

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
JIHOČESKÉ UNIVERZITY V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**



**MERODY PURIFIKACE SPIROCHÉT LYMESKÉ
BORELIÓZY – *BORRELIA BURGDORFERI* SENSU LATO**

Bakalářská práce 2010

Autor: Markéta Hejníková

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

Hejníková M., 2010: Metody purifikace spirochét Lymeské boreliózy – *Borrelia burgdorferi sensu lato*. [Methods of purification Lyme of diseases spirochete – *Borrelia burgdorferi sensu lato*. BSc. Thesis in Czech] – 37 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This study deals with various methods purification of spirochetes from *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex. Limiting dilutions and growth on solid agar were used for obtaining pure culture that grew out from one cell only. *Borrelia* cultures also contained contaminating bacteria which were resistant to commonly used antibiotics. For elimination of this bacteria other antibiotics and their combinations were used. Furthermore, mouse bodies were used for gaining pure culture and zero passage of *borrelia*.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 12.1.2010

.....

Markéta Hejníková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Doc. RNDr. Janu Kopeckému, CSc za poskytnutí tématu bakalářské práce a možnosti pracovat pod jeho vedením. Bc. Veronice Slavíkové za odbornou pomoc a rady a v neposlední řadě celému osazenstvu laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí a ochotu vždy pomoci. Velký dík patří RNDr. Heleně Horké za asistenci a pomoc při pokusech. Chtěla bych také poděkovat své rodině za podporu a trpělivost.

Obsah

1. Úvod	6
2. Teoretický přehled	7
2.1. Spirochéty	7
2.2. Rod <i>Borrelia</i>	7
2.2.1. Obecná charakteristika	7
2.2.2. Borelie jako patogenní organismus	8
2.2.3. <i>Borrelia burgdorferi</i>	9
2.2.4. Přírodní cyklus <i>B. burgdorferi</i> a její antigenní vlastnosti	9
2.3. Lymeská borelióza	11
2.3.1. Historie	12
2.3.2. Imunita	12
2.3.3. Klinické projevy	13
2.3.4. Léčba a prevence	13
3. Cíle práce	15
4. Materiál a metody	16
4.1. Purifikace borelií limitním ředěním	16
4.1.1. Potřebné chemikálie	16
4.1.2. Postup	16
4.1.2.1. Izolace DNA v bodech	17
4.1.2.2. PCR (polymerázová řetězová reakce)	17
4.1.2.3. Gelová elektroforéza v bodech	19
4.2. Purifikace borelií pomocí izolace z infikovaných myší	19
4.2.1. Potřebný materiál	19
4.2.2. Pracovní postup	20
4.3. Purifikace borelií pomocí antibiotik	20
4.3.1. Potřebný materiál	20
4.3.2. Pracovní postup	21
4.4. Purifikace borelií na agaru	22
4.4.1. Potřebný materiál	22
4.4.2. Pracovní postup	22
4.4.2.1. Pokus č. 1	22

4.4.2.2. Pokus č. 2	23
5. Výsledky	24
5.1. Purifikace borelií limitní ředěním	24
5.2. Purifikace borelií pomocí izolace z infikovaných myší	25
5.3. Purifikace borelií pomocí antibiotik	26
5.4. Purifikace borelií na agaru	29
6. Diskuze	30
7. Závěr	32
8. Použitá literatura	33

1. Úvod

Lymeská borelióza trápí lidstvo severní polokoule už od nepaměti. Vědci se desítky let snaží vyvinout účinnou vakcínu proti etiologickému agens *Borrelia burgdorferi*, ale doposud nebyli příliš úspěšní. Práci jim do značné míry komplikuje množství druhů náležících k *B. burgdorferi* a jejich ohromná antigenní variabilita. Obrovským problémem může být i případná kontaminace jinými druhy bakterií, jako se tomu stalo u izolátů z českobudějovických klíšťat. Kontaminace může do značné míry ovlivnit průběh a výsledky pokusů, a proto je důležité ji nějakým způsobem odstranit. Bohužel, ne vždy pomohou antibiotika, běžně používaná pro tento účel. Ve své práci se proto zabývám různými metodami a postupy, které vedou jak k odstranění nežádoucí kontaminace, tak k získání čisté homogenní kultury borelií.

2. Teoretický přehled

2.1. Spirochéty

Spirochéty jsou jemné spirálovité bakterie dosahující délky až 500 μm . Množí se příčným dělením a běžnými bakteriologickými technikami se nebarví. K této skupině bakterií náleží tři rody: *Treponema*, *Leptospira* a *Borrelia*. Všechny tři rody zahrnují kromě neškodných druhů i druhy vysoce patogenní pro člověka. (Bednář et al., 1996). V buněčné stěně spirochét je umístěno tzv. osově vlákno, které dává buňce charakteristický tvar a zároveň svými kontrakcemi umožňuje bakteriím vývrtkovitý pohyb.

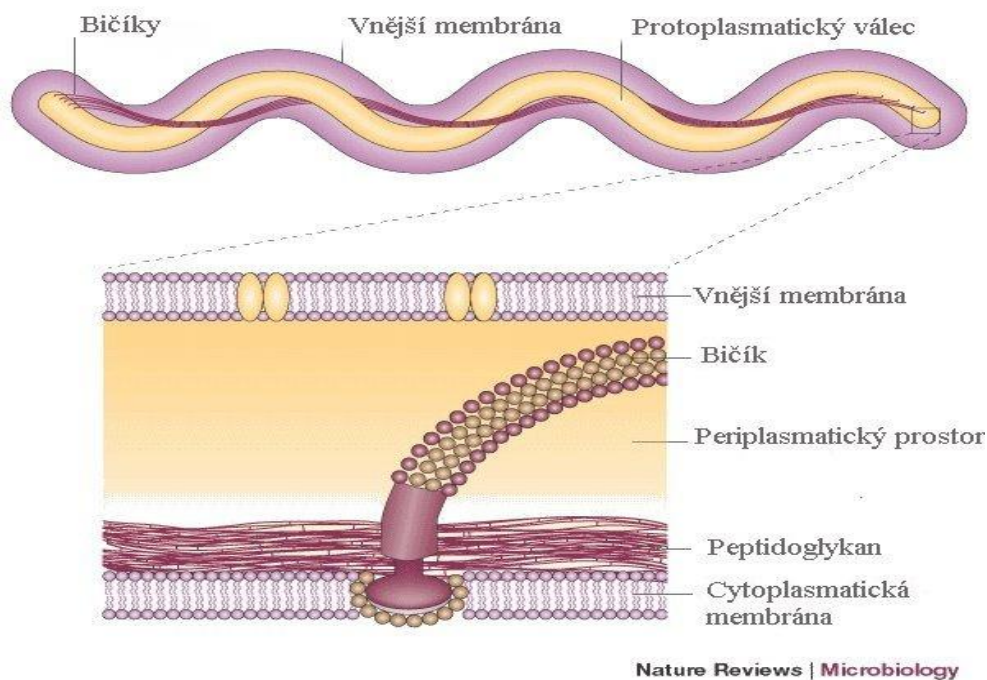
2.2. Rod *Borrelia*

2.2.1. Obecná charakteristika

Rod *Borrelia* se řadí do třídy *Spirochaetes*, řádu *Spirochaetales*, čeledi *Spirochaetaceae*. Jsou to spirálovité 0,2 až 0,5 μm široké a 10 až 30 μm dlouhé bakterie, pohybující se pomocí 7 až 30 axiálních bičíků ukotvených v periplazmatickém prostoru na obou koncích buňky. (Barbour et al., 1986). Bičíky obtácejí tělo borelie pod buněčnou stěnou a ovlivňují tak její tvar.

Jsou chemoorganotrofní, mikroaerofilní, špatně se barví dle Grama, účinnější je barvení Giemsovou technikou. Kultivace borelií *in vitro* je velmi náročná. Nevytváří vlastní enzymy pro syntézu aminokyselin, mastných kyselin ani nukleotidů. Veškeré tyto látky získávají ze svého hostitele, a proto vyžadují komplexní živné půdy s dostatkem glukózy, vitamínů, bovinního albuminu a králíčího séra, které zajistí přísun již zmiňovaných, aminokyselin a mastných kyselin. (Nazario et al., 1998).

Borelie mají poměrně dlouhou generační dobu: 12-20 hodin a optimální růstovou teplotu 30-37°C. Dělí se příčným nebo podélným zaškrfováním a mateřská buňka ztrácí polovinu bičíků (Barbour et al., 1986). Živé je můžeme pozorovat v temném poli optického mikroskopu nebo ve fázovém kontrastním mikroskopu. (Aguero-Rosenfeld et al., 2005).



Obrázek 1: Schéma borelie a ukotvení jejího bičíku
(Zdroj: Rosa et. al., 2005)

2.2.2. Borelie jako patogenní mikroorganismus

K rodu *Borrelia* náleží asi 33 druhů borelií (www.bacterio.cict.fr/b/borrelia.html), ale jen některé z nich jsou pro člověka patogenní. Takovéto druhy můžeme z klinického hlediska rozdělit do dvou skupin. První tvoří borelie způsobující návratné horečky (relapsing fever borreliae), druhou pak borelie se vztahem k Lymeské borelióze (Lyme disease borreliae) (Felsenfeld, 1965).

