

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2023

Nicola Pomališová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vliv chemických a fyzikálních faktorů na morfologii
bakterií *Borrelia burgdorferi sensu lato***

Bakalářská práce

Nicola Pomališová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

Vedoucí práce: Mgr. Michala Křupky, Ph.D

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Nicola POMALIŠOVÁ**
Osobní číslo: **R19852**
Studijní program: **B1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Vliv chemických a fyzikálních faktorů na morfologii bakterií *Borrelia burgdorferi* sensu lato**
Zadávající katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Vypracování stručného literárního přehledu na téma morfologické formy *B. burgdorferi* a faktory ovlivňující jejich indukcii.
2. Praktické zvládnutí kultivace bakterií *B. burgdorferi*, vitálního barvení karboxyfluoresceinem a fluorescenční mikroskopie.
3. Testování vlivu vnějších faktorů na morfologii bakterií a sledování dynamiky změn. Testovány budou změny složení kultivačního média, vystavení změně osmotického tlaku, vliv specifických protilátek, oxidačních činidel a různých antimikrobiálních látek.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

1. Krupka M, Raska M, Belakova J, Horynova M, Novotny R, Weigl E. (2007). Biological aspects of Lyme disease spirochetes: unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. – Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Republic. 2007
2. Embers M.E. (editor) The Pathogenic Spirochetes: strategies for evasion of host immunity and persistence. Springer, 2012. 265 pp.
3. Samuels D.S., Radolf J.D. (editors) *Borrelia: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis*. Caister Academic Press 2010. 550 pp.
4. Krupka M., Rubesova A., Holy O. (2019) Existuje chronická lymeská borelióza?

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Michal Křupka, Ph.D.

Ústav imunologie

Datum zadání bakalářské práce: 23. března 2021
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2022

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 24. března 2021

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora:	Nicola Pomališová
Název práce:	Vliv chemických a fyzikálních faktorů na morfologii bakterií <i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>
Typ práce:	bakalářská
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci
Vedoucí práce:	Mgr. Michala Křupky, Ph.D
Rok Obhajoby práce:	2023
Klíčová slova:	Lymeská borelióza, <i>Borrelia burgdorferi</i> , morfologické formy, autoprotilátky specifické pro myozitidu
Počet stran:	41
Počet příloh:	0
Jazyk:	čeština

SOUHRN

U bakterií *B. burgdorferi sensu lato* způsobujících lymeskou boreliózu je i po mnoha letech výzkumu stále mnoho otazníků. Doposud existuje mnoho nejasností ohledně rozdílných morfologických forem, které tyto bakterie mohou vytvářet v závislosti na nepříznivých podmínkách prostředí či v reakci na antibiotika. Výskyt těchto morfologických forem je velkým tématem v souvislosti s přetrvávajícími obtížemi o řady pacientů, kteří podstoupili řádnou antibiotickou léčbu. Prozatím nebyla potvrzena ani vyvrácena role těchto rozdílných morfologických forem v patogenezi lymeské boreliózy. Zároveň je u řady pacientů s přetrvávajícími obtížemi pozorován výskyt autoprotilátek typických pro myozitidy. Testování přítomnosti těchto protilátek tak bylo dalším tématem této práce.

V praktické části byl testován účinek antibiotik a možnost, že mohou indukovat odlišné morfologické formy *Borrelii*. Kultury pěstované a antibiotiky byly barveny a pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem k určení životnosti bakterií. Kromě toho byla testována séra myší, imunizovaných připravenými vakcínami s jednotlivými morfologickými formami *Borrelii*, na přítomnost protilátek a autoprotilátek. Výsledky ukázaly, že některá antibiotika mohou způsobovat vznik cystických forem *Borrelii*. V testovaných sérech byla detekována přítomnost protilátek, které se lišily proti jednotlivým použitým vakcínám. Přítomnost autoprotilátek detekována nebyla. Výsledky

této práce tak slouží jako další informace pro následné studie, která budou nutná k objasnění role odlišných morfologických forem *Borrelia* v patogenezi lymeské boreliózy.

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Nicola Pomališová
Title:	Impact of chemical and physical factors on morphology of bacteria <i>Borellia burgdorferi sensu lato</i>
Type of thesis:	bachelor
Department:	Department of Cell biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University Olomouc
Supervisor:	Mgr. Michala Křupky, Ph.D
The year of presentation	2023
Keywords:	Lyme disease, <i>Borrelia burgdorferi</i> , morfologic forms, myositis-specific autoantibodies
Number of pages:	41
Number of appendices:	0
Language:	Czech

SUMMARY

There are still many questions surrounding the bacteria *B. burgdorferi sensu lato*, which causes Lyme disease, despite years of research. There is still much uncertainty about the different morphological forms that these bacteria can create, depending on adverse environmental conditions or in response to antibiotics. The occurrence of these morphological forms is a major topic in relation to the persistent difficulties experienced by many patients who have undergone proper antibiotic treatment. The role of these different morphological forms in the pathogenesis of Lyme disease has not yet been confirmed or refuted. At the same time, the presence of autoantibodies typical of myositis has been observed in many patients with persistent symptoms. Therefore, the testing for the presence of these antibodies was another topic of this work.

In the practical part, the effect of antibiotics and the possibility that they may induce different morphological forms of *Borrelia* were tested. Cultures grown with antibiotics were stained and observed under a fluorescence microscope to determine the viability of the bacteria. Finally, sera from mice immunized with prepared vaccines containing individual morphological forms of *Borrelia* were tested for the presence of antibodies and autoantibodies. The results showed that some antibiotics can cause

the formation of cystic forms of *Borrelia*. The tested sera showed the presence of antibodies that differed against the individual vaccines used. The presence of autoantibodies was not detected. The results of this work thus serve as additional information for subsequent studies that will be necessary to clarify the role of different morphological forms of *Borrelia* in the pathogenesis of Lyme disease.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením Mgr. Michala Křupky, Ph.D. a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne:

.....

Nicola Pomališová

Chtěla bych velmi poděkovat svému vedoucímu této bakalářské práce, panu Mgr. Michalu Křupkovi, Ph.D. za jeho trpělivost, velkou ochotu, věnovaný čas a cenné rady. Další díky také patří celému kolektivu Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za ochotu a nápomocnost při realizování experimentální části. V neposlední řadě patří velké díky mé rodině a přátelům za podporu při psaní této práce. Tato práce byla podpořena projektem IGA_LF_2023_010.

Obsah

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	STRUČNÁ HISTORIE.....	3
3.2	LYMESKÁ BORELIÓZA.....	3
3.2.1	Klinické projevy.....	3
3.2.2	Epidemiologická situace v České republice.....	5
3.2.3	Diagnostika.....	6
3.2.4	Možnosti léčby, prevence a vakcinace.....	6
3.3	KOMPLEX <i>BORRELIA BURGDORFERI SENSU LATO</i> (BBSL).....	7
3.3.1	Morfologická charakteristika.....	7
3.3.2	Genom Bbsl.....	9
3.3.3	Vektory přenosu.....	10
3.3.4	Různé morfologické formy.....	11
4	MATERIÁL A METODY	15
4.1	BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	15
4.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, SOUPRAVY A ROZTOKY.....	15
4.2.1	Použité chemikálie.....	15
4.2.2	Použité soupravy.....	15
4.2.3	Použité roztoky a jejich příprava.....	16
4.3	SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ A ZAŘÍZENÍ.....	16
4.4	POUŽITÉ EXPERIMENTÁLNÍ A VYHODNOCOVACÍ POSTUPY.....	16
4.4.1	Mikroskopická charakterizace bakteriálních kultur pěstovaných s antibiotiky pomocí fluorescenční mikroskopie.....	18
4.4.2	Diagnostika přítomnosti protilátek v sérech imunizovaných myší.....	18
5	VÝSLEDKY	22
5.1	MIKROSKOPICKÁ CHARAKTERISTIKA BAKTERIÁLNÍCH KULTUR PĚSTOVANÝCH S ANTIBIOTIKY POMOCÍ FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE.....	22
5.2	STANOVENÍ PŘÍTOMNOSTI PROTILÁTEK V SÉRECH IMUNIZOVANÝCH MYŠÍ.....	25

6	DISKUSE	33
7	ZÁVĚR	35
8	LITERATURA	36

Seznam symbolů a zkratek

ACA - *acrodermatitis chronica atrophicans*

Bb - *Borrelia burgdorferi*

Bbsl - *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Bbss - *Borrelia burgdorferi sensu stricto*

Bgp - *Borrelia glycosaminoglycan-binding protein*

BSK - Barbour-Stoner-Kelly médium

Dbp - decorin binding proteins (A a B)

ELISA - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EM - *erythema migrans*

FlaA - flagellin A (vnější protein bičíku)

FlaB - flagellin B (vnitřní protein bičíku)

LB - lymeská borelióza

Lp - lineární plazmid

Mlp - multicopy proteins

Osp - outer surface proteins (A-F)

PCR - Polymerázový řetězová reakce

PI - propidium jodid

PLS - *post-lyme syndrome*

PTLDS – *post-treatment lyme disease syndrome*

PTLS - *post-treatment lyme syndrome*

Salp15 - salivary tick protein

TROSPA - tick receptor for OspA

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schématické znázornění buněčných stěn Bbsl (převzato z Radolf *et al.*, 2012). Mezi vnitřní a vnější membránou se nachází peptidoglykanová vrstva a bičíky. Na vnější membráně jsou znázorněny Osp proteiny.

Obrázek 2: Schématické znázornění životního cyklu klíštěte *I. ricinus*. Z vajíček se líhnou drobné larvy, které se živí na drobných hlodavcích. Z nich se vyvíjejí nymfy a poté dospělci, kteří mohou náhodně infikovat člověka bakteriemi *Bbsl* (převzato z Kurokawa *et al.*, 2020).

Obrázek 3: Schématické zobrazení použitých blotových proužků. Pro sadu Anti-*Borrelia* EUROLINE-WB v levo. Pro sadu Anti-*Borrelia* EUROLINE-RN-AT uprostřed, s označením IgG protilátek. Dostupné z: https://www.euroimmun.com/documents/Indications/Infections/Borrelia/BI_2132_I_UK_C.pdf

Obrázek 4: Snímek spirochet *Borrelia garinii* (kontrolní kultura) pořízený fluorescenčním mikroskopem zvětšení 400x). Bakterie byly obarveny pomocí uvedené soupravy pro barvení. (foto: Nicola Pomališová).

Obrázek 5: Snímek *Borrelií* pěstovaných s antibiotikem ampicilinem. Přítomné jsou jak spirální tak cystické formy. Použité zvětšení 400x. (foto: Nicola Pomališová).

Obrázek 6: Snímek *Borrelií* pěstovaných s antibiotikem kanamycinem. Přítomné jsou pouze živé či mrtvé spirální formy. Živé jsou obarveny zeleně, mrtvé jsou obarveny červeně. Použité zvětšení 400x. (foto: Nicola Pomališová).

Obrázek 7: Snímek *Borrelií* pěstovaných s antibiotikem chloramfenikolem. Přítomné jsou pouze živé či mrtvé spirální formy. Živé jsou obarveny zeleně, mrtvé jsou obarveny červeně. Použité zvětšení 400x. (foto: Nicola Pomališová).

Obrázek 8: Výsledné hodnoty protilátek z krevního séra myši imunizovaných: A) štěpenou vakcínou a B) inaktivovanou vakcínou proti jednotlivým antigenům *Borrelií*. Všechny testované vzorky byly vyhodnoceny jako pozitivní a byly získány použitím soupravy Anti-*Borrelia* EUROLINE-WB (IgG).

Obrázek 9: Souhrnné grafy (A-F) pro výsledky hodnot protilátek proti jednotlivým testovaným antigenům sadou Anti-*Borrelia* EUROLINE-WB (IgG). Výsledky na každém grafu jsou pro oba typy testovaných vakcín. Výsledné hodnoty jsou v jednotkách optické denzity.

Obrázek 10: Výsledné hodnoty protilátek z krevního séra myši imunizovaných: A) štěpenou vakcínou a B) inaktivovanou vakcínou proti jednotlivým antigenům. Kromě vzorku Spir-F, byly všechny ostatní testované vzorky vyhodnoceny jako pozitivní. Výsledné hodnoty byly získány použitím soupravy Anti-*Borrelia* EUROLINE-RN-AT. Agr-F (inaktivovaná vakcína- agregáty), Cys-F (inaktivovaná vakcína s cystami), Spir-F (inaktivovaná vakcína se spirálními formami).

Obrázek 11: Souhrnné grafy (A-D) pro výsledky hodnot protilátek proti jednotlivým testovaným antigenům sadou Anti-*Borrelia* EUROLINE-RN-AT. Výsledky na každém grafu jsou pro oba typy testovaných vakcín. Výsledné hodnoty jsou v jednotkách optické denzity.

Obrázek 12: Výsledné hodnoty autoprotilátek z krevních sér imunizovaných myší štěpenou vakcínou.
Legenda: MYO 4/109-33 (Spirální formy), MYO 4/109-35 (kontrola), MYO 4/109-34 (agregáty), MYO 4/109-32 (cysty).

1 Úvod

Lymeská borelióza je multisystémové onemocnění, vyvolávané bakteriemi z druhového komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Tyto bakterie jsou gramnegativní, mikroaerofilní spirochéty a jsou přenášeny členovci. Díky tomu je toto onemocnění jednou z nejčastějších antropozoonóz. Nejvíce přenosů nemoci na lidi v Severní Americe a Eurasii je způsobeno díky kousnutí čtyř druhů klíšťat rodu *Ixodes* (*I. scapularis*, *I. pacificus*, *I. ricinus*, *I. persulcatus*) a ta jsou seskupena do komplexu *Ixodes ricinus* (Poucher *et al.*, 1999).

Ačkoli je toto onemocnění léčitelné antibiotiky, přetrvávají u řady pacientů obtíže i po ukončení řádné léčby. Dříve byl tento stav označován jako chronická lymeská borelióza. V současnosti je preferován výstižnější pojem post-boreliový syndrom (Křupka *et al.*, 2019). Prozatím nejsou příčiny tohoto jevu ještě přesně vysvětleny.

V této bakalářské práci se zabývám bakteriemi způsobujícími lymeskou boreliózu, jejich morfologií, působením různých látek na změnu jejich morfologie a také testováním přítomnosti protilátek proti vybraným antigenům *Borrelia* v sérech imunizovaných myší.

2 Cíle práce

Hlavní cíle této práce byly následující:

- Vypracování stručného literárního přehledu ohledně bakteriálního komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato* a možností indukce rozdílných morfologických forem.
- Zvládnutí kultivace, vitální barvení a pozorování pod fluorescenčním mikroskopem.
- Testování různých druhů látek na změny morfologie bakteriálního komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato*.
- Testování sér imunizovaných myší na přítomnost protilátek proti konkrétním antigenům *Borrelií*.

3 Literární přehled

3.1 Stručná historie

První zmínky o lymeské borelióze (LB) jako takové, se začaly objevovat ani ne před 200 lety. Avšak původce tohoto onemocnění, *Borrelia burgdorferi* (Bb) se vyskytuje v lidské populaci už od dávných dob. DNA těchto bakterií byla nalezena v archeologickém materiálu lidské tkáně staré přibližně 5 300 let (Keller *et al.*, 2012).

Historie objevování LB je vcelku bohatá. V Evropě se první informace související s LB objevila v roce 1883, kdy německý dermatolog A. Buchwald popsal *acrodermatis chronica migrans* (ACA), dermatitidu, dnes známou jako pozdní projev LB. Přibližně o dvě desetiletí později, v roce 1909, navrhnul Afzelius vztah mezi přisátím klíštěte a vytvořením *erythema migrans* (EM) a v roce 1911 byl popsán borreliový lymfocytom (Prokeš, 2015). Spojitost mezi přisátím klíštěte a vytvořením EM byla potvrzena až v roce 1921. V následujících letech se postupně objevovali další příznaky LB, ovšem bez spojení s konkrétním původcem, či konkrétním onemocněním. V roce 1922 podali Garin a Bujaudoux zprávu o pacientovi, u kterého se po kousnutí klíštětem objevila vyrážka (EM) a následoval vznik *meningopolyneuritidy*. Uplynulo dalších 20 let, než Bannwarth popsal řadu nemocných, kteří měli po přisátí klíštěte radikulitidu (zánět míšních nervů). Začaly se objevovat různé názory na spojitosti mezi těmito případy. Jako zásadní se ukázalo tvrzení Lenhoffa, který poukázal na souvislost mezi EM, ACA a spirochétami. Tento pravdivý názor nebyl bohužel dalšími autory přijat a následně od něj bylo upuštěno.

Dalšího pokroku bylo dosaženo díky vývoji imunochemických a molekulárních metod a vytvořením Barbour-Stoner-Kelly (BSK) kultivačního média. V roce 1983 na první mezinárodní konferenci lymeské boreliózy v Yaleu bylo rozhodnuto, že bakterie způsobující tuto nemoc budou pojmenovány podle Willyho Burgdorfera. Samotná nosologická jednotka – lymeská borelióza – byla přijata až v roce 1987 na III. mezinárodní konferenci v New Yorku věnované této problematice (Prokeš, 2015).

3.2 Lymeská Borelióza

Tato nemoc byla pojmenována po městě Lyme, které se nachází v Connecticutu, USA. Po svém objevení se stala nejrozšířenější nemocí přenášenou členovci jak ve Spojených státech amerických, tak v Evropě. Právě v Evropě byly její příznaky popisovány už dlouho dobu před tím, než došlo k jejímu „objevení“ a pojmenování.

3.2.1 Klinické projevy

Toto onemocnění je charakteristické rozdílnou škálou klinických projevů. Může postihnout více orgánů a díky tomu je charakterizováno jako komplexní multisystemové, infekční, zánětlivé a chronické

onemocnění (Křupka *et al.*, 2007). Rozmanité projevy tohoto onemocnění jsou způsobené mimo rozdílným rozšířením jednotlivých patogenních druhů *Borrelia*. Díky tomu se tato nemoc může projevat rozdílně i v rámci jednotlivých světadílů. Lymeská borelióza se dělí do tří stádií a to na: stádium časně lokalizované, časně diseminované a pozdní.

