

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Analýza infekčního potenciálu nově popsaných druhů borelie z komplexu  
*B. burgdorferi sensu lato*, *B. americana* a *B. carolinensis* na laboratorním  
modelu infikovaných zvířat.**

Bakalářská práce

**Nelly Keplová**

Školitelka: Maryna Golovchenko, MSc

Vedoucí práce: Nataliia Rudenko, PhD

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

České Budějovice 2014

Keplová N., 2014: Analýza infekčního potenciálu nově popsaných druhů borelie z komplexu *B. burgdorferi* sensu lato, *B. americana* a *B. carolinensis* na laboratorním modelu infikovaných zvířat. [Analysis of infectious potential of newly described species of borrelia from *B. burgdorferi* sensu lato complex, *B. americana* and *B. carolinensis* on laboratory model of infected animals. Bc. Thesis, in Czech.] – 43.p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:**

The aim of the study was to analyze the infectious potential of the newly described species of borrelia, *B. americana* and *B. carolinensis*, studied on the model laboratory animals (mice and gerbils). We confirmed that *B. carolinensis* is able to infect mice and gerbils and is able to disseminate into different animal organs. The ability of *B. americana* to infect the mice under used experimental conditions was not confirmed. Further experiments on different animal models (avian, for example) are required.

Bakalářská práce byla financována z grantů FP7 EC project ANTIGONE, projektové číslo – 278976.

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 elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 26. 4. 2014

.....

Nelly Keplová

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala svým školitelkám Natalii Rudenko, Ph.D. a Maryně Golovchenko, MSc. za podporu a neobvyklou trpělivost při zodpovězení mi všech dotazů. Poděkování patří i Prof. RNDr. Liboru Grubhofferovi, CSc., který mi umožnil pracovat v Laboratoři molekulární biologie vektorů a patogenů. Také bych ráda poděkovala RNDr. Radkovi Šimovi, Ph.D., který mi pomohl při práci se zvířaty.

V neposlední řadě děkuji své nejbližší rodině za velkou podporu.

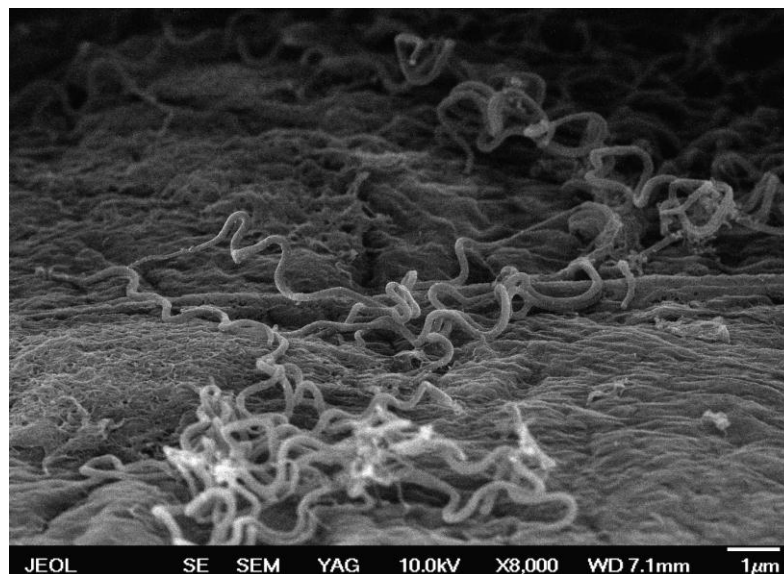
<b>1. Úvod</b> .....	1
1.1. Borelie.....	1
1.2. <i>Borrelia americana</i> .....	7
1.3. <i>Borrelia carolinensis</i> .....	8
<b>2. Cíle práce</b> .....	9
<b>3. Materiál a metody</b> .....	10
3.1. Příprava média.....	11
3.2. Kultivace borelií.....	11
3.3. Mikroskopie temného pole.....	11
3.4. Infikování laboratorního modelu.....	12
3.5. Odebírání tkání.....	12
3.6. Kultivace borelie z tkáně .....	13
3.7. Extrakce nukleových kyselin z borelie a tkáně laboratorních zvířat.....	13
3.8. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	13
3.9. Real time PCR.....	16
3.10. Elektroforéza v agarózovém gelu.....	17
3.11. Purifikace PCR produktu a sekvenování.....	17
3.12. Citlivost borelií ke komplementu zvířat, průtoková cytometrie.....	17
<b>4. Výsledky</b> .....	20
4.1. Optimalizace podmínek kultivace spirochét.....	20
4.2. Vypracování metody infikování a detekce borelií v tkáních myši na pozitivní kontrole ( <i>Bb</i> s.s.).....	20
4.3. <i>Borrelia americana</i> .....	25
4.4. <i>Borrelia carolinensis</i> .....	27
<b>5. Diskuze</b> .....	31
<b>6. Závěr</b> .....	34
<b>7. Nejpoužívanější zkratky</b> .....	35
<b>8. Seznam literatury</b> .....	36

## 1. Úvod

Je důležité zkoumat patogenní potenciál nových druhů borelie na modelových zvířatech. Tato zjištění jsou nezbytným faktorem pro vytváření si představ o šíření se bakterií, které by mohly být potenciálně nebezpečnými i pro člověka, především v období, kdy neustále dochází k objevení a popisu nových druhů spirochét a onemocnění, které vyvolávají, se rychle rozšiřuje a stává se větším problémem po celém světě.

### 1.1. Borelie

Borelie patří do kmene spirochaetes, do které mimo borelií patří i rod *Treponema*, zahrnující původce syfilidy. Jsou to drobné spirálovité bakterie s bičíky, které dosahují délky až 50  $\mu\text{m}$ , jsou jednobuněčné a množí se příčným dělením. Pohybují se aktivně. Množí se v hostitelích. Jejich přenos je zajištěn členovci, různými druhy tvrdých klíšťat. Mezi boreliemi a přenašeči je velice úzká vazba (Bednář, 1999).



Obr. 1: Spirochéta *Borrelia burgdorferi* (foto: M. Vancová, Parazitologický ústav, Biologické Centrum AV ČR.)

#### 1.1.1. Morfologie spirochét komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Borelie je gram - negativní, extracelulární bakterie, 4 až 30  $\mu\text{m}$  dlouhá a 0,2  $\mu\text{m}$  široká. Na obou koncích má bičíky (Bednář, 1999). Její tvar umožňuje této bakterii šroubovitý pohyb,

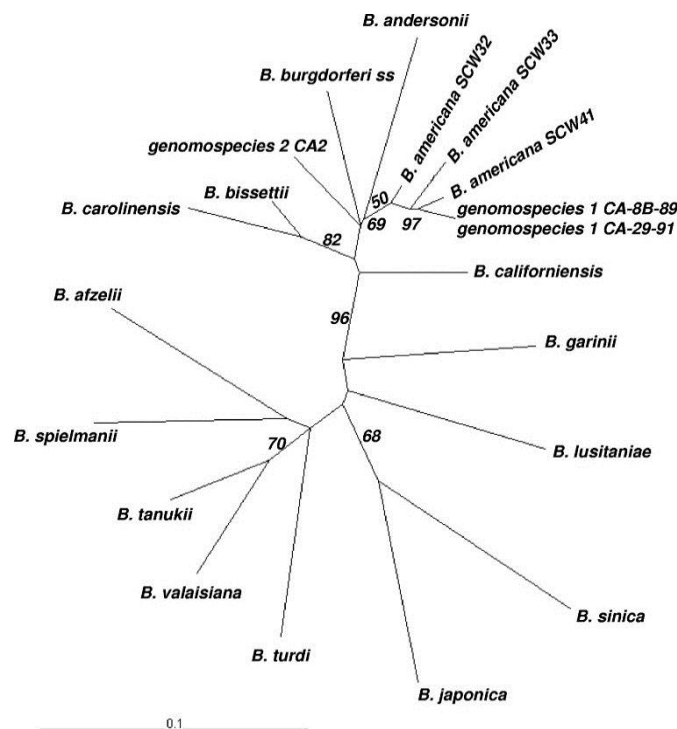
pomocí něhož velmi dobře dokáže překonávat různé bariéry. Tuto schopnost umí bakterie dobře využít k pohybu ve vysoce viskózním prostředí, jako je například mezibuněčná hmota. Je schopná vstupovat do buněk jako jsou fibroblasty, dendritické buňky nebo mikrofágy a v těchto buňkách umí nadále přežívat (Křupka et al., 2008). Ideální teplota pro růst borelií je 30 – 34 °C a její generační doba je 12 hodin (Bednář, 1999). Zvláštností u borelií je jejich genom, představený lineárním chromosomem. Na rozdíl od borelie, ostatní bakterie mají genom kruhový (Madigan et al., 2012). Díky tomu, že boreliím chybí enzymy potřebné pro tvorbu aminokyselin, mastných kyselin a nukleotidů, nejsou schopné samostatného žití, a proto potřebují svého hostitele (Křupka, 2008).

Bakterie z rodu *Borrelia* se dají rozdělit do dvou skupin, podle toho jaké onemocnění způsobují. První skupinou jsou bakterie, které vyvolávají návratnou horečku: *B. hermsii*, *B. persica*, *B. crocidurae*, *B. duttonii*, *B. recurrentis*, *B. hispanica*, *B. coriaceae*, *B. lonestari*, *B. miyamotoi*, *B. parkeri*, *B. turicatae*, *B. anserina* (Ras M. et al., 1996).

Do druhé skupiny patří původci lymfské boreliózy - spirochéty komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Tato skupina zahrnuje *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. americana*, *B. andersonii*, *B. californiensis*, *B. finlandensis*, *B. chilensis*, *B. carolinensis*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. sinica*, *B. yangtze*, *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. kurtenbachii*, *B. spielmanii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* (Bunikis et al., 2004, Rudenko et al., 2011).

### 1.1.2. Taxonomie

*Borrelia burgdorferi* sensu lato je rozmanitá skupina bakterií. Je celosvětově rozšířená a neustále dochází k popsání nových druhů. V současné době je uznáno 20 druhů borelií (Rudenko et al., 2011).



Obr. 2: Fylogenetický strom spirochét komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Rudenko et al., 2009). (\*po publikování tohoto fylogenetického stromu byli popsány další 2 druhy borelie z této skupiny a to *B. chilensis* a *B. finlandensis*)

Různé druhy *B. burgdorferi* s.l. se často vyskytují pouze na určitém místě. Například *B. andersonii*, *B. bissetii*, *B. americana*, *B. carolinensis*, *B. californiensis*, *B. kuznetsovii*, jsou nalézány především v Severní Americe, zatímco *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. valaisiana*, *B. japonica*, *B. turdi*, *B. tanukii*, *B. sinica*, *B. yangtze*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. valaisiana* vyskytují se v Evropě a Asii. *B. burgdorferi* s.s., *B. bissetii* a *B. bavariensis* se vyskytují jak v Evropě, tak i v Asii a Americe (Lee et al., 2003, Margos et al., 2011, Rudenko et al. 2011).

Předpokládalo se, že v Jižní Americe *Borrelia burgdorferi* s.l. není přítomna, kromě Uruguaye. Tato domněnka byla vyvrácena po objevení druhu *B. chilensis* v této lokalitě (Ivanova et al., 2013). Dalším druhem, který byl nedávno popsán je *B. finlandensis* ve Finsku. Přesné rozšíření těchto druhů doposud není známo (Casjens et al., 2011).

