

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Bakalářská práce**

**2014**

**Hana Hájková**

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Výskyt klíšťat a analýza jimi přenášených druhů borelie v rekreačních zónách v  
Českých Budějovicích a okolí.**

**Mapování výskytu *B. miyamotoi* v klíšťatech z vybraných regionů Jižních Čech.**

Bakalářská práce

Hana Hájková

Vedoucí práce: Nataliia Rudenko, PhD.

Školitel specialista: Maryna Golovchenko, MSc

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

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

České Budějovice 2014

Hájková, H., 2014: Výskyt klíšťat a analýza jimi přenášených druhů borelie v rekreačních zónách v Českých Budějovicích a okolí. Mapování výskytu *B. miyamotoi* v klíšťatech z vybraných regionů Jižních Čech. [Presence of ticks and analysis of tick-transmitted borrelia species in ticks from recreation sites of České Budějovice and nearby areas. Mapping of the prevalence of *B. miyamotoi* in ticks from selected regions of South Bohemia.] – 36 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:** Since its discovery, spirochetes from *B. burgdorferi* sensu lato complex has been the subject of many epidemiological studies. To determine its prevalence and the distribution of the different genospecies in ticks in different recreation areas around České Budejovice was the main goal of this study. The obtained data confirmed the presence of infected ticks in all locations under investigation. Our results represent the important information concerning the spreading of *Borrelia* infection in the city areas and the possible risk for the health of the population. The second part of the project was aimed at the determination of *B. miyamotoi* DNA in ticks collected in different parts of South Bohemia. This recently described *Borrelia* species represents the relapsing fever group of spirochetes, attracts the attention of the scientific community due to it proved pathogeneisity to humans. The presented data reveal the presence of *B. miyamotoi* in two out of 5 checked areas. The prevalence of *B. miyamotoi* corresponds to the one stated in this part of Europe by previous investigations. This is the first research that involves the investigation of *B. miyamotoi* species in South Bohemia (Czech Republic).

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

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím parametrů 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, 21.3.2014 ..... Hana Hájková

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce a vedoucí práce Maryně Golovchenko a Natashe Rudenko za možnost osvojení si nových laboratorních metod a za trpělivost během vypracovávání práce. Také bych chtěla poděkovat profesorovi Liborovi Grubhofferovi za příležitost pracovat v Laboratoři molekulární biologie vektorů a patogenů. Svým rodičům děkuji za trpělivost a podporu během celého studia.

## Obsah

1. Úvod .....	1
2. Hlavní cíle práce .....	2
3. Literární přehled .....	3
3.1 Morfologie spirochét.....	3
3.1.2 <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato .....	3
3.1.3 Lymeská borelióza v České republice .....	5
3.1.4 <i>Borrelia bissetii</i> .....	6
3.2 <i>Borrelia miyamotoi</i> .....	8
3.2.1 <i>Borrelia miyamotoi</i> v České republice .....	9
4. Materiál a metody .....	10
4.1 Sběr klíšťat.....	10
4.2 Zpracování vzorků klíšťat.....	10
4.2.1 Purifikace genomové DNA.....	10
4.2.2 Polymerázová řetězcová reakce (PCR).....	10
4.2.3 Elektroforéza.....	12
4.2.4 Extrakce DNA z gelu .....	12
4.2.5 Příprava vzorku na sekvenační reakci .....	12
4.3 Klonování a transformace .....	12
4.3.1. Purifikace plazmidové DNA.....	13
4.3.2. Ověření přítomnosti inzertu v plazmidu pomocí PCR a sekvenování.....	13
5. Výsledky .....	14
5.1 Charakteristika jednotlivých oblastí .....	15
5.2. Zastoupení jednotlivých druhů <i>Bb</i> s.l. a <i>B. miyamotoi</i> v pozitivních vzorcích .....	19
6. Diskuze .....	22
Prevalence klíšťat.....	23
Přítomnost <i>B. burgdorferi</i> s.l. v klíšťatech .....	23
Druhové zastoupení .....	24
<i>B. bissetii</i> .....	25
<i>B. miyamotoi</i> .....	26
7. Závěr.....	27
Použitá literatura.....	28

## Seznam použitých zkratk

<b>CM</b>	cytoplasmatická membrána
<b><i>Bb</i> s.l.</b>	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato
<b><i>Bb</i> s.s.</b>	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto
<b>LB</b>	Lymfská borelioza
<b>EM</b>	Erythema migrans
<b>PCR</b>	Polymerázová řetězcová reakce
<b><i>I. ricinus</i></b>	<i>Ixodes ricinus</i>
<b>RT-PCR</b>	Real-time PCR

## 1. Úvod

Lymfská borelióza - ohniskové onemocnění s výskytem závislým zásadně na přítomnosti původce - spirochéty komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato, vektoru, přenášejících patogen na hostitele a kompetentních rezervoárových hostitelích jak pro patogen tak i pro klíšťata - přenašeče. Neposlední roli hraje ale i mikroklima regionu v jednotlivých měsících či ročním období, které přímo ovlivňuje aktivitu klíšťat a také pohyb divokých zvířat a volnočasovou aktivitu lidí v přírodě.

V posledním desetiletí se míra urbanizace celosvětově výrazně zvyšuje. Rychlá urbanizace má za následek přesun lidské populace jejich zvýšeným cestováním např. za prací, nový bližší kontakt lidí a jejich domácích zvířat s přírodou. Vývoj městských oblastí je následován změnami v biodiverzitě fauny i flory. Zvýšená míra poměšťování vzbuzuje pozornost k problému vektorů a vektory přenášeným nemocem v těchto oblastech (Gratz, 1999; Comer et al., 2001; Robinson, 2005), ovlivňuje tak i vektory lidských a zvířecích onemocnění a neposledně má vysoký dopad na interakce patogenů a populací divoce žijících zvířat (Bradley a Altizer, 2007; Decker et. al., 2010).

Klíšťata byla vždy součástí městské přírody zejména příměstských částí obydlených oblastí. Urbanizace a lidské aktivity spojené s ní mohou tedy často pozitivně nebo negativně ovlivnit jak výskyt klíšťat, tak i přítomnost patogenů v nich.

## 2. Hlavní cíle práce

1. Literární studie k problematice.
2. Analýza vybraných rekreačních lokalit v Českých Budějovicích a okolí na intenzitu výskytu klíšťat.
3. Optimalizace technik pro detekci borelií vyvolávajících Lymfskou boreliózu a návratnou horečku v klíšťatech ze sběrů (nymfy, dospělci) v rekreačních oblastech v okolí Českých Budějovic.
4. Analýza druhů borelie přenášených klíšťaty v rekreačních zónách v Českých Budějovicích a okolí.
5. Mapování výskytu *B. miyamotoi* v dospělých klíšťatech z vybraných regionů Jižních Čech.
6. Interpretace výsledků s důrazem na použitelnost při mapování rekreačních lokalit v Českých Budějovicích a okolí a ochranu zdraví obyvatelstva.



### 3. Literární přehled

#### 3.1 Morfologie spirochét

Spirochéty *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*Bb* s.l.) jsou gramnegativní, mikroaerofilní bakterie a jsou charakteristické svým tenkým, spirálovitě vinutým tvarem o velikosti 0,2  $\mu\text{m}$  x 4-30  $\mu\text{m}$ . Tyto buňky jsou stočené, s pravidelnými závity, pohybují se rotací kolem podélné osy či smršťováním a natahováním. Tento pohyb je umožněn bičíky, které se vypínají mezi oběma konci buňky z bazálních disků rozmístěných v cytoplazmatické membráně (CM), obtáčí tělo borelie pod vnější buněčnou stěnou, která se skládá ze tří vrstev a to vnitřní peptidoglykanové, střední lipopolysacharidové a vnější lipoproteinové vrstvy. Fluidita vnější membrány je zásadní pro posun antigenních molekul proteinů, a buněčných glykosaminopeptidových receptorů, které jsou potřebné k adhezi s hostitelovými buňkami (Hulinská, 2006a).

Rod borelie zahrnuje dvě druhové skupiny. První skupinu tvoří druhy borelie způsobující návratnou horečku. Do této skupiny patří například *B. miyamotoi*, *B. duttonii*, *B. parceria*, *B. hermsii*. Borelie této skupiny jsou v přírodě přenášeny převážně klíšťaty z čeledi *Argasidae*, tzv. "soft-ticks". Druhou skupinou borelii je komplex *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Druhy spirochét této skupiny jsou přenášeny klíšťaty z čeledi *Ixodidae*, tzv. "hard-ticks".

##### 3.1.2 *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Komplex *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*Bb* s.l.) je různorodou skupinou celosvětově rozšířené bakterie, která již zahrnuje 20 popsáných druhů spirochét a některé doposud nepojmenované izoláty, například "genospecies 2" (Postic et al., 2007). Popis a rozpoznávání nových variant a druhů stále pokračuje, tudíž nynější číslo popsáných druhů není pravděpodobně konečné. U většiny známých druhů spirochét se předpokládá, že mají omezenou distribuci. Deset druhů z komplexu *B. burgdorferi* s.l. bylo identifikováno a spojováno s Eurasií (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. japonica*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. valaisiana*, *B. sinica* a *B. yangtze*), zatímco *B. americana*, *B. andersonii*, *B. californiensis*, *B. carolinensis* a *B. kurtenbachii* byly dříve považovány za vymezené jen pro USA (Rudenko et al., 2009a, 2009b; Margos et al., 2010). *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (*Bb* s.s.), *B. bissettii* a *B. bavariensis* spolu sdílí odlišnost v přítomnosti v obou v Novém a Starém Světě. Nově nalezený druh *B. chilensis* byl identifikován v Jižní Americe (Chile), kde se předpokládalo, že *Bb* s.l. není přítomna, kromě Uruguaye (Ivanova et al., 2013). Dalším

druhem, který byl nedávno nalezený ve Finsku je *B. finlandensis*. Přesné rozšíření těchto druhů doposud není známo (Casjens et al., 2011). Z 20 druhů *Borelie*, 3 běžně a 4 příležitostně infikují člověka a způsobují Lymfskou boreliózu (LB). Geografické rozšíření jednotlivých druhů borelie je uvedeno v tabulce 1.

**Tab.1:** Geografické rozšíření druhů borelie. Zdroj: (Rudenko et al., 2011), aktualizováno.

Druh borelie	Vektor	Host/reservoir	Geografické rozšíření	Citace
<i>B. afzelii</i>	<i>I. ricinus, I. persulcatus</i>	hlodavci	Asie, Evropa	Canica et al. (1993)
<i>B. americana</i>	<i>I. pacificus, I. minor</i>	ptáci	USA	Rudenko et al. (2009c)
<i>B. andersonii</i>	<i>I. dentatus</i>	Králík divoký	USA	Marconi et al. (1995)
<i>B. bavariensis</i>	<i>I. ricinus</i>	hlodavci	Evropa	Margos et al. (2009)
<i>B. bissetii</i>	<i>I. ricinus, I. scapularis, I. pacificus, I. minor</i>	hlodavci	Evropa, USA	Postic et al. (1998)
<i>Bb s.s.</i>	<i>I. ricinus, I. scapularis, I. pacificus</i>	hlodavci, ptáci, ještěrky, velcí savci	Evropa, USA	Baranton et al. (1992)
<i>B. californiensis</i>	<i>I. pacificus, I. jellisonii, I. spinipalpis</i>	klokan, jelenec ušatý	USA	Postic et al. (2007)
<i>B. carolinensis</i>	<i>I. minor</i>	hlodavci, ptáci	USA	Rudenko et al. (2009b)
<i>B. garinii</i>	<i>I. ricinus, I. persulcatus, I. hexagonus, I. nipponensis</i>	ptáci, ještěrky, hlodavci	Asie, Evropa	Baranton et al. (1992)
<i>B. japonica</i>	<i>I. ovatus</i>	hlodavci	Japonsko	Kawabata et al. (1993)
<i>B. kurtenbachii</i>	<i>I. scapularis</i>	hlodavci	Evropa, USA	Margos et al. (2010)
<i>B. lusitaniae</i>	<i>I. ricinus</i>	hlodavci, ještěrky	Evropa, Severní Afrika	Le Fleche et al. (1997)
<i>B. sinica</i>	<i>I. ovatus</i>	hlodavci	Čína	Masuzawa et al. (2001)
<i>B. tanukii</i>	<i>I. tanuki</i>	neznámý (pravděpodobně kočky, a psi)	Japonsko	Fukunaga et al. (1996)
<i>B. turdi</i>	<i>I. turdus</i>	ptáci	Japonsko	Fukunaga et al. (1996)
<i>B. spielmanii</i>	<i>I. ricinus</i>	hlodavci	Evropa	Richter et al. (2006)
<i>B. valaisiana</i>	<i>I. ricinus, I. granulatus</i>	ptáci, ještěrky	Asie, Evropa	Wang et al. (1997)
<i>B. yangtze</i>	<i>Haemaphysalis longicornis, I. granulatus</i>	hlodavci	Čína	Chu et al. (2008)
<b>Genomospecies 2</b>	<i>I. pacificus</i>	neznámý	USA	Postic et al. (2007)
<i>B. chilensis</i>	<i>I. stilesi</i>	krysy <i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	USA	Ivanova et al. (2013)
<i>B. finlandensis</i>	<i>I. ricinus</i>	neznámý	Evropa	Casjens et al.(2011)