Pro první fázi, která se vyskytuje v prvních týdnech až měsících po nákaze, je typický výskyt *erythema migrans* (EM). Tato červená, kruhovitá, nesvědivá vyrážka se objeví u 70 – 80 % lidí nejčastěji mezi 7 – 10 dnem po nákaze. U přibližně 20 % infikovaných pacientů se EM neprojeví nebo zůstane pacientem nepovšimnuta (Nadelman *et Wormser*, 1995). Další méně časté příznaky v této fázi jsou spíše nespecifické a zahrnují zvýšenou teplotu, únavu, bolesti hlavy či nechutenství. U dětí se častěji objevuje *lymfocytom*, což je vzácnější časný projev LB a typicky se vyskytuje na ušním boltci (Bartůněk *et al.*, 2013). Díky složité diagnostice a možnosti, že se neprojeví EM, se může stát, že nedojde k žádné léčbě a nemoc bez povšimnutí přejde do druhého stádia.

Druhé, časně diseminované stádium se projevuje týdny až měsíce po nákaze. Příznaky této fáze jsou velmi variabilní a mohou se projevit od postižení kůže, přes neurologické poruchy až po kardiální projevy. Z kožních příznaků se mohou objevit mnohočetná *erythemata* (*erythema migrans multiplex*) či nespecifické příznaky, jako jsou artralgie, myalgie, ale i hepatopatie (Křupka *et al.*, 2019). Časté jsou neurobiologické příznaky, které zahrnují encefalitidu, meningoencefalitidu, časté jsou obrny hlavových nervů, především lícního nervu. Typickou jednotkou je lymfocytární *meningomyeloradikuloneuritida* označovaná jako *Garin-Bujadoux-Bannwarthův syndrom* (Roháčová, 2012). K vzácným projevům této fáze patří *lymeská karditida*. Většina autorů se shoduje, že její výskyt nepřesahuje 10 % všech klinických projevů LB (Bartůněk *et al.*, 2013).

Třetím stádiem je stádium pozdně diseminované. K jeho projevům dochází po několika měsících až letech od nakažení a jen u malého počtu infikovaných pacientů (Stanek *et al.*, 2012). Tato fáze je charakteristická přítomností *acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA), neurologických příznaků nebo artritidy (Křupka *et al.*, 2019). Lymeská artritida postihuje především velké klouby (kolenní, ramenní,...) a její součástí jsou i zánětlivé změny dalších struktur pohybového aparátu (*entenzitidy*, *burzitidy*, *kapsulitidy*, *myozitidy*). ACA je typickou manifestací tohoto stádia v Evropě. Oproti tomu pozdní neurologické formy LB jsou vzácné (Roháčová, 2012). Mezi tyto projevy patří lymeská encefalopatie, kdy dochází k poruchám kognitivních funkcí, periferní neuropatie a encefalomyelitida, která je častěji popisována v Evropě než v USA a bývá označována jako chronická (progresivní) neuroborrelióza. Má projevy, které připomínají demenci vaskulární či jiné etiologie (Roháčová, 2013).

Popsaná stádia se všechna nemusí manifestovat u jednoho pacienta a jejich rozvoj není přesně časově ani klinicky oddělen. Otázkou zůstává výskyt přetrvávajících obtíží u řady pacientů (2 – 40 %). Tento stav se označuje jako *post-lyme syndrome* (PLS) (Marques, 2008), *post-treatment lyme syndrome* (PTLS) (Klempner *et al.*, 2001) nebo nejnovějším pojmenováním je *post-treatment lyme disease syndrom* (PTLDS). PTLDS zahrnuje soubor nespecifických příznaků, které trvají déle než 6 měsíců

po ukončení řádné léčby LB. Příznaky, které tento stav provázejí, jsou trvalá únava, kognitivní deficity, bolesti svalů, kloubů či hlavy nebo psychické problémy (Křupka *et al.*, 2019). Podle některých prací se ale běžné nespecifické symptomy (únava, bolesti hlavy, myalgie, ...) nevyskytují u pacientů po prodělané LB častěji než u běžné populace (Nemeth *et al.*, 2016) U pacientů s psychickými problémy prozatím není ani jasné, zda jsou vyvolané PTLDS nebo zda jsou jen důsledkem úzkostí pacienta ohledně svého zdravotního stavu. Dosud tak není jasná přesná příčina tohoto jevu, ale uvažuje se ale o několika faktorech: perzistence bakterií v organismu, autoimunitní reakci, aktivace imunitního systému přetrvávající i po eliminaci kauzálních bakterií, poškození tkání nebo koinfekce dalšími infekcemi přenášenými klíšťaty. Vztah koinfekcí s PTLDS zatím nebyl prokázán (Lantos *et Wormser*, 2014). Díky často subjektivním příznakům a nejednoznačné příčině tohoto jevu je obtížné vytvořit přesnou definici PTLDS. V Evropě dosud není žádná přesná definice zavedena. V USA byla definice publikována v roce 2006 (Wormser *et al.*, 2006).

Právě autoimunitní reakce a možná perzistence bakterií v organismu jsou velmi diskutovaným tématem spojeným s PTLDS. Řada prací popisuje přítomnost autoprotilátek specifických pro myozitidu (MSA) a autoprotilátek spojených s myozitidou (MAA) u pacientů s PTLDS (Reimers *et al.*, 1993, Nilsson *et al.*, 2021, Sloupenska *et al.*, 2023). Myozitida je zánětlivé onemocnění kosterních svalů, které může být vyvolané infekcemi či různými poruchami imunitního systému. MSA autoprotilátky (např. proti proteinu Mi-2 α) jsou specifické pro myozitidy a MAA se mohou vyskytovat i u jiných autoimunitních poruch. V současnosti pořád není zcela jasné, který mechanismus je zodpovědný za vznik těchto autoprotilátek u některých pacientů s PTLDS, ale díky širokému spektru autoprotilátek je možné, že jde spíše o disregulaci imunitního systému či expozici kryptickým antigenům, než zkřížená reaktivita s antigeny *Borrelia* spojená s molekulárními mimikry (Bolz *et Weis.*, 2004).

3.2.2 Epidemiologická situace v České republice

Česká republika je díky své poloze v mírném pásu ideálním místem pro výskyt klíšťat, která jsou hlavními vektory LB. Rezervoárem bývají drobní savci, ptáci větší lesní zvěř a člověk je pouze náhodným hostitelem. Onemocnění má sezónní charakter, který je podmíněný větší aktivitou klíšťat v letních měsících. Případy jsou ovšem hlášeny celoročně. Incidence onemocnění v ČR kolísá mezi 40 – 60 případy na 100 000 obyvatel ročně (Prokeš, 2015). Od roku 1986 byla zavedena laboratorní diagnostika (Bartůněk *et al.*, 2013) a toto onemocnění také podléhá hlášení.

Toto onemocnění může postihnout kteroukoli věkovou skupinu a ženy bývají nakaženy častěji než muži. Vnímavost k této nemoci je tedy všeobecná, ale nejvyšší výskyt LB je u dětí ve věku 5 – 14 let a u dospělých ve středním věku (40 – 50 let).

3.2.3 Diagnostika

Díky velkému množství různých symptomů, kterými se tato nemoc vyznačuje, je obtížné prokázat aktivní infekci a není dostupný „zlatý standard“ v diagnostice (Křupka *et al.*, 2019). Máme ale k dispozici celou řadu vyšetření, a to jak tzv. přímých, tak nepřímých diagnostických testů (Roháčová, 2013).

Nejvíce rozšířenou nepřímou metodou používanou k diagnostice LB je Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). ELISA je imunoenzymový test a určují se pomocí něj protilátky třídy IgG, tak třídy IgM, které se vyšetřují z krve, mozkomíšního moku nebo kloubního punktátu (Roháčová, 2012). Problém ale bývá fakt, že protilátky se u infekce LB začínají vytvářet poměrně pozdě. U ELISA testu jsou detekovatelné IgM protilátky až po 2–4 týdnech onemocnění, IgG ještě později (Roháčová, 2012). Proto je důležité ověřit výsledek ještě pomocí některé přímé metody, např. PCR nebo imunoblotem. U blotových metod se musí pečlivě interpretovat výsledky, protože případná pozitivita některého z antigenů nemusí znamenat pozitivní výsledek a opačně.

Mezi metody přímé patří metody mikroskopické, kultivační histologické, elektronoptické a metody polymerázové řetězové reakce (PCR) (Bartůněk *et al.*, 2013). Mikroskopie se využívá v klinické praxi jen okrajově, kultivace je sice možná, ale velmi obtížná, takže se v praxi neprovádí (Roháčová, 2013). Nejrozšířenější přímou metodou je tedy PCR a i ta má svá úskalí. Neumožňuje odlišit přítomnost živých bakterií od neživotaschopných perzistujících částic obsahujících zbytky nukleových kyselin (Křupka *et al.*, 2019).

3.2.4 Možnosti léčby, prevence a vakcinace

Základním léčebným postupem po správné diagnostice této nemoci je podávání antibiotik. Druh a dávkování se liší v závislosti na stádiu nemoci, i komu jsou antibiotika podávána (děti, dospělí, těhotné ženy,...). Nejvíce používaným antibiotikem pro léčbu LB je doxycyklin. Využívá se v časných fázích, i v pozdní fázi proti lymeské artritidě. Pokud není možné podat doxycyklin, využívají se např. amoxicilin, cefuroxim-axetil nebo azitromycin. Amoxicilin bývá první volbou u gravidních žen a dětí do 8 let (Roháčová, 2012). Dávka a doba léčby je pro každého pacienta individuální a liší se i mezi jednotlivými druhy antibiotik. V klinických studiích se dosud neprokázal žádný přínos prodloužené nebo kombinované antibiotické léčby u přetrvávajících obtíží LB (Berende *et al.*, 2016, Berende *et al.*, 2019, Sjöwall *et al.*, 2012).

Mezi nejlepší způsob prevence patří vyhnutí se kontaktu s infikovaným klíštětem. V prevenci je důležitá osvěta, ale také informace o změnách aktivity klíšťat (Bartůněk *et al.*, 2013). Pokud je klíště již přisáté, je nutné jej odstranit v co nejkratším čase, aby se minimalizovalo riziko přenosu *Borrelie*, pokud je jimi klíště infikované. Pro vytažení se doporučuje použít pinzetu, aby nedošlo k roztržení klíštěte a případnému potřísnění rány obsahem jeho vnitřností (které mohou obsahovat *Borrelie*).

Následně je důležité ráno vydesinfikovat. Preventivní podávání antibiotik se nedoporučuje (Prokeš, 2015).

Vakcinace proti LB pro humánní účely není v současné době k dispozici. V minulosti byly vyvinuty a testovány 2 vakcíny založené na rekombinantním antigenu OspA- ImuLyme a LYMERix (Samuels *et Radolf*, 2010). Po úspěšných klinických testech a schválení LYMERixu byla tato vakcína používána, ale začaly se objevovat názory, že má souvislost se vznikem artritidy. Veřejné mínění ohledně nežádoucích účinků a postupně klesající prodeje vedly ke stažení vakcíny z trhu v roce 2002 (Samuels *et Radolf*, 2010). Vakcíny byly vyvíjeny i proti jiným lipoproteinům *Borrelia*. Synergického efektu imunitní odpovědi bylo dosaženo při použití antigenů OspA a DbpA (Hanson *et al.*, 2000). Pro veterinární účely existuje několik typů vakcín, jak v USA, tak v Evropě.

3.3 Komplex *Borrelia burgdorferi sensu lato* (Bbsl)

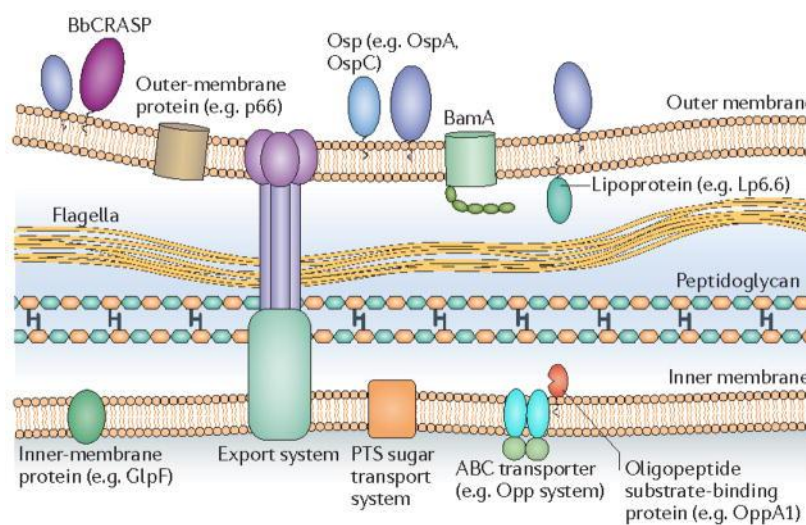
V současnosti komplex *Bbsl* zahrnuje celkem 22 druhů rodu *Borrelia*. Z těchto 22 druhů bylo identifikováno 10 jako patogenní pro člověka. Jedná se o: *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. burgdorferi sensu stricto* (*Bbss*), *B. garinii*, *B. kurtenbachii*, *B. lusitaniae*, *B. mayonii*, *B. spielmanii* a *B. valaisiana*. Pro druhy *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* zatím nebyla patogenita prokázána (Křupka *et al.*, 2019). V Evropě je LB způsobena druhy *B. burgdorferi sensu stricto* (*Bbss*), *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia bavariensis* and *B. spielmanii* (Stanek *et al.*, 2012) avšak v počtu způsobených onemocnění dominují druhy *Borrelia afzelii* a *Borrelia garinii* (Margos *et al.*, 2009). V USA jsou s infekcí člověka nejvíce spojovány pouze *Bbss* (Stanek *et al.*, 2012). Jednotlivé druhy se mezi sebou liší i symptomy, které způsobují u LB a také se liší četností výskytu. *B. burgdorferi sensu lato* jsou přenášeny klíšťaty rodu *Ixodes*. V USA to jsou druhy *I. scapularis* (Burgdorfer *et al.*, 1982) a *I. pacificus* (Burgdorfer *et al.*, 1985) a v Evropě je to především druh *Ixodes ricinus*.

3.3.1 Morfologická charakteristika

Spirochety patřící do komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato*, jsou často, ovšem mylně popisovány jako gramnegativní bakterie (Samuels *et Radolf*, 2010). Pravděpodobně nejmarkantnějším ukazatelem, že se od gramnegativních bakterií liší je absence lipopolysacharidů na vnější membráně (Takayama *et al.*, 1987) a naopak zde mají lipoproteiny, které se uplatňují při adhezi Bb k buňkám hostitele (Eiffert *et al.*, 1991; Křupka *et al.*, 2007; Kenedy *et al.*, 2012) Mají tenké spirálovité, šroubovicovitě stočené tělo a jsou mikroaerofilní (stačí jim pro růst nízké koncentrace kyslíku). Velikost buňky *Borrelie* do délky je od 4 – 30 μm a šířka cca 0,2 μm. Spirochety jsou obecně schopny velmi rychlého pohybu pomocí bičíků. To jim pomáhá unikat imunitním buňkám hostitele, dobře se pohybovat

ve viskózním prostředí a procházet přes epiteliální, tak i hematoencefalickou bariéru (Kimsey *et Spielman*, 1990; Křupka *et al.*, 2008; Malawista *et de Boisfleury Chevance*, 2008). Počet bičíků je přibližně 7 – 12, u patogenních druhů jich může být 15 až 20 (Bartůněk *et al.*, 2013). Tyto bičíky jsou velmi dlouhé a jsou stočené kolem tzv. protoplazmatického cylindru (Křupka *et al.* 2007). Tyto periplazmatické bičíky se skládají z majoritního flagelinového proteinu FlaB (41 kDa) a minoritního flagelinového proteinu FlaA (38 kDa) (Ge Y *et al.*, 1998). Kromě pohybu slouží bičíky ještě k udržování tvaru buňky (Rosa, 1997).

Buněčná stěna nad plazmatickou membránou je tvořena peptidoglykanem a nad ní je ještě vnější membrána a společně ohraničují periplazmatický prostor. V tomto prostoru se vinou bičíková vlákna (Kudryashev *et al.*, 2009). Na vnější membráně se nachází mnoho druhů proteinů. Tyto proteiny vnější membrány hrají zásadní roli ve virulenci bakterií (Samuels *et Radolf*, 2010) a dají se rozdělit do několika skupin. Mezi nejvíce studované patří rodina lipoproteinů VlsE (Vls=Vmp like sequence), dále lipoproteiny nazvané outer surface proteins (OspA - OspF), multicopy proteins (Mlp), RevA protein, decorin-binding proteins (DbpA a DbpB) a mnoho dalších. Tyto lipoproteiny hrají důležitou roli při vstupu *Bbsl* do hostitelského organismu (ptáci, savci, náhodně člověk), ale i do vektoru, kterým je v nejvíce případech klíště rodu *Ixodes*. V hostitelském organismu se uplatňují tím, že soutěží se specifickými obrannými mechanismy hostitele, a tím usnadňuje invazi a kolonizaci různých tkání (Samuels *et Radolf*, 2010).



Obrázek 1: Schématické znázornění buněčných stěn *Bbsl* (převzato z Radolf *et al.*, 2012). Mezi vnitřní a vnější membránou se nachází peptidoglykanová vrstva a bičíky. Na vnější membráně jsou znázorněny Osp proteiny.

K zajímavé strategii, jak *Bb* unikají imunitnímu systému, patří exprese povrchového proteinu VlsE. Gen pro tento protein se skládá z 15 kazetových segmentů, nacházejících se na plazmidu lp28-1 a kombinací těchto segmentů může vznikat neomezený počet variant proteinu VlsE. Díky tomu mohou *Bb* unikat imunitnímu systému hostitele, během infekce. Zároveň rekombinace VlsE se vyskytuje pouze

u bakterií *in vivo* (Křupka *et al.*, 2007) a ne *in vitro*, což naznačuje, že savčí hostitel poskytuje signál pro VIs rekombinaci (Zhang *et Norris*, 1998). Ovšem o jaké signály se jedná, je zatím neznámé.