Návratná horečka neboli vratný tyfus je velice závažné onemocnění, které může vést až ke smrti postiženého. Epidemický vratný tyfus (louse-borne relapsing fever) má svého původce v bakterii jménem *Borrelia recurrentis*, jejímž hostitelem je výhradně člověk. Borelie je přenášena vši šatní (*Pediculus humanus*). V současné době se objevuje pouze v severovýchodní a střední Africe, kde se veš stále hojně vyskytuje (Porcella et al., 2000). Endemický vratný tyfus (tick-borne relapsing fever) je dalším typem návratné horečky. Nejméně patnáct druhů borelií (*Borrelia hermsii*, *Borrelia parkeri*, *Borrelia turicatae*, *Borrelia persica*, *Borrelia duttoni*, *Borrelia hispanica* a další) způsobujících toto onemocnění je přenášeno klíšťaty rodu *Ornithodoros* v subtropické a tropické oblasti světa. Bakterie pronikají do všech tkání klíšťáka, proto infekci mohou způsobit i jeho exkrementy. Primárním zdrojem těchto borelií jsou

převážně hlodavci, psovitě šelmy a jiní divoče žijící savci a dokonce i někteří plazi (Felsenfeld, 1965).

2.2.3. *Borrelia burgdorferi*

Borelie se vztahem k Lymeské borelióze tvoří komplex asi třinácti druhů (genospecies), souhrnně nazvaných *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Je možné, že toto číslo není dosud konečné. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* a nedávno přiřazená *Borrelia spielmani* jsou prokazatelně doloženy jako původci Lymeské boreliózy. U druhů *B. japonica*, *B. andersonii*, *B. sinica*, *B. turdi*, *B. tanukii* a *B. californiensis* patogenita není doposud prokázána, ale v současné době se předpokládá, že i druhy *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* a *B. bissetii* mají co do činění s Lymeskou chorobou. (Steere, 2004; Postic et al., 2007; Richter et al., 2004; Wang et al., 1999; van Dam, 1993; Richter et al., 2006).

Borrelia burgdorferi byla poprvé náhodně izolována z nymfálního stádia klíštěte *Ixodes dammini* (nyní *Ixodes scapularis*) v roce 1982 doktorem Willy Burgdorferem a jeho kolegy ve Spojených státech (Burgdorfer et al., 1982). Tato, do té doby neznámá bakterie, byla později vykultivována i z pacienta s počínající Lymeskou nemocí a jeho imunitní odpověď byla přesvědčivě spojena se spirochetálním původem infekce (Steere et al., 2004). V době objevení spirochéty se mělo zato, že se jedná pouze o jediný druh. Postupem času, se zdokonalováním laboratorních technik, byla však *B. burgdorferi* rozdělena na více, již výše zmíněných, druhů.

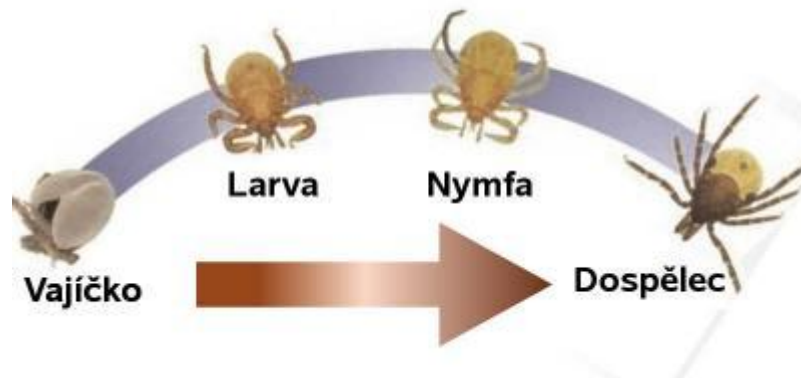
Borrelia burgdorferi je výjimečná svým genomem. Vlastní jeden lineární chromozom o velikosti 910 725 bp a devět cirkulárních a dvanáct lineárních plasmidů o celkové velikosti 610 694 bp. Dlouhodobá kultivace *in vitro* má za následek ztrátu některých plasmidů, tudíž i změnu proteinové exprese a ztrátu schopnosti infikovat pokusná zvířata. Z toho lze usuzovat, že plasmidy kódují proteiny, hrající důležitou úlohu při virulenci (Fraser et al., 1997).

2.2.4. Přírodní cyklus *B. burgdorferi* a její antigenní vlastnosti

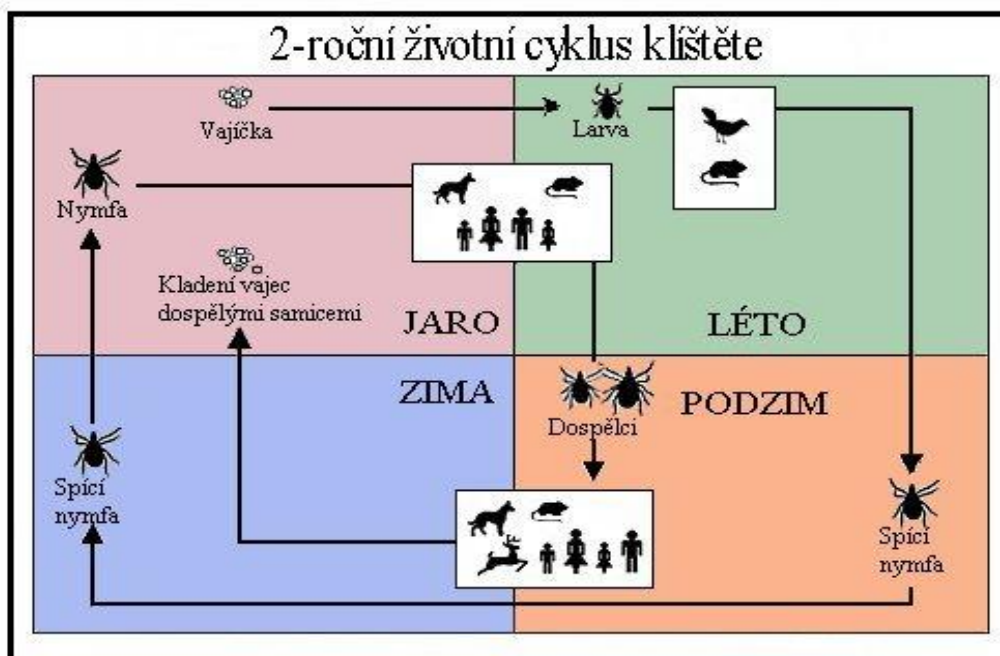
Nejrozšířenějším vektorem přenášejícím *B. burgdorferi* na člověka a jiné savce jsou klíšťata druhu *Ixodes dammini*, *I. pacificus*, *I. scapularis* v Severní americe a *I. ricinus* a *I. persulcatus* v Euroasii. Rezervoárem těchto bakterií v přírodě jsou převážně hlodavci a v malé míře i ptáci (Wilske et al., 1993). Klíšťata jsou schopna šířit bakterie díky svému komplexnímu životnímu cyklu, kdy projdou postupným vývojem od

vajíčka, přes larvu a nymfu, až po dospělého jedince - imago (Nazario et al., 1998). Relativně krátká parazitická fáze, během které dochází k sání, je střídána dlouhou neparazitickou fází bez přístupu k potravě a tekutinám. Každé vývojové stádium klíštěte saje pouze jednou a pokaždé na jiném hostiteli (Knülle et al., 1982). Nepatrná larva si vybírá pro svou obživu převážně drobné hlodavce zatím co dospělec vyšší živočichy včetně člověka. Hostitelova krev zajišťuje růst a vývoj nedospělých klíšťat a produkci vajíček dospělými samicemi (Diehl et al., 1982).

Pro borelie je životně důležité vyvinout mechanismus, který jim umožní překonat imunitní odpověď klíštěte, pro usídlení se v jeho zažívacím traktu a následné vycestování skrz slinné žlázy až do hostitele a samozřejmě musí být schopny hostitelský organismus kolonizovat. K tomu jim slouží povrchové proteiny nazvané Outer surface proteins (Osp), jejichž exprese se různě mění jak v závislosti na životním cyklu klíštěte, tak samotných borelií. Během podzimu, zimy a předjaří přežívají borelie v zažívacím traktu klíštěcích nymf v nečinném stavu. V tomto období exprimují zejména proteiny OspA a OspB, které zde plní funkci adhezivních molekul. Když se klíště koncem jara začne krmit, exprese proteinů se mění. Produkce OspA se snižuje a zvyšuje se exprese OspC, který je nutný pro infikování savčího hostitele (Steere et al., 2004). Borelie musí během sání klíštěte vycestovat ze střeva do hemolymfy, slinných žláz a nakonec do hostitele (Piesman et al., 2002). Napomáhá jim k tomu schopnost vázat savčí plasminogen a jeho aktivátory z nasáté krve savců a tím usnadní rozšiřování spirochét uvnitř klíštěte. Po vycestování ze střevního lumen do slinných žláz převládá ještě exprese OspC, ale některé druhy borelií produkují pouze OspE a OspF, exprese OspA a OspB již chybí (Steere et al., 2004). Během diseminace spirochét do hostitele se objevuje protein VlsE, vyznačující se vysokou antigenní variabilitou. Jeho expresí borelie aktivně omezuje působení rozvíjející se imunitní odpovědi hostitelského organismu a umožní přechod do chronické fáze infekce. V těle teplokrevných savců exprimují další proteiny OspE a OspF, které váží H-faktor zapojený do regulace aktivace komplementové kaskády. V pozdní fázi infekce se na povrchu borelií opět objevují OspA a OspB (Křupka et al., 2008).



