

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Biologická fakulta**

**Katedra obecné biologie**



**Infekce klíšťat *Ixodes ricinus* spirochetami *Borrelia burgdorferi* sensu lato**

**Magisterská diplomová práce**

**Vypracovala: Lenka Fišerová**

**Vedoucí práce: Doc. RNDr. Jan Kopecký, CSc.**

**České Budějovice, duben 2007**

Fišerová L. (2007): Infekce klíšťat *Ixodes ricinus* spirochetami *Borrelia burgdorferi* sensu lato [Experimental infection of *Ixodes ricinus* ticks with spirochaetes *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Mgr. Thesis, in Czech] – 47p., Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:**

I describe procedures for the introduction of *Borrelia burgdorferi*, the spirochetal agent of Lyme disease, into larval and nymphal stage of the tick vector, *Ixodes ricinus*. The goal of this Mgr. Thesis is to find an optimum system, that would reliably and reproducibly allow the infection of large numbers of ticks with the Lyme disease spirochete.

Práce byla financována z grantu GA ČR číslo 59/3034.

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou prací vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne

***Poděkování:***

*Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli, Doc. RNDr. Janu Kopeckému, CSc., za zadání zajímavého tématu, podporu, důvěru a cenné rady při zpracovávání této práce. Velký dík patří Katce Kýčkové a Heleně Horké za spoustu času a pomoc, kterou mi vždy byly ochotné poskytnout. Děkuji také Honzovi Erhartovi za zásobování klišťaty, Veronice Slavíkové za kultivaci borelií a ostatním kolegům z Laboratoře interakcí vektor – hostitel za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Speciální poděkování chci věnovat také všem svým blízkým za trpělivost a za to, že mě podporovali ve studiu.*

## Obsah:

<b>1. Literární přehled.....</b>	<b>6</b>
1.1. Rod <i>Borrelia</i> .....	6
1.1.1. <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	6
1.1.2. Morfologie borelií.....	7
1.1.3. Antigenní vlastnosti borelií.....	9
1.1.4. Genom borelií.....	9
1.2. Lymeská borrelióza.....	10
1.2.1. Stručná historie objevení Lymeské borreliózy.....	10
1.2.2. Klinické projevy Lymeské borreliózy.....	10
1.2.3. Lymeská borrelióza u myší.....	11
1.3. Klíště.....	12
1.3.1. Přenos patogenů hematofágními členovci.....	12
1.3.2. Klíště <i>Ixodes ricinus</i> .....	12
1.4. Vzájemné interakce klíště – borelie – hostitel.....	14
1.4.1. Interakce borelie – hostitel.....	14
1.4.2. Interakce klíště – hostitel.....	15
1.4.3. Interakce klíště – borelie.....	16
<b>2. Cíle práce.....</b>	<b>17</b>
<b>3. Materiál a metody.....</b>	<b>18</b>
3.1. Pokusná zvířata.....	18
3.1.1. Myši.....	18
3.1.2. Klíšťata.....	18
3.2. Borelie.....	18
3.2.1. Kultivace borelií.....	18
3.2.2. Stanovení počtu borelií.....	18
3.3. Metody infekce klíšťat spirochetami <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	19
3.3.1. Infekce klíšťat sáním na infikovaných myších.....	19
3.3.1.1. Infekce myší.....	19
3.3.1.2. Detekce infekce u myší.....	19
3.3.1.3. Infekce klíšťat.....	20
3.3.2. Infekce klíšťat sáním z kapiláry.....	20
3.3.3. Infekce klíšťat ponořením do suspenze borelií.....	20
3.4. Detekce <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato v infikovaných klíšťatech.....	21
3.4.1. Izolace DNA.....	21
3.4.2. Polymerázová řetězová reakce.....	21
3.4.3. Gelová elektroforéza.....	22
3.5. Zjištění schopnosti infikovaných klíšťat přenést infekci na hostitele.....	22
3.5.1. Schopnost infikovaných klíšťat ještě před metamorfózou přenést infekci na hostitele.....	22
3.5.2. Schopnost infikovaných klíšťat po metamorfóze nakazit hostitele.....	23

3.5.3. Detekce infekce v hostitelích.....	23
3.5.3.1. Detekce protilátek proti <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	23
3.5.3.2. Detekce boreliové DNA pomocí PCR.....	24
<b>4. Výsledky.....</b>	<b>25</b>
4.1. Infekce klíšťat sáním na infikovaných myších.....	25
4.2. Infekce klíšťat ponořením do suspenze borelií.....	30
4.3. Infekce klíšťat sáním z kapiláry.....	31
4.4. Schopnost nakažených klíšťat přenést infekci na dalšího hostitele.....	31
4.4.1. Schopnost nakažených klíšťat přenést infekci ještě před metamorfózou.....	31
4.4.2. Schopnost nakažených klíšťat po metamorfóze infikovat hostitele.....	32
<b>5. Diskuse.....</b>	<b>34</b>
5.1. Infekce klíšťat sáním na infikovaných myších.....	34
5.2. Infekce klíšťat sáním z kapiláry.....	35
5.3. Infekce klíšťat ponořením do suspenze borelií.....	35
5.4. Jiné metody infekce klíšťat <i>Ixodes ricinus</i> spirochetami <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	36
5.5. Schopnost infikovaných klíšťat přenést infekci na dalšího hostitele.....	36
5.6. Detekce <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato v infikovaných klíšťatech.....	37
<b>6. Závěr.....</b>	<b>38</b>
<b>7. Citovaná literatura.....</b>	<b>39</b>
<b>8. Seznam použitých zkratk.....</b>	<b>47</b>

# 1. Literární přehled

## 1.1. Rod *Borrelia*

Rod *Borrelia* zahrnuje druhy spirochet, které tvoří velice starou vývojovou větev (Woese 1987). Druhy tohoto rodu je možné rozdělit do tří hlavních skupin: borelie způsobující návratné horečky (tzv. „relapsing fever borreliae“), borelie se vztahem k Lymeské borrelióze (tzv. „Lyme disease borreliae“) a *Borrelia anserina* (původce spirochetóz ptáků). Zástupci všech tří skupin jsou patogenní mikroorganismy, největší pozornost je však věnována druhům souvisejícím s onemocněním Lymeskou borreliózou (Postic et al. 1998). Jedná se o komplex dvanácti druhů, který nese souhrnné označení *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Podle Bergerova manuálu jsou borelie taxonomicky zařazeny do třídy *Spirochaetes*, řádu *Spirochaetales*, čeledi *Spirochaetaceae* (Bergey's Manual of Systematic Biology, 2nd ed., 5 vols, 2000) (Tortora et al. 2001).

Čeleď *Spirochaetaceae* zahrnuje dva rody, a to rod *Borrelia* a *Treponema*. Zástupci těchto rodů vykazují řadu odlišností, přesto mají také některé společné znaky, např. to, že se v obou případech jedná o agens způsobující závažná onemocnění. Zatímco *Borrelia burgdorferi* způsobuje Lymeskou borreliózu či vratný tyfus, hlavní treponemální agens, *Treponema pallidum* (Dubos et Hirsch 1967), odpovídá za pohlavní onemocnění syfilis a na rozdíl od borelií se jedná o primárního patogena napadajícího člověka. Obě bakterie se šíří krevní cestou z místa infekce do orgánů, u neléčných pacientů může docházet k prostupu do tkání a jejich destrukci, což může případně vést až ke smrti pacienta (Greenwood et al. 1999).

Borelie a treponemy vykazují podobnost v řadě morfologických znaků a také v přítomnosti některých antigenů. Přesto je mezi těmito druhy také množství odlišností. Borelie se od treponem liší např. v těchto znacích: nepřítomnost jemných vláček v cytoplazmě, možnost barvení Giemsou (treponemy se běžnými technikami nebarví), jednoduchý bičík (u treponem složen z pochvy a vnitřní dřeně). Borelie je navíc možné kultivovat, což u treponem nelze, pomnožují se a udržují na vnímavých zvířatech.

### 1.1.1. *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Doposud bylo na základě molekulární analýzy definováno 12 příbuzných druhů (genospecies) *Borrelia burgdorferi*, souhrnně označovaných jako komplex *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Náleží sem tyto druhy: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B.*

*afzelli*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. bissettii*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. sinica*, *B. turdii*, *B. andersoni*, *B. spielmani* (Richter et al. 2004). *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (Bbss), *Borrelia garinii* a *Borrelia afzelii* jsou patogenní druhy, jejichž společným znakem je průkazný vztah k Lymeské borrelióze. Donedávna se předpokládalo, že pouze tyto tři druhy odpovídají za symptomy onemocnění a jsou asociovány s Lymeskou borreliózou u lidí, přestože každá genospecies způsobuje odlišné klinické příznaky nemoci. V dnešní době je však známo, že Lymeskou borreliózu u lidí by mohly vyvolávat také další tři druhy, a to *Borrelia valaisiana*, *Borrelia lusitaniae* a *Borrelia bissettii*. V případě *B. lusitaniae* byl dokonce proveden úspěšný záchyt u pacienta v Portugalsku (Stanek 2004).

V Evropě byl potvrzen výskyt sedmi genospecies spirochet rodu *Borrelia*, a to *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. bissettii* a *B. spielmani* (Kurtenbach et al. 2001, Richter et al. 2004). Pět dalších genospecies bylo izolováno z klíšťat. Byly to *B. andersoni* v USA, *B. japonica*, *B. turdii* a *B. tanukii* v Japonsku a *B. sinica* v Číně (Grubhoffer et al. 2005).

### 1.1.2. Morfologie borelií

*Borrelia burgdorferi* sensu lato je spirálně stočená gramnegativní bakterie o délce 10 – 30  $\mu\text{m}$  a šířce 0,2 – 0,5  $\mu\text{m}$  (Barbour et Hayes 1986). Mají 4 – 15 pravidelných závitů, buněčná stěna je od cytoplazmatické membrány oddělena periplazmatickým prostorem. Z hlediska virulence má největší význam vnější vrstva buněčné stěny, ve které se nachází důležité antigenní proteiny, kterých bylo do současnosti identifikováno již přes sto (Hulínská 2001).

Borelie je možné barvit stříbřením nebo Giemsovou technikou. Pro kultivaci vyžadují komplexní půdy s N-acetylglukosaminem, aminokyselinami, vitamíny a nukleovými kyselinami. Speciální kultivační médium je BSK-H médium (Barbour-Stoenner-Kelly) (Barbour 1984) komerčně vyráběné firmou Sigma-Aldrich. Generační doba růstu je 12 – 18 hodin, teplotní optimum 30 – 37 °C. Jedná se o mikroaerofilní bakterii, která netvoří katalázu a glukózu štěpí na kyselinu mléčnou (Barbour et Hayes 1986).

Borelie se dělí příčným nebo podélným zaškrcováním. Vytvořením příčného nebo podélného septa mateřská buňka ztrácí polovinu bičíků, ne však disky a háčky, ze kterých v dceřinných buňkách vyrostou nové bičíky. Pouze vlivem nevhodných podmínek (např. působení lytických enzymů nebo antibiotik) k obnově bičíků nedojde a borelie bez bičíků potom vytvářejí nepravidelné struktury (Barbour et Hayes 1986).

Tvar bakteriální buňky je obvykle dán peptidoglykanovou vrstvou buněčné stěny. V případě odlišného morfologického tvaru *B. burgdorferi* sensu lato však hrají významnou roli vnitřní periplazmatické bičíky. Jsou to velmi důležité organely, neboť zajišťují buněčný pohyb, jsou to ale také velmi důležité oporné a strukturálně nezbytné organely (Motaleb et al. 2000).

Borelie mají dva svazky bičíků, které vystupují z obou konců buňky, a ke svému pohybu musí organizovaně přepínat řídicí mechanismy tak, aby bičíky mohly rotovat v různých směrech a zajišťovaly tak synchronní pohyb (Shi et al. 1998).

Počet bičíků se liší v závislosti na druhu borelie, a to v rozmezí 7 – 11. Bičíky vystupují na obou koncích buňky z bazálních disků umístěných v cytoplazmatické membráně. Všechny bičíky pak obtáčejí tělo borelie v periplazmatickém prostoru pod buněčnou stěnou a jsou navíc zvenku uzavřeny tenkou membránou (Barbour et Hayes 1986). Tato struktura je typická pouze pro borelie a umožňuje jejich zcela specifický pohyb.

Základní složku bičíků tvoří tzv. flagelární proteiny, které jsou kódovány několika genovými operony a jsou lokalizovány na bakteriálním chromosomu. Pohybový aparát spirochet je velmi podobný jiným bakteriálním druhům, ale právě spirochetální bičíky se liší tím, že jsou tvořeny dvěma třídami proteinů namísto třídy jedné. Jedná se o hlavní flagelární protein FlaA, který je lokalizován v pochvě bičíků a je typický pouze pro spirochety. Druhým proteinem je protein bičíkové dřeně FlaB (flagellin), který vykazuje podobnost s bičíkovými proteiny jiných bakterií (Ge et al. 1998, Wallich et al. 1990). S ohledem na druhové zastoupení spirochet bylo zjištěno, že periplazmatické bičíky mohou být tvořeny jedním až dvěma FlaA proteiny a dvěma až čtyřmi různými FlaB proteiny. U *B. burgdorferi* jsou bičíky tvořeny pouze proteiny FlaA (39kDa) a FlaB (41kDa), přičemž FlaA se objevuje v mnohem menším množství (Ge et al. 1998).

Buňka *B. burgdorferi* sensu lato je ohraničena od vnějšího prostředí cytoplazmatickou membránou a navíc je kryta buněčnou stěnou, kterou tvoří tři vrstvy – vnitřní peptidoglykanová, střední glykolipidová a vnější lipoproteinová. Střední a vnější vrstva buněčné stěny tvoří tzv. vnější membránu. Ta obsahuje 45 – 62 % proteinů, 23 – 50 % lipidů a 3 – 4 % sacharidů a tvoří podstatnou část buněčné stěny (Barbour et Hayes 1986).