Mezi další důležité lipoproteiny patří Outer surface proteins (Osp), které se dělí na několik skupin. OspA (31 kDa) a OspB (34 kDa) jsou kódované stejným operonem na lineárním plazmidu lp54 (Barbour *et Garon*, 1988, Bergström *et al.*, 1989). Oba tyto lipoproteiny jsou exprimovány ve velkém množství, když se Bb nacházejí ve střevě klíštěte. Hlavním funkcí OspA je adheze ke střevnímu epitelu klíštěte, kde se váže se na glykoprotein TROSPA (tick receptor for OspA) (Křupka *et al.*, 2007). Pokud dojde k přisátí klíštěte k hostiteli, tak se sníží exprese OspA a OspB a dojde k recipročnímu zvýšení exprese OspC. U OspC bylo dosud identifikováno 19 hlavních skupin (Wang *et al.*, 1999). Jednou z popsaných funkcí OspC je vazba na imunosupresivní protein Salp15, který se nachází ve slinách klíšťat. Díky této vazbě, získávají Bb imunosupresivní povlak ze Salp15, který je činí nezjistitelné pro imunitní systém obratlovců v rané fázi přisátí klíštěte (Křupka *et al.*, 2007). Salp15 sám o sobě inhibuje proliferaci CD4+ T buněk a snižuje produkci cytokinů (Wen *et al.*, 2020).

OspE a OspF jsou kódovány dvěma plazmidy, cp32 a cp18 a jejich geny jsou transkripčně spojeny (Akins *et al.*, 1999, Hefty *et al.*, 2001). Společně s dalšími proteiny (např. *erpAB*, *erpCD*, atd.) patří do skupiny tzv. OspEF related proteins (Erps) (Stevenson *et al.*, 1998). OspE je využíván *Borrelia* proti komplementu, kdy se v lidské krvi váže sérový faktor H. Faktor H je regulační protein, který inhibuje aktivitu C3b (složka komplementu) (Křupka *et al.*, 2007). Tohoto mechanismu ochrany před autoimunitním poškozením aktivací komplementu využívají jak savčí buňky, tak ho zneužívají právě *Borrelia*. Díky tomuto je umožněna delší doba perzistence Bbsl v hostiteli a přechod do pozdního stadia LB (Hellwage *et al.*, 2001; Kraiczy *et al.*, 2001; Křupka *et al.*, 2007; Kennedy *et al.*, 2012).

Borrelia se musí přichytit nejen ve střevech klíštěte, ale i k buňkám hostitelského organismu. Proto není překvapivé, že bylo prokázáno, že několik *Borreliových* lipoproteinů funguje jako adheziny (Samuels *et Radolf.*, 2010). K hlavním adhezním lipoproteinům patří tzv. decorin binding proteins A a B (DbpA, DbpB). Ty se vážou v kolagenních tkáních na proteoglykan decorin spojený s kolagenem (Guo *et al.*, 1995, Guo *et al.*, 1998, Hanson *et al.*, 1998). DbpA i DbpB významně přispívají k celkové virulenci *B. burgdorferi* více než jiné lipoproteinové adhesiny (Shi *et al.*, 2008).

Mezi další proteiny, které slouží k adhezi k buňkám, patří *Borrelia glycosaminoglycan-binding protein* (Bgp) nebo *Fibronectin binding protein* (BBK32). BBK32 společně s BBA64 slouží jako důležité diagnostické markery pro časné stádium LB (Samuels *et Radolf*, 2010).

3.3.2 Genom Bbsl

Bakterie *B. burgdorferi* jsou v mnoha ohledech jedinečné, a není tomu jinak ani v případě jejich genomu. První genetická mapa *B. burgdorferi* s. s. B31 byla získána v roce 1997 (Fraser *et al.*, 1997, Křupka *et al.*, 2007) a doplněna byla Casjensem *et al.* v roce 2000 (Casjens *et al.*, 2000). Jejich genom má celkovou velikost cca 1,5 Mb a je tvořen jedním hlavním lineárním chromozomem, který

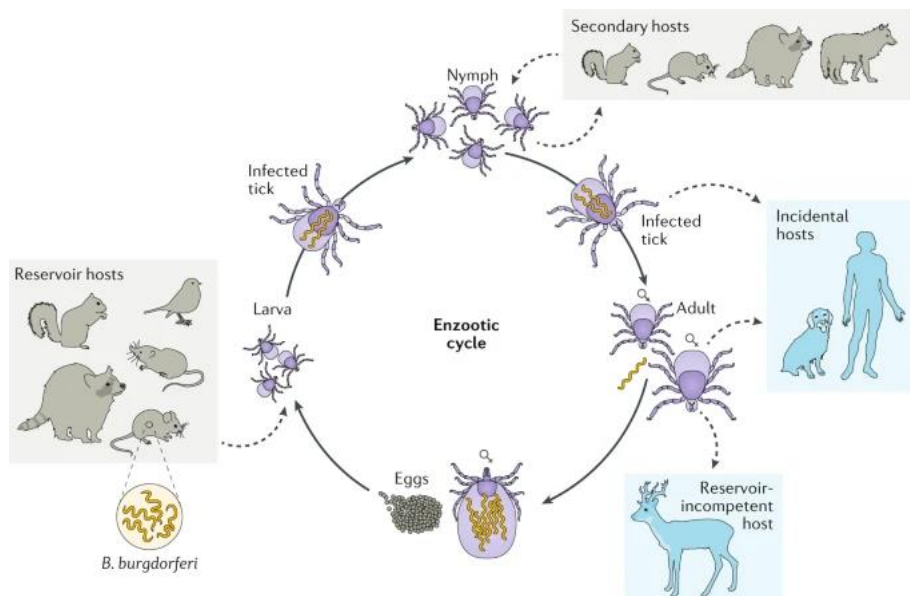
má velikost 910 725 bp a nejméně 17 lineárními a kruhovými plazmidy, kdy ale některé izoláty obsahují až 20 plazmidů (Fraser *et al.*, 1997). Hlavní lineární chromozom je zakončen na obou koncích kovalentně uzavřenými vlásenkami a nese 853 genů (Barbour *et Garon*, 1987, Fraser *et al.* 1997). Vlášenkové zakončení telomer chromozomu je u prokaryot neobvyklé, ale bylo nalezeno u DNA virů s dvouvláknovou DNA nebo na některých molekulách eukaryotické mitochondriální DNA (Casjens *et al.*, 1997, Křupka *et al.*, 2007). Relativně malá velikost genomu je dána tím, že geny na hlavním chromozomu kódují jen proteiny pro udržení základních funkcí spirochéty. V genomu Bb chybí geny pro syntézu aminokyselin, mastných kyselin, enzymových kofaktorů a nukleotidů. Tato chudá metabolická výbava Bb je důvodem, proč je při kultivaci Bb v *in vitro* podmínkách potřeba komplexní kultivační médium doplněné savčím krevním sérem. Naproti tomu až 54 genů kóduje proteiny zapojené do motility a chemotaxe těchto bakterií a tvoří 6 % chromozomu (Fraser *et al.*, 1997). To ukazuje důležitost těchto genů, protože díky periplazmaticky uloženým bičíkům se Bb mohou pohybovat viskózním prostředím a pronikat do tkání.

Chromosomy jednotlivých zástupců Bb mají velmi podobný genový obsah, zatímco plazmidy jsou variabilnější (Samuels *et Radolf*, 2010). Biologický význam většiny genů na plazmidech zatím není známý. Navíc Bb obsahují málo, pokud vůbec nějaké geny zapojené do virulence a exprese genů se liší podle druhu hostitele, teploty a dalších faktorů (Fraser *et al.*, 1997).

3.3.3 Vektory přenosu

Bbsl jsou přenášeny nejčastěji klíšťaty rodu *Ixodes*, která jsou jedinými celosvětově uznanými přenašeči LB (Hulínská, 2013). Přenos jinými vektory, např. pomocí krev-sajícího hmyzu je zatím zkoumán. Druhový komplex *Ixodes ricinus-persulcatus*, kam se řadí druhy přenášející lymfskou boreliózu, *Ixodes ricinus* v Evropě a *Ixodes scapularis* ve Spojených státech amerických. Za hlavní rezervoáry Bbsl jsou považovány různé druhy saveců a ptáků.

Klíšťata rodu *Ixodes* se vyskytují v širokém geografickém pásmu (od severní Afriky až po Skandinávii). Osidlují nejčastěji oblasti listnatých a smíšených lesů a vyžadují vyšší vlhkost (až 80 %). Jsou to roztoči, kteří nemají oči, ale mají Hallersův orgán, kterým mohou detekovat teplotu, vlhlost a vibrace. Mají dlouhý životní cyklus, který má 4 stádia: vajíčko, larva, nymfa, dospělec. Celý tento cyklus dokončí v závislosti na podmínkách okolí mezi 3-6 lety. Mají také velkou škálu hostitelů, kdy každé ze tří stádií životního cyklu (larva, nymfa, dospělec) saje krev na odlišném druhu hostitelů (Bartůněk *et al.*, 2013).



Obrázek 2: Schématické znázornění životního cyklu klíštěte *I. ricinus*. Z vajíček se líhnou drobné larvy, které se živí na drobných hlodavcích. Z nich se vyvíjejí nymfy a poté dospělci, kteří mohou náhodně infikovat člověka bakteriemi *Bbsl* (převzato z Kurokawa *et al.*, 2020).

Klíšťata při hledání hostitelů lezou na špičky rostlin a čekají. Jak již bylo zmíněno, každé z jednotlivých stádií vývoje využívá jiný druh hostitele. V lesních oblastech, se larvy živí převážně na hlodavcích, nymfy na hlodavcích a ptácích a dospělci na větších savcích (např. jelenech, srnkách, atd.) (Sprong *et al.*, 2018). Klíšťata tohoto druhu sají několik dnů, což přispívá k jejich šíření díky pohybu hostitelů a všechna vývojová stádia se stávají infekčními po ingesci spirochet v průběhu sání krve na infikovaných savcích nebo ptácích (Bartůněk *et al.*, 2013). Promoření *Bbsl* se u jednotlivých stádií liší. Nejvyšší promořenost *Bbsl* je u nymf. *Bbsl* u malých hlodavců a ptáků přetrvávají pravděpodobně celý jejich život bez projevení příznaků LB. Ovšem o větších zvířat (koně, psi) mohou způsobit symptomy podobné LB jako u člověka. Klíšťata tohoto rodu mohou přenášet i jiné choroby než lymeskou boreliózu způsobenou bakteriemi komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Může to být klíšťová encefalitida, granulocytární anaplazmóza, babezióza, atp. (Wormser *et al.*, 2006).

3.3.4 Různé morfologické formy

Borrelie jsou opředeny od počátku jejich výzkumu mnoha záhadami a nejasnostmi. Jednou z nich je vznik non-spirálních forem. Již v roce 1905 vzniklo podezření, že *Borrelie* mohou nabývat i jiných než spirálních forem (Miklossy *et al.*, 2008). Doposud není zcela jasné, proč tyto formy vznikají. Faktorů a různých příčin je ale hned několik. Mohou vznikat při neoptimálním pH při kultivaci, absencí séra či přítomnosti různých antibiotik (Křupka *et al.*, 2007). Při těchto nevhodných kultivačních podmínkách je možné pozorovat vznik cystických forem, „blebs“ či L-form. Tyto formy se sníženou metabolickou aktivitou jsou pravděpodobně alespoň z části schopny reverzně přejít v plně metabolicky

aktivní spirální formu (Křupka *et al.*, 2008). A zdá se, že jsou také vůči těmto nevhodným podmínkám odolnější (Bronson *et al.*, 2009; Meriläinen *et al.*, 2016) než klasické spirální formy.

Jak již bylo zmíněno, non-spirální formy mohou vznikat vlivem nevhodných podmínek a vzniká jich několik druhů. Terminologie je v tomto ohledu velmi nejednotná a používá se velké množství pojmenování. Obecně lze ale rozdělit non-spirální formy *Borrelii* na L-formy, cysty, „blebs“ (Lantos *et al.*, 2014) a agregáty („biofilm-like kolonie“) (Sapi *et al.*, 2012; Srivastava *et al.*, 2009, Meriläinen *et al.*, 2015). V předběžných studiích vykazovaly tyto různé sférické formy Bbsl rozdíly v biochemickém složení (Meriläinen *et al.*, 2015, Meriläinen *et al.*, 2016), v proteinových profilech a antigenitě (Al-Robaiy *et al.*, 2010, Alban *et al.*, 2000, Hulínská *et al.*, 1994) ve srovnání se spirálními formami Bbsl (Meriläinen *et al.*, 2016). Předpokládá se tak, že morfologické formy Bb mohou mít rozdílnou expresi membránových proteinů a díky tomu mají také odlišné antigenní vlastnosti (Alban *et al.*, 2000, Meriläinen *et al.*, 2016).

V průběhu let a s přibývajícím výzkumy ohledně těchto non-spirálních forem se začaly také objevovat různé kontroverzní názory. Existuje ale stále více věrohodných důkazů, že různé non-spirální formy mohou pomoci Bbsl vyhnout se imunitnímu systému nebo snížit citlivost na antibiotika a také změnit jejich patogenní mechanismy (Dominique *et al.*, 1997, Justice *et al.*, 2008, Meriläinen *et al.*, 2015).

L-formy *Borrelii* vznikají, když jsou spirochety Bbsl vystaveny nevhodným kultivačním podmínkám, čímž může být nevhodné kultivační médium, změny pH, či kultivace s antibiotiky. Vznik těchto forem v *in vitro* podmínkách jako odpověď na expozici β -laktamovým antibiotikům (např. penicilin), která jsou běžně doporučována na léčbu LB, byl popsán před více než 20 lety (Kersten *et al.*, 1995). To byl důležitý objev, protože tyto L-formy byly posléze nalezeny ve vzorcích pacientů po adekvátní léčbě antibiotiky (Bruck *et al.*, 1995; Preac-Mursic *et al.*, 1996, Allan *et al.*, 2009). To může ukazovat na možnou roli L-form v patogenezi LB, což ovšem doteď nebylo potvrzeno nebo vyvráceno. Tyto formy jsou velké $2,8 \pm 0,4 \mu\text{m}$ (Meriläinen *et al.*, 2015). Jsou to přeměněné spirální formy bez, nebo s částečně zachovanou buněčnou stěnou. Geneticky jsou identické jako spirochety Bbsl, jsou také metabolicky a translačně aktivní. Nejsou pohyblivé a nemají schopnost se dělit. V příznivých podmínkách se mohou navrátit do spirálních forem, ovšem tento proces je zdlouhavý a náročný.

Cysty jsou nepohyblivé kulovité formy. Stejně jako L-formy a další odlišné morfologické formy Bbsl vznikají i cysty při nepříznivých vnějších podmínkách (např. přítomnost protilátek, antibiotik, změny pH či teploty). Tvorba cyst zahrnuje změny integrity membrány a tvaru buněk (Alban *et al.*, 2000). Cysty mohou být indukovány i procesem hladovění spirochet. K tomu dochází v případě, že nemají dostatečný zdroj tuků a mastných kyselin. V průběhu hladovění spirochet může dojít k syntéze více než 20 druhů proteinů, které jsou pro savčího hostitele antigenní (Alban *et al.*, 2000). Bylo popsáno, že po zlepšení vnějších podmínek se do původní spirální formy může vrátit cca 50 % cyst (Samuels *et al.*, 2010).

Cysty vznikají stočením spirochet (jedné nebo více) do uzlů. Velikost tak závisí na množství spirochet, které se na tvorbě cysty podílejí. Mají také ztenčenou povrchovou membránu a chybí jim některé povrchové lipoproteiny (např. vnější Erp, protein P66 nebo OmS28) (Bartůněk *et al.*, 2013). Povrchový protein OspA je exprimován ve větší míře (Alban *et al.*, 2000). U živých cyst se OspA nachází na povrchu (Bartůněk *et al.*, 2013), u mrtvých se nachází uvnitř cysty (Hulínská *et al.*, 1994, Hulínská *et al.*, 2013, Meriläinen *et al.*, 2015). Jejich tvorba je pomalá, je při tom potřeba syntéza proteinů a nejedná se tedy o formy bez metabolické aktivity (Alban *et al.*, 2000). Jsou považovány za klidové stádium, sloužící k přečkání nepříznivých podmínek.

O výskytu atypických, cystických nebo granulárních forem Bbsl v infikovaných tkáních jsou k dispozici jen omezené údaje (Miklossy *et al.*, 2008). Například atypické cystické formy byly pozorovány v mozkové kůře pacienta s chronickou lymeskou neuroboreliózou (Miklossy *et al.*, 2008) nebo v kožních lézích (Aberer *et al.*, 1996, Miklossy *et al.*, 2008). Díky možné přeměně cystických forem zpět na spirální a přítomnosti těchto forem u různých pacientů se připouští možná patogenita cyst.

Když jsou *Borrelie* vystaveny antibiotikům (penicilinu), zmrazení, rozmrazení nebo prodloužené kultivaci, tvoří spirochety vnější membránové váčky („blebs“), které oddělují od mateřské buňky (Barbour *et Hayes.*, 1986). „Blebs“ jsou tedy indukovány různými faktory (Barbour *et Hayes.*, 1986, Meriläinen *et al.*, 2015) a to podporuje zjištění, že tvorba „blebs“ se zvyšuje při stresu z prostředí. Jsou to rozdílně velká extracelulární granula, jejich průměrná velikost je 1,3 μm (Meriläinen *et al.*, 2015) a mají podobnou stavbu jako ztenčená buněčná stěna (Bartůněk *et al.*, 2013). Na rozdíl od cyst jsou pohyblivá a zřejmě nejsou živá (Bartůněk *et al.*, 2013). Mají těsně sbalenou DNA a mohou se podílet na přenosu genetické informace a (Garon *et al.*, 1989, Meriläinen *et al.*, 2015).