Epidemiologické data z mnoha Evropských zemí a z USA ukazují dramatický vzestup diagnostikovaných případů LB díky vývoji nových, pokrokových, diagnostických metod během posledních deseti let (Hubálek, 2009). Centra pro kontrolu a prevenci onemocnění ve Spojených státech (CDC) ukázaly vysokou incidenci případů onemocnění LB, která je větší

než 300 000 případů ročně. Většina těchto případů byla vyšetřena u žen a dětí. Podle této nejnovější informace by měla být LB uznávána za epidemii, která je alespoň 6x častější než HIV/AIDS (Stricker a Johnson, 2014).

Nyní se změnila i definice onemocnění. Co dříve nebylo považováno za Lymskou boreliózu, nyní může být.

Jak už bylo řečeno z 20 druhů borelií, které byly doposud identifikovány, jsou pouze některé považovány za prokazatelné původce Lymské boreliózy: *Bb* s.s., *B. garinii* a *B. afzelii*. Každý druh má určitý tropismus, což znamená, že jednotlivé druhy jsou spojované s různými klinickými projevy onemocnění. Například, *B. garinii* většinou způsobuje neurologické symptomy, *B. afzelii* je spojována s chronickými kožními projevy jako např. erythema migrans (EM) a *Bb* s.s. se vztahuje ke kloubnímu postižení.

### 3.1.3 Lymská borelióza v České republice

Území České republiky patří v Evropě mezi lokality s největším výskytem onemocnění přenášených klíšťaty, mezi které se řadí i Lymská borelióza (Hubálek, 2009; Süss, 2011). Rozšíření onemocnění závisí nejen na geografických, klimatických a ekologických faktorech, ale i na patogenezí každého druhu komplexu *Bb* s.l. Dále je důležité geografické rozšíření druhu komplexu, přítomnost několika druhů spirochét ve vektoru a hostiteli najednou nebo i možnost spolupůsobení s dalšími patogeny, jako u viru klíšťové encefalidity. Studie z roku 2004, provedena Státním zdravotním ústavem v Praze, vyšetřila 87 pacientů s Lymskou boreliózou pocházející z Moravy, východních a středních Čech. Sekvenací fragmentů genu kódujícího povrchový antigen OspA byla u pacientů ze středních Čech prokázána přítomnost různých subtypů *B. garinii* v 51,8 %, *Bb* s.s. v 29,6 % a *B. afzelii* v 18,5 % vzorků. Ve východní oblasti výrazně dominovala *B. garinii*. U pacientů z Moravy byla určena prevalence *B. afzelii* v 44 %, následovaná *Bb* s.s. v 36 % a v 20 % zbývajících infekcí *B. garinii* (Hulínská et al., 2004). Podle těchto výsledků můžeme odvodit výskyt jednotlivých forem onemocnění LB. Je zřetelné, že ve Středních Čechách budou převažovat neurologické symptomy a případy artritidy, ve Východních Čechách neurologické symptomy a na Moravě postižení kůže známé nejčastěji jako erythema migrans.

Během posledních dvou desetiletí se rozšířila distribuce vektoru a patogenu i do oblastí s vyšší nadmořskou výškou a počty případů onemocnění za rok také vzrostly (Danielová a Beneš, 1997; Daniel et al., 2003; Kříž et al., 2012). Výškový posun se dá snadno vysvětlit klimatickými změnami a migrací zvířat (Zeman a Beneš, 2004; Danielová et al., 2006; Materna et al., 2008). Pozorované oteplování v jarních a letních měsících, kdy je aktivita klíšťat vysoká, vytváří vhodné podmínky pro přesun klíšťat ptáky nebo na migrujících zvířatech do vyšších nadmořských výšek všech horských oblastí v Česku. Nicméně podíl těchto změn na zvýšení počtu případů onemocnění je celkem malý a vztahuje se na zvýšené území zahrnující přibližně 3% z celkové rozlohy země.

### **Lymeská borrelióza ČR** *incidence na 100 000 osob podle regionů*



**Obr.1:** Výskyt onemocnění LB v regionech České republiky za rok 2006, Zdroj: <http://www.szu.cz/tema/prevence/diagnostika-lymeske-borreliozy-v-nrl-lb>.

V dnešní době byla u pacientů s LB v České republice prokázána velice neobvyklá *B. bissetii* (Rudenko et al., 2008; Rudenko et al., 2009). Jsou známy i odlišné druhy borelií nespádající do komplexu *Bb* s.l., které člověku způsobují závažná onemocnění, jde o druhy, které patří do komplexu borelií způsobujících návratnou horečku ke kterým patří *B. miyamotoi*.

#### **3.1.4 *Borrelia bissetii***

*B. bissetii* byla poprvé popsána v roce 1998 v USA (Postic et al., 1998) jako genomická skupina DN127. Ekologie tohoto druhu borelie byla zkoumána v severozápadní Kalifornii. Bylo dokázáno, že vektorem *B. bissetii* je klíště *I. spinipalpis* a mezi hlavní

hostitele patří dlouhoocasé myši rodu *Neotoma*, na kterých mimo jiné parazitují také *I. scapularis* a *I. pacificus*. Výskyt tohoto druhu spirochét byl zaznamenán zejména v oblastech s mírným podnebím, hojnými srážkami a suchým létem (např. v Kalifornii, Mexiku, Chile a podél jižního pobřeží Austrálie) (Eisen et al., 2009). Přítomnost *B. bissettii* v Evropě nebyla zaznamenána do konce 20. století.

Po dlouhou dobu byly závěry o nízké patogenitě *B. bissettii* založeny na analýze kmenu 25015. Tento kmen byl izolován z *I. scapularis* odebraného z křečka zachyceného ve městě Millbrook (New York, USA). Už dávno byla potvrzena infekčnost (Anderson et al., 1990), ale ne patogenita tohoto kmene a tento názor přetrval až do objevení článků o evropských izolátech v roce 1997 spojujících *B. bissettii* s LB. Před více než patnácti lety prezentoval Dr. Strle klinické nálezy u slovenských pacientů trpících LB, která byla způsobena borelií podobnou severo-americkému kmenu 25015 (Strle et al., 1997). Kmen 25015 byl připsán ke genomické skupině DN127 *B. bissettii* navzdory patřičným genetickým rozdílům mezi kmeny (Postic et al., 1998). Další zkoumání kmene na myším modelu ukázalo jeho artritogenní účinky (Fikrig et al., 1992). Nedávné testování fylogenetické příbuznosti několika kmenů dříve řazených mezi *B. bissettii* ukázalo, že kmen 25015 a několik dalších kmenů se odlišují od *B. bissettii*. Tato skupina zahrnuje nejen vzorky izolované z kultury, ale i DNA extrahované z nymfy klíštěte *I. scapularis* odebrané z člověka v Kanadě. Všechny tvoří nový druh borelie pojmenovaný *B. kurtenbachii* sp. nov. (Margos et al., 2010). A tak byl kmen *B. bissettii* rozdělen pomocí MLSA ("multilocus sequence analysis") do dvou genových druhů s možnou patogenitou u lidí.

Vzrůstající nálezy druhu *B. bissettii* jako příčiny LB v Evropě jsou ještě podpořeny opakovanými nálezy spirochét podobným kmeni 25015 a DN127 u evropských pacientů (Rudenko et al., 2008; Rudenko et al., 2009). První případ popsání *B. bissetti* u pacientů v Severní Americe byl nedávno publikován skupinou Dr. Girard, která po analýze DNA borelie ve vzorcích pacientů s LB ve státě Kalifornie (USA) objevila DNA *B. bissettii* (nebo *B. bissettii*-like) a to ve 2,6% analyzovaných vzorků (Girard et al., 2010).

Zajímavým faktem se ukázal být původ kmenů *B. bissettii* a na něm závislé uchycení onemocnění ve tkáni. *B. bissetti* pocházející z hlodavce způsobila patogenezí ve vnitřních tkáních hostitele i když *B. bissetti* izolována z klíštěte toto nevyvolala. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že borelie pocházející z klíštěte vykazuje určitý tkáňový tropismus a je odstraňována imunitním systémem (Schneider et al., 2008).

V České republice byla *B. bissettii* ve vzorcích pacientů poprvé popsána v roce 2008. Celkem 12 vzorků sér bylo odebráno u pacientů se symptomy LB z Jižních Čech, u kterých se vyskytly nejasné výsledky serologických testů. Vzorky byly zkoumány na přítomnost DNA spirochét borelie a byla u nich prokázána *B. bissettii*. Často byla detekována i konfekce jiným druhem borelie (Rudenko et al., 2008; Rudenko et al., 2009).

### 3.2 *Borrelia miyamotoi*

*B. miyamotoi* patří ke skupině borelie způsobující návratnou horečku. Návratná horečka je onemocnění způsobené různými druhy borelie, které jsou přenášeny především klíšťáky (*Argasidae*). Nicméně před nedávnem byl tento druh borelie objeven i v klíšťatech (*Ixodidae*), ve kterých byla prokázána přítomnost druhu borelie způsobující návratnou horečku a to *B. miyamotoi*.

*B. miyamotoi* byla izolována poprvé v Japonsku v roce 1995 z klíšťat *I. persulcatus* a z krve myši *Apodemus argenteus* (Fukunaga et al., 1995). DNA blízce příbuzných spirochét byla následně detekována v USA a to v klíšťatech *I. pacificus* (Mun et al., 2006) a *I. scapularis* (Scoles et al., 2001). *B. miyamotoi* byla nalezena v *I. ricinus* v Evropě, a to ve Švédsku (Fraenkel et al., 2002) a Německu (Richter et al., 2003). V Evropských a Asijských oblastech Ruska byla detekována DNA *B. miyamotoi* v *I. persulcatus* (Fomenko et al., 2010) a *I. ricinus*. Navíc se ukázalo, že křeček bělonohý (*Peromyscus leucopus*) může sloužit jako rezervoárový hostitel pro *B. miyamotoi* (Scoles et al., 2001). Později *B. miyamotoi* byla také detekována v divoké krůtě (*Meleagris gallopavo*) (Scott et al., 2010).

V průběhu posledních deseti let byla *B. miyamotoi* detekována u klíšťat rodu *Ixodes* v USA (Scoles et al., 2001; Mun et al., 2006), Švédsku (Wilhelmsson et al., 2010), České republice (Richter et al., 2002), Francii, Německu (Richter et al., 2003) a v Rusku (Fomenko et al., 2010; Borgoiakov et al., 2011; Korotkov et al., 2008).

