveného konjugátu, které byly za stejných podmínek inkubovány 45 minut.
8. Po uplynutí 45 minut byl roztok konjugátu odpipetován do odpadu a podle výše zmíněného postupu proužek promýt třikrát 2 ml promývacího roztoku A
9. Po promytí přidat 1,5 ml roztoku substrátu a celou směs inkubovat 8 minut na třepačce.
10. Po 8 minutách roztok substrátu odpipetovat do odpadu a celou reakci zastavit třemi promytími celé směsi destilovanou vodou.
11. Následně proužky vyjmout z plastové nádoby, vysušit mezi filtračními papíry a vyhodnotit.

### 3.4.5. Western blot

1. Nejdříve odebrat vzorky pro celý experiment. Jedná se o vzorky OspA, OspC, konstrukt 09 a Bb.
2. Provést elektroforézu podle výše zmíněného postupu (3.4.2). Vzorky aplikovat podle schématu: mezera – standard – vzorek (1:1 s bromfenolovou modří) – mezera – standard – vzorek – mezera – standard – vzorek – mezera – standard – vzorek – mezera.
3. Mezitím aktivovat membránu sestřiženou do tvaru gelu ponořením do roztoku methanolu na 2 minuty.
4. Po ukončení elektroforézy přenést gel do vaničky s Towbinovým transferovým pufrem. Do druhé vaničky se stejným pufrem dát dva blotovací papíry vystřižené do stejného tvaru jako je tvar gelu a aktivovanou membránu. V roztoku nechat 20 minut
5. Následně poskládat všechny části do přístroje podle schématu: blotovací papír – gel – membrána – blotovací papír. Přístroj připojit ke zdroji napětí při vstupních údajích 20 V a 400 mA po dobu 1 hodiny
6. Vytaženou membránu ponořit na chvíli do roztoku 1 x PBS a nechat v barvicím roztoku

### 3.4.6. Vyhodnocení Westernblotu

1. Připravit 1 l PBS v poměru 9: 1, tzn. 450 ml ddH<sub>2</sub>O a 50 ml 10x PBS. Poté přidat Tween 20 0,5 ml na 1 l roztoku
2. Membránu sestříhnout skalpelem tak, aby vznikly 4 proužky. Tyto proužky přemístit pinzetou do 4 označených Petriho misek. Označení A, C, 09, Bb
3. K nastříhaným membránám přidat na 2 minuty methanol a slít.
4. Membrány poté promýt v pomoci připraveného roztoku PBS, umístit na vířivou třepačku a po 10 minutách slít. Celý postup zopakovat ještě jednou.
5. Mezitím připravit blokovací roztok, kdy na 100 ml připraveného roztoku PBS přidat 1 g albuminu. Petriho misky s proužky sundat z třepačky.
6. Do Petriho misek přidat 7 ml připraveného roztoku albuminu na ponechat na třepačce po dobu 1 hodiny.
7. V mezičase naředit protilátku v poměru 1:1000 (10 µl roztoku protilátky na 10 ml roztoku albuminu), napipetovat do Petriho misek a umístit na třepačku po dobu 1,5 hodiny.



8. Odsát protilátky, 3x promýt roztokem PBS-Tween 20 po dobu 5 minut a umístit na třepačku.
9. Přidat 10 ml sekundární protilátky (antimýší IgG protilátka – konjugát s SHRP; poměr 1:5000) a nechat inkubovat přes noc v chladničce
10. Odsát roztok protilátek a 4x promýt roztok PBS-Tween 20 10 ml po 10 minutách na třepačce.
11. Poté 2x promýt 100 ml zředěného roztoku 10x PBS, tzn. 90 ml ddH<sub>2</sub>O na 10 ml 10x PBS po dobu 10 minut.
12. Pro vyvolání chemiluminiscence použít zakoupený komerční kit.
13. Membrány z Petriho misek pomocí pinzety přenést do jedné vaničky.
14. Podle návodu výše zmíněného kitu připravit 8 ml pracovního roztoku v poměru 1:1 a přidat k membránám. Roztok se skládá ze stabilního peroxidového roztoku a roztoku luminolu. Takto připravený roztok přidat k nastříhaným částem membrány do vaničky.
15. Pomocí přístroje pořídit příslušné fotografie a vyhodnotit.

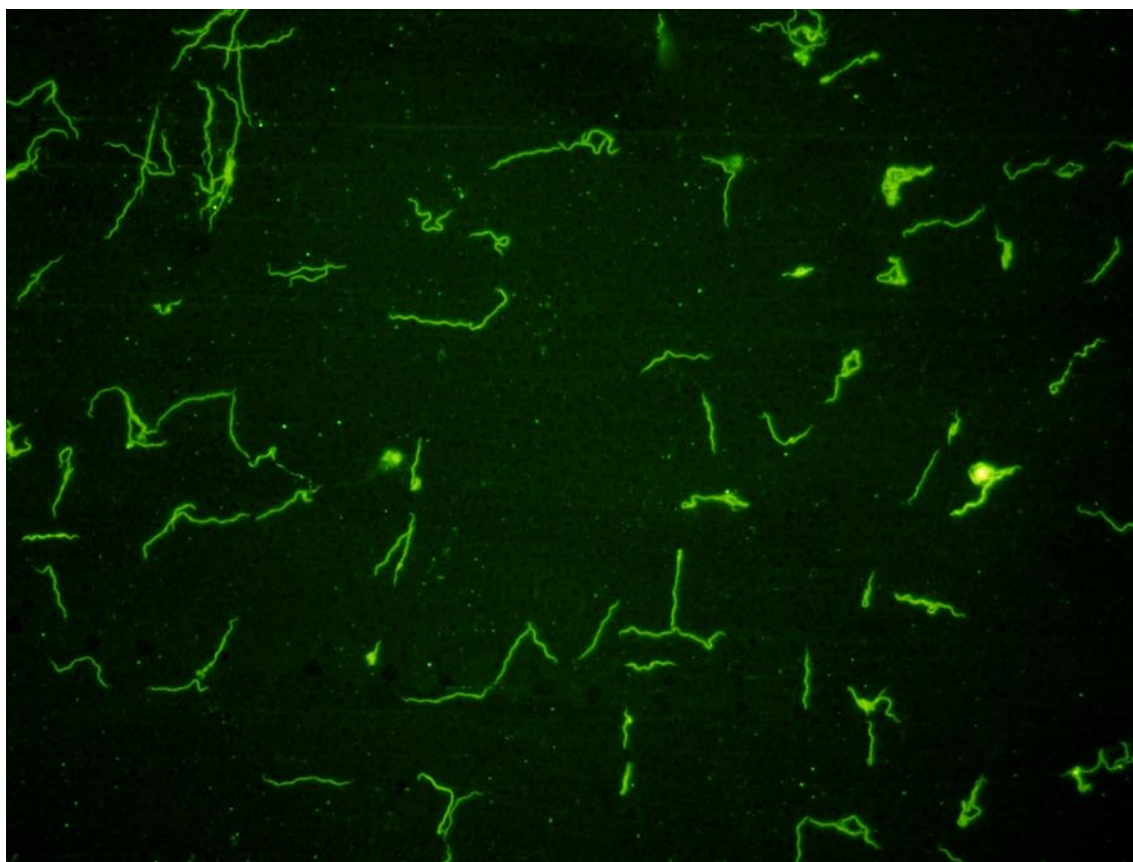
### **3.4.7. Fluorescenční mikroskopie**