Biofilmy jsou příkladem adaptace bakterií na různé vnější podmínky prostředí a jsou to velmi složité struktury vysoce odolné vůči okolnímu prostředí (Rudenko *et al.*, 2019). Bylo potvrzeno, že *Borelie* jsou schopné tvořit biofilmu-podobné kolonie (Sapi *et al.*, 2012). Tyto biofilmu-podobné kolonie a agregáty jsou *Borrelie* schopné vytvářet na biotických i abiotických substrátech (O'Toole *et al.*, 2000). Kolonie *Borrelií* jsou tvořeny různými morfologickými formami Bb a to bylo prokázáno jak *in vivo*, tak *in vitro* (Sapi *et al.*, 2012, Meriläinen *et al.*, 2015). Tvorbu biofilmů u *Borrelií in vitro* podporuje vysoká hustota buněk (Srivastava *et de Silva*, 2009, Meriläinen *et al.*, 2015), ale není jediným faktorem (Meriläinen *et al.*, 2015). Dalšími faktory, které pozitivně ovlivňují tvorbu biofilmů je vyšší teplota a nízké pH (Srivastava *et de Silva*, 2009, Meriläinen *et al.*, 2015). Vysoká odolnost těchto struktur je dána extracelulární vrstvou. Sapi a kolegové (2012) prokázali, že ochranná extracelulární vrstva *Borrelií* je tvořena převážně alginátem s vápníkem a extracelulární DNA (Sapi *et al.*, 2012). Součástí této vrstvy jsou i proteiny podobné kolagenu a nejspíš můžou podporovat vazbu biofilmu na hostitelské tkáně (Meriläinen *et al.*, 2015). Zároveň jsou v této vrstvě přítomny kanálovité struktury (Rudenko *et al.*, 2019), které asi slouží k přísunu živin (Sapi *et al.*, 2012). Některé studie naznačují spojitost mezi patologií Alzheimerovy choroby a *B. burgdorferi*, ovšem

mechanismus zatím není znám. Jednou z teorií je, že tvorba biofilmů Bb vytváří A β plaky charakteristické pro Alzheimerovu chorobu (Chakravarthi *et Joshi*, 2022).

Rozdílné morfologické formy Borrelií vyžadují ještě mnoho studií, aby byla zjištěna jejich hlavní úloha a mechanismy, kterými mohou přispívat k patogenezi LB. Bylo ovšem potvrzeno, že rozdílné morfologické formy Borrelií vyvolávají odlišnou imunitní odpověď ve srovnání se spirochétami a mohou tak hrát roli v patogenezi LB (Meriläinen *et al.*, 2016).

4 Materiál a Metody

4.1 Biologický materiál

Pro experimenty byly použity bakterie sbírkového kmene *B. garinii* (terénní izolát z klíštěte *Ixodes ricinus*. Byly pěstované v BSK médiu (viz Použité experimentální a vyhodnocovací postup).

Laboratorní myši použité v experimentu jsou kmene BALB/C (Anlab, Praha).

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie

- Ampicilin, sodná sůl (Calbiochem)
- Antibiotická směs obsahující rifampicin, fosfomycin a amphotericin B (HiMedia)
- Barbour-Stones-Kelly (BSK) médium (BioConcept)
- Deionizovaná voda
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-ner)
- Doxycyklin (Sigma-Aldrich)
- EDTA (Sigma-Aldrich)
- Fenoxyetanol (Fisher Scientific)
- Formaldehyd, 16% (Electron Microscopy Sciences)
- Hydrogenfosforečnan draselný (Lach-ner)
- Chloramfenikol (Sigma-Aldrich)
- Chlorid draselný (Lach-ner)
- Chlorid sodný (Lach-ner)
- Kanamycin (Sigma-Aldrich)
- Králičí sérum (Sigma-Aldrich)
- Protilátka Goat Anti-Mouse IgG Fc, alkaline phosphatase conjugate (Invitrogen, A16093)

4.2.2 Použité soupravy

- Anti-*Borrelia* EUROLINE-RN-AT (EUROIMMUN, DN 2131-3201 G)
- Anti-*Borrelia* EUROLINE-WB (IgG) (EUROIMMUN, DY 2131-3001-1 G)
- *Autoimmune Inflammatory Myopathies* 16 Ag (EUROIMMUN, DL 1530-1601-4 G)
- LIVE/DEAD™ BacLight™ –Bacterial Viability Kit (ThermoFisher, L7007)

4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava

- 10 x PBS pufr (zásobní roztok):
 - 240 g chloridu sodného
 - 6 g chloridu draselného
 - 40 g hydrogenfosforečnanu disodného dodekahydrátu
 - 6 g dihydrogenfosforečnanu draselného
 - Rozpustit ve 3 l deionizované vody.
- 1 x PBS pufr (pracovní roztok):
 - Na přípravu 1 l tohoto roztoku je potřeba smíchat 900 ml deionizované vody se 100 ml zásobního roztoku 10 x PBS.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Běžné počítačové vybavení
- Centrifuga multifunkční 352-R (MPW)
- Fluorescenční mikroskop Axioskop (Opton) s kamerou DP70 (Olympus)
- Kombinovaná laboratorní chladnička (Samsung)
- Minitřepačka MS 3 basic (IKA)
- Odstředivka fixní MPW15 (MPW)
- Sada jednobáňových automatických pipet s různými objemovými rozsahy (minimální rozsah 0,2 µl a maximální 1000 µl) – Thermo Scientific
- Třepačka orbital shaker KS (IKA)
- Váhy EMB 600-2 (KERN)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

Praktické úkony byly prováděny v laboratořích Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Byly dodržovány postupy a zásady práce s infekčním materiálem.

Kultivace bakterií, kultivace s antibiotiky a imunizace myši byla z větší části provedena vedoucím práce za mé přítomnosti kvůli legislativním a bezpečnostním omezením práce s infekčním materiálem a laboratorními zvířaty.

Kultivace bakterií:

1. Bakterie sbírkového kmene *B. garinii* (terénní izolát z klíštěte *Ixodes ricinus*) byly kultivovány v médiu Barbour-Stoner-Kelly (BSK) obohaceném o 6% králíčího séra a antibiotickou směs obsahující rifampicin, fosfomycin a amphotericin B.
2. Spirální formy byly izolovány v logaritmické růstové fázi, agregáty byly vyvolány dlouhodobou kultivací (cca 21 dnů) a cystické formy byly indukovány přidávkem 100 µg/ml ampicilinu.

3. Bakteriální peleta získaná z kultury spirálních a cystických forem centrifugací při 6000xg byla třikrát promyta PBS. Agregáty byly izolovány od zbytku spirálních forem centrifugací při nízkých otáčkách s opakovaným promýváním PBS (100xg, 20 min, 5 cyklů).

Kultivace v přítomnosti antibiotik:

1. Bakteriální kmen *B. garinii* byl kultivován podle výše popsaného postupu. V logaritmické fázi růstu byla ke kultuře přidána antibiotika doxycyklin (100 µg/ml), ampicilin (100 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml) nebo chloramfenikol (100 µg/ml).

Příprava vakcinačních přípravků:

- Inaktivovaná vakcína:
 1. Bakterie byly resuspendovány v 1% formaldehydu v PBS (množství odpovídající objemu původní kultury) a inkubovány 1 týden při 4°C.
 2. Následně byly inaktivované bakterie promyty 3x sterilním PBS a doředěny na koncentraci celkového proteinu 200 µg/ml pomocí sady BCA protein assay kit.
 3. K bakteriím bylo přidáno adjuvans na bázi hliníku v objemu 20 %.
- Štěpená vakcína:
 1. Bakterie byly resuspendovány ve sterilním PBS s 1 % fenoxyetanolu a 100 µm EDTA.
 2. Bakterie byly lyzovány opakovaným zamražením (3x) v kombinaci s následnou sonikací za využití ultrazvukového homogenizátoru na ledu 10 x 10 vteřin.
 3. Lyzáty byly doředěny na koncentraci celkového proteinu 200 µg/ml pomocí sady BCA protein assay kit.
 4. K bakteriím bylo přidáno adjuvans na bázi hliníku v objemu 20 %.

Imunizace experimentálních zvířat a odběr vzorků:

1. Oběma vakcinačními přípravky byly imunizovány laboratorní myši kmene BALB/C ve skupinách po 4 samicích (při začátku experimentu hmotnost 18 – 20 gramů).
2. Vakcinace byla provedena 100 µl intradermálně. Myši byly revakcinovány po 14 dnech.
3. Myši byly uspány injekčním podáním ketaminu/xylazinu a byly jim odebrány vzorky krve protětím *arteria carotis sinister*.
4. Krevní vzorky byly ponechány koagulovat 4 hodiny při 4°C, zcentrifugovány na stolní centrifuze a sérum bylo zamraženo na -20°C pro pozdější použití.

4.4.1 Mikroskopická charakterizace bakteriálních kultur pěstovaných s antibiotiky pomocí fluorescenční mikroskopie

K fluorescenčnímu obarvení bakteriálních kultur byla využita souprava LIVE/DEAD™ BacLight™ – Bacterial Viability Kit (ThermoFisher, L7007). Tato souprava se používá pro rychlé a snadné určení viability bakterií.

Tato souprava využívá dvou fluorescenčních barviv: zelené fluorescenční barvivo SYTO a propidium jodid (PI). Obě tato barviva mají rozdílnou prostupnost do bakterií a rozdílnou afinitu k nukleovým kyselinám. Barvivo SYTO prostupuje do všech buněk, jak porušených tak s intaktní plazmatickou membránou. Toto barvivo vykazuje zelený fluorescenční signál a maxima excitace a emise jsou: $\lambda_{ex} = 480 \text{ nm}$ a $\lambda_{em} = 500 \text{ nm}$. Druhé barvivo PI prostupuje převážně do bakteriálních buněk s porušenou plazmatickou membránou a má také větší afinitu k nukleovým kyselinám než barvivo SYTO. Ve fluorescenčním mikroskopu má červený signál a maxima excitace a emise jsou: $\lambda_{ex} = 490 \text{ nm}$ a $\lambda_{em} = 635 \text{ nm}$. Při mikroskopii zůstává pozadí nefluorescenční, mrtvé bakterie vykazují červený signál a živé vykazují zelený signál. Směs fluorochromů byla použita v poměru 1:1. Postup barvení Bb pomocí LIVE/DEAD™ BacLight™ –Bacterial Viability Kit (ThermoFisher, L7007) byl následující:

1. Bakteriální suspenze byla zcentrifugována při 6000xg po dobu 10 minut.
2. Po centrifugaci byl slit supernatant a vzniklá peleta byla promyta přidáním 1 ml 1 x PBS pufru. Tyto dva kroky byly opakovány celkem třikrát.
3. Poté byl znovu slit supernatant a sediment byl resuspendován v 1 ml 1x PBS pufru a byly přidány 2 μl směsi fluorochromů SYTO a propidium jodidu (1:1) z použité soupravy (směs bylo nutné před použitím rozmrazit).
4. Obarvený vzorek bylo nutné promíchat a inkubovat 15 minut ve tmě.

4.4.2 Diagnostika přítomnosti protilátek v sérech imunizovaných myší

Pro stanovení protilátek ze sér imunizovaných myší byly použity 3 typy souprav, a to: *Anti-Borrelia* EUROLINE-WB (IgG) (EUROIMMUN, DY 2131-3001-1 G), *Autoimmune Inflammatory Myopathies* 16 Ag (EUROIMMUN, DL 1530-1601-4 G), *Anti-Borrelia* EUROLINE-RN-AT ((EUROIMMUN, DN 2131-3201 G). Byly testovány séra myší imunizovaných různými typy vakcín.

Souprava *Anti-Borrelia* EUROLINE-WB (IgG) využívá techniku Westernblotu a soupravy *Autoimmune Inflammatory Myopathies* 16 Ag a *Anti-Borrelia* EUROLINE-RN-AT využívají lineblotu. Proteiny (antigeny) byly separovány gelovou elektroforézou a přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Vysoce purifikované antigeny byly následně aplikovány jako linie na proužky používané v těchto testovacích sadách.

Souprava Anti-*Borrelia* EUROLINE-WB (IgG) poskytuje kvalitativní in vitro esej na protilátky třídy IgG proti *Borreliovým* antigenům. Sada obsahuje stripy s extrakty antigenů z *Borrelia afzelii* a každý strip navíc obsahuje antigen VlsE z *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. Pokud se v séru pacienta vyskytnou protilátky proti přítomným antigenům, dojde k jejich navázání a následně jsou tyto protilátky třídy IgG detekovány sekundární enzymově značenou protilátkou. Pro stanovení myších protilátek byly soupravy přizpůsobeny použitím konjugované protilátky proti myšimu IgG místo protilátky proti IgG lidskému, která je obsažena v sadách.

Postup při práci s diagnostickou sadou Anti-*Borrelia* EUROLINE-WB (IgG) (EUROIMMUN, DY 2131-3001-1 G) byl následující:

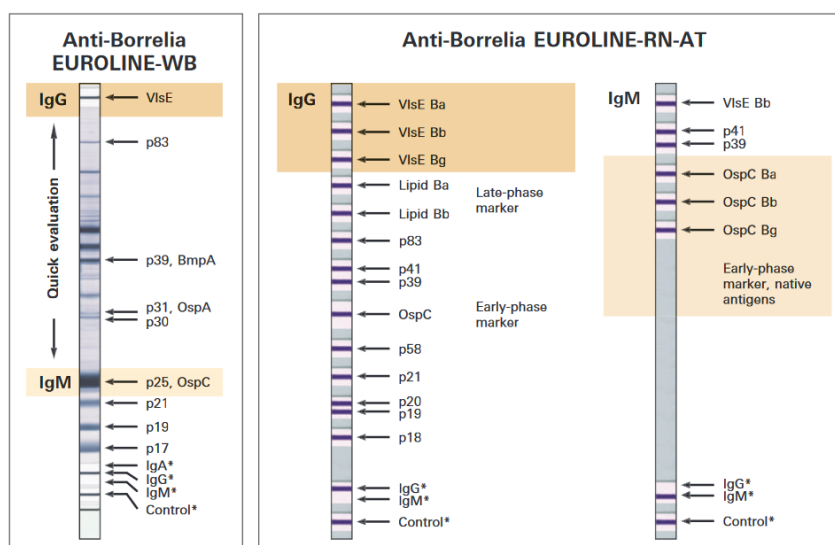
1. Požadovaný počet blotů byl vložen do vaničky a ke každému bylo přidáno 1,5 ml naředěného univerzálního pufru, který je součástí sady (10 x koncentrát). Tento koncentrovaný univerzální pufr byl naředěn s deionizovanou vodou v poměru 1:10. Množství pufru, které je potřeba naředit se odvíjí podle počtu použitých blotů (např. pro 1 blot se míchá 1,5 ml koncentrovaného roztoku pufru s 13,5 ml deionizované vody). Bloty s pufrem byly nechány na třepačce 15 minut při pokojové teplotě.
2. Pufr byl vylit a bylo napipetováno 1,5 ml naředěných sér (ředění 1:1000) k blotům a ty byly nechány 30 minut inkubovat na třepačce při pokojové teplotě.
3. Po inkubaci bylo vylito naředěné sérum a bloty byly promyty 3x 10 minut pomocí 1,5 ml naředěného univerzálního pufru.
4. Po promytí bylo napipetováno ke každému blotu 1,5 ml ředěného enzymového konjugátu Goat Anti-Mouse IgG Fc, alkaline phosphatase conjugate (Invitrogen, A16093), který byl ředěn v poměru 1:1000 a bloty byly nechané inkubovat 30 minut na třepačce při pokojové teplotě.
5. Po této inkubaci byly bloty opět promyty 3x 10 minut pomocí 1,5 ml - naředěného univerzálního pufru a vždy nechané na třepačce při pokojové teplotě.
6. Následně byl vylit naředěný univerzální pufr a do každé jamky k blotu bylo napipetováno 1,5 ml substrátového roztoku (dodáván v sadě ihned k použití, neředí se) a necháno inkubovat 10 minut při pokojové teplotě na třepačce.
7. Nakonec, bylo vše vylito a reakce byla zastavena promytím destilovanou vodou 3x 1 minutu.
8. Bloty byly nechané usušit a byly vyhodnocené pomocí softwaru EUROLineScan, program Euro02 Inf WB30.

Souprava Anti-*Borrelia* EUROLINE-RN-AT (EUROIMMUN, DN 2131-3201 G) slouží ke kvalitativnímu stanovení lidských imunoglobulinů třídy IgG proti antigenům *Borrelia* v séru nebo plazmě. Principem testu je, že obsahuje testovací bloty s navázanými antigeny (nativní OspC Bg, nativní OspC Bb, nativní OspC Ba, p39, p41 a VlsE Bb). V prvním kroku dochází k inkubaci vzorků s těmito bloty.

Pokud jsou přítomné protilátky proti daným antigenům, dojde k jejich navázání a jsou pak detekovány v druhém kroku pomocí sekundární protilátky značené enzymem. Následně je přidán substrát pro enzym a v případě pozitivní reakce dojde ke vzniku zabarvení.