### 1.1.3. Nově popsány druhy borelie

Díky neustále se objevujícím novým druhům je taxonomie komplexu *B. burgdorferi* s.l. stále komplikovanější. Během několika posledních let bylo identifikováno větší množství nových druhů borelie a to především ve Spojených státech (Rudenko et al., 2009).

Tak v roce 2009 například došlo k popsání hned 3 nových druhů, kterými jsou *B. americana*, *B. carolinensis* a *B. bavariensis* (Rudenko et al., 2009a, 2009b, Margos et al., 2011).

V Severní Americe byla, jako jedna z posledních, popsána *B. kurtenbachii*, která do nedávné doby patřila do druhu *B. bissettii*. Tato bakterie byla již v roce 1997 izolovaná ze slovenských pacientů, to znamená, že je to další druh borelie patogenního pro člověka, který se vyskytuje v Americe a Evropě (Rudenko et al., 2011).

Mezi jeden z posledních objevených druhů borelie patří *B. finlandensis*, který byl izolován z klíštěte *Ixodes ricinus* (Casjens, 2011). Kompletní genomová sekvence *Borrelia* sp. izolátu SV1 byla zveřejněna. Izolát se nejvíce přibližuje *B. burgdorferi* sensu stricto, ale je geneticky dostatečně odlišný.

*B. chilensis* byla nově izolována z klíšťat *I. stilesi*, která byla nasbírána v Chile z přírodní vegetace a z křečků ocasatých (*Oligoryzomys longicaudatus*). Kultivované spirochéty a DNA borelií v klíšťatech byli analyzované multilokusovou sekvenční typizací a sekvenováním 5 dalších lokusů (16S rDNA, 16S - 23S mezigenového úseku, 5S - 23S mezigenového úseku, *flaB*, *ospC*). Pomocí fylogenetické analýzy došlo k závěru, že se jedná o nový druh ve skupině způsobující Lymskou boreliózu. Plazmidový profil tohoto druhu, který byl stanovený pomocí PCR a pulzní gelovou elektroforézou, se liší od *B. burgdorferi* B31A3 (Ivanova et al, 2013).

#### 1.1.4. Borelie a Lymská borelióza: patogeneze různých druhů borelie

Lymská borelióza (LB) je nejčastější onemocnění, které se vyskytuje na severní polokouli a je přenášeno klíšťaty (Rauter et al., 2005). LB je pojmenována podle města Lyme, kde nemoc byla poprvé identifikována (Connecticut, USA). Infekce se zásadně přenáší klíšťaty. Nicméně, přítomnost spirochét v komárech a jiných druzích hematofágního hmyzu byla také prokázána (Bednář, 1999).

Ne každý druh borelie je schopen infikovat člověka (Wang et al., 1999). Z doposud známých 20 druhů borelií 3 naprosto běžně infikují člověka v Evropě. Těmi jsou *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* a *B. afzelii* (Rudenko, 2011). Na rozdíl od toho, v Severní Americe je pouze jeden druh, který se oficiálně považuje za infekční pro člověka, a to *B. burgdorferi* sensu stricto.



*B. valaisiana*, *B. lusitaniae* byly detekovány z kožní biopsie pacientů, ale nejsou běžným druhem borelií které infikují člověka. Z tohoto důvodu patří do druhé skupiny. Schopnost zmíněných druhů a také *B. bavariensis*, *B. bissetii*, *B. kurtenbachii* a *B. spielmanii* vyvolávat Lymfskou boreliózu u člověka je uznána. Stále se ale diskutuje otázka, zda jsou schopni způsobit jen lokální infekci v místě kousnutí klíštětem, nebo pronikat do vnitřních tkání hostitele (Rauter et al., 2005).

Třetí skupinou jsou druhy borelií, které ještě nebyly izolovány z lidských vzorků ani nebyly detekovány v člověku. Těmi jsou: *B. americana*, *B. andersonii*, *B. californiensis*, *B. finlandensis*, *B. chilensis*, *B. carolinensis*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. sinica*, *B. yangtze* (Rudenko et al., 2011)

LB se projevuje širokým spektrem klinických příznaků a často napodobuje nemoci, které nemají žádnou spirochétovou etiologii. Proto se o ní často mluví jako o „velkém imitátorovi“. Různé druhy spirochét způsobují mírnější zdravotní potíže v podobě erythemy migrans až závažnější potíže jako je artritida nebo neurologická onemocnění (Rudenko et al., 2011). Klinické projevy se dají rozdělit do tří fází. V 70% případů se časná fáze projevuje jako erythema migrans, což je lokalizovaná kožní forma infekce. V případě, že bakterie neeliminuje imunitní systém hostitele, mohou se začít dále šířit do dalších orgánů, jako jsou klouby, nervové orgány nebo vzácně do očí nebo mohou způsobit lymfskou karditidu (Krupka et al., 2008). Nastává druhá fáze, časné diseminované stádium, které je charakteristické neurologickými projevy, artritidou, záněty svalů a šlach, popřípadě poruchami srdečního rytmu nebo karditidou. Pro třetí fázi jsou typické dlouhotrvající potíže jako zasažení velkých kloubů, demence či atrofie (Bolehovská et al., 2009). Třetí chronická fáze onemocnění LB je často předmětem diskusí, a to zejména v USA: její existence je zpochybňována.

Bylo zjištěno, že různé druhy borelie jsou zodpovědné za různé klinické projevy onemocnění. Například pro *B. afzelii* jsou typické kožní příznaky, *B. bavariensis* a *B. garinii* jsou spojeny s neuroborreliózou a *B. burgdorferi* s.s je spojena s artritidou (Margos et al., 2011). V Evropě je spektrum klinických projevů LB větší, na rozdíl od Severní Ameriky, kde je klasickým projevem onemocnění artritida, způsobená *B. burgdorferi* sensu stricto (Stanek et al., 2011).

Poměrně dlouze byly *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* a *B. garinii* považovány za jediné druhy, které způsobují LB ve světě. S objevováním nových druhů borelií dochází k rozšíření škály klinických projevů tohoto onemocnění. Velmi často se v dnešní době stává, že se objevují netradiční projevy LB, které dříve s tímto onemocněním nebyly spojovány. Některé druhy borelie dříve nebyly vůbec spojovány přímo s onemocněním člověka a některé, dnes již známé druhy, nebyly ještě objeveny (Rudenko et al., 2011).

Pro patogenezi u borelií jsou velmi důležité některé plasmidy, které nesou geny, důležité pro adaptaci na hostitele, šíření, infekčnost a přežití spirochét. Těmito geny jsou *vlsE*, *adeC* nebo *pncA* (Lawrenz et al., 2004; Jewett et al., 2007; Purser et al., 2003). Během manipulace s boreliemi může dojít ke ztrátě infekčnosti kmene borelií důsledkem ztráty některého z klíčového plasmidu. Ke ztrátě plasmidu může dojít například během opakované re-kultivace kultur. Mezi prvními důležitými plasmidy, které určují virulenci, jsou lp – 25 a lp 28 – 1 (Grubhoffer et al., 2005).

#### 1.1.5. Interakce borelie - vektor - hostitel

Vztah mezi hostitelem, vektorem a patogenem je velmi složitý. Borelie jsou přenášeny na hostitele klíšťaty rodu *Ixodes* (Clark, 2001). Hostiteli borelií jsou nejrůznější druhy savců, plazů a ptáků (Anguita et al., 2003). Klíšťata sají minimálně na 237 různých druzích zvířat (Rudenko et al., 2011). Například je známo, že velmi důležitou roli v rozšiřování *B. burgdorferi* s.l. hraje ptactvo a to díky své migraci do různých oblastí. Ptactvo se zásadně podílí na rozšiřování infikovaných klíšťat (Rudenko et al., 2011). Klíšťata někdy mohou být nakažena i více než jedním druhem spirochét z komplexu *B. burgdorferi* sensu lato (Rauter et al., 2005).

Některé druhy borelie mají své typické hostitele. Jiné druhy jsou přizpůsobené i na více hostitelů. Zdá se, že například *B. garinii*, *B. americana* a *B. turdi* jsou druhy, které jsou spojovány většinou s ptáky, nebo schopné parazitovat většinou v ptácích, na rozdíl například od *B. burgdorferi* sensu stricto, která má velké množství možných hostitelů bez zřejmých preferencí (Karami, 2012). Borelie se musí dobře přizpůsobit vnitřním podmínkám hostitele, popřípadě vektora, aby nedošlo k odhalení bakterie imunitním systémem (Křupka et al., 2008).

Některé druhy borelií se vyskytují pouze na určitých místech, v určitých druzích hostitelů anebo v určitých vektorech. Je to důsledek toho, že tyto druhy nedokáží překonat imunitní bariéry hostitelů, jsou citliví k hostitelskému komplementu nebo neustojí obranu vektora. Borelie má ovšem velmi dobré adaptační vlastnosti, proto v budoucnu hrozí další šíření

onemocnění, popřípadě hrozí, že se rozšíří i spektrum borelií, které jsou nebezpečné pro člověka.

#### 1.1.6. Imunitní odpověď hostitele

Ve větším ohrožení v propuknutí nemoci jsou organismy, kterým chybí určitá složka imunity, ať už jde o poruchu komplementu nebo poruchu v tvorbě lymfocytů. K eliminaci borelií je zapotřebí opsonizace pomocí komplementu, lektinu nebo protilátek. Odstranění bakterií mají za úkol neutrofilní granulocyty, které jsou chemotakticky lákány do místa infekce. V pozdějších fázích infekce dochází k aktivaci specifické imunity, ve které se tvoří lymfocyty B a IgM protilátky, které se postupně za pomoci T lymfocytů přesmyknou na IgG protilátky (Horejší V. et al, 2009).

Druhy borelií, které jsou spojené s daným hostitelem, musí dokázat překonat alternativní cestu komplementu jejich hostitele. V případě, že borelie není schopná překonat komplement, nemůže dojít k nakažení daného organismu bakterií (Bhide et al., 2005).

Studie citlivosti dvou nově objevených druhů borelie, *B. americana* a *B. carolinensis* ke komplementu hlodavců na laboratorních modelech je cílem této práce.

### **1.2. *Borrelia americana***

Nově odhalený druh *Borrelia americana* byl popsán v roce 2009 (Rudenko et al., 2009). Jde o druh, který byl objevený v jižní části Severní Ameriky, konkrétně v Jižní Karolíně. Tento druh byl objeven díky rozboru vzorků z klíšťat, ptáků a hlodavců, které byly nasbírány v Jižní Karolíně a přilehlých státech jihovýchodní USA. *Borrelia sp. nov.* (později pojmenována *B. americana*) byla izolována z nymf klíštěte *Ixodes minor*. Nový druh borelií ukázal poměrně velkou podobnost s kmenem, který byl známý jako genomospecies 1. Odlišnost od ostatních druhů byla prokázána pomocí multilokusové sekvenční analýzy zahrnující amplifikaci a sekvenční analýzu genů, lokalizovaných jak na plastidech, tak i na chromozomu spirochety. Tento nově popsáný druh se rozděluje na dvě skupiny, A a B, díky menším, ale zřejmým odlišnostem v sekvencích různých úseků genomu (Rudenko et al., 2009).

### 1.2.2. Vektory *Borrelia americana*

Není známo, zda *B. americana* je pro člověka nebezpečná. *Borrelia americana* sp.nov. doposud byla izolována pouze z klíšťat *I. pacificus* a *I. minor*. *I. minor* patří mezi druhy klíšťat, která většinou nesají na člověku. Ale *I. pacificus* může kousnout člověka a krmí se na stejných hostitelích jako *I. minor*. Z tohoto důvodu se dá uvažovat i o možnosti, že by *B. americana* mohla být přenosná i na člověka. Tato domněnka ovšem prozatím není potvrzena (Rudenko et al., 2009).