Obrázek 2: Vývojová stádia klíštěte
(zdroj: www.kliste.cz)



Obrázek 3: Životní cyklus klíšťat
(zdroj: <http://newenglandtickandmosquito.com>)

2.3. Lymeská borelióza

Lymeská choroba, jak je také nazývána, je multisytémové onemocnění začínající v místě přisátí klíštěte a postupující z lokalizované kožní vyrážky - *erythema migrans* - do rozličných orgánových systémů (Sellek et al., 2002). Své jméno získala díky městu Old Lyme, kde jako první započal důkladný výzkum typických příznaků onemocnění.

2.3.1. Historie

Když byly v Connecticutu v USA pozorovány první případy stavu, nyní známého jako Lymeská borelióza, bylo to až dlouhých devadesát dva let poté, co Alfred Buchwald v Evropě popsal chronickou kožní poruchu, později nazvanou *acrodermatitis chronica atrophicans*. V roce 1909 Arvid Afzelius představil Stockholmskému dermatologickému sdružení pacienta s pomalu expandující kožní lézí, kterou nazval *erythema migrans*. O několik let později, v roce 1923, vídeňský dermatolog Benjamin Lipschütz naznačil, že pozornost a výzkum by měly být směřovány k bakteriálnímu vyšetření zažívacího traktu a sekretu slinných žláz klišťat. Avšak v Evropě nikdo jeho myšlenku nenásledoval (Stanek et al., 2002). Zlom nastal v roce 1975 v USA, kdy matky z Old Lyme a dvou sousedních měst oznámily nezvykle vysoký počet případů vzácné juvenilní artritidy u dětí žijících blízko sebe. Příčinu přijeli objasnit experti z Yalské university v čele s Alanem Steereem. Do léta 1976 napočítali 39 dětí a 12 dospělých u kterých artritida byla doprovázena různými klinickými projevy, jako horečka, bolest hlavy, únava, bolest svalů a vyrážka (Monzoe, 2001; Sternbach et al., 1996). Steere a kolegové, nevědomí si předchozích svědectví v Evropě, usoudili, že lidé trpí novou, dosud neznámou nemocí a nazvali ji Lymeská artritida. Další podrobný výzkum objevil u pacientů nejen rozvoj artritidy, ale u některých také neurologické a kardiální abnormality. Tudíž byl rozpoznán komplex multisystémových poruch organismu a jméno Lymeská artritida bylo změněno na Lymeská choroba (Stanek et al., 2002).

2.3.2. Imunita

V průběhu onemocnění je prokazatelná významná proliferace T buněk v periferní krvi, v mozkomíšním moku a v kloubní dutině. Protilátková odpověď se rozvíjí v relativně krátké době. Za 1-3 týdny je prokazatelná tvorba IgM globulinů proti bičíkovému antigenu borelií. Sekrece IgG proti nejméně jedenácti různým antigenům nastává o 2-4 týdny později a může přetrvávat měsíce až roky i bez vazby na další klinický vývoj onemocnění. Specifické protilátky bohužel nemají ochranný charakter a v některých případech nejsou prokázány vůbec. (Bednář et al., 1996; Bartůněk et al., 2006).

2.3.3. Klinické projevy

Obecně rozdělujeme projevy Lymeské boreliózy na tři fáze, i když ne vždy proběhnou všechny. Klinické projevy jsou různé v odlišných částech světa a liší se i mezi jednotlivci. Tyto rozdíly jsou zapříčiněny existencí více druhů borelií způsobujících Lymeskou chorobu.

Nejlepším ukazatelem první fáze (časná lokalizovaná infekce) je červená skvrna v místě přisátí klíštěte se světlým středem (*erithema chronicum migrans*). Může být lokalizována kdekoli na těle 7 - 30 dnů po proniknutí bakterie do organismu. Nejběžněji však na stehně, slabinách a v podpaždí. Některé postižené navíc doprovází malátnost a únava, bolest hlavy, horečka, zimnice a zvětšení uzlin (lymfadenopatie).

Druhá fáze (časná diseminovaná infekce) se rozvíjí během několika týdnů až měsíců. Borelie jsou diseminovány do rozličných částí těla. Zasažena může být nervová soustava a postupně začne vykazovat jednotlivé projevy meningitidy, encefalitidy, chori a neuritidy. Nejčastějším projevem je však artritida, charakteristická vracejícím se otokem a bolestí, postihující zejména velké klouby, jako je například kloub kolení. Vzácně bývá zasažen i kardiovaskulární systém. Dostávají se příznaky infarktu a poruchy srdečního rytmu.

Třetí fáze (pozdní diseminovaná infekce) nastupuje během několika měsíců až let po vypuknutí infekce. Znova se objevují výše popsané příznaky, ale přecházejí do chronického stavu. Nastává nevratné postižení kloubů erozí, nervovou tkáň postihuje těžká diseminovaná encefalitida a kůži zarudlé léze nazývané chronická atrofická akrodermatitida (Farmakoterapeutické informace, 4/2006; Steere et al., 1984; Rahn et al., 1991;).

2.3.4. Léčba a prevence

Je velmi důležité chorobu včas a správně diagnostikovat, protože zahájení léčby v prvním stádiu má velice dobré výsledky. Volba vhodných antibiotik se odvíjí od věku pacienta, druhu postižení a stádia infekce. V tabulce 1 jsou uvedena běžně používaná antibiotika na různé klinické projevy Lymeské choroby. Jestliže chceme předcházet nákaze, naší jedinou možností je chránit se před přisátím klíštěte nebo sající klíštěte ihned odstranit a postižené místo ošetřit dezinfekčním prostředkem na bázi jódu. Tím snížíme riziko propuknutí choroby na minimum, protože přenos borelií z klíštěte trvá zřejmě více než 24 hodin.

Bohužel účinná vakcína v Evropě pro člověka v současné době neexistuje. Důvodem je vícero etiologických agens a obrovská variabilita jejich povrchových antigenů. Naopak v USA se sice podařilo vyvinout vakcínu proti *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, založenou na použití rekombinantního OspA, ale v roce 2002 byla stažena z trhu. Důvodem byla příliš vysoká cena jedné dávky a obavy z vedlejších účinků. Tento druh borelie se v Evropě vyskytuje pouze minoritně, proto by vakcína na našem území nebyla účinná (Křupka et al., 2008; Bartůněk et al., 2006, Krbková, 2007).

Erythema migrans, erythema migrans multiple, boreliový lymfocytom		
Antibiotikum	Dávkování a způsob podání	Délka terapie
penicilin (phenoxymethylpenicilin, penicilin G, prokain)	3x 1 – 1,5 mil IU p.o. 2x 1,5 mil IU i.m.	14 dní (10 – 21 dní)
doxycyklin	2x 100mg p.o.	14 dní (10 – 21 dní)
azithromycin	2x 500mg p.o. 1x 500mg p.o.	1. den další 4 dny
amoxicilin	3x 500 – 1000mg p.o.	14 dní (10 – 21 dní)
cefuroxim axetil	2x 500 – 1000mg p.o.	14 dní (10 – 21 dní)
Boreliový lymfocytom (děti)		
penicilin	0,1 – 0,6 mil IU/kg/den 3 – 4x denně p.o., 1x denně i.m.	21 – 28 dní
ceftriaxon	50 – 100mg/kg/den 1x denně i.m.	14 dní (10 – 21 dní)
Neuroborelióza		
ceftriaxon	1x 2g i.v.	14 – 21 dní
cefotaxim	3x 1g i.v.	14 – 21 dní
penicilin G (benzylpenicilin)	4x 5mil IU i.v.	14 – 21 dní
Izolovaná paréza n. facialis boreliové etiologie		
doxycyklin	2x 100 mg p.o.	21 dní (14 – 30)
amoxicilin	3x 500 – 1000mg p.o.	21 dní (14 – 30)
Lymeská artritida a karditida, acrodermatitis chronica atrophicans		
doxycyklin	2x 100mg p.o.	21 dní (14 – 30)
amoxicilin	3x 500 – 1000mg p.o.	21 dní (14 – 30)
ceftriaxon	1x 2g i.v.	21 dní (14 – 30)

Tabulka 1: klinická forma Lymeské boreliózy a doporučená antibiotika

(zdroj: Lymeská borelióza, MUDr. Lenka Krbková, CSc., Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně, Klinika dětských infekčních nemocí, FN Brno-Bohunice)

3. Cíle práce

- 1.** Purifikace borelií limitním ředěním
- 2.** Purifikace borelií pomocí izolace z infikovaných myší
- 3.** Purifikace borelií pomocí antibiotik
- 4.** Purifikace borelií na agaru

4. Materiál a metody

Borelie

Pro všechny pokusy, pokud nebude popsáno jinak, byly borelie kultivovány standardním způsobem. Inokulum boreliové kultury bylo přeneseno do 5ml tekutého BSK-H média s 1% směsí antibiotik pro borelie (SIGMA) a ponecháno v termostatu při 34 °C 4-5 dní. Následně byly borelie spočítány dle Magnusona (Magnuson, 1948). Na podložní sklo bylo odpipetováno 3,5μl boreliové suspenze, překryto krycím sklem o rozměrech 1,8 x 1,8 cm a spočítáno 20 zorných polí v temném poli optického mikroskopu při zvětšení 400x. Výsledný počet borelií v 1ml byl vypočítán podle vzorce, který vznikl odvozením od vzorce Magnusonova:

$$\text{počet bor./ml} = a * 7,7 * 10^5$$

a zde znamená průměrný počet borelií ze 20ti zorných polí.