Vnější struktura borelií je obdobou vnější struktury gramnegativních bakterií. Přesto je zde několik odlišností, přičemž nejvýznamnější je absence lipopolysacharidu, který jinak tvoří vnější část buněčné stěny gramnegativních bakterií (Takayama et al. 1987). Glykolipidy přitom ale i tak tvoří více než polovinu všech membránových lipidů, přestože zahrnují jen galaktózu a monosacharidové složky (Hossain et al. 2001).



### 1.1.3. Antigenní vlastnosti borelií

Komplex *B. burgdorferi* sensu lato vykazuje velmi bohatou antigenní strukturu. Povrchové antigeny mají většinou plazmidový původ a nalézáme je na vnější bakteriální membráně. Mezi nejdůležitější vnější proteiny patří tzv. „outer surface proteins“ OspA, OspB a OspC a dále také proteiny bičíků a vnitřních membrán.

V infekčním cyklu borelií hraje exprese ospA a ospC genů důležitou roli (Schwan et al. 1995). Pokud se borelie dostanou do trávicího traktu nenasátých klíšťat, dojde k expresi ospA a ospB genů, ne však k expresi ospC. Jakmile se však klíště přisaje k hostiteli, produkce proteinů OspA a OspB začne klesat a je zahájena syntéza OspC. OspC proteiny se ve střevě klíšťat dostávají do nasáté krve, a to zřejmě způsobí to, že borelie střevo opouštějí a pomocí hemolymfy se dostanou do slinných žláz klíštěte (Schwan et al. 1995). Tyto změny jsou částečně ovlivněny i teplotou, pro expresi ospC genů je potřeba teplota 32 – 37 °C (Johnson et Bergstrom 1995).

Imunitní odpověď na infekci boreliemi je indukována především působením lipoproteinů, které se nacházejí ve vnější bakteriální membráně. Lipoproteiny představují u borelií většinu povrchových bílkovin a jsou tedy imunodominantními proteiny Bbsl. Lipoproteiny však nemusí být jen součástí vnější membrány borelií, některé se vyskytují také v cytoplazmatické membráně a protoplazmatickém cylindru (Radolf et al. 1995).

### 1.1.4. Genom borelií

Genom *B. burgdorferi* tvoří jeden lineární chromosom o velikosti 910 725 bp a dále 12 lineárních a 9 cirkulárních plazmidů o celkové velikosti 610 694 bp (Casjens et al. 2000). Kompletní sekvence genomu *B. burgdorferi* sensu stricto byla publikována v roce 1997. Chromosomální geny kódují základní sadu proteinů pro replikaci DNA, transkripci, translaci, transport látek a energetický metabolismus. Téměř zde ale chybí geny nezbytné pro biosyntetické reakce buňky (Fraser et al. 1997). Na plazmidech jsou kódovány především sekvence genů neznámých funkcí, ale jsou zde i geny pro povrchové proteiny borelií a pak také pro faktory virulence. Některé plazmidy obsahují také velký počet tzv. pseudogenů, které vznikly pravděpodobně jako odraz rychlé evoluce (Casjens et al. 2000). Některé plazmidy se během kultivace borelií *in vitro* (10 – 17 pasáží) ztrácejí, což může vést ke ztrátě virulence (Schwan et al. 1988). Nízkopasážové kmeny borelií jsou tedy mnohem virulentnější (Champion et al. 1994).

## **1.2. Lymeská borrelióza**

### **1.2.1. Stručná historie objevení Lymeské borreliózy**

Lymeská borrelióza je souhrnný termín, který se používá pro všechny klinické příznaky způsobené infekcí *Borrelia burgdorferi* sensu lato. V Evropě byly příznaky onemocnění popsány již koncem 19. století (Buchwald 1883), byli to ale Američané, kteří onemocnění objevili a definovali (Steere et al. 1977). Onemocnění bylo pojmenováno Lymeská nemoc, a to podle městečka Old Lyme ve státě Connecticut, kde obyvatelé v roce 1975 reagovali na neobvykle vysoký výskyt onemocnění kloubů u dětí. Společným znakem onemocnění bylo u všech pacientů předchozí „hmyzí“ kousnutí. O rok později byly u některých pacientů zjištěny neurologické nebo srdeční potíže. Bylo známo, že přenašečem onemocnění je klíště rodu *Ixodes*. Otázka původce však byla zodpovězena až v roce 1982 Wiliamem Burgdorferem, kdy se mu zcela náhodně podařilo izolovat do té doby neznámé spirochety se střeva klíšťat *Ixodes dammini* (dnešní název *Ixodes scapularis*) (Burgdorfer et al. 1982). Kultivace těchto spirochét se v modifikovaném Kellyho médiu zdařila A. Barbourovi (Barbour 1984) a s onemocněním Lymeskou borreliózou byly tyto bakterie spojeny ve chvíli, kdy byla pomocí imunofluorescence zjištěna pozitivní reakce s krevními séry pacientů, kteří trpěli touto chorobou (Burgdorfer et al. 1982, Barbour 1984). Tento nový druh spirochéty byl pojmenován po svém objeviteli *Borrelia burgdorferi*.

### **1.2.2. Klinické projevy Lymeské borreliózy**

Lymeská borrelióza je nejrozšířenější členovci přenášené lidské onemocnění v Evropě a Severní Americe (Denis et Hayes 2002). Klasifikace Lymeské borreliózy doporučená Asbrinkovou rozlišuje časně stádium onemocnění (lokalizované a diseminované) a stádium pozdní (Asbrink et Hovmark 1988).

Časně lokalizované stádium klinické borreliózy se projevuje pomalu se šířícím kruhovým exantémem zvaným erythema migrans, který se objevuje v místě přisátí klíštěte mezi 3. a 22. dnem po infekci a mizí po 3 – 4 týdnech. V této fázi infekce se často objevuje horečka, třesavka, bolesti ve svalech a únava.

Po několika týdnech, nejdéle však do třech měsíců, se u neléčených pacientů objeví projevy postižení nervového, kloubního či kardiovaskulárního systému. Příznaky tohoto diseminovaného stádia zahrnují bolesti hlavy, ztuhlost šíje, poruchy citlivosti a hybnosti, obrny (především lícního nervu), bolesti v zádech a končetinách. Může nastat postižení kloubů projevující se ataky bolesti, záněty šlach, kloubních pouzder a svalů. Srdeční potíže mohou připomínat infarkt myokardu a často se projevují také dušností.

Pozdní stádium má chronický průběh, objevuje se za více než 6 – 12 měsíců od získání infekce. Projevuje se zejména postižením kloubů, kůže a nervového systému. Všechny fáze Lymeské borreliózy mohou být provázeny dalšími projevy, např. očními (Preac-Mursic et al. 1989, Hauptl et al. 1993).

Projevy a rozsah perzistentní infekce do značné míry závisí na druhu borelie, kterou je pacient infikován. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto způsobuje především artritidu velkých kloubů (Steere et al. 1987), pro druh *Borrelia afzelii* jsou charakteristické kožní projevy, tzv. acrodermatitis chronica atrophicans (Balmelli et Piffaretti 1995). *Borrelia garinii* je neurotropní spirocheta, která může způsobit velké množství neurologických komplikací (Logigian et al. 1990).

Diagnostika Lymeské borreliózy spočívá především v detekci specifických protilátek proti boreliím v krvi, a to zejména metodami ELISA a Western-blotting. Je také možné prokázat spirochety v kloubní tekutině či erythema migrans pomocí PCR. Jako lék první volby se podává antibiotikum doxycyklin (Wormser et al. 2000).

### **1.2.3. Lymeská borrelióza u myši**

Náchylnost myši k Lymeské borrelióze a průběh infekce závisí na genotypu a také věku laboratorních myši (Berthold et al. 1990). Mezi citlivé kmeny laboratorních myši patří SCID myši, C3H myši a SWR myši (Berthold et al. 1990, Schaible et al. 1990, Zeidner et al. 1997). Za rezistentní je považován kmen BALB/c (Zeidner et al. 1997), C57DL/6 a DBA/2J (Brown et Reiner 1998, Ma et al. 1998, Brown et al. 2003, Ganapamo et al. 2003). Pokud je vybrán vhodný kmen, jsou laboratorní myši vhodným modelem pro studium Lymeské borreliózy.

Klinické příznaky jsou nejlépe popsány u SCID myši. Postupně dochází k rozvoji chronického systémového onemocnění. Artritida začíná zarudnutím a otokem tibiotarzálního kloubu, později dochází k napadení metatarzálních a ulnakarpálních kloubů. Změny mohou vést až k rozrušení a odbourání chrupavek nebo kostí. U myši se vyvíjí také pankarditida, což je zánět všech vrstev srdeční stěny (endokardu, myokardu a perikardu), dále hepatitida, fibróza jater a granulomatózní reakce. Drobné lokalizované léze se vyskytují v ledvinách, plicích, mozku a příčně pruhovaných svalech. Zánět je charakterizován infiltrací monocytů, makrofágů a neutrofilů. Naopak rezistentní myši BALB/c většinu těchto příznaků postrádají, vyskytuje se u nich pouze minimum lézí v různých orgánech (Schaible et al. 1990, Schaible et al. 1991).

### 1.3. Klíště

#### 1.3.1. Přenos patogenů hematofágními členovci

Členovci tvoří přibližně 85 % ze všech známých živočišných druhů. Charakteristickým znakem je článkovaná stavba těla a končetin, kloubovité párové přívěsky (nohy, tykadla), exoskelet (nejčastěji chytinózní) a bilatelární souměrnost. Dělí se do čtyřech základních tříd: *Chelicerata* (klepítkatci), *Crustacea* (korýši), *Insecta* (hmyz) a *Myriapoda* (mnohonožky) (Hubálek 2000).

Hematofágní členovce řadíme do dvou tříd: *Chelicerata* a *Insecta*. (Hubálek 2000) Hematofágní členovci jsou častými přenašeči patogenů. K přenosu patogenů může dojít dvěma způsoby. Prvním z nich je biologický přenos, kdy se infekční agens ve vektoru pomnoží, příp. prodělá určitý vývojový cyklus, než je přeneseno na nového hostitele. Druhým typem je mechanický přenos, kdy se patogen v přenašeči nemnoží ani nevyvíjí a je přenesen na hostitele (Hubálek 2000).

Pro zajištění efektivního přenosu patogenního agens při sání krve přenašečem na nového hostitele musí patogen v těle vektora překonat dvě hlavní bariéry – střevní bariéru a bariéru slinných žláz, do kterých se musí dostat (Hubálek 2000).

#### 1.3.2. Klíště *Ixodes ricinus*

Klíšťata jsou krev sající ektoparaziti. Jedná se o druhého nejčastějšího vektora lidských patogenů po komárech. Klíšťata řadíme do kmene *Arthropoda*, podkmene *Chelicerata*, třídy *Arachnida*, řádu *Acarina*. Můžeme rozlišit dvě hlavní skupiny klíšťat, tzv. „měkká“ (*Argasidae*) a „tvrdá“ (*Ixodidae*) (Oschmann et al. 1999).

Hlavními přenašeči borelií jsou klíšťata rodu *Ixodes*. Zástupci čeledi *Ixodidae* (*I. ricinus*, *I. scapularis*, *I. pacificus*, *I. persulcatus*) přenášejí kromě borelií ještě řadu dalších patogenů: *Francisella tularensis*, *Anaplasma phagocytophylum*, TBE virus atd. (Oschmann et al. 1999). Hlavními přenašeči Lymeské boreliózy jsou *Ixodes ricinus* v Evropě, *Ixodes scapularis* a *Ixodes pacificus* v Severní Americe, *Ixodes persulcatus* a *Ixodes ovatus* v Asii (Chao et al. 2002, Steere et al. 2004).

Předpokládá se, že přenos patogenů je spíše transstadiální, tzn. nakažení larvy nebo nymfy a následná infekce hostitele nymfou nebo dospělcem. Výskyt borelií u nymf a dospělců se v Evropě pohybuje v rozmezí 2 – 43 %, resp. 3 – 58 % (Hubálek et Halouzka 1998). Transovariální přenos, tedy přenos ze samice na larvy, je sice možný, avšak

neefektivní, promořenost larev *Ixodes ricinus* boreliemi se pohybuje maximálně v jednotkách procent (Zhioua et al. 1994).

Klíště obecné se vyskytuje po celé západní, střední a jižní Evropě až do nadmořských výšek okolo 2000 m n.m. Ve střední Evropě je hojně rozšířeno v listnatých a smíšených lesích, křovinatých porostech, vlhčích loukách. *Ixodes ricinus* je typickým trojhostitelským druhem, každé stádium sají na jiném hostiteli. Mezi hostitele klíšťat patří více než tři stovky živočišných druhů, zahrnuti jsou velcí i malí savci a také ptáci a plazi. Larvy a nymfy sají především na drobných savcích (např. hlodavci), dospělci spíše na větších savcích (např. dobytek či vysoká lesní zvěř). Sání larev trvá 2 – 6 dní, nymf 2 – 7 dní a dospělých samic 5 – 14 dní. Po nasátí opouští každé stádium hostitele a další vývoj probíhá v tzv. opadance. Kopulace je za normálních okolností samice schopná až po částečném nasátí krve, dochází k ní na hostiteli nebo mimo něj, samice následně klade vajíčka, kterých může být až 5000. Délka celého vývojového cyklu kolísá mezi dvěma a šesti lety, v našich zeměpisných šířkách to jsou ale nejčastěji 3 roky. Zimování může probíhat jak v hladovém, tak v nasátém stavu (Oschmann et al. 1999).

<b>Druh klíštěte</b>	<b>Geografická distribuce</b>
<i>Ixodes ricinus</i>	Evropa
<i>Ixodes persulcatus</i>	Východní Evropa, Asie
<i>Ixodes scapularis</i>	Kanada, střední východ, severovýchod a jihovýchod USA
<i>Ixodes pacificus</i>	Tichomořské pobřeží centrální a Severní Ameriky, Středozápad USA
<i>Ixodes ovatus</i>	Japonsko

**Tab. 1. Geografická distribuce různých druhů klíšťat, která jsou vektory *Borrelia burgdorferi* sensu lato.**

Sání krve je poměrně komplikovaný proces. Sací ústrojí klíštěte sestává z hypostomu se zpětnými háčky a dvou čelistních makadel. Po proniknutí ústního ústrojí přes epidermis a poškození krevních vlásečnic následuje ukotvení v ráně pomocí tzv. cementu a vytvoření tzv. potravní léze. Během sání se tělo klíštěte několikanásobně zvětšuje, přičemž největší objem krve přijímají klíšťata až v závěru sání (Gray 2002).