### 1.3. *Borrelia carolinensis*

*Borrelia carolinensis* byla nalezena při rozboru nasbíraných vzorků z jihu Severní Ameriky (Rudenko et al., 2009b). *Borrelia carolinensis* byla izolována z hlodavců *Peromyscus gossypinus* a *Neotoma floridana* kterým byla provedena biopsie tkáně z uší. Tito hlodavci byli odchyceni v 5 oblastech Jižní Karolíny. *Borrelia carolinensis* byla pojmenována podle místa jejího nálezu, státu Jižní Karolína. Pro ujasnění taxonomického statusu nového popsaného druhu v komplexu *B. burgdorferi* sensu lato, bylo analyzováno rrf-rrl mezigenový úsek, 16S rRNA, *fla*, *ospA*, *ospC* a *p66* geny. Tyto sekvence jsou důležité pro komplexní analýzu a porovnání mezi ostatními druhy (Rudenko et al., 2009b).

#### 1.3.1. Geografie *B. carolinensis* a její hostitelé

Vzorky *B. carolinensis* byly nasbírány z 5 oblastí v Jižní Karolíně, USA. Jednou z oblastí byl ostrov nacházející se v Sumter County, ostatní oblasti byly pobřežní. Množství vzorků z každé oblasti bylo různé. Bylo nasbíráno 9 vzorků *B. carolinensis* z *P. gossypinus*, 6 z *N. floridana* a 1 z klíštěte *I. minor* (samce), krmícího se na hlodavci *N. floridana*.

Jako primární hostitelé *B. carolinensis* jsou křeček bavlnový - *P. gossypinus* a lesomýš floridská - *N. floridana*. Tito hlodavci jsou hostitelé pro různá klíšťata, jako jsou *I. scapularis*, *Ixodes affinis*, *I. minor*, *Dermacentor variabilis* a *Amblyomma maculatum*. Kvůli tomu, že tyto hlodavci, díky přírodním podmínkám, jsou velmi rozšířeni v jihovýchodní části Spojených států, mohlo dojít i k rozšíření *B. carolinensis* v této oblastech (Rudenko et al., 2009b).

## 2. Cíle práce

1. Literární studie k problematice.
2. Optimalizace podmínek kultivaci *B. americana*, *B. carolinensis* a *B. burgdorferi* sensu stricto spirochét v různých mediích vyrobených v laboratoři.
3. Optimalizace technik pro detekci spirochét LB v tkáních hostitelů.
4. Analýza infekčního potenciálu *B. carolinensis* a *B. americana* na laboratorním modelu.
5. Interpretace výsledků s důrazem na objasnění infekčního potenciálu nově popsaných druhů borelie.

### 3. Materiál a metody

V tabulce I je představen seznam použitých chemikálií v různých metodách.

Tab. I: Seznam použitých chemikálií.

Metoda	Materiál	Složení
Kultivace borelie	BSK - II médium	Připraveno podle protokolu P. Rosa (viz. postup přípravy)
	MKP médium	Připraveno podle protokolu E. Ruzic - Sabljic (viz. postup přípravy)
Izolace genomové DNA	Kit	DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen)
		NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel)
PCR	2x Master mix	Taq DNA polymeráza 400 μM dATP, 400 μM dGTP, 400 μM dCTP, 400 μM dTTP, 3mM MgCl <sub>2</sub> (Promega)
Real time PCR	FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)	FastStart Taq DNA polymeráza, SYBR green I, reakční pufr, dNTPs, barvivo (Roche)
Elektroforéza	Agarózový gel	1x TAE pufr, 1% agarosa (Serva)
	50x TAE pufr	200 mM Tris - HCl, 50 mM EDTA
	Marker	100 bp Gene Ruler (Promega)
	6x DNA Loading dye	0.03 % bromophenol blue, 0.03 % xylene cyanol, FF, 0.4 % orange G, 15 % Ficoll™ 400, 10 mM Tris - HCl (pH 7.5) a 50 mM EDTA (pH 8.0) (MBI Fermentas)
Purifikace PCR produktu	Kit	NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel)
Průtoková cytometrie	1x PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1,8 mM KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	Ředící roztok	2 % BSA, 5,4 mM glukóza v 1x PBS
	Propidiumiodid	1,5 μM C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> I <sub>2</sub> N <sub>4</sub> (Sigma Aldrich)

### **3.1. Příprava média**

#### **3.1.1. Médium BSK – II**

Médium bylo připraveno podle protokolu Dr. P. Rosa (USA). Přesné množství sloučenin pro přípravu 1 litru média: 10x CMRL 9,7 g/l, neopeptone 5 g/l, BSA 50 g/l, yeastolate 2 g/l, HEPES 6 g/l, glukóza 5 g/l, citrát sodný 0,7 g/l, pyruvát sodný 0,8 g/l, N-acetyl glukózamin 0,4 g/l, hydrogenuhličitan sodný 2,2 g/l, želatina 10 g/l.

Postup přípravy: Patřičné množství CMRL, neopeptonem a BSA bylo za stálého míchání rozpuštěno. Následně byly přidány další složky. Želatina byla rozpuštěna v horké vodě a přidána k ostatním složkám. pH roztoku bylo upraveno na 7,6 a roztok byl přefiltrován přes 0,2 µm filtr. Bylo přidáno tepelně opracované sterilní králičí sérum (konečná koncentrace 6%) a médium bylo uloženo v mrazáku (Dr. Rosa P., <http://www.niaid.nih.gov>).

#### **3.1.2. MKP médium**

Médium bylo připraveno podle protokolu Prof. E. Ruzic – Sabljic (Slovinsko):

Přesné množství sloučenin pro přípravu 1 litru média: 10x CMRL 9,7 g/l, N-acetyl glukózamin 0,4 g/l, glukóza 3 g/l, neopeptone 3 g/l, BSA 50 g/l, HEPES 6 g/l, hydrogenuhličitan sodný 2 g/l, želatina 10 g/l, kyselina citrónová 0.7 g/l, kyselina pyrohroznová 0,8 g/l, králičí sérum (3,6 ml na 50 ml základního média),

Postup přípravy: Všechny látky ve formě prášku byly kompletně rozpuštěny v 750 ml destilované vody. Bylo přidáno 100 ml 10x CMRL a pH bylo upraveno na 7,6 pomocí NaOH. Objem byl vodou doplněn na 1000 ml. Želatina, králičí sérum a BSA byly dány na 33 °C a po zahřátí byly přidány k základnímu médiu. Médium bylo filtrováno přes 2,2 µm filtr. Médium se nezmrazuje, uschovává se v ledničce maximálně po dobu jednoho měsíce.

### **3.2. Kultivace borelií**

Pomocí očkovací kličky byly zmražené kultury nasazeny do 10 ml BSK nebo MKP média ve sterilním prostředí. V pravidelných intervalech byl pozorován růst kultury pod mikroskopem temného pole.

### **3.3. Mikroskopie temného pole**

Kultury byly kontrolovány pod mikroskopem temného pole kvůli pozorování nárůstu a životnosti borelií. K určení koncentrace jednotlivé spirochéty byly počítány pomocí Petroff -

Hausserovy komůrky. Koncentrace se počítá pomocí vzorce  $A \times 1,25 \times 10^6$ , kde A je průměr spočítaných bakterií v 5-ti polích komůrky.

### 3.4. Infikování laboratorního modelu

Narostlá nekontaminovaná kultura borelie byla naředěna do  $1 \times 10^5$  spirochét ve 100  $\mu\text{l}$  - požadovaná koncentrace spirochét k inokulaci do myši.

Myši byly infikovány  $10^5$  spirochétami borelie (ve 100  $\mu\text{l}$ ) na každou myš pod kůži na břicho pomocí injekční jehly. Byly použity SCID myši a bílé laboratorní myši z chovu Parazitologického Ústavu kmene CD1.

Společně s *B. carolinensis* a *B. americana* byla kontrolní skupina myši infikovaná *B. burgdorferi* s.s. izolované z hlodavců.

Kromě myši byli použiti i samci pískomilů mongolských, kterým byla stejným způsobem aplikována *B. carolinensis*. Bylo aplikováno 250  $\mu\text{l}$  média s boreliemi o koncentraci  $10^5$  spirochét ve 100  $\mu\text{l}$ .

### 3.5. Odebírání tkání

Týden po infikování myši spirochétami borelií, byl odebrán kousek tkáně z ucha myši pomocí nůžek pro následnou analýzu. Tento krok se opakoval každý týden. Po uplynutí 5. - 6. týdnů od inokulace borelií byly myši usmrceny s následným provedením pitvy.

Při pitvě u každé myši byl odebrán kousek tkáně ze srdce, ucha, močového měchýře a kloubu. Následně byly myši vykrvené s cílem získat sérum pro reakce s komplementem.

Pískomilům byl po 14. dnech odebrán kus ocasu. Po uplynutí 5. týdnů byli usmrceni a byly jim vzaty stejné tkáně jako u myších modelů (vzor odebírání tkáně každý týden byl pozměněn kvůli náročnější manipulaci se zvířaty).

### 3.6. Kultivace borelie z tkáně

Tkáň odebraná z pískomilů byla promyta od nečistot a dána do média.

Promývání:

- 4 min – 70% ethanol
- 4 min – 10% roztok chloru (SAVO)



- 1 min – 95% ethanol
- 2 min - osušení filtračním papírem

Médium spolu s tkání bylo inkubováno 14 dní při 34 °C. Metoda byla převzata od Sinsky et al. 1989. Médium bylo prohlédnuto pod mikroskopem a částečně přeneseno do čerstvého media k další kultivaci. U zbytku vzorku došlo k odstranění tkáně a ke stočení média pomocí centrifugy při maximálních otáčkách po dobu 10 minut při 4 °C. Buňky byly použité pro k extrakci nukleových kyselin pomocí kitu ‘DNeasy® Blood & Tissue Kit, (Qiagen)’ k následujícímu prokazování přítomnosti borelií v kulturách pomocí PCR.

### 3.7. Extrakce nukleových kyselin z borelie a tkáně modelových zvířat

Borelie byly pomocí centrifugy odděleny od média při maximálních otáčkách po dobu 10 minut při 4 °C. Supernatant byl odsát a buňky byly dále zpracovány. Genomová DNA byla izolována z borelií pomocí kitu ‘DNeasy® Blood & Tissue Kit, (Qiagen)’ a z myší pomocí NucleoSpin® Tissue přesně podle protokolu od výrobce.

### 3.8. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

DNA borelií byla kontrolována na přítomnost genů *pncA*, *adeC*, *vlsE* metodou PCR. DNA myší byla z počátku kontrolována pomocí primerů na myší aktin a potom na přítomnost DNA borelií pomocí primerů pro flagelin a mezigenetický úsek 5S – 23S.

V tabulce II je zaznamenáno složení reakční směsi na 20 µl PCR reakce.

Tab. II: Přehled složení reakce pro PCR.

10 x pufr	2 µl	} 2x Master mix (Promega)
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2 µl	
Taq DNA polymeráza	0,5 µl	
10 mM dNTPs	1 µl	
1 mM Primer reverse	1 µl	
1 mM Primer forward	1 µl	
Templát (DNA)	1 - 4 µg	
Voda	závisí na množství templátu	

U každé reakce byla provedena pozitivní a negativní kontrola. Negativní kontrolou je voda, která nahrazuje DNA v kontrolní reakci, aby se dokázalo, že reakce proběhla bez kontaminace. Jako pozitivní kontrola na přítomnost borelií v celkové DNA myši, byla použita DNA borelie. U primerů pro gen *adeC* a *pncA* byla použita jako pozitivní kontrola DNA *B. afzelii* CB43 a pro gen *vlsE* - *B. burgdorferi* sensu stricto kmen B31, u kterých dřívě bylo prokázáno přítomnost těchto genů.