1. 1 ml bakteriální kultury centrifugovat v 1,5 ml zkumavce při laboratorní teplotě, při 2500xg 10 minut
2. Pelet promýt 1 ml PBS o laboratorní teplotě
3. Promytý pelet rozsuspendovat v 500 µl PBS o laboratorní teplotě
4. Přidat 500 µl PBS obsahujícího 10 µl CFSE
5. Protřepat zkumavku a inkubovat ve tmě po dobu 10 minut
6. Centrifugovat při 2500xg 10 minut při laboratorní teplotě
7. Rozsuspendovat pelet v PBS s 5% FBS
8. Centrifugovat vzorek při 2500xg 10 minut při laboratorní teplotě
9. Rozsuspendovat pelet v PBS s 5% FBS
10. Roztok umístit na podložní sklíčko, umístit do fluorescenčního mikroskopu a pořídit fotografie

#### 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Ve své praktické části jsem se nejdříve zaměřil na kultivaci a vizualizaci samotné bakterie *B. burgdorferi* (Obr. 11). K vizualizaci bylo využito fluorescenční barvení, jehož postup byl popsán výše. K pořízení samotné fotografie byl využit fluorescenční mikroskop. Mikroskopii jsme prokázali nárůst bakterií spirální morfologie typické pro spirochety.

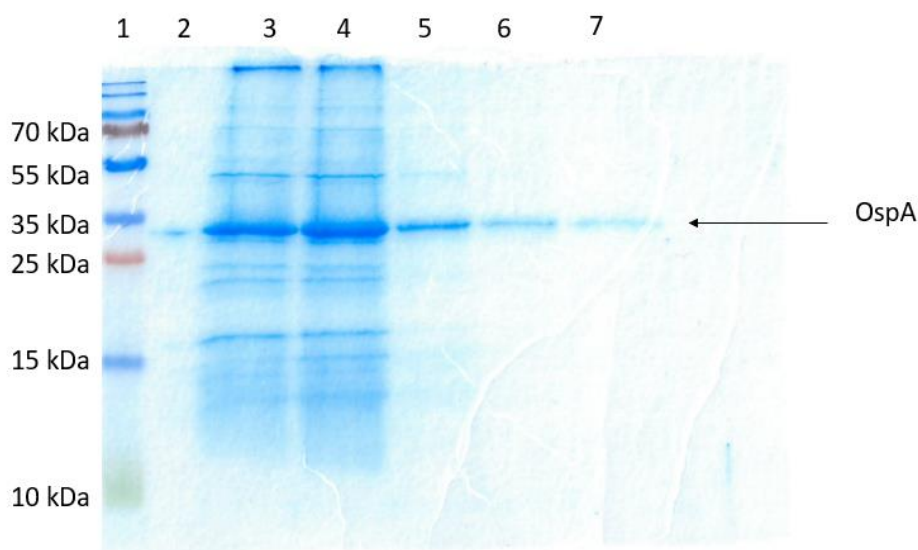
Cystická forma, která je pro tyto bakterie typická, zde není moc dobře vidět. Tyto formy mohou být z určité části zodpovědné za přetrvávající potíže při léčbě onemocnění.



Obr. 11: Fotografie pořízená pomocí fluorescenčního mikroskopu. Jedná se o bakterie *B. burgdorferi*. Zvětšeno 400x. Autoři: Michal Křupka, Stanislav Číkl

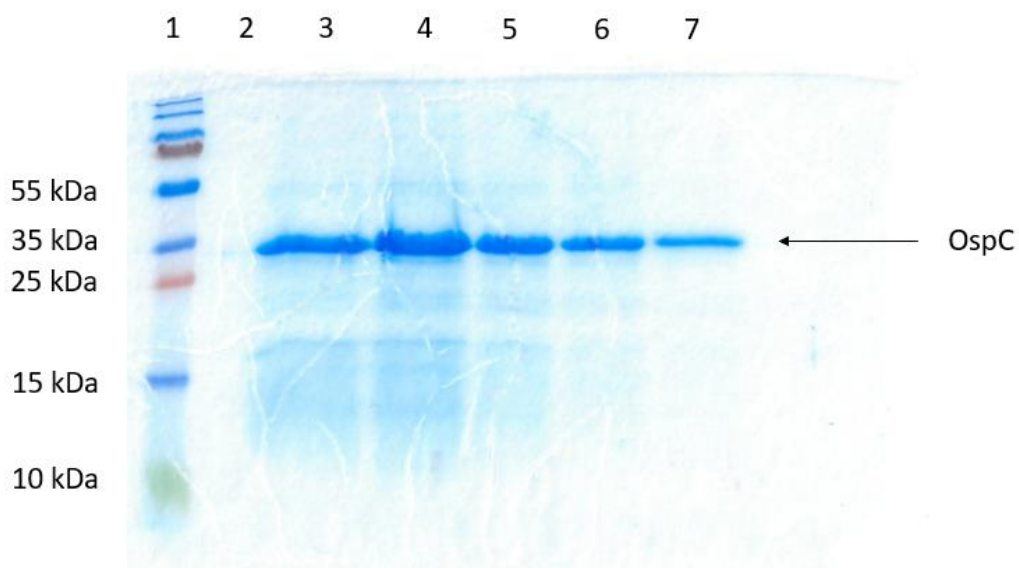
K vyhodnocení purifikačních procesů byla použita metoda SDS-PAGE diskontinuální elektroforézy. Použité vzorky byly jímány po použití elučního pufru. První čtyři frakce byly jímány do zkumavek o objemu 2 ml, poslední frakce do zkumavky o objemu 5 ml. Námi hledané rekombinantní antigeny OspA, OspC a DbpA byly identifikovány na základě srovnání bandu proteinu a bandu standardu molekulových hmotností. Molekulová hmotnost je podle literatury pro OspA je 31 kDa, pro OspC 23 kDa a pro DbpA 20 kDa.

