

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Příprava klonálních populací borelie ze severoamerických izolátů s cílem
prokázání přítomnosti druhu borelie běžně se vyskytující v Evropě**

Bakalářská práce

Štěpánka Smolenová

školitelka: Maryna Golovchenko, MSc.

vedoucí práce: Nataliia Rudenko, PhD.

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

České Budějovice 2014

Bakalářská diplomová práce

Smolenová Š., 2014: Příprava klonálních populací borelie ze severoamerických izolátů s cílem prokázání přítomnosti druhu borelie běžně se vyskytující v Evropě. [Preparation of clonal populations of *Borrelia* from North American isolates in purpose to detect the presence of *Borrelia* species commonly distributed in Europe]. Bc. Thesis, in Czech., 57 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The topic of this bachelor thesis is the continuation of the projects that are currently solved in the Laboratory of Molecular Ecology of Vectors and Pathogens, Institute of Parasitology, Academy of Sciences of the Czech Republic, focusing on study of intra and interspecies diversity within *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex.

Up to now, 20 spirochete species from the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex have been described. Three of them are generally known to cause Lyme borreliosis (LB) in humans in Europe: *B. garinii*, *B. afzelii* and *B. burgdorferi* sensu stricto. In the USA, only *B. burgdorferi* sensu stricto has been officially recognized as the LB agent. *B. garinii* and *B. afzelii* are currently recognized as species occurring exclusively in Europe.

Analysis of *Borrelia* isolates from the collection of the James H. Oliver, Jr., Institute for Coastal Plain Science in Statesboro, USA, revealed the presence of *B. garinii* and *B. afzelii* DNA in several co - infected isolates from ticks and rodents collected in the south-eastern part of the United States. The aim of this project was the separation of co – infected borrelia cultures into individual species using novel technique of *Borrelia* cultivation on solid media, producing of clonal population of each separated species and characterization of individual *B. garinii* isolates using the PCR technique. The detailed characterization of the obtained *B. garinii* isolate was conducted by MLST analysis of 8 housekeeping genes (PCR amplification and sequencing). The results of presented thesis brought new insights into the global distribution of Lyme disease spirochetes, support the theory of spirochete transoceanic migration, highlighting, the impact of migrating birds in this process and represents the first data on the presence in the United States *Borrelia* species previously considered to be restricted to Europe only.

Bakalářská práce byla financována z Evropského projektu – FP7 ANTIGONE (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, 23. 11. 2014

.....

Štěpánka Smolenová

PODĚKOVÁNÍ:

Zde bych chtěla poděkovat svým školitelkám Maryně Golovchenko a Natashe Rudenko za neuvěřitelnou trpělivost a ochotu, kterou mi věnovaly, za cenné rady a odborné vedení mé bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala Prof. RNDr. Liboru Grubhofferovi, CSc., že mi umožnil pracovat v laboratoři Molekulární biologie vektorů a patogenů. Mé poděkování patří celé mé rodině, především mým rodičům za lásku, kterou mě obklopují, za všestrannou podporu a trpělivost, kterou se mnou měli po celou dobu studia. Velký dík patří také Ing. Zdeňkovi Polákovi, Ing. Miluši Blechové, kamarádkám Luce Bohoňkové a Paule Helebradnové. A v neposlední řadě patří mé děkuji příteli Karlovi a přátelům za podporu, trpělivost a udržení dobré nálady.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2. 1. SPIROCHÉTY	2
2. 2. ROD <i>BORRELIA</i>	2
2.2.1. Obecná charakteristika.....	2
2.2.2. Taxonomie.....	4
2.2.3. Životní cyklus.....	5
2.2.4. Interakce borelie – hostitel.....	6
2.2.5. Geografické rozšíření různých druhů borelií.....	8
2. 3. <i>BORELIA GARINII</i>	9
2.3.1. <i>Borrelia</i> a ptáci.....	10
2.3.2. <i>B. garinii</i> a migrační trasy ptáků.....	11
2.3.3. Interakce mezi pevninským a mořským infekčním cyklem.....	15
3. CÍL PRÁCE	16
4. MATERIÁL A METODY	17
4. 1. MATERIÁL A CHEMIKÁLIE	17
4.1.1. Použité chemikálie a kity.....	17
4.1.2. Použité zařízení.....	18
4. 2. METODY	18
4.2.1. Příprava tekutého média BSK – II.....	18
4.2.2. Kultivace spirochét v tekutém mediu.....	19
4.2.3. Mikroskopování spirochét v tekutém mediu a počítání spirochét.....	19
4.2.4. Příprava tekutého média 1,5x BSK ⁺ (pro pevnou půdu).....	19
4.2.5. Kultivace spirochét na pevné půdě.....	20
4.2.5.1. Kultivace spirochét na pevné půdě v bodech.....	20
4.2.6. Isolace genomové DNA.....	21
4.2.6.1. PCR (Polymerase Chain Reaction).....	21
4.2.7. Elektroforéza v agarozovém gelu.....	25
4.2.8. Sekvenování.....	25
4.2.8.1. Purifikace PCR produktů z agarózového gelu – postup.....	25
4.2.8.2. Sekvenování – postup.....	26
4.2.9. Analýza sekvencí.....	26

5. VÝSLEDKY	27
5. 1. KULTIVACE SPIROHÉT NA PEVNÉ PŮDĚ	27
5. 2. KONTROLA DRUHOVÉ ČISTOTY IZOLÁTU	28
5. 3. ANALÝZA VYBRANÝCH ÚSEKŮ GENOMU AMERICKÉHO IZOLÁTU	
<i>B. GARINII</i> SCCH – 7 (138)	30
5.3.1. Analýza částečného <i>fla</i> genu.....	30
5.3.2. Analýza <i>rrf</i> – <i>rrl</i> mezigenového „spacer“ úseku.....	31
5.3.3. Analýza částečné sekvence <i>ospA</i> genu.....	31
5.3.4. Analýzy částečné sekvence <i>ospC</i> genu.....	32
5.3.5 MLST analýza „housekeeping“ genů.....	32
6. DISKUZE	35
7. ZÁVĚR	38
8. LITERATURA	39
9. POUŽITÉ ZKRATKY	47
10. PŘÍLOHY	48

1. ÚVOD

V širokém spektru infekčních onemocnění jsou nemoci, se kterými lidstvo bojuje již celá staletí a stále se nedaří je dostat pod kontrolu, nemoci, které již byly vymýceny a konečně nemoci, které se objevují jako nové. K posledním relativně novým onemocněním patří i lymeská borelióza, známá po dobu třiceti let. Přes tuto krátkou dobu, jsou získané informace z oblasti etiologie, patologie, klinických obrazů, diagnostiky i léčby již velmi bohaté (Farmakoterapeutické informace, 4/2006). Některé aspekty, ale zůstávají stále nejasné a problém vakcinace také dosud nebyl vyřešen (Křupka, 2008).

Člověk jako druh, i jako jedinec, žije doslova v moři mikroorganismů, které nás obklopují v zemním prostředí a ve velkém množství osidlují naši kůži a sliznice. Během svého života se pak jedinec setkává s mikroorganismy, které jsou pro něj výrazněji patogenní. Tyto mikroorganismy mají na svém povrchu strukturu, schopnou vazby na receptory na povrchu buněk lidských tkání. Těchto mikroorganismů jsou řádově desítky. K tomu aby člověk jako druh, i jako jedinec, tomuto všudypřítomnému tlaku světa mikroorganismů odolal a aby přežil, musel si vytvořit složitý systém zachování integrity organismu. K tomuto systému, patří povrchové struktury a komplexy nespecifické a specifické imunity (Havlík, 1990).

Infekční nemoc, je řetězec dějů, který počíná průnikem infekčního agens povrchovou bariérou. Pokud není agens po průniku inaktivováno, začne se množit a když dosáhne v tkáních určitého počtu nebo množství, vyvolá reakci, která vede zpravidla k eliminaci infekčního agens a k úpravě funkcí a struktur napadeného makroorganismu. Někdy však proces zanechá trvalé následky nebo přejde do chronické formy, jindy vede ke vzniku nosičství či konečně ke smrti nemocného (Havlík, 1990).

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2. 1. SPIROCHÉTY

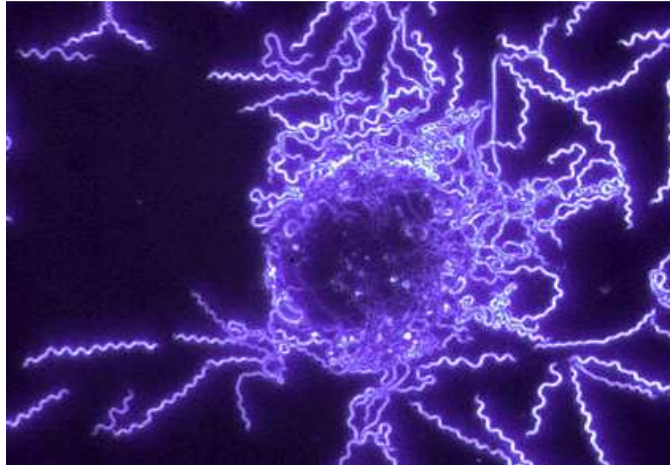
Spirochéty jsou jednobuněčné, spirálovitě tvarované bakterie dosahující délky až 500 μm s rozlišující anatomii a lokomocí (Bednář et al., 1994, Johnson et al., 1984). Množí se příčným dělením. Běžnými bakteriologickými technikami se nebarví (Bednář et al., 1984). Spirochéty sdílejí následující morfologické vlastnosti: (1) vícevrstevný vnější plášť; (2) protoplasmatický válec, který se skládá z peptidoglykanové vrstvy, cytoplasmatické membrány a uzavřeného cytoplasmatického obsahu; (3) periplasmatické bičíky, které jsou umístěné mezi vnějším pláštěm a protoplasmatickým válcem (Johnson et al., 1984).

Řád *Spirochaetales* je rozdělen do dvou čeledí *Spirochaetaceae* a *Leptospiraceae* a pěti rodů *Cristispira*, *Spirochaeta*, *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira* (Paster et al., 1991; Johnson et al., 1984). Rody *Treponema*, *Borrelia* a *Leptospira* obsahují spirochéty vysoce patogenní pro člověka, zejména *Treponema pallidum* jako původce syfilisu, *Leptospira interrogans* jako původce leptospirózy a několik druhů patogenních borelií, např. *Borrelie burgdorferi* sensu stricto (*B. burgdorferi* s.s.) - původce Lymské borreliózy, *Borrelie recurrentis* a *Borrelie hermsii* - původce návratné horečky (Bednář et al., 1994; Johnson et al., 1984).

2. 2. ROD BORRELIA

2.2.1. Obecná charakteristika

Spirochéty rodu *Borrelia* jsou chemoorganotropní, mikroaerofilní, gramnegativní bakterie. Vyznačují se tenkým, pravidelně spirálovitě vyvinutým tvarem o rozměrech 4 – 30 μm na délku a 0,18 – 0,25 μm v průměru (Bartůněk, 2006; Johnson et al., 1984; Burgdorfer et al., 1982). Buňky spirálovitě stočené, s pravidelnými závití vzdálenými 2,2 μm , jejichž počet je 4 – 15 (Bartůněk, 2006) (Obr. 1).



Obr. 1: Spirochéty *Borrelia Burgdorferi*.

(zdroj:<https://rbssdiseases.wikispaces.com/Lyme+Disease>).