Tabulka III obsahuje sekvencí použitých primerů.

Tab. III: Přehled použitých primerů.

Primer pro:	Název primeru (F, R)	Sekvence primeru forward (5' -> 3')	Sekvence primeru reverse (5' -> 3')	Teplota nasedání (°C)	Reference
<i>pncA</i>	Primer pair 5	TAAAAACGGG GGCATTGGC	ACGCAAAAATCT AATGCCAATCCT	50	Purser et al., 2003
<i>adeC</i>	Primer pair 2	CTTCTTGTGTG CCGGCTTTG	TCGTGCCCATACC CTATTGC	55	Jewett et al., 2007
<i>vlsE</i>	Primer pair 1	TGGTGCGAAGG CTGATAAGG	TTACATCCTTCAG CGCACCC	55	Liveris et al., 2008
<i>actin</i>	Act	AGAGGGAAAT CGTGCGTGAC	CAATAGTGATGA CCTGGCCGT	60	Buxbaum et al., 2014
<i>flagellin</i> out	Fla out	AARGAATTGGC AGTTCAATC	GCATTTTCWATTT TAGCAAGTGATG	52	Clark et al., 2005
<i>flagellin</i> in	Fla inn	ACATATTCAGA TGCAGACAGA GGTTCTA	GAAGGTGCTGTA GCAGGTGCTGGC TGT	55	Clark et al., 2005
<i>flagellin</i>	FlaF1A, FlaR1	AGCAAATTTAG GTGCTTTCCAA	GCAATCATTGCCA TTGCAGA	55	Schwaiger et al., 2001
intergenic spacer out	23 SC1, 23 SN1	CTGCGAGTTCG CGGGAGA	TCCTAGGCATTCA CCATA	52	Rijpkema et al., 1995
intergenic spacer in	5SCB, 23 SN2	biotin- GAGAGTAGGTT ATTGCCAGGG	ACCATAGACTCTT ATTACTTTGACCA	55	Rijpkema et al., 1995

Reakční směs byla připravena v 200 µl mikrozkuhavce v Mastercycler personal (Eppendorf).

Tab. IV: Podmínky amplifikační reakce.

1. Počáteční denaturace	5 min	96 °C	→ 30 - 35 cyklu
2. Denaturace	30 s	95 °C	
3. Nasedání primerů	30 s	závisí na primeru	
4. Elongace	30 s	72 °C	
5. Konečná elongace	5 min	72 °C	

### 3.8.1. Průkaz infekce u myši: nested PCR

Po extrakci DNA z tkáně myši bylo provedeno PCR na jednotlivých vzorcích každého týdne. Byla provedena optimalizaci metody PCR pro detekci borelie v tkáni.

Pro zvýšení citlivosti reakce a potlačování inhibice cizorodou DNA (myši) ve vzorku byla použita dvou kroková nested PCR.

- Nested PCR – s primery pro intergenic spacer
  1. krok – primery 23 SC1 a 23SN1 (spacer)
  2. krok – primery 23 SN2 a 5SCB - jako templat bylo použito 5 µl z předchozí reakce.

### 3.9. Real time PCR (qPCR)

Metoda real time PCR neboli qPCR je kvantitativní modifikací běžné PCR reakce. Reakce qPCR se sleduje v reálném času, dochází ke sledování emitace fluorescence ze SYBR greenu, který je nespecificky navázaný na DNA. Reakce probíhá v Lightcycleru® 480.

Tab. V: Složení reakce pro qPCR o objemu 25µl.

2x SYBR Green master	12,5 µl
1 mM Primer reverse	1 µl
1 mM Primer forward	1 µl
Templát (DNA)	250 ng
Voda	závisí na množství templátu

Tab. VI: Podmínky reakce qPCR.

1. Počáteční denaturace	5 min	95 °C	→ 45 cyklů
2. Denaturace	10 s	95 °C	
3. Nasedání primerů	10 s	60 °C	
4. Elongace	10 s	72 °C	

V této metodě byly použity primery pro *flagellin* které dávají PCR produkt o velikosti 120 bp.

### 3.10. Elektroforéza v agarózovém gelu

Po proběhnutí amplifikační reakce, výsledky byly zkontrolovány elektroforézou v agarózovém gelu. Koncentrace gelu závisela na velikosti očekávaného PCR produktu (od 0,8 do 2,5 % agarózy). Elektroforéza byla prováděna v 1x TAE pufru. Pro zviditelnění PCR produktů pod UV zářením byl použit 5x pufr s obsaženým SYBR Green. Pro upřesnění velikostí PCR produktu byl použit marker 100 bp gene ruler (MBI Fermentas). Elektroforéza proběhla při cca 100 V. Gel byl vyfocený pod UV lampou a fotografie byla uložena.

### 3.11. Purifikace PCR produktu a sekvenování

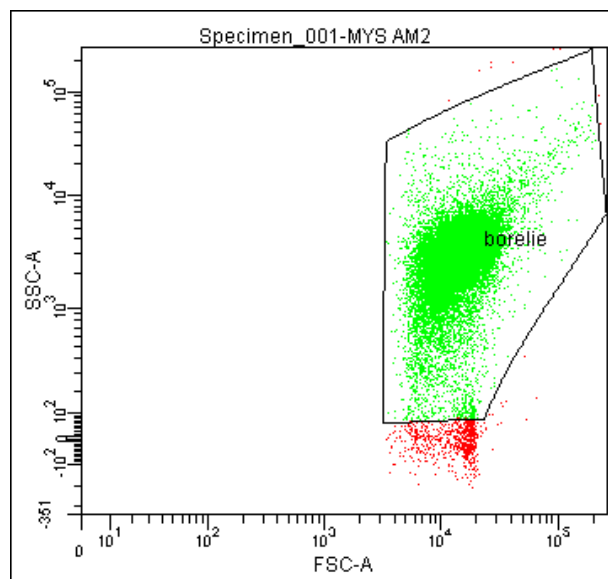
Purifikace PCR produktu z agarozového gelu, do 1% koncentrace, byla provedena pomocí kolon Millipore a při vyšší koncentraci agarozového gelu – pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Machere-Nagel) přesně podle protokolu od výrobce. Takto purifikovaný PCR produkt byl sekvenován z obou stran pomocí gen - specifických primerů v sekvenační laboratoři Biologického Centra AV ČR, České Budějovice. Výsledné sekvence byly zpracované pomocí příslušných programů (DNA Star) a ověřené v GenBanku.

### 3.12. Citlivost borelií ke komplementu zvířat, průtoková cytometrie

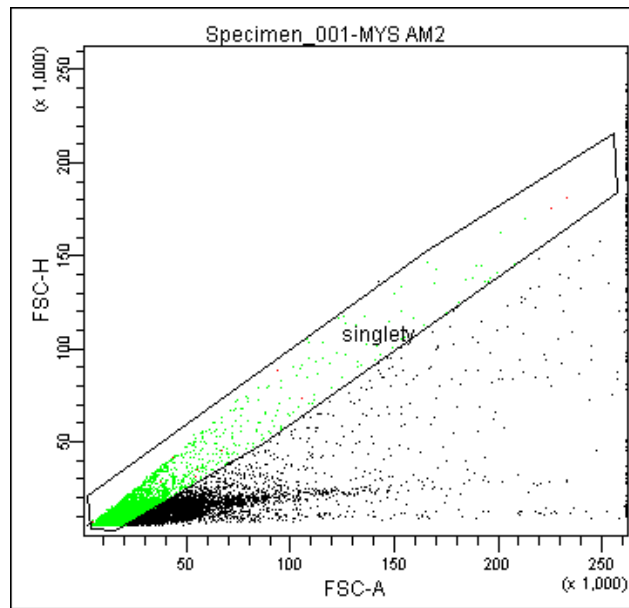
Sérum bylo získáno z krve myši, pomocí centrifugace na 2 000 rpm po dobu 10 minut a následovně filtrováno přes 2,2 µm filtr.

Test citlivostí borelií ke komplementu myši byl proveden na základě publikace Dr. Kurtenbacha (Kurtenbach et al., 1998). Borelie byly nakultivovány do koncentrace  $10^7$  spirochét v ml. V mikrozkušavce byla smíchána kultura a myši sérum v poměru 1:1. Vzorky byly inkubovány při 34°C po dobu šesti hodin. Jako pozitivní kontrola (živé buňky) byla použita čistá kultura borelií, bez přidání séra, která byla inkubována spolu s ostatními vzorky. Druhou kontrolou byla kontrola negativní (mrtvé buňky), kde spirochéty byly zahřívány na 56 °C po dobu 30 minut.

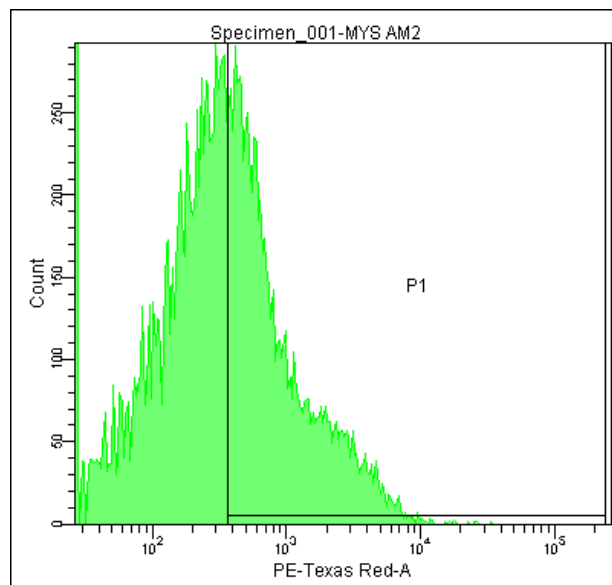
Pro vyhodnocení, zda myši komplement zabíjí buňky borelií byla použita průtoková cytometrie. Po ukončení inkubace vzorky byly centrifugované po dobu 15 minut na 10 000 rpm. Pelet borelie byl rozmíchán v 200 µl ředícího roztoku. Roztok byl přenesen do speciálních 5 ml zkumavek BD Falcon™ s kulatým dnem. Měření probíhalo se 30 000 událostmi. Borelie byly odděleny pomocí hodnoty měření v přímém a kolmém směru. Od vybraných bakterií byly odstraněny i shluky, a proto došlo k vybrání pouze jednotlivých buněk. Byla změřena intenzita fluorescence propidiumiodidu a určeno procent živých a mrtvých buněk v kanálu PE-Texas Red-A 616/23. Byla určena oblast P1, která označovala oblast s výskytem mrtvých buněk.



Obr. 3: Vymezení borelií měřením v přímém a kolmém směru (SCID myš + *B. americana*).



Obr. 4: Odstranění shluků a omezení na jednotlivé buňky (SCID myš + *B. americana*).



Obr. 5: Vymezená oblast P1 s mrtvými buňkami ( SCID myš + *B. americana*).