Jak můžeme vidět na obr. 12, tak rekombinantní antigen OspA se nám podařilo vyizolovat poměrně v čisté podobě. U prvních dvou frakcí (jamky č. 3 a 4) jsou vidět kromě cílového proteinu i další slabší bandy. S největší pravděpodobností se může jednat o proteiny z bakterie *E. coli*. Třetí, čtvrtá i pátá frakce (jamky č. 5, 6 a 7) obsahuje relativně čistý rekombinantní antigen OspA, jen u poslední frakce je patrné, že koncentrace tohoto proteinu již není příliš vysoká. Zřejmě bychom proteiny z *E. coli* pozorovali u dalších vzorků, ale vzorky 3, 4 a 5 již nejsou tak koncentrované jako první dva.



Obr. 12: Obr. Elektroforeogram pěti získaných vzorků rekombinantního antigenu OspA. V jamce č. 1 – PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, jamka č. 2 – možná kontaminace, jamka č. 3 – 7 pět získaných vzorků rekombinantního antigenu OspA.

Na obr. 13 je patrný výsledek purifikace rekombinantního antigenu OpsC, kde je možné pozorovat, že první dvě frakce obsahují i jiné složky než námi hledaný rekombinantní protein. Jako v případě OspA, i zde se s největší pravděpodobností jedná o proteiny z *E. coli*. Tyto proteiny bychom nejspíše viděli i u dalších tří vzorků, pokud by byly stejně koncentrované jako předešlé. Poslední tři frakce tedy obsahují více méně čistý, námi hledaný, antigen.

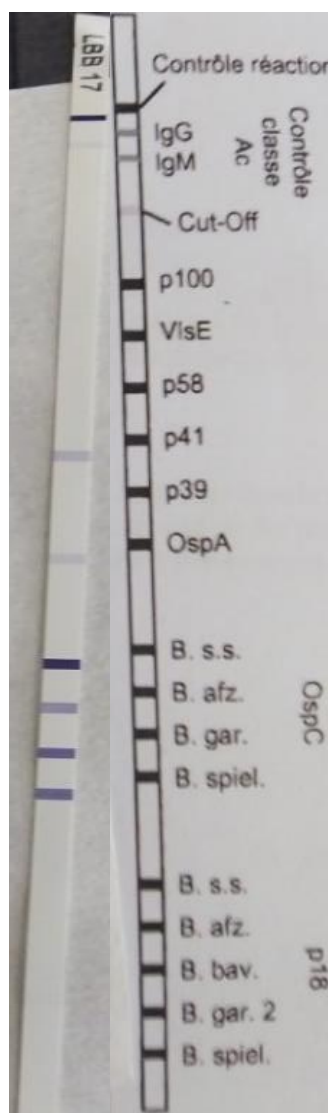


Obr. 13: Leketroforeogram pěti získaných vzorků rekombinantního antigenu OspC. Jamka č. 1 – PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, jamka č. 2 – prázdná, jamka č. 3 – 7 pět získaných vzorků rekombinantního antigenu OspC.

U rekombinantního antigenu DbpA nastal problém v tom, že po provedení purifikačních procesů, jímání pěti frakcí a diskontinuální SDS-PAGE elektroforézy nebyly patrné bandy tohoto proteinu na gelu. Celý proces byl proveden několikrát, ale vždy bez úspěchu.

Rekombinantní antigeny OspA a OspC byly dále použity k přípravě vakcinační dávky, ale až po proběhnutí dialyzačních procesů, od kterých jsme očekávali další přečištění těchto rekombinantních antigenů.

Test Imunoblotu (Obr. 14) byl vyhodnocen pouze vizuálně. Jako správnost celého testu slouží kontrolní proužek, který značí pozitivitu (izotopová kontrola). Je možné vidět, že slabou pozitivitu vykazuje OspA a p41, což je flagelin. Tento protein se vyskytuje při valné většině všech bakteriálních onemocnění, což znamená, že pro onemocnění Lymeská borelióza a konkrétně pro infekci *B. burgdorferi* není specifický. Za jednoznačně pozitivní lze považovat OspC, konkrétně *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii* a *B. spielmani*.



Obr. 14: Výsledek testu Imunoblot. Autoři: Kristýna Sloupenská, Stanislav Číkl

V poslední části mé praktické části byl proveden sérologický test, konkrétně Western blot (Obr. 15). Nejdříve byla provedena elektroforéza podle postupu popsáno výše. Poté byl proveden samotný Western blot, jehož vyhodnocení bylo provedeno pomocí chemiluminiscence.

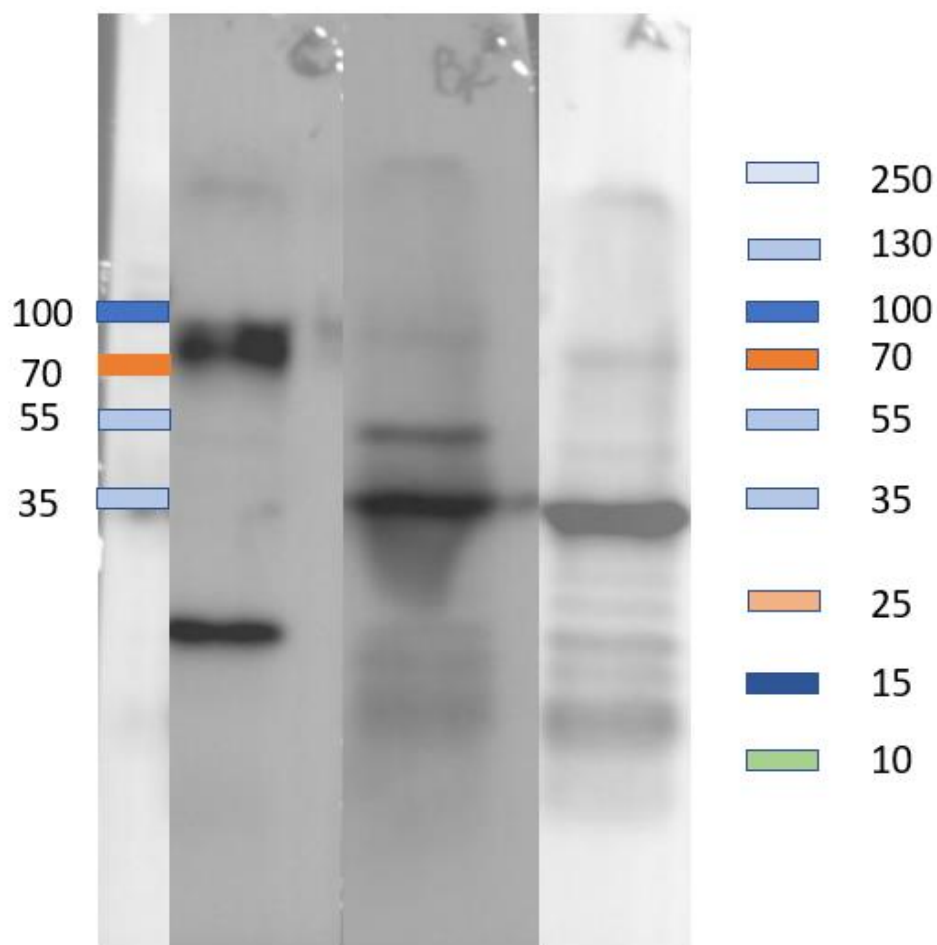
První proužek je proužek obsahující OspC. Na tomto proužku je patrné silné pozadí. Jsou patrné dvě velmi silné odezvy. První se nachází v oblasti 70–100 kDa ( $M_r=70\ 000 - 100\ 000$ ) a druhá se nachází v oblasti 25 kDa ( $M_r=25\ 000$ ). Podle literatury je hmotnost tohoto proteinu 23 kDa ( $M_r=23\ 000$ ).