4.1. Purifikace borelií limitním ředěním

Tato metoda je vhodná pro získání čisté boreliové kultury ze směsi více druhů. Zde byl použit českobudějovický kmen borelií CB53 (*Borrelia burgdorferi* sensu stricto), který byl kontaminován kmenem CB61 (*Borrelia garinii*).

4.1.1. Potřebné chemikálie:

BSK-H médium (SIGMA), antibiotika pro borelie (SIGMA), 10x TAE pufr, agaróza (Amresco), polymeráza Taq-500 (rEcoli), nukleotidy dNTP mixture (TAKARA), kit pro přípravu DNA High Pure PCR Template (ROCHE), deionizovaná voda, primery (Generi Biotech), ethidium bromid (EtBr) (Top-Bio), zatěžkávací pufr (Fermentas), DNA marker (Fermentas).

4.1.2. Postup:

1. Nejprve bylo nutné připravit si suspenzi borelií CB53 o koncentraci 20 borelií/ml.
2. Z takto připravené suspenze bylo postupně odebíráno 50μl (teoreticky by tedy každých 50 μl mělo obsahovat pouze jednu borelii) a přenášeno postupně do padesáti mikrozkuvek o objemu 500μl a doplněno 450 μl BSK-H média s antibiotiky.

- Po kultivaci byla ve všech mikrozkušavkách hodnocena přítomnost borelií a kontaminace: pasterovou pipetou bylo kápnuto na podložní sklo malé množství obsahu mikrozkušavky, přikryto krycím sklíčkem a zkontrolováno v temném poli optického mikroskopu. Pro další postup byly vybrány ty mikrozkušavky, které obsahovaly narostlé borelie a od pohledu žádné, nebo jen malé množství kontaminace.
- Jejich obsah byl přenesen do asi 5ml BSK-H média s antibiotiky a opět kultivován.
- Dále následovala izolace DNA pomocí komerčního kitu High Pure PCR Template a PCR (polymerázová řetězová reakce), kterou byla ověřena čistota kultury.
- Čisté kultury byly zamraženy na -75°C .

4.1.2.1. Izolace DNA v bodech:

- 1ml narostlé boreliové kultury byl stočen 30 minut při 13000 rpm
- Supernatant byl opatrně odlit a do peletu bylo přidáno 200 μl lyzačního pufru T1 (z kitu) a 40 μl proteinázy (20 mg/ml - lyofilizovaná z kitu). Obsah byl dobře promíchán a mikrozkušavka ponechána v bloku předehřátém na 56°C po dobu 30 minut.
- Bylo přidáno 200 μl pufru T2, vše promícháno a dáno do bloku, tentokrát po dobu 10 minut při 70°C .
- Byl přidán 96% ethanol, vše promícháno a přeneseno do kolonky, ta byla nasazena na jímací zkumavku a dána centrifugovat při 10000 rpm na 1 minutu.
- Kolonka byla přenesena do nové jímací zkumavky a bylo přidáno 500 μl pufru TX opět centrifugace při 10000 rpm po dobu 1minuty.
- Kolonka byla znovu přenesena na čistou jímací zkumavku a bylo přidáno 500 μl pufru T3, byla provedena centrifugace při 13000 rpm 3 minuty, filtrát byl vylit do Persterilu (desinfekce) a kolonka vrácena na jímací zkumavku.
- Kolonka byla stočena 2 minuty nasucho při 13000 rpm.
- Kolonka byla přendána na zkumavku. Pipetou bylo do středu kolonky přidáno 200 μl pufru T5 vytemperovaného na 50°C , 1 minutu necháno stát a pak centrifugováno při 8000 rpm 1 minutu.
- Část finálního produktu byla použita pro PCR a část byla zamražena na -80°C pro případné pozdější použití.

4.1.2.2. PCR (polymerázová řetězová reakce)

Veškerá příprava vzorků probíhala na ledu a co možná nejrychlejším způsobem. Pro jednotlivé reakce byly použity malé zkumavky pro PCR. Primery (viz. tabulka 3) ze

zásobního roztoku o koncentraci 0,1mM byly naředěny 10x a byly připraveny čtyři různé Master Mixy, každý s jinou dvojicí primerů. Celkový objem reakční směsi jedné reakce byl 20 μ l. Složky Master Mixu pro jednu reakci jsou uvedeny v tabulce 2.

deionizovaná H ₂ O	12,3 μ l
10x reakční Taq pufr	2 μ l
nukleotidy 10mM	1,6 μ l
primery 0,01mM	1 μ l + 1 μ l
Taq polymeráza 5U/ μ l	0,1 μ l
vzorek DNA	2 μ l

Tabulka 2: Složky Master Mixu pro 1 reakci

Druh <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	Primer	Sekvence	T _m °C	Borelie pro pozitivní kontrolu
<i>Bb sensu lato</i>	BBsLF	5'-ACG CTG GCA GTG CGT CTT AA-3'	55	jakýkoli kmen
	BBsLR	5'-CTG ATA TCA ACA GAT TCC ACC C-3'	55	
<i>Bb sensu stricto</i>	BBssF	5'-AAC AAA GAC GGC AAG TAC GAT CTA ATT-3'	55	kmen CB53
	BBssR	5'-TTA CAG TAA TTG TTA AAG TTG AAG TGC C-3'	55	
<i>B.garinii</i>	MC33+	5'-CTA ACC GCA CTA ACA GCA GCA AT-3'	55	kmen CB61
	MC33-	5'-AGT TTT CAT TAG CAG CAA-3'	55	
<i>B. afzelii</i>	GIIF	5'-TAA AGA CAA AAC ATC AAC AGA TGA AAT C-3'	55	kmen CB43
	GIIR	5'-TTC CAA TGT TAC TTT ATC ATT AGC TAC TT-3'	55	

Tabulka 3: Použité primery pro PCR, jejich sekvence, teplota při annealingu **T_m** a kmen borelií použitý pro pozitivní kontrolu.

Pro každý primer byla připravena i negativní a pozitivní kontrola. V případě negativní kontroly byly do směsi místo vzorku DNA přidány 2 μ l deionizované vody a u pozitivní kontroly 2 μ l DNA izolované z předem známých kmenů borelií. Zkumavky byly dobře

promíchány a vloženy do termocycleru UNO II (Biometra). Teploty v cycleru byly nastaveny takto:

1. počáteční denaturace.....94°C 5 minut
2. denaturace pro každý cyklus.....94°C 30 sekund
3. nasednutí primerů (annealing).....55°C 45sekund
4. syntéza vláken DNA (extension).....72°C 1 minutu
5. konečná syntéza.....72°C 7 minutu

Krok 2 - 5 byl zopakován v 35 cyklech. Po dokončení amplifikace (namnožení) úseku DNA byla provedena detekce produktů na agarózovém gelu pomocí elektroforézy.

4.1.2.3. Gelová elektroforéza v bodech:

1. 10x TAE pufr (24,23 g TRIS, 5,706 ml 99% kys. octové, 1,86g EDTA-Na₂, 500 ml H₂O) byl naředěn na 1x TAE. Z 1g agarózy a 100 ml 1x TAE pufru byl připraven 1% gel, do kterého ještě před zatuhnutím byly vmíchány cca 2 μ l EtBr.
2. 1x TAE pufr byl také nalit do elektroforézní komůrky, která obsahovala ztuhlý gel.
3. Ke každému produktu PCR bylo přidáno 5 μ l zatěžkávacího pufru a obarvený produkt byl nanesen do jamek v gelu. Do jedné jamky byl dán DNA marker.
4. Byla provedena elektroforéza při 100V po dobu 50ti minut.
5. Přítomnost produktu PCR v gelu byla hodnocena pod UV světlem.

4.2. Purifikace borelií pomocí izolace z infikovaných myší

Pro tento pokus bylo použito šest myších samic C3H/N 6 týdnů starých. Byly infikovány suspenzí borelií CB53 čtvrté pasáže a chovány ve zvěřinci Parazitologického ústavu Akademie věd ČR v Českých Budějovicích. Podkladem metody byly publikace: Sinsky a Piesman, 1989; Wikel et al., 1997.