Procentuální zastoupení *B. miyamotoi* v klíšťatech se průměrně pohybuje kolem 1-3%. V Rusku je to v průměru  $1,1 \pm 0,6\%$  (Fomenko et al., 2010), Kalifornii - 0,7 – 1,7% v klíšťatech *I. pacificus* (Jeomhee et al., 2006), na západě Spojených států bylo detekováno 1,9 – 2,5 % (Scoles et al., 2003) v Evropě - 0,7 – 3,5% v klíšťatech *I. ricinus* (Richter et al., 2003).

Zvýšenou pozornost k tomuto druhu borelie vyzvala detekce těchto spirochét v lidské krvi nejprve v Rusku (Platonov et al., 2011) a potom ve Spojených Státech (Gugliotta et al., 2013).

Infekce způsobená *B. miyamotoi* je spojována se symptomy jako jsou celosystémové obtíže ke kterým patří horečka, nevolnost a malátnost. U amerických pacientů se sníženou imunitou bylo v nynější době prokázáno, že *B. miyamotoi* je schopná způsobit i meningoencefalitidu. *B. miyamotoi* byla však prokázána i u pacientů bez potíží v imunitní odpovědi, kteří žijí v oblastech, kde je LB vysoce rozšířená. U těchto pacientů byl detekován *GlpQ* protein, což je antigen, který není reaktivní s protilátkami proti *B. burgdorferi*. Tyto studie předpokládají, že infekce způsobené *B. miyamotoi* mohou být stejně rozšířeny v oblastech ve kterých je LB endemická.

Na rozdíl od spirochét LB, *B. miyamotoi* a další spirochéty návratné horečky jsou vertikálně přenášeny z dospělé samice klíštěte na její potomky (Davis et al., 2011; Richter et al., 2002; Schwan et al., 2002). Také přenos spirochét spolukrměním z nymf na larvy a horizontální přenos z infikované myši na klíšťata byl experimentálně prokázán (Barbour et al., 2009; Mun et al., 2006) avšak v nižší míře, než u *Bb* s.l. (Scoles et al., 2001).

### **3.2.1 *Borrelia miyamotoi* v České republice**

V posledních deseti letech se objevily studie *B. miyamotoi* prováděné i českými vědci a to na klíšťatech rodu *I. ricinus* (Richter D. et al., 2002).

Pozitivní výsledky detekce patogenu v tvrdých klíšťatech byly dosaženy díky použití citlivé a spolehlivé metody RT-PCR (Morrison et al. 1999; Pietila et al. 2000; Mommert et al. 2001; Hulinská et al. 2004; Rudenko et al. 2005) pro genotypizaci kmenů genu borelie, kterou následně porovnávali s výsledky nové metody EE chips ("Experion electrophoretic chips") pro rychlejší a citlivější hodnocení *Bb* s.l. komplexu u klíšťat *I. ricinus*. Tímto způsobem bylo identifikováno 0,5 % vzorků pozitivních na přítomnost *B. miyamotoi* (Hulinská et al. 2007).

Byla prokázána vyšší prevalence *B. miyamotoi* u larválního vývojového stádia klíštěte díky transovarialnímu přenosu spirochét (vertikální přenos) (Richter et al., 2012).

## **4. Materiál a metody**

### **4.1 Sběr klíšťat**

Klíšťata byla sbírána metodou vlajkování bílého plátna uvnitř zkoumaných oblastí v období červen, červenec, srpen, září, říjen roku 2013. Každý sběr probíhal přibližně 60-120 minut.

### **4.2 Zpracování vzorků klíšťat**

Klíšťata byla uložena do mrazáku při teplotě - 20°C, kde byla uchována do doby než byla použita pro testování. Před samotným testováním byly všechny klíšťata rozděleny podle jednotlivých vývojových stádií do řádně označených mikrozkušavek typu Ependorf (dospělci - zvlášť samice a samci; nymfy).

Následovalo promývání klíšťat v 10% chloru po dobu 10 minut, poté v H<sub>2</sub>O, 70% etanolu (10 minut) a znovu v H<sub>2</sub>O. Všechna klíšťata sterilizována tímto způsobem byla usušena a tím připravena na krájení, které je nezbytné pro purifikaci DNA. Pro krájení byly použity skalpely, které byly před každým použitím desinfikovány pomocí vypálení etanolu na čepeli skalpelu. Nymfy byly řezány na minimálně dva až čtyři kusy, dospělci na čtyři až šest kusů.

#### **4.2.1 Purifikace genomové DNA**

Genomová DNA byla purifikovaná ze vzorků pomocí kitu "DNeasy Blood & Tissue Kit"(Qiagen) přesně podle protokolu výrobce. Takto připravená DNA byla použita pro PCR reakce.

#### **4.2.2 Polymerázová řetězcová reakce (PCR)**

PCR byla použita nejprve ke skriningu všech klíšťat na přítomnost DNA *Bb* s.l. (infikovanost klíšťat) a potom k určení jednotlivých druhů borelií v infikovaných klíšťatech. Pro první reakce byly použité primery pro detekci více druhů spirochét komplexu *Bb* s.l. Na další reakci byly použity druhově - specifické primery pro borelie *Bb*.s.s. (GI), *B. garinii* (GII) a *B. afzelii* (GIII).

Reakce se prováděla ve 20 µl a její složení je zaznamenáno v tabulce 2.



**Tab. 2:** Komponenty PCR reakce.

Složení jedné PCR reakce	Množství
10x PCR pufr	2 $\mu$ l
25mM MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu$ l
1mM Primer forward	1 $\mu$ l
1mM Primer reverse	1 $\mu$ l
10mM dNTPs	1 $\mu$ l
Tag DNA polymeráza (Promega) (0,5 U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
DNA	1 $\mu$ g

\*10x PCR pufr, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM dNTPs a Tag DNA polymeráza byly nahrazené 10x PCR premixem od Promega.

Ke každé reakci patřila pozitivní (DNA purifikovaná z kultury borelie), a negativní kontrola (kde DNA templát byl nahrazen vodou). Amplifikace probíhala v "Thermal Cycler" (Eppendorf) a její jednotlivé kroky jsou popsány níže:

1. **Denaturace 96°C – 5 min**
2. **Opakování 30/35 cyklů:**
  - 2.1. Denaturace 95°C – 30 s
  - 2.2. Nasedání primerů 50°C – 55°C - 30 s (závisí na použitých primerech)
  - 2.3. Elongace 72°C – 1 min
3. **Konečná elongace 72°C – 5-10 min**

Po skončení reakce byly vzorky v cycleru udržovány při teplotě 14°C.

Pro potvrzení výsledků z první reakce byla v některých případech použita "nested" PCR, kde ve druhé reakci dochází k amplifikaci produktu z první reakce a tímto se snižuje inhibice PCR reakce cizorodou DNA (v tomto případě DNA klíštěte).

**Tab. 2:** Primery použité pro PCR reakce.

Primer	Teplota nasedání (°C)	Velikost PCR produktu (bp)	Sekvence primeru (5'-3')	Autor článku
flaB Forw	52	242	TTCAATCAGGTAACGGCACA	Picken, 1992
flaB Rev	52		GACGCTTGAGACCCTGAAAG	Picken, 1992
flaB Outer 1	52	477	AARGAATTGGCAGTTCAATC	Clark et al., 2005
flaB Outer 2	52		GCATTTTCWATTTTAGCAAGTGATG	Clark et al., 2005
flaB Inner 1	54	361	ACATATTCAGATGCAGACAGAGGTTCTA	Clark et al., 2005
flaB Inner 2	54		GAAGGTGCTGTAGCAGGTGCTGGCTGT	Clark et al., 2005
ospC-Forw	52	605	ATGAAAAAGAATACATTAAGTGC	Bunikis et al., 2004
ospC-Rev	52		ATTAATCTTATAATATTGATTTTAATTAAGG	Bunikis et al., 2004
glpQ1	52	633	CACCATTGATCATAGCTCACAG	Fomenko et al. 2011
glpQ2	52		CTGTTGGTGCTTCATTCCAGTC	Fomenko et al. 2011

glpQ3	54	399	GCTAGTGGGTATCTTCCAGAAC	Fomenko et al. 2011
glpQ4	54		CTTGTTGTTTATGCCAGAAGGGT	Fomenko et al. 2011

**Tab.3:** Primery specifické pro různé druhy borelie komplexu sensu lato.

Primer	Teplota nasedání (°C)	Velikost PCR produktu (bp)	Sekvence primeru (5'-3')	Specifita primeru	Autor článku
GI Forw	55	517	AACAAAGACGGCAAGTACGATCTAATT	<i>B.b.s.s.</i>	Demaerschalck I. et al., 1995
GI Rev	55		TTACAGTAATTGTTAAAGTTGAAGTGCC		
GII Forw	56	321	TGATAAAAAC AACGGTTCTG GAAC	<i>B. garinii</i>	
GII Rev	56		GTAACCTTCAATGTTGTTTGGCCG		
GIII Forw	56	162	TAAAGACAAAACATCAACAGATGAAATG	<i>B. afzelii</i>	
GIII Rev	56		TTCCAATGTTACTTTATCATTAGCTACTT		

#### 4.2.3 Elektroforéza

Výsledky PCR byly zkontrolovány na agarózovém gelu (0.9 - 1%), vizualizovány pod UV lampou a zdokumentované pomocí fotosystému Kodak.

#### 4.2.4 Extrakce DNA z gelu

Extrakce byla provedena pomocí "QIAquick Gel Extraction Kit " (Qiagen) přesně dle protokolu od výrobce. PCR produkty rozdělené na 0,9% agarozovém gelu byly přečištěny pomocí kolon "Ultrafree DA DNA extraction from agarose gels"(Millipore). Takto připravené vzorky byly použity na sekvenační reakci.

#### 4.2.5 Příprava vzorku na sekvenační reakci

Vzorky byly sekvenované v sekvenační laboratoři Biologického Centra AV se specifickými primery použitými pro amplifikaci fragmentu. Vzorky byly připravené podle návodu ze sekvenační laboratoře. Do dvou 200µl mikrozkušavek typu Eppendorf bylo přidáno 1,5-5 ng PCR produktu nebo 75-150 ng plazmidu, dále byly přidány gen-specifické nebo vektor-specifické primery (2,5 pmol ke každé reakce).

### 4.3 Klonování a transformace

Purifikovaný PCR produkt byl dle návodu od výrobce " (TOPO TA Cloning Kit For Sequencing" (Invitrogen) zaklonován do pCR<sup>®</sup> 4-TOPO vektoru. Reakční směs byla po dobu 30 minut inkubována při pokojové teplotě. Následovala transformace kompetentních buňek

One Shot TOP10 *E. coli* přidáním 2 µl z klonovací reakce. Směs byla ponechána ve vodní lázni při teplotě 42°C a ihned zchlazena na ledu (heat shock). 250µl S.O.C. média a reakční směs byla inkubována 1 hodinu při 37°C na třepačce. Výsledná transformační směs byla rozetřena na Petriho misky obsahující LB/agar/ampicilin (50µg/ml) a přes noc inkubovaná na 37°C. Druhý den byly jednotlivé kolonie přeneseny do LB média s ampicilinem (50 µg/ml) a opět inkubovány přes noc na 37°C na třepačce.

#### 4.3.1. Purifikace plazmidové DNA

Buněčné kultury byly po inkubaci stočeny a z buněčného peletu byla podle protokolu z kitu "QIAprep® Spin Miniprep Kit" purifikována plazmidová DNA. Plazmidová DNA byla eluována z kolony 50 µl ddH<sub>2</sub>O.

#### 4.3.2. Ověření přítomnosti inzertu v plazmidu pomocí PCR a sekvenování

Pro ověření přítomnosti inzertu v plazmidu byla použita metoda PCR za použití gen-specifických primerů stejných jako při amplifikaci genu a vektor-specifických primerů M13 forward a M13 reverse. Výsledek byl zkontrolován elektroforézou na 1% agarózovém gelu a vyhodnocen pod UV světlem. Plazmidy, u kterých byla potvrzena přítomnost inzertu, byly následně osekvenovány a použity jako pozitivní kontrola v PCR reakcích při skriningu vzorků na přítomnost DNA *B. miyamotoi*.