Druhým proužkem v pořadí je proužek obsahující Bb, který představuje celobuněčnou vakcínu. Tato vakcína obsahovala bakterie *B. burgdorferi* inaktivované formaldehydem.

V tomto případě dostáváme dvě silné odezvy. První je v oblasti 55 kDa ( $M_r=55\ 000$ ) a druhá v oblasti 35 kDa ( $M_r=35\ 000$ ).

Posledním je proužek obsahující OspA. Zde dostáváme tři silné odezvy. První je v oblasti 70 kDa ( $M_r=70\ 000$ ), druhá v oblasti 35 kDa ( $M_r=35\ 000$ ) a třetí v oblasti 10 kDa ( $M_r=10\ 000$ ). Druhá odezva je shodná s odezvou pro celobuněčnou vakcínu Bb. Podle výše zmíněných literárních pramenů je hmotnost samotného proteinu 31 kDa ( $M_r=31\ 000$ ).

Můžeme tedy říct, že oba dva pásy mají nejsilnější odezvu v oblasti 35 kDa ( $M_r=35\ 000$ ). Pokud bychom chtěli vyvodit nějaký závěr, tak všechny výše uvedené informace můžeme vztáhnout k celobuněčné vakcíně. Z toho vyvozují, že vzorky z vakcíny Bb obsahovaly OspA a že tento protein je protein syntetizovaný v časně fázi infekce, což odpovídá i literárním pramenům.



Obr. 15: Výsledky Western blotu. Zleva: séra myši imunizovaných antigenem OspC, celobuněčnou inaktivovanou vakcínou Bb, monovalentním antigenem OspA. Použitý standard: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder. Autoři: Kristýna Sloupenská, Stanislav Číkl



## 5. ZÁVĚR

Teoretická část si dala za cíl shrnout dosavadní znalosti o biologii rodu *Borrelia* a konkrétně druhového komplexu *B. burgdorferi* sensu lato (Bbsl). Byla provedena i literární rešerše a zpracována stručná charakteristika povrchových proteinů včetně těch, které byly později využity v praktické části. Následoval popis samotného onemocnění Lymeská borelióza a jejich fází. Dále byla shrnuta nejnovější data o epidemiologické situaci v ČR včetně charakterizace vektoru, tj. klíštěte *Ixodes ricinus*. Závěr teoretické části se pak věnuje popisu léčby a také vakcín, které byly doposud na trh uvedeny.

V praktické části jsem se zaměřil na produkci hyperimunních sér, k jejíž produkci byly využity dva ze tří vybraných proteinů. Nejdříve se mělo jednat o použití rekombinantních antigenů OspA, OspC a DbpA. S těmito proteiny byl proveden také celý purifikační proces, který byl zakončen SDS-PAGE diskontinuální elektroforézou s použitím standardu pro zjištění přítomnosti požadovaných proteinů na základě porovnání molekulových hmotností. Při vyhodnocení gelu s DbpA bylo zjištěno, že se nám tento protein nepodařilo vyizolovat v dostatečném množství a ani kvalitě. Po dohodě s vedoucím práce bylo dohodnuto, že budou použity pouze dva proteiny, a to OspA a OspC.

Dále bylo přistoupeno k přípravě očkovací dávky, její aplikaci do vzorku myší subkutánně a odebrání vzorků pro provedení testu na detekci protilátek (Imuno blot) a také pro provedení metody Western blot. V poslední části byla provedena fluorescenční mikroskopie kultury bakterie *B. burgdorferi*.

Celý tento experiment je jen jednou částí z celého projektu. Výsledkem této první části mělo být získání a prokázání přítomnosti protilátek proti třem rekombinantním antigenům. To se nám ale podařilo jen u dvou ze tří požadovaných proteinů.

V další části budou použity získané protilátky proti OspA a OspC a budou provedeny specifické detekce *Borrelii* v různých kultivačních podmínkách.

Všechny námi vytyčené cíle byly splněny.

## 6. LITERATURA

ANGUITA, Juan, Nandhini RAMAMOORTHY, Joppe W.R HOVIUS, et al., 2002. Salp15, an *Ixodes scapularis* Salivary Protein, Inhibits CD4 T Cell Activation. *Immunity* [online]. 16(6), 849-859 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1016/S1074-7613(02)00325-4. ISSN 10747613. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761302003254>

ARVIKAR, Sheila L. a Allen C. STEERE, 2015. Diagnosis and Treatment of Lyme Arthritis. *Infectious Disease Clinics of North America* [online]. 29(2), 269-280 [cit. 2020-01-26]. DOI: 10.1016/j.idc.2015.02.004. ISSN 08915520. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552015000185>

BAMM, Vladimir V., Jordan T. KO, Iain L. MAINPRIZE, Victoria P. SANDERSON a Melanie K. B. WILLS, 2019. Lyme Disease Frontiers: Reconciling *Borrelia* Biology and Clinical Conundrums. *Pathogens* [online]. 8(4) [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.3390/pathogens8040299. ISSN 2076-0817. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2076-0817/8/4/299>

BARBOUR, A G, S L TESSIER a W J TODD, 1983. Lyme disease spirochetes and ixodid tick spirochetes share a common surface antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. *Infection and Immunity* [online]. 41(2), 795-804 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1128/IAI.41.2.795-804.1983. ISSN 0019-9567. Dostupné z: <https://IAI.asm.org/content/41/2/795>

BARBOUR, AG, 1984. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE*. 57(4), 521-525.

BECKER, Michael, Jonas BUNIKIS, Barbara D. LADE, John J. DUNN, Alan G. BARBOUR a Catherine L. LAWSON, 2005. Structural Investigation of *Borrelia burgdorferi* OspB, a Bactericidal Fab Target. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 280(17), 17363-17370 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1074/jbc.M412842200. ISSN 0021-9258. Dostupné z: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M412842200>

BEŇOVSKÁ, Miroslava a Petr BREINEK, 2011. Imunoanalytické metody. *Klinická biochemie: bakalářský obor Zdravotní laborant. 2., přepracované vydání*. Brno: Coprint s r.o. ISBN 978-80-87192-18-4.