Postup při práci s diagnostickou sadou *Anti-Borrelia* EUROLINE-RN-AT (EUROIMMUN,) byl následující:

1. Prvním krokem bylo umístit požadovaného množství blotů do pracovní desky s kanálky a bylo přidáno 1,5 ml naředěného univerzálního pufru ke každému blotu. Univerzální pufr je součástí sady jako 10 x koncentrát. Ředí se v poměru 1:10 a pro 1 blot je potřeba smíchat 1,5 ml koncentrátu tohoto pufru s 13,5 ml deionizované vody. Bloty byly inkubovány s naředěným univerzálním pufrem 15 minut při pokojové teplotě na třepačce.
2. Naředěný univerzální pufr byl vylit a bylo přidáno 1,5 ml naředěných sér (ředění 1:1000) ke každému blotu a byly inkubovány při pokojové teplotě na třepačce 30 minut.
3. Tekutina byla vylita a bloty byly promyty 3 x 5 minut pomocí naředěného univerzálního pufru.
4. Znovu byla tekutina vylita a k blotům bylo přidáno 1,5 ml enzymového konjugátu Goat Anti-Mouse IgG Fc, alkaline phosphatase conjugate, který byl ředěn v poměru 1:1000 a byly nechány inkubovat 30 minut na třepačce při pokojové teplotě.
5. Bloty byly znovu promyty jako v kroku č. 3.
6. Tekutina byla vylita a ke každému blotu bylo přidáno 1,5 ml substrátového roztoku (součástí sady, ihned k použití, neředí se) a byly nechány inkubovat 10 minut při pokojové teplotě na třepačce.
7. Reakce byla zastavena vylitím tekutiny a promytím 3 x 1 minutu destilovanou vodou.
8. Bloty byly nechány vysušit a byly vyhodnoceny pomocí softwaru EUROLIneScan, program Euro02 Inf WB30.



Obrázek 3: Schématické zobrazení použitých blotových proužků. Pro sadu *Anti-Borrelia* EUROLINE-WB vlevo. Pro sadu *Anti-Borrelia* EUROLINE-RN-AT uprostřed, s označením IgG protilátek. Dostupné z: https://www.euroimmun.com/documents/Indications/Infections/Borrelia/HI_2132_I_UK_C.pdf

Souprava Autoimmune Inflammatory Myopathies 16 Ag (EUROIMMUN, DL 1530-1601-4 G) poskytuje kvalitativní in vitro stanovení lidských autoprotilátek třídy IgG proti 16 myositis specifickým a myositis asociovaným autoantigenům (Mi-2 α , Mi-2 β , TIF1 γ , MDA5, NXP2, SAE1, Ku, PM-Scl100, PM-Scl175, Jo-1, SRP, PL-7, PL-12, EJ, OJ and Ro-52) a slouží k diagnóze různých druhů zánětlivých myositid (imunitně meidovaných onemocnění kosterního svalstva). Každý blot obsahuje linie s purifikovanými antigeny (viz výše). Stejně jako u přechozích souprav. Pokud se v testovaném séru nachází protilátky proti daným antigenům, dojde k jejich navázání a následně jsou detekovány sekundární protilátkou značenou enzymem.

Postup diagnostickou sadou Autoimmune Inflammatory Myopathies 16 Ag (EUROIMMUN, DL 1530-1601-4 G) byl následující:

1. Byl vložen požadovaný počet blotů do vaničky s oddělenými přihrádkami a ke každému bylo přidáno 1,5 ml pufru (součástí sady a hned k použití). Bloty s pufrem byly inkubované 5 minut na třepačce při pokojové teplotě.
2. Pufř byl vylit a bylo přidáno 1,5 ml naředěných sér imunizovaných myší (ředění 1:1000). Bloty byly inkubovány při pokojové teplotě 30 minut na třepačce.
3. Séra byla vylita a každý blot byl promyt 3 x po dobu 5 minut naředěným promývacím pufrem. Tento pufř je v sadě jako 10 x koncentrát a připravuje se ředěním v poměru 1:10 (např. pro 1 blot se smíchá 1 ml koncentrovaného promývacího pufru a 9 ml deionizované vody).
4. Tekutina byla vylita a ke každému blotu bylo přidáno 1,5 ml naředěného enzymového konjugátu Goat Anti-Mouse IgG Fc, alkaline phosphatase conjugate (ředění 1:1000) a byly inkubovány při pokojové teplotě 30 minut na třepačce.
5. Bloty byly promyty naředěným promývacím pufrem stejně jako v kroku 3.
6. Tekutina byla vylita a bylo přidáno 1,5 ml substrátu (součástí sady, ihned k použití) pro enzym a bloty byly nechané inkubovat 10 minut při pokojové teplotě na třepačce.
7. Reakce byla zastavena vylitím a promytím 3 x 1 minutu destilovanou vodou.
8. Bloty byly nechané vysušit a byly vyhodnoceny pomocí softwaru EUROLineScan, program Euro01 AAb EL30 na počítači.

Vzorky sér a protilátka s navázaným enzymem pro testy byly ředěny 1000x. Jako enzym byla použita protilátka Goat Anti-Mouse IgG Fc, alkaline phosphatase conjugate (Invitrogen, A16093).

5 Výsledky

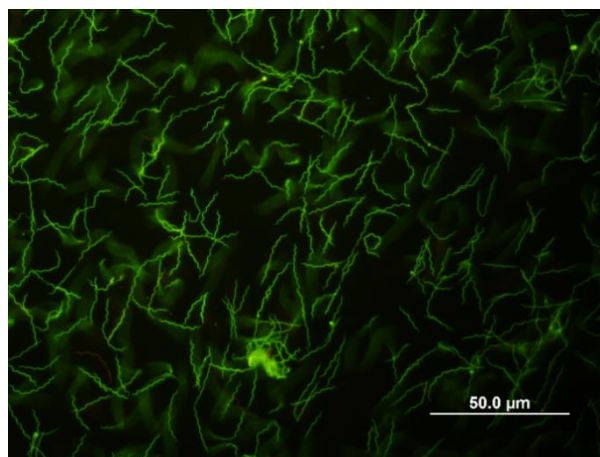
Všechny úkony byly provedeny v souladu s postupy a zásadami práce s infekčním biologickým materiálem. Práce byla prováděna v laboratořích Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

5.1 Mikroskopická charakteristika bakteriálních kultur pěstovaných s antibiotiky pomocí fluorescenční mikroskopie

V první části mé práce, byl testován vliv několika druhů antibiotik na bakterie *Borrelia garinii* patřící do druhového komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Cílem bylo zjistit, jak budou daná antibiotika působit na *Borrelie* a jestli u nich dojde k vytvoření různých morfologických forem. Testována byla antibiotika: ampicilin, doxycyklin, kanamycin a chloramfenikol. Bakterie byly s těmito antibiotiky kultivovány dle postupu uvedeného v metodice.

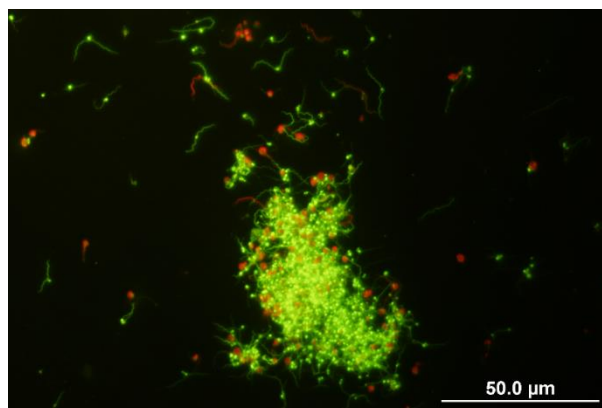
Následně byly bakteriální kultury pěstované s antibiotiky obarveny pomocí sady LIVE/DEAD™ BacLight™ –Bacterial Viability Kit (ThermoFisher, L7007). Výsledky byly získány pozorováním obarvených bakteriálních kultur za použití fluorescenčního mikroskopu Axioskop (Opton) s kamerou DP70 (Olympus) při zvětšení 400x.

Kontrolní vzorky bakteriálních kultur, které nebyly kultivovány s testovanými antibiotiky, byly také obarveny stejnou sadou a pozorovány za použití stejného vybavení. Kontrolní vzorky sloužily k ověření, že bakteriální kultura roste v daném médiu dobře a případný vznik různých morfologických forem není dán špatnými kultivačními podmínkami, ale vlivem testovaných látek (antibiotik). Jak je možné vidět na obrázku č. 4, bakteriální kultury bez přídavku testovaných antibiotik rostly dobře a měly tedy vhodné kultivační podmínky. Je možné vidět klasické spirální formy, metabolicky aktivní, protože po obarvení vykazovaly zelené zbarvení.



Obrázek 4: Snímek spirochet *Borrelia garinii* (kontrolní kultura) pořízený fluorescenčním mikroskopem zvětšení 400x). Bakterie byly obarveny pomocí uvedené soupravy pro barvení. (foto: Nicola Pomališová).

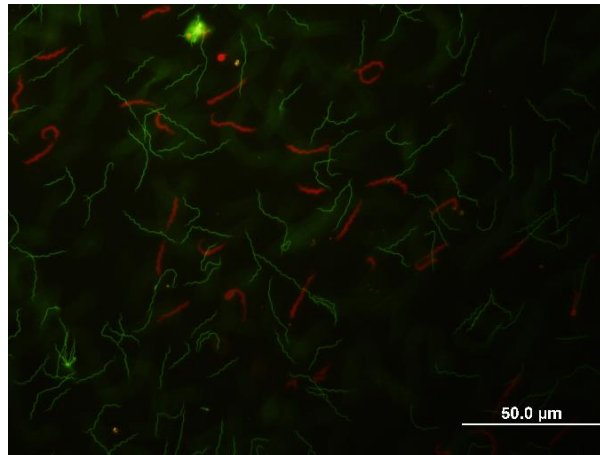
Prvním testovaným antibiotikem byl ampicilin. Toto antibiotikum patří mezi β -laktamová antibiotika. Ta obecně působí tak, že inhibují syntézu buněčné stěny bakterií (Marešová, 2007). Bakteriální kultury *Borrelii* pěstované s tímto antibiotikem vykazovaly vznik cystických forem, jak je možné vidět na obrázku č. 5. Zároveň, v kultuře zůstaly i klasické spirální formy a docházelo ke shlukování těchto forem s cystami do kolonií. Po obarvení bylo možné odlišit metabolicky aktivní (živé) bakterie od neživých. Živé bakterie vykazovaly zelené zbarvení, mrtvé vykazovaly zbarvení červené. Cysty měli ve větší míře poškozenou buněčnou stěnu a po barvení se zbarvily červeně, což značí, že jsou to mrtvé bakteriální formy.



Obrázek 5: Snímek *Borrelii* pěstovaných s antibiotikem ampicilinem. Přítomné jsou jak spirální tak cystické formy. Použité zvětšení 400x. (foto: Nicola Pomališová).

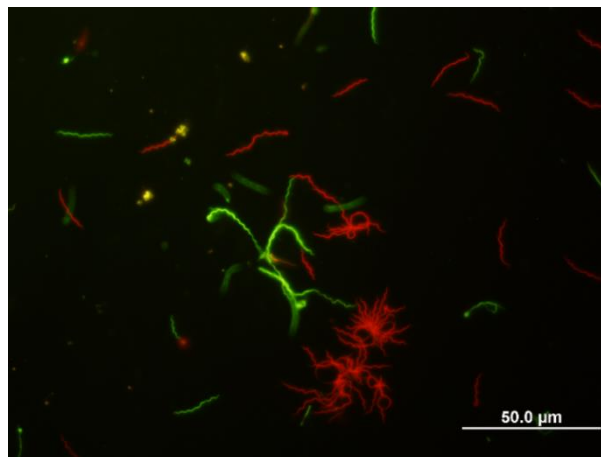
Druhým testovaným antibiotikem byl doxycyklin. Toto antibiotikum patří mezi tetracykliny a je běžně používaným antibiotikem při léčbě Lymeské boreliózy. Působí bakteriostaticky a narušuje proteosyntézu bakterií (stejně jako kanamycin a chloramfenikol). Po kultivaci *Borrelii* s tímto antibiotikem nedošlo k vytvoření žádných odlišných morfologických forem. Odlišné morfologické formy nebyly indukovány ani použitím kanamycinu či chloramfenikolu.

Kanamycin se řadí mezi aminoglykosidy, což jsou širokospektrá baktericidní antibiotika. Po inkubaci bakteriální kultury *Borrelii* s tímto antibiotikem nedošlo k vytvoření žádných morfologicky odlišných forem, jak je možné vidět na obrázku č. 6. Po obarvení bylo možné detekovat jen usmrcené spirochety, které byly zbarvené červeně, ale i spirochety vitální, zbarvené zeleně.



Obrázek 6: Snímek *Borrelii* pěstovaných s antibiotikem kanamycinem. Přítomné jsou pouze živé či mrtvé spirální formy. Živé jsou obarveny zeleně, mrtvé jsou obarveny červeně. Použité zvětšení 400x. (foto: Nicola Pomališová).

Posledním testovaným antibiotikem byl chloramfenikol. Chloramfenikol patří mezi amfenikoly a je to baktericidní antibiotikum, které má mnoho závažných nežádoucích účinků a proto se v humánní medicíně používá jen velmi omezeně. Po kultivaci *Borrelii* s tímto antibiotikem se nevytvořily žádné morfologicky odlišné formy. Jak je možné vidět na obrázku č. 7, v kultuře pěstované s tímto antibiotikem došlo k usmrcení mnoha bakterií, ale nedošlo k vytvoření odlišných morfologických forem. Živé bakterie jsou zbarveny zeleně, mrtvé jsou zbarveny červeně.



Obrázek 7: Snímek *Borrelii* pěstovaných s antibiotikem chloramfenikolem. Přítomné jsou pouze živé či mrtvé spirální formy. Živé jsou obarveny zeleně, mrtvé jsou obarveny červeně. Použité zvětšení 400x. (foto: Nicola Pomališová).

Z testovaných antibiotik tak způsobil vznik cystických forem jen ampicilin, který jako jediný z testovaných antibiotik inhibuje syntézu buněčné stěny bakterií. Ostatní testovaná antibiotika působí na proteosyntézu a nezpůsobila vznik žádných odlišných morfologických forem *Borrelii*, pouze bylo pozorováno, že část bakterií byla antibiotiky usmrcena. Přítomnost části bakterií, které se při barvení

jeví jako životaschopné, není znamením neefektivity antibiotik, ale pravděpodobně výsledkem krátkodobé expozice antibiotikům. U *Borrelii* charakteristických pomalým růstem může být potřeba delší inkubace k vyvolání detekovatelného poškození membrány, které se v použité metodě projeví změnou zbarvení.

5.2 Stanovení přítomnosti protilátek v sérech imunizovaných myší

V druhé experimentální části své práce jsem se věnovala testování sér imunizovaných myší a zjišťování, jaké protilátky vytvořily v reakci na různé typy vakcín, které jim byly podány (viz imunizace laboratorních myší- metodika).

K imunizaci byly použity dva typy vakcín, inaktivovaná a štěpená vakcína (viz příprava vakcinačních přípravků- metodika). Každý typ vakcíny byl připraven pro spirální formy, cysty nebo agregáty.

Jako první byla pro testování použita souprava Anti-*Borrelia* EUROLINE-WB (IgG). Touto sadou byly testovány séra myší imunizovaných jak inaktivovanou tak štěpenou vakcínou. Touto sadou byla testována přítomnost protilátek v sérech imunizovaných myší proti vybraným antigenům *Borrelii* – VlsE, p83, BmpA (p39), OspA (p31), p30, OspC (p25), p21, p19 a p17 (viz obrázek 8). Součástí každého blotu byly i kontrolní čipy (IgG, IgM, IgA) a kontrolní proužek (Koef). Pro vyhodnocení byla jako hraniční stanovena hodnota 20, protože pod touto hodnotou bylo množství protilátek proti danému antigenu vyhodnoceno jako negativní nebo hraniční. Jako negativní byly u všech testovaných vzorků vyhodnoceny protilátky proti antigenům p19 a p17 a hraniční proti VlsE (viz obrázek 8). Pro ostatní antigeny byly vytvořeny grafy, jak je možné vidět na obrázku č. 9 (A-F).

	Anl	Koef	MG	A	p17	p19	p21	p25	p31	p39	p83	VisE		
1 A) Agregáty														
S220302BB-21/51														
pozitivní	Anl	Koef	M	G	A	p17	p19	p21	p25	p30	p31	p39	p83	VisE
	0	194	19	195	14	0	0	134	64	95	81	138	144	18
	o	+	+	+	o	o	o	+	+	+	+	+	+	(+)
2 Cysty														
S220302BB-21/50														
pozitivní	Anl	Koef	M	G	A	p17	p19	p21	p25	p30	p31	p39	p83	VisE
	0	197	17	191	9	0	0	122	69	107	70	147	131	18
	o	+	o	+	o	o	o	+	+	+	+	+	+	(+)
3 Spirální formy														
S220302BB-21/49														
pozitivní	Anl	Koef	M	G	A	p17	p19	p21	p25	p30	p31	p39	p83	VisE
	0	192	16	184	8	0	0	90	108	144	91	132	137	17
	o	+	o	+	o	o	o	+	+	+	+	+	+	(+)
4 B) Agregáty														
S220302BB-21/42														
pozitivní	Anl	Koef	M	G	A	p17	p19	p21	p25	p30	p31	p39	p83	VisE
	0	198	12	189	2	0	0	26	108	18	30	116	127	0
	o	+	o	+	o	o	o	+	+	(+)	+	+	+	o
5 Cysty														
S220302BB-21/41														
pozitivní	Anl	Koef	M	G	A	p17	p19	p21	p25	p30	p31	p39	p83	VisE
	0	197	15	198	4	0	0	97	93	0	67	122	125	0
	o	+	o	+	o	o	o	+	+	o	+	+	+	o
6 Spirální formy														
S220302BB-21/40														
pozitivní	Anl	Koef	M	G	A	p17	p19	p21	p25	p30	p31	p39	p83	VisE
	0	197	15	201	8	0	0	79	99	0	52	116	46	0
	o	+	o	+	o	o	o	+	+	o	+	+	+	o

Obrázek 8: Výsledné hodnoty protilátek z krevního séra myši imunizovaných: A) štěpenou vakcínou a B) inaktivovanou vakcínou proti jednotlivým antigenům *Borrelia*. Všechny testované vzorky byly vyhodnoceny jako pozitivní a byly získány použitím soupravy Anti-*Borrelia* EUROLINE-WB (IgG).