Všechny použité chemikálie a přístroje byly shrnuty v tabulce 4 a 5.

**Tab. 4:** Použité materiály a jejich koncentrace.

Chemikálie	Složení
Agaróza	Karosa (Serva) pro DNA ELFO v 1xTAE pufru
50xTAE pufr	200mM Tris-HCl, 50mM EDTA
2x Master mix	Taq DNA polymeráza[doplněno reakčním pufrem (pH 8,5)] 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP, 3mM MgCl <sub>2</sub> (Promega)
Marker	100 bp Plus Gene Ruller (MBI Fermentas)
Kultivační médium	LB médium(Luria-Bertani Medium) [25 g LB Broth, Miller, Tissue Culture Grade (Amresco)/1 l dH <sub>2</sub> O]
Ampicilin	100µg/ml stock solution
S.O.C. médium	2% trypton, 0.5% výtazek z kvasnic, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> a 20 mM glukóza

**Tab. 5:** Seznam použitého zařízení.

PCR box	DNA/RNA UV cleaner UVC/T-M-AR (Biosan)
Flow box	Gelaire
Zahříváč	Thermomixer (Eppendorf)
PCR cycler	Mastercycler personal (Eppendorf)
Elektroforéza	OVL Easycast™ B2 (Thermo scientific)
Fotosystém (focení gelů)	Kodak
Centrifugy	Centrifuge 5415 C (Eppendorf), Centrifuge 5415D (Eppendorf)

## 5. Výsledky

Pro kontrolu přítomnosti klíšťat a jejich nákazy spirochétami byly zvoleny tři lokality v Českých Budějovicích s vysokým výskytem obyvatel, kteří se zde pohybují za účelem sportovních aktivit, volnočasových aktivit a venčení domácích zvířat. Pro další část práce (skrining klíšťat na přítomnost DNA *B. miyamotoi*) byly použity sběry klíšťat z roku 2012 a 2013, (lokality Jižních Čech: Stožec, Zliv, Strakonice, Netolice), které byly určeny pro mapování výskytu borelie v Jižních Čechách.

Vybrané rekreační lokality v Českých Budějovicích: Lokalita č. 1 - park Stromovka, lokalita č. 2 - park u plovárny a č.3 - cyklo stezka u řeky Vltavy.



**Obr.1:** Oblasti sběru klíšťat na území Českých Budějovic (2013), Zdroj: <https://maps.google.cz/maps?hl=cs&tab=w1>.

## 5.1 Charakteristika jednotlivých oblastí

*Lokalita č. 1:* smíšený les s převahou jehličnanů (zejména *Picea abies*), půda pokrytá vrstvou suchého listoví a jehličí. Les obklopen menší loukou s udržovaným travnatým porostem. V okolí lesa se nachází menší chatová oblast.

*Lokalita č. 2:* Travnatá oblast s nízkým keřovitým porostem a listnatými stromy. Oblast podél říčního koryta řeky Vltavy.

*Lokalita č. 3:* Travnatá oblast zastíněna listnatými stromy převážně duby (*Quercus robur*), vinoucí se podél cyklo stezky.

Konkrétní data a počty nasbíraných klíšťat jsou uvedeny v tab. 6.

**Tab. 6:** Počet nasbíraných klíšťat v jednotlivých lokalitách Českých Budějovic.

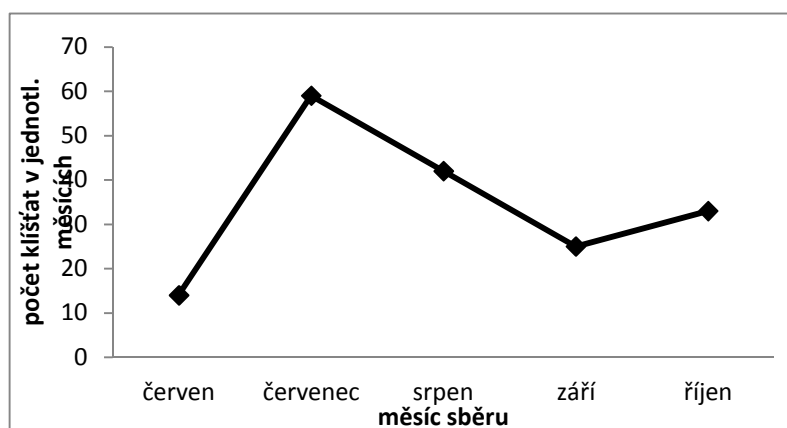
datum sběru	počet klíšťat
lokalita č.1 (Stromovka)	
21.6.13	14
16.7.13	7
23.7.13	13
30.7.13	6
15.8.13	6
31.8.13	12
22.9.13	9
2.10.13	13
<b>8 sběrů</b>	<b>80</b>
lokalita č.2 (Park u plovárny)	
16.7.13	1
23.7.13	4
30.7.13	2
15.8.13	0
31.8.13	8
9.9.13	0
22.9.13	0
4.10.13	6
5.10.13	3
<b>9 sběrů</b>	<b>28</b>
lokalita č.3 (Vltava cyklo stezka)	
16.7.13	12
19.7.13	10
29.7.13	4
6.8.13	5
15.8.13	0
31.8.13	11
9.9.13	0
22.9.13	7
29.9.13	5
3.10.13	5
6.10.13	6
<b>11 sběrů</b>	<b>65</b>

Průměrný počet klíšťat za jednu hodinu sběru byl 6,1 (od 2,8 do 10 v závislosti na lokalitě). Tabulka 7 znázorňuje počet klíšťat v lokalitách Českých Budějovic a jejich prevalenci v jednotlivých měsících sběru.

**Tab. 7:** Prevalence klíšťat v měsících sběru.

měsíc	počet klíšťat
červen	14
červenec	59
srpen	42
září	25
říjen	33

Údaje z tabulky byly vyneseny do grafu (Obr. 3).



**Obr. 3:** Grafické znázornění výkyvů v počtu nasbíraných klíšťat v průběhu pěti měsíců.

Jak lze vyčíst z obrázku 3 počet klíšťat vzrůstal od června, největšího počtu dosáhl v měsíci červenec a pak postupně klesal do září, kdy se počet opět znovu zvýšil. Z toho je možné vyčíst průměrnou aktivitu klíšťat v roce 2013, kdy píku dosahovala v létě a na podzim.

**Tab. 8:** Zastoupení jednotlivých stádií vývoje

datum sběru	N	F	M
lokalita č.1 (Stromovka)			
21.6.13	14	0	0
16.7.13	7	0	0
23.7.13	8	3	2
30.7.13	4	1	1
15.8.13	1	1	4

31.8.13	11	0	1
22.9.13	9	0	0
2.10.13	12	1	0
<b>celkem</b>	<b>66</b>	<b>6</b>	<b>8</b>
<b>datum sběru</b>	<b>N</b>	<b>F</b>	<b>M</b>
<b>lokality č.2 (Park u plovárny)</b>			
16.7.13	0	1	0
23.7.13	1	3	0
30.7.13	2	0	0
15.8.13	0	0	0
31.8.13	8	0	0
9.9.13	0	0	0
22.9.13	3	1	0
4.10.13	6	0	0
5.10.13	3	0	0
<b>celkem</b>	<b>23</b>	<b>5</b>	<b>0</b>
<b>datum sběru</b>	<b>N</b>	<b>F</b>	<b>M</b>
<b>lokality č.3 (Vltava cyklo stezka)</b>			
16.7.13	6	2	4
19.7.13	9	0	1
29.7.13	4	0	0
6.8.13	3	0	2
15.8.13	0	0	0
31.8.13	9	0	2
9.9.13	0	0	0
22.9.13	4	0	3
29.9.13	5	0	0
3.10.13	4	0	1
6.10.13	6	0	0
<b>celkem</b>	<b>50</b>	<b>2</b>	<b>13</b>

N-nymfa, F-samice, M-samec

**Tab. 9:** Znázornění positivity jednotlivých stádií vývoje.

<b>datum sběru</b>	<b>počet pozitivních klíš'at (Bb s.l.)</b>
<b>lokality č.1 (Stromovka)</b>	
16.7.13	1 (N*)
23.7.13	1 (M)
2.10.13	1 (F)
<b>celkem pozitivních</b>	<b>3</b>
<b>lokality č. 2 (Park u plovárny)</b>	
16.7.13	1 (F)
23.7.13	1 (N*); 2 (F)
30.7.13	1 (N*)
31.8.13	1 (N*)
<b>celkem pozitivních</b>	<b>6</b>
<b>lokality č. 3 (Vltava cyklo stezka)</b>	
16.7.13	1 (F)
19.7.13	1 (N*)
3.10.13	1 (M)
6.10.13	1 (N*)
<b>celkem pozitivních</b>	<b>4</b>

\* "Puly" z deseti nymf, které byly identifikovány jako pozitivní.

Nejvíce pozitivních klíšťat z celkového počtu bylo prokázáno u stádia nymfa (6).

**Tab. 10:** Procentuální zastoupení pozitivních klíšťat v různých vývojových stádiích.

Lokalita	Počet pozitivních nymf	Počet pozitivních samic	Počet pozitivních samců
č.1 Stromovka	1	1	1
Procenta (%)	<b>1,51</b>	<b>16,7</b>	<b>12,5</b>
č.2 Park u plovárny	3	3	0
Procenta (%)	<b>13,04</b>	<b>60</b>	<b>0</b>
č.3 Vltava cyklo stezka	2	1	1
Procenta (%)	<b>4</b>	<b>50</b>	<b>7,69</b>

**Tab. 11:** Tabulka pozitivních klíšťat a jejich procentuální zastoupení v jednotlivých lokalitách.

Lokalita	počet klíšťat	počet pozitivních klíšťat	pozitivní klíšťata (%)	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i>	<i>Bb s.s.</i>	<i>B. bissettii</i>	Ko- infekce
č.1 Stromovka	80	3	3,75%	1(1,25%)	0	2(2,5%)	0	0
č.2 Park u plovárny	28	6	21,43%	0	0	0	5(17,9%)	0
č.3 Vltava cyklo stezka	65	4	6,15%	0	1(1,54%)	3(4,62%)	0	4- <i>B.gar.+Bb s.s.</i>
<b>celkem</b>	<b>173</b>	<b>13</b>	<b>1,73%</b>	<b>1 (0,58%)</b>	<b>1 (0,58%)</b>	<b>5 (2,9%)</b>	<b>5 (2,9%)</b>	<b>4 (2,31%)</b>

Nejvíce pozitivních klíšťat bylo zjištěno u lokality č. 2 - park u plovárny (Tabulka 8). To může být způsobeno nejenom vhodnými podmínkami pro výskyt klíšťat jako je vlhko, díky blízkosti břehu řeky Vltavy, ale také díky velkému množství vhodných hostitelů. Zvláštností této lokality je nejenom vysoký počet infekčních klíšťat, ale také v nich přítomné *B. bissettii*, druhu borelie který se dříve považoval za výhradně severoamerický.

**Tab.12:** Zjištěná pozitivita klíšťat z Jižních Čech (rok 2012 a 2013) a Českých Budějovic na přítomnost DNA *B. myiamotoi*.

Lokalita	období sběru	pozitivní na <i>B. myiamotoi</i>	
České Budějovice 2013		samec	samice
3.Vltava cyklo stezka	léto	<b>2</b>	0
<b>celkem zkoumaných</b>		<b>173</b>	
Jižní Čechy 2013	léto, podzim	0	0
Stožec		0	0
Strakonice		0	0
Zliv		0	0
Netolice		0	0



celkem zkoumaných	77	
Jižní Čechy 2012	podzim	0
Stožec		0
Strakonice		0
Zliv		1
Netolice		0
celkem zkoumaných	111	

Procento klíšťat infikovaných *B. miyamotoi* v Jižních Čechách se za období dvou let blíží ke 2 % (Tabulka 11).