Spirochéty se pohybují rotačním pohybem kolem své osy, nebo pohybem translačním a smršťování (Bartůněk, 2006; Johnson et al., 1984). Šroubovitý pohyb umožňuje pohyb v místech jejich nejčastějšího výskytu – ve vysoce viskózním prostředí mezibuněčné hmoty. Tento způsob pohybu umožňuje boreliím překonat epiteliální bariéru a rovněž i jinak vysoce účinnou hematoencefalitickou bariéru. *Borelie* jsou také schopné vstupovat do buněk, například fibrioblastů, dendrických buněk a makrofágů a v nich přežívat (Křupka, 2008). Pohyb umožňují bičíky, kterých je 7 – 11 (Bartůněk, 2006). Bičíky se skládají ze čtyř složek, a to z vlákna, háčku, krku a bazálního disku (Barbour & Hayes, 1986). Bičíky se nacházejí na obou koncích buňky na bazálních discích, umístěných v cytoplasmatické membráně. Ta se skládá ze tří vrstev, vnitřní peptidoglykanové, střední lipopolysacharidové a vnější lipoproteinové (Bartůněk, 2006; Johnson et al., 1984). *Borelie* jsou schopny vyvinout rychlost přesahující 2mm/minutu (Křupka, 2008).

Borelie mohou být kultivované *in vitro* v modifikovaném Barbour – Stonner – Kelly (BSK) mediu (Johnson et al., 1984). Variace tohoto tekutého media jsou běžně používány pro kultivaci *in vitro* (Kurtti et al., 1987). Jednou ze složek Kelly's media je N – acetylglucosamin, který pomáhá růst a způsobuje vyšší buněčnou hustotu. Jiné amino cukry nemohou tento cukr v mediu nahradit (Barbour & Hayes, 1986). Optimální teplota pro kultivaci borelie *in vitro* je mezi 33 – 35°C. Při teplotě 37 - 39°C rostou pomalu a tvoří dlouhé vláknité formy. Generační doba organismu *in vitro* je 11 – 14 hodin při teplotě 35°C, *in vivo* není známá (Bartůněk, 2006; Johnson et al., 1984).

Spirochéty se dobře barví anilínovými barvivy (Bednář, 1994) a Giemsa a Warthin – Starry barvivy (Johnson et al., 1984). Nebarvené buňky nejsou viditelné ve světlém poli mikroskopu, ale jsou viditelné v temném poli mikroskopu nebo ve fázovém – kontrastním mikroskopu (Johnson et al., 1984).

Díky své nekompletní metabolické výbavě jsou borelie plně závislé na svém hostiteli. Nejsou tak schopny růstu ve vnějším prostředí. Chybí jim enzymy pro syntézu aminokyselin, mastných kyselin a nukleotidů, které získávají z hostitelského organismu (Křupka, 2008). Vlivem nevhodných podmínek byla pozorována tvorba „ne – spirálních“ forem (Bartůněk, 2006; Broson and Broson, 1997; Křupka, 2008). Tyto formy se sníženou metabolickou aktivitou jsou při příznivých podmínkách většinou schopny znovuoobnovení (reverse) v plně metabolicky aktivní spirální formu (Křupka, 2008).

2.2.2. Taxonomie

Spirochéty jsou jednou z mála hlavních bakteriálních skupin, jejíž přírodní fylogenetické vztahy jsou patrné na úrovni hrubé fenotypové charakteristiky. Rod *Borrelia* patří do čeledi *Spirochaetaceae* (Paster et al., 1991) a obvykle je rozdělen do dvou hlavních kategorií. První kategorií tvoří druhy borelií způsobující návratnou horečku (*B. hermsii*, *B. recurrentis*). Druhá kategorie tvoří komplex *Borrelie burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* s.l.) způsobující lymeskou boreliózu (LB) (Wang et al., 1999). *B. burgdorferi* s.l. je rozmanitá skupina celosvětově rozšířených spirochét a má základní fenotypové charakteristiky rodu *Borrelia* (Johnson et al., 1984).

V současné době je popsáno 20 druhů spirochét komplexu *B. burgdorferi* s.l. po celém světě. Patří mezi ně *B. afzelii* (Canica et al., 1993), *B. americana* (Rudenko et al., 2009b), *B. andersonii* (Marconi et al., 1995), *B. bavariensis* (Margos et al., 2009), *B. burgdorferi* s.s. (Johnson et al., 1984), *B. bissettii* (Postic et al., 1997), *B. californiensis* (Postic et al., 2007), *B. carolinensis* (Rudenko et al., 2009a), *B. finlandensis* (Casjens et al., 2011), *B. chilensis* (Ivanova et al., 2013), *B. garinii* (Baranton et al., 1992), *B. japonica* (Kawabata et al., 1993), *B. kurtenbachii* (Margos et al., 2010), *B. lusitaniae* (LaFleche et al., 1997), *B. sinica* (Masuzawa et al., 2001), *B. spielmanii* (Richter et al., 2006), *B. tanukii* (Fukunaga et al., 1996), *B. turdi* (Fukunaga et al., 1996), *B. valaisiana* (Wang et al., 1997), *B. yangtze* (Chu et al., 2008). Popisování nových druhů nadále pokračuje, takže aktuální počet popsáných druhů borelií není pravděpodobně konečný (Rudenko et al., 2011).

Tento komplex můžeme dále rozdělit do tří skupin, podle patogeneze pro člověka jako původce LB. Do první skupiny patří druhy patogenní pro člověka, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*. Pouze *B. burgdorferi* s.s. způsobuje LB ve Spojených státech a v Evropě (Rudenko et al., 2011). *B. afzelii* a *B. garinii* jsou považované za druhy, které se vyskytují jen v Eurasii. Druhou skupinu tvoří druhy borelií, které byly nalezeny ve vzorcích člověka, ale nejsou běžným druhem borelií, které ho infikují. Tvoří tedy skupinu, která není standardní pro onemocnění u člověka. Jsou to druhy jako např., *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. kurtenbachii*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii* a *B. valaisiana*. Do třetí skupiny řadíme druhy borelií, které nikdy nebyly nalezeny u člověka, ani nebyly izolovány z lidských vzorků. K této skupině patří druhy např., *B. americana*, *B. andersoni*, *B. carolinensis*, *B. chilensis*, *B. sinica*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. yangtze*.

2.2.3. Životní cyklus

Pro epidemií borelií je důležitý přenos prostřednictvím členovců (Bendář et al., 1994). Životním cyklem skupiny spirochét, způsobující LB, je dynamická souhra mezi bakterií, hostitelem a přenašečem. Hlavním vektorem patogenních druhů *B. burgdorferi* s.l., u nás i ve světě je klíště rodu *Ixodes* (Bartůněk, 2006). Jedná se o *Ixodes ricinus* v Evropě, *Ixodes persulcatus* ve východní Evropě a Asii, *Ixodes scapularis* a *Ixodes pacificus* v Severní Americe (Margos et al., 2011).

Borelie rostou a vyvíjí se ve střevě klíštěte a mění se pod vlivem okolí, kterým je krev a lymfa hostitele (Bartůněk, 2006). Existuje více než 240 druhů obratlovců, kteří mohou působit jako rezervoároví hostitelé pro spirochéty způsobující LB, mezi ně zahrnujeme myši, krysy, hraboše, veverky, čipmanky, hmyzožravce (rejsci, ježci), mývaly a mnoho ptačích druhů (Gern, 2008; Margos et al., 2011). Pokud do tohoto řetězce zapadne člověk, stává se slepým článkem ve vývoji, který už dále nepokračuje.

Významnou roli ve vývoji spirochét hraje to, že už raná vývojová stádia klíšťat, tj. larvy a nymfy, mohou být nositeli borelií. To pro člověka znamená, že při jejich přisátí může být spirochéta přenesena na člověka a stát se příčinou onemocnění boreliózou. Nymfy a dospělci se příležitostně živí na lidech. Malá velikost nymf je dělá těžko odhalitelnými, a tím se zvyšuje pravděpodobnost, že sání nymfy trvá dostatečně dlouho pro přenos infekce. Spirochéty jsou zřídka, pokud vůbec přenášeny transovarialně, takže larvy a nymfy jsou velmi důležité pro zachování spirochét v přírodě (Tilly et al., 2008).

Klíště a obratlovec jako hostitel poskytují kontrastní prostředí pro bakteriální růst. Pozoruhodný je fakt, že obratlovci regulují svou teplotu mezi 37 – 42°C, zatímco klíšťata svou teplotu mění v závislosti na teplotě okolního prostředí (Tilly et al., 2008). Délka životního cyklu klíšťat je závislá na klimatických faktorech a hostitelích, kolísá tedy mezi 2 – 6 lety. Na našem území žijí klíšťata 2 roky.

2.2.4. Interakce borelie - klíště – hostitel

Všichni známí původci lymeské boreliózy kolují mezi klíšťaty (Arachnida, Acari, Ixodoidea) a širokým spektrem obratlovců (savci, ptáci, plazi). Cirkulace spirochét je modelem složitého vztahu mezi hostitelem, přenašečem a bakterií. Ve volné přírodě se vyskytuje rozdíl mezi specifitou a selektivitou různých druhů borelií k hostitelům. Hostitelská specializace je důležitým faktorem v geografickém rozšíření jednotlivých druhů borelií. Klíště se nemůže pohybovat samostatně na velké vzdálenosti. Je známo, že šíření spirochét LB je spojeno s pohybem hostitelů (Margos et al, 2011).

Existující interakce zahrnují vztahy – 1. patogen a klíště

2. patogen a hostitel

3. klíště a hostitel

V 1. případě na sebe vzájemně působí patogen a jeho vektor, přičemž patogen infikuje buňky nebo mezibuněčné prostory klíštěte (střevo, hemocél, slinné žlázy), kde se replikuje. Schopnost konkrétního druhu klíšťat působit jako kompetentní vektor, závisí na tom, zda patogen dokáže přežít a překonat několik obraných bariér v klíštěti.

Ve 2. případě patogen interaguje se svým hostitelem – obratlovcem, kterého infikuje a replikuje se extracelulárně nebo v buňkách. Následky nákazy závisí na „tropismu“ patogenu pro konkrétní buňky, typy tkání hostitele, nebo místo infekce (např. nervová tkáň, klouby) a jeho „patogenickém fenotypu“, a také na věku, genetické výbavě a stavu imunitního systému hostitele.

Ve 3. případě je interakce mezi klíštětem a jeho hostitelem. Místo na kůži hostitele kde se klíště přisálo, představuje křižovatku pro patogeny a překročení, které pro spirochéty není vůbec jednoduché. Tato křižovatka je obzvlášť rušná pro patogeny přenášené klíštětem, jelikož sání krve klíštětem je velmi složitý a poměrně dlouhý a vysoce uspořádaný proces (Nuttal & Labuda, 2004).

Sání tvrdých klíšťat je dlouhodobý proces. Larva se krmí po dobu 3 – 5 dní, nymfa po dobu 4 – 7 dní a dospělé klíště 7 – 11 dnů (www.avcr.cz, ziva 6/2007). Krev hostitele a místo kousnutí ovlivňuje dobu krmení (Comstedt, 2008). Během sání se vyvíjí silná odpověď hostitele, zahrnující jak složku hemostatickou (zastavující krev), tak zánětlivou. Klíště se těmto mechanismům brání pomocí sekrece biologicky aktivních látek ze slinných žláz. Slinné žlázy patří v těle klíštěte mezi největší a hrají významnou roli v úspěšném příjmu krve. Zároveň jsou cestou přenosu mnoha patogenů do těla hostitele. Příjem potravy (sání krve) ektoparazitů je ztížen faktorem, že hostitel má účinné mechanismy, jak zabránit ztrátě krve a tedy i nasátí. Sliny ektoparazitů obsahují širokou škálu biologicky aktivních látek, které umožňují obranné mechanismy hostitele obejít. Všechny druhy klíšťat sají krev svých hostitelů, ale jen 10% z celkového počtu má schopnost přenášet patogenní organismy – viry, bakterie, prvoky – na člověka. Všechny patogeny se do klíštěte dostanou během sání na infikovaném hostiteli a při následujícím sání se přenášejí skrze slinné žlázy na dalšího hostitele (www.avcr.cz/ziva 6/2007).