## 1.4. Vzájemné interakce klíště – borelie – hostitel

### 1.4.1. Interakce borelie - hostitel

Infekce *Borrelia burgdorferi* sensu lato vyvolává u hostitele silnou imunitní odpověď, která zahrnuje mechanismy jak přirozené, tak adaptivní imunity. Borelie jsou však i přesto schopné perzistentní infekce, a to proto, že si vyvinuly mechanismy, pomocí nichž obcházejí imunitní dozor hostitele. Je to především jejich antigenní variabilita, kdy borelie v reakci na imunitní odpověď hostitele mění nebo omezují expresi svých povrchových antigenů, a dále vytváření fyzických bariér, jako je vznik cyst v nutričně nepříznivých podmínkách či vyhledávání imunologicky privilegovaných míst (Zhang et Norris 1998).

Povrchové antigeny borelií v místě sání klíštěte aktivují alternativní dráhu komplementu. Citlivost borelií na komplement je závislá na druhu borelie a také na druhu hostitele (Breitner-Ruddock et al. 1997). Povrchové struktury spirochet aktivují také makrofágy, následně dochází k fagocytóze borelií a jejich likvidaci uvnitř fagolysozomu pomocí reaktivních sloučenin kyslíku (kyslíkové radikály) a dusíku (oxid dusnatý) (Montgomery et al. 2002). Aktivované makrofágy produkují prozánětlivé cytokiny, a to především IL-1, IL-6 a TNF $\alpha$  (Miller et al. 1992, Radolf et al. 1995). Tyto cytokiny fungují jako chemotaktický faktor pro další makrofágy, neutrofilů, dendritické buňky, lymfocyty a monocyty. Vzhledem k tomu, že IL-1, IL-6 a TNF $\alpha$  řadíme mezi poškozující složky imunity, dochází většinou k poškození buněk a tkání hostitele, nikoliv k eliminaci patogenních borelií (Janouškovcová 2004). Neutrofilů mohou také fagocytovat borelie, ale pouze opsonizované protilátkami (Montgomery et al. 2002).

Je žádoucí zvýšení aktivity Th2 lymfocytů, které vede k časně a dostatečné produkci specifických protilátek, které mohou patogenní borelie eliminovat. Protilátková odpověď proti *Borrelia burgdorferi* sensu lato je vcelku dobře známa. Vrchol tvorby protilátek typu IgM je mezi třetím a osmým týdnem od počátku infekce. Hladina specifických IgM se u většiny nemocných postupně snižuje a během několika měsíců tyto protilátky zcela vymizí. IgG protilátky se objevují většinou již v nepřítomnosti IgM, mají vrchol v průběhu pozdních manifestací a mohou přetrvávat ještě mnoho let po léčbě (Nadelman et Wormser 1998). Diseminace spirochet v rámci hostitelského organismu je dána jejich schopností se vázat na určité hostitelské receptory na povrchu buněk nebo extracelulární matrix (Coleman et al. 1995).

### 1.4.2. Interakce klíště – hostitel

Klíšťata čeledi *Ixodidae* sají na hostiteli po dobu několika dnů. Dlouhodobý kontakt mezi klíštětem a hostitelem poskytuje imunitnímu systému hostitele příležitost ovlivnit sání klíštěte. Imunitní obrana hostitele spočívá v zánětlivé reakci s přílivem lymfocytů, bazofilů, eozinofilů a makrofágů do místa sání klíštěte. Infiltrace bazofily byla popsána jako kožní bazofilní hypersenzitivita, která je zprostředkována lymfocyty Th1 subpopulace. Jedná se o formu oddáleného typu přecitlivělosti (Allen 1973). U imunních hostitelů jsou žírné buňky a bazofily obsazeny homocytotropními protilátkami, které po setkání s antigeny klíštěcích slin způsobují degranulaci těchto buněk a uvolnění mediátorů z granul (Wikel et al. 1996). Bylo prokázáno, že histamin inhibuje produkci klíštěcích slin i sání krve (Paine et al. 1983). Jako důsledek zánětlivé reakce je urychlena aktivace komplementu a produkce cytokinů (Kopecký et Kuthejlová 1998).

Přestože sání klíštěte představuje velký zásah do organismu hostitele a vyvolává silnou hemostatickou a imunitní odpověď, je klíště schopno dokončit sání. Úspěšné sání klíšťat je závislé na tom, jak je klíště schopné se vypořádat se s imunitní odpovědí hostitele. Klíšťata si vyvinula mechanismy, které působí jak proti přirozené, tak proti adaptivní imunitě hostitele. Za tyto mechanismy jsou zodpovědné farmakologicky aktivní látky obsažené ve slinných žlázách. Tyto látky jsou během sání sekretovány do slin a se slinami do hostitele (Brossard et Wikel 2004, Valenzuela 2004). Jedná se o látky s imunomodulačními, vasoaktivními a antikoagulačními vlastnostmi (Ribeiro 1995, Wikel et Bergmann 1997).

Sliny, ale také extrakt ze slinných žláz (SGE), inhibují aktivaci komplementu alternativní cestou (Ribeiro 1987) a anafylatoxinovou aktivitu (Ribeiro et Spielman 1986). Dále dochází k inhibici fagocytózy neutrofilů a produkce superoxidu (Ribeiro et al. 1990). Dochází k potlačení prozánětlivých cytokinů IL-1 a IFN $\gamma$  produkovaných Th1 subpopulací a naopak ke vzrůstu produkce protizánětlivých Th2 cytokinů IL-4, IL-10 a TNF $\beta$  (Ferreira et Silva 1999). Polarizace imunitní odpovědi hostitele směrem k Th2 subpopulaci je pro klíště výhodná tím, že vede k potlačení zánětu.

Imunomodulační molekuly obsažené ve slinách klíšťat poskytují určité výhody i pro patogeny, které jsou klíštětem přenášeny. Polarizace k Th2 odpovědi vede k potlačení fagocytózy a snížení produkce zabíječských molekul. To vede k tomu, že zabíjení patogena je inhibováno a jeho přenos je usnadněn. Jev, kdy dochází ke snazšímu přenosu patogena prostřednictvím klíštěcích slin, se nazývá *saliva activated transmission* (SAT), tedy slinami aktivovaný přenos patogenů. Poprvé byl SAT popsán u viru Thogoto a jeho vektora *Rhipicephalus appendiculatus* (Jones et al. 1987) a dodnes byl prokázán u mnoha patogenů a

jejich klíštěcích či hmyzích vektorů. Konkrétní molekuly klíštěcích slin zodpovědné za slinami aktivovaný přenos borelií nejsou dobře známy. Dosud toto bylo prokázáno pouze u proteinu Salp15 z *I. scapularis*, jehož exprese je selektivně zvýšena v přítomnosti *Borrelia burgdorferi*. Salp15 se váže na OspC spirochét, tím je chráněn před zabíjením protilátkami a komplementem a usnadňuje množení borelií v cílových orgánech (Ramamoorthi et al. 2005).

### **1.4.3. Interakce klíště – borelie**

Borelie se po nasátí klíštětem množí v jeho střevní stěně, kde infekce zůstává lokalizována. Dochází zde k selektivní expresi vnějších povrchových proteinů borelií. Jedná se o proteiny, které nejsou exprimovány, pokud se borelie nachází v hostiteli (Fingerle et al. 2000). Zásadní roli zde hrají OspA proteiny, pomocí nichž se borelie váží k epitelialním buňkám střeva. Následně dochází ke generalizovanému rozsevu borelií do ostatních tkání klíštěte. Během sání klíštěte pronikají borelie do střevního lumen a hemolymfou jsou zaneseny do slinných žláz, které jsou pak zdrojem infikovaných slin. Sáním klíštěte na dalším hostiteli tak dochází k přenosu infekce (Burgdorfer et al. 1987).



## **2. Cíle práce**

1. Optimalizovat metody infekce klíšťat boreliemi – sání na infikovaných myších
  - sání z kapiláry
  - ponoření do suspenze borelií.
2. Prokázat schopnost infikovaných klíšťat přenést infekci na dalšího hostitele.
3. Zvolit vhodnou metodu detekce borelií v klíšťatech.

### **3. Materiál a metody**

#### **3.1. Pokusná zvířata**

##### **3.1.1. Myši**

V pokusech byly použity inbrední SPF myši C3H/N (ANLAB Praha), a to samice 8 – 12 týdnů staré. Myši jsem potřebovala jednak pro pokusy, ve kterých sloužily jako zdroj boreliové infekce pro klíšťata, a jednak pro ostatní pokusy, kdy na nich bylo klíšťatům umožněno plné nasátí krve, které je nezbytné pro přechod z jednoho stádia do dalšího.

Myši byly chovány ve zvěřinci Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za standardních podmínek – teplota vzduchu 22 °C, relativní vlhkost vzduchu 65 %. Byly krmeny komerční směsí pro hlodavce. Vodu i potravu měly k dispozici *ad libitum*.

##### **3.1.2. Klíšťata**

Pro jednotlivé pokusy byla použita klíšťata *Ixodes ricinus*, podle potřeby larvální, nymfální či dospělá stádia. K pokusům bylo potřeba mít klíšťata prostá borelií. Proto jsem používala klíšťata z chovu Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích, jejichž předchozí dvě generace sály na morčeti imunizovaném směsným boreliovým antigenem. Před zahájením každého pokusu byl reprezentativní vzorek klíšťat testován na přítomnost *Borrelia burgdorferi* sensu lato pomocí PCR a klíšťata byla použita jen v případě negativního výsledku.

#### **3.2. Borelie**

##### **3.2.1. Kultivace borelií**

K pokusům byly používány tři druhy spirochety *Borrelia burgdorferi* sensu lato se vztahem k Lymeské borrelióze, a to jejich českobudějovické kmeny CB 53 (druh *Borrelia burgdorferi* sensu stricto), CB 43 (druh *Borrelia afzelii*) a CB 61 (druh *Borrelia garinii*). Byla použita vždy nejnižší dostupná pasáž. Borelie byly kultivovány v termostatu při 34 °C v BSK-H médiu (SIGMA) s 6 % králičího séra a 1% směsí antibiotik pro borelie (SIGMA).

##### **3.2.2. Stanovení počtu borelií**

Pro všechny pokusy bylo nezbytné znát přesnou koncentraci borelií v kultivačním médiu. Zjištění této koncentrace probíhalo následujícím způsobem. Na podložní sklo bylo z kultury borelií kápnuto 3,5 µl boreliové suspenze, kapka byla překryta krycím sklem o

rozměrech 18 x 18 mm. Preparát byl prohlížen pod mikroskopem v temném poli při zvětšení 400x (Amplival, Carl Zeiss, JENA). Bylo hodnoceno množství spirochet, počet živých borelií a kontaminace kultury. Počítány byly jen živé spirochety, a to ve dvaceti zorných polích. Počet borelií v 1ml bakteriální suspenze byl zjištěn podle následujícího vzorce (Magnuson 1948):

$$\text{Počet borelií/ml} = a/3,5 \times 3724 \times 1/d \times 1000,$$

kde **a** je průměrný počet borelií ve dvaceti zorných polích a **d** ředění suspenze.

Borelie byly poté doředy do potřebné koncentrace, pokud to pro pokus bylo nezbytné.

### **3.3. Metody infekce klíšťat spirochetami *Borrelia burgdorferi* sensu lato**

#### **3.3.1. Infekce klíšťat sáním na infikovaných myších**

##### **3.3.1.1. Infekce myší**

Hostitelé, kteří sloužili jako zdroj boreliové infekce pro klíšťata, byly SPF myši C3H/N 8 – 12 týdnů staré (ANLAB Praha). Vždy pět myší bylo s. c. infikováno jednotlivými druhy borelií, a to *B. burgdorferi* sensu stricto (kmen CB 53), *B. afzelii* (kmen CB 43) a *B. garinii* (kmen CB 61). Borelie z kultury byly v BSK-H médiu naředy na koncentraci  $10^4$  buněk/ml, infekční dávka s. c. aplikovaná myším činila 100  $\mu$ l naředy bakteriální suspenze, obsahovala tedy  $10^3$  borelií. Jako negativní kontrolu jsem použila tři SPF myši C3H/N, které boreliemi infikovány nebyly.

##### **3.3.1.2. Detekce infekce u myší**

Po jednom měsíci po s. c. infekci myší jsem zjišťovala, zda se u těchto myší vyvinula protilátková odpověď jako reakce na infekci boreliemi. Protilátky byly detekovány v myších sérech metodou nepřímá ELISA. Postup byl následující. Na dno jamek mikrotitračního panelu byl imobilizován boreliový antigen o koncentraci 10  $\mu$ g/ml ve vazebném roztoku (1,59 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 2,93 g  $\text{NaHCO}_3$  v 1 litru  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 9,6). Mikrotitrační panel byl inkubován 24 hodin při teplotě 4 °C. Poté byly blokovacím puřem (10% PTS v PBS) vyblokovány nespecifické vazby. Po promytí byla přídána testovaná myší séra a také pozitivní (monoklonální protilátka proti flagelinu) a negativní kontrola (normální myší sérum), vše v ředění 1:200. Po inkubaci následovalo opět promytí a byla přídána antimyší protilátka značená peroxidázou (Sevapharma, ředění 1 : 2000). Následovala další inkubace a promytí a

poté byla vyvolána enzymatická reakce přidáním substrátového roztoku (10 ml fosfocitrátového pufru, 4 mg OPD, 4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Reakce byla po cca deseti minutách zastavená koncentrovanou kyselinou sírovou. Intenzita zabarvení byla hodnocena změřením absorbance na vertikálním spektrofotometru (Multiskan MCC 340, Labsystems Oy, Helsinky, Finland) při vlnové délce 490 nm.