BERGSTROM, S., L. NOPPA, A. GYLGE a Y. OSTBERG, 2002. Molecular and Cellular Biology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. GRAY, J.S., O KAHL, R.S. LANE a G. STANEK.

Lyme Borreliosis–Biology, Epidemiology and Control. Wallingford, Oxon, UK: CAB International. ISBN 0851996329.

BORCHERS, Andrea T., Carl L. KEEN, Arthur C. HUNTLEY a M. Eric GERSHWIN, 2015. Lyme disease: A rigorous review of diagnostic criteria and treatment. *Journal of Autoimmunity* [online]. 57, 82-115 [cit. 2020-01-26]. DOI: 10.1016/j.jaut.2014.09.004. ISSN 08968411. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896841114001334>

BRISSETTE, Catherine A., Anne E. COOLEY, Logan H. BURNS, Sean P. RILEY, Ashutosh VERMA, Michael E. WOODMAN, Tomasz BYKOWSKI a Brian STEVENSON, 2008. Lyme borreliosis spirochete Erp proteins, their known host ligands, and potential roles in mammalian infection. *International Journal of Medical Microbiology* [online]. 298, 257-267 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.1016/j.ijmm.2007.09.004. ISSN 14384221. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1438422107001683>

BRISSON, Dustin, Dan DRECKTRAH, Christian H. EGGERS a D. Scott SAMUELS, 2012. Genetics of *Borrelia burgdorferi*. *Annual Review of Genetics* [online]. 46(1), 515-536 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1146/annurev-genet-011112-112140. ISSN 0066-4197. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-genet-011112-112140>

BUBECK-MARTINEZ, Sarah, 2005. Immune evasion of the lyme disease spirochetes. *Frontiers in Bioscience* [online]. 10(1-3), 873-878 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.2741/1581. ISSN 10939946. Dostupné z: <http://www.bioscience.org/2005/v10/af/1581/list.htm>

CARDENAS-DE LA GARZA, Jesus Alberto, Estephania DE LA CRUZ-VALADEZ, Jorge OCAMPO-CANDIANI a Oliverio WELSH, 2019. Clinical spectrum of Lyme disease. *EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY & INFECTIOUS DISEASES* [online]. 38(2), 201-208 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1007/s10096-018-3417-1. ISSN 0934-9723. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-018-3417-1>

CERAR, Daša, Tjaša CERAR, Eva RUŽIĆ-SABLJIĆ, Gary P. WORMSER a Franc STRLE, 2010. Subjective Symptoms after Treatment of Early Lyme Disease. *The American Journal of Medicine* [online]. 123(1), 79-86 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1016/j.amjmed.2009.05.011. ISSN 00029343. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002934309005026>

CROWLEY, H. a B. T. HUBER, 2003. Host-Adapted *Borrelia burgdorferi* in Mice Expresses OspA during Inflammation. *Infection and Immunity* [online]. 71(7), 4003-4010 [cit. 2020-03-13].

DOI: 10.1128/IAI.71.7.4003-4010.2003. ISSN 0019-9567. Dostupné z:  
<http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.71.7.4003-4010.2003>

DUNHAM-EMS, Star M., Melissa J. CAIMANO, Christian H. EGGERS, Justin D. RADOLF a Jenifer COBURN, 2012. *Borrelia burgdorferi* Requires the Alternative Sigma Factor RpoS for Dissemination within the Vector during Tick-to-Mammal Transmission. *PLoS Pathogens* [online]. 8(2) [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002532. ISSN 1553-7374. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002532>

FEDER, Henry M., Barbara J.B. JOHNSON, Susan O'CONNELL, Eugene D. SHAPIRO, Allen C. STEERE a Gary P. WORMSER, 2007. A Critical Appraisal of "Chronic Lyme Disease". *New England Journal of Medicine* [online]. 357(14), 1422-1430 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1056/NEJMra072023. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra072023>

FENG, Sunlian, Emir HODZIC, Brian STEVENSON a Stephen W. BARTHOLD, 1998. Humoral Immunity to *Borrelia burgdorferi* N40 Decorin Binding Proteins during Infection of Laboratory Mice. *Infection and Immunity* [online]. 66(6), 2827-2835 [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1128/IAI.66.6.2827-2835.1998. ISSN 1098-5522. Dostupné z: <https://IAI.asm.org/content/66/6/2827>

FIKRIG, E, S W BARTHOLD, F S KANTOR a R A FLAVELL, 1992. Long-term protection of mice from Lyme disease by vaccination with OspA. *Infection and Immunity* [online]. 60(3), 773-777 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1128/IAI.60.3.773-777.1992. ISSN 0019-9567. Dostupné z: <https://IAI.asm.org/content/60/3/773>

FRASER, Claire M., Sherwood CASJENS, Wai Mun HUANG, et al., 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*. 390(6660), 580-586. DOI: 10.1038/37551. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/37551>

FRASER, Claire M., Sherwood CASJENS, Wai Mun HUANG, et al., 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* [online]. 390(6660), 580-586 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1038/37551. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/37551>

GARCIA, R. C., R. MURGIA a M. CINCO, 2005. Complement Receptor 3 Binds the *Borrelia burgdorferi* Outer Surface Proteins OspA and OspB in an iC3b-Independent Manner. *Infection*

and Immunity [online]. 73(9), 6138-6142 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1128/IAI.73.9.6138-6142.2005. ISSN 0019-9567. Dostupné z: <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.73.9.6138-6142.2005>

GARG, Renu, Ignacio J. JUNCADELLA, Nandhini RAMAMOORTHY, et al., 2006. Cutting Edge: CD4 Is the Receptor for the Tick Saliva Immunosuppressor, Salp15. The Journal of Immunology [online]. 177(10), 6579-6583 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.4049/jimmunol.177.10.6579. ISSN 0022-1767. Dostupné z: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.177.10.6579>

GE, Yigong, Chunhao LI, Linda CORUM, Clive A. SLAUGHTER a Nyles W. CHARON, 1998. Structure and Expression of the FlaA Periplasmic Flagellar Protein of *Borrelia burgdorferi*. Journal of Bacteriology [online]. 180(9), 2418-2425 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1128/JB.180.9.2418-2425.1998. ISSN 1098-5530. Dostupné z: <https://JB.asm.org/content/180/9/2418>