V přírodě se oblasti s endemickým rozšířením LB udržují prostřednictvím složitých interakcí mezi různými druhy klíšťat, rozmanitými kmeny *B. burgdorferi* s.l. a mnoha druhy savců, ptáků a plazů, na nichž se klíšťata krmí. Existují další druhy klíšťat z komplexu *Ixodes* stejně jako druhy nespádající do komplexu *Ixodes*, o nichž je známo, že mohou být přirozeně nakažená a přenášet *B. burgdorferi* s.l. mezi volně žijícími zvířaty. Krátký výčet těchto druhů zahrnuje: *I. minor*, *I. affinis*, *I. dentatus*, *I. spinipalpis*, *Dermacentor variabilis*, *D. albipictus*, *Amblyomma americanum*, *I. hexagonus*, *I. trianguliceps*, *I. uriae*, *I. turdus*, *I. tanukii*, *I. ovatus*, *I. columnae*, *I. nipponensis*, *I. granulatus*, *I. monospinosus*, *I. moschiferi*, *Haemaphysalis longicornis*, *H. concinna*, *H. bispinosa*. Většina z nich obvykle neútočí na člověka, ale slouží jako „udržovací“ vektory a v některých oblastech se zdají být významnější v enzootickém cyklu *B. burgdorferi* s.l. než ‘bridge’ vektory, kteří se živí na stejných hostitelích a napadají člověka (Rudenko et al., 2011).

Různé druhy borelie z komplexu *B. burgdorferi* s.l. jsou specifické k různým hostitelům. Je známo, že *B. burgdorferi* s.s. ve Spojených státech a v Eurasii byla izolovaná ze širokého spektra hostitelů – savců i ptáků, na rozdíl od *B. afzelii*, která v Eurasii byla izolována především z hlodavců a *B. garinii* je specializovaná na různé druhy ptáků. V Japonsku je mnoho druhů savců hostitelů *B. japonica*. Za jediné hostitele *B. valaisiana* v Evropě jsou považováni ptáci, neboť ze savců ani hlodavců dosud nebyly žádné izoláty *B. valaisiana* kultivovány ani detekovány. Pouze několik kmenů *B. lusitaniae* bylo izolováno z

I. ricinus v jižní, střední a východní Evropě. Je známo, že ještěrky jsou základními hostiteli *B. lusitaniae*. *B. andersonii* a *B. bissettii* v Severní Americe mají patrně specifické a úzké spektrum hostitelů, konkrétně králíka východoamerického (*Sylvilagus floridanus*) a křečka příbytkového (*Neotoma fuscipes*) (Wang et al., 1999).

2.2.5. Geografické rozšíření různých druhů borelií

Komplex *B. burgdorferi* s.l. je různorodá skupina celosvětově rozšířené bakterie. Různé druhy komplexu *B. burgdorferi* s.l. se často vyskytují pouze na určitém místě. Tak dvanáct druhů z komplexu *B. burgdorferi* s.l. jsou spojena s Eurasií. Do Eurasie patří druhy *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. japonica*, *B. lusitaniae*, *B. sinica*, *B. spielmanii*, *B. tukanii*, *B. turdi*, *B. valaisiana*, *B. yangtze*. Dalších 7 druhů je přítomno v Severní Americe, zde jsou zařazeny druhy *B. americana*, *B. andersonii*, *B. bissettii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. californiensis*, *B. carolinensis*, *B. kurtenbachii* (Clark et al, 2013). Pouze *B. burgdorferi* s.s., *B. bissettii*, *B. carolinensis* jsou přítomné ve Starém a Novém světě (Rudenko et al., 2011). Až do popsání *B. chilensis* v roce 2013 nebyla na území Latinské Ameriky zaznamenána přítomnost borelie. Nový druh z komplexu *B. burgdorferi* s.l., *B. chilensis* byla popsána jako poslední po jejím objevení v Chile. Šest druhů z komplexu *B. burgdorferi* s.l. bylo hlášeno ve vzdáleném východním Rusku a Asijských zemí, jsou to druhy *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. yangtze*, *B. garinii* a *B. afzelii*. *B. japonica*, *B. tanukii* a *B. turdi* jsou omezeny na Japonsko. Přítomnost *B. burgdorferi* s.s. v Asii je sporný, ačkoli většina zpráv prokazuje, že *B. burgdorferi* s.s. je tam přítomna. Tak například, dvě nedávné studie potvrzují přítomnost tohoto druhu borelie na pevnině Číny a Taiwanu (Wang et al, 1999). Případy LB na Jižní polokouli byly registrované v Jižní Americe (Chile, Brazílie, Argentina, Kostarika), Africe (Maroko, Tunisko) a v Austrálii (Wang et al, 1999). V Jižní Americe se například nacházejí druhy jako je *B. carolinensis*, *B. californiensis*, *B. chilensis* a v Africe se nacházejí druhy *B. garinii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. lusitaniae* (www.lymebook.com).

2. 3. BORRELIA GARINII

B. garinii je pojmenována po Charlesi Gariniimu, francouzském lékaři, který roku 1922 popsal neurologické a kožní příznaky, které se vyskytovaly u pacientů po přisátí klíštěte (Baranton et al., 1992). *B. garinii* způsobuje LB v Evropě a Asii (Comstedt et al., 2009). V Evropě *B. garinii* je na druhém místě po *B. afzelii*, jako původce LB a dominuje u pacientů s neuroboreliózou. Tato borelie je nejvíce neurotropní, ze tří druhů komplexu

B. burgdorferi s.l. a nemoc, kterou vyvolá, zahrnuje případy meningopolyneuritis a vzácně encephalomyelitis (Smith et al., 2006).

B. garinii je geneticky a antigeně nejvíce heterogenní druh, mezi druhy borelie způsobující LB. Určováním s monoklonálními protilátkami specifickými pro vnější povrchový protein A (*ospA*) bylo zjištěno, že *B. garinii* představuje 5 z celkem 7 sérotypů *ospA* nalezených mezi druhy borelií způsobující LB (Comstedt et al., 2009). *B. garinii* byla jako samostatný druh popsána v roce 1992 skupinou Dr. Barantona, pomocí porovnání vzorků po restrikci genu pro rRNA, vzorků na proteinové elektroforóze a reaktivitou s monoklonálními protilátkami myši. Byl také stanoven obsah G+C párů v genomu, a to 27 až 28 mol% (Baranton et al., 1992).

Údaje získané v průběhu posledních deseti let vyžadují přehodnocení již dříve získaných představ o LB ve Spojených státech, zejména v západních a jižních oblastech Severní Ameriky. Nedávné výsledky, založené na analýze izolátů borelie získaných z klíšťat, ptáků a hlodavců z jihovýchodu Spojených států, potvrzují přítomnost již dobře zavedených populací různých druhů borelií, kromě *B. burgdorferi* s.s., a to *B. andersonii*, *B. bissettii* a také nově popsáných druhů *B. carlinensis*, *B. americana* a *Borrelia sp. nov* v jižní části země (Rudenko et al., 2011). Kromě toho bylo zjištěno, že některé izoláty mají v sobě směs více druhů borelií, včetně těch „evropských“, jako je například *B. garinii* (nepublikovaná data).

2.3.1. *Borrelia* a ptáci

Ptáci hrají důležitou roli v ekologii a epidemiologii u mnoha druhů patogenů infekčních pro lidskou populaci. Při migraci mají ptáci tendenci se shromažďovat na místech odpočinku a tím umožňují horizontální přenos patogenů. K dispozici jsou tři mechanismy v rozšiřování patogenů, do kterých mohou být zapojeni ptáci.

1. **Biologičtí dopravci/nosiči:** Pro ně je typické, že pták je infikován a patogen se množí v ptačím těle. Některé z více známých patogenů, pro které ptáci slouží jako biologičtí dopravci/nosiči jsou West Nile virus, virus chřipky typu A, nalezený v některých ptácích v Evropě, *Vibrio cholera*, také *Campylobacter jejuni* a *Salmonella typhimurium*. Dva poslední druhy také dokážou infikovat vodu z ptačích výkalů.

2. **Mechaničtí dopravci/nosiči:** Ptáci mohou sloužit jako vnější a vnitřní dopravci/nosiči, ale bez rozšíření patogenu. Například, spory hub z různých druhů, zahrnující *Candida albicans* a *Aspergillus fumigatus*, jako původce aspergilózy (houbová infekce plic), se drží na peří nebo na jiných částech ptačího těla, tímto používají ptáky jako prostředek přenosu.
3. **Transportéry:** Ptáci mohou sloužit jako transportéry infikovaných ektoparazitů. Z medicínského pohledu jsou nejdůležitějšími ektoparazity klíšťata (*Ixodes* spp a *Argas* spp). Například virus klíšťové encefalitidy TBE (Tick – Borne Encephalitis virus), byl nalezen v klíšťatech krmících se na různých druzích ptáků (Comstedt, 2008).

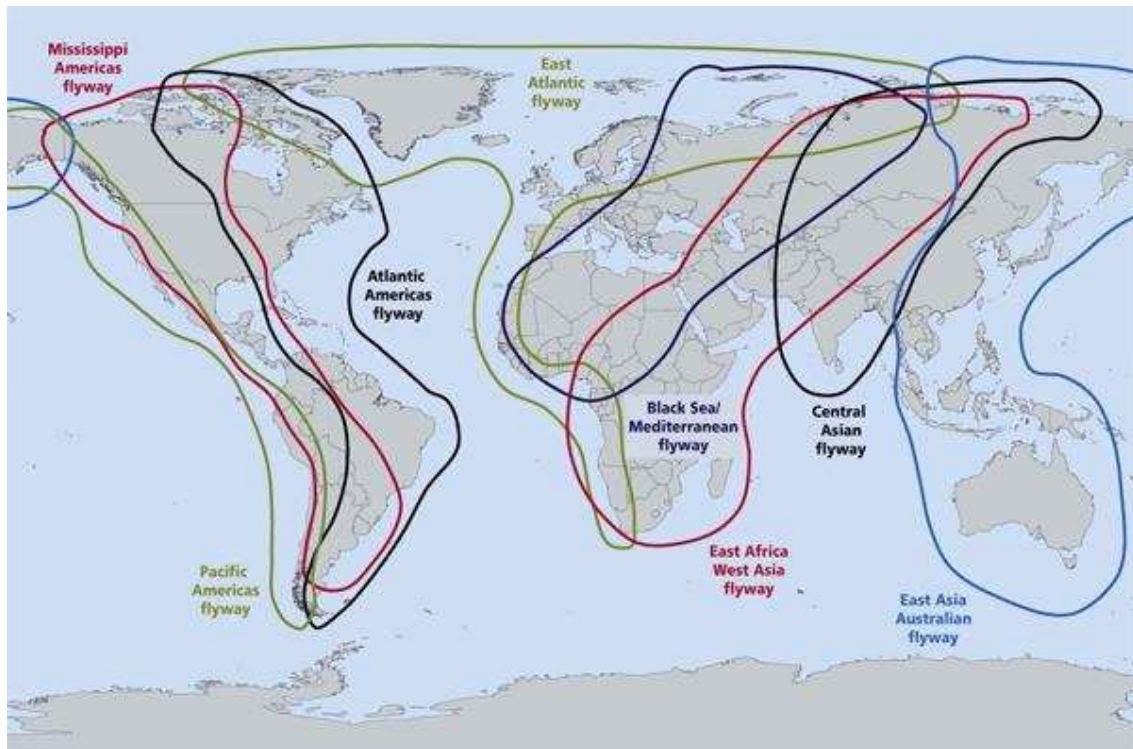
Po dlouhou dobu byli ptáci, zejména z důvodu své vysoké tělesné teploty vyloučeni ze seznamu možných hostitelů pro spirochéty *B. burgdorferi* s.l. Je známo, že jako optimální růstová teplota pro mnoho kmenů borelie způsobující LB je teplota stanovená mezi 33 – 35°C, čemuž ptáci nevyhovují, neboť mají ve srovnání s většinou savců tělní teplotu zvýšenou. Nicméně, na rozdíl od jiných druhů, izoláty *B. garinii* vykazují růst při teplotách až do 41°C. Pravděpodobně se jedná o důvod, proč *B. garinii* je nejčastějším druhem infikujícím ptáky v Evropě a Asii. Je možné, že migrace ptáků může být také jedním z vysvětlení, proč *B. garinii* je nejvíce heterogenní ze všech dosud studovaných druhů borelií způsobujících LB (Comstedt et al., 2011). Pokud jde o spirochéty LB, ptáci fungují stejně jako biologičtí dopravci/přenašeči infikovaných ptáků a také jako přepravci infikovaných klíšťat (Comstedt, 2008).