### 3.3.1.3. Infekce klíšťat

Klíšťata byla infikována tak, že byla umístěna do kloboučků připevněných na hřbet myši. Klíšťata byla na myších ponechána až do úplného nasátí. Tímto způsobem jsem infikovala nymfy *Ixodes ricinus*. Na každou myš bylo nasazeno dvacet klíšťat. Po nasátí byla klíšťata uchovávána v Parazitologickém ústavu AV ČR při teplotě 25°C a relativní vlhkosti vzduchu 80% až do metamorfózy v dospělce. Dospělci byli poté vyšetřeni na přítomnost *Borrelia burgdorferi* sensu lato pomocí PCR.

### 3.3.2. Infekce klíšťat sáním z kapiláry

Stejně jako u předcházejícího pokusu byly tímto způsobem infikovány nymfy *Ixodes ricinus*. Klíšťata byla hřbetní stranou připevněna na oboustrannou lepicí pásku přilepenou na podložní sklo. Tímto bylo klíšťatům zabráněno v pohybu. Na sací ústrojí jsem nymfám nasadila kapiláru se suspenzí borelií o koncentraci 10<sup>7</sup> buněk/ml. Použity byly opět jednotlivé druhy z komplexu *B. burgdorferi* sensu lato se vztahem k Lymeské borrelióze, a to českobudějovické kmeny CB 43 (*B. afzelii*), CB 53 (*B. burgdorferi* sensu stricto) a CB 61 (*B. garinii*). Bylo použito vždy 15 klíšťat na každý druh borelie. Negativní kontrola (nymfy bez infekce) byla společná s předchozím pokusem. Po nasátí boreliové suspenze z kapiláry byly nymfy opatrně odstraněny z podložního skla a umístěny na samice myši C3H/N, aby se dosály krví, což je nezbytné pro přechod do dalšího stádia. Následně mělo proběhnout vyšetření dospělců na přítomnost *B. burgdorferi* sensu lato pomocí PCR.

### 3.3.3. Infekce klíšťat ponořením do suspenze borelií

Tento způsob infekce je vhodný pro infekci larev *Ixodes ricinus*. Vždy cca 40 larev bylo ponořeno do mikrozkuřavky s boreliovou suspenzí o koncentraci 10<sup>7</sup> buněk/ml. Byly použity tytéž tři druhy borelií z komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato jako v předchozích pokusech. Jako negativní kontrolu jsem použila larvy ponořené do kultivačního BSK-H média bez borelií. Larvy byly v médiu s boreliemi (v případě negativní kontroly v médiu bez borelií) inkubovány po dobu dvou hodin při teplotě 32 °C v termostatu. Následně byly larvy omyty

krátce v 70% ethanolu a poté dvakrát v destilované vodě a nasazeny na myši C3H/N kvůli dosátí krve. Po přechodu do dalšího stádia byly vyšetřeny nymfy, a to pomocí PCR stejně jako v předchozích pokusech.

### **3.4. Detekce *Borrelia burgdorferi* sensu lato v infikovaných klíšťatech**

Detekci borelií v infikovaných klíšťatech jsem prováděla metodou PCR (polymerase chain reaction; polymerázová řetězová reakce). Jedná se o reakci, kde dochází k amplifikaci (namnožení) určitého úseku DNA *in vitro* v cyklické reakci o třech teplotních fázích. Dochází k nasyntetizování velkého množství kopií určité vybrané sekvence DNA. Detekce produktů amplifikace následně probíhá především pomocí gelové elektroforézy.

Detekce borelií nebyla prováděna přímo u infikovaných klíšťat, ale až po jejich metamorfóze do dalšího stádia. Důvody, proč klíšťata nebyla vyšetřena ihned po infekci byly dva. První důvod byl ten, že v zaživacím traktu klíšťat byla nasátá krev, která negativně ovlivňuje PCR, což by mohlo vést k falešně negativním výsledkům. Druhým důvodem byl cíl zjistit, jestli dojde k transstadiálnímu přenosu borelií.

#### **3.4.1. Izolace DNA**

Pro izolaci DNA byl použit komerční kit JETquick Tissue DNA Spin Kit (Genomed) a bylo postupováno podle návodu výrobce. Izolace DNA z klíšťat probíhala tak, že klíšťata byla umístěna do jamek mikrotitračního panelu a pod binokulární lupou roztrhána a zhomogenizována v 30  $\mu$ l PBS. Vzniklá suspenze vyjma pevných částí byla přenesena do mikrozkušavky s 200  $\mu$ l pufru T1 a 25  $\mu$ l proteinázy K (c = 20 mg/ml). Vzorky byly inkubovány v termobloku při teplotě 56 °C do druhého dne. Další postup probíhal podle protokolu výrobce kitu. Vzorky DNA byly skladovány v mrazničce při -20 °C.

#### **3.4.2. Polymerázová řetězová reakce**

Byl amplifikován úsek genu pro 16 S rRNA *B. burgdorferi* sensu lato o velikosti 669 bp. Sekvence použitých primerů byla následující: 5'-ACG CTG GCA GTG CGT CTT AA-3' a 5'-CTG ATA TCA ACA GAT TCC ACC C-3' (Liebisch et al. 1998). PCR probíhala v PCR zkumavkách v celkovém objemu 20  $\mu$ l, přičemž k 18  $\mu$ l Master-Mixu byly přidány 2  $\mu$ l vyizolované DNA (případně 2  $\mu$ l pozitivní či negativní kontroly).

18  $\mu$ l Master-Mixu obsahovalo: 12,3  $\mu$ l deionizované H<sub>2</sub>O

2,0  $\mu$ l reakčního Taq pufru (Generi-Biotech)

1,6  $\mu$ l 10 mM směsi nukleotidů (TopBio)

1,0 + 1,0 µl 0,01 mM primerů (Generi-Biotech)

0,1 µl Taq DNA polymerázy (Generi-Biotech)

Amplifikace probíhala v termocyleru UNO II (Biometra). Po počáteční pětiminutové denuraci DNA při 94 °C následovalo 35 cyklů s následujícími teplotními fázemi:

- 30 sekund při 94 °C (denaturace DNA)
- 30 sekund při 57 °C (annealing = připojení primerů na oba konce úseku DNA)
- 60 sekund při 72 °C (syntéza komplementárních vláken DNA)

Produkty amplifikace byly separovány v 1% agarózovém gelu a zviditelněny činidlem SYBR Green.

### 3.4.3. Gelová elektroforéza

Elektroforéza k detekci produktů PCR amplifikace probíhala v 1% agarózovém gelu. Ten byl připraven z 0,8 g agarózy (Amresco) a 80 ml 10x koncentrovaného TAE pufru (24,23 g tris(hydroxymethyl)aminometanu – TRIS, 5,706 ml 99% CH<sub>3</sub>COOH, 1,86 g EDTA-Na<sub>2</sub>, 500 ml H<sub>2</sub>O). K PCR produktům byly přidány 4 µl roztoku interkalační látky SYBR Green (2 g Ficoll, 100 µl 1M TRIS, 10 mg Orange G, 20 µl SYBR Green II (Sigma)). Vzorky byly nanášeny do jamek agarózového gelu a byla provedena horizontální elektroforéza (65 V, 50 mA, 60 minut). Poté byl gel prohlížen pod UV lampou a vyhodnocen, popř. vyfotografován.

### 3.5. Zjištění schopnosti infikovaných klíšťat přenést infekci na hostitele

Bylo nutné zjistit, zda klíšťata různými metodami infikovaná spirochetami *B. burgdorferi* sensu lato jsou schopna tuto infekci přenést na dalšího savčího hostitele. Jako hostitelé byly použity samice SPF myši C3H/N 8 – 12 týdnů staré (ANLAB Praha).

#### 3.5.1. Schopnost infikovaných klíšťat ještě před metamorfózou přenést infekci na hostitele

Zjišťovala jsem, zda u myši C3H/N, na kterých probíhalo dosátí klíšťat po jejich infekci boreliemi, je prokazatelná boreliová infekce. Tyto myši byly cca jeden měsíc po nasávání klíšťat usmrceny a byla vyšetřena jednak přítomnost protilátek proti boreliím, a jednak také pomocí PCR detekována přítomnost borelií v jednotlivých orgánech. Vyšetření bylo prováděno u myši, na kterých se dosávaly larvy infikované ponořením do suspenze borelií.

### 3.5.2. Schopnost infikovaných klíšťat po metamorfóze nakazit hostitele

Zjišťovala jsem také, zda klíšťata která byla infikována boreliemi a udržela si tuto infekci přes metamorfózu do dalšího stádia (nymphálního či dospělého). Pokus byl prováděn jako v předchozím případě jednak detekcí protilátek proti boreliím v myších sérech, jednak detekcí přítomnosti borelií v jednotlivých orgánech pomocí PCR. Myši jsem infikovala jednak nymfami, které byly infikovány jako larvy ponořením do suspenze borelií, a to tak, že na myši bylo umístěno vždy pět nymf a bylo jim umožněno plné nasátí krve. Dále jsem infikovala myši pomocí dospělců, kteří vznikli metamorfózou nymf, které byly infikovány sáním na infikovaných myších. Byly nasazeny vždy dvě infekční samice na myš. Aby myš přežila sání těchto dvou samic, nebylo jim umožněno plné nasátí krve, ale byly odstraněny po pěti dnech sání. Po cca jednom měsíci od sání infikovaných klíšťat (nymf či dospělých samic) byly myši usmrceny a vyšetřeny.

### 3.5.3. Detekce infekce v hostitelích

#### 3.5.3.1. Detekce protilátek proti *Borrelia burgdorferi*

Protilátky proti *B. burgdorferi* byly detekovány metodou nepřímá ELISA. Postup byl shodný jako v kapitole 3.3.1.2. Následně však byla zvolena ještě další metoda detekce protilátek, a to metoda Western-blotting, která je oproti metodě ELISA citlivější.

Western-blotting je metoda, která umožňuje přenos elektroforeticky rozdělených proteinů z polyakrylamidového gelu na nitrocelulózovou membránu. Následuje detekce rozdělených proteinů na nitrocelulózové membráně pomocí protilátek. Polohy proteinů jsou srovnávány s molekulovým markerem.

Již připravený směsný boreliový antigen byl elektroforeticky rozdělen na jednotlivé proteiny na gradientovém polyakrylamidovém gelu v minisystému Mighty small II (Hofer Science Institute). Byl použit gradientový minigel obsahující 375 mM Tris/HCl (pH 8,8), 0,1% (w/v) SDS a 0 – 0,20% (v/v) gradient glycerolu. Elektroforéza probíhala 20 minut při napětí 70 V a přibližně dalších 140 minut při napětí 100 V a proudu 50 mA, než se proteiny dostaly do vzdálenosti 0,5 cm od spodního okraje gelu. Rozdělené proteiny byly přeneseny z polyakrylamidového gelu na nitrocelulózovou membránu mokřím způsobem. Přenos proteinů probíhal 75 minut při proudu 230 mA a napětí 71 V v elektroforetickém zařízení Hofer TE22 (Pharmacia & Biotech). Poté byla z membrány odříznuta část, na kterou se přenesl standard molekulových vah a část antigenu. Tato část byla ihned 3 – 4 minuty barvena roztokem amidočerni (0,1 % amidočerně, 25 % methanol, 10 % kyselina octová), dále několikrát opláchnuta v destilované vodě a odbarvována přes noc v odbarvovacím roztoku (25

% methanol, 10 % kyselina octová). Tím byla zkontrolována úspěšnost přenosu proteinů na membránu.

Zbylá část nitrocelulózkové membrány byla rozstříhána na 5 mm proužky, které byly vloženy na desku se žlábkem. Každý proužek byl za stálého promíchávání při laboratorní teplotě blokován 1 hodinu v 1 ml 5 % roztoku sušeného mléka v borátovém pufru (BBS – 0,17 M  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 26 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  a 7,5 mM NaCl). Po blokování nespecifických míst byl blokovací roztok odsát a ke každému proužku byla přidána myší séra v ředění 1 : 50. Pro negativní kontrolu bylo použito normální myší sérum ve stejném ředění. Inkubace probíhala při laboratorní teplotě za stálého míchání po dobu dvou hodin. Dále byly proužky 3 x 15 minut promývány v 3 % roztoku odtučněného sušeného mléka v BBS. Poté byla přidána sekundární protilátka značená peroxidázou SwAM/Px (SEVAK Praha) v ředění 1 : 300 a za stálého míchání následovala inkubace dlouhá jednu hodinu. Proužky byly omyty 2 x 15 minut v 3 % roztoku odtučněného sušeného mléka v BBS. Pro zviditelnění vazby protilátky na antigeny byly poté proužky umístěny do chlornaftolové vývojky (40 ml 0,5 % Tris o pH 6,8, 10 ml 0,3 % roztok 4-chloro-1-naftolu (SIGMA) v methanolu, 25  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Reakce byla po objevení proužků zastavena destilovanou vodou.

### 3.5.3.2. Detekce boreliové DNA pomocí PCR

Provedla jsem také detekci boreliové DNA pomocí PCR v myších orgánech, a to v srdci a močovém měchýři. Detekce probíhala stejným způsobem jako u detekce boreliové DNA v klíšťatech, pouze s menšími odchylkami v počáteční fázi izolace DNA.

Pro izolaci DNA z myších orgánů byla použita vždy část odebraného orgánu o hmotnosti 15 – 20 mg. Tkáň byla rozstříhána do 200  $\mu\text{l}$  T1 pufru s 25  $\mu\text{l}$  proteinázy K (c = 20 mg/ml) a inkubována v termobloku při 56 °C do druhého dne. Další postup probíhal stejně jako u izolace DNA z klíšťat podle protokolu výrobce kitu. Stejně probíhala také amplifikace úseku genu pro 16 S rRNA *B. burgdorferi* sensu lato a jeho následné zviditelnění v agarózovém gelu.