GROSHONG, Ashley M., Abhishek DEY, Irina BEZSONOVA, Melissa J. CAIMANO, Justin D. RADOLF a Steven J. PROJAN, 2017. Peptide Uptake Is Essential for *Borrelia burgdorferi* Viability and Involves Structural and Regulatory Complexity of its Oligopeptide Transporter. MBio [online]. 8(6), e02047-17 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1128/mBio.02047-17. ISSN 2150-7511. Dostupné z: <http://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.02047-17>

GUY, E., 1991. *Borrelia burgdorferi* in urban parks. The Lancet [online]. 338(8761) [cit. 2020-01-31]. DOI: 10.1016/0140-6736(91)90392-3. ISSN 01406736. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0140673691903923>

HAGMAN, K.E., X. YANG, S.K. WIKEL, G.B. SCHOELER, M.J. CAIMANO, J.D. RADOLF a M.V. NORGDARD, 2000. Decorin-binding protein A (DbpA) of *Borrelia burgdorferi* is not protective when immunized mice are challenged via tick infestation and correlates with the lack of DbpA expression by *B. burgdorferi* in ticks. Infect. Immun. 68, 4759-4764.

HALPERIN, John J., 2019. Lyme neuroborreliosis. Current Opinion in Infectious Diseases [online]. 32(3), 259-264 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000545. ISSN 0951-7375. Dostupné z: <http://Insights.ovid.com/crossref?an=00001432-201906000-00014>

HAMMERSCHMIDT, Claudia, Teresia HALLSTRÖM, Christine SKERKA, Reinhard WALLICH, Brian STEVENSON, Peter F. ZIPFEL a Peter KRAICZY, 2012. Contribution of the

Infection-Associated Complement Regulator-Acquiring Surface Protein 4 (ErpC) to Complement Resistance of *Borrelia burgdorferi*. *Clinical and Developmental Immunology* [online]. 2012, 1-12 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.1155/2012/349657. ISSN 1740-2522. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/jir/2012/349657/>

HOFMEESTER, T R, E C COIPAN, S E VAN WIEREN, H H T PRINS, W TAKKEN a H SPRONG, 2016. Few vertebrate species dominate the *Borrelia burgdorferi* s.l. life cycle. *Environmental Research Letters* [online]. 11(4) [cit. 2020-01-31]. DOI: 10.1088/1748-9326/11/4/043001. ISSN 1748-9326. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/1748-9326/11/i=4/a=043001?key=crossref.29d02a95fe1afb8cce3856898d0d6b00>

HOROWITZ, Harold W., Maria E. AGUERO-ROSENFELD, Diane HOLMGREN, Donna MCKENNA, Ira SCHWARTZ, Mary E. COX a Gary P. WORMSER, 2013. Lyme Disease and Human Granulocytic Anaplasmosis Coinfection: Impact of Case Definition on Coinfection Rates and Illness Severity. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 56(1), 93-99 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1093/cid/cis852. ISSN 1537-6591. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/cis852>

HOWE, T., L. MAYER a A. BARBOUR, 1985. A single recombinant plasmid expressing two major outer surface proteins of the Lyme disease spirochete. *Science* [online]. 227(4687), 645-646 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1126/science.3969554. ISSN 0036-8075. Dostupné z: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.3969554>  
<http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/643>

HUGHES, J.M. a D.J. GUBLER, 1999. Recommendations for the use of Lyme disease vaccine. *ARCHIVES OF DERMATOLOGY*. 11(135), 1425-1426.

HULÍNSKÁ, Dagmar, 2013. Diagnostika. Lymeská borelióza. 4., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4355-4.

Klíště obecné, 2020. In: Scalibor [online]. Praha 5: Intervet [cit. 2020-03-12]. Dostupné z: <http://www.scalibor.cz/Parazite/KlisteObecne>

KRAUSE, Peter J. a Linda K. BOCKENSTEDT, 2013. Lyme Disease and the Heart. *Circulation* [online]. 127(7), E451-E454 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.101485. ISSN 0009-7322. Dostupné z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.101485>

KRUPKA, Michal, Milan RASKA, Jana BELAKOVA, Milada HORYNOVA, Radko NOVOTNY a Evzen WEIGL, 2007. BIOLOGICAL ASPECTS OF LYME DISEASE SPIROCHETES: UNIQUE BACTERIA OF THE BORRELIA BURGDOFFERI SPECIES GROUP. *Biomedical Papers* [online]. 151(2), 175-186 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.5507/bp.2007.032. ISSN 12138118. Dostupné z: <http://biomed.papers.upol.cz/doi/10.5507/bp.2007.032.html>

KRZEMIEN, Paweł Jan, 2017. ROLE OF VlsE/C6 ANTIGEN AS A MARKER FOR EARLY LYME BORRELIOSIS DIAGNOSIS AND MONITORING THE EFFECTIVENESS OF ITS TREATMENT. *Health Problems of Civilization* [online]. 2(11), 87-92 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.5114/hpc.2017.69023. ISSN 2353-6942. Dostupné z: <https://www.termedia.pl/doi/10.5114/hpc.2017.69023>

KŘÍŽ, B, Martin GAŠPÁREK a Helena ŠEBESTOVÁ, 2017. Situace ve výskytu Lymeské boreliózy v roce 2016 v České republice [online]. In: . Praha: Státní zdravotní ústav [cit. 2020-03-12]. Dostupné z: [http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Lymeska\\_borelioza/Situace\\_ve\\_vyskytu\\_Lymeske\\_boreliozy\\_v\\_roce\\_2016\\_v\\_Ceske\\_republice.pdf](http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Lymeska_borelioza/Situace_ve_vyskytu_Lymeske_boreliozy_v_roce_2016_v_Ceske_republice.pdf)

KŘUPKA, Michal, Adéla RUBEŠOVÁ a Ondřej HOLÝ, 2019. Existuje chronická lymeská borelióza? *Alergie*. 1(4), 253-258.

LÄHTEENMÄKI, Kaarina, Pentti KUUSELA a Timo K. KORHONEN, 2001. Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 25(5), 531-552 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00590.x. ISSN 1574-6976. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00590.x>

LEONG, John M., Linden T. HU a Magnus HOOK, 2010. Pathobiology of Lyme disease *Borrelia*. SAMUELS, D. Scott a Justin D. RADOLF. *Borrelia Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis*. Norfolk, UK: Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-58-5.