4.2.1. Potřebný materiál:

Myši C3H/N (ANLAB), BSK-H médium (SIGMA), antibiotika pro borelie (SIGMA), krevní agar (DULAB), 70% ethanol.

4.2.2. Pracovní postup:

1. Ze suspenze borelií CB53/IV, získané limitním ředěním v kapitole 4.1.2., bylo připraveno šest infekčních dávek. Každá o objemu 40 μ l a koncentraci 4x10⁵ borelií/ml.
2. Myši byly subkutánně infikovány a chovány ve zvěřinci za standardních podmínek (22°C, relativní vlhkost vzduchu 65%).
3. Po 3., 4. a 5. týdnu byla provedena pitva vždy jedné dvojice myší. Myši byly na pár minut ponořeny do 70% ethanolu kvůli vnější desinfekci. Následně byly odebrány tyto orgány: srdce, močový měchýř, kloub zadní nohy a ucho a přeneseny do 5ml BSK-H média s 1% přídavkem antibiotik pro borelie.
4. Zkumavky byly umístěny do termostatu a kultivovány při 34°C 14 dní.
5. V temném poli optického mikroskopu bylo ověřeno, zda zkumavky s orgány obsahují borelie.
6. Pro ověření přítomnosti kontaminace bylo z každé zkumavky odebráno 200 μ l a rozetřeno na krevní agar. Petriho misky byly vloženy do termostatu a kultivovány při 37°C 4 dny bez CO₂.

4.3. Purifikace borelií pomocí antibiotik

Pro odstranění kontaminace z boreliové kultury byla použita různá antibiotika, přidávaná do BSK-H média, jak ve formě roztoků, tak v podobě antibiotických disků. Bylo zjištěno, že kontaminace přítomná v kultuře borelií dobře roste i na krevním agaru, proto byl krevní agar použit pro kontrolu účinnosti antibiotik.

4.3.1. Potřebný materiál:

BSK-H médium (SIGMA), kontaminovaný kmen borelií CB53, antibiotika (SIGMA): amphotericin B, 5- fluorouracil, fosfomycin, rifampicin, trimethoprim, sulfamethoxazol, antibiotické disky (Lachema): penicilin, ampicilin, oxacilin, kanamycin, linkomycin, tetracyklin, streptomycin, erytromycin, 20% dimethylsulfoxid (DMSO), krevní agar (DULAB).

Antibiotikum	koncentrace v disku
penicilin	10 µg
ampicilin	10 µg
oxacilin	1 µg
kanamycin	30 µg
linkmycin	10 µg
tetracyklin	30 µg
streptomycin	30 µg
erytromycin	15 µg

Tabulka 4: Koncentrace antibiotik v jednotlivých antibiotických discích

Antibiotikum	rozpouštědlo	požadovaná koncentrace
amphotericin B	voda	250 µg/ml
rifampicin	DMSO	150 µg/ml
fosfomycin	voda	500 µg/ml
5-fluoruracil	DMSO	250 µg/ml
trimethoprim	DMSO	125 µg/ml
sulfamethoxazol	ethanol	125 µg/ml

Tabulka 5: Příprava roztoků antibiotik

4.3.2. Pracovní postup:

1. Byly připraveny zásobní roztoky antibiotik o požadované koncentraci, viz. tabulka 5. Zároveň byla připravena směs antibiotik fosfomycinu, 5-fluoruracilu, trimethoprimu a sulfamethoxazolu, tak, aby jednotlivá antibiotika měla ve směsi tyto koncentrace: fosfomycin 400 µg/ml, 5-fluoruracil 100 µg/ml, trimethoprim 10 µg/ml, sulfamethoxazol 50 µg/ml (M. G. Morshed et al., 1993).
2. Byly připraveny 1%, 2% a 3% roztoky jednotlivých antibiotik a výše uvedené směsi v BSK-H médiu, které byly inokulované 100µl kontaminovaných borelií CB53.
3. Na krevní agar bylo rozetřeno 100 µl shodných borelií CB53 a na povrch byly umístěny disky napuštěné antibiotiky viz. tabulka č. 4.

4. Zkumavky byly dány kultivovat do termostatu při 34°C 4 dny a krevní agary do termostatu při 37°C v atmosféře bez CO₂ také 4 dny.
5. U krevních agarů byla změřena inhibiční zóna kolem jednotlivých disků. Obsah zkumavek byl prohlédnut v temném poli optického mikroskopu pro ověření přítomnosti borelií a 100 µl suspenze zkumavek bylo rozetřeno na krevní agar a dáno opět kultivovat při 37°C do atmosféry bez CO₂, pro ověření účinnosti antibiotik.
6. Antibiotické disky, u kterých byly zóny inhibice větší než 10 mm, byly jednotlivě vloženy do BSK-H média a kultivovány spolu s 100 µl boreliového inokula standardním způsobem. Poté byla opětovně použita kontrola kontaminace na krevním agaru.
7. Dále byla ověřována účinnost rozdílných kombinací a koncentrací antibiotik a antibiotických disků. Tyto různé varianty jsou uvedeny v tabulce 9 v části výsledky.

4.4. Purifikace borelií na agaru

Borrelia burgdorferi je obvykle pěstována v tekuté živné půdě, ale existují publikace, které popisují růst kolonií i na pevném BSK-H médiu. Tyto publikace byly předlohou k této části mé práce (De Martino et al., 2006; Kurtti et al. 1987). Schopnost růst na pevné půdě je významná, jak k získání klonální kultury (kultury vyrostlé pouze z jedné buňky), tak pro odstranění kontaminujících bakterií.

4.4.1. Potřebný materiál:

BSK-H médium (SIGMA), antibiotika pro borelie (SIGMA), agaróza (Amresco), roztoky antibiotik připravených v kapitole 4.3.2. (fosfomycin, 5-fluoruracil, trimethoprim, sulfamethoxazol, rifampicin), kultura borelií CB53, plastové Petriho misky o průměru 6 cm.

4.4.2. Pracovní postup

4.4.2.1. Pokus č. 1:

1. Z tekutého BSK-H média byla připravena pevná živná půda přidavkem 0,2%, 0,5%, 0,8%, 1%, 1,2% a 1,5% agarózy. BSK-H médium obsahuje termolabilní složky, proto byla agaróza rozvařena odděleně v malém množství vody a poté přimíchána do média vytemperovaného na 60°C. Také bylo přimícháno 1% antibiotik pro borelie.
2. Směsi byly rozlity do Petriho misek vždy v duplikaci od každé koncentrace agarózy.

3. Na povrch bylo rozetřeno 50 μ l inokula o koncentraci asi $1,18 \times 10^3$ borelií.
4. Pro kultivaci bylo nutné docílit anaerobního prostředí o vysoké vlhkosti atmosféry
Vhodné podmínky byly navozeny použitím exsikátoru, kde do dolní části pod rošt bylo nalito malé množství vody a doprostřed roštu byla umístěna svíčka, která svým hořením vytvořila anaerobní prostředí.
6. Exsikátor byl umístěn do termostatu při 34°C. Růst kolonií byl pravidelně každých 5 dní kontrolován.



Obrázek 4: Exsikátor s Petriho miskami a svíčkou uprostřed. V dolní části je nalita voda.

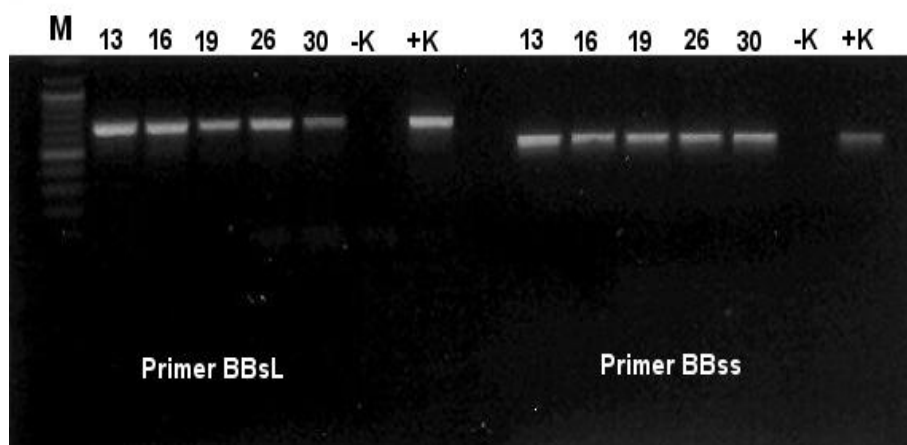
4.4.2.2. Pokus č. 2:

1. Opět byly připraveny Petriho misky s pevným BSK-H médiem, tentokrát všechny s 1% koncentrací agarózy.
2. Na povrch bylo rozetřeno 100 μ l jednotlivých antibiotik (fosfomycin, 5-fluoruracil trimethoprim, sulfamethoxazol, rifampicin), každé v duplikaci.
3. Dále bylo na povrch rozetřeno 50 μ l inokula o koncentraci asi $1,2 \times 10^3$ borelií.
4. Petriho misky byly dány kultivovat do exikátou při 34°C a rovněž průběžně kontrolovány.