## 4. Výsledky

### 4.1. Infekce klíšťat *Ixodes ricinus* sáním na infikovaných myších

Samice myší C3H/N byly s. c. infikovány českobudějovickými kmeny jednotlivých druhů borelií. Jednalo se o tyto kmeny: CB 53 (Bbss), CB 43 (*B. afzelii*) a CB 61 (*B. garinii*). Každým kmenem borelie bylo infikováno pět myší. Myši byly infikovány 100 µl bakteriální suspenze o koncentraci 10<sup>4</sup> borelií/ml média. Další tři myši byly použity jako negativní kontrola, boreliemi tedy infikovány nebyly.

Po cca jednom měsíci byla u myší zjišťována protilátková odpověď na přítomnost borelií metodou nepřímá ELISA. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 2. Protilátková odpověď je vyjádřena vždy jako hodnota absorbance změřené na vertikálním fotometru. Cut off hodnota, od které byl výsledek považován za pozitivní, byl vždy dvojnásobek hodnoty negativní kontroly.

		Hodnoty absorbance v ELISA testu			
		CB 53	CB 43	CB 61	kontrola
Myš	1	2,581	0,357	0,160 *	0,101 *
	2	1,243	0,372	0,371	0,133 *
	3	2,856	0,194 *	0,272	0,108 *
	4	0,228	0,313	0,252	-
	5	0,244	0,230	0,270	-
PK		3,137	3,166	0,755	2,364
NK		0,098	0,100	0,084	0,086
Cut - off hodnota		0,196	0,200	0,168	0,172

**Tab. 2:** Přítomnost protilátek u myší s. c. infikovaných jednotlivými kmeny borelií. Výsledky jsou vyjádřeny jako hodnota absorbance při vlnové délce 490 nm. PK = pozitivní kontrola (monoklonální Ab proti flagelinu), NK = negativní kontrola (normální myší sérum), \* = negativní výsledek.

Téměř u všech s. c. infikovaných myší byly prokázány protilátky proti boreliím, přestože většinou byla jejich hladina poměrně nízká.

Následně byly na tyto myši nasazeny nymfy *Ixodes ricinus*. Po jejich nasátí a následné metamorfóze byli vzniklí dospělci vyšetřeni na přítomnost spirochet *Borrelia burgdorferi* sensu lato, a to pomocí PCR. Bylo vyšetřeno vždy deset dospělců z každé myši.

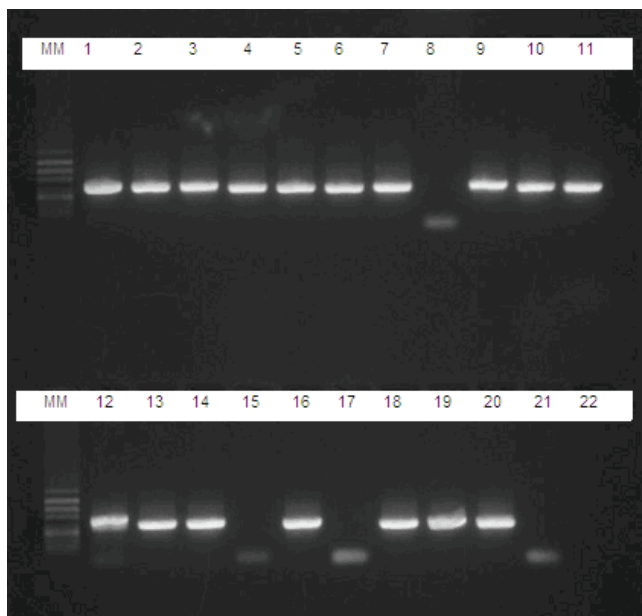
U všech myši s. c. infikovaných druhem *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (kmen CB 53) byla prokázána přítomnost protilátek proti boreliím, přestože u myši označených číslem 4 a 5 byla jejich hladina velmi nízká. Úspěšnost nákazy nymf *Ixodes ricinus*, které sály na těchto myších, se pohybovala od 20 do 100%. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 3. Celková úspěšnost infekce klíšťat sáním na myších s. c. infikovaných kmenem CB 53 (Bbss) byla 64%.

Nymfy sající na myši C3H/N číslo	Přítomnost protilátek u myši (ELISA)	Množství infikovaných klíšťat	
		Počet infik./počet vyšetřených klíšťat	% infikovaných klíšťat
1	+	10/10	100%
2	+	7/10	70%
3	+	9/10	90%
4	+	2/10	20%
5	+	4/10	40%
<b>Celkem:</b>		<b>32/50</b>	<b>64%</b>

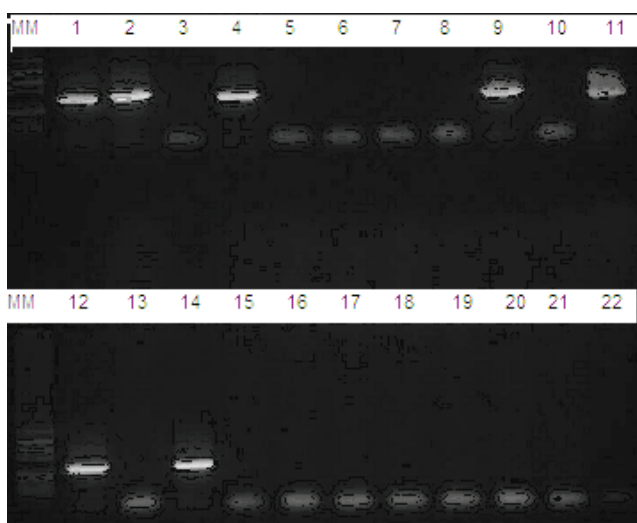
**Tab. 3:** Množství klíšťat, která se nakazila sáním na myši s. c. infikované kmenem CB 53 (*Borrelia burgdorferi* sensu stricto).

Na Obrázku 1 je výsledek detekce boreliové DNA v klíšťatech pomocí PCR, zviditelněný gelovou elektroforézou. Vzorek číslo 1 představuje pozitivní kontrolu, na kterou byla použita DNA vyizolovaná z kultury borelií o koncentraci  $10^5$  b/ml (kmen B31 – *Borrelia burgdorferi* sensu stricto). Vzorky 2 – 11 představují boreliovou DNA získanou z deseti klíšťat sajících na myši č. 2, vzorky 12 – 21 pak boreliovou DNA získanou z deseti klíšťat sajících na myši č. 3. Vzorek 22 je negativní kontrola, kde byla k Master Mixu namísto DNA přidána destilovaná voda.

Obrázek 2 znázorňuje výsledek detekce boreliové DNA v klíšťatech pomocí PCR, zviditelněný gelovou elektroforézou. Vzorek číslo 1 je pozitivní kontrola (DNA vyizolovaná z kultury Bbss kmene B31 o koncentraci  $10^5$  b/ml). Vzorky 2 – 11 představují boreliovou DNA získanou z deseti klíšťat sajících na myši č. 4, vzorky 12 – 21 pak boreliovou DNA získanou z deseti klíšťat sajících na myši č. 5. Vzorek 22 je negativní kontrola, kde byla k Master Mixu namísto DNA přidána destilovaná voda.



**Obr. 1:** Výsledky vyšetření klíšťat na přítomnost *Borrelia burgdorferi* sensu stricto pomocí PCR. MM = molekulový marker, vzorky DNA z klíšťat jsou označeny čísly 2 – 21. Vzorek č. 1 = pozitivní kontrola PCR reakce, vzorek č. 22 = negativní kontrola PCR reakce.



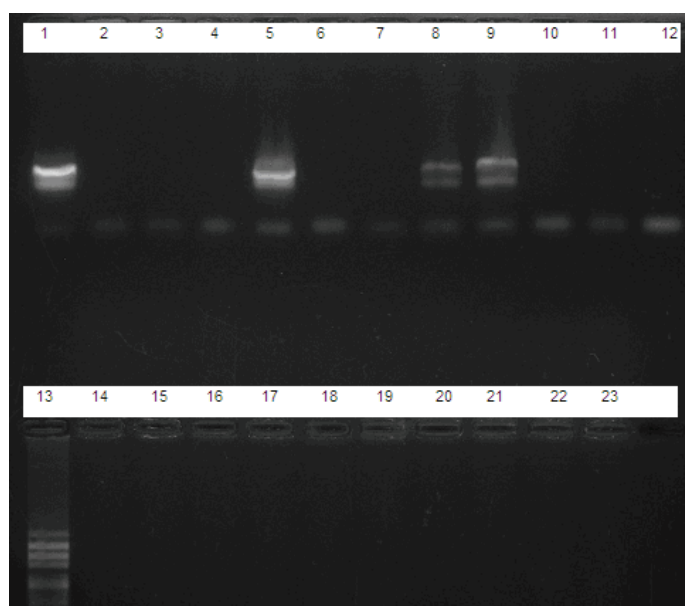
**Obr. 2:** Výsledky vyšetření klíšťat na přítomnost *Borrelia burgdorferi* sensu stricto pomocí PCR. MM = molekulový marker, vzorky DNA z klíšťat jsou označeny čísly 2 – 21. Vzorek č. 1 = pozitivní kontrola PCR reakce, vzorek č. 22 = negativní kontrola PCR reakce.

U čtyř z pěti myší s. c. infikovaných druhem *Borrelia afzelii* (kmen CB 43) byla prokázána přítomnost protilátek proti boreliím. Hladina protilátek byla ale u všech těchto myší velmi nízká. Úspěšnost nákazy nymf *Ixodes ricinus*, které sály na těchto myších, se pohybovala pouze od 0 do 30%. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 4. Celková úspěšnost infekce klíšťat sáním na myších s. c. infikovaných kmenem CB 43 (*B. afzelii*) byla pouhých 16%.

Nymfy sající na myši C3H/N číslo	Přítomnost protilátek u myši (ELISA)	Množství infikovaných klíšťat	
		Počet infik./počet vyšetřených klíšťat	% infikovaných klíšťat
1	+	2/10	20%
2	+	3/10	30%
3	-	0/10	0%
4	+	3/10	30%
5	+	0/10	0%
<b>Celkem:</b>		<b>8/50</b>	<b>16%</b>

**Tab. 4:** Množství klíšťat, která se nakazila sáním na myši s. c. infikované kmenem CB 43 (*Borrelia afzelii*).

Na Obrázku 3 je výsledek detekce boreliové DNA v klíšťatech pomocí PCR, zviditelněný gelovou elektroforézou. Vzorek číslo 1 představuje pozitivní kontrolu, na kterou byla použita DNA vyizolovaná z kultury borelií o koncentraci  $10^5$  b/ml (kmen B31 – *Borrelia burgdorferi* sensu stricto). Vzorky 2 – 11 představují boreliovou DNA získanou z deseti klíšťat sajících na myši č. 4, vzorky 12 a 14 – 22 pak boreliovou DNA získanou z deseti klíšťat sajících na myši č. 5. Vzorek 23 je negativní kontrola, kde byla k Master Mixu namísto DNA přidána destilovaná voda.



**Obr. 3:** Výsledky vyšetření klíšťat na přítomnost *Borrelia afzelii* pomocí PCR. 13 = molekulový marker, vzorky DNA z klíšťat jsou označeny čísly 2 – 12 a 14 – 22. Vzorek č. 1 = pozitivní kontrola PCR reakce, vzorek č. 23 = negativní kontrola PCR reakce.

U čtyř z pěti myší s. c. infikovaných druhem *Borrelia garinii* (kmen CB 61) byla prokázána přítomnost protilátek proti boreliím. Úspěšnost nákazy nymf *Ixodes ricinus*, které sály na těchto myších, se pohybovala od 0 do 80%. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 5. Celková úspěšnost infekce klíšťat sáním na myších s. c. infikovaných kmenem CB 61 (*B. garinii*) byla 44%.

Nymfy sající na myši C3H/N číslo	Přítomnost protilátek u myši (ELISA)	Množství infikovaných klíšťat	
		Počet infik./počet vyšetřených klíšťat	% infikovaných klíšťat
1	–	0/10	0%
2	+	8/10	80%
3	+	4/10	40%
4	+	5/10	50%
5	+	5/10	50%
<b>Celkem:</b>		<b>22/50</b>	<b>44%</b>

**Tab. 5:** Množství klíšťat, která se nakazila sáním na myši s. c. infikované kmenem CB 61 (*Borrelia garinii*).

Výsledky detekce boreliové DNA v podobě fotografií gelu po gelové elektroforéze bohushrnuje celkovou úsp žel nejsou u tohoto pokusu k dispozici.

Tabulka 6 zachycuje úspěšnost infekce klíšťat *Ixodes ricinus* spirochetami *Borrelia burgdorferi* sensu lato sáním na infikovaných myších.

Použitý kmen borelie	Množství infikovaných klíšťat	
	Počet infikovaných klíšťat / počet vyšetřených klíšťat	% infikovaných klíšťat
CB 53 (Bbss)	32/50	64%
CB 43 ( <i>B. afzelii</i> )	8/50	16%
CB 61 ( <i>B. garinii</i> )	22/50	44%
Kontrola	0/30	0%
<b>Celkem:</b>	<b>61/150</b>	<b>40,7%</b>

**Tab. 6:** Shrnující tabulka úspěšnosti infekce klíšťat *Ixodes ricinus* spirochetami *Borrelia burgdorferi* sensu lato sáním na infikovaných myších. Do celkového množství infikovaných klíšťat není zahrnuta kontrola, ale pouze klíšťata, která sála na myších infikovaných třemi druhy borelií.