LI, X., G. NEELAKANTA, X. LIU, D. S. BECK, F. S. KANTOR, D. FISH, J. F. ANDERSON a E. FIKRIG, 2007. Role of Outer Surface Protein D in the *Borrelia burgdorferi* Life Cycle. *Infection and Immunity* [online]. 75(9), 4237-4244 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1128/IAI.00632-07. ISSN 0019-9567. Dostupné z: <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.00632-07>

Lymeská borelióza, 2015. In: Avenier [online]. Brno: Avenier [cit 2020-03-12]. Dostupné z: <https://www.ockovacentrum.cz/cz/lymska-borelioza>

MARCONI, R T, D S SAMUELS a C F GARON, 1993. Transcriptional analyses and mapping of the ospC gene in Lyme disease spirochetes. *Journal of Bacteriology* [online]. 175(4), 926-932 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1128/JB.175.4.926-932.1993. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <https://JB.asm.org/content/175/4/926>

MASUZAWA, T., N. TAKADA, M. KUDEKEN, et al., 2001. *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. 51(5), 1817-1824 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1099/00207713-51-5-1817. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-51-5-1817>

MEAD, Paul S., 2015. Epidemiology of Lyme Disease. *Infectious Disease Clinics of North America* [online]. 29(2), 187-210 [cit. 2020-01-26]. DOI: 10.1016/j.idc.2015.02.010. ISSN 08915520. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552015000240>

MOTALEB, M. A., L. CORUM, J. L. BONO, A. F. ELIAS, P. ROSA, D. S. SAMUELS a N. W. CHARON, 2000. *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 97(20), 10899-10904 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1073/pnas.200221797. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.200221797>

NEELAKANTA, Girish, Xin LI, Utpal PAL, et al., 2007. Outer Surface Protein B Is Critical for *Borrelia burgdorferi* Adherence and Survival within Ixodes Ticks. *PLoS Pathogens* [online]. 3(3), 06-PLPA-RA-0492R2 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030033. ISSN 1553-7366. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.0030033>

NEMETH, J, E BERNASCONI, U HEININGER, et al., 2016. Update of the Swiss guidelines on post-treatment Lyme disease syndrome. *Swiss Medical Weekly* [online]. (146) [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.4414/smw.2016.14353. ISSN 1424-7860. Dostupné z: <http://doi.emh.ch/smw.2016.14353>

OGRINC, Katarina, Lara LUSA, Stanka LOTRIČ-FURLAN, Petra BOGOVIČ, Daša STUPICA, Tjaša CERAR, Eva RUŽIČ-SABLJIČ a Franc STRLE, 2016. Course and Outcome of Early European Lyme Neuroborreliosis (Bannwarth Syndrome): Clinical and Laboratory Findings.



Clinical Infectious Diseases [online]. 63(3), 346-353 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1093/cid/ciw299. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/ciw299>

OJAIMI, C., C. BROOKS, S. CASJENS, et al., 2003. Profiling of Temperature-Induced Changes in *Borrelia burgdorferi* Gene Expression by Using Whole Genome Arrays. Infection and Immunity [online]. 71(4), 1689-1705 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1128/IAI.71.4.1689-1705.2003. ISSN 0019-9567. Dostupné z: <http://iai.asm.org/cgi/doi/10.1128/IAI.71.4.1689-1705.2003>

ORNDORFF, P. E., Jonas BUNIKIS a Alan G. BARBOUR, 1999. Access of Antibody or Trypsin to an Integral Outer Membrane Protein (P66) of *Borrelia burgdorferi* Is Hindered by Osp Lipoproteins. Infection and Immunity [online]. 67(6), 2874-2883 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1128/IAI.67.6.2874-2883.1999. ISSN 1098-5522. Dostupné z: <https://IAI.asm.org/content/67/6/2874>

PATRICK, David M., Ruth R. MILLER, Jennifer L. GARDY, et al., 2015. Lyme Disease Diagnosed by Alternative Methods: A Phenotype Similar to That of Chronic Fatigue Syndrome. Clinical Infectious Diseases [online]. 61(7), 1084-1091 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1093/cid/civ470. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/civ470>

PCR, 2019. LAB Guide, Průvodce laboratoří [online]. lab guide [cit. 2020-03-12]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/pcr/>

PÍCHA, Dušan, 2013. Patogeneze. Lymeská borelióza. 4., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4355-4.

PLOTKIN, Stanley A., 2011. Correcting a Public Health Fiasco: The Need for a New Vaccine against Lyme Disease. Clinical Infectious Diseases [online]. 52(suppl\_3), s271-s275 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1093/cid/ciq119. ISSN 1537-6591. Dostupné z: [http://academic.oup.com/cid/article/52/suppl\\_3/s271/445092/Correcting-a-Public-Health-Fiasco-The-Need-for-a](http://academic.oup.com/cid/article/52/suppl_3/s271/445092/Correcting-a-Public-Health-Fiasco-The-Need-for-a)

POLAND, Gregory A., 2011. Vaccines against Lyme Disease: What Happened and What Lessons Can We Learn? Clinical Infectious Diseases. 52(suppl\_3), s253-s258. DOI: 10.1093/cid/ciq116. ISSN 1537-6591. Dostupné také z:

[http://academic.oup.com/cid/article/52/suppl\\_3/s253/444754/Vaccines-against-Lyme-Disease-What-Happened-and](http://academic.oup.com/cid/article/52/suppl_3/s253/444754/Vaccines-against-Lyme-Disease-What-Happened-and)

Prescott L., M., Harley J. P., Klein D. A., Microbiology, WCB, Dubuque, 1996, ISBN 0-697-29390-4.

RANDOLPH, S. E. Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. *Parasitology* [online]. 2004, 129(S1), S37-S65 [cit. 2020-01-29]. DOI: 10.1017/S0031182004004925. ISSN 0031-1820. Dostupné z: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182004004925/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182004004925/type/journal_article)

ROSTAND, KS a JD ESKO, 1997. Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. *INFECTION AND IMMUNITY*. 65(1), 1-8.

ROSTOFF, Pawel, Grzegorz GAJOS, Ewa KONDURACKA, Andrzej GACKOWSKI, Jadwiga NESSLER a Wieslawa PIWOWARSKA, 2010. Lyme carditis: Epidemiology, pathophysiology, and clinical features in endemic areas. *International Journal of Cardiology* [online]. 144(2), 328-333 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1016/j.ijcard.2009.03.034. ISSN 01675273. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167527309002897>

RpoN, 2020. In: UniProt [online]. UniProt Consortium [cit. 2020-03-29]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P24255>

RpoS, 2020. In: UniProt [online]. UniProt Consortium [cit. 2020-03-29]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P13445>

RUDENKO, Nataliia, Maryna GOLOVCHENKO, Libor GRUBHOFFER a James H. OLIVER, 2011. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks and Tick-borne Diseases* [online]. 2(3), 123-128 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2011.04.002. ISSN 1877959X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X11000379>

SCHEFFOLD, Norbert, Bernhard HERKOMMER, Reinhard KANDOLF a Andreas E. MAY, 2015. Lyme Carditis-Diagnosis, Treatment and Prognosis. *Deutsches Aerzteblatt Online* [online]. 112(12), 202-U31 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.3238/arztebl.2015.0202. ISSN 1866-0452. Dostupné z: <https://www.aerzteblatt.de/10.3238/arztebl.2015.0202>