V přírodě *B. garinii* přirozeně udržuje mořský a pevninský enzootický cyklus, který v první řadě zahrnuje mořské ptáky a stěhovavé pěvce. Tyto skupiny ptáků jsou spojovány s odpovídajícími klíšťaty: mořští ptáci s *I. uriae* a stěhovaví ptáci s *I. ricinus*, *I. scapularis* a *I. persulcatus* (Comstedt et al., 2009; Smith et al., 2006; Muzaffar et al., 2012). Tyto jmenované druhy klíšťat mohou sít a přenášet infekci i na člověka. Pravděpodobně s migrací mnoha druhů ptáků přes velké vzdálenosti úzce souvisí to, že izoláty *B. garinii* byly nalezeny jak na severní, tak i v jižní polokouli.

2.3.2. *B. garinii* a migrační trasy ptáků

Migrace ptáků zůstává jedním z nejzajímavějších aspektů ptačího světa. Dvakrát ročně se miliardy ptáků stěhují na velké vzdálenosti po celém světě (www.birdlife.org).

Někteří z nich jsou mistři v cestování na vzdálenost až tisíce kilometrů (Fritzsche, 2002). Mnoho druhů spolu migruje na dobře zavedených trasách, známých jako „flyways“, tedy migrační trasy. Obvykle se tyto trasy sledují převážně ze severu na jih a spojují hnízdiště v arktických a mírných oblastech s nechovnými místy (nehnízdišti) v mírných a tropických oblastech. Nedávný výzkum, který identifikoval osm takových tras (viz obrázek 2), ukázal, že se ptáci stěhují i z východu na západ, jak nám naznačuje například zelená migrační trasa („East Atlantic Flyway“).



Obr. 2: Migrační trasy ptáků.

(zdroj:http://www.birdlife.org/datazone/userfiles/file/sowb/flyways/4_East_Atlantic_Factsheet)

„East Atlantic flyway“ spojuje přerušovaný pruh arktických hnízdišť, v úseku z Kanady na východ k střední Sibiři, se zimovištěm v západní Evropě a západní Africe. Každý podzim obrovské množství arktických migrantů, především vodních ptáků, se slétá ze západní Evropy a z dálného severu. Ze západní polokoule (Kanady, Grónska, Islandu) přilétají polární ptáci, včetně bernešky tmavé (*Branta bernicla hrota*), z Grónska - husy běločelé (*Anser albifrons flavirostris*) a bělořita šedého (*Oenanthe oenanthe leucorhoa*). Z východní polokoule (Skandinávie, arktického Ruska a severozápadní Sibiře) přilétají euroasijské ekvivalenty: berneška tmavá (*B. b. bernicla*), evropská husa běločelá (*A. a. albifrons*) a skandinávský druh bělořita šedého (*O. o. oenanthe*). Pro mnoho arktických migrantů,

zejména husy, kachny a labutě je západní Evropa konečná destinace. Pro jiné je pouze odrazovým můstkem před cestou, která bude končit v zimovišti v Africe (www.birdlife.org).

Ptačí kolonie v různých zeměpisných šířkách mohou být zamořeny mnoha druhy klíšťat a klíšťáků (Muzzafar et al., 2012). Stěhovaví ptáci hrají důležitou roli roznašečů klíšťat uvnitř a mezi kontinenty (Olsén et al., 1995). Díky jejich relativně dlouhé životnosti a skutečnosti, že mohou létat, pomáhají ptáci při rozšiřování infekce po celém světě (Comstedt et al., 2011). Migrační trasy ptáků jsou rozmanité (Olsén et al., 1995). Stěhovaví ptáci využívají nejrůznějších zastávek podél svých migračních tras (Humair et al., 2002). V těchto místech, kde se ptáci krmí a odpočívají, se klíšťata a jiní ektoparaziti mohou připojit a později odpojit po přeletu z trasy na jinou trasu, nebo po přemístění v hnízdištích (Olsén et al., 1995). Právě v těchto místech se mohou infikovaná klíšťata přisát na ptáky a předat jim spirochéty *Borrelia* nebo naopak neinfikovaná klíšťata mohou získat borelie z již z infikovaných ptáků. (Humair et al., 2002).

Mořský infekční cyklus *B. garinii* byl objeven téměř před dvěma desítkami let, kdy Olsén s kolegy prokázali cirkulaci tohoto druhu spirochét, mezi mořskými ptáky prostřednictvím klíšťat *I. uriae* (Olsén et al., 1995; Smith et al., 2006). Přítomnost *B. garinii* byla dále zdokumentována v klíšťatech *I. uriae*, parazitujících na alkách (*Alca torda*) na ostrově Bonden ve Švédsku. Dodatečně autoři zjistili infekci v kožní biopsii z alek, a tímto poskytli některé z prvních důkazů existence mořského cyklu LB zahrnujícího mořské ptáky a klíšťata *I. uriae*. Následně byla *B. garinii* detekována v klíšťatech *I. uriae* krmících se na papuchalcích bělobradých (*Fratercula arctica*) na Faerských ostrovech, na alkounovi obecném (*Cephus grylle*) a buňňáčkovi šedém (*Oceanodroma furcata*) na Islandu (Fritzsche, 2002).

Během posledních deseti let byly zveřejněny četné studie o zjištění *B. garinii* v mořských ptácích a klíšťatech *I. uriae* v subarktické Eurasii (Comstedt et al., 2011), Arktidě (Larsoo, 2007), u pobřeží Labradoru (Muzaffar et al., 2009), na Gullských ostrovech Newfoundlandu (Baggs, 2011), stejně jako na atlantickém pobřeží Severní Ameriky (Smith et al., 2006; Bunikis et al., 1996).

Mořští ptáci, kteří tráví většinu svého života daleko na moři, musí plodit na zemi. Vzhledem k tomu, že se musí vyhnout predátorům, se často množí na izolovaných ostrovech nebo poloostrovech, které vedou k shlukování stovky tisíc, někdy až milionů párů v průběhu období rozmnožování. Přítomnost takového obrovského množství ptáků, je a jejich potomky

je dělá citlivými na zamoření klíštětem *I. uriae*. Není divu, že zamoření *I. uriae* bylo zjištěno ve více než 50 druzích mořských ptáků na obou polokoulích (Fritzsche, 2002). Během období hnízdění parazitovaní ptáci mohou sdílet společná stanoviště s různými druhy klíšťat, které mohou být schopné přenášet *B. garinii* tam a zpět mezi konečnými hostiteli. Kromě toho tyto shromáždění mohou vést k „super – infekcím“ a zvýšení zachování infekce (Smith et al., 2006).

V severní a jižní polokouli, je několik druhů ptáků, kteří jsou důležití pro rozšíření infikovaných klíšťat, a tím pádem jsou důležití pro rozšíření a přežití spirochét *B. garinii*. Papuchalk a burňák severní (*Puffini puffini*), se například pohybují po celém světě v obrovských smyčkách. Vyskytují se na evropském kontinentálním šelfu v červenci a srpnu, kdy míří na jihovýchod. Mezi srpnem a prosincem tráví čas hlavně podél amerického pobřeží, mezi Rio de Janeiro na severu a Rio de la Plata na jihu. V březnu a dubnu ptáci opouštějí svá hnízdiště na Falklandských a dalších ostrovech v jižním Atlantiku a míří na severozápad přes rovník k vodám bohatým na ryby, k Newfoundlandu. Tak se postupně přesunou zpět přes severní Atlantik, kde jsou často viděni okolo Skotska, Islandu, Faerských ostrovů, kde tradiční lovecká sezóna papuchálek začíná na konci července (Fritzsche, 2002).

Mezi nejúspěšnější a nejrozšířenější mořské ptáky patří rackové. Existuje 45 druhů racků, kteří se vyskytují na obou polokoulích. Kolonie mohou být výrazné čítající až tisícovky jedinců. V období rozmnožování většina racků, například racek chechtavý (*Arus ridibundus*), provádí migrační stěhování. Pohybuje se paralelně k zeměpisné šířce, aby se vyhnul chladnému počasí. Podél přítoku Horního Rýna, například, dosáhnou až na úpatí švýcarských Alp, kde se *B. garinii* stala vysoce endemickou mezi různými pozemními pěvci. Ti pak mohou šířit borelie na jiné hostitele, tím že se pravidelně stěhují k severní a jižní Evropě, buď údolím Horního Rýna, nebo přímo přes Alpský průsmyk (Fritzsche, 2002).

Přítomnost *B. garinii* na jižní polokouli v tučňákoví patagonském (*Aptenodytes patagonicus*) a albatrosovi černobrvém (*Diomedea melanophris*) z Campbellských ostrovů u Nového Zélandu, stejně jako na Falklandských ostrovech svědčí o rozšíření výskytu tohoto druhu borelie na obou polokoulích (Muzaffar et al., 2012).

V roce 2012 skupinou Dr. Muzaffara byla zaznamenána přítomnost *B. garinii* v klíšťatech *I. uriae* na ostrovech Newfoundlandu a Labradoru v Kanadě (Muzaffar et al., 2012). Tyto ostrovy jsou důležitou oblastí pro rozmnožování mořských ptáků. Mořští ptáci, jako například alka malá (*Alca torda*), běžný alkoun tlustozobý (*Uria aalge* a *Uria lomvia*),

papuchalk bělobradý (*Fratercula arctica*) a buňáček dlouhokřídlý (*Oceanodroma leucorhoa*), využívají širokou škálu biotopů od skalnatých útesů po poměrně hluboké nory. Klíšťata (*I. uriae*) byla detekována ve všech stanovištích ptáků na ostrovech a jsou popsána, jako jeden z hlavních parazitů těchto mořských ptáků. Kromě ptáků, je tam zaznamenána přítomnost několika druhů hlodavců jako, např., hraboše, lasice a norky. Zjištění *B. garinii* v těchto oblastech představuje první záznam této spirochéty z kolonie ptáků v severním Atlantiku. Tím se prodlužuje severní hranice výskytu patogenu ve východní Severní Americe, což může být důsledkem globálního oteplování a jiných polehčujících okolností (Baggs et al., 2011).