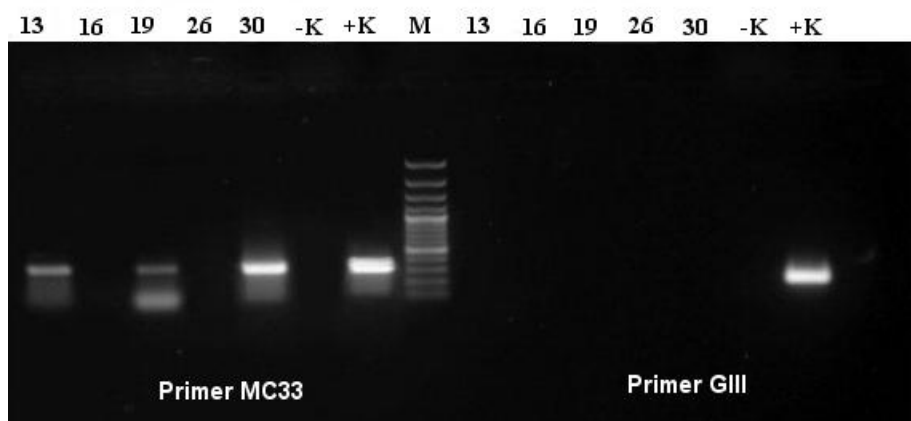
5. Výsledky

5.1. Purifikace borelií limitním ředěním

V tomto pokuse bylo za cíl oddělit směšnou kulturu *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Konkrétně druhy *B. burgdorferi* sensu stricto a *B. garinii* získané izolací z českobudějovických klíšťat. Inokulum přenášené do jednotlivých mikrozkušavek bylo naředěno tak, aby teoreticky každá pipetovaná dávka obsahovala pouze jednu boreliovou buňku. V ideálním případě by měla tedy každá mikrozkušavka po kultivaci obsahovat narostlou homogenní kulturu borelií. V praxi je však spíše otázkou náhody, zda se opravdu podaří odebrat inokulum pouze s jednou buňkou. Nicméně pokusy dokázaly, že limitním ředěním lze opravdu jednotlivé druhy od sebe oddělit. Jako důkaz pro toto tvrzení byla použita PCR vybraných vzorků (viz. obrázek 5 a 6). Z obrázků vyplývá, že vzorky 16 a 26 obsahují pouze *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, zatím co vzorky 13, 19 a 30 zůstaly smíšené. Použitím primeru GIII byla vyloučena přítomnost *Borrelia afzeli*.



Obrázek 5: Výsledné produkty PCR zviditelněné na agarózovém gelu s přidavkem EtBr. Písmeno **M** označuje DNA marker, číslice označují pracovní název vzorku boreliové DNA a **-K**, **+K** ukazují negativní a pozitivní kontrolu. Primer BBsL je specifický pro komplex *Borrelia burgdorferi* sensu lato a BBss pro *Borrelia burgdorferi* sensu stricto.



Obrázek 6: Výsledné produkty PCR zviditelněné na agarózovém gelu s přidavkem EtBr. Písmeno **M** označuje DNA marker, číslice označují pracovní název vzorku boreliové DNA a **-K**, **+K** ukazují negativní a pozitivní kontrolu. Primer MC33 je specifický pro *Borrelia garinii* a primer GIII pro *Borrelia afzeli*.

5.2. Purifikace borelií pomocí izolace z infikovaných myší

V tomto pokuse byly subkutánně infikované myši C3H/N vždy po dvojici sterilně vypitvány a odebrané orgány byly kultivovány v BSK-H médiu s antibiotiky pro získání nekontaminované kultury borelií. Jak ukazuje tabulka 6, až po pěti týdnech inkubace se podařilo získat nultou pasáž boreliové kultury, avšak zkouška přítomnosti kontaminace na krevním agaru odhalila kontaminaci. U orgánů, ze kterých nebyly izolovány borelie, nebyla většinou prokázána ani přítomnost kontaminace.

myš číslo	délka chovu po infikování	přítomnost borelií a kontaminace v médiu po kultivaci orgánů							
		ucho		srdce		kloub		moč. měchýř	
		borelie	kontam.	borelie	kontam.	borelie	kontam.	borelie	kontam.
1	3 týdny	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
2	3 týdny	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
3	4 týdny	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
4	4 týdny	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
5	5 týdnů	Ne	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano
6	5 týdnů	Ne	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano

Tabulka 6: Přítomnost borelií a kontaminace po kultivaci myších orgánů v BSK-H médiu.

5.3. Purifikace borelií pomocí antibiotik

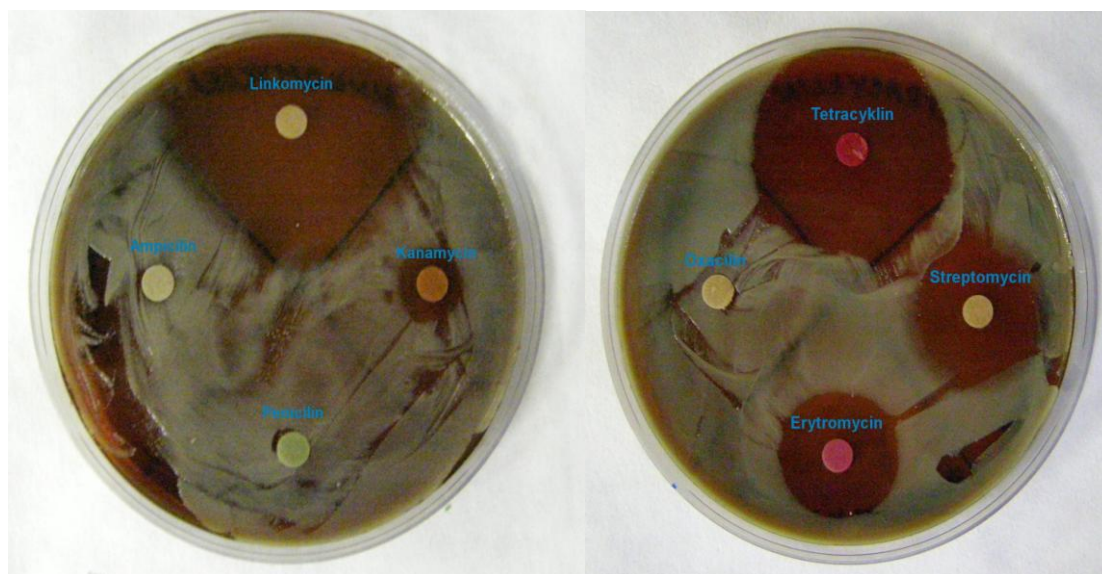
Tento pokus měl za cíl nahradit, nebo doplnit stávající používanou směs antibiotik pro borelie, protože její účinnost na kontaminaci, přítomnou v borelilích CB53, je nedostačující. U testovaných antibiotik (ATB) byla kromě vlivu na kontaminaci, sledována i schopnost borelií přežít a rozmnožovat se.

název ATB	množství v médiu	počet borelií/ml	množství kontaminace
borelie bez ATB	0%	6,45E+07	↑K
směs ATB	5%	4,34E+06	K
	3%	9,78E+06	K
	1%	3,17E+07	↓K
sulfamethoxazol	5%	9,20E+06	K
	3%	1,79E+07	K
	1%	1,69E+07	↓↓K
trimethoprim	5%	0,00E+00	↑↑K
	3%	1,31E+06	↑↑K
	1%	6,83E+07	↑K
rifampicin	5%	7,80E+07	↑↑K
	3%	8,58E+07	↓K
	1%	1,51E+08	↑K
fosfomycin	5%	1,17E+08	↓K
	3%	1,78E+08	↓↓K
	1%	1,29E+08	↓K
5- fluorouracil	5%	1,81E+07	↓K
	3%	3,36E+07	↓K
	1%	4,18E+07	↓K
amphotericin B	500 µg/ml	5,58E+06	K
	250 µg/ml	2,83E+07	↑K

Tabulka 7: Roztoky antibiotik a jejich procentuální množství v BSK-H médiu. Písmeno **K** zde naznačuje běžně se vyskytující množství kontaminace, které je přítomné v boreliové kultuře kultivované se standardními antibiotiky. Šipky směřující nahoru a dolů ukazují nárůst či úbytek kontaminace v porovnání s normálním množstvím.

Tabulka 7 ukazuje skupinu antibiotik připravenou dle pokynů popsaných v článku M.G. Morsheda et al., 1993, kromě amphotericinu B, který je součástí běžně užívané směsi antibiotik pro borelie. Výrazné omezení růstu borelií způsobil jen přídavek trimethoprimu o koncentraci vyšší jak 1%. Naopak fosfomycin nápadně podporuje růst kultury oproti normálu. Ostatní ATB neměla na prospívání boreliové kultury zvláštní vliv. Kontrola přítomnosti kontaminace na krevním agaru určila jako nejúčinnější inhibitor kontaminace 5% směs ATB. Avšak její účinky jsou srovnatelné s komerčně vyráběnými antibiotiky od Sigmy. Hodnocení množství kontaminace znázorněné v tabulce 7 je pouze orientační. Výsledky jsou založeny jen na subjektivním pozorování vzorků v temném poli optického mikroskopu.