SCHWARZBACH, Armin, Anni HERRANEN, Leona GILBERT a Leena MERILÄINEN, 2015. Morphological and biochemical features of *Borrelia burgdorferi* pleomorphic forms. *Microbiology* [online]. 161(3), 516-527 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1099/mic.0.000027. ISSN 1350-0872. Dostupné z:

<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.000027>

SIEGEL, Corinna, Teresia HALLSTRÖM, Christine SKERKA, et al., 2010. Complement Factor H-Related Proteins CFHR2 and CFHR5 Represent Novel Ligands for the Infection-Associated CRASP Proteins of *Borrelia burgdorferi*. *PLoS ONE* [online]. 5(10) [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.1371/journal.pone.0013519. ISSN 1932-6203. Dostupné z:

<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0013519>

SINGH, S.K. a H.J. GIRSCHICK, 2006. Toll-like receptors in *Borrelia burgdorferi*-induced inflammation. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 12(8), 705-717 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2006.01440.x. ISSN 1198743X. Dostupné z:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14642567>

SKOTARCZAK, Bogumiła, 2015. Why is There Still no Human Vaccine Against Lyme Borreliosis? *Folia Biologica*. 63(3), 159-165. DOI: 10.3409/fb63\_3.159. ISSN 00155497.

SPRONG, Hein, Agnetha HOFHUIS, Fedor GASSNER, et al., 2012. [online]. 5(1) [cit. 2020-01-31]. DOI: 10.1186/1756-3305-5-294. ISSN 1756-3305. Dostupné z:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-5-294>

SPRONG, Hein, Tal AZAGI, Dieuwertje HOORNSTRA, Ard M. NIJHOF, Sarah KNORR, M. Ewoud BAARSMA a Joppe W. HOVIUS, 2018. Control of Lyme borreliosis and other Ixodes ricinus-borne diseases [online]. 11(1) [cit. 2020-01-31]. DOI: 10.1186/s13071-018-2744-5. ISSN 1756-3305. Dostupné z: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-2744-5>

STANEK, Gerold a Franc STRLE, 2018. Lyme borreliosis—from tick bite to diagnosis and treatment. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 42(3), 233-258 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1093/femsre/fux047. ISSN 1574-6976. Dostupné z:

<https://academic.oup.com/femsre/article/42/3/233/4904097>

STEERE, ALLEN C., 1980. Antibiotic Therapy in Lyme Disease. *Annals of Internal Medicine* [online]. 93(1), 1-8 [cit. 2020-02-02]. DOI: 10.7326/0003-4819-93-1-1. ISSN 0003-4819. Dostupné z: <http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-93-1-1>

STEERE, Allen C., Franc STRLE, Gary P. WORMSER, Linden T. HU, John A. BRANDA, Joppe W. R. HOVIUS, Xin LI a Paul S. MEAD, 2016. Lyme borreliosis. *Nature Reviews Disease Primers* [online]. 2(1) [cit. 2020-01-26]. DOI: 10.1038/nrdp.2016.90. ISSN 2056-676X. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrdp201690>

STEERE, Allen C., Jerry GREEN, Robert T. SCHOEN, Elise TAYLOR, Gordon J. HUTCHINSON, Daniel W. RAHN a Stephen E. MALAWISTA, 1985. Successful Parenteral Penicillin Therapy of Established Lyme Arthritis. *New England Journal of Medicine* [online]. 312(14), 869-874 [cit. 2020-02-02]. DOI: 10.1056/NEJM198504043121401. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198504043121401>

SUNG, S.-Y., J. V. MCDOWELL a R. T. MARCONI, 2001. Evidence for the Contribution of Point Mutations to vlsE Variation and for Apparent Constraints on the Net Accumulation of Sequence Changes in vlsE during Infection with Lyme Disease Spirochetes. *Journal of Bacteriology* [online]. 183(20), 5855-5861 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1128/JB.183.20.5855-5861.2001. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.183.20.5855-5861.2001>

TEMPLETON, Thomas J., 2004. Borrelia Outer Membrane Surface Proteins and Transmission Through the Tick. *The Journal of Experimental Medicine* [online]. 199(5), 603-606 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1084/jem.20040033. ISSN 1540-9538. Dostupné z: <https://rupress.org/jem/article/199/5/603/40056/Borrelia-Outer-Membrane-Surface-Proteins-and>

VAN DUIJVENDIJK, Gilian, Hein SPRONG a Willem TAKKEN, 2015. Multi-trophic interactions driving the transmission cycle of Borrelia afzelii between Ixodes ricinus and rodents: a review [online]. 8(1) [cit. 2020-01-31]. DOI: 10.1186/s13071-015-1257-8. ISSN 1756-3305. Dostupné z: <http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/643>

VASUDEVAN, Biju a Manas CHATTERJEE, 2013. Lyme borreliosis and skin. *Indian Journal of Dermatology* [online]. 58(3) [cit. 2020-01-26]. DOI: 10.4103/0019-5154.110822. ISSN 0019-5154. Dostupné z: <http://www.e-ijd.org/text.asp?2013/58/3/167/110822>

VINK, Cornelis, Gloria RUDENKO a H. Steven SEIFERT, 2012. Microbial antigenic variation mediated by homologous DNA recombination. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 36(5), 917-948 [cit. 2020-03-06]. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00321.x. ISSN 1574-6976. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2011.00321.x>

VOTAVA, Miroslav, c2010. Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody. Brno: Neptun, 341-350. ISBN 978-80-86850-04-8.

Western blot, 2019. In: Labguide [online]. [cit. 2020-03-28]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/western-blot/>

WORMSER, Gary P., Raymond J. DATTWYLER, Eugene D. SHAPIRO, et al., 2006. The Clinical Assessment, Treatment, and Prevention of Lyme Disease, Human Granulocytic Anaplasmosis, and Babesiosis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 43(9), 1089-1134 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1086/508667. ISSN 1537-6591. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/508667>

ZHANG, Jing-Ren, John M HARDHAM, Alan G BARBOUR a Steven J NORRIS, 1997. Antigenic Variation in Lyme Disease *Borreliae* by Promiscuous Recombination of VMP-like Sequence Cassettes. *Cell* [online]. 89(2), 275-285 [cit. 2020-03-13]. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80206-8. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400802068>

ZIPFEL, Peter F, T.Sakari JOKIRANTA, Jens HELLWAGE, Vesa KOISTINEN a Seppo MERI, 1999. The factor H protein family. *Immunopharmacology* [online]. 42(1-3), 53-60 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.1016/S0162-3109(99)00015-6. ISSN 01623109. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0162310999000156>