2.3.3. Interakce mezi pevninským a mořským infekčním cyklem

Nicméně na nějakou dobu byli mořští ptáci považováni pouze za potenciálního rezervoárového hostitele v globálním oběhu borelie. Považovalo se za fakt, že bakterie se zachovávají v „tichém“ enzootickém cyklu v mořských ptácích ve svých hnízdištích v širokých, ale nespojitých oblastech. Potenciální spojení mořského cyklu *B. garinii* s pevninským cyklem a tedy možný přenos epidemiologie LB, bylo považováno za nemožné, kvůli tomu, že tyto dva enzootické cykly jsou obecně geograficky a ekologicky oddělené. Stručně řečeno, aktuální pohled naznačuje 2 důvody, proč mořský infekční cyklus bezprostředně neohrožuje lidi. Za prvé geografická bariéra, jak jsou kolonie mořských ptáků často nacházeny v pobřežních oblastech nebo na ostrovech, kde je hustota lidské populace nízká. Riziko získání infekce je tedy velmi malé. Za druhé, biologická bariera, z čehož vyplývá, že *I. uriae* raději parazituje na různých mořských ptácích, než na savcích, včetně lidí. Z toho lze vyvodit, že mořský infekční cyklus jen ovlivňuje globální rozšíření a heterogenitu mezi kmeny *B. garinii* (Comstedt et al., 2011).

Avšak v poslední době se začíná diskutovat o možné interakci mezi těmito cykly, a to buď pomocí rozšíření z mořských ptáků na jiné ptáky, nebo z ptáků na savce. I když mořský infekční cyklus je omezen na různé mořské ptáky a otevřená moře, a klíšťata *I. uriae* se jen zřídka nacházejí mimo kolonie, může spojení s pevninským infekčním cyklem probíhat v rámci kolonií mořských ptáků, kde vyhledávají potravu hlodavci a odpočívají jiní ptáci (Comstedt et al., 2011).

Mimoto vnitřní přenos *B. garinii* se může vyskytovat v místech, kde se oba přenašeči (*I. uriae* a *I. scapularis*) vyskytují vedle sebe. Smith s kolegy zjistili rozšíření *B. garinii* v klíšťeti *I. uriae* na ostrově Gull na východním pobřeží poloostrova Avalon ostrova

Newfoundlandu (Smith et al., 2006). Ve stejných místech byla nedávno objevena přítomnost *I. scapularis*. Autoři naznačují, že objevení *I. scapularis* na pobřeží Maine a dalších pobřežních místech, může být příkladem překryvů mořských a pevninských genotypů *B. garinii*, bez ohledu na rozdíl v ekologickém umístění. Autoři dále uvádí, že význam tohoto nálezu bude záviset na pravděpodobnosti začlenění *B. garinii* do vznikajících cyklů zahrnujících *I. scapularis*. Existence v některých koloniích mořských ptáků kontaktních zón hlodavců a jiných savců s různými ptáky a kombinace *I. uriae* s relativně běžným přírodním přenašečem, jako je *I. ricinus* nebo *I. scapularis*, může poskytnout přenos borelií mezi tyto dva enzootické cykly.

Každopádně, překrytí mezi pevninským a mořským infekčním cyklem kmenů *B. garinii*, už bylo částečně potvrzeno analýzou sekvencí různých úseků genomu několika druhů *B. garinii*. Tak na základě rekombinační analýzy různých alel bylo zjištěno, že některé mořské kmeny *B. garinii* jsou velice blízko příbuzné k pevninským kmenům. Sekvenační analýza 8 chromosomálních a 2 plasmidových úseků (*ospA* and *ospC*) ukázala: zaprvé na to, že *B. garinii*, která cirkuluje v mořském cyklu, je velice heterogenní, a zadruhé na smíšený původ mořských a pevninských alel (Gómez – Díaz et al., 2011).

Kromě toho izoláty *B. garinii* s identickými IGS (mezigenovými úseky) byly nalezeny v obou klíšťatech *I. ricinus* a *I. uriae* shromážděných ze švédských ostrovů Norrbyskär a Bonden, vzdálených od sebe 25 km (Comstedt et al., 2011), což také potvrzuje překrytí obou cyklů.

Pro další pochopení vztahů mezi mořským a pevninským enzootickým cyklem *B. garinii* byla pozorována genetická variabilita kmenů toho druhu, v první řadě v klíšťatech *I. ricinus* a *I. uriae* sesbíraných v subarktické Eurasii. Bylo zjištěno, že k *B. garinii* v této zeměpisné oblasti patří dvě částečně se překrývající populace *B. garinii* s odlišnou genetickou variabilitou (Comstedt et al., 2009).

Závěrem můžeme říct, že prokázaná výměna kmenů *B. garinii* mezi pevninským a mořským infekčním cyklem může svědčit o rozšiřování tohoto druhu borelie na místa, kde dosud nikdy nebyla nalezena a že nalezení *B. garinii* mimo Evropu a Asii bylo jen otázkou času a snahy.

3. CÍL PRÁCE

1. Literární studie k problematice globální distribuce *B. garinii*.
2. Použití metody kultivace borelie na tvrdé půdě a jejich rozdělení na jednotlivé klony.
3. Charakterizace jednotlivých klonů pomocí molekulárních technik.
4. Interpretace výsledů a zkušenosti se zvolenými metodami.

4. MATERIÁL A METODY

4.1. MATERIÁL A CHEMIKÁLIE

4.1.1 Použité chemikálie a kity

Tab. 2: Seznam použitých chemikálií a kitů.

Kultivace	
BSK – II medium	kompletní BSK – II medium + 6% králičí sérum
Persteril - roztok kyseliny peroxyoctové, peroxidu vodíku a kyseliny octové (Acidum peraceticum)	0,5 % roztok
Izolace DNA	
Kit na izolace genomové DNA	DNeasy® Blood & Tissue Kit (250), (Qiagen)
Kit na purifikace PCR produktů (kolony)	Centrifugal Filter Units DNA extraction form agarose (Millipore)
PCR	
PCR 2x Master Mix	Taq DNA polymeráza [doplněno reakčním pufrém (pH 8.5)] 400μM dATP, 400μM dGTP, 400μM dCTP, 400μM dTTP, 3mM MgCl ₂ (Promega)
DNA Elektroforéza	
50x TAE pufr	200mM Tris-HCl, 50mM EDTA
Agaróza	0,8 – 2 % agaróza (Serva) pro DNA ELFO v 1xTAE pufru
6x vzorkový pufr	Blue/Orange 6x loading dye, (0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 0.4% orange G, 15% Ficoll™ 400, 10mM Tris-HCl (pH 7.5) a 50mM EDTA (pH 8.0) (MBI Fermentas)
PCR Marker	Gene Ruller 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)

4.1.2. Použité zařízení

Tab. 3: Seznam použitých zařízení.

Zařízení	Typ
Centrifugy	Centrifuga 5415 C (Eppendorf)
	Centrifuga 5415D (Eppendorf)
	Centrifuga 1415 R (Eppendorf)
	Centrifuga Universal 32 R (Hettlich zentrifugen)
Elektroforéza	SHU6 (Sigma Aldrich)
	OVL Easycast TM B2 (Thermo scientific)
Mikroskop s temným polem	Leica DM 1000 LED (Leica)
PCR cycler	Mastercycler <i>personal</i> (Eppendorf)
Zahříváč	Thermomixer (Eppendorf)
Petroff - Hauserova počítací komůrka	hloubka: 0,02 mm, Hauser Scientific, PA, USA
Fotosystém na focení gelů	Kodak
Flow box	Gelaire
Box pro pěstování borelie na pevné půdě	BD GasPak TM EZ
PCR box	DNA/RNA UV cleaner UVC/T-M-AR (Biosan)
Vortex	Heidolph REAX top

4. 2. METODY

4.2.1. Příprava tekutého media BSK – II

Příprava byla prováděna podle protokolu Dr. P. Rosa (USA). Seznam použitých složek pro výrobu 1 litru media je zobrazen v tabulce 4. První tři sloučeniny ze seznamu byly v patřičném množství ponechány za stálého míchání v 800 ml vody na magnetickém míchadle, dokud se tyto sloučeniny nerozpustily. Poté byly přidány ostatní složky uvedené v tabulce 4 a následně byl celý roztok připraven při stálém míchání. Želatina byla rozpuštěna v horké vodě a přidána k ostatním složkám. Po rozpuštění všech složek bylo pH dovedeno do 7,6 pomocí NaOH. Po zahřátí na 55°C byl roztok přefiltrován přes 0,22 µm filtr. Filtrace probíhala ve sterilním boxu, aby nedošlo ke kontaminaci. Přefiltrovaný roztok byl poté při sterilních podmínkách rozdělen do zkumavek po 50 ml a do každé zkumavky byly přidány 3 ml králíčího séra. Medium bylo uloženo do mrazáku na – 20°C.

Tab. 4: Složky pro výrobu BSK – II.

Složky	Množství na 1000 ml [g]
10 x CMRL	9,7
Neopentane	5
Yeastolate	50
Hepes acid	2
Glucose	6
Sodium pyruvate	0,8
Sodium citrate	0,7
N – acetyl glucosamine	0,4
Sodium bicarbonate	2,2
Gelatina	10

4.2.2. Kultivace spirochét v tekutém mediu

Kultivace spirochét probíhalo v kompletním BSK – II mediu ve sterilním prostředí. Do 15 ml zkumavky s 10 ml BSK – II media bylo přidáno 1 – 2 ml kultury borelie ze zmraženého zásobního roztoku izolátu. Kultura byla inkubována při 34°C. V průběhu inkubace byla kultura pravidelně kontrolována pod mikroskopem temného pole. Po dosažení požadované hustoty spirochét v nekontaminovaných kulturách na 10^7 buněk/ml, byly tyto kultury vhodné pro další používání v experimentech.

4.2.3. Mikroskopování spirochét v temném poli a počítání spirochét

Během kultivace borelií v tekutém mediu, byly kultury průběžně kontrolovány pod mikroskopem temného pole. Kontrolami byl sledován nárůst, stav borelií a čistota kultury. Koncentrace kultur byla sledována pod zvětšením 10 x 40 a byla stanovena počítáním jednotlivých spirochét pomocí Petroff – Hausserovy počítací komůrky. K určení koncentrace, byl spočítán průměrný počet borelií v 5 větších čtvercích Petroff – Hausserovy počítací komůrky. Daná koncentrace se spočítala pomocí vzorce $A \times 1,25 \times 10^6$, kde A je průměrný počet borelií v 5 čtvercích komůrky.

4.2.4. Příprava tekutého media 1,5 x BSK⁺ (pro pevnou půdu)

Příprava byla prováděna podle protokolu Dr. P. Rosa (USA). Do 400 ml milliQ vody bylo přidáno 34,7 g BSA. Následně byla tato směs jemně míchaná na magnetickém míchadle, dokud se zcela nerozpustila. Poté byly přidány zbývající složky uvedené v tabulce 5. K dovedení pH do 7,5 bylo použito NaOH. Objem byl doplněn milliQ do 500 ml. Medium bylo přefiltrováno přes 0,22 µm sterilní membránu a bylo do něj přidáno 20 ml králičího

séra. Při sterilních podmínkách bylo medium rozděleno do potřebných objemů a uskladněno při – 20°C.

Tab. 5: Složky pro výrobu 1,5 x BSK⁺.

Složky	Množství na 500 ml [g]
BSA (Millipore Probumin 81-033)	34,7
Neopeptone (BD 211681)	3,45
Hepes acid (Calbiochem 391338)	4,15
Glucose (Sigma C – 7021)	3,45
Sodium citrate (Sigma C – 7254)	0,5
Sodium pyruvat (Sigma P – 5280)	0,55
N – acetyl glukosamine (Sigma A – 3286)	0,3
Sodium bicarbonate (Sigma S- 3817)	3,2
Yeastolate (BD 255772)	1,75
10 x CMRL powder (US Biological C5900 – 5)	6,35

4.2.5. Kultivace spirochét na pevné půdě

B. burgdorferi s.l. je většinou pěstována v tekuté půdě, ale jsou známé metody podporující růst kolonií na pevné půdě. V našich experimentech pro kultivaci na pevné půdě byly použity takto naředěné kultury: 1000 borelií/ml, 500 borelií/ml, 200 borelií/ml a 100 borelií/ ml.