## 4. Výsledky:

### 4.1. Optimalizace podmínek kultivaci spirochét

Pro optimalizaci podmínek kultivaci spirochét bakterie byly inkubované ve třech médiích – komerčním BSK – Complete (Sigma), v laboratoří připraveném mediu BSK - II a MKP mediu. Po srovnání výsledků kultivace bylo zjištěno že:

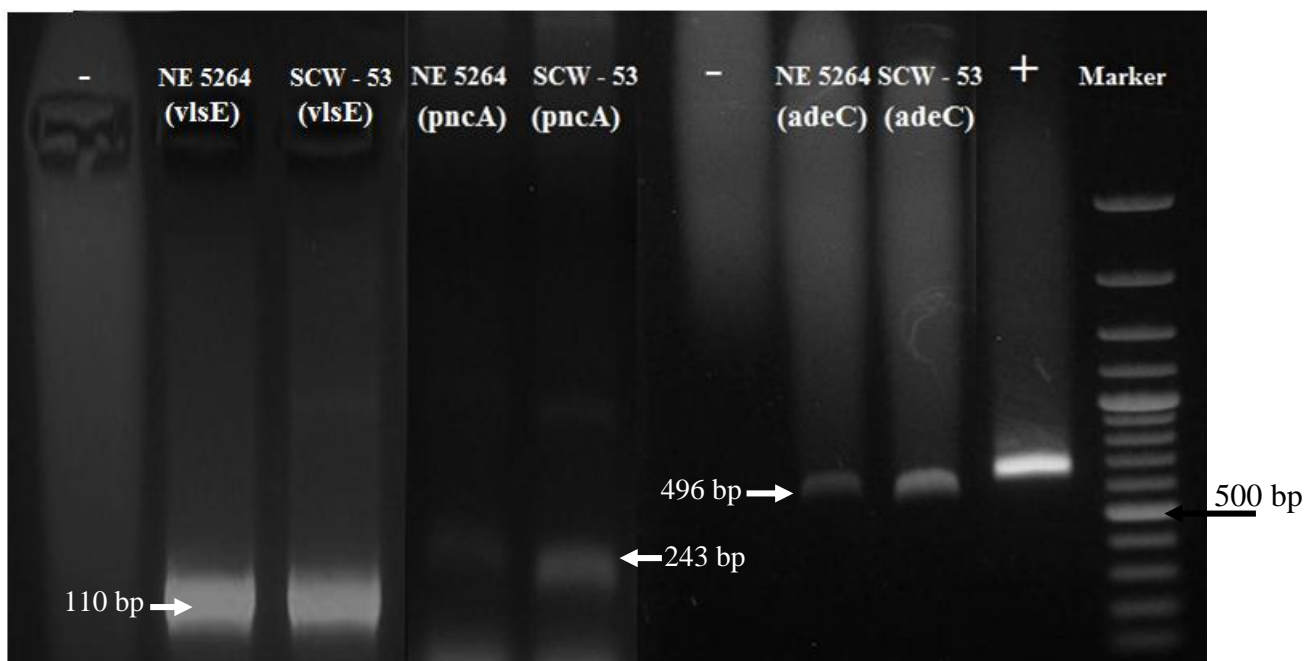
- Spirochéty *B. americana* - nejlépe rostly při teplotě 34 °C v BSK – II mediu, které bylo vyráběno přímo v laboratoří. To platilo pro obě kultury *B. americana* subtype A (strain SCW – 33) a B (strain SCW – 41).
- Na rozdíl od *B. americana* spirochéty, *B. carolinensis* nejlépe rostly v komerční BSK-H Complete (Sigma) mediu při stejné teplotě 34 °C. *B. carolinensis* rostla při teplotě 34 °C v porovnání s ostatními kulturami o poznání déle. *B. carolinensis* rostla nejhůře v MKP mediu.
- Kontrolní *B. burgdorferi* sensu stricto SCW – 53 a NE 5264 vyrostly nejrychleji v mediu MKP.

### 4.2. Vypracování metody infikování a detekce borelií v tkáních myši na pozitivní kontrole (*Bb* s.s.)

#### 4.2.1. Průkaz infekčnosti

V DNA, purifikovaného z každé kultury, nejprve byla prokázána přítomnosti genu důležitých pro rozvoj infekce - *pncA*, *adeC* a *vlsE*.

Na obrázku 6 jsou zobrazené PCR produkty jednotlivých genů přítomných v kontrolní kultuře *B. burgdorferi* sensu stricto NE 5264 (původ - Evropa) a SCW – 53 (původ - USA). Velikost PCR produktů genu *pncA* - 243 bp, genu *adeC* - 496 bp a genu *vlsE* – 110 bp.



Obr. 6: PCR produkty přítomných genů u kontrolních kultur (- negativní kontrola, + pozitivní kontrola)

V tabulce VII uveden přehled všech použitých modelových zvířat při experimentech. Všechny myši a pískomilové pocházeli z laboratorního chovu Biologického centra AV ČR, České Budějovice. Práce s laboratorními zvířaty se prováděla pod kontrolou oprávněné osoby (RNDr. R. Šimek, PhD)

Tab VII: Množství a kmen použitých myší při pokusech.

Kultura	SCID myši	CD1 myši	Pískomilové
<i>B. americana</i>	7	0	0
<i>B. carolinensis</i>	0	2	3
<i>B. burgdorferi</i> s.s. - SCW - 53 (pozitivní kontrola)	0	2	0
<i>B. burgdorferi</i> s. s. - NE 5264 (pozitivní kontrola)	0	2	0

#### 4.2.2. Průkaz infekce u myši (kontrolní skupina)

V tabulce VIII a IX jsou představené výsledky z testování myši na přítomnost borelií pomocí primeru na *flagellin*.



- 1 – 2 myš – *B. burgdorferi* s.s. izolát SWC – 53
- 3 – 4 myš – *B. burgdorferi* s.s. izolát NE 5264

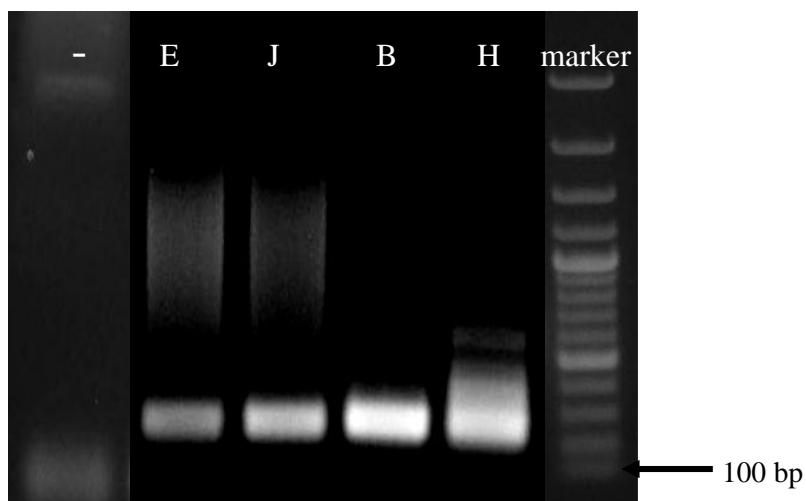
Tab. VIII: Nakažení myši borelií v jednotlivých týdnech.

Myš					
	Primer	1	2	3	4
1. týden	Fla out	-	-	-	-
2. týden	Fla out	-	-	-	-
3. týden	FlaF1A, Fla R1	-	-	-	-
4. týden	FlaF1A, Fla R1	+	+	+	+

Tab. IX: Detekce borelií ve tkáních myši po pitvě (PCR s primery FlaF1A, FlaR1).

Myš				
Tkáň	1.	2.	3.	4.
Ucho	+	+	+	+
Močový měchýř	+	+	+	+
Kloub	+	+	+	+
Srdce	+	+	+	+

Na obrázku 7 jsou představené výsledky PCR na prokázání přítomnosti borelií v myších tkáních. Pozitivní vzorky byly poslány na sekvenaci, a tak došlo k potvrzení výsledků z PCR. Velikost PCR produktu je 120 bp, byly použité primery pro *flagellin*.



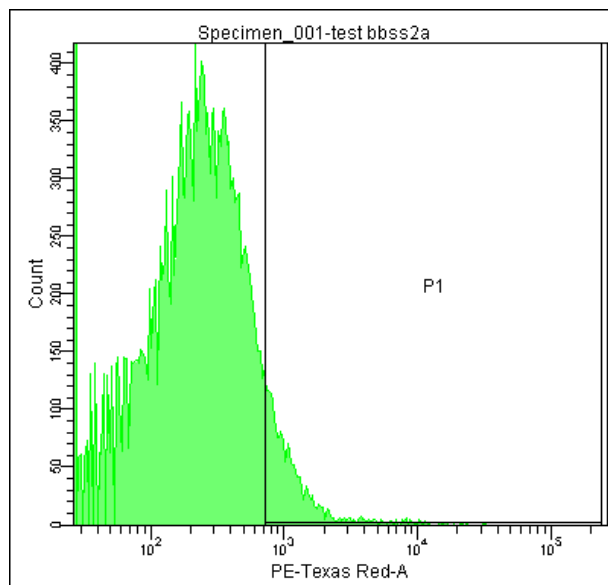
Obr. 7: PCR produkty představující přítomnost borelií ve 2. myši nakažené kulturou SWC - 53 (- negativní kontrola, E – ucho, J – kloub, B – močový měchýř, H – srdce, + pozitivní kontrola).

Infekce byla u všech myší detekovaná ve 4. týdnu. Pozitivita byla potvrzena i při pitvě. Borelie byly rozšířené ve všech zkoumaných orgánech.

#### 4.2.3. Reakce séra s *B. burgdorferi* s.s.

Pomocí reakce bylo zjištěno, že *B. burgdorferi* sensu stricto nejsou zabíjeny komplementem použitých hlodavců. Průtokový cytometr naměřil úmrtnost borelií 7,1% v případě myšího komplementu a 9,7% v případě komplementu pískomilů, což objasňuje výsledky z minulých experimentů. Experiment byl proveden s kulturou *Bb* s.s. SCW – 53.

Výsledky průtokové cytometrie jsou představené na obrázku 7 a 8.



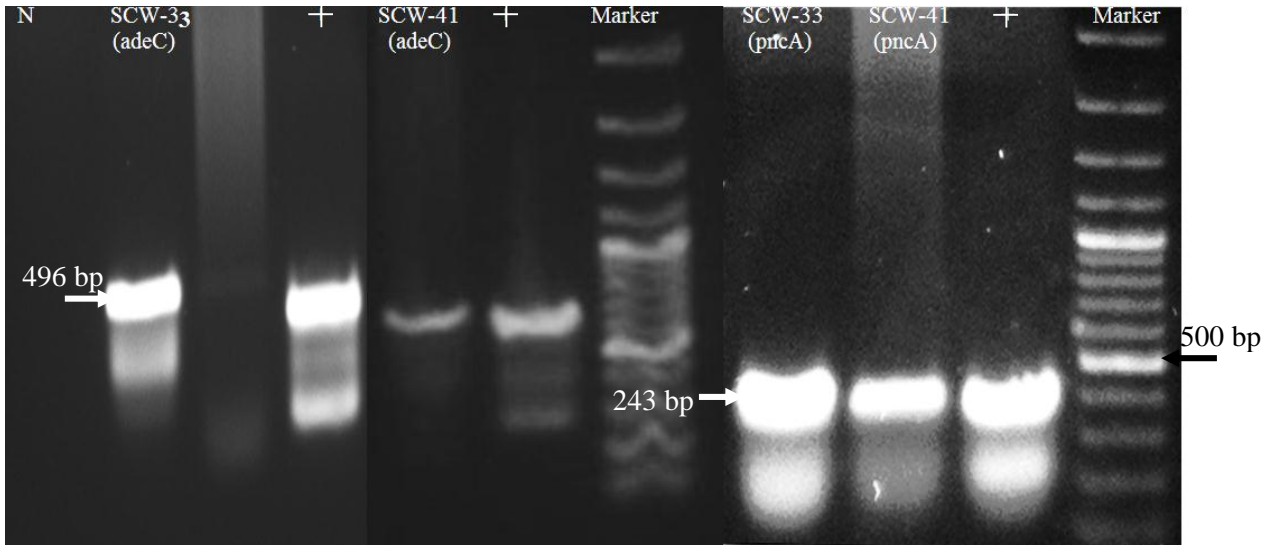
Obr. 8: Oblast P1 s mrtvými buňkami *Bb* s.s.