Kvůli obtížné kultivaci *B. miyamotoi* v médiu v laboratorních podmínkách, byl jako pozitivní kontrola v PCR reakcích použit fragment zaklonovaného genu *glpQ* *B. miyamotoi*, předběžně amplifikovaný z celkové klíštěcí DNA prokazatelně pozitivní na přítomnost tohoto druhu spirochéty.

**Obrázek č. 2** Částečná sekvence *glpQ* genu *B. miyamotoi* používaná pro detekci DNA *B. miyamotoi* v klíšťatech ze sběru, zaklonovaná do pCR4-TOPO vektoru (červeně jsou vyznačeny primery forward a reverse reakce spacer a žlutě – primery nested)

```

CACCATTGATCATAGCTCACAGGGGTGCTAGTGGGTATCTGCCAGAACATAC
TTAGAAGCTAAAGCATATGCTTATGCATTAGGAGCTGATTATCTAGAACAAG
ACATAGTTCTAACAAAGGACAATATTCCTGTTATAATGCACGACCCAGAAAT
TGACACAACCACAAATGTTGCACAATTATTTCCCAATCGAGCTAGAGAAAAC
GGACGATATTACGCTACTGACTTCACACTCACTGAACTTAAATCACTAAGTCT
CAGTGAAAGATTTGATCCTGAAAACAAAAACCAATATATCCTAATCGTTTC
CCTTAAATGAATATAATTTTAAAAATCCAACCTTAGAAGAAGAAATACAATTC
ATACAAGGACTAAATAAAAGCACAGGAAAAAATGTTGGGATTTACCCCTGAA
ATTAAAAAAACCCTTCTGGCATAAACACAAGGCAAGGACATCTCTAAAATG
TAATAGAAATTCTAAATAAATATGGGTATAAATCAAAAAGAAGATAAGATTTA
CCTACAAACATTCGACTTTGATGAATTA AAAAGAATAAGAAAAGA AACTTGGA
TACCAAGGAAAATAAATAATGCTTGCTGGAGAAAAATGACTGGAATGAAGCAC
CAACAG — 633 bp

```

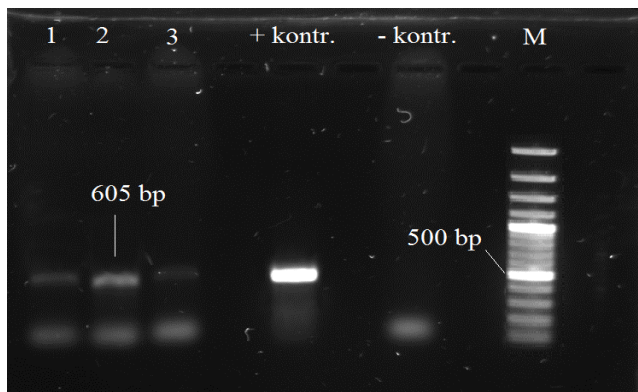
## 5.2. Zastoupení jednotlivých druhů *Bb* s.l. a *B. miyamotoi* v pozitivních vzorcích

Na přítomnost různých druhů borelie komplexu *Bb* s.l. bylo celkem vyšetřeno 173 klíšťat (139 nymf, 21 samců, 13 samic) sesbíraných z lokalit Českých Budějovic, s vysokou frekvencí pohybu obyvatel. Dodatečně bylo vyšetřeno 77 (rok 2013) a 111 (rok 2012) klíšťat z Jižních Čech na přítomnost DNA *B. miyamotoi*. Všechny vzorky byly zpracovány pomocí PCR a vyhodnoceny elektroforézou na agarózovém gelu. Část vzorků, u kterých nebyl určen druh borelie pomocí PCR se specifickými primery, byla sekvenována.

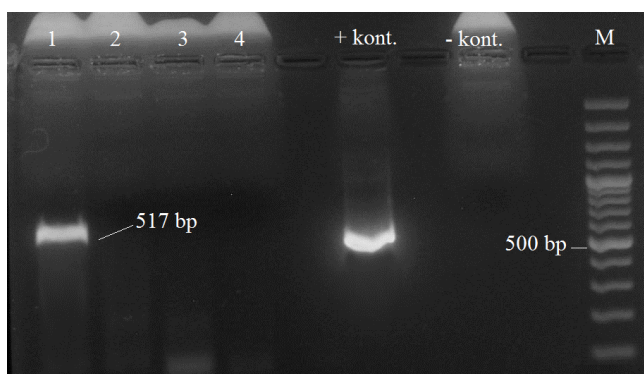
K prokázání přítomností DNA borelie (*Bb* s.l.) byly použity primery na *flagellin* (*flaB*). Na obrázku 3. jsou vidět specifické produkty o velikosti 650 bp (jamky 1, 2, 3). Po provedení následné PCR s primery specifickými na *Bb* s.s., *B. afzelii* a *B. garinii* se v tomto

případě nepodařilo amplifikovat žádné PCR produkty. Proto byly produkty osekvenovány. Podle homologie s GenBank byla zjištěna přítomnost DNA *B. bissetii*.

**Obr. 3:** Amplifikace fragmentu genu *flaB* v klíšťatech pozitivních na *Bb* s.l.

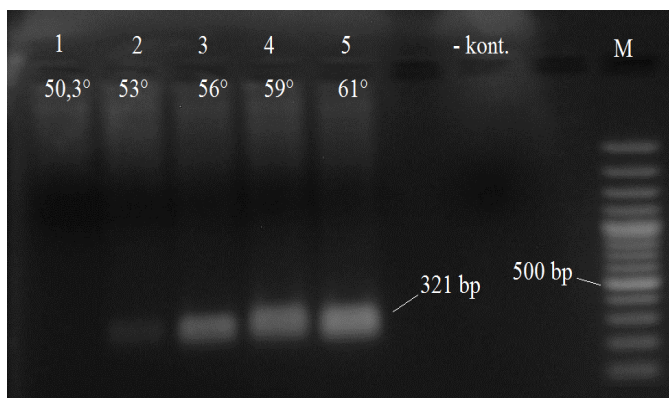


**Obrázek 4.** znázorňuje výsledek PCR za použitím GI specifických primerů k průkazu *Bb* s.s.

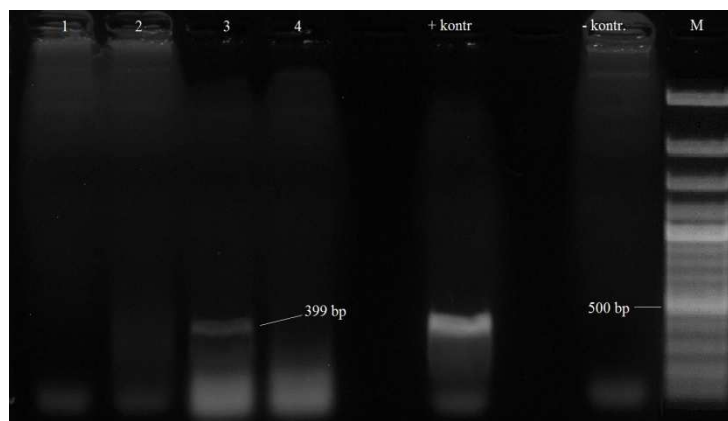


Před použitím primeru bylo v některých případech třeba provést teplotní gradient s pozitivní kontrolou, na kterou je daný primer určen (druhy *Bb* s.l. a *Bb* s.s.). Touto reakcí byla zjištěna optimální teplota nasedání primerů.

**Obr. 5:** Teplotní gradient s GII primerem pro *B. garinii*.

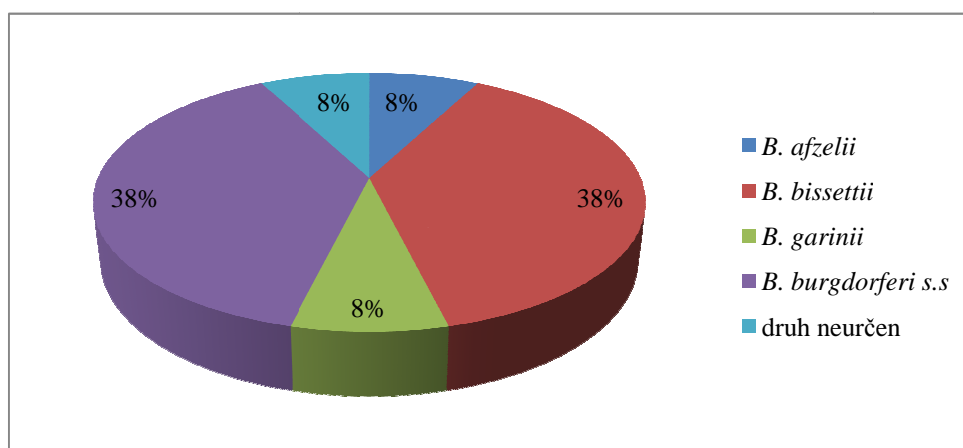


Na obrázku 5 je vidět produkt o velikosti 321 bp, který je nejlépe viditelný při teplotě 56° až 61° C (jamky 3-5). Ve všech reakcích byla jako templát použita DNA *B. garinii*.



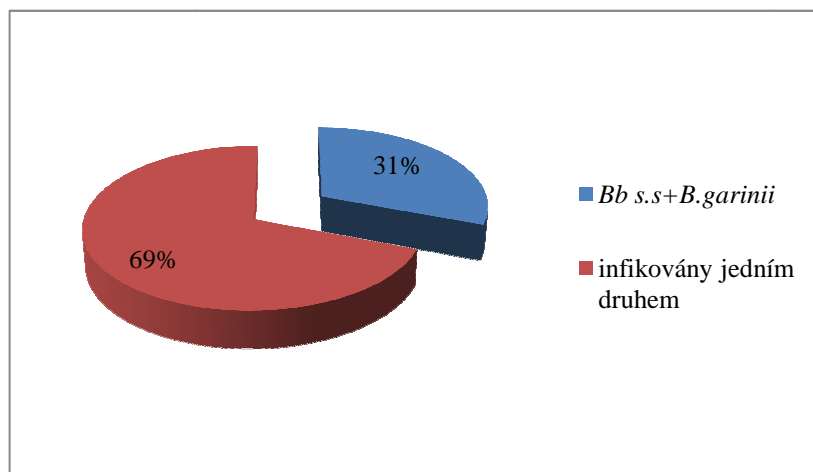
**Obr. 6:** Pozitivní vzorek *B. miyamotoi* (jamka 3) amplifikovaný za použití *glpQ* primerů.

Celkové zastoupení jednotlivých druhů komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato včetně ko-infekce jsou znázorněny na obrázku 7 a 8.



**Obr. 7:** Prevalence druhů v procentech.

Nejvíce byly zastoupeny druhy *Bb s.s.* a *B. bissettii* a to u 38% vzorku každý. Stejně procento bylo zjištěno u *B. afzelii* a *B. garinii* a to 8% (tato data nemohou být statisticky vyhodnocené kvůli malému počtu vyšetřených vzorků). K tomu se prokázalo, že u 8% vzorku pozitivních na borelie se nepovedlo určit druh s použitím popsáných primerů.



**Obr. 8:** Detekce koinfekce v celkovém počtu pozitivních klíšťat.

Koinfekce byla prokázána u 4, 31% vzorku a vyskytla se pouze jako kombinace *Bb s.s.* a *B. garinii*.

## 6. Diskuze

Závažné multisystémové onemocnění Lymeská borelióza, způsobené přenosem spirochét komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato klíštětem *Ixodes ricinus*, patří dnes mezi nejčastější a nejrozšířenější lidské onemocnění v Evropě (Kazimírová M. et al., 2013). Onemocnění je komplexní a postihuje řadu orgánů. Základní klinicko-patologickou charakteristikou spirochét komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato je relativně velmi dobrá adaptace ve vnitřním prostředí hostitele. V důsledku jejich adaptačních schopností je klinický průběh infekce pomalý.

Závažnost onemocnění je zvýšena možnou rezistencí k léčbě a schopností jednotlivých druhů spirochét komplexu *Bb s.l.* unikat imunitní reakci i u jedinců s plně fungujícím imunitním systémem.