4.2.5.1. Kultivace spirochét na pevné půdě v bodech

1. 100 ml horké 1,7% agarózy rozpuštěné ve vodě, bylo smícháno se 150 ml 1,5x BSK⁺ rozehřátého ve vodní lázni při 55°C.
2. Získaný roztok byl rozdělen do Petriho misek po 10 ml a media nechána ztuhnout, zbytek media s agarózou byl udržován ve vodní lázni při 55°C.
3. Do 45 ml zkumavek bylo odpipetováno 40 ml media smíchané s agarózou a následně do nich byla přidána kultura borelií (1 ml), naředěná podle požadovaného počtu.
4. Na dříve připravené Petriho misky (2 misky pro každé ředění) bylo přidáno 20 ml připraveného media s řádně naředěnou kulturou a ponecháno 5 – 10 minut zatuhnout.
5. Takovým způsobem připravené misky byly uloženy do boxu (BD GasPakTM EZ) s 2,5% obsahem CO₂ a ponechané růst při teplotě 34°C po dobu několika týdnů.

6. Po 3- 4 týdnech byly jednotlivé kolonie pipetou přeneseny do 2 ml tekutého BSK – II media. Kultury rostly při teplotě 34°C. Růst spirochét byl průběžně kontrolován pod mikroskopem temného pole.
7. Po 1 – 2 týdnech se z narostlé kultury odebralo po 1 ml do kriozkumavky a uschovalo se na - 80°C.
8. Zbylý 1 ml se doplnil BSK – II a uschoval při teplotě 34°C pro další experimenty.

4.2.6. Isolace genomové DNA

Narostlé kultury byly centrifugované při 4°C po dobu 15 minut při maximální rychlosti. Supernatant byl velmi opatrně odebrán a inaktivován v 0,5% roztoku pertersilu. Získané buňky byly zamrazeny při – 20°C nebo ihned použity pro další experiment. Pro izolaci genomové DNA byl používán kit DNeasy® Blood & Tissue Kit (250), (Qiagen). Izolace byla provedena striktně podle protokolu od výrobce [protokol Purification of Total DNA from Gram – Negative Bacteria, (Spin – Column)].

4.2.6.1. PCR (Polymerase chain Reaction)

Izolovaná DNA byla zkontrolována metodou PCR. PCR reakce se prováděly ve dvou etapách. První etapa byla provedená s použitím druhově specifických primerů k určení jednotlivých druhů borelií v narostlých kulturách. Celá příprava vzorků pro PCR reakci probíhala v boxu na ledu, kromě přidání DNA, to bylo vždy přidáno mimo box na ledu na pracovním stole. Pro určení jednotlivých druhů borelií byly použity primery GI pro *B. burgdorferi* sensu stricto (PCR produkt 543 bp), GII pro *B. garinii* (PCR produkt 344 bp), GIII pro *B. afzelii* (PCR produkt 189 bp) (Damaerschaleck et al., 1995).

Celkový objem reakční směsi každé reakce byl 20 µl a reakce probíhala v 0,2 µl tenkostěnných zkumavkách.

Příprava reakční směsi (20 µl):

10x PCR pufr.....	2 µl
25mM MgCl ₂	2 µl
10mM dNTPs´.....	1 µl
Tag DNA polymeráza (Promega).....	0,5 µl
1mM Primer forward.....	1 µl
1mM Primer reverse.....	1 µl
Templát (DNA).....	1 – 2 µg

Voda.....odvozena od množství templátu

10x PCR pufr, 25mM MgCl₂, 10mM dNTPs a Tag DNA polymeráza byly nahrazené 2x PCR Master mix od Promega.

Ke každé reakci byla přidána pozitivní a negativní kontrola. Pro pozitivní kontrolu byla jako templát použita ověřená DNA známých kmenů borelií. Pro negativní kontrolu v reakci jako templát byla použita deionizovaná voda.

Vzorky byly dostatečně promíchány. Amplifikační reakce probíhala v přístroji Master cycler personal (Eppendorf).

Tabulka 6 obsahuje sekvence použitých druhově - specifických primerů.

Tab. 6: Přehled použitých druhově specifických primerů GI, GII, GIII.

Název primeru	Teplota nasedání	Sekvence 5' → 3'	Specifita primeru	Citace
GI R	50°C	TTACAGTAATTGTTAAAGTTGAAGTGCC	<i>B. burgdorferi</i>	Demaerschalck et al., 1995
GI F	50°C	AACAAAGACGGCAAGTACGATCTAATT	<i>B. burgdorferi</i>	
GII R	50°C	GTAACCTTCAATGTTGTTTTGCC	<i>B. garinii</i>	
GII F	50°C	TGATAAAAAC AACGGTCTG GAAC	<i>B. garinii</i>	
GIII R	50°C	TAAAGACAAAACATCAACAGATGAAAG	<i>B. afzelii</i>	
GIII F	50°C	TTCCAATGTTACTTTATCATTAGCTAC	<i>B. afzelii</i>	

Podmínky pro amplifikační reakci pro GI, GII, GIII:

- Počáteční denaturace.....95°C.....5minut
- Denaturace DNA.....95°C.....1minuta
- Nasedání primerů (annealing).....55°C.....30 sekund
- Elongace (extension).....72°C.....1minuta
- Závěrečná elongace.....72°C.....5 minut
- Teplota po skončení reakce.....4°C.....∞

Kroky 2 – 4 byly zopakovány 30 krát.

Druhá etapa PCR reakce byla provedená na vzorcích, u nichž s použitím primeru GII byla potvrzená přítomnost *B. garinii*.

B. garinii v kultuře byla dále analyzována pomocí PCR amplifikace s použitím primerů pro *flagellin*, *ospA*, *ospC* a primerů pro „housekeeping“ geny (*clpA*, *cplX*, *nifS*, *pepX*, *pyrG*,

recG, *rplB* a *uvrA*) (Tab. 7). V případě „housekeeping“ genů byla provedena tak zvaná „semi – nested“ PCR, kde pro druhou reakci bylo použito jako templát 5 µl z předchozí reakce.

Tab. 7: Přehled použitých primerů pro *flagellin*, *ospA*, *ospC* a „housekeeping“ geny.

Název primeru	Teplota nasedání	Sekvence 5' → 3'	Citace
<i>clpX</i> Outer R	50°C	GATTGATTCATATAACTCTTTTG	Margos et al., 2008
<i>clpX</i> Outer F	50°C	GCTGCAGAGATGAATGTGCC	
<i>clpX</i> Inner R	48°C	TTAAGAAGACCCTCTAAAATAG	
<i>clpX</i> Inner F	48°C	AATGTGCCATTTGCAATAGC	
<i>clpA</i> Outer R	50°C	TTCATCTATTA AAAAGCTTTCCC	
<i>clpA</i> Outer F	50°C	GATAGATTTCTCCAGACAAAG	
<i>clpA</i> Inner R	48°C	CAAAAAAACATCAAATTTTCTATCTC	
<i>clpA</i> Inner F	48°C	GACAAAGCTTTTGATATTTTAG	
<i>nifS</i> Outer R	50°C	GTTGGAGCAAGCATTTTATG	
<i>nifS</i> Outer F	50°C	GTTGGAGCAAGCATTTTATG	
<i>nifS</i> Inner R	48°C	TCACAGCCAATTTTTTAAAC	
<i>nifS</i> Inner F	48°C	ATGGATTTCAAACAAATAAAAAG	
<i>pepX</i> Outer R	50°C	GTTCCAATGTCAATAGTTTC	
<i>pepX</i> Outer F	50°C	ACAGAGACTTAAGCTTAGCAG	
<i>pepX</i> Inner R	48°C	TGTGCCTGAAGGAACATTTG	
<i>pepX</i> Inner F	48°C	TTATTCCAAACCTTGCAATCC	
<i>pyrG</i> Outer R	50°C	CAAACATTACGAGCAAATTC	
<i>pyrG</i> Outer F	50°C	GATTGCAAGTTCTGAGAATA	
<i>pyrG</i> Inner R	48°C	AAACCAAGACAAATTCCAAG	
<i>pyrG</i> Inner F	48°C	GATATGGAAAATATTTTATTTATTG	
<i>recG</i> Outer R	50°C	GAAAGTCCAAAACGCTCAG	
<i>recG</i> Outer F	50°C	CCCTTGTTGCCTTGCTTTC	
<i>recG</i> Inner R	48°C	CAAGTTGCATTTGGACAATC	
<i>recG</i> Inner F	48°C	CTTAATTGAAGCTGGATATC	
<i>rplB</i> Outer R	50°C	GCTGTCCCAAGGAGACA	
<i>rplB</i> Outer F	50°C	TGGGTATTAAGACTTATAAGC	
<i>rplB</i> Inner R	48°C	GCTGTCCCAAGGAGACA	
<i>rplB</i> Inner F	48°C	CGCTATAAGACGACTTTATC	
<i>uvrA</i> Outer R	50°C	CCTATTGGTTTTTGATTTATTG	
<i>uvrA</i> Outer F	50°C	GCTTAAATTTTTAATTGATGTTGG	
<i>uvrA</i> Inner R	48°C	CAAGGAACAAAAACATCTGG	
<i>uvrA</i> Inner F	48°C	GAAATTTTAAAGGAAATTA AAAAGTAG	
<i>flag</i> R	50°C	GACGCTTGAGACCCTGAAAG	Picken, 1992
<i>flag</i> F	50°C	TTCAATCAGGTAACGGCACA	Bunikis et al., 2004
<i>ospA</i> R	50°C	GA CTCAGCACCTTTT TG	
<i>ospA</i> F	50°C	TATTTATTGGGAATAGGTC	
<i>ospC</i> R	50°C	ATTAATCTTATAATATTGATTTTAATTAAGG	
<i>ospC</i> F	50°C	ATGAAAAAGAATACATTAAGTGC	

Podmínky 1. amplifikační reakce 1 („spacer“) pro *clpX*, *clpA*, *nifS*, *pepX*, *pyrG*, *rplB* geny (primery „Outer“):

1. Počáteční denaturace.....95°C.....15 minut
2. Denaturace.....94°C.....30 sekund
3. Nasedání primerů (anealing).....55°C – 48°C.....30 sekund – s každým cyklem po 30 s se teplota snížila o 1 stupeň
4. Elongace (extension).....72°C.....30 sekund
5. Denaturace94°C.....30 sekund
6. Anealing.....48°C.....30 sekund
7. Elongace72°C.....30 sekund
8. Cykly 5 -7 se opakovaly 20x
9. Závěrečná elongace.....72°C.....5minut
10. Teplota po skončení reakce.....15°C.....∞

Tento PCR cyklus se odborně nazývá „touchdown PCR“.

Po skončení první reakce („spacer“) následovala druhá reakce „housekeeping“ 2 („semi – nested“) s primery „inner“.

Příprava druhé reakce byla stejná jako v případě 1. reakce, jen jako templát ve druhé reakci bylo použito 5 µl z předchozí reakce.