#### 4.2. Infekce klíšťat *Ixodes ricinus* ponořením do suspenze borelií

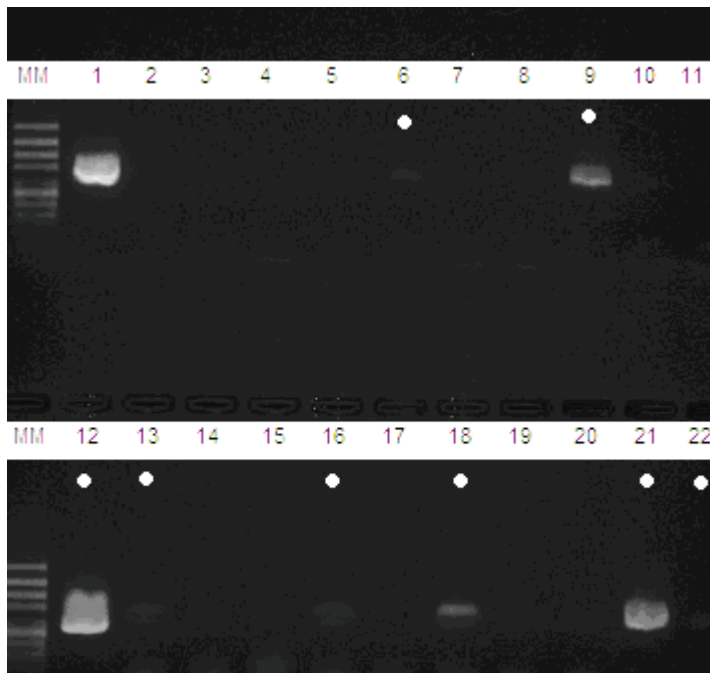
Larvy *Ixodes ricinus* byly ponořeny do suspenzí jednotlivých druhů borelií. Byly použity opět tři českobudějovické kmeny, a to kmen CB 43 (*B. afzelii*), kmen CB 53 (Bbss) a kmen CB 61 (*B. garinii*). Na přítomnost borelií byly po metamorfóze pomocí PCR vyšetřeny vzniklé nymfy *Ixodes ricinus*.

Pokus byl prováděn dvakrát, bylo vždy vyšetřeno 10 nymf z každé skupiny, celkem tedy u každého druhu borelie a také u kontroly 20 nymf. Výsledky jsou shnuty v Tabulce 7.

Použitý kmen borelie	Množství infikovaných klíšťat	
	Počet infikovaných / počet vyšetřených	% infikovaných klíšťat
CB 53 (Bbss)	13/20	65%
CB 43 (B.afzelii)	8/20	40%
CB 61 (B. garinii)	10/20	50%
Kontrola (médiu)	0/20	0%
<b>Celkem:</b>	<b>31/60</b>	<b>51,7%</b>

**Tab. 7:** Tabulka úspěšnosti infekce klíšťat *Ixodes ricinus* ponořením do suspenzí se třemi druhy spirochet komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Do celkového množství infikovaných klíšťat není (stejně jako v předcházejícím pokusu) zahrnuta kontrola.

Na Obrázku 4 je výsledek gelové elektroforézy, pomocí které byla detekována boreliová DNA získaná z klíšťat a namnožená pomocí PCR reakce. Vzorek č. 1 je pozitivní kontrola PCR reakce (boreliová DNA vyizolovaná z kultury Bbss, kmen B 31), vzorek č. 2 je negativní kontrola PCR reakce (destilovaná voda). Čísly 3 – 22 jsou označeny vzorky DNA získané z klíšťat *Ixodes ricinus* infikovaných ponořením do suspenze *Borrelia garinii*. Pozitivní vzorky, tedy ty, ve kterých byla detekována DNA *Borrelia burgdorferi* sensu lato, jsou označeny tečkou. Jedná se o vzorky 6, 9, 12, 13, 16, 18, 21 a 22. Označení jsem zvolila z toho důvodu, že na rozdíl od předcházejícího pokusu, jsou zde proužky znázorňující přítomnost boreliové DNA poměrně slabé.



**Obr. 4:** Výsledky vyšetření klíšťat na přítomnost *Borrelia garinii* pomocí PCR. MM = molekulový marker, vzorky DNA z klíšťat jsou označeny čísla 3 - 22. Vzorek č. 1 = pozitivní kontrola PCR reakce, vzorek č. 2 = negativní kontrola PCR reakce.

Fotografie znázorňující výsledky detekce boreliové DNA v klíšťatech infikovaných ponořením do suspenze *Borrelia burgdorferi* sensu stricto a *Borrelia afzelii* nejsou bohužel k dispozici.

#### 4.3. Infekce klíšťat *Ixodes ricinus* sáním z kapiláry

Tímto způsobem jsem se pokoušela infikovat nymfy *Ixodes ricinus*. Na sací ústrojí byla nymfám nasazena kapilára se suspenzí jednotlivých druhů borelií. Po nasátí boreliové suspenze z kapiláry byla klíšťata umístěna na myši C3H/N k dosátí krve. Klíšťata však nebyla schopna se přisát na myš, tento pokus tedy skončil neúspěšně a klíšťata se tímto způsobem boreliemi nakazit nezdařilo.

#### 4.4. Schopnost nakažených klíšťat *Ixodes ricinus* přenést infekci na dalšího hostitele

##### 4.4.1. Schopnost nakažených klíšťat přenést infekci ještě před metamorfózou

Prokazovala jsem infekci boreliemi u myší, na kterých se dosávaly larvy po infekci ponořením do suspenze borelií, a to cca po jednom měsíci. Jelikož byl pokus opakován dvakrát a byly vždy použity tři druhy borelií a negativní kontrola v podobě larev ponořených do média bez borelií, bylo k dosátí klíšťat použito celkem 8 myší. Nejprve jsem zjišťovala

přítomnost protilátek proti boreliím metodou nepřímá ELISA. Vzhledem k negativním výsledkům jsem pro ověření zvolila citlivější metodou, a to Western-blotting, také s negativním výsledkem. Následně jsem provedla detekci boreliové DNA v myších orgánech (srdci a močovém měchýři) metodou PCR. U žádné z myší, na kterých se dosávaly larvy infikované ponořením do suspenze spirochet, se neprokázala infekce boreliemi.

#### **4.4.2. Schopnost infikovaných klíšťat po metamorfóze nakazit hostitele**

V tomto pokusu jsem chtěla prokázat schopnost nakažení myší C3H/N pomocí dospělců vzniklých metamorfózou nymf nakažených sáním na infikovaných myších. Vzhledem k nízkému množství dospělců po metamorfóze byl pokus proveden pouze s klíšťaty infikovanými druhem *Borrelia afzelii*. Na dvě SPF myši C3H/N bylo nasazeno po dvou dospělých samicích. Bohužel ani jedna z myší sání dvou dospělých samic nepřežila. Schopnost klíšťat infikovaných sáním na s. c. infikovaných myších nakazit dalšího hostitele tedy z tohoto důvodu prokázána nebyla.

Dále jsem chtěla prokázat schopnost klíšťat infikovaných ponořením do suspenze borelií po metamorfóze v nymfy nakazit SPF C3H/N myši. Vzhledem k omezenému počtu nymf po metamorfóze byl pokus proveden pouze u klíšťat infikovaných druhem *Borrelia afzelii*. K dispozici bylo dvacet nymf, přičemž promořenost boreliemi po vyšetření pomocí PCR činila 40%. Na čtyři myši C3H/H bylo nasazeno vždy pět nymf. Jako negativní kontrolu jsem použila dvě C3H/N myši. Na obě bylo nasazeno po pěti nymfách prostých borelií. Po jednom měsíci od sání klíšťat byly myši usmrceny. V myších sérech jsem detekovala přítomnost protilátek proti boreliím metodou nepřímá ELISA. Přítomnost protilátek byla prokázána u dvou ze čtyřech myší, na kterých sály nymfy se 40% promořeností boreliemi. U kontrolních myší, na kterých sály nymfy prosté borelií protilátky prokázány nebyly.

Pomocí PCR jsem provedla také detekci DNA borelií ve tkáních močového měchýře a srdce, a to u každé ze šesti použitých myší. Výsledky detekce protilátek metodou nepřímá ELISA a detekce boreliové DNA v myších orgánech jsou shrnuty v Tabulce 8.

U obou myší, u kterých byla prokázána přítomnost protilátek proti boreliím, byla zjištěna jejich infekce boreliemi také pomocí PCR. U obou myší byla prokázána přítomnost borelií jak ve tkáni močového měchýře, tak v srdci. U jedné z myší, na kterých sály infikované nymfy, ale nebyly prokázány protilátky proti boreliím, byla pomocí PCR zjištěna přítomnost borelií ve tkáni močového měchýře. Poslední ze čtyř myší, na kterých sály infikované larvy, se boreliemi nenakazila. U kontrolních myší, na kterých sály nymfy prosté borelií se přítomnost *Borrelia burgdorferi* sensu lato neprokázala ani pomocí PCR.



Myš C3H/N číslo	Nepřímá ELISA	PCR	
		Srdce	Močový měchýř
1	+	+	+
2	-	-	+
3	-	-	-
4	+	+	+
5	-	-	-
6	-	-	-

Tab. 8: Výsledky detekce infekce u myši na kterých sála klíšťata infikovaná ponořením do suspenze *B. afzelii*. 1 – 4: myši, na kterých sály nymfy infikované *B. afzelii*. 5 – 6: myši, na kterých sály nymfy prosté borelií.

Bylo tedy prokázáno, že nymfy, které se nakazily v larválním stádiu ponořením do suspenze borelií, jsou schopné tuto infekci přenést na dalšího hostitele.

## 5. Diskuse

Klíšťata rodu *Ixodes* fungují jako přenašeči pro původce Lymeské borreliózy, spirochetu *Borrelia burgdorferi*. Nasají patogena spolu s krví infikovaného obratlovce a přenesou jej na dalšího hostitele během dalšího sání, kdy spirochety hemolymfou migrují ze střeva do slinných žláz (Donahue et al. 1987).

Přežití v zažívacím traktu klíšťat, penetrace přes střevní tkáň a tkáň slinných žláz a migrace se slinami do hostitele jsou nezbytné kroky v infekčním cyklu patogena a jejich porozumění je nezbytné pro další výzkum Lymeské borreliózy. Proto je důležité najít optimální systém, který spolehlivě a reprodukovatelně umožní infekci většího množství klíšťat spirochetami *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Je však obtížné najít vhodnou laboratorní metodu infekce klíšťat, a to z toho důvodu, že sání klíšťat je dlouhý a poměrně komplikovaný proces (Young et al. 1996).

### 5. 1. Infekce klíšťat *Ixodes ricinus* sáním na infikovaných myších

Infekce klíšťat *Ixodes ricinus* sáním na infikovaných myších je metoda, která se nejvíce podobá přirozenému způsobu infekce. Množství infikovaných klíšťat, která infekci získala sáním na nakažených laboratorních zvířatech, se u jednotlivých pokusů velmi liší, a to od neschopnosti klíšťat získat infekci (Burgdorfer et Cage 1986) až po 100% úspěšnost (Donahue et al. 1987).

Existuje několik způsobů, jak infikovat hostitele spirochetami *Borrelia burgdorferi*. Pro svou práci jsem zvolila s. c. infekci kulturou borelií. Je možné myši infikovat také sáním infikovaných klíšťat nebo injekcí homogenátu z infikovaných klíšťat (Piesman 1993). Bylo prokázáno, že laboratorní zvířata infikovaná sáním nakažených klíšťat, popř. homogenátem z nakažených klíšťat, byla pro následně sající klíšťata více infekční, přičemž množství tímto způsobem infikovaných klíšťat rutinně překračovalo 80% (Piesman 1993). Důvod, proč myši infikované materiálem z nakažených klíšťat či přímo sáním nakažených klíšťat jsou pro další klíšťata, která na nich sají, více infekční, je ten, že u těchto myši chybí odpověď proti OspA proteinu (Roehrig et al. 1992). Dalším důvodem může být ovlivnění hostitele klíšťecími slinami, které zvyšují infektivitu borelií jak pro hostitele, tak pro klíšťata, která na něm sají (slinami aktivovaný přenos) (Pechová et al. 2004)

Ve svém pokusu jsem přesto zvolila infekci myši kulturou borelií, a to z toho důvodu, že jsem neměla k dispozici klíšťata definovaným způsobem nakažená boreliemi. Zvolila jsem

také poměrně nízkou dávkou borelií, která byla s. c. aplikována myším, a to pouze  $10^3$  spirochet. Nízká dávka borelií byla zvolena z toho důvodu, aby myši infekci přežily a následně ještě vydržely sání dvaceti nymf. Navíc není jisté, že pokud by byla použita vyšší infekční dávka, zvýšilo by se tím také procento nakažených klíšťat. Piesman ve své práci při infekci myši kulturou borelií použil dávku  $10^7$  spirochet a při následném sání se nakazilo pouze 28,9% klíšťat (Piesman 1993). Obávám se také, že infekce vyšší dávkou borelií by mohla organismus myši natolik oslabit, že by se tyto myši potom těžko vyrovnávaly s další zátěží, kterou představovalo sání poměrně velkého počtu použitých nymf.

## **5.2. Infekce klíšťat *Ixodes ricinus* sáním z kapiláry**

Infekce klíšťat sáním na infikovaném hostiteli je metoda poměrně časově náročná. Myši je nezbytné infikovat cca jeden měsíc před infekcí klíšťat. Navíc po umístění klíšťat na myši je téměř nemožné sledovat množství spirochet, které klíšťata nasají (Broadwater et al. 2002).

Sání z kapiláry bylo jakožto metoda umožňující nákazu klíšťat patogeny poprvé popsáno Chabaudem a následně použito také Burgdorferem (Chabaud 1950, Burgdorfer 1957). Od té doby byla tato metoda několikrát úspěšně použita k infekci klíšťat rodu *Ixodes* spirochetou *Borrelia burgdorferi* (Monin et al. 1989, Hu et al. 1992, Gern et al. 1993, Gern et al. 1994, Toutoungi et Gern 1993, Hu et al. 1996, Li et Lane 1996).

Mnou infikované nymfy sice suspenzi borelií z kapiláry nasály, nicméně ani při opakování pokusu klíšťata nebyla schopná přisátí na myš. Důvodem může být poškození sacího ústrojí při nasazování kapiláry.