Cílem této bakalářské práce bylo zkontrolovat výskyt klíšťat ve vybraných rekreačních lokalitách Českých Budějovic a mapovat zde promořenost klíšťat spirochétami *Bb s.l.* - původce onemocnění Lymeská borelióza. Dalším cílem bylo určit druhy komplexu *Bb s.l.* v infikovaných klíšťatech a také otestovat klíšťata z jednotlivých oblastí Jižních Čech na možnou přítomnost DNA *B. miyamotoi* – původce návratné horečky.

## **Prevalence klíšťat**

Prevalence klíšťat v regionu je dána teplotními podmínkami a zejména vlhkostí. Díky tomu v mírném klimatickém pásmu Evropy dosahuje průměrná sezonní aktivita klíšťat maxima v měsíci květen a červenec a pokračuje do října, kde opět nepatrně vzroste. Aktivita je závislá zejména na teplotách v daném období, proto můžeme zaznamenat aktivitu klíšťat i v zimě pokud je mírná. Opačným případem jsou suchá léta, která nejsou vyhovující pro aktivitu *I. ricinus* hlavně při vyšších odpoledních teplotách (Gray et al., 2009).

Dlouhodobý výzkum aktivity a promořenosti klíšťat na přítomnost spirochét původce onemocnění Lymfská borelióza v Jižních Čechách byl prováděn v naší laboratoři během několika posledních let. Cílem této nové studie bylo porovnat parametry předchozího sledování se současným stavem s větším zaměřením na lokality příměstských parků a oblastí využívaných jako časté místo odpočinku a procházek obyvatel města České Budějovice.

Byla zjištěna prevalence zastoupení jednotlivých vývojových stádií. Celkové procento samců (13,2%) a samic (15,8%) bylo relativně podobné předchozím studiím, pouze zastoupení nymf (70,9%) bylo statisticky vyšší; larvy nebyly sbírány (data nebyla publikována).

Typický dvouvrcholový pík výskytu klíšťat uváděný v literatuře byl potvrzen. Největší počet nasbíraných klíšťat byl pozorován v měsíci červenec a srpen, další nepatrný vzrůst nastal v říjnu.

První jarní pík v květnu nebyl potvrzen, neboť se sběry v květnu neprováděly. Roční období tak bylo rozděleno na období s různým výskytem klíšťat. V listopadu se klíšťata již skoro nevyskytovala. Výsledky jsou srovnatelné s předešlými studiemi a s daty z literatury.

## **Přítomnost *B. burgdorferi* s.l. v klíšťatech**

Detekce a následná izolace borelií z klíšťat je významná pro předpověď promořenosti klíšťat v určitých lokalitách a také pro včasnou diagnostiku Lymfské boreliózy. Stejně tak, je pro předpovězení průběhu onemocnění LB významná genotypizace druhu borelií izolovaných z klíšťat či vzorků pacientů.

*Bb* s.l. byla nalezena po celé Evropě a její přítomnost byla hlášena dohromady z 30 států (Hubálek a Halouzka, 1997; Hubálek, 2009). Podle statistických údajů ze Zdravotního Ústavu v Praze je boreliemi nakaženo od 5 do 30% klíšťat v České republice (podle oblasti) přičemž Jihočeský kraj patří mezi oblasti s nejvyšší úrovní promořenosti.

Procento promořenosti klíšťat spirochétami LB ve zkoumaných oblastech bylo relativně podobné předchozím studiím (od 1,73% do 21,43%), stejně tak i přítomnost spirochét v jednotlivých stádiích vývoje klíšťete: nejvyšší počet vzorků pozitivních na přítomnost borelie byl prokázán ve skupině nymfy (46,2 %) a pak dospělých samiček – (38,5 %) a samců (15,4%). Tyto výsledky naznačují možnou roli nymf jako hlavního vývojového stádia, který udržuje cirkulaci borelií v rekreačních oblastech Českých Budějovic.

Výzkum z roku 2003 udává data o 195 klíšťatech odebraných z obyvatel v České republice hlavně v oblasti Jižní Moravy během roku 1997-2001. Většina vzorků patřila do stádia nymfy 62% (Hubálek et al., 2003b).

### **Druhové zastoupení**

Nicméně stále nevíme vše o distribuci různých druhů borelie v Evropě. Dnes je odhadováno, že dva druhy a to *B. garinii* a *B. afzelii* patří mezi nejčastější a nejrozšířenější druhy zatímco *Bb* s.s. je méně prezentována (Piesman a Gern, 2004; Gern, 2009) i když byla detekována po celé Evropě a to ve větším spektru hostitelů než *B. garinii* a *B. afzelii* (Kurtenbach et al., 1998b; Gray et al., 2000; Humair et al., 1999; Michalik et al., 2005).

Stejně tak i na území České republiky jsou z klíšťat nejčastěji izolovány druhy *B. afzelii* a *B. garinii*. Tyto druhy jsou v České republice také nejčastějším původcem Lymbské boreliózy.

Hubálek a Halouzka (1997) uvádějí evropský průměr nakažení jednotlivými druhy následně: *Bb* s.s. - 15,9%, *B. garinii* - 39,7% a *B. afzelii* - 37,1%. Podle statistických údajů z Jižních Čech z předešlých let byla *B. afzelii* potvrzena v největším množství (od 6,8% do 38,7%) klíšťat, následovala *B. garinii* – od 8,5% do 29% a *Bb* s.s. – od 3 do 12,9%. V přibližně 6% nebyla stanovena druhová specifičnost a 12% až 32% klíšťet bylo infikováno více než jedním druhem borelie (většinou koinfekce *B. garinii* a *B. afzelii*). Výskyt ostatních druhů jako *B. bissettii* a *B. valaisiana* podle předchozích publikací, lze hodnotit jako náhodný.

Podle našeho výzkumu procentuální zastoupení *B. afzelii* a *B. garinii* v infikovaných klíšťatech bylo přibližně stejné (8%), což je v porovnání s Evropským, republikovým průměrem a předchozími studiemi znatelně nižší (Kybicová K., 2008). Naopak, procento vzorků pozitivních na *Bb* s.s. bylo mnohem vyšší než v předchozích publikacích. Například, výsledky z oblastí Severních Čech, Severozápadní a Jižní Moravy prokázaly přítomnost *Bb* s.s. pouze u 4,8% zkoumaných hlodavců.

To může být vysvětleno nízkým či naopak vysokým výskytem vhodných hostitelů pro jednotlivé druhy ve zkoumaných lokalitách. Dalším vysvětlením může být to, že byl náš sběr klíšťat prováděn v úzce vymezených lokalitách. Představené výsledky nemůžou být aplikovány na celou oblast Jižních Čech, ale spíše představují lokální ohniska (hot-spots) výskytu určitých druhů borelie. Rozdíl ve výsledcích lze také vysvětlit malým množstvím vyšetřených vzorků. Z tohoto důvodu nelze tyto data považovat za statistickou analýzu.

Ve 2,3% vyšetřených klíšťat byla zjištěna ko-infekce dvěma druhy borelie – *Bb s.s.* a *B. garinii*. V dalších 8 % druh borelie nebyl určen nejspíš proto, že tyto vzorky obsahovaly borelie jiných druhů než *Bb s.s.*, *B. garinii*, *B.afzelii*, *B.bissettii* a *B. miyamotoi*. Přítomnost více druhů borelie v jednom vzorku (ko-infekce), stejně tak i přítomnost nedetekovatelných druhů borelie s použitými primery je pro oblast Jižních Čech běžná a naše výsledky odpovídají údajům z minulých let.

### ***B. bissettii***

Velmi zajímavý je nález *B. bissettii* a to v jedné z vyšetřovaných lokalit (lokalita číslo 2 U plovárny). Pět klíšťat pocházejících z jednoho sběru bylo identifikováno jako pozitivní na daný druh borelie.

Podle informací z nynějších výzkumů výskyt *B. bissettii* v Evropě a v České republice je dost neobvyklý. Přítomnost *B. bissetti* byla prokázána spíše v severoamerických regionech a druzích amerických klíšťat, které se vyskytují v oblastech se zcela odlišnými klimatickými podmínkami v porovnání s klimatem České republiky (Eisen et al., 2009). Nicméně, výsledky pořízené v naší laboratoři před nedávnem prokázaly, že pacienti v Jižních Čechách s diagnózou Lymfské boreliózy nebo podezřením na ni, byli nakaženi právě *B. bissettii* (Rudenko et al., 2008, Rudenko et al., 2009). Toto se může stát za jedné podmínky: populace *B. bissettii* musí být prokazatelně přítomna v lokálních vektorech a hostitelích. Proto analýza promořenosti *I. ricinus B. bissettii* v rekreačních oblastech okolí Českých Budějovic byla jedním z cílů představené práce. Výsledky naší práce potvrdily přítomnost *B. bissetti* v 0,5% klíšťat nasbíraných v okolí Českých Budějovic. V průběhu vylajování jsme narazili na lokalitu, kde se, pravděpodobně, vyskytovala skupina klíšťat, které se krmily na stejném hostiteli, který byl infikován daným druhem borelie. Detekovaný spot je nejspíš lokálním ohniskem *B. bissettii* a výskyt tohoto druhu borelie nemůže být aplikován na celý region. Nicméně, přítomnost *B. bissettii* ve vektorech byla nepochybně prokázána naší prací.

Spirochéty Lymské boreliózy byly detekovány ve všech zkoumaných lokalitách v okolí Českých Budějovic, což odpovídá údajům z výzkumů minulých let v Jihočeském kraji a také potvrzují teorii, že *Borrelia burgdorferi* sensu lato se vyskytuje téměř všude, kde se vyskytuje klíště *I. ricinus*. Celkově bylo prokázáno, že všechny zkoumané lokality v rekreačních oblastech v okolí Českých Budějovic vykazují zvýšené riziko nákazy pro člověka klíšťaty přenášenými patogeny. Zkrátka, původce Lymské boreliózy je prakticky všudypřítomný v prozkoumaných lokalitách.

### ***B. miyamotoi***

Studium transovarialního přenosu *B. burgdorferi* sensu lato přinesl před nedávnem zajímavé zjištění, že takovýto přenos vůbec neexistuje (Rolland et al., 2013).

To co bylo po dlouhá léta považováno za borelii komplexu *Bb* s.l. při transovarialním přenosu bylo zpleteno z antigeneticky a filogeneticky vysoce podobným druhem borelie, ale z jiné skupiny - borelie působící návratnou horečku, *B. miyamotoi*. Bylo také prokázáno, že v Severní Americe přítomnost *B. miyamotoi* jako koinfekce ve vzorcích původně pozitivních na přítomnost *Bb* s.s. je běžná (Rolland et al., 2013). Přítomnost *B. miyamotoi* byla popsána ve Spojených Státech v roce 2001 (Scoles et al., 2001) a později i v Evropě v roce 2002 (Fraenkel et al., 2002). Takže, přítomnost borelie návratné horečky v LB endemických regionech by zřejmě zvyšovalo riziko nákazy člověka další chorobou spirochétové etiologie v rekreačních lokalitách Jižních Čech. Proto, prokázání přítomnosti nebo nepřítomnosti *B. miyamotoi* v námi vybraných lokalitách bylo další prioritou predloženého studia.

Tato práce je prvním potvrzením přítomnosti DNA *B. miyamotoi* v klíšťatech z Jižních Čech. *B. miyamotoi* byla detekována nejenom v klíšťatech nasbíraných v roce 2013 v rekreačních oblastech Č. Budějovic, ale i v klíšťatech z rozsáhlejších oblastí Jižních Čech z období 2012 a 2013. Celková incidence tohoto druhu v Českých Budějovicích odpovídá přibližně 1,16 %. Celkové procento četnosti *B. miyamotoi* v Jižních Čechách je 1,11 % za rok 2012-2013. Náš výsledky odpovídají udávaným procentům *B. miyamotoi* z celé Evropy. Například, v Nizozemsku počet infikovaných klíšťat dosahoval přibližně 2% (Hovius et al., 2013). V Rusku podle Fomenko (2010) promořenost klíšťat představuje 1,8% v Leningradě, 2,9% v Sverdlovsku a dokonce 4,5% v Novosibirsku.