Proti antigenu p21 byly zjištěny protilátky v sérech myši imunizovaných oběma typy vakcín (viz obrázek 9-A). Vyšší hodnoty protilátek proti antigenu p21 byly zjištěny při použití štěpené vakcíny a to pro všechny tři typy (agregáty, cysty, spirální formy). Největší rozdíl byl zaznamenán u obou vakcín s agregáty, kdy hodnoty zjištěných protilátek byly u štěpené vakcíny s agregáty až 5x vyšší než u inaktivované vakcíny s agregáty (viz obrázek 9-A). Pro cysty a spirální formy byla vyšší hodnota protilátek naměřena při použití štěpené vakcíny.

Pro antigen OspC (p25) byly hodnoty zjištěných protilátek velmi podobné. Pro vakcíny s agregáty a cystami bylo zjištěno větší množství protilátek v sérech myši imunizovaných inaktivovanou vakcínou. U spirálních forem byly zjištěny vyšší hodnoty při použití štěpené vakcíny (viz obrázek 9-B).

U antigenu p30 (viz obrázek 9-C) byly protilátky zjištěny při použití štěpené vakcíny (všechny tři typy) a hodnoty zjištěných protilátek byly od nejnižší po nejvyšší u agregátů přes cysty až po štěpenou vakcínu se spirálními formami. U sér myši imunizovaných inaktivovanou vakcínu byly protilátky proti antigenu p30 zjištěny jen při použití inaktivované vakcíny s agregáty. U inaktivované vakcíny s cystami nebo spirálními formami nebyly protilátky proti tomuto antigenu detekovány vůbec.

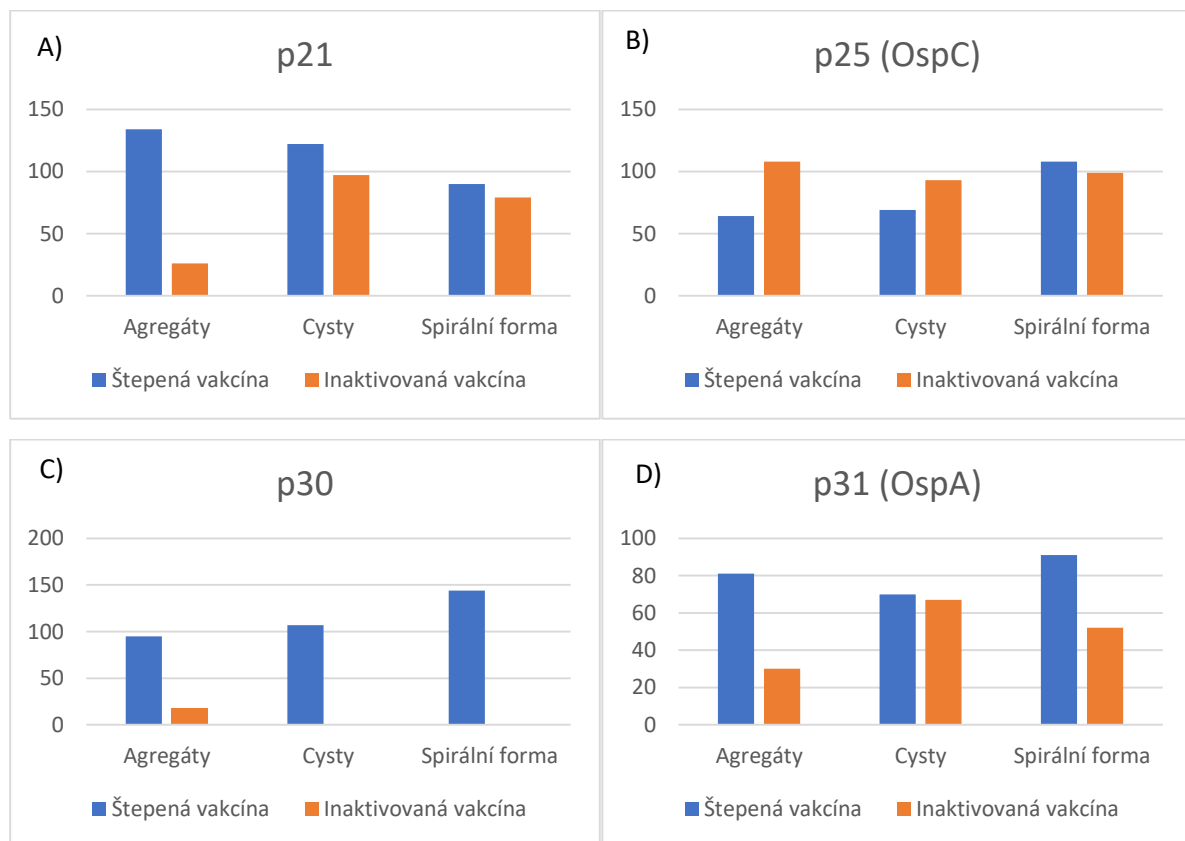
Pro antigen OspA (p31) byly nejvyšší hodnoty zjištěných protilátek zaznamenány ze sér myši imunizovaných štěpenou vakcínou se spirálními formami (viz obrázek 9-D). Tato hodnota byla až o polovinu vyšší než při použití inaktivované vakcíny se spirálními formami. Pro obě vakcíny s cystami byly hodnoty téměř shodné. Při použití vakcín s agregáty byly zjištěny až 2,5x vyšší hodnoty

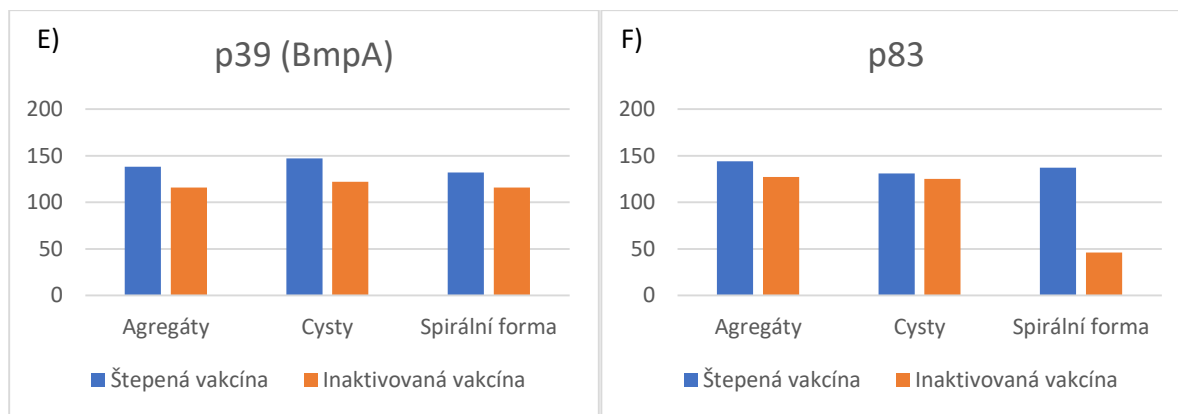
protilátek ze sér myši imunizovaných štěpenou vakcínou než u myši imunizovaných vakcínou inaktivovanou (viz obrázek 9-D).

Pro antigen BmpA (p39) byly zjištěny vyšší hodnoty protilátek při použití štěpené vakcíny všech tří typů (agregáty, cysty, spirální formy) - viz obrázek 9-E. Nejvyšší hodnota protilátek byla zaznamenána při použití štěpené vakcíny s cystami. Hodnoty protilátek při použití inaktivované vakcíny byly pro všechny tři typy velmi podobné a téměř se nelišily.

Pro antigen p83 (viz obrázek 9-F) byly hodnoty zjištěných protilátek velmi podobné při použití štěpené a inaktivované vakcíny buď s agregáty, nebo cystami. Všechny byly v rozmezí od 100 do 150 a lehce vyšší byly při použití štěpených vakcín. Největší rozdíl ve stanovených protilátkách byl zjištěn při použití obou typů vakcín se spirálními formami. U štěpené vakcíny se spirálními formami byly hodnoty zjištěných protilátek až 3x vyšší než u inaktivované vakcíny se spirálními formami (viz obrázek 9-F).

Pro poslední antigen VlsE byly zjištěny protilátky hraniční a jen při použití štěpené vakcíny. Při podrobnější analýze grafu optické denzity kvůli plochosti a velikosti peaku máme podezření na nespecifičnost tohoto výsledku.





Obrázek 9: Souhrnné grafy (A-F) pro výsledky hodnot protilátek proti jednotlivým testovaným antigenům sadou Anti-*Borrelia* EUROLINE-WB (IgG). Výsledky na každém grafu jsou pro oba typy testovaných vakcín. Výsledné hodnoty jsou v jednotkách optické denzity.

Jako druhá byla použita testovací souprava Anti-*Borrelia* EUROLINE-RN-AT. Tato souprava byla použita, protože obsahuje rekombinantní antigeny, které mohou poskytovat specifitější reakce a kvůli částečně odlišnému antigennímu spektru. Jsou zde obsaženy lipidové antigeny a antigen p58, které se klinicky vyžívají jako marker pro pokročilé infekce. Byla testována přítomnost protilátek proti následujícím antigenům: VlsE (Ba, Bb, Bg), LBa (lipid *B. afzelii*), LBb (lipid *B. burgdorferi*), p83, Flagellinu (p41), BmpA (p39), OspC, p58, p21, p20, p19 a p18. Dále každý testovací proužek obsahoval pozitivní kontrolu (Ko) a izotypové kontroly IgG a IgM. Touto soupravou byly opět testovány oba typy vakcín- jak inaktivovaná, tak štěpená vakcína. Opět pro vyhodnocení výsledků byla stanovena hraniční hodnota 20, a pod touto hodnotou byla přítomnost testovaných protilátek vyhodnocena jako negativní. Výsledné hodnoty jednotlivých testů je možné vidět na obrázku č. 10. Jako negativní byly vyhodnoceny u všech testovaných vzorků protilátky proti následujícím antigenům: p18, p19, p20, p21, p58, LBb, LBa a všechny druhy VlsE (VlsE-Ba, VlsE-Bb, VlsE-Bg). Pro ostatní antigeny, proti kterým byly detekovány protilátky, byly vytvořeny grafy- viz obrázek 11 (A-D).

2	myš_agregáty	Et	Ko	Ig/IgG	p18	p19	p20	p21	p58	OspC	p39	p41	p83	LBb	LBa	VisE-Bg	VisE-Bb	VisE-Ba	
		Bor-G/ 32-82																	
		pozitivní	-1	171	-1	170	2	2	2	2	2	3	85	139	102	1	1	1	1
		o	+	o	+	o	o	o	o	o	+	+	+	o	o	o	o	o	o
3	myš_cysty	Et	Ko	Ig/IgG	p18	p19	p20	p21	p58	OspC	p39	p41	p83	LBb	LBa	VisE-Bg	VisE-Bb	VisE-Ba	
		Bor-G/ 32-83																	
		pozitivní	-1	164	-1	165	1	1	2	1	1	3	76	150	47	0	1	2	3
		o	+	o	+	o	o	o	o	o	+	+	+	o	o	o	o	o	o
4	myš_spirály	Et	Ko	Ig/IgG	p18	p19	p20	p21	p58	OspC	p39	p41	p83	LBb	LBa	VisE-Bg	VisE-Bb	VisE-Ba	
		Bor-G/ 32-84																	
		pozitivní	-1	174	-1	175	1	2	2	1	1	3	70	142	99	0	1	1	1
		o	+	o	+	o	o	o	o	o	+	+	+	o	o	o	o	o	o
3	Agr- F	Et	Ko	Ig/IgG	p18	p19	p20	p21	p58	OspC	p39	p41	p83	LBb	LBa	VisE-Bg	VisE-Bb	VisE-Ba	
		Bor-G/ 144-89																	
		pozitivní	-1	115	-1	94	13	3	3	3	3	82	62	113	87	1	0	1	3
		o	+	o	+	(+)	o	o	o	o	+	+	+	o	o	o	o	o	o
4	Cys- F	Et	Ko	Ig/IgG	p18	p19	p20	p21	p58	OspC	p39	p41	p83	LBb	LBa	VisE-Bg	VisE-Bb	VisE-Ba	
		Bor-G/ 144-90																	
		pozitivní	-1	94	-1	77	12	6	2	4	2	15	77	113	45	1	1	1	3
		o	+	o	+	(+)	o	o	o	o	(+)	+	+	o	o	o	o	o	o
5	Spir-F	Et	Ko	Ig/IgG	p18	p19	p20	p21	p58	OspC	p39	p41	p83	LBb	LBa	VisE-Bg	VisE-Bb	VisE-Ba	
		Bor-G/ 144-91																	
		negativní	-1	121	-1	90	5	2	2	4	2	17	66	110	5	1	0	1	2
		o	+	o	+	o	o	o	o	(+)	+	+	o	o	o	o	o	o	o

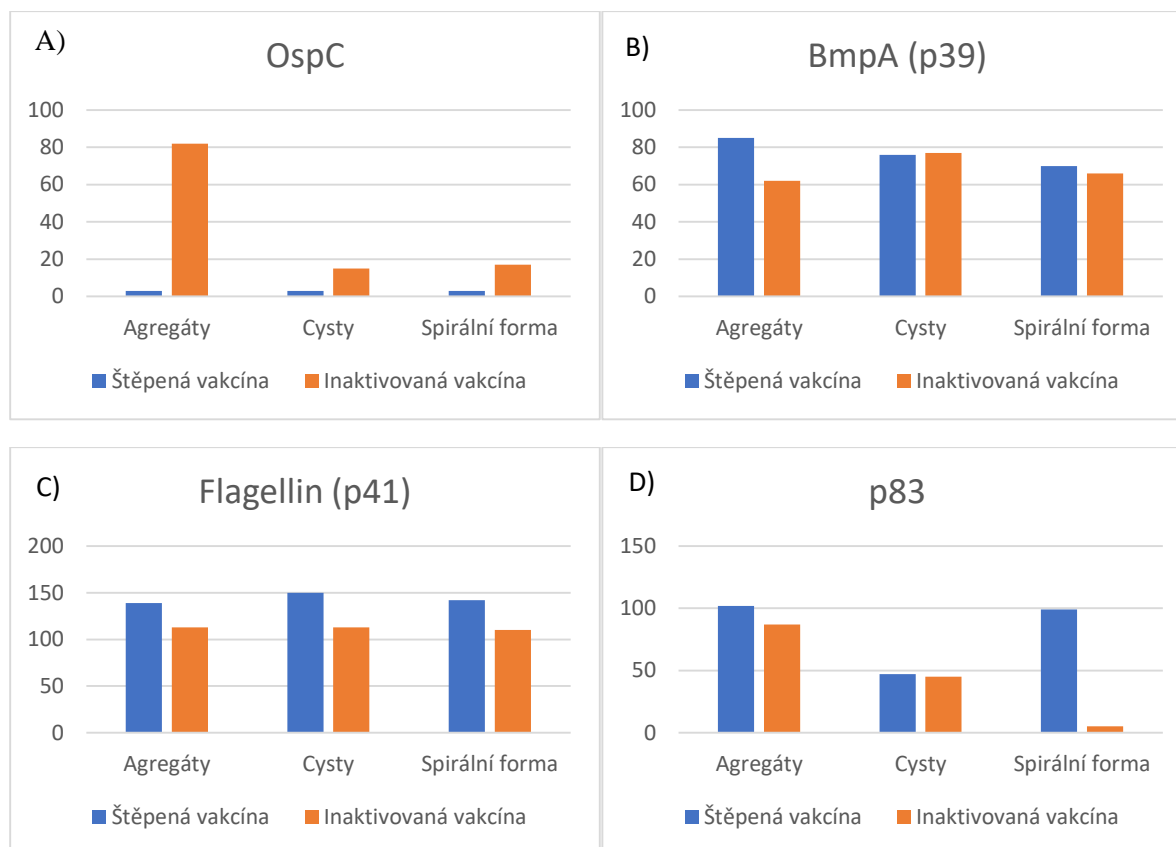
Obrázek 10: Výsledné hodnoty protilátek z krevního séra myši imunizovaných: A) štěpenou vakcínou a B) inaktivovanou vakcínou proti jednotlivým antigenům. Kormě vzorku Spir-F, byly všechny ostatní testované vzorky vyhodnoceny jako pozitivní. Výsledné hodnoty byly získány použitím soupravy Anti-*Borrelia* EUROLINE-RN-AT. Agr-F (inaktivovaná vakcína- agregáty), Cys-F (inaktivovaná vakcína s cystami), Spir-F (inaktivovaná vakcína se spirálními formami).

Pro antigen OspC byly zjištěné hodnoty protilátek pro štěpenou vakcínu vyhodnoceny jako negativní (viz obrázek 11-A). Ovšem při použití inaktivované vakcíny byly detekovány protilátky u všech tří typů této vakcíny. Nejvíce protilátek proti antigenu OspC bylo zjištěno ze sér imunizovaných myši inaktivovanou vakcínou s agregáty. Tato hodnota byla až 5x vyšší než u protilátek detekovaných ze sér myši imunizovaných inaktivovanou vakcínou s cystami nebo spirálními formami. Hodnoty protilátek při použití inaktivované vakcíny s cystami nebo spirálními formami byly shodné.

U antigenu BmpA (p39)- viz obrázek 11-B, byly výsledné hodnoty zjištěných protilátek velmi podobné hodnotám zjištěným soupravou Anti-*Borrelia* EUROLINE-WB (IgG). Protilátky byly detekovány při použití obou typů vakcín (štěpená, inaktivovaná) a nejvyšší hodnota byla zjištěna při použití štěpené vakcíny s agregáty a zároveň nejnižší hodnota byla zjištěna použitím inaktivované vakcíny s agregáty. Ostatní naměřené hodnoty byly velmi podobné v rozmezí od 60 do 80.

Protilátky proti Flagellinu (p41) byly detekovány u obou typů testovaných vakcín (viz obrázek 11-C). Vyšší hodnoty byly zjištěny při použití štěpené vakcíny všech tří typů (agregáty, cysty, spirální formy) oproti inaktivované vakcíně. Nejvyšší hodnota protilátek byla zjištěna při použití štěpené vakcíny s cystami. Hodnoty zjištěných protilátek pro inaktivovanou vakcínu byly totožné jak pro agregáty, cysty i spirální formy.