Dále byla na krevním agaru zkoušena inhibiční schopnost antibiotik, které se pro boreliové kultury doposud nepoužívají. Na obrázku 7 jsou vidět inhibiční zóny kolem jednotlivých antibiotických disků na krevním agaru. Ampicilin, penicilin a oxacilin nebyly účinné. Nevytvořily kolem sebe žádnou inhibiční zónu, proto se s nimi již dále nepracovalo. Oproti tomu linkomycin, streptomycin, erytromycin a tetracyklin inhibovaly kontaminaci velice účinně. U těchto antibiotik byl proto zjišťován vliv na růst borelií v BSK-H médiu. Kanamycin byl také zahrnut i když jeho inhibiční zóna nebyla příliš velká. V tabulce 8 je shrnut výsledek pokusu.



Obrázek 7: Test citlivosti kontaminace na antibiotika.

ATB	množství v médiu	živé borelie	množství kontaminace	inhibiční zóna
kanamycin	1 disk	Ano	velké	11 mm
linkomycin	1 disk	Ne	žádné	40 mm
tetracyklin	1 disk	Ano	velmi malé	35 mm
streptomycin	1 disk	Ne	velmi malé	20 mm
erytromycin	1 disk	Ne	velmi malé	20 mm

Tabulka 8: Velikost inhibičních zón u antibiotických disků a účinky na růst borelií a kontaminace v BSK-H médiu.

kombinace antibiotik	vliv na borelie
1 disk tetracyklin + 0,5% fosfomycin	mrtvé
1 disk tetracyklin + 1% fosfomycin	mrtvé
2 disky tetracyklin + 0,5% fosfomycin	mrtvé
2 disky tetracyklin + 1% fosfomycin	mrtvé
1 disk tetracyklin + 0,5% 5-fluoruracil	mrtvé
1 disk tetracyklin + 1% 5-fluoruracil	mrtvé
1 disk tetracyklin + 0,5% sulfamethoxazol	mrtvé
½ disku tetracyklin + 0,5% sulfamethoxazol	malý počet živých
½ disku tetracyklin + 0,2% sulfamethoxazol	mrtvé
1 disk tetracyklin + 0,5% směs ATB	mrtvé
1 disk tetracyklin + 1% směs ATB	mrtvé
½ disku tetracyklin + 0,5% směs ATB	mrtvé
½ disku tetracyklin + 0,2 % směs ATB	mrtvé
½ disku tetracyklin + ½ disku kanamycin	malý počet živých
½ disku tetracyklin + 2% rifampicin	malý počet živých
½ disku tetracyklin + 1% rifampicin	mrtvé
1 disk tetracyklin + 1% rifampicin	mrtvé
1 disk tetracyklin + 0,5% rifampicin	mrtvé

Tabulka 9: Kombinace ATB a vliv této směsi na růst borelií

Borelie byly schopny přežít pouze za přítomnosti tetracyklinu a kanamycinu. Ostatní antibiotika je zahubila. Bohužel kontaminaci se opět nepodařilo odstranit. Byly

proto zkoušeny další různé kombinace antibiotik mezi sebou, ať už v podobě antibiotických disků nebo roztoků. Zde byl v první řadě sledován vliv na růst borelií. Až když bylo prokázáno, že borelie jsou schopny přežít, byla prověřena přítomnost kontaminace na krevním agaru. V konečném výsledku pouze tři směsi antibiotik (½ disku tetracyklin + 0,5% sulfamethoxazol, ½ disku tetracyklin + ½ disku kanamycin, ½ disku tetracyklin + 2% rifampicin) nezahubily borelie, bohužel ani kontaminaci. V tabulce 9 výše je přehled použitých variant směsí ATB a jejich vliv na borelie.

5.4.Purifikace borelií na agaru

První pokus s pevným BSK-H médiem byl založený na různé koncentraci agaru, do kterého byla před zatuhnutím vmíchána běžná antibiotika pro borelie a na povrch pak rozetřeno inokulum borelií. V druhém pokuse byl naopak použit jen 1% ní agar a na povrch byla rozetřena připravená antibiotika a poté borelie. Kolonie borelií se měly objevit za 3-4 týdny kultivace (T. J. Kurtti et al., 1987). Toho však nikdy nebyl docíleno, protože ve všech případech byly Petriho misky během 4-7 dnů úplně porostlé kontaminací a to bez ohledu na použitá antibiotika. Na obrázku 8 dole je Petriho miska s koloniemi kontaminace. Někdy byla kontaminace tak početná, že jednotlivé kolonie splývaly v souvislou plochu pokrývající celý agar.



Obrázek 8: Pevné BSK-H médium porostlé kontaminací.

6. Diskuze

Tato práce si kladla za cíl izolovat od sebe jednotlivé druhy borelií, rostoucích ve společném médiu a následně prokázat a popsat růst kolonií na pevném BSK-H médiu. Limitním ředěním, tedy ředěním, kdy byla kultura borelií postupně naředěna tak, aby každá očkovací dávka přenášená do kultivačního média obsahovala pouze jedinou borelii, byla *Borrelia burgdorferi* sensu stricto separována od *Borrelia garinii*. Toto tvrzení bylo ověřeno metodou PCR za použití primerů náležících jednotlivým druhům borelií. Zároveň tak byla vyloučena přítomnost *Borrelia afzeli* v kultuře. Byla tedy získána homogenní kultura *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, ovšem nemůže být řečeno, že vyrostla z jediné buňky. Pro tento účel byly borelie kultivovány na pevném BSK-H médiu.

Pro kultivaci na pevném BSK-H médiu byly použity rozdílné koncentrace agarózy. Pro vyhodnocení morfologie kolonií pouhým okem je nezbytná kultivace 3-4 týdny (T. J. Kurtti et al., 1987). Tuto dobu kultivace se ovšem nikdy nepodařilo dodržet, protože povrch živné půdy byl během asi čtyř dnů vždy porostlý koloniemi kontaminujících bakterií. Proto bylo za další cíl práce stanoveno odstranění nežádoucí kontaminace. V první řadě byly připraveny roztoky antibiotik (5-fluorouracil, fosfomycin, rifampicin, trimethoprim, sulfamethoxazol) a jejich směs, které měly zajistit selektivní růst borelií (M. G. Morshed et al. 1993). Tyto roztoky byly rozetřeny na povrch pevného BSK-H média, tentokrát však jen o 1% koncentraci agarózy. Bohužel i při této metodě Petriho misky přerůstaly kontaminací.

Působení různých antibiotik ve formě roztoků i disků a jejich kombinací bylo dále zkoumáno. Nebyla však objevena žádná vhodná kombinace, která by zahubila kontaminaci a zároveň umožnila růst borelií.

Mimo cíle práce byla z kontaminujících bakterií, které vyrostly na krevním agaru získána čistá kultura a její DNA byla poslána na sekvenční analýzu do Genomické laboratoře Ústavu molekulární biologie rostlin AV ČR v Českých Budějovicích. Jelikož se jednalo o neznámý vzorek, byl amplifikován gen pro 16S malou ribosomální podjednotku, která je charakteristická pro všechny druhy bakterií. Porovnáním výsledku sekvenace s mezinárodní genomovou databází (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), bylo zjištěno, že se s 96% pravděpodobností jedná o *Paenibacillus lactis*. Což jsou rovné, na koncích zaoblené, pohyblivé, Gram

pozitivní tyčinky. Mají schopnost tvořit endospory a to jim umožňuje přežít ty nejtvrdější životní podmínky mezi které patří i přítomnost antibiotik a desinfekčních látek (Scheldeman et al., 2004). Nepochybně je to důvod, proč antibiotika usmrtí v první řadě buňky borelií, které nedisponují takovou odolností.

Jako poslední metoda odstranění nežádoucích bakterií byla použita purifikace boreliové kultury přes samice myši kmene C3H/N. Po pěti týdnech inkubace byly borelie izolovány ze srdce, kloubu a močového měchýře infikovaných samic. Kontrola na krevním agaru odhalila přítomnost kontaminace v boreliové kultuře, třebaže ne v tak hojném počtu, jako před inokulací do myši. Na první pohled se však již nejednalo o *Paenibacillus lactis*. Tyto bakterie rostly na krevním agaru mnohem déle a odlišná byla i morfologie kolonií. Zato mnohem lépe prospívaly v tekutém BSK-H médiu, ve kterém byly pozorovány pod mikroskopem. Tato kontaminace mohla být do média zavlečena při pitvě z myši srsti. Myši byly sice zevně desinfikovány 70% ethanolem, ale v srsti mohly ulpívat sporotvorné bakterie nebo bakterie tvořící pouzdra, které jsou velmi odolné a ethanol je nezahubil. Nelze také vyloučit, že tato kontaminace koexistovala v inokulátu borelií spolu s *Paenibacillus lactis*, který svým expansivním růstem zamaskoval její přítomnost při kontrole na krevním agaru. Také mohla odolat imunitní odpovědi myši a být zpětně izolována spolu s boreliemi, zatím co *Paenibacillus* byl imunitním systémem zahuben.