Experiment Name: EXP9 NELLY				
Specimen Name: Specimen_001				
Tube Name: test bbss2a				
Record Date: Mar 18, 2014 2:32:51 PM				
§OP: Administrator				
GUID: 06abcf14-7265-4878-80e7-31ca39c1d3d4				
				PE-Texas Red-A
Population	#Events	%Parent		Mean
<span style="color: red;">■</span> singlety	24,929	83.1		287
<span style="color: green;">■</span> borelie	24,905	99.9		286
<input checked="" type="checkbox"/> P1	1,765	7.1		1,531

Obr. 9: Výsledky naměřené z průtokového cytometru.

### 4.3. *Borrelia americana*

#### 4.3.1. Průkaz infekčnosti



Obr. 10: PCR produkty představují úseky genů *pncA* a *adeC* zodpovědné za infekčnost v *B. americana*.

V následující tabulce je přehled přítomnosti genů v jednotlivých kulturách *B. americana*. Gen *vlsE* není přítomen v tabulce z důvodu nespecificity primerů použitých v reakci. Původně primery byly připravovány na *B. burgdorferi* sensu lato, ale nemusí jednak být specifické pro *B. americana*.

Tab. X: Geny přítomné, popřípadě nepřítomné v kulturách (+ přítomnost genu, - nepřítomnost genu).

Geny	Kultura <i>B. americana</i>	
	SCW - 33	SCW - 41
<i>pncA</i>	+	+
<i>adeC</i>	+	+
<i>vlsE</i>	-	-

#### 4.3.2. Průkaz infekce u myši

V tabulce XI jsou představené výsledky prokázání infekce u myši pomocí různých metod v 1. týdnu.

Označení myši:

1. – 3. *B. americana* SCW – 33 – podtyp A

4. – 7. *B. americana* SCW - 44 – podtyp B

Tab. XI: Přehled použitých primerů u různých myší různé týdny (0 v tabulce = metoda nebyla u dané myši provedena, - negativní na přítomnost borelií).

	Myš							
	Primery	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
1. týden	Fla outer + cca 4 µg	-	-	-	-	-	-	-
	Fla outer + cca 2 µg	-	-	-	-	-	-	-
	Nested PCR - <i>flagellin</i>	-	-	-	-	-	-	+
	23 SC1, 23 SN1	-	-	-	-	0	0	0
2. týden	Fla outer + cca 4 µg	-	-	-	-	-	-	-
	23 SC1, 23 SN1	-	-	-	-	0	0	0
3. týden	Fla outer + cca 4 µg	-	-	-	-	-	-	-
	23 SC1, 23 SN1	-	-	-	-	0	0	0
4. týden	23 SC1, 23 SN1	-	-	-	-	-	-	-
	Fla outer + cca 4 µg	-	-	0	0	0	0	0

Primery na amplifikaci genu kodujícího *flagellin* byly použity s různou koncentrací DNA (templatu) v PCR reakci.

V 1. týdně byl získán nespecifický PCR produkt u 7. myši v metodě nested PCR. Po sekvenování bylo zjištěno, že jde o myši DNA.

V tabulce XII jsou výsledky PCR s primery pro amplifikaci 5S-23S mezigenového úseku a použitím vzorku z pitvy myši. Tyto vzorky byly pořízeny 6. týden od aplikace borelií. Při pitvě došlo k odebrání kousku tkáně z ucha, močového měchýře, kloubu a srdce.

Tab. XII: Výsledky provedého PCR s primery na integenic spacer z pitvy.

Myš							
Tkáň	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
Ucho	-	-	-	-	-	-	-
Močový měchýř	-	-	-	-	-	-	-
Kloub	-	-	-	-	-	-	-
Srdce	-	-	-	-	-	-	-

Borelie druhu *B. americana* nebyly detekované v tkání myši v průběhu týdnů. Přítomnost borelie tohoto druhu ve vnitřních orgánech hladovce prokázány nebyly.

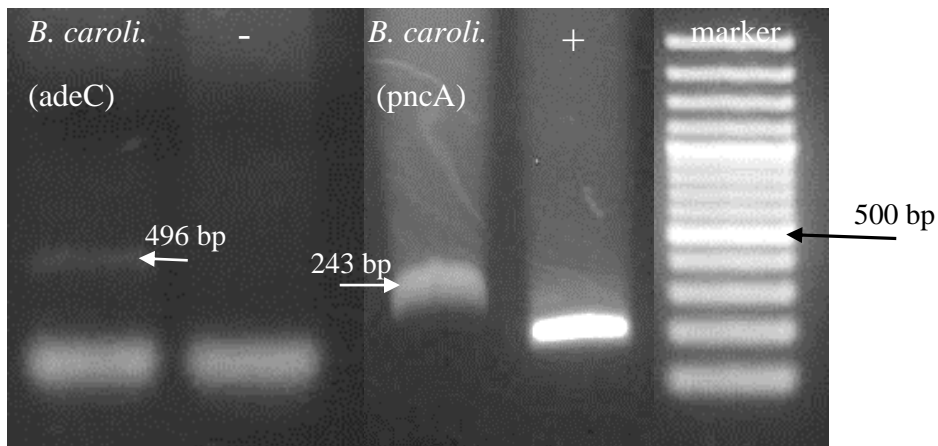
#### 4.3.3. Reakce séra s *B. americana*

Pomocí reakce bylo zjištěno, že borelie druhu *B. americana* jsou zabíjeny komplementem myši. Průtokový cytometr naměřil úmrtnost borelií 37,9%, což objasňuje výsledky z minulých experimentů.

#### 4.4. *Borrelia carolinensis*

##### 4.4.1. Průkaz infekčnosti:

Na obrázku 11 jsou představeny výsledky rozdělení PCR produktů na agarózovém gelu po amplifikaci s primery pro geny, které jsou zodpovědné za infekčnost. Gen *vlsE* nebyl v kultuře *B. carolinensis* prokázán, zřejmě ze stejného důvodu jako i v případě *B. americana*. Původní primery byly připraveny pro jiné druhy borelie.



Obr. 11: Fragментy genu po amplifikaci s primery pro geny *pncA* a *adeC*.

V tabulce XIII je přehled použitých kultur a ověření kultur na přítomnost genů zodpovědných za infekčnost borelií.

Tab. XIII: Přítomnost genů v kulturách *B. carolinensis*.

Geny	<i>B. carolinensis</i>
<i>pncA</i>	+
<i>adeC</i>	+
<i>vlsE</i>	-

##### 4.4.2. Průkaz infekce u myši a pískomilů

V tabulce XIV a XV jsou představené výsledky z testování myši na přítomnost borelií pomocí různých primerů.

- 1 – 2 myš
- 3 – 5 pískomil

Tab. XIV: Nakažení myši borelií v jednotlivých týdnech (0 v tabulce = metoda nebyla u dané myši provedena, - negativní na přítomnost borelií, + pozitivní na přítomnost borelií).

Laboratorní modely						
	Primer	1	2	3	4	5
1. týden	Fla out	-	-	0	0	0
2. týden	Fla out	-	-	+	+	+
3. týden	Fla F1A, Fla R1	+	+	0	0	0
4. týden	Fla F1A, Fla R1	+	+	0	0	0

Tab. XV: Výsledky nakažení myši borelií z pitvy.

Laboratorní modely					
	1	2	3	4	5
Tkáň					
Ucho	+	+	-	-	-
Močový měchýř	+	+	+	-	+
Kloub	+	+	+	+	+
Srdce	+	+	+	+	+

Reakce PCR byla prováděna s primery Fla F1A, Fla R1 a pro ověření výsledků byly použity primery fla out F/R a následně sekvenování PCR produktu.

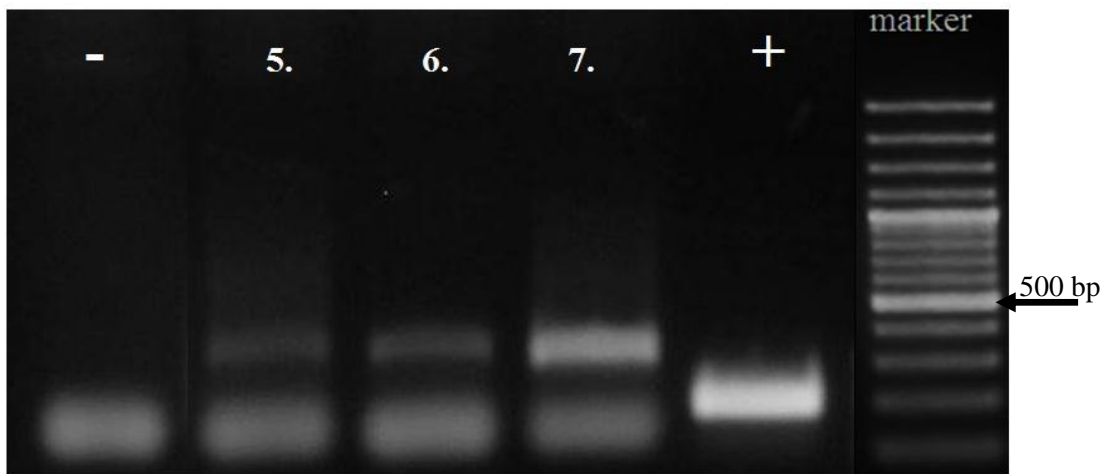
*B. carolinensis* byla detekována během pitvy ve všech zkoumaných orgánech.

#### 4.4.3. Kultivace borelie z tkáně pískomilů

Po 14 dnech od nasazení tkání do kultivačního media byly borelie viditelné pod mikroskopem temného pole u pískomila s označením 5. a 6. Po 4 týdnech od kultivování tkáně došlo k další kontrole média, kde byly viditelné spirochéty ve všech třech vzorcích.



Na obrázku 12 je výsledek PCR s použitými primery pro *flagellin* (fla outer) o velikosti 497 bp. Pro ujištění, zda se skutečně jedná o navázané borelie, PCR produkt byl osekvenován.



Obr. 12: Fragменты genu kódujícího *flagellin* byly přítomny u všech pískomilů po amplifikaci.

Výsledek potvrzuje předchozí přítomnost borelií pomocí metody PCR.