## **5.3. Infekce klíšťat *Ixodes ricinus* ponořením do suspenze borelií**

Infekce klíšťat sáním z kapiláry sice podle literatury vede k nakažení klíšťat rodu *Ixodes* spirochetami *Borrelia burgdorferi* (Indest et al. 2001, Broadwater et al. 2002, Fingerle et al. 2002), jedná se ovšem o metodu poměrně technicky náročnou. Navíc je to metoda použitelná jen pro nymfální stádium a dospělé. Není použitelná pro larvy klíšťat, a to vzhledem k jejich malé velikosti. Transstadiální přenos *Borrelia burgdorferi* z larválního na nymfální stádium má přitom největší význam v infekčním cyklu této spirochety. Proto bylo nezbytné najít a optimalizovat také metodu infekce larev *Ixodes ricinus* (Zhioua et al. 1994).

Metodu infekce klíšťat ponořením do suspenze borelií poprvé použili Policastro a Schwan (Policastro et Schwan 2003). Při ponoření larev do kultury borelií o koncentraci  $10^8$  buněk/ml média získali již po 45 minutách inkubace při 32 °C 65% infikovaných klíšťat. Ve

své práci jsem zvolila delší inkubaci klíšťat v kultivačním médiu s boreliemi (ta činila 2 hodiny, také při 32 °C), přesto jsem získala klíšťata infikovaná pouze v 51,7%. Policastro a Schwan také prokázali, že již larvy ihned po infekci ponořením do suspenze borelií byly schopné tuto infekci přenést na hostitele. Tuto skutečnost se mi prokázat nepodařilo, u myši nebyly prokázány protilátky proti *Borrelia burgdorferi* a pomocí PCR nebyla prokázána ani přítomnost DNA borelií v myších orgánech.

#### **5.4. Jiné metody infekce klíšťat *Ixodes ricinus* spirochetami *Borrelia burgdorferi***

V literatuře lze nalézt ještě další metody, kterými je možné infikovat klíšťata spirochetami *Borrelia burgdorferi*. Bylo prokázáno, že klíšťata lze infikovat rektální infuzí spirochet, či jejich intracoelomickou injekcí (Pollack et al. 1991). Přestože se tímto způsobem podařilo spirochety vpravit do těla klíštěte, jejich přežití v něm a přenos do dalšího stádia byly téměř nulové, a to nejspíše z toho důvodu, že se jedná o poměrně invazivní metody a často dochází ke zranění klíštěte a k jeho úhynu. Navíc těmito metodami jsou sice borelie vpraveny do těla klíštěte, ne však do lumen střeva, kam by se dostaly při jejich nasátí.

Klíšťata je možné infikovat také sáním přes umělé membrány (Young et al. 1996, Barre et al. 1998, Burkot et al. 2001). Příprava membrán pro sání klíšťat je však jednak drahá a jednak také poměrně technicky náročná, především z důvodu jejich časté kontaminace.

#### **5.5. Schopnost infikovaných klíšťat přenést infekci na dalšího hostitele**

Ve své práci jsem se pokoušela prokázat také to, zda klíšťata v laboratorních podmínkách infikovaná spirochetami *Borrelia burgdorferi* sensu lato jsou schopná tuto infekci přenést na dalšího hostitele. Jak jsem již uvedla výše, na rozdíl od Policastro a Schwana (Policastro et Schwan 2003) jsem neprokázala, že larvy infikované ponořením do suspenze borelií by přenesly infekci na myši, na kterých se dosávaly krví, což je nezbytné pro jejich přechod do dalšího stádia. Prokázala jsem ale, že nymfy, které vznikly z těchto larev a jejichž promořenost boreliemi činila 40%, byly schopné infikovat myši C3H/N. Z důvodu nízkého počtu klíšťat toto však bylo prokázáno pouze u nymf infikovaných druhem *Borrelia afzelii*.

K zjištění, zda nakažené nymfy získané z larev infikovaných ponořením do suspenze borelií jsou schopny přenést infekci na dalšího hostitele, byly použity čtyři SPF C3H/N myši a na každou bylo nasazeno pět klíšťat. Je zajímavé, že metodou nepřímá ELISA u jedné z myši nebyla prokázána přítomnost protilátek proti *Borrelia burgdorferi*, přesto však pomocí PCR byla u této myši ve tkáni močového měchýře prokázána přítomnost boreliové DNA. To

dokazuje, že onemocnění Lymeskou borreliózou nelze vyloučit pouze na základě nepřítomnosti protilátek proti spirochetě *Borrelia burgdorferi* (Tylewska et al. 2002).

Z důvodu nízkého počtu získaných dospělců po infekci nymf sáním na infikovaném hostiteli také nebylo ověřeno, zda tito dospělci jsou schopni přenést infekci spirochetami *Borrelia burgdorferi* na SPF C3H/N myši. Piesman však takto infikovaná klíšťata používal k další infekci laboratorních zvířat (Piesman 1993).

### **5.6. Detekce *Borrelia burgdorferi* sensu lato v infikovaných klíšťatech**

Pro detekci spirochet *Borrelia burgdorferi* sensu lato v infikovaných klíšťatech jsem zvolila metodu PCR. Jedná se o metodu technicky a časově poměrně nenáročnou, navíc jsem pomocí této metody byla schopná dokázat přítomnost borelií již v množství  $10^2$ . Metoda PCR je k detekci borelií v biologických materiálech, včetně klíšťat, používána velmi často (Schwarz et al. 1997, Kahl et al. 1998). Bylo však prokázáno, že látky obsažené v krvi inhibují PCR reakci (Schwarz et al. 1997), proto jsem neprováděla detekci boreliové DNA přímo u nasátých klíšťat, ale až po jejich přechodu do dalšího stádia. Tímto jsem také prokázala transstadiální přenos borelií. Jedinou nevýhodou byla časová náročnost pokusů, jelikož přechod klíšťat z jednoho stádia do dalšího je záležitostí týdnů až měsíců.

## 6. Závěr

- Podařilo se infikovat klíšťata *Ixodes ricinus* různými druhy spirochet *Borrelia burgdorferi* sensu lato sáním na infikovaných myších.
- Nezdařilo se infikovat klíšťata spirochetami *Borrelia burgdorferi* sensu lato sáním z kapiláry.
- Podařilo se infikovat larvy *I. ricinus* ponořením do suspenze jednotlivých druhů *Borrelia burgdorferi* sensu lato.
- U nymf, které vznikly z larev infikovaných ponořením do suspenze *Borrelia afzelii*, byla prokázána schopnost přenést infekci na dalšího hostitele.
- Jako metoda detekce *Borrelia burgdorferi* sensu lato v klíšťatech byla úspěšně použita PCR.

## 7. Seznam citované literatury

- Allen, J. R.** (1973) Tick resistance: Basophils in skin reactions of resistant guinea pigs. *Int. J. Parasitol.* 3, 195-198.
- Asbrink E., Hovmark A.** (1988) Early and late cutaneous manifestations in Ixodes-borne borreliosis (Erythema migrans borreliosis, Lyme borreliosis). *Ann. NY Acad. Sci.* 539, 4 – 15.
- Balmelli, T., Piffaretti, J. C.** (1995) Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Res. Microbiol.* 146, 329-340.
- Barbour A.G.** (1984) Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.* 57, 521 – 525.
- Barbour A.G., Hayes S. F.** (1986) Biology of *Borrelia* species. *Microbiol. Rev.* 50, 381-400.
- Barre, N., Aprelon, R., Eugene, M.** (1998) Attempts to feed *Amblyomma variegatum* ticks on artificial membranes. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 849, 384-90.
- Berthold, S. W., Beck, D. S., Hansen, G. M., Terwilliger, G. A., Moody, K. D.** (1990) Lyme borreliosis in selected strains and ages of laboratory mice. *J. Infect. Dis.* 162, 133-138.
- Breitner-Rudock, S., Wurznner, R., Schulze, J., Brade, V.** (1997) Heterogeneity in the complement-dependent bacteriolysis within the species of *Borrelia burgdorferi*. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 185, 253-260.
- Broadwater, A. H., Sononshine, D. E., Hynes, W. L., Ceraul, S., de Silva, A. M.** (2002) Glass capillary tube feeding: a method for infecting nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) with the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *J. Med. Entomol.* 39, 285-292.
- Brossard, M. and Wikel, S. K.** (2004) Tick immunology. *Parasitology* (Suppl.).
- Brown, C. R. and Reiner, S. L.** (1998) Activation of natural killer cells in arthritis-susceptible but not arthritis-resistant mouse strain following *Borrelia burgdorferi* infection. *Infect. Immun.* 66, 5208-5214.
- Brown, C. R., Blaho, V. A., Loiacono, C. M.** (2003) Susceptibility to experimental Lyme arthritis correlates with KC and monocyte chemoattractant protein-1 production in joints and requires neutrophil recruitment via CXCR2. *J. Immunol.* 171, 893-901.
- Buchwald, A.** (1883) *Arch. Vierteljahrssch.* 10, 553.
- Burgdorfer, W., Barbour A.G., Hayes S.F., Henách J.L., Grunwaldt E., Davis J. P.** (1982) Lyme disease – a tick-borne spirochetosis? *Science* 216, 1317 – 1319.
- Burgdorfer, W.** (1957) Artificial feeding of Ixodid ticks for studies on the transmission of disease agents. *J. Infect. Dis.* 100, 212-214.

- Burgdorfer, W., Cage, K. L.** (1986) Susceptibility of the black-legged tick, *Ixodes scapularis*, to the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Zentralbl. Bakterios. Mikrobiol. Hyg. Ser. A* 263, 15-20.
- Burkot, T. R., Happ, C. M., Dolan, M. C., Maupin, G. O.** (2001) Infection of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) with *Borrelia burgdorferi* using a new artificial feeding technique. *J. Med. Entomol.* 38, 167-71.
- 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., Jockey, E., Gwinn, M., White, O., 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*. *Mol. Microbiol.* 35, 490-516.
- Chabaud, A. G.** (1950) Sur la nutrition artificielle des tiques. *Ann. Parasitol.* 25, 42-47.
- Champion, C. I., Blanco, D. R., Skare, J. T., Haake, D. A., Giladi, M., Foley, D., Miller, J. N., Lovett, M. A.** (1994) A 9.0-kilobase-pair circular plastid of *Borrelia burgdorferi* encodes an exported protein: evidence for expression only during infection. *Infect. Immun.* 62, 2653-2661.
- Chao L.L. et Shih C.M.**(2002) Molecular characterization of Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi* sensu lato) isolated in Taiwan by restriction length polymorphism analysis of 5S(rrf) – 23S(rrl) intergenic spacer amplicons. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 67, 504 – 510.
- Coleman, J. L., Sellati, T. J., Testa, J. E., Kew, R. R., Furie, M. B., Benach, J. L.** (1995) *Borrelia burgdorferi* binds plasminogen, resulting in enhanced penetration of endothelial monolayers. *Infect. Immun.* 63, 2478-2484.
- Dennis, D. T., Hayes, E. B.** (2002) Epidemiology of Lyme borreliosis. In: Kahl, O., Gray, J. S., Lane, R. S., Stanek, G., editors: Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control. *CABI Publishing*, Oxford, United Kingdom, 251-280.
- Donahue, J. G., Piesman, J., Spielman, A.** (1987) Reservoir competence of white-footed mice for Lyme disease spirochetes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36, 92-96.
- Dubos R.J., Hirsch J.G.** (1967) Bakteriální a mykotické infekce člověka. *Státní zdravotnické nakladatelství*, Praha, pp. 1055.
- Ferreira, B. R., Silva, J. S.** (1999) Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. *Immunology* 96, 434-439.
- Fingerle, V. Rauser, S., Hamer, B., Kahl, O., Heimerl, C., Schulte-Spechtel, U., Gern, L., Wilske, B.** (2002) Dynamics of dissemination and outer surface protein expression of different European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains in artificially infected *Ixodes ricinus* nymphs. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1456-1463.



Fraser, C. M., Casjens, S., Huang, W. M., Sutton, G. G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K. A., Dodson, R., Jockey, E. K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J. F., Fleischmann, R. D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A. R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M. D., Gocayne, J., Weidman J., Utterback, T., Wathley, L., Macdonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Garland, S., Fuji, C., Citron, M. D., Horst, K., Roberts, K., Hatch, B., Smith, H. O., Center, J. C. (1997): Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390, 580-586.

Ganapamo, F., Denis, V. A., Philips, M. T. (2003) Differential acquired immune responsiveness to bacterial lipoproteins in Lyme disease-resistant and -susceptible mouse strain. *Eur. J. Immunol.* 33, 1934-1940.

Ge Y., Li C., Corum L., Slaughter C. A., Charon N. W. (1998) Structure and expression of the FlaA periplasmic flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* 180 (9), 2418 – 2425.

Gern, L., Schaible, U. E., Simom, M. M. (1993) Mode of inoculation of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* influences infection and immune response in inbred strains of mice. *J. Infect. Dis.* 167, 971-5.

Gern, L., Rais, O., Capiou, C., Hauser, P., Lobet, Y., Simoen, E., Voet, P., Petre, J. (1994) Immunization of mice by recombinant OspA preparations and protection against *Borrelia burgdorferi* infection induced by *Ixodes ricinus* tick bites. *Immun. Lett.* 39, 249-58.

Gray, J. S. (2002) Biology of *Ixodes* species ticks in relation to tick-borne zoonoses. *Sien. Klin. Wochenschr.* 114, 473-478.

Greenwood D., Slak R. C. B., Peutherer J.F. (1999) Lékařská mikrobiologie – přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie. *Grada Publishing*, Praha, pp. 335 – 362.

Grubhoffer L., Golovchenko M., Vancová M., Zacharovová – Slavičková K., Rudenko N., Oliver Jr. J.H. (2005) Lyme borreliosis: insights into tick-host-borrelia relations. *Folia Parasitol.* 52, 279 – 294.

Hauptl, T., Hahn, G., Rittig, M., Krause, A., Schoerner, C., Schonherr, U., Kalden, J. R., Burmester, G. R. (1993) Persistence of *Borrelia burgdorferi* in ligamentous tissue from a patient with chronic Lyme borreliosis. *Arthritis Rheum.* 36, 1621-1626.

Hossain H., Wellensiek H., Zeyer R., Lochnit G. (2001) Structural analysis of glycolipids from *Borrelia burgdorferi*. *Biochemie* 83, 683 – 692.