Podmínky 2. amplifikační reakce pro reakci „housekeeping“ 2 („semi – nested“) s primery *clpX*, *clpA*, *nifS*, *pepX*, *pyrG*, *rplB* („inner“):

1. Počáteční denaturace.....95°C.....15 minut
2. Denaturace.....94°C.....30 sekund
3. Nasedání primerů (anealing).....50°C30 sekund
4. Elongace (extension).....72°C.....30 sekund
5. Závěrečná elongace (extension).....72°C.....5 minut
6. Teplota po skončení reakce.....15°C.....∞

Kroky 2 – 4 byly opakovány ve 35 cyklech.

Reakce s primery pro „housekeeping“ gen *recG* měla jiné podmínky pro amplifikaci (podmínky jsou uvedeny níže). Reakční směs byla připravena stejně jako u ostatních reakcí.

Podmínky amplifikační reakce pro gen *recG*:

1. reakce („spacer“):

1. Počáteční denaturace.....95°C.....15 minut
2. Denaturace.....94°C.....30 sekund
3. Nasedání primerů (anealing).....55°C30 sekund
4. Elongace (extension).....72°C.....30 sekund
5. Závěrečná elongace (extension).....72°C.....5 minut

Kroky 1 – 4 byly opakovány ve 30 cyklech.

Podmínky 2. reakce („semi – nested“ s primery „inner“) pro gen *recG* byly stejné, jen počáteční denaturace při 95°C trvala 7 minut. Jako templát ve druhé reakci bylo použito 5 μ l z předchozí reakce.

4.2.7. Elektroforéza v agarózovém gelu

Analýza všech PCR reakcí byla provedena na agarózovém gelu, jehož koncentrace závisela na velikosti PCR produktu (od 0,8% do 2% agarózy). Před nanášením na gel do 20 μ l vzorků bylo přidáno 3,3 μ l 6x koncentrovaného vzorkového pufru (6x Orange DNA Loading Dye, Thermo Scientific, 50x SYBR GreenI). Elektroforéza probíhala v 1x TAE pufru při napětí 110 V po dobu 30 – 40 minut. Výsledky byly vizualizovány pod UV zářením, fotograficky zdokumentovány a fotografie byla uložena.

4.2.8. Sekvenování

Pro potvrzení přítomnosti a charakterizace *B. garinii* v kultuře byly všechny PCR produkty z druhé etapy PCR reakce osekvenované a obdržené sekvence následně byly porovnány se sekvencemi z databáze GenBank. Před sekvenací byly všechny PCR produkty purifikované z agarózového gelu pomocí kolon (Centrifugal Filter Units, Millipore)

4.2.8.1. Purifikace PCR produktů z agarózového gelu - postup.

1. Z agarózového gelu byly vyříznuty PCR produkty vizualizované pod UV zářením.
2. Produkty byly vloženy do kolony (Millipore) a centrifugované po dobu 10 minut při 5,000 otáčkách/min.

4.2.8.2. Sekvenování – postup.

1. 10 ng purifikovaného PCR produktu bylo smícháno s 2,5 pmol příslušného primeru, a to pokaždé 2x pro každý produkt (s primery Forward a Reverse).
2. Sekvence byla provedena v sekvenační laboratoři Biologického Centra Akademie Věd České republiky, České Budějovice.
3. Získané výsledky ze sekvenační laboratoře byly zpracovány v programech DNASTar a porovnané v GenBanku. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.)

4.2.9. Analýza sekvencí

Analýza polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP), byla provedena *in silico* pomocí bezplatného softwaru na <http://www.restrictionmapper.org/> (Bikandi et al., 2004). Sekvence genu pro *flagellin* (488bp) byla virtuálně štěpena pomocí restrikčních enzymů *HapII*, *HhaI*, *HincII*, *CelII* a *DdeI*. Všechny získané RFLP vzorce, byly porovnávány s již publikovanými (Fukunaga et al., 1996, Wang et al., 1999).

Dodatečná MLST analýza (multilokusové typování sekvencí) 8 „housekeeping“ genů kodujících *clpA*, *clpX*, *nifS*, *pepX*, *pyrG*, *recG*, *rplB* a *uvrA* byla použita k vyřešení taxonomického postavení amerického izolátu *B. garinii*. Schéma MLST bylo popsáno Dr. Margos (Margos et al., 2008) (<http://www.mlst.net/>).

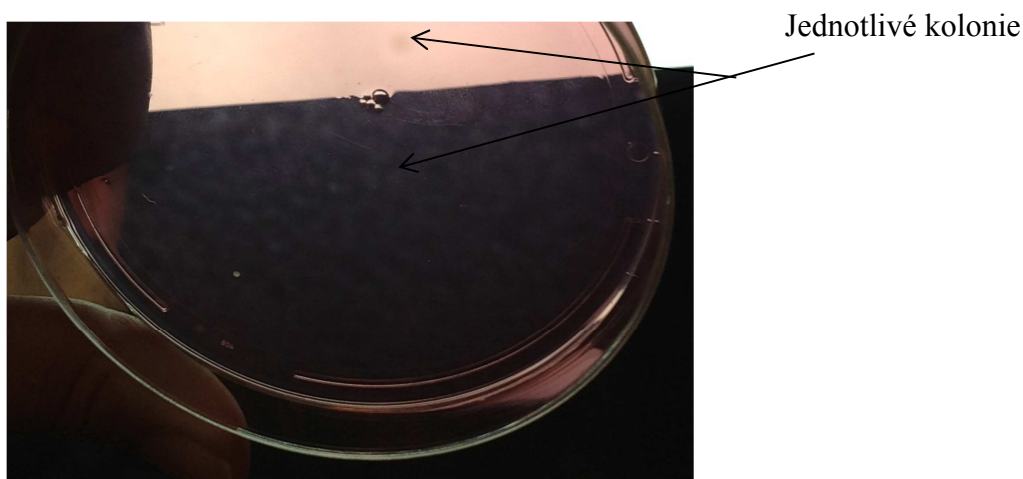
5. VÝSLEDKY

V průběhu molekulární analýzy různých izolátů *B. burgdorferi* s.l. získaných z klíšťat, hlodavců a ptáků z jihovýchodu Spojených států, několik izolátů odhalilo přítomnost dvou a více různých kmenů borelií, včetně „evropských“ kmenů *B. garinii* a *B. afzelii* (nepublikovaná data).

Předmětem šetření byl izolát SCCH – 7, který byl kultivován z biopsie tkání (kousek ucha) křečka bavlníkového (*Peromyscus gossypinus*) chyceného ve městě Mt. Pleasant, Charleston Country, stát Jižní Karolína v USA. Na základě předběžné analýzy vzorků pomocí RLB (Reverse Line Blot hybridizace) byl izolát SCCH – 7 charakterizován jako ko – infekce dvou kmenů *B. burgdorferi* s.s. a *B. garinii*. Cílem tohoto projektu, bylo od sebe oddělit tyto dva kmeny a získat čistou monoklonální kulturu *B. garinii*.

5. 1. KULTIVACE SPIROCHÉT NA PEVNÉ PŮDĚ

Po rekultivaci SCCH – 7 v tekutém BSK – II mediu ze zmraženého zásobního roztoku, byly borelie přenesené na pevnou půdu na Petriho miskách. Narostlé samostatné kolonie byly viditelné na miskách přibližně za 3 týdny po nasazení (Obr. 3). Jednotlivé kolonie (klony), které byly odebrány z Petriho misek (Obr. 4), se nechaly narůst v tekutém BSK - II médiu.



Obr. 3: Pevné medium BSK – II porostlé koloniemi borelií.

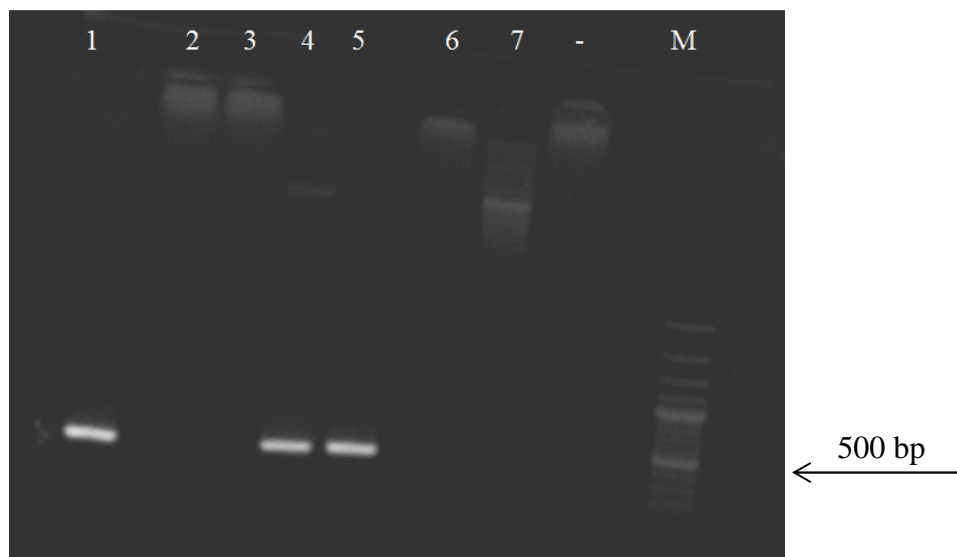


Obr. 4: Odebrané jednotlivé kolonie (selekce).

5. 2. KONTROLA DRUHOVÉ ČISTOTY

Monoklonální kultury borelií (kultury namnožené z jednoho klonu – kolonie) byly kontrolovány metodou PCR s použitím druhově specifických primerů. Z 200 zkontrolovaných vzorků kultur, všechny až na jeden byly identifikovány jako *B. burgdorferi* s.s. Jeden izolát SCCH – 7(138), ve druhově specifické PCR reakci s primery GII (specifických pro *B. garinii*) dal specifický *B. garinii* PCR produkt, odpovídající velikosti 344 bp (Obrázek 6).

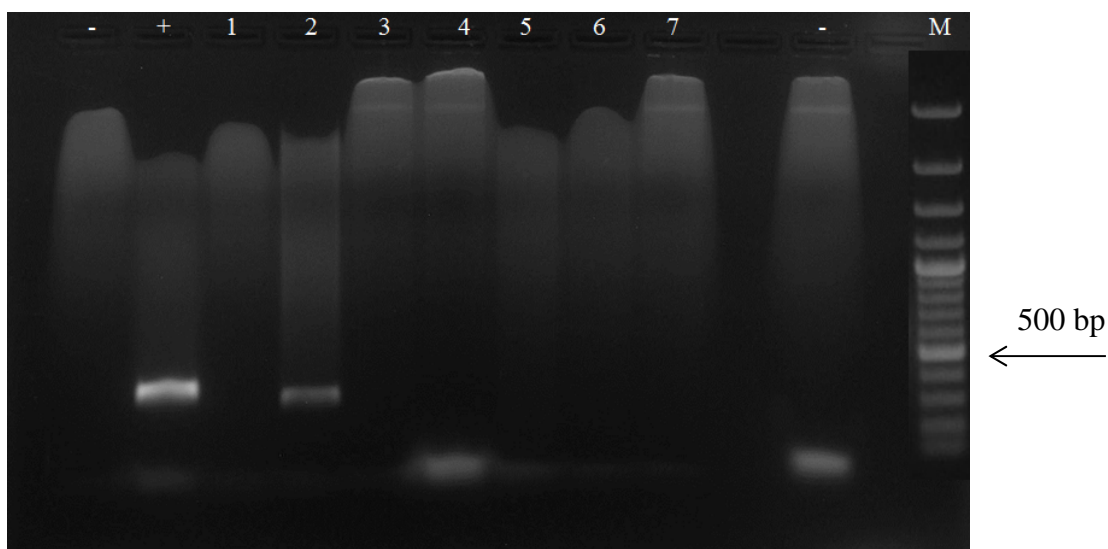
Ještě před začátkem testování jednotlivých kolonií (klonů), byla různá DNA borelií dostupná v laboratoři, kontrolována primery GI, GII, GII na přítomnost DNA *B. garinii*, která potom byla použita jako pozitivní kontrola při „skreeningu“ jednotlivých monoklonálních kultur. Na obrázku 5 jsou zobrazeny kontroly různých DNA borelií na přítomnost *B. garinii*.