Bylo by vhodné zaměřit další studie na hledání vhodných antibiotik, které by úspěšně zamezily růst kontaminujících bakterií. Pak by s největší pravděpodobností bylo možné vypěstovat kolonie borelií na pevném BSK-H médiu a byla by tím získána čistá klonální kultura borelií pro další studie. Jinou, potenciálně vhodnou metodou by mohla být příprava specifických protilátek proti kultuře kontaminujících bakterií, pomocí imunizace pokusných zvířat. Tyto protilátky by byly ve vhodné koncentraci přidány k boreliové kultuře a možná by způsobily rozpad příslušných bakterií. Vzhledem k dlouhé generační době borelií, by bylo potřeba mnohem více času na podrobnější výzkum zaměřený na purifikaci a růst borelií.

7. Závěr

Úspěšně se podařilo od sebe separovat *Borrelia garinii* a *Borrelia burgdorferi* sensu stricto pomocí limitního ředění. Nepodařilo se vypěstovat kolonie borelií na pevném BSK-H médiu. Podařilo se izolovat nultou pasáž boreliové kultury z myších samic, ale nezdařilo se takto odstranit kontaminaci. Nebyla nalezena ani vhodná kombinace antibiotik, která by inhibovali nežádoucí bakterie a dovolila růst kultuře borelií.

8. Použitá literatura:

Aguero-Rosenfeld M. E., Wang G., Schwartz I., Wormser G. P. (2005)

Diagnosis of Lyme Borreliosis. Clin. Microbiol. Rev. 18: 484-509.

Barbour A. G., Hayes S. F. (1986)

Biology of Borrelia Species. Microbiol. Rev. 50: 381-400.

Bartůněk P. a kolektiv (2006)

Lymeská borelióza 3.,Doplněné a přepracované vydání. Nakladatelství Grada.

Bednář M., Fraňková V., Schindler J., Souček A., Vávra J. (1996)

Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Nakladatelství Marvil.

Burgdorfer W, Barbour A.G., Hayes S. F., Benach J. L., Grunwaldt E., Davis J. P. (1982)

Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? Science 18;216(4552):1317-9.

De Martino S. J., Sordet Ch., Piémont Y., Ruzic-Sabljić E., Vetter M. T., Monteil H., Sibia J., Jaulhac B. (2006)

Enhanced culture of *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* strains on a solid BSK-based medium in anaerobic conditions. Res. Microbiol. 157: 726-729.

Diehl P. A. , Aeschliman A., Obenchain F.D. (1982)

Tick Reproduction: Oogenesis and Oviposition. In: F. D. Obenchain, R. Galun (Eds.), Physiology of Ticks, Pergamon Press, pp 277-350.

Farmakoterapeutické informace.- Měsíčník pro lékaře a farmaceuty(4/2006)

Lymeská borelióza a její léčba

Felsenfeld O. (1965)

Borreliae, Human Relapsing Fever, and Parasite- Vector-Host Relationships. *Bacteriol. Rev.* 29: 46-74.

Fraser C. M., Casjens S., Huang W. M., Sutton G. G., Clayton R., Lathigra R., White O., Ketchum K. A., Dodson R., Hickey E. K., Gwinn M., Dougherty B., Tomb J. F., Fleischmann R. D., Richardson D., Peterson J., Kerlavage A. R., Quackenbush J., Salzberg S., Hanson M., Vugt R., Palmer N., Adams M. D., Gocayne J., Weidman J., Utterback T., Wattney L., McDonald L., Artiach P., Bowman Ch., Garland S., Fujii C., Cotton M. D., Horst K., Roberts K., Hatch B., Smith H. O., Venter J. C. (1997)

Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, 390:580-586.

Krbková L. (2007)

Lymeská borelióza. *Medicína Pro Praxi* 5: 200-203.

Křupka M., Raška M., Weigl E. (2008)

Lymeská borelióza: Biologie, patogeneze, diagnostika a léčba. *Dermatologie pro praxi*, 2(5-6): 236-239

Knülle K. , Rudolph D. (1982)

Humidity Relationship and Water Balance of Ticks. In: F. D. Obenchain, R. Galun (Eds) *Physiology of Ticks*, Pergamon Press, pp. 43-70.

Kurtti T. J., Munderloh U. G. , Johnson R. C., Ahlstrand G. G. (1987)

Colony formation and Morphology in *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* 25: 2054-2058.

Magnusson H.J., Hill C., Fleischman R. (1948)

The Minimal Infectious Inoculum of *Spirochaeta pallida* (Nichols strain) and Consideration of Its Rate of Multiplication *in vivo*. *Am. J. Syph. Gonorrh. Ven. Dis.* 32: 1-18

Monroe J. (2001)

Lyme disease: Perspectives on Disease and Illness. Nakladatelství Capston Press.

Morshed M. G., Konishi H., Nishimura T., Nakazawa T. (1993)

Evaluation of agents for use in medium for selective isolation of Lyme disease and relapsing fever *Borrelia* species. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12(7): 512-8.

Nazario S., Das S., de Silva M. A. , Deponte K., Marcantonio N., Anderson J. F., Fish D., Fikrig E., Kantor F.S. (1998)

Prevention of *Borrelia burgdorferi* Transmission in Guinea Pigs by Tick Immunity. J. Trop. Med. Hyg. 58: 780-785.

Piesman J., Schneider B. S. (2002)

Dynamic Changes in Lyme Disease Spirochetes During Transmission by Nymphal Tick. Exp. App. Acarol., 28: 141-145.

Porcella S. F., Raffel S. J., Schrumph M. E., Schriefer M. E., Dennis D. T., Schwan T. G. (2000).

Serodiagnosis of Louse-Borne Relapsing Fever with Glycerophosphodiester Phosphodiesterase (GlpQ) from *Borrelia recurrentis*. J. Clin. Microbiol. 38: 3561-3571.

Postic D., Garnier M., Baranton G. (2007).

Multilocus Sequence Analysis of Atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato Isolates--Description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and Genomespecies 1 and 2. Int. J. Med. Microbiol. 297(4):263-71.

Rahn D. W., Malawista S. E. (1991)

Lyme Disease. West J Med. 154:706-714.

Richter D., Schlee D. B., Allgöwer R., Matuschka F. R. (2004).

Relationships of a Novel Lyme Disease Spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with Its Hosts in Central Europe. Appl. Environ. Microbiol. 70: 6414-6419.

Richter D., Postic D., Sertour N., Livey I., Matuschka F. R., Baranton G. (2006).
Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu lato* species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmani* sp. nov. Int. J.Syst. Evol. Microbiol., 56: 873–881.

Rosa P. A., Tilly K., Stewart P.E. (2005).
The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. Nat. Rev.Microbiol., 3: 129–143

Sellek R. E., Escudero R., Gil H., Rodríguez I., Chapparo E., Pérez-Pastrana E., Vivo A., Anda P. (2002).
In Vitro Culture of *Borrelia garinii* Results in Loss of Flagella and Decreased Invasiveness. Infect. Immun. 70: 4851-4858.

Scheldeman P., Goossens K., Rodriguez-Diaz M., Pil A., Goris J. ,Herman L., De Vos P. Logan N. A. Heyndrickx M. (2004).
Paenibacillus lactis sp. nov., isolated from raw and heat-treated milk. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54: 885–891.

Sinsky R. J., Piesman J. (1989)
Ear Punch Biopsy Method for Detection and Isolation of *Borrelia burgdorferi* from Rodents. J. Clin. Microbiol. 27: 1723-1727.

Stanek G., Strele F., Gray J., Wormser G. P. (2002)
History and Characteristic of Lyme Borreliosis. In: J. S. Gray, O, Kahl, R. S. Lane and G. Stanek (Eds.), Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control, CABI Publishing, pp. 1-29.

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

Steere A. C., Malawista S. E., Newman N. H., Rahn D. W., Hutchinson G. J., Green J., Snyderman D. R., Taylor E. (1984)

The Clinical Spectrum and Treatment of Lyme Disease. Yale J. Biol. Med., 57: 453-461

Sternbach G., Dibble Ch. L. (1996)

Willy Burgdorfer: Lyme disease. J. Emerg. Med., 14: 631-634.

van Dam, A. P., H. Kuiper, K. Vos, A. Widjojokusumo, B. M. de Jongh, L.

Spanjaard, A. C. P. Ramselaar, M. D. Kramer, and J. Dankert. (1993)

Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. Clin. Infect. Dis. 17:708-717.

Wang G., Dam A. P., Schwartz I., Dankert J. (1999)

Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Taxonomic, Epidemiological, and Clinical Implications. Clin. Microbiol. Rev. 12: 633-653.

Wikel S. K., Ramachandra R. N., Bergman D. K., Burkot T. R., Piesman J. (1997)

Infestation with Pathogen-Free Nymphs of the Tick *Ixodes scapularis* Induces Host Resistance to Transmission of *Borrelia burgdorferi* by Ticks. Infect. Immun. 65: 335-338.

Wilske B., Preac-Mursis V., Göbel U. B., Graf B., Jauris S., Soutschek E., Schwab E., Zumstein G. (1993)

An OspA Serotyping System for *Borrelia burgdorferi* Based on Reactivity with Monoclonal Antibodies and OspA Sequence Analysis. J. Clin. Microbiol. 31: 340-350.

<http://newenglandtickandmosquito.com>)

www.bacterio.cict.fr/b/borrelia.html

www.kliste.cz