*B. miyamotoi* byla detekována i v USA (Kalifornii) a to u 1,7% nymf a 0,7% u dospělců klíštěte *I. pacificus* (Mun et al., 2006). V České republice byla *B. miyamotoi* zaznamenána v menší míře 0,5% už před 7 lety (Hulinská et al., 2007).



435 dospělých klíšťat *I. ricinus* bylo zkoumáno na prezenci *B. miyamotoi*. V předešlých letech bylo dokázáno, že dospělci vykazovali vyšší prevalenci borelie oproti nymfám. Tak, například, ve Švédsku se ukázal znatelně vyšší počet spirochét u dospělých klíšťat (33%) oproti nymfám (14%) (Wilhelmsson et al., 2010). Data z Estonska prokazují, že spirochéty návratné horečky se vyskytují více u klíšťat dospělců než u nymf, ale rozdíly nebyly zcela zřetelné (Geller et al., 2012). Také nebyla zaznamenána žádná statisticky významná odlišnost v prevalenci *B. miyamotoi* u dospělců a nymf (byla u obou stadií stejná) u populace klíšťat *I. pacificus* na západě USA (Mun et al., 2006).

Během let 2012-2013 byla sbírána klíšťata *I. ricinus* z různých oblastí České Republiky. *B. miyamotoi* byla detekována u 1,6% z celkového počtu 435 dospělců (5 samic a 2 samců) sesbíraných z pěti různých lokalit. Srovnání předchozích a námi představených výsledků ukazuje, že počet klíšťat promořených *B. miyamotoi* v České republice se s časem zvyšuje. Toto zjištění může být vysvětleno vývojem citlivějších a druhově-specifických metod na detekci různých klíšťat přenášených patogenů, nebo prokázáním toho, že populace *B. miyamotoi* se „zabydlela“ v České republice natrvalo. Na distribuci borelie návratné horečky v Evropě se podílejí, jak pro tento druh neobvyklí vektorů- tvrdá klíšťata rodu *I. ricinus* tak, nejspíš, i migrující rezervoároví hostitelé, které spirochéty návratné horečky sdílejí se spirochetami Lymské boreliózy. Dá se předpokládat, že oblasti endemické pro Lymskou boreliózu se časem mohou stát endemickými i pro návratnou horečku.

## 7. Závěr

Poprvé bylo provedeno mapování několika nových rekreačních lokalit Českých Budějovic výrazně zaměřené na výskyt klíšťat *I. ricinus* infikovaných *B. bissettii* a *B. miyamotoi*. Pro rok 2013 byl zjištěn pík klíšťecí aktivity, který připadl na červenec – období nejvyšší rekreační aktivity obyvatelstva Českých Budějovic. Byl prokázán výskyt koinfekce (*Bb* s.s. a *B. garinii*) v promořených klíšťatech, který může příležitostně ovlivnit správnou diagnózu onemocnění člověka, kvůli odlišným klinickým projevům, způsobeným různými druhy spirochét komplexu *Bb* s.l. Poprvé byla prokázána přítomnost *B. bissettii* v klíšťatech z Jižních Čech a zjištěno ohnisko tohoto druhu borelie v rekreační zóně Českých Budějovic. Poprvé byla prokázána přítomnost *B. miyamotoi* v tvrdých klíšťatech nespecifických pro tento druh borelie, což je významným upozorněním na možnost šíření návratné horečky v Jihočeském kraji.

Výsledky předložené práce přinesly nové poznatky o přítomnosti spirochét skupiny Lymská borelióza a návratné horečky v rekreačních zónách a vybraných lokalitách Jižních Čech, což je přímo spojeno s veřejným zdravím a bude mít velký význam pro identifikaci oblastí zvýšeného rizika pro široké okolí obyvatel.

### **Použitá literatura**

**Anderson J.F., Barthold S.W., Magnarelli L.A. (1990):** Infectious but nonpathogenic isolate of *Borrelia burgdorferi*. J Clin Microbiol, 28, 2693–2699.

**Barbour A.G., Bunikis J., Travinsky B., Hoen A.G., Diuk-Wasser M.A. et al. (2009):** Niche partitioning of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia miyamotoi* in the same tick vector and mammalian reservoir species. Am J Trop Med Hyg, 81, 1120–1131.

**Borgoiakov V., Fomenko N.V., Panov V.V., Chikova E.D. (2011):** Study on the infection of taiga ticks with *Borrelia* in the territory of Novosibirsk Scientific Center SB PAS, Parazitologija 44, 543–556.

**Bradley C.A., Altizer S. (2007):** Urbanization and the ecology of wildlife diseases, Trends Ecol. Evol., 22, 95-102.

**Bunikis J., Garpmo U., Tsao J., Berglund J., Fish D., Barbour A.G. (2004):** Sequence typing reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents *Borrelia burgdorferi* in North America and *Borrelia afzelii* in Europe. Microbiology., 150,1741-1755.

**Casjens Sherwood R., Claire M. Fraser-Liggett, Emmanuel F. Mongodin, Wei-Gang Qiu, John J. Dunn, Benjamin J. Luft, Steven E. Schutzer (2011):** Whole genome sequence of an unusual *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolat, Journal of bacteriology, 1489–1490.

**Comer J.A., Paddock C.D., Childs J.E. (2001):** Urban zoonoses caused by *Bartonella*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, and *Rickettsia* species. Vector-Borne Zoonotic Dis., 1, 91-118.

**Comstedt P., Bergström S., Olsén B., Garpmo U., Marjavaara L., Mejlón H., Barbour A.G., Bunikis J. (2006):** Migratory passerine birds as reservoirs of Lyme borreliosis in Europe. Emerg Infect Dis., 12, 1087–1095.

**Damaerschack I., Ben Messaoud A., De Kesel M., Hoyois B., Lobet Y., Hoet P., Bigaignon G., Bollen A., Godfroid E. (1995):** Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients; J. Clin.

Microbio., 33, 602-608. **Danielová V., Beneš Č. (1997):** Recent situation in tick-borne encephalitis in the Czech republic. In: **Süss J., Kahl O. (Eds.),** Tick-borne encephalitis and Lyme Borreliosis. Pabst Sci. Publishers, Lingerich, 47-56.

**Daniel M., Danielová V., Kříž B., Jirsa A., Nižička J. (2003):** Shift of the tick *Ixodes ricinus* and tick-borne encephalitis to higher altitudes in Central Europe, Eur.J.Clin.Microbiol.Inf.Dis., 22, 327 – 328.

**Danielová N., Rudenko N., Daniel M., Holubová J., Materna J., Golovchenko M., Schwartzova L. (2006):** Extension of *Ixodes ricinus* tick and agent of tick-borne diseases to mountain areas in the Czech Republic. Int.J.Med.Microbiol.,296(S1), 48-53.

**Davis S., Bent S.J. (2011):** Loop analysis for pathogens: niche partitioning in the transmission graph for pathogens of the North American tick *Ixodes scapularis*. J Theor Biol ,269, 96–103.

**Decker D.J., Evenson D.T.N., Siemer W.F., Leong K.M., Riley S.J., Wild M.A., Castle K.T., Higgins C.L. (2010):** Understanding risk perceptions to enhance communications about human-wildlife interactions and the impacts of zoonotic disease, ILAR J., 51, 255-261.

**Eisen L., Rebecca J. Eisen, Jeomhee Mun, Daniel J. Salkeld, Robert S. Lane (2009):** Transmission cycles of *Borrelia burgdorferi* and *B. bissettii* in relation to habitat type in northwestern California, Journal of Vector Ecology, 34 (1), 81-91.

**Fikrig E., Barthold S.W., Persing D.H., Sun X., Kantor F.S., Flavell R.A. (1992):** *Borrelia burgdorferi* strain 25015: characterization of outer surface protein A and vaccination against infection. J Immunol., 148, 2256–2260.

**Fukunaga M., Takahashi Y., Tsuruta Y., Matsushita O., Ralph D. et al. (1995):** Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. Int J Syst Bacteriol, 45, 804–810.

**Fraenkel C.J., Garpmo U., Berglund J. (2002):** Determination of novel *Borrelia* genospecies in Swedish *Ixodes ricinus* ticks. J Clin Microbiol, 40, 3308–3312.

**Fomenko N.V., Epikhina T.I., Chernousova N.Y. (2010):** Detection of *Borrelia miyamotoi* in the blood of patients got disease in the spring-summer epidemiological period. Molekuliarnaya medusina, 28–31.

**Geller J., Nazarova L., Katargina O., Järvekülg L., Fomenko N. et al. (2012):** Detection and genetic characterization of relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in Estonian ticks. PLoS ONE, 7(12), 1-7.

**Gern L. (2008):** *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the agent of Lyme borreliosis: life in the wilds. Parasite, 15, 244–247.

**Gern L. (2009):** Life cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and transmission to humans. Curr. Probl. Dermatol., 37, 18-30.

**Girard Y.A., Fedorova N., Lane R.S. (2011):** Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* and detection of *B. bissettii*-like DNA in serum of north-coastal California residents. J Clin Microbiol., 49(3), 945–954.

**Gratz N.G. (1999):** Urbanization, arthropod and rodent pests, and human health. In: Robinson W.H, Rettich F., Rambo G.W. (EDS.), Proceeding of the 3rd International Conference on Urban Pests, Czech University of Agriculture, Prague, 51-58.

**Gray J.S., Robertson J.N., Key S. (2000):** Limited role of rodents as reservoirs of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Ireland. Eur J Epidemiol, 16(2), 101-103.

**Gray J.S., Dautel H., Estrada-Pena A., Kahl O. a Lingren E. (2009):** Effects of climate change on tick and tick-borne diseases in Europe, Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, 11-12.

**Gugliotta J.L., Goethert H.K., Berardi V.P., Telford S.R. III. (2013):** Meningoencephalitis from *Borrelia miyamotoi* in an immunocompromised patient. N Engl J Med, 368, 240-245.

**Hanincova K., Taragelova V., Koci J., Schäfer S.M., Hails R., Ullmann A.J., Piesman J., Labuda M., Kurtenbach K. (2003):** Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. Appl Environ Microbiol, 69, 2825–2830.

**Hovius Joppe W.R., Bob de W., Sohne M., Brouwer M.C., Coumou J., Wagemakers A. et al. (2013):** A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in Europe, The Lancet journal, 658.

**Hubalek Z., Halouzka J. (1997):** Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. Eur. J. Epidemiol., 13, 951-957.

- Hubálek Z., Stünzner D., Halouzka J., Juricová Z, Sixtl W., Sanogo Y.O. (2003a):** Prevalence of *borreliae* in *ixodid* ticks from a floodplain forest ecosystem, Institute of vertebrate biology, Academy of Science, 121-124.
- Hubálek Z., Halouzka J., Juricová Z. (2003b):** *Borrelia* in ticks biting humans and prevention of LB, Ústav biologie obratlovců AV CR, 13-17.
- Hubálek Z. (2009):** Epidemiology of Lyme borreliosis. In: Lipsker, D.; Jaulhac, B., editors. Lyme Borreliosis Curr. Probl. Dermatol. Vol. 37. Basel; Karger, 31-50.
- Hulínská D., Dřevová H., Votýpka J., Langrová K., Kurzová Z. (2004):** Prevalence druhů *Borrelia burgdorferi* sensu latou pacientů v České republice; přímá sekvenční analýza a polymerázová řetězová reakce v reálném čase, Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 4, 181-189.
- Hulínská D., (2006a):** Lymská Borelioza: Mikrobiologie, GRADA Publishing, Praha, 14-15.
- Hulínská D., (2006b):** Lymská Borelioza: Mikrobiologie, GRADA Publishing, Praha, 20 – 21.
- Hulínská D., Votýpka J., Kříž B., Holínková N., Nováková J., Hulinský V. (2007):** Phenotypic and Genotypic analysis of *Borrelia* spp. Isolates from *I. ricinus* ticks by using Electrophoretic chips and Real-Time polymerase chain r., Folia Microbiol., 52(4), 315-324.
- Hu C.M., Wilske B., Fingerle V., Lobet Y., Gern L. (2001):** Transmission of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 to BALB/c mice by *Ixodes ricinus* ticks collected in the field. J Clin Microbiol, 39, 1169–1171.
- Huegli D., Hu C.M., Humair P.F., Wilske B., Gern L. (2002):** Apodemus species mice are reservoir hosts of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 in Switzerland. J Clin Microbiol, 40, 4735–4737.
- Humair P.F., Rais O., Gern L. (1999):** Transmission of *Borrelia afzelii* from *Apodemus* mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission pattern and overwintering maintenance, Parasitology, 118(1), 33-42.
- Cherepko J. (2009):** Surveillance of *Ixodes scapularis* for *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophila*, and *Babesia microti*, (Monroe county, PA). Zdroj: <http://static2.docstoccdn.com/docs/165162858/Surveillance-of-Ixodes-scapularis-for-Borrelia-burdorferi>.