Sekvence fragmentu genu kódujícího *flagellin B. carolinensis*.

```

1 aaggaattgg cagttcaatc aggtaacggc acatattcag atgcagacag aggttctata
61 caaattgaaa tagagcaact tacagacgaa attaatagaa ttgctgatca agctcaatat
121 aaccaaatgc acatgttgtc aaacaaatct gcttctcaaa atgtaaaaac agctgaagag
181 cttggaatgc agcctgcaaa aattaacaca ccagcatcac ttcagggtc tcaggcttct
241 tggaccttaa gagttcatgt tggagcaaac caagatgaag ctattgctgt aaatatttat
301 gcagctaatag ttgcaaatct tttctctggt gagggagctc aaactgctca ggctgcacct
361 gttcaagaag gtgttcaaca agaaggagct caacagccag cacctgctac agcaccttct
421 cagggtggag ttaattctcc tgtaaatgtt acaaccacag ttgatgctaa tacatcactt
481 gctaaaatag aaaatgc

```

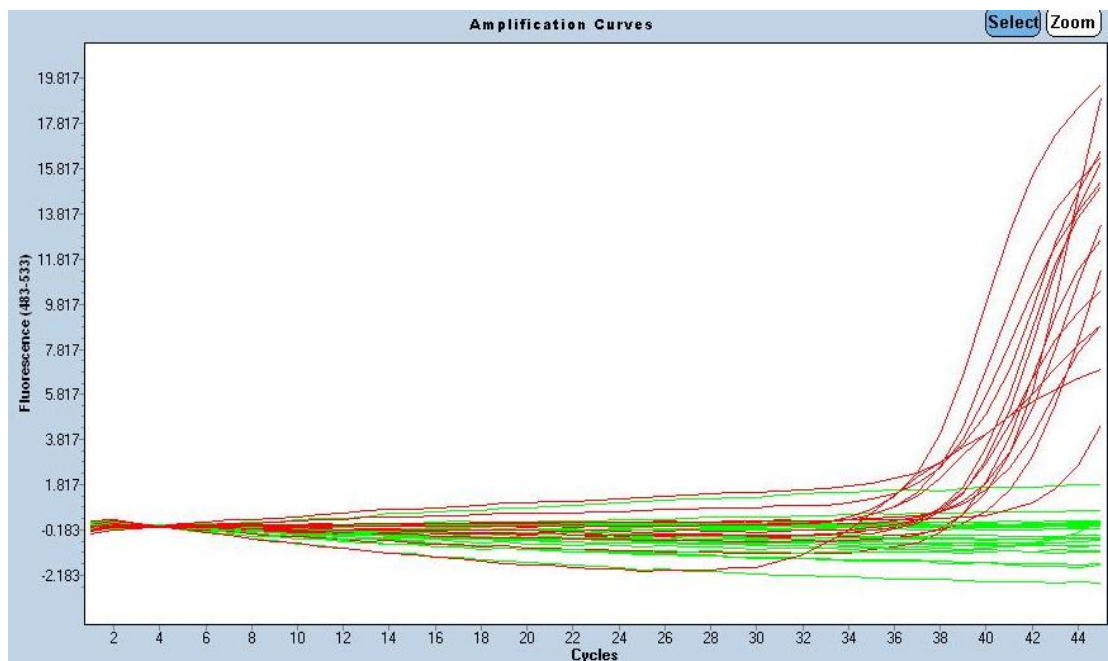
#### 4.4.4. Reakce séra myši s *B. carolinensis*

Test prokázal, že pouze 5,3% borelií bylo zabito pomocí komplementu. Zmíněný druh borelie je rezistentní ke komplementu myši.

#### 4.4.5. Real time PCR

Pro další potvrzení přítomnosti borelií ve tkáních hostitele byla použita metoda real time PCR.

Na obrázku 13 je amplifikační křivka, která ukazuje: červené - pozitivní vzorky (ve kterých byly borelie), zeleně - negativní vzorky. Pozitivní vzorky pochází z tkání pískomila i tkáně myši.



Obr. 13: Amplifikační křivka reakce.

## 5. Diskuze

Spirochéty komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato, dokážou proniknout do vnitřních tkání hostitelů a způsobit Lymskou boreliózu. LB se projevuje u myši podobně jako u lidí. SCID myši mají trochu horší průběh onemocnění, který někdy končí lézemi na srdci.

Do dnes bylo popsáno 20 druhů borelií, ovšem pouze 3 druhy byly prokázány jako definitivně patogenní pro člověka (*B. burgdorferi* s.s, *B. garinii*, *B. afzelii*). Nicméně se občas objeví i jiný druh borelie, který způsobí Lymskou boreliózu u člověka, přestože není považován za patogenní, popřípadě má jen patogenní potenciál.

Tato práce byla zaměřena na zjištění patogenního potenciálu nově popsaných druhů borelií z komplexu *Bb* s.1, *B. americana* a *B. carolinensis*, které byly izolovány ze vzorku, původem ze Severní Ameriky. Ověření schopnosti těchto druhů bakterií pronikat do různých tkání laboratorních myši a pískomilů, odpoví na otázku, zda *B. carolinensis* a *B. americana* jsou nebezpečné pro člověka. Pro porovnání patogenního potenciálu byla použita *B. burgdorferi* s.s., prokazatelně patogenní pro hlodavce.

### *B. americana*

*B. americana* byla popsána roku 2009 na základě analýzy sedmi izolátů z nymf klíštěte *I. minor*. Tyto nymfy byly sesbírané z ptáků ve Wedge Plantation, Charleston County a Jižní Karolíně na jihu Spojených států amerických. Pět ze sedmi nymf bylo získáno ze střízlíka karolínského (*Thryothorus ludovicianus*) a dvě byly izolovány z pipila rudookého (*Pipilo erythrophthalmus*). Na základě fylogenetické analýzy pěti různých lokusů bylo zjištěno, že tyto izoláty se seskupují dohromady s kmeny izolovanými dříve v Kalifornii, které pro malé množství izolátů a nedostatečné množství informací byly pojmenovány jako „genomospecies 1“ (Postic et al., 2007). Tyto izoláty byly také původně izolovány z klíšťat *I. pacificus* Dr. Tomem Schwanem (National Institutes of Health [NIH], Rocky Mountain Laboratories).

Všechny izoláty nového druhu, které byly pojmenovány *Borrelia americana* sp. nov., jsou totiž spojené s klíšťaty *I. pacificus* a *I. minor*. Klíšťata infikována *B. americana* na jihu USA se krmili na ptácích. Další hostitelé *B. americana* ještě nejsou známi.

Je tudíž neznámo, zdali *B. americana* může infikovat člověka nebo nemůže. Jak *I. spinipalpis* (západní USA), tak i *I. minor* (východní USA) nejsou typickými klíšťaty sajícími na člověku, sají jen ve velmi vzácných případech. Z tohoto důvodu by teoreticky nemělo docházet k přenosu infekce na člověka. Ovšem *I. pacificus* (západní USA) a *I. scapularis* (východní USA) jsou druhy klíšťat, které člověka kousou. Tato klíšťata sají i na stejných hostitelích jako *I. spinipalpis* a *I. minor*. Izoláty *B. americana* z *I. pacificus* potvrzují, že tento druh klíštěte, který napadá i člověka, může získat borelie z infikovaného hostitele. Teoreticky tak může dojít k přenesení *B. americana* na člověka. *B. americana* se zdá být druhem, který se tiše šíří mezi divokými zvířaty.

V experimentech v této práci se nepovedlo nakazit myši spirochétami *B. americana* při použitých podmínkách. Ani po 5 týdnech od infikování myši přítomnost *B. americana* ve všech tkáních nebyla potvrzena. Další experiment na citlivost *B. americana* k hostitelskému komplementu potvrdil předchozí výsledek, myší komplement byl schopný zneškodnit spirochéty tohoto druhu. Nicméně tyto experimenty nám nedávají konečnou odpověď o patogenním potenciálu *B. americana*. Neúspěšné nakažení myši může být způsobené vybraným druhem myši. Je možné, že jiný druh myši nebo jiného hlodavce by byl pro *B. americana* náchylný. Tuto domněnku potvrzuje fakt, že různé izoláty *B. burgdorferi* sensu lato mají různý infekční potenciál u různých hostitelů. Citlivost jiných druhů borelií vůči komplementu různých hostitelů již bylo popsáno (Gern et al., 1998, Kurtenbach et al., 1998).

Zjišťování patogenního potenciálu *B. americana* dostalo ještě větší význam po publikaci Dr. Kerry Clark z Univerzity Jižní Floridy, který analyzoval sekvence DNA borelie ze dvou pacientů nakažených LB ve Spojených státech. Tyto sekvence byly velice podobné *B. americana* (99%). Studie publikována v květnu 2013 v *International Journal of Medical Sciences* může vnést nové světlo na potenciální patogeneze tohoto nově popsaného druhu borelie (Clark et al., 2013).

Zřejmě je důvod pro další pokusy na jiných laboratorních modelech, nejspíše na ptácích. Výsledky budoucí práce jsou důležité pro určení hostitelů *B. americana* a tudíž i pro její rozšíření mezi divokými zvířaty a klíšťaty.

Mezitím, výsledky experimentů z této práce jsou dobrým příspěvkem k identifikaci hostitelských druhů, které nejsou rezervoárovými hostiteli *B. americana*. Tato data jsou také

velmi důležité, protože množství těchto hostitelů v dané oblasti může výrazně ovlivnit množství infikovaných klíšťat.

### **B. carolinensis**

Na rozdíl od *B. americana*, která byla izolována pouze z klíšťat, *B. carolinensis* byla vykultivována z ušní tkáně hlodavců, kteří jsou dvěma hlavními reservoáry pro *Borrelia burgdorferi* s.l. na jihu USA. Z 16 původních izolátů, které patřili do nové skupiny komplexu *B. burgdorferi* sensu lato a byly pojmenovány *B. carolinensis*, 9 izolátů bylo izolováno z křečka bavlnového (*P. gossypinus*), 6 z lesomyši floridské (*N. floridana*) a pouze 1 z klíštěte *I. minor*, samice, která se krmila na *N. floridana*. Zdá se tak, že *N. floridana* a *P. gossypinus* jsou primárními hostiteli tohoto druhu borelie. Geografické rozšíření obou druhů hlodavců a znalost, že na nich parazitují klíšťata *I. scapularis*, *I. affinis*, *I. minor*, *D. variabilis*, a *A. maculatum*, může být použito pro možnost předpokladu rozšíření *B. carolinensis* v USA. Epidemiologický význam *B. carolinensis* pro člověka nebo hlodavce až do teď není známý. Tento druh borelie je blízce příbuzný *B. bissetti*, která je přítomná v Kalifornii a je spojována s LB u lidí jak v Severní Americe, tak i v Evropě (Rudenko et al. 2009).

Na začátku byly nálezy *B. carolinensis* oznamovány pouze z jihovýchodní Ameriky, ale už v roce 2010, rok po objevení *B. carolinensis*, skupina francouzských vědců publikovala nález *B. carolinensis* v klíšťatech z jihu Francie (Cotté V. et al., 2010).

Dále, v roce 2014 Foley et al. popsali přítomnost *B. carolinensis* u hlodavců z Kalifornie, včetně domácích a polních myší, stejně jako v ohroženém, samostatném poddruhu kalifornského hraboše *Microtus californicus scirpensis* – podobný myši.

Veškeré objevy *B. carolinensis* svědčí o tom, že geografické rozšíření tohoto druhu borelie není omezeno jen místem jejího objevení.

Výsledky z této práce potvrdili patogenní potenciál *B. carolinensis* u hlodavců. Přítomnost *B. carolinensis* v každé analyzované hostitelské tkáni, byla potvrzena. Obdržená data, rozšíří naše znalosti ohledně infekčnosti tohoto druhu borelie a pomůže tak k pochopení, jestli tato borelie může být významným ohrožením i pro zdraví člověka.

Nicméně, i když detekce DNA borelií v hostitelské tkáni po laboratorním infikování znamená, že došlo k rozšíření infekce v těle hostitele, ovšem neprokazuje to schopnost přenosu borelie z infikovaného hlodavce na intaktní klíš'ata. Proto je nutné udělat další experimenty pro objasnění schopnosti přenosu *B. carolinensis* z nakažených zvířat na klíš'ata. Tato vědomost je důležitá pro představu celistvosti cyklu přenosu a šíření infekce *B. carolinensis*.