Hu, C. M., Gern, L., Aeschlimann, A. (1992) Changes in the protein profile and antigenicity of different *Borrelia burgdorferi* strains after reintroduction to *Ixodes ricinus* ticks. *Parasite Immunol.* 14: 415-27.

Hu, C. M., Simon, M., Kramer, M. D., Gern, L. (1996) Tick factors and in vitro cultivation influence the protein profile, antigenicity and pathogenicity of a cloned *Borrelia garinii* isolate from *Ixodes ricinus* hemolymph. *Infection* 24, 251-7.

- Hubálek Z.** (2000) Mikrobiální zoonózy a saponózy. *Vydavatelství MU*, Brno.
- Hubálek, Z., Halouzka, J.** (1998) Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasitol. Res.* 84, 167-172.
- Hulínská D.** (2001) Laboratorní diagnostika, pp. 39 – 45. In Bartůněk P., Lymeská borrelióza. *Grada Publishing*, Praha.
- Indest, K. J., Howell, J. K., Jacobs, M. B., Scholl-Meecker, D., Norris, S. J., Phillip, M. T.** (2001) Analysis of *Borrelia burgdorferi* vlsE gene expression and recombination in the tick vector. *Infect. Immunol.* 69, 7083-7090.
- Jones, L. D., Davies, C. R., Steele, G. M., Nuttall, P. A.** (1987) A novel mode of arbovirus transmission involving a nonviraemic host. *Science* 237, 775-777.
- Jonsson, M., Bergstrom, S.** (1995) Transcriptional and translational regulation of the expression of the major outer surface proteins in Lyme disease *Borrelia* strains. *Microbiology* 141, 1321-1329.
- Kahl, O., Gern, L., Gray, J. S., Guy, E. C., Jongejan, F., Kirstein, F., Kurtenbach, K., Rijpkema, S. G., Stanek, G.** (1998) Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks: immunofluorescence assay versus polymerase chain reaction. *Zentralbl Bakteriol.* 287, 205-10.
- Kopecký, J., Kuthejlová, M.** (1998) Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanisms of natural immunity in vitro. *Parasite Immunol.* 20, 169-174.
- Kurtenbach K., S. De Michelis, H.S. Sesekl, S. Etti, S.M. Schafer, R. Hails, M. Collares-Pereira, M. Santos-Reis, K. Hadincová, M. Labuda, A. Bormane and M Donaghy** (2000) Distinct combinations of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies found in individual questing ticks from Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4926 – 4929.
- Li, X., Lane, R. S.** (1996) Vector competence of ixodid ticks (Acari) for *Borrelia burgdorferi* as determined with a capillary feeding method. *J. Spiro Tick Dis.* 3, 116-123.
- Liebisch, G., Sohns, B., Bajtech, W.** (1998) Detection and typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks attached to human skin by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36, 3355-3358.
- Logigian E. L., Kaplan, R. F., Steere, A. C.** (1990) Chronic neurologic manifestations of Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 323, 1438-1444.
- Ma, Y., Seiler, K.P., Eichwald, E. J., Weis, J. H., Teuscher, C., Weis, J. J.** (1998) Distinct characteristics of resistance to *Borrelia burgdorferi*-induced arthritis in C57BL/6N mice. *Infect. Immun.* 66, 161-168.
- Magnuson, H. J., Chapel Hill N. C., Eagle, H., Fleischman, R.** (1948) The minimal infectious inoculum of *Spirochaeta pallida* (Nichols strain), and a consideration of its rate of multiplication *in vivo*. *Am. J. Syph. Gonorrhoea Vener. Dis.* 32, 1-18.

- Miller, L. C., Isa, S., Vannier, E., Georgilis, K., Steere, A. C., Dinarello, C. A.** (1992) Live *Borrelia burgdorferi* preferentially activate interleukin-1 beta gene expression and protein synthesis over the interleukin-1 receptor antagonist. *J. Clin. Invest.* 90, 906-912.
- Monin, R., Gern, L., Aeschlimann, A.** (1989) A study of the different mode of transmission of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes ricinus*. *Zbl. Bakt. Suppl.* 18, 14-20.
- Montgomery, R. R., Lusitani, D., de Boisfleury Chevance, A., Malawista, S. E.** (2002) Human phagocytic cells in the early innate immune response to *Borrelia burgdorferi*. *J. Infect. Dis.* 185, 1773-1779.
- Motaleb M.A., Corum L., Bono J. L., Elias A. F., Rosa P., Samuels D. S., Charon N. W.** (2000) *Borrelia burgdorferi* periplasmic flagella have both skeletal and motility functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 20, 10899 – 10904.
- Nadelman, R. B., Wormser, G. P.** (1998) Lyme borreliosis. *Lancet* 352, 557-565.
- Oschmann P., Kraiczy P., Halperin J., Brade V.** (1999) Lyme borreliosis and tick – borne encephalitis. *UNI-MED, Bremen, Germany*, pp. 16 – 17; 20 – 25; 30 – 34; 42 – 47.
- Paine, S. H., Kemp, D. H., Allen, J. R.** (1983) *In vitro* feeding of *Dermacentor andersoni* (Stiles): effects of histamine and other mediators. *Parasitology* 86, 419-428.
- Pechová, J., Kopecký, J., Salát, J.** (2004) Effect of tick salivary gland extract on the cytokine production by mouse epidermal cells. *Folia Parasitol (Praha)* 51(4),367-72.
- Piesman, J.** (1993) Standard system for infecting ticks (Acari: Ixodidae) with the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J. Med. Entomol.* 30, 199-203.
- Policastro, P. F., Schwan, T. G.** (2003) Experimental infection of *Ixodes scapularis* larvae (Acari: Ixodidae) by immersion in low passage cultures of *Borrelia burgdorferi*. *J. Med. Entomol.* 40, 364-370.
- Pollack, R. J., Telford III, S. R., Spielman, A.** (1991) Reptal infusion and aspiration of material through the guts of ixodid ticks (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 28, 809-815.
- Postic, D., Ras, N. M., Lane, R. S., Hendson, M., Baranton, G.** (1998) Expanded diversity among California *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *J. Clin. Microbiol.* 36, 3497-3504.
- Preac-Mursic, V., Weber, K., Pfister, H. W., Wilske, B., Gross, B., BAumann, A., Prokop, J.** (1989) Survival of *Borrelia burgdorferi* in antibioticly treated patients with Lyme borreliosis. *Infection.* 17, 355-359.
- Radolf J.D., Goldberg M.S., Bourell K., Baker S. I., Jones J. D., Norgard M. V.** (1995) Characterization of outer membranes isolated from *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Infect. Immun.* 63, 2154 – 2163.

**Radolf, J. D., Arndt, L. L., Akins, D. R., Curetty, L. L., Levi, M. E., Shen, Y., Davis, L. S., Norgard, M. V.** (1995) *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and synthetic lipopeptides activate monocytes/macrophages. *J. Immunol.* 154, 2866-2877.

**Ramamoorthi, N., Narasimhan, S., Pal, U., Bao, F., Yang, X. F., Fish, D., Anguita, J., Norgard, M. V., Kantor, F. S., Anderson, J. F., Koski, R. A., Fikrig, E.** (2005) The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature* 436, 573-577.

**Ribeiro, J. M. C.** (1995) How tick make a libiny. *Parazitology today* 11, 91-93.

**Ribeiro, J. M. C.** (1987) *Ixodes dammini*: salivary anti-complement aktivity. *Exp. Parasitol.* 64, 347-353.

**Ribeiro, J. M. C., Spielman, A.** (1986) *Ixodes dammini*: salivary anaphylatoxin inactivating aktivity. *Exp. Parasitol.* 62, 292-297.

**Ribeiro, J. M. C., Weiss, J. J., Telford, III.S. R.** (1990) Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Exp. Parasitol.* 70, 382-388.

**Richter D., Schode D. B., Allgower R., Franz – Rainer Matuschka** (2004). Relationship of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6414 – 6419.

**Roehrig, J. T., Piesman, J., Hunt, A. R., Keen, M. G., Happ, C. M., Johnson, B. J. B.** (1992) The hamster immune response to tick-transmitted *Borrelia burgdorferi* differs from the response to needle-inoculated, cultured organisms. *J. Immunol.* 149(11):3648-53.

**Schaible, U. E., Gay, S., Museteanu, C., Kramer, M. D., Zimmer, G., Eichmann, K., Museteanu, U., Simon, M. M.** (1990) Lyme borreliosis in the severe combined immunodeficiency (scid) mouse manifests predominantly in the joints, heart, and liver. *Am. J. Pathol.* 137, 811-820.

**Schaible, U. E., Wallich, R., Kramer, M. D., Museteanu, C., Simon, M. M.** (1991) A mouse model for *Borrelia burgdorferi* infection: pathogenesis, immune response and protection. *Behring. Inst. Mitt.* 88, 59-67.

**Shi W., Yang Z., Geng Y., Dolinsky L. W., Lovett M. A.** (1998) Chemotaxis in *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* 180, 231 – 235.

**Schwan, T. G., Burgdorfer, W., Garon, C. F.** (1988) Changes in infectivity and plastid profile of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, as a result of *in vitro* cultivation. *Infect. Immun.* 56, 1831-1836.

**Schwan, T. G., Piesman, J., Golde, W. T., Dolan, M. C., Rosa, P. A.** (1995) Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2909-2913.

**Schwartz, I., Varde, S., Nadelman, R. B., Wormser, G. P., Fish, D.** (1997) Inhibition of efficient polymerase chain reaction amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in blood-fed ticks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56, 339-42.

**Stanek G.** (2004) Biology of *Borrelia* and epidemiology of disease. *14th European Congress of Clinical Mikrobiology and Infectious Diseases*, Praha, May 1 – 4.

**Steere A.C., Malawista S.E., Snyderman D.R., Shope R.E., Andiman W.A., Ross M.R., Steele F.M.** (1977) Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum.* 20, 7 – 17.

**Steere A.C., Coburn J., Glickstein L.** (2004) The emergence of Lyme disease. *Clin Infect.* 113, 1093 – 1101.

**Steere, A. C., Schoen, R. T., Taylor, E.** (1987) The clinical evolution of Lyme arthritis. *Ann. Intern. Med.* 107, 725-731.

**Takayama K., Rothenberg R.J., Barbour A.G.** (1987) Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 55, 2311 – 2313.

**Tortora G.J., Funke B.R., Case Ch.L.** (2001) Mikrobiology: an introduction. *Benjamin Cummings*.

**Toutoungi, N. L., Gern, L.** (1993) Ability of transovarially and subsequent transstadially infected *Ixodes hexagonus* ticks to maintain and transit *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. *Exp. Appl. Acarol.* 17, 581-6.

**Tylewska, Wierzbanska, S., Chmielewski T.** (2002) Limitation of serologic trstiny for Lyme borreliosis: evaluation of ELISA and Western blot in comparison with PCR and culture methods. *Wien Klin. Wochenschr.* 114, 601 – 605.

**Valenzuela, J. G.** (2004) Exploring tick saliva: from biochemistry to 'sialomes' and functional genomics. *Parasitology* 129 Suppl:S83-94. Review.

**Wallich R., Moter S.E., Simon M.M., Ebnet K., Heiberger A., Frajer M.D.** (1990) The *Borrelia burgdorferi* flagellum-associated 41-kilodalton antigen (flagellin): molecular cloning, expression, and amplification of the gene. *Infect. Immun.* 58, 1711 – 1719.

**Wikel, S. K.** (1996) Host immunity to ticks. *Ann. Rev. Entomol.* 41, 1-22.

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

**Woese C.R.** (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221 – 271.

**Wormser, G. P., Nadelman, R. B., Dattwyler, R. J., Dennis, D. T., Shapiro, E. D., Steere, A. C., Rush, T. J., Rahn, D. W., Coyle, P. K., Persing, D. H., Fish, D., Luft, B. J.** (2000) Practice guidelines for the treatment of Lyme disease. The Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 31 Suppl. 1, 1-14.

**Young, A. S., Waladde, S. M., Morzaria, S. P.** (1996) Artificial feeding systéme for ixodid ticks as a tool for study of pathogen transmission. *Ann. NY. Acad. Sci.* 791, 211-218.

**Zeidner, N., Mbow, L. M., Dolan, M., Massung, R., Baca, E., Piesman, J.** (1997) Effects of *Ixodes scapularis* and *Borrelia burgdorferi* on modulation of the host immune response: Induction of a TH2 cytokine response in Lyme disease-susceptible (C3H/HeJ) mice but not in disease-resistant (BALB/c) mice. *Infect. Immun.* 65, 3100-3106.

**Zhang, J. R., Norris, S. J.** (1998) Kinetics and in vivo induction of genetic variation of *vlsE* in *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 66, 3689-3697.

**Zhioua, E., Aeschlimann, A., Gern, L.** (1994) Infection of field-collected *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) larva with *Borrelia burgdorferi* in Switzerland. *J. Med. Entomol.* 31, 763-766.

## 8. Seznam použitých zkratek

16S rRNA	ribosomální RNA o velikosti 16 Svedbergových jednotek
AV ČR	Akademie věd České republiky
BbsI	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato
Bbss	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto
bp	base pair, páry bází (jednotka délky úseku DNA)
BSK-H	Barbour-Stoenner-Kelly-H médium
C3H/N	označení kmene myši
CB 53	označení kmene <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto
DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
kDa	kilodalton, jednotka velikosti proteinu
LB	Lymeská borrelióza
OspA	outer surface protein A, vnější povrchový protein A
OspB	outer surface protein B, vnější povrchový protein B
OspC	outer surface protein C, vnější povrchový protein C
PBS	phosphate-buffered saline, fosfáty pufovaný fyziologický roztok
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
SAT	saliva-activated transmission, slinami aktivovaný přenos
s. c.	sub cutaneous, podkožní aplikace
SPF	specific pathogen free, označení laboratorních zvířat bez určitých patogenů
TAE	TRIS-acetátový-EDTA pufr
Taq	označení polymerázy z bakterie <i>Thermus aquaticus</i>