**Ivanová L.B., Tomova A., González-Acuña D., Murúa R, Moreno C.X., Hernández C., Cabello J., Cabello C., Daniels T.J., Godfrey H.P., Cabello F.C. (2013):** *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere, *Environ Microbiol.*, 1462-2920.

**Jeomhee M., Rebecca J.E., Lars E., Robert S. Lane (2006):** Detection of a *B. miyamotoi* Sensu Lato Relapsing-Fever Group Spirochete from *I. pacificus* in California, *J. Med. Entomol.*, 43(1), 120-123.

**Karan L.S., Koliashnikova N.M., Toporkova M.G., Makhneva M.A., Nadezhdina M.V. et al. (2010):** Usage of real time polymerase chain reaction for diagnostics of different tick-borne infections, *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 72–77.

**Kazmínová M., Mydlová L., Svitáľková Z. (2013):** Variability on prevalence and distribution of *Borrelia burgdorferi* s.l. in *Ixodes ricinus* tich Gross Bratislava forest park and adjacent sites (SW Slovakia), *Slovak academy of science, Bratislava*, 26-29.

**Korotkov Y.S., Kislenco G.S., Burenkova L.A., Rudnikova N.A., Karan L.S. (2008):** Spatial and temporal variability of *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* infection with the Lyme disease agent in Moscow Region, *Parazitologiya*, 42, 441–451.

**Kříž B., Malý M., Beneš C., Daniel M. (2012):** Epidemiology of tick-borne encephalitis in the Czech republic 1970-2008, *Vector-borne Zoonotic dis.*, 21, 994-999.

**Kurtenbach K., Peacey M., Rijpkema S.G., Hoodless A.N., Nuttall P.A., Randolph S.E. (1998):** Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. *Appl Environ Microbiol*, 64, 1169–1174.

**Kurtenbach K., Carey D., Hoodless A.N., Nuttall P.A. et al. (1998a):** Competence of pheasants as reservoirs for Lyme disease spirochetes. *J Med Entomol*, 35(1),77-81.

**Kurtenbach K., Peacey M., Rijpkema S.G., Hoodless A.N. et al. (1998b):** Differential transmission of the genospecies of *B.b.s.l.* by game birds and small rodents in England. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(4), 1169-1174.

- Kurtenbach K., Schäfer S.M., Sewell H.S., Peacey M., Hoodless A., Nuttall P.A., Randolph S.E. (2002):** Differential survival of Lyme borreliosis spirochetes in ticks that feed on birds. *Infect Immun.*, 70, 5893–5895.
- Kybicová K., Kurzová Z., Hulinská D. (2008):** Molecular and serological evidence of *B.b.s.l.* in wild rodents in the Czech republic, *Vector borne and Zoonotic diseases* (Lachmont, N.Y.), 645-652.
- Margos G., Gatewood A.G., Aanensen D.M., Hanincová K., Terekhova D., Vollmer S.A., Cornet M., Piesman J., Donaghy M., Bormane A., Hurn M.A., Feil E.J., Fish D., Casjens S., Wormser G.P., Schwartz I., Kurtenbach K. (2008):** MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 8730–8735.
- Margos G., Hojgaard A., Lane R.S., Cornet M., Fingerle V., Rudenko N., Ogden N., Aanensen D.M., Fish D., Piesman J. (2010):** Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissettii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. *Ticks Tick Borne Dis.*, 1, 151–158.
- Materna J., Daniel M., Metelka I., Harcarik J. (2008):** The vertical distribution, density and the development of the tick *Ixodes ricinus* in mountain areas influenced by climate changes (The Krkonoše Mts., Czech republic). *Int.J.Med.Microbiol.*, 298 (S1), 25-37.
- Michalik J., Skotarczak B., Skoracki M., Wodecka B. et al. (2005):** *B.b.s.s.* in yellow-necked mice and feeding *Ixodes ricinus* ticks in a forest habitat of west central Poland, *J Med Entomol*, 42(5), 850-856.
- Morrison T.B., Ying Ma, Weis J.H., Weis J.J.(1999):** Rapid and sensitive quantification of *Borrelia burgdorferi* infected mouse tissues by continuous fluorescent monitoring PCR. *J.Clin.Microbiol.*, 37, 987-992.
- Mun J., Eisen R.J., Eisen L., Lane R.S. (2006):** Detection of a *Borrelia miyamotoi* sensu lato relapsing-fever group spirochete from *Ixodes pacificus* in California. *J Med Entomol*, 43, 120–123.
- Oliver J.H. Jr. (1996):** Lyme borreliosis in the southern United States: a review. *J Parasitol*, 82, 926–935.

**Olsén B., Jaenson T.G., Bergström S. (1995):** Prevalence of *B.b.s.l.*-infected ticks on migrating birds. *Appl Environ Microbiol*, 61, 3082–3087.

**Piesman J. (2002):** Vector interactions and molecular adaptations of Lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. *Emerg Infect Dis*, 8, 115–121.

**Piesman J., Gern L. (2004):** Lyme borreliosis in Europe and North America. *Parasitology*, 129, 191-220.

**Picken R.N. (1992):** Polymerase chain reaction primers and probes derived from flagellin gene sequences for specific detection of the agents of Lyme disease and North American relapsing fever. *J Clin Microbiol.*, 30, 99-114.

**Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., Makhneva N.A., Toporkova M.G. et al. (2011):** Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg Infect Dis*, 17, 1816–1823.

**Postic D., Marti Ras N., Lane R. S., Hendson M., a Baranton G. (1998):** Expanded Diversity among Californian *Borrelia* Isolates and Description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (Formerly *Borrelia* Group DN127), *J. Clin. Microbiol.*, 3497-3504.

**Postic D., Garnier M., Baranton G. (2007):** Multilocus sequence analysis of atypical *B.b.s.l.* isolates—description of *Borrelia californiensis* sp nov., and genomospecies 1 and 2. *Int J MedMicrobiol*, 297, 263–271.

**Poupon M.A., Lommano E., Humair P.F., Douet V., Rais O., Schaad M., Jenni L., Gern L. (2006):** Prevalence of *B.b.s.l.* in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Appl Environ Microbiol*, 72, 976–979.

**R. Jory Brinkerhoff, Corrine M. Folsom-O'Keefe, Kimberly Tsao, Maria A. Diuk-Wasser (2011):** Do birds affect Lyme disease risk? Range expansion of the vector-borne pathogen *Borrelia burgdorferi*. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 9, 103–110.

**Richter D., Schlee D.B., Matuschka F.R. (2003):** Relapsing fever-like spirochetes infecting European vector tick of Lyme disease agent. *Emerg Infect Dis*, 9, 697–701.



- Richter D., Klug B., Spielman A., Matuschka F.R. (2004):** Adaptation of diverse Lyme disease spirochetes in a natural rodent reservoir host. *Infect Immun.*, 72(4), 2442-2444.
- Richter D., Debski A., Hubalek Z., Matuschka F.R. (2012):** Absence of Lyme disease spirochetes in larval *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 12, 21–27.
- Robinson W.H. (2005):** Urban insects and arachnids -A handbook of urban entomology, Cambridge: Cambridge University Press, 100-101.
- Rollend L., Fish D., Childs J.E. (2013):** Transovarial transmission of *Borrelia* spirochetes by *Ixodes scapularis*: a summary of the literature and recent observations. *Ticks Tick Borne Dis*. 2013, 4, 46-51.
- Rudenko N., Golovchenko M., Mokráček A., Piskunová N., Růžek D., Mallatová N., Grubhoffer L. (2008):** Detection of *Borrelia bissetii* in cardiac valve tissue of a patient with endocarditis and aortic valve stenosis in the Czech Republic. *J Clin Microbiol*, 46, 3540–3543.
- Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L., Oliver H.J. Jr. (2009a):** *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from the southeastern region of the United States. *J Clin Microbiol*, 47, 134–141.
- Rudenko N., Golovchenko M., Lin T., Gao L., Grubhoffer L., Oliver H.J. Jr. (2009b):** Delineation of a new species of the *B.b.s.l.* complex, *Borrelia americana* sp.nov. *J Clin Microbiol*, 47, 3875–3880.
- Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L., Oliver J.H. Jr. (2011):** Updates on *B.b.s.l.* complex with respect to public health. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2, 123-128.
- Scoles G.A., Papero M., Beati L., Fish D. (2001):** A relapsing fever group spirochete transmitted by *Ixodes scapularis* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 1, 21–34.
- Scott J.D., Lee M.K., Fernando K., Durden L.A., Jorgensen D.R., Mak S., Morshed M.G. (2010):** Detection of Lyme disease spirochete, *B.b.s.l.*, including three novel genotypes in tick (Acari: *Ixodidae*) collected from songbirds (Passeriformes) across Canada. *J Vector Ecol*, 35, 124–139.

**Scott M.C., Rosen M.E., Hamer S.A., Baker E., Edwards H. et al. (2010):** High prevalence *Borrelia miyamotoi* infection among wild turkeys (*Meleagris gallopavo*) in Tennessee. J Med Entomol, 47, 1238–1242.

**Schwan T.G., Piesman J. (2002):** Vector interactions and molecular adaptations of lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. emerg. infect. dis., 8, 115–121.

**Schneider B.S., Schriefer M.E., Dietrich G., Dolan M.C., Morshed MG, Zeidner N.S. (2008):** *Borrelia bissettii* isolates induce pathology in a murine model of disease. Vector borne zoonotic dis., 8, 623–633.

**Spitalská E., Literák I., Sparagano O.A., Golovchenko M., Kocianová E. (2006):** Ticks (*Ixodidae*) from passerine birds in the Carpathian region. Wien Klin Wochenschr, 118, 759–764.

**Stricker R.B., Johnson L. (2014):** Lyme Disease: Call for a “Manhattan Project” to Combat the Epidemic. PLoS Pathog., 10(1), 1-3.

**Strle F., Picken R.N., Cheng Y., Cimperman J., Maraspin V., Lotric-Furlan S., Ruzic-Sabljić E., Picken M.M. (1997):** Clinical findings for patients with Lyme borreliosis caused by *B.b.s.l.* with genomic and phenotypic similarities of strain 25015. clin. infect. dis., 25, 273-280.

**Strle F.(1999):** Lyme borreliosis in Slovenia. Zentralbl. bakteriol., 289, 643–652.

**Süss J. (2001):** Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia – an overview. Tick-borne dis., 2, 2-15.

**Wilhelmsson P., Fryland L., Borjesson S., Nordgren J., Bergstrom S., et al. (2010):** Prevalence and diversity of *Borrelia* species in ticks that have bitten humans in Sweden. J Clin Microbiol, 48, 4169–4176.

**Wilske B., Busch U., Eiffert H., Fingerle V., Pfister H.W., Rössler D., Preac-Mursic V. (1996):** Diversity of OspA and OspC among cerebrospinal fluid isolates of *B.b.s.l.* from patients with neuroborreliosis in Germany. Med. microbiol. immunol., 184, 195–201.