Obr. 5: 1-7 různé DNA borelií, vzorky 1, 4 a 5 – *B. garinii*, „-“ negativní kontrola, M – marker 100 bp.

Vzorky 1,4 a 5 byly pozitivní pro *B. garinii*, ostatní vzorky 2,3, 6 a 7 nebyly zachyceny specifickými *B. garinii* primery GII (Obr. 5).

Demonstrační obrázek – jeden z gelů s výsledky „skreeningu“ jednotlivých kolonií. Vzorek s číslem 2 vykazuje přítomnost *B. garinii*. Přítomnost *B. garinii* v ostatních vzorcích nebyla prokázána PCR amplifikací specifickými primery GII.



Obr. 6: „-“ negativní kontrola (DNA *B. burgdorferi* s.s., která není zachycována specifickými primery pro *B. garinii* GII), „+“ pozitivní kontrola (DNA *B. garinii*), vzorky 1-7 jednotlivých kolonií, „-“ negativní kontrola (voda jako templát), M – marker 100bp.

Ve vzorek č. 2 byla prokázána přítomnost DNA *B. garinii*.

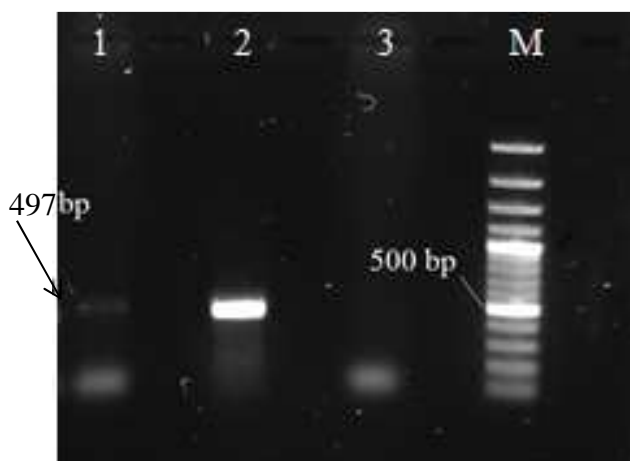
Pozitivní vzorek byl dále kontrolován PCR reakcí s primery GI pro vyloučení kontaminace *B. burgdorferi* s.s. Kontaminace *B. burgdorferi* s.s. nebyla zjištěna.

5. 3. ANALÝZA VYBRANÝCH ÚSEKŮ GENOMU AMERICKÉHO IZOLÁTU *B. GARINII* SCCH – 7 (138)

Čistá klonální *B. garinii* byla dále kultivovaná v tekutém BSK – II mediu, k získání materiálu pro další analýzu. Všechny sekvence analyzované v této práci jsou představené v Příloze č. 1. Všechny sekvence byly zaslané do GenBank a jsou v procesu zpracování. Ve všech PCR reakcích jako pozitivní kontrola se používala DNA *B. burgdorferi* s.s. pro vyloučení kontaminace pozitivní kontrolou.

5.3.1. Analýza částečného *fla* genu

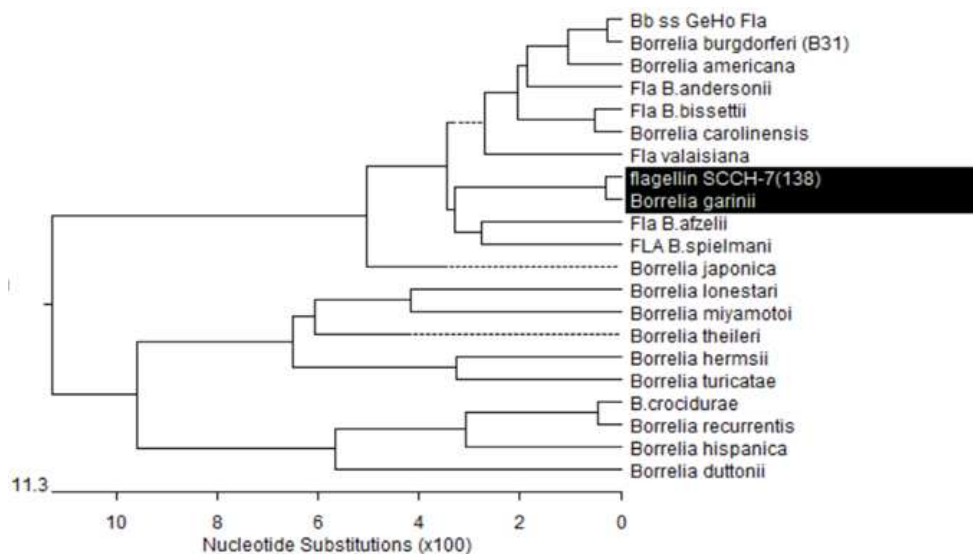
Na obrázku 7 je výsledek PCR reakce s primery pro *flagellin*.



Obr. 7: 1 – izolát SCCH – 7(138), 2- pozitivní kontrola (DNA *B. burgdorferi* s.s.), 3 – negativní kontrola, M – marker 100 bp.

Částečná sekvence genu kodující *flagellin* z SCCH – 7(138) ukázala 99% identitu s různými kmeny *B. garinii*. *In silico* štěpení 488 bp dlouhého fragmentu *flagellinu* restričními enzymy *CelII*, *DdeI*, *HapII*, *HhaI* a *HincII* odhalilo RFLP vzor charakteristický pro *B. garinii*. To znamená žádné restriční místo po restrikci *CelII* a *HapII* restriktázy, 329 bp, 78 bp, 72 bp a 9 bp dlouhé fragmenty po restrikci *DdeI*, 405 bp a 83 bp dlouhé fragmenty pro *HhaI* a 453 bp a 35 bp dlouhé fragmenty po restrikci *HincII* restriktázou (Fukunaga et al., 1996), co odpovídá vzoru specifickému pro *B. garinii*.

Částečná sekvence genu pro *flagellin* izolátu SCCH-7(138) byla porovnaná se sekvencemi flagellinů různých druhů borelií představených v GenBank. Schematické znázornění porovnání (pomocí MegAlign) je představeno na obrázku 8.



Obr. 8: Schématické znázornění porovnání různých kmenů borelií s izolátem SCCH – 7(138).

Americký izolát SCCH – 7 (138) jak je vidět na obrázku, je ve skupině s *B. garinii*, což potvrzuje naše výsledky.

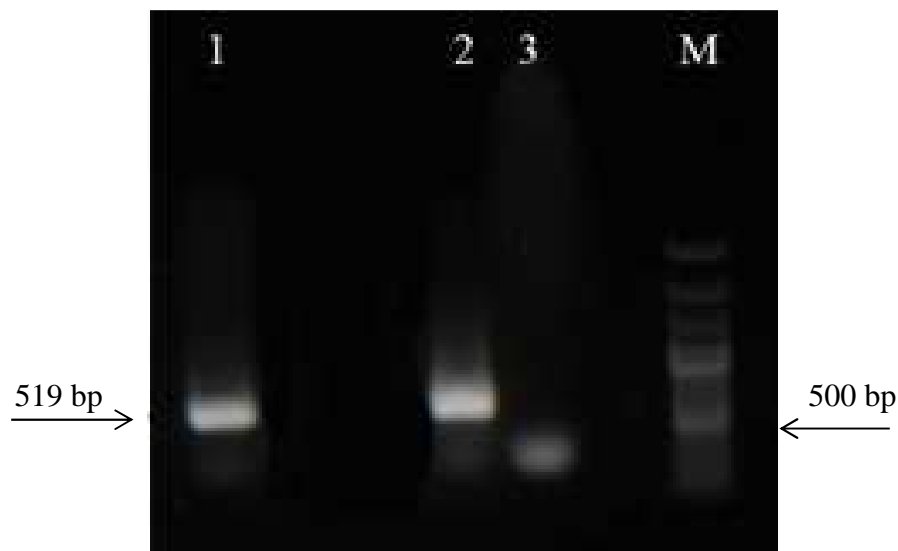
5.3.2. Analýza *rrf* – *rfl* mezigenového „spacer“ úseku

Přesná velikost mezigenového úseku (253 nukleotidů) testovaného izolátu byla zjištěna přímým sekvenováním purifikovaného amplikonu. Sekvence mezigenového „spacer“ *rrf* – *rfl* úseku vykazovala 97% sekvenční identitu v tomto lokusu s izolátem *B. garinii* 20047 z Číny (číslo v GenBank KJ459339). *In silico* štěpení restričními enzymy *DraI* a *MseI* odhalilo fragmenty o velikosti 201 bp a 52 bp po restrikci *DraI* a 107 bp, 95 bp a 51 bp po restrikci *MseI* restriktázou, RFLP vzor specifický pro *B. garinii* (Postic et al, 1994).

5.3.3. Analýza částečné sekvence genu pro *ospA*

Gen *ospA* z *Borrelie* je geneticky heterogenní, což je užitečné pro druhově specifické rozdělení kmenů *B. burgdorferi* sensu lato. Částečná sekvence *ospA* amplikonu z našeho vzorku odhalila nejvyšší homologii (99%) s nekultivovaným klonem *Borrelia* sp. Bg31 (*B. garinii*) izolovaným z Číny (číslo v GenBank KM226888).

Na obrázku 9 je ukázka PRC reakce s primery pro *ospA* gen.



Obr. 9: 1 – izolát SCCH – 7 (138), 2 - pozitivní kontrola (DNA *B. burgdorferi* s.s), 3 – negativní kontrola, M – marker 100bp

5.3.4. Analýza částečné sekvence *ospC* genu

Částečná sekvence genu pro *ospC* potvrdila ten fakt, že americký izolát SCCH-7 (138) patří k *B. garinii*. Srovnáním sekvence izolátu SCCH – 7 (138) se sekvencemi z GenBank odhalilo 100% homologii s různými kmeny *B. garinii*.

5.3.5. MLST „housekeeping“ genů

Multilokusová sekvenční typizace (MLST) odhaluje variace sekvence DNA v souboru „housekeeping“ genů a charakterizuje různé kmeny borelie svými jedinečnými profily. Pro každý z těchto „housekeeping“ genů jsou různé sekvence uloženy v databázi, jako alely poskytující alelický profil. Řada profilů pak může být identifikační značka pro typizaci kmenů.

Multilokusová analýza 8 „housekeeping“ genů amerického izolátu SCCH-7 (138) pomocí databáze MLST odhalila 100% shodu s 4 druhy *B. garinii* uložených v databázi v 7 lokusech, kromě genu *clpX*. Výsledky analýzy jsou představené na obrázku 10, kde jsou srovnané MLST profily různých kmenů *B. garinii*, a to 20047, 71180B, 80235B a 84214B.

Strain	ST	clpA	clpX	nifS	pepX	pyrG	recG	rplB	uvrA
SCCH-7(138)		40	102	26	36	27	34	25	31
20047	82	40	25	26	36	27	34	25	31
71180B	82	40	25	26	36	27	34	25	31
80235B	82	40	25	26	36	27	34	25	31
84214B	82	40	25	26	36	27	34	25	31

Obr. 10: Výsledky analýzy 8 „housekeeping“ genů.

V případě genu *clpX* alela 102 odpovídá jinému druhu *B. garinii*, izolovanému v Japonsku z klíštěte *I. persulcatus* (obrázek 11).