Pro antigen p83 (viz obrázek 11-D) byly zjištěny protilátky u obou typů vakcín. U štěpené vakcíny s agregáty byly zjištěny vyšší hodnoty protilátek než u inaktivované vakcíny s agregáty. Pro oba typy vakcín s cystami byly zjištěny totožné hodnoty protilátek proti antigenu p83. Pro štěpenou vakcínu se spirálními formami byla zjištěna 20x vyšší hodnota protilátek než při použití inaktivované vakcíny se spirálními formami. Nejvyšší hodnoty byly zjištěny pro štěpenou vakcínu s agregáty a spirálními formami. Nejnižší hodnota protilátek byla zjištěna při použití inaktivované vakcíny se spirálními formami. Zároveň hodnoty protilátek naměřené touto sadou odpovídají hodnotám zjištěným sadou Anti-*Borrelia* EUROLINE-WB (IgG) pro tento antigen.



Obrázek 11: Souhrnné grafy (A-D) pro výsledky hodnot protilátek proti jednotlivým testovaným antigenům sadou Anti-*Borrelia* EUROLINE-RN-AT. Výsledky na každém grafu jsou pro oba typy testovaných vakcín. Výsledné hodnoty jsou v jednotkách optické denzity.

Antigeny: VlsE, p83, BmpA (p39), OspC (p25), p21 a p19 se nacházely v obou použitých testovacích soupravách. Protilátky proti antigenu p19 nebyly detekovány ani jednou použitou soupravou. Pro antigen p21 byly získány výsledky jen při použití soupravy Anti-*Borrelia* EUROLINE-WB (IgG) a při použití druhé testované soupravy byly výsledky testovaných protilátek proti antigenu p21 negativní.

Výsledné hodnoty protilátek u obou testovacích souprav pro antigen p83 vyšly shodně (vykazovaly stejný trend), jak je možné vidět na obrázcích 10-F a 11-D. Stejných výsledků bylo

dosazeno i při zjišťování protilátek proti antigenu BmpA (p39) jak je možné vidět na obrázcích 10-E a 11-B.

Největší rozdíl byl zaznamenán u antigenu OspC (p25), který byl testován taktéž oběma typy souprav (viz obrázky 10-B a 11-A). Testovací sadou *Anti-Borrelia* EUROLINE-WB (IgG) byly protilátky proti tomuto antigenu detekovány u obou typů testovaných vakcín (štěpená, inaktivovaná), zatímco u druhé testovací sady *Anti-Borrelia* EUROLINE-RN-AT byly protilátky detekovány jen v sérech myši imunizovaných inaktivovanou vakcínou. Navíc nejvyšší hodnota protilátek byla zaznamenána jen u inaktivované vakcíny s agregáty a u inaktivované vakcíny s cystami a spirálními formami bylo detekováno jen nízké množství protilátek (lehce nad hranici negativních hodnot). Pozorovaný rozdíl lze vysvětlit rozdílem ve formě použitého antigenu. V první sadě je obsažen antigen v plné délce včetně triacylglycerolového motivu (OspC je lipoprotein). V druhé sadě je obsažen antigen rekombinantní, o jeho přesné struktuře však výrobce nepodává informace. Je však možné, že může jít o zkrácenou molekulu, postrádající C-terminální lipidizační motiv, případně i část peptidové sekvence na tomto konci.

Poslední použitou testovací soupravou byla *Autoimmune Inflammatory Myopathies 16 Ag*. Touto soupravou byla testována přítomnost autoprottilátek proti následujícím antigenům: Mi-2 α , Mi-2 β , TIF1 γ , MDA5, NXP2, SAE1, Ku, PM-Scl-100, PM-Scl-75, Jo-1, SRP, PL-7, PL-12, EJ, OJ, Ro-52. Součástí každého blotu byla i kontrola. Antigeny v této soupravě jsou různé proteiny, které se používají k diagnostice různých druhů myozitid. V mém případě byla testována přítomnost autoprottilátek v sérech imunizovaných myši proti uvedeným antigenům. Všechny testované vzorky vyšly jako negativní, jak je možné vidět na obrázku č. 12. U žádné imunizované myši nebyly detekovány autoprottilátky proti antigenům v této soupravě tj. žádné myši nevyvinuly MSA (Myositis-specific autoantibodies) nebo MAA (Myositis-associated autoantibodies). Tento test byl proveden kvůli předchozímu pozorování vysoké frekvence MSA/MAA protilátek u pacientů s PTLDS. Výsledek naznačuje, že indukce těchto autoprottilátek není důsledkem zkřížené reaktivity borreliových proteinů se savčími antigeny, ale pravděpodobněji mechanismy souvisejícími s nespecifickou aktivací imunitního systému během infekce.

1	1	Zn	Koef	Ro52	OJ	EJ	PL-12	PL-7	SRP	Jo-1	PM75	PM100	Ku	SAE1	NXMDA5	TIF1g	Mi-2b	Mi-2a	
		MYO 4/109-33																	
		Zn	Koef	Ro52	OJ	EJ	PL-12	PL-7	SRP	Jo-1	PM75	PM100	Ku	SAE1	NXP2	MDA5	TIF1g	Mi-2b	Mi-2a
		-1	55	0	1	1	1	1	2	0	1	1	1	0	1	1	0	2	1
		o	+++	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
2	2	Zn	Koef	Ro52	OJ	EJ	PL-12	PL-7	SRP	Jo-1	PM75	PM100	Ku	SAE1	NXMDA5	TIF1g	Mi-2b	Mi-2a	
		MYO 4/109-35																	
		Zn	Koef	Ro52	OJ	EJ	PL-12	PL-7	SRP	Jo-1	PM75	PM100	Ku	SAE1	NXP2	MDA5	TIF1g	Mi-2b	Mi-2a
		-1	20	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1
		o	+	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
3	3	Zn	Koef	Ro52	OJ	EJ	PL-12	PL-7	SRP	Jo-1	PM75	PM100	Ku	SAE1	NXMDA5	TIF1g	Mi-2b	Mi-2a	
		MYO 4/109-34																	
		Zn	Koef	Ro52	OJ	EJ	PL-12	PL-7	SRP	Jo-1	PM75	PM100	Ku	SAE1	NXP2	MDA5	TIF1g	Mi-2b	Mi-2a
		-1	33	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1
		o	++	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	
4	4	Zn	Koef	Ro52	OJ	EJ	PL-12	PL-7	SRP	Jo-1	PM75	PM100	Ku	SAE1	NXMDA5	TIF1g	Mi-2b	Mi-2a	
		MYO 4/109-32																	
		Zn	Koef	Ro52	OJ	EJ	PL-12	PL-7	SRP	Jo-1	PM75	PM100	Ku	SAE1	NXP2	MDA5	TIF1g	Mi-2b	Mi-2a
		-1	42	1	0	4	0	1	1	2	1	0	1	0	2	1	0	1	1
		o	++	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	

Obrázek 12: Výsledné hodnoty autoprotílátek z krevních sér imunizovaných myši štěpenou vakcínou. Legenda: MYO 4/109-33 (Spirální formy), MYO 4/109-35 (kontrola), MYO 4/109-34 (agregáty), MYO 4/109-32 (cysty).

6 Diskuse

Bakterie z komplexu *B. burgdorferi sensu lato* způsobující Lymeskou boreliózu, jsou vybaveny celou řadou mechanismů, kterými se mohou vyhnout účinku imunitního systému svého hostitele. Mezi tyto mechanismy patří produkce velkého množství rozdílných antigenů na svém povrchu nebo navázání určitých imunosupresivních molekul hostitele na svůj povrch, čímž se stávají nezjistitelné pro hostitelský imunitní systém. Dále mohou využít k rychlému pohybu periplazmaticky uložené bičíky, unikat fagocytujícím buňkám a pronikat přes mnohé epiteliální bariéry. V neposlední řadě mohou vlivem vnějších podmínek nebo účinkem antibiotik tvořit odlišné morfologické formy. Tyto morfologicky odlišné formy jsou odolnější než klasické spirální formy a mají také odlišné antigenní vlastnosti. Díky výzkumu přibývá stále více věrohodných důkazů, že různé non-spirální formy mohou pomoci *Bbsl* uniknout imunitnímu systému hostitele (Dominique *et* Woody, 1997, Justice *et al.*, 2008, Meriläinen *et al.*, 2015).

Vznik a možná perzistence odlišných morfologických forem je velmi diskutovaným tématem v souvislosti s *post-treatment lyme disease syndromem* (PTLDS), jako jedna z možných variant, co tento stav způsobuje. Doposud se však nepodařilo vyvrátit, či prokázat jestli za tímto jevem stojí různé morfologické formy *Borrelii* či je způsobován jinou příčinou. Proto je důležité dále studovat efekt používaných antibiotik a předcházet možnému vzniku těchto odlišných morfologických forem *Borrelii*.

V první části mého experimentu byl testován vliv čtyř druhů antibiotik na změny morfologie *Borrelii*. Testována byla antibiotika: ampicilin, doxycyklin, kanamycin a chloramfenikol. K vyvolání cystických forem došlo jen při použití antibiotika ampicilinu (viz obrázek 5), který patří mezi β -laktamová antibiotika a jako jediný z testovaných antibiotik inhibuje syntézu buněčné stěny bakterií. Tento výsledek odpovídá již dříve zjištěným závěrům, kdy bylo prokázáno, že β -laktamová antibiotika způsobují vznik cystických forem (Kersten *et al.*, 1995). Antibiotikum doxycyklin patří mezi tetracykliny, působí bakteriostaticky, inhibuje proteosyntézu a běžně se využívá k léčbě raných fází lymeské boreliózy (Wormser *et al.*, 2006). V mém experimentu nebyly indukovány použitím tohoto antibiotika odlišné morfologické formy. Ve studii publikované v roce 2011 (Sapi *et al.*, 2011) bylo použitím doxycyklinu zvýšeno množství cystických forem až 2x, ovšem byla použita 2,5x vyšší koncentrace než v mém experimentu. Nelze tedy říct, že by doxycyklin způsoboval vznik cystických forem při léčbě Lymeské boreliózy a potenciálně tak zvyšoval riziko přetrvávání *Borrelii* v organismu, protože nejde porovnávat *in vitro* studie s účinkem antibiotik na bakterie v organismu. K vyvolání odlišných morfologických forem v mém experimentu nedošlo ani při použití kanamycinu a chloramfenikolu (obrázky 6 a 7). Obě tato antibiotika působí baktericidně, narušují proteosyntézu a cytoplazmatickou membránu a usmrcují tak bakterie. Výsledek tedy vyšel dle očekávání, protože při pozorování byla velká část bakterií mrtvá. Rozlišit mrtvé či živé bakteriální formy bylo možné díky použité barvicí soupravě LIVE/DEAD™ BacLight™ – Bacterial Viability Kit. Díky barvení bylo možné

odlišit bakterie s neporušenou plazmatickou membránou (živé) a porušenou plazmatickou membránou (mrtvé). Díky tomu bylo možné pozorovat účinek jednotlivých antibiotik.

V druhé experimentální části byla testována přítomnost protilátek proti jednotlivým antigenům *Borrelii*. *Borrelie* exprimují odlišné antigeny v závislosti na typu hostitele a také v závislosti na tom, jestli se nacházejí *in vivo* nebo *in vitro* podmínkách. Studium protilátek detekovaných ze sér imunizovaných zvířat by mohlo pomoci pochopit mechanismy, jakými hostitelský systém reaguje na infekci *Borreliemi*. U imunizovaných myší byly zjištěny u některých antigenů rozdílné hodnoty protilátek v závislosti na použité vakcíně, ale i mezi jednotlivými typy vakcín (s agregáty, cystami, spirálními formami). Protilátky proti antigenu p58 a lipidům (LBa a LBb) jsou používány jako markery pokročilé infekce a proti těmto antigenům nebyly u imunizovaných myší protilátky detekovány, což potvrzuje, že myši neprodělaly lymeskou boreliózu po imunizaci. Proti antigenu VlsE neměly být protilátky detekovány, protože tento antigen je exprimován jen živými bakteriemi *in vivo*. Ovšem u jednoho testu byla nízká hladina protilátek proti tomuto antigenu detekována. Z výsledků jde ale spíše usuzovat na nespecifičnost reakce, protože druhým testem už protilátky proti tomuto antigenu detekovány nebyly. Dle práce pana Albana (Alban *et al.*, 2000) je v případě cyst exprimován antigen OspA ve větší míře. Z výsledků bylo toto potvrzeno v případě inaktivované vakcíny s cystami. Pro štěpenou vakcínu byly hodnoty u všech typů podobné. To lze vysvětlit tím, že u štěpené vakcíny jsou bakterie lyzovány a k imunitnímu systému se tak dostane větší množství antigenů, proti kterým mohou být vytvořeny protilátky. Z výsledků také bylo zjištěno, že při detekci protilátek, hraje roli i použitý typ antigenu. Toto bylo zjištěno u antigenu OspC, který se lišil v rámci dvou použitých testovacích souprav.

V neposlední řadě byla také testována přítomnost či absence autoprottilátek v sérech imunizovaných myší. Bylo testováno, jestli imunizované myší vytvořili Myositis-specific autoantibodies (MSA) nebo Myositis-associated autoantibodies (MAA). Tyto autoprottilátky se v organismu vytvářejí při myozitidách, což jsou záněty kosterních svalů. Zároveň byly některé tyto autoprottilátky pozorovány u pacientů s *post-treatment lyme disease syndromem* (PTLDS) aniž by tito pacienti vykazovaly nějaké známky myozitid. Ani u jedné z testovaných imunizovaných myší nebyly tyto autoprottilátky detekovány. Tento výsledek podporuje hypotézu, že vznik těchto autoprottilátek u pacientů s PTLDS není způsoben zkříženou reaktivitou s antigeny *Borrelií*, jak se předpokládá, ale že široké spektrum autoprottilátek je indukováno nějakou imunopatologickou odpovědí. Pravděpodobně disregulací imunitního systému ve smyslu polyklonální aktivace, suprese tolerance či expozici kryptickým antigenům. Pokud by šlo o zkříženou reaktivitu, byl by očekáván užší okruh detekovaných protilátek, než jaké byly zjištěny u pacientů s PTLDS.

K objasnění zda hrají nebo nehrají různé morfologické formy *Borrelií* nějakou roli při vzniku PTLDS a vzniku autoprottilátek MSA/MAA při tomto stavu bude potřeba ještě mnoha dalších studií. Výsledky části této práce poukazují, že spíše jde o jiné mechanismy. Důležité tak bude dál studovat jednotlivé morfologické formy *Borrelií*, možnosti jejich indukce a to jakou roli hrají v patogenezi lymeské boreliózy.

7 Závěr

V současnosti existuje stále mnoho nejasností ohledně bakteriálního komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato* a jejich různých morfologických formách. Proto byla tato práce věnována právě těmto bakteriím, způsobujícím lymeskou boreliózu, a jejich odlišným morfologickým formám.

V literární rešerši byly ze začátku krátce zmíněny milníky vztahující se k objevování komplexu Bbsl a lymeské boreliózy. Následně byla jedna kapitola věnována tomuto onemocnění, jeho klinickým projevům, diagnostice, možnostem léčby a prevence a také přetrvávajícím obtížím řady pacientů po prodělání tohoto onemocnění. Poslední část byla věnována bakteriálními komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato* jako takovému. V této části byla popsána obecná charakteristika, morfologie, vektory přenosu těchto bakterií a také rozdílné morfologické formy, které mohou tyto bakterie vytvářet.

V praktické části byl nejdříve testován vliv antibiotik na možnou indukci odlišných morfologických forem *Borrelia* a tyto kultury pěstované s testovanými antibiotiky byly barveny a charakterizovány za použití fluorescenčního mikroskopu. V druhé části byla testována přítomnost protilátek a autoprotiátek v sérech myší imunizovaných dvěma typy vakcín. Byla srovnána reaktivita s řadou antigenů obsažených v diagnostických testech. Autoprotiátky MSA/MAA nebyly u imunizovaných myší detekovány vůbec.

Shrnutím tedy je, že k objasnění problematiky týkající se lymeské boreliózy, bakteriálního komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato* a jejich odlišných morfologických forem bude potřeba ještě mnoha let výzkumu. Bude důležité zaměřit se na jednotlivé morfologické formy, potvrdit, či vyvrátit faktory, které způsobují jejich indukci, zjistit jakou roli hrají v patogenezi LB a jestli se podílejí na vzniku chronických obtíží u řady pacientů, které jsou zahrnuty v PTLDS.

8 Literatura

- Aberer E**, Kersten A, Klade H, Poitschek C, Jurecka W (1996): Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* in the skin. *American Journal of Dermatopathology*. 18: 571-579.
- Akins D. R.**, Caimano M. J., Yang X., Cerna F., Norgard M. V. et Radolf J. D. (1999): Molecular and Evolutionary Analysis of *Borrelia burgdorferi* 297 Circular Plasmid-Encoded Lipoproteins with OspE- and OspF-Like Leader Peptides. *Infection and Immunity*. 67(3), 1526-1532.
- Alban P. S.**, Johnson P. W. et Nelson D. R. (2000): Serum-starvation-induced changes in protein synthesis and morphology of *Borrelia burgdorferi*. *Microbiology* 146: 119–127.
- Allan E. J.**, Hoischen C. et Gumpert J. (2009): Bacterial L-Forms. *Advances in Applied Microbiology* 68: 1–39.
- Al-Robaïy S.**, Dihazi H., Kacza J., Seeger J., Schiller J., Huster D., Knauer J. et Straubinger R. K. (2010): Metamorphosis of *Borrelia burgdorferi* organisms – RNA, lipid and protein composition in context with the spirochetes' shapes. *Journal of Basic Microbiology* 50: 5–17.
- Barbour A. G.** et Garon C. F. (1987): Linear Plasmids of the Bacterium *Borrelia burgdorferi* Have Covalently Closed Ends. *Science* 237(4813): 409–411.
- Barbour A. G.** et Garon C. F. (1988): The Genes Encoding Major Surface Proteins of *Borrelia burgdorferi* Are Located on a Plasmid. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 539 (1 Lyme Disease), 144-153.
- Barbour A. G.** et Hayes S. F. (1986): Biology of *Borrelia* Species. *Microbiological Reviews* 50(4): 381–400.
- Bartůněk P.**, et al. (2013): *Lymeská borelióza*. 4., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4355-4.
- Berende A.**, ter Hofstede H. J. M., Vos F. J., van Middendorp H., Vogelaar M. L., Tromp M., van den Hoogen F. H., Donders A. R. T., Evers A. W. M. et Kullberg B. J. (2016): Randomized Trial of Longer-Term Therapy for Symptoms Attributed to *Lyme Disease*. *The New England Journal of Medicine* 374(13): 1209–1220.
- Berende A.**, ter Hofstede H. J. M., Vos F. J., Vogelaar M. L., van Middendorp H., Evers A. W.M., Kessels R. P. C. et Kullberg B. J. (2019): Effect of prolonged antibiotic treatment on cognition in patients with *Lyme borreliosis*. *Neurology*. 92(13), e1447-e1455.
- Bergström S.**, Bundoc V. G. et Barbour A. G. (1989): Molecular analysis of linear plasmid-encoded major surface proteins, OspA and OspB, of the *Lyme disease* spirochaete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology*. 3(4), 479-486.
- Bolz D. D.**, Weis J. J. (2004): Molecular mimicry to *Borrelia burgdorferi*: pathway to autoimmunity? *Autoimmunity*. 37, 387–92.