## 6. Závěr

- Bylo prokázáno že *B. americana*, *B. carolinensis* a *B. burgdorferi* sensu stricto vyžadují odlišné podmínky pro úspěšnou kultivaci *in vitro*.
- Spirochéty druhu *B. americana* podtypu A (strain SCW – 33) a B (strain SCW – 41) nejlépe rostly při teplotě 34 °C v BSK – II médiu vyráběném v laboratoři.
- Spirochéty druhu *B. carolinensis* nejlépe rostly v komerční BSK-H Complete (Sigma) médiu při teplotě 34 °C. MKP média vyráběná v laboratoři je nejméně vhodná pro kultivaci *B. carolinensis*.
- Kontrolní kmeny spirochét *B. burgdorferi* sensu stricto (SCW – 53 a NE5264) rostly nejrychleji v médium MKP vyráběném v laboratoři .
- *B. americana* a *B. carolinensis* obsahují nejméně dva geny, zodpovědné za infekčnost borelie, *pncA* a *adeC*. Nebylo možné ověřit přítomnost třetího genu, *vlsE*, což může být objasněno nespecifitou primerů, které byly připraveny na základě sekvence genu jiného druhu borelie.
- Bylo prokázáno, že při použitých laboratorních podmínkách spirochéty druhu *B. americana* nejsou schopné nakazit laboratorní myši (včetně SCID). Byla potvrzena citlivost tohoto druhu ke komplementu myši.
- Bylo prokázáno, že spirochéty druhu *B. carolinensis* jsou schopné infikovat myši i pískomily bez omezení, za použitých laboratorních podmínek. Přítomnost spirochét byla prokázána ve všech vnitřních tkáních, které byly testovány. Schopnost *B. carolinensis* infikovat hlodavce nepřímou ukazuje na potenciální riziko nákazy člověka tímto druhem borelie.

## 7. Nejpoužívanější zkratky

adeC – **a**denine deaminasa

bp – **b**áze

BSA – **b**ovin serum **a**lbumin

BSK – **B**arbour – **S**toenner - **K**elly medium

DNA – **D**eoxy**r**ibonucleic **a**cid

Fla - **F**lagellin

IgM – **i**munoglobulin **M**

LB – **L**ymská **b**orreliosa

MKP – **M**odifikované **K**elly – **P**ettenkofer médium

NCBI – **N**ational **c**enter for **b**iotechnology **i**nformation

Osp - **O**uter surface **p**roteins

PCR – **P**olymerase chain **r**eaction

pncA - **P**yrasinamidase /**n**icotinamidase

RNA – **R**ibonucleic **a**cid

rRNA – **R**ibosomal **R**NA

SCID - **S**evere **C**ombined **I**mmunodeficiency **D**isease

Th1 - **T** helper type **1** cells

VlsE - **v**ariable major protein - **l**ike sequence, **e**xpressed

## 8. Literatura:

1. Anguita, J., Hedrick, M., Fikrig E. (2003): Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the tick and the mammalian host. *FEMS Microbiology Reviews*. 27 (4), 493 – 504.
2. Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J., (1999): Lékařská mikrobiologie. *Marvil*. 10, 192 – 193.
3. Bhide, M. R., Travnicek, M., Levkutova, M., Curlik, J., Revajova, V., Levkut, M. (2005): Sensitivity of *Borrelia* genospecies to serum complement from different animals and human: a host–pathogen relationship. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 43 (2), 165–172
4. Bolehovská, R., Líšek, S., Plíšková, L., Čermáková, Z., Palička, V. (2009): Lymfská borelióza. *Klinická biochemie a metabolismu*. 17 (38), 24 – 28.
5. Bunikis, J., Tsao, J., Garpmo, U., Berglund, J., Fish, D., Barbour, A. (2004): Typing of *Borrelia* Relapsing Fever Group Strains. *Emerging Infectious Diseases journal*. 10 (9), 1661–1664.
6. Buxbaum, A. R., Wu, B., Singer, R. H. (2014): Single beta-actin mRNA detection in neurons reveals a mechanism for regulating its translatability. *Science*. 343 (6169), 419 - 422.
7. Casjens, S., Fraser-Liggett, C., Mongodin, E., Qiu, W., Dunn, J., Luft, B., Schutzer, S. (2011): Whole genome sequence of an unusual *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate. *Journal of Bacteriology*. 193 (6), 1489-1490.
8. Clark, L. K., James, H. O., John, M. G., Angela, M. J., Lance, A. D., Craig, W. B. (2001): Host associations of tick parasitizing rodents at *Borrelia burgdorferi* enzootics sites in south Carolina. *The journal of parasitology*. 87 (6), 1379 – 1386.
9. Clark, L. K., Hendrick, A., Burge, D. (2005): Molecular Identification and Analysis of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Lizards in the Southeastern United States *Appl. Environmental Microbiology*. 71 (5), 2616 – 2625.
10. Clark, L. K., Leydet, B., Hartman, S. (2013): Lyme Borreliosis in Human Patients in Florida and Georgia, USA. *The International Journal of Medical Sciences*. 10 (7), 915 - 931.



11. Cotté, V., Bonnet, S., Cote, M., Vayssier-Taussat, M. (2010): Prevalence of five pathogenic agents in questing *Ixodes ricinus* ticks from western France. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 10 (8), 723 - 30.
12. Foley, J., Ott-Conn, C., Worth, J., Poulsen, A., Clifford, D. (2014): An *Ixodes minor* and *Borrelia carolinensis* enzootic cycle involving a critically endangered Mojave Desert rodent. *Ecology and Evolution*. 4 (5), 576 – 581.
13. Gern, L., Estrada-Pena, A., Frandsen, F., Gray, J., Jaenson, T., Jongejan, F., Kahl, O., Korenberg, E., Mehl, R., Nuttall, P. (1998): European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 287 (3), 196 - 204.
14. Grubhoffer, L., Golovchenko, M., Vancová, M., Zacharová-Slavičková, K., Rudenko, N., Oliver, J. (2005): Lyme borreliosis: insights into tick- / host-borrelia relations. *Folia parasitol. Praha*. 52 (4), 279 – 294.
15. Ivanova, B., Tomova A., González-Acuña, D., Murúa, R., Moreno, C., Hernández, C., Cabello, J., Cabello, C., Daniels, T., Godfrey, H., Cabello, F. (2013): *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere. *Environmental Microbiology*. 16 (4), 1462 -2920.
16. Jewett, M.W., Lawrence, K., Bestor, A.C., Tilly, K., Grimm, D., Shaw, P., VanRaden, M., Gherardini, F., Rosa, P.A. (2007): The critical role of the linear plasmid lp36 in the infectious cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology*. 64 (5), 1358 -1374.
17. Karami A., 2012: Lyme disease. *InTech*. 2, 27 – 30, Chorvatsko.
18. Křupka, M., Raška M., Weigl E., (2008): Lymská borelióza – biologie, patogeneze, diagnostika a léčba. *Dermatologie pro praxi (online)*. 2 (5 – 6), 236 - 239.
19. Kurtenbach, K., Sewell, H., Ogden, N., Randolph, S., Nuttall, P. (1998): Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. *Infection and Immunity*. 66 (3), 1248 – 1251.
20. Lawrenz, M.B., Wooten, R.M., Norris, S.J. (2004): Effects of vlsE complementation on the infectivity of *Borrelia burgdorferi* lacking the linear plasmid lp28-1. *Infection and Immunity*. 72 (11), 6577 - 6585.

21. Lee, S., Lee, J., Park, H., Jang, W., Koh, S., Yang, Y., Kim, B., Kook, Y., Park, K. (2003): Differentiation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato through *groEL* gene analysis. FEMS Microbiology Letters. 222 (1), 51 – 57.
22. Liveris, D., Mulay, V., Sandigursky, S., Schwartz, I. (2008): *Borrelia burgdorferi* *vlsE* antigenic variation is not mediated by RecA. Infection and Immunity. 76 (9), 4009–4018.
23. Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., Clark, D. (2012): Brock Biology of Microorganisms, thirteenth edition. San Francisco. Benjamin Cummings.
24. Margos, G., Vollmer, S., Ogden, N., Fish, D. (2011): Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Infection, Genetics and Evolution, Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases (MEEGID). 11 (7), 1545 – 1563.
25. Postic, D., Garnier, M., Baranton, G. (2007): Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates – Description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. International Journal of Medical Microbiology. 297 (4), 263–271.
26. Purser, J.E., Lawrenz, M.B., Caimano, M.J., Howell, J.K., Radolf, J.D., Norris, S.J. (2003): A plasmid-encoded nicotinamidase (*PncA*) is essential for infectivity of *Borrelia burgdorferi* in a mammalian host. Molecular Microbiology. 48 (3), 753-764.
27. Ras, N. M., Lascola, B., Postiv, D., Cutler, S. J., Rodhain, F., Baranton, G., Mout, D. (1996): Phylogenesis of relapsing fever *Borrelia* sp.p.. International journal of systematic bacteriology. 46 (4), 859 – 865.
28. Rauter, C., Hartung, T. (2005): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a Metaanalysis. Applied and Environmental Microbiology. 71 (11), 7203 – 7216.
29. Rijpkema, S. G., Molkenboer, M. J., Schouls, L. M., Jongejan, F., Schellekens, J. F. (1995): Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. Journal clinical mikrobiology. 33 (12), 3091 - 3095.

30. Rosa, P.: NIAID, Laboratory of Molecular Genetics web page: [http://www.niaid.nih.gov/LabsAndResources/labs/aboutlabs/lzp/molecularGeneticsSection/Documents/lzp\\_recipes.pdf](http://www.niaid.nih.gov/LabsAndResources/labs/aboutlabs/lzp/molecularGeneticsSection/Documents/lzp_recipes.pdf). Citováno 14. 1. 2013.
31. Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Oliver, J. H., (2011): Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Tick and Tick Borne Diseases*. Journal of clinical mikrobiology. 2 (3), 123 – 128.
32. Rudenko, N., Golovchenko, M., Lin, T., Gao, L., Grubhoffer, L., Oliver, J. H. (2009a): Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, *Borrelia americana* sp. nov.. Journal of clinical mikrobiology. 47 (12), 3875–3880.
33. Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Oliver, J. H. (2009b): *Borrelia carolinensis* sp. nov., a New (14th) Member of the *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Complex from the Southeastern Region of the United States. Journal of clinical mikrobiology. 47 (1), 134 – 141.
34. Ruzic – Sabljic, E.: Cultivation of *Borrelia* from clinical samples. Institute of Microbiology and Immunology. Ljubljana. Slovenia. Protocol.
35. Schwaiger, M., Péter O., Cassinotti, P.: Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) infections using a real-time PCR assay. *Clinical Mikrobiolog Infection*. 7 (9), 461 – 469.
36. Sinsky, R. J., Piesman, J. (1989): Ear Punch Biopsy Method for Detection and Isolation of *Borrelia burgdorferi* from Rodents. *Journal of Clinical Microbiology*. 27 (8), 1723 – 1727.
37. Stanek, G., Reiter, M. (2011): The expanding Lyme *Borrelia* complex—clinical significance of genomic species. *Clinical microbiology infection*. 17 (4), 487 – 493.
38. Wang, G., Dam, A., Schwartz, I., Dankert, J. (1999): Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato: Taxonomic, Epidemiological, and Clinical Implications. *Clinical mikrobiology reviews*. 12 (4), 633 – 653.