- Boulos L.**, Prévost M., Barbeau B., Coallier J. et Desjardins R. (1999): LIVE/DEAD[®] BacLight[™]: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods* 37: 77–86.
- Brorson Ø.**, Brorson S.-H., Scythes J., MacAllister J., Wier A. et Margulis L. (2009): Destruction of spirochete *Borrelia burgdorferi* round-body propagules (RBs) by the antibiotic Tigecycline. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106(44): 18656–18661.
- Bruck D. K.**, Talbot M. L., Cluss R. G. et Boothby J. T. (1995): Ultrastructural characterization of the stages of spheroplast preparation of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Microbiological Methods* 23(2): 219–228.
- Burgdorfer W.**, Barbour A. G., Hayes S. F., Benach J. L., Grunwaldt E. et Davis J. P. (1982): Lyme disease – A Tick-Borne Spirochetosis? *Science* 216(4552): 1317–1319.
- Burgdorfer W.**, Lane R. S., Barbour A. G., Gresbrink R. A. et Anderson J. R. (1985): The Western Black-Legged Tick, *Ixodes Pacificus*: A Vector of *Borrelia Burgdorferi*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 34(5), 925-930.
- Casjens S.**, Murphy M., DeLange M., Sampson L., van Vugt R. et Huang W. M. (1997): Telomeres of the linear chromosomes of *Lyme disease* spirochaetes: nucleotide sequence and possible Exchange with linear plasmid telomeres. *Molecular Microbiology* 26(3): 581–596.
- Casjens S.**, Palmer N., van Vugt R., Huang W. M., Stevenson B., Rosa P., Lathigra R., Sutton G., Peterson J., Dodson R. J., Haft D., Hickey E., Gwinn M., White O. et Fraser C. M. (2000): A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the *Lyme disease* spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology* 35(3): 490–516.
- Domingue, G. J.**, Sr et Woody, H. B. (1997). Bacterial persistence and expression of disease. *Clinical Microbiology Reviews* 10, 320–344
- Eiffert H.**, Lotter H, Jarecki-Khan K. et Thomssen R. (1991): Identification of an immunoreactive non-proteinaceous component in *Borrelia burgdorferi*. *Medical Microbiology and Immunology* 180(5): 229–237.
- Fraser C.**, Casjens S., Huang W., Sutton G., Clayton R., Lathigra R., White O., Ketchum K., Dodson R., Hickey E., Gwinn M., Dougherty B., Tomb J., Fleischmann R., Richardson D., Peterson J., Kerlavage A., Quackenbush J., Salzberg S., Hanson M., van Vugt R., Palmer N., Adams M., Gocayne J., Weidman J., Utterback T., Watthey L., McDonald L., Artiach P., Bowman C., Garland S., Fujii C., Cotton M., Horst K., Roberts K., Hatch B., Smith H. et Venter J. (1997): Genomic sequence of a *Lyme disease* spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390(6660): 580–586.
- Garon C. F.**, Dorward D. W. et Corwin M. D. (1989): Structural Features of *Borrelia burgdorferi* – the *Lyme Disease* Spirochete: Silver Staining for Nucleic Acids. *Scanning Microscopy Supplement* 3: 109–115.

- Ge Y.**, Li Ch., Corum L., Slaughter C. A. *et* Charon N. W. (1998): Structure and Expression of the FlaA Periplasmic Flagellar Protein of *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Bacteriology* 180(9): 2418–2425.
- Gulia-Nuss M.**, Nuss A. B., Meyer J. M. & kol. (2016): Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of *Lyme disease*. *Nature communications* 7: 1 – 13.
- Guo B. P.**, Brown E. L., Dorward D. W., Rosenberg L. C. *et* Magnus Höök M. (1998): Decorin-binding adhesins from *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology*. 30(4), 711-723.
- Guo B. P.**, Norris S. J., Rosenberg L. C. *et* Höök M. (1995): Adherence of *Borrelia burgdorferi* to the Proteoglycan Decorin. *Infection and Immunity* 63(9): 3467–3472.
- Hanson M. S.**, Cassatt D. R., Guo B. P., Patel N. T., Mccarthy M. P., Dorward D. W. *et* Höök M. (1998): Active and Passive Immunity against *Borrelia burgdorferi* Decorin Binding Protein A (DbpA) Protects against Infection. *Infection and Immunity*. 66(5), 2143-2153.
- Hanson M. S.**, Patel N. K., Cassatt D. R. *et* Ulbrndt N. D. (2000): Evidence for Vaccine Synergy between *Borrelia burgdorferi* Decorin Binding Protein A and Outer Surface Protein A in the Mouse Model of *Lyme Borreliosis*. *Infection and Immunity*. 68(11), 6457-6460.
- Hefty P. S.**, Jolliff S. E., Caimano M. J., Wikel S. K., Redolf J. D. *et* Akins D. R. (2001): Regulation of OspE-Related, OspF-Related, and Elp Lipoproteins of *Borrelia burgdorferi* Strain 297 by Mammalian Host-Specific Signals. *Infection and Immunity*. 69(6), 3618-3627.
- Hellwage J.**, Meri T., Heikkilä T., Alitalo A., Panelius J., Lahdenne P., Seppälä I. J. T. *et* Meri S. (2001): The Complement Regulator Factor H Binds to the Surface Protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of Biological Chemistry* 276(11): 8427–8435.
- Hulínská D.** (2013): Mikrobiologie. In: Bartůněk P., Bojar M., Calda P., Diblík P., Hergocogová J., Hoza J., Hulínská D., Janovská D., Pícha D., Valešová M.: *Lymeská borelióza*, 4. přepracované a doplněné vydání, p. 24, Grada Publishing, a.s., Praha.
- Hulínská D.**, Barták P., Hergocogová J., Hančil J., Bašta J. *et* Schramlová J. (1994): Electron microscopy of Langerhans cells and *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease patients. *Zentralblatt fur Bakteriologie* 280(3): 348–359.
- Chakravarthi S. T.** *et* Joshi S. G. (2022): An Association of Pathogens and Biofilms with Alzheimer’s Disease. *Microorganisms*. 10(1).
- Justice, S. S.**, Hunstad, D. A., Cegelski, L. *et* Hultgren, S. J. (2008). Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nature Reviews Microbiology* 6, 162–168.
- Keller A.**, Graefen A., Ball M., *et al.* (2012): New insights into the Tyrolean Iceman’s origin and phenotype as inferred by whole genome sequencing. *Nature Communications*; 3:698.
- Kenedy M. R.**, Lenhart T. R. *et* Akins D. R. (2012): The role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 66(1): 1–19.

- Kersten A.**, Poitschek C., Rauch S. et Aberer E. (1995): Effects of Penicillin, Ceftriaxone, and Doxycycline on Morphology of *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(5): 1127–1133.
- Kimsey R. B.** et Spielman A. (1990): Motility of Lyme Disease Spirochetes in Fluids as Viscous as the Extracellular Matrix. *The Journal of Infectious Diseases* 162: 1205–1208.
- Klempner M. S.**, Hu L. T., Evans J., Schmid C. H., Johnson G. M., Trevino R. P., Norton D., Levy L., Wall D., McCall J., Kosinski M. et Weinstein, A. (2001): Two Controlled Trials of Antibiotic Treatment in Patients with Persistent Symptoms and a History of Lyme Disease. *The New England Journal of Medicine* 345(2): 85–92.
- Kraiczy P.**, Skerka Ch., Kirschfink M., Brade V. et Zipfel P. F. (2001): Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL-1/reconnectin and Factor H. *The European Journal of Immunology* 31(6): 1674–1684.
- Křupka M.**, Raška M. et Weigl E. (2008): Lymyska borelioza – biologie, patogeneze, diagnostika a léčba. *Dermatologie pro praxi* 2(5–6): 236–239.
- Křupka M.**, Raška M., Bělakova J., Horynova M., Novotny R. et Weigl E. (2007): Biological aspects of Lyme disease spirochetes: unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky in Olomouc* 151(2): 175–186.
- Křupka M.**, Rubešová A., Holý O. (2019): Existuje chronická lymeská borelióza?. *Alergie*. 21(4), 253-258.
- Kudryashev M.**, Cyrklaff M., Baumeister W., Simon M. M., Wallich R., Frischknecht F. (2009): Comparative cryo-electron tomography of pathogenic Lyme disease spirochetes. *Molecular Microbiology* 71, 1415–1434.
- Kurokawa Ch.**, Lynn G. F., Pedra J. H. F., Pal U., Narasimhan S. et Fikrig E. (2020): Interactions between *Borrelia burgdorferi* and ticks. *Nature Reviews Microbiology*. 18(10), 587-600.
- Lantos P. M.** et Wormser G. P. (2014): Chronic Coinfections in Patients Diagnosed with Chronic Lyme Disease: A Systematic Review. *The American Journal of Medicine*. 127(11), 1105-1110.
- Lantos P. M.**, Auwaerter P. G. et Wormser G. P. (2014): A Systematic Review of *Borrelia burgdorferi* Morphologic Variants Does Not Support a Role in Chronic Lyme Disease. *Clinical Infectious Diseases* 58(5): 663–671.
- Malawista S. E.** et de Boisfleury Chevance A. (2008): Clocking the Lyme Spirochete. *PloS ONE* 3(2): e1633.
- Margos G.**, Vollmer S. A., Cornet M., Garnier M., Fingerle V., Wilske B., Bormane A., Vitorino L., Collares-Pereira M., Drancourt M. et Kurtenbach K. (2009): A New *Borrelia* Species Defined by Multilocus Sequence Analysis of Housekeeping Genes. *Applied and Environmental Microbiology* 75(16): 5410–5416.
- Marques A. R.** (2008): Chronic Lyme Disease: A Review. *Infectious Disease Clinics of North America* 22(2): 341–360.

- Meriläinen L.**, Brander H., Herranen A., Schwarzbach A. et Gilbert L. (2016): Pleomorphic forms of *Borrelia burgdorferi* induce distinct immune responses. *Microbes and Infection* 18(7–8): 484–495.
- Meriläinen L.**, Herranen A., Schwarzbach A. et Gilbert L. (2015): Morphological and biochemical features of *Borrelia burgdorferi* pleomorphic forms. *Microbiology* 161: 516–527.
- Miklossy J.**, Kasas S., Zurn A. D., McCall S., Yu S. et McGeer P. L. (2008): Persisting atypical and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and local inflammation in *Lyme neuroborreliosis*. *Journal of Neuroinflammation* 5: 40.
- Nadelman R. B.** et Wormser G. P. (1995): *Erythema migrans* and early Lyme disease. *The American Journal of Medicine* 98(4): 15–24.
- Nemeth, J.**, Bernasconi E., Heininger U., Abbas M., Nadal D., Strahm C., Erb S., Zimmerli S., Furrer H., Delaloye J., et al. (2016): Update of the Swiss guidelines on post-treatment Lyme disease syndrome. *Swiss Medical Weekly*. 146, w14353.
- Nilsson K.**, Skoog E., Jones V., Labbé Sandelin L., Björling C., Fridenström E., Edvinsson M., Mårtensson A., Olsen B. (2021): A comprehensive clinical and laboratory evaluation of 224 patients with persistent symptoms attributed to presumed tick-bite exposure. *PLoS One*. 16, e0247384.
- O'toole, G.**, Kaplan H. B. et Kotler R. (2000): Biofilm Formation as Microbial Development. *Annual Review of Microbiology*. 54(1), 49-79.
- Poucher K. L.**, Hutcheson H. J., KEIRANS J. E., Durden L. A. et Black W. C. IV (1999): Molecular Genetic Key for the Identification of 17 *Ixodes* Species of the United States (*Acari: Ixodidae*). *The Journal of Parasitology*. 85(4).
- Preac-Mursic V.**, Wanner G., Reinhardt S., Wilske B., Busch U. et Marget W. (1996): Formation and cultivation of *Borrelia burgdorferi* spheroplast L-form variants. *Infection* 24(3): 218–226.
- Prokeš Z.** (2015): Lymeská borrelióza. *Dermatologie v praxi*, 9(1), 36-39.
- Radolf J. D.**, Caimano M. J., Stevenson B. et Hu L. T. (2012): Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of *Lyme disease* spirochaetes. *Nature Reviews Microbiology*. 10(2), 87-99.
- Reimers C. D.**, de Koning, J., Neubert, U. et al. (1993): *Borrelia burgdorferi* myositis: report of eight patients. *Journal of Neurology* 240, 278–283.
- Rohačova H.** (2012): Lymeska borrelióza. *Interni medicina pro praxi* 14(5): 203-205.
- Roháčová H.** (2013): Je pozdní forma Lymeské neuroborreliózy léčitelná?. *Neurologie pro praxi*. 14(4): 200-202.
- Rosa P. A.** (1997): Microbiology of *Borrelia burgdorferi*. *Seminars in Neurology* 17(1): 5–10.
- Rudenko N.**, Golovchenko M., Kybicova K., Vancova M.(2019): Metamorphoses of *Lyme disease* spirochetes: phenomenon of *Borrelia* persists. *Parasit Vectors*. 16;12(1):237
- Samuels D. S.** et J. D. Radolf (2010): *Borrelia: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis*. 1. Norfolk, UK: Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-58-5.

Sapi E., Bastian S. L., Mpoy C. M., Scott S., Rattelle A., Pabbati N., Poruri A., Burugu D., Theophilus P. A., Pham T. V., Datar A., Dhaliwal N. K., MacDonald A., Rossi M. J., Sinha S. K. et Luecke D. F. (2012): Characterization of biofilm formation by *Borrelia burgdorferi* *in vitro*. *PLoS ONE* 7(10): e48277.

Sapi E., Kaur N., Anyanwu S., Luecke D. F., Datar A., Patel S., Rossi M. et Stricker R. B. (2011): Evaluation of *in-vitro* antibiotic susceptibility of different morphological forms of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Drug Resistance* 4: 97–113.

Shi Y., Xu Q., Mcshan K. et Liang F. T. (2008): Both Decorin-Binding Proteins A and B Are Critical for the Overall Virulence of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity*. 76(3), 1239-1246.

Sjöwall J., Ledel A., Ernerudh J., Ekerfelt Ch. et Forsberg P. (2012): Doxycycline-mediated effects on persistent symptoms and systemic cytokine responses post-neuroborreliosis: a randomized, prospective, cross-over study. *BMC Infectious Diseases*. 12(1). 1471-2334.

Sloupenska, K.; Koubkova, B.; Horak, P.; Hutyrova, B.; Racansky, M.; Mares, J.; Miklusova, M., Schovanek, J.; Zapletalova, J.; Raska, M.; Krupka, M. (2023): Myositis Autoantibodies in Patients with Suspected Post-Treatment Lyme Disease Syndrome. *Life* 13, 527.

Sprong H., Azagi T., Hoornstra D., Nijhof A. M., Knorr S., Baarsma M. E. et Hovius J. W. (2018): Control of Lyme borreliosis and other *Ixodes ricinus*-borne diseases. *Springer*. 11(1).

Srivastava S. Y. et de Silva A. M. (2009): Characterization of *Borrelia burgdorferi* Aggregates. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 9(3): 323–329.

Stanek G., Wormser G. P., Gray J. et Strle F. (2012): Lyme borreliosis. *The Lancet* 379(9814): 461–473.

Stevenson B., Bono J. L., Schwan T. G. et Rosa P. (1998): *Borrelia burgdorferi* Erp Proteins Are Immunogenic in Mammals Infected by Tick Bite, and Their Synthesis Is Inducible in Cultured Bacteria. *Infection and Immunity*. 66(6), 2648-2654.

Takayama K., Rothenberg R. J. et Barbour A. G. (1987): Absence of Lipopolysaccharide in the Lyme Disease Spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 55(9): 2311–2313.

Wang G., Dam A. P. et Dankert J. (1999): Evidence for frequent OspC gene transfer between *Borrelia valaisiana* sp. nov. and other Lyme disease spirochetes. *FEMS Microbiology Letters*. 177(2), 289-296.

Wen S., Wang F., Ji Z., Pan Y., Jian M., Bi Y., Zhou G., Luo L., Chen T., Li L., Ding Z., Abi M-E., Liu A. et Bao F. (2020): Salp15, a Multifunctional Protein From Tick Saliva With Potential Pharmaceutical Effects. *Frontiers in Immunology*. 10:3067.

Wormser G. P., Dattwyler R. J., Shapiro E. D., 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*. 43(9), 1089-1134.

Zhang J. R., et Norris S. J. (1998): Genetic Variation of the *Borrelia burgdorferi* Gene vlsE Involves Cassette-Specific, Segmental Gene Conversion. *Infection and Immunity*. 66(8), 3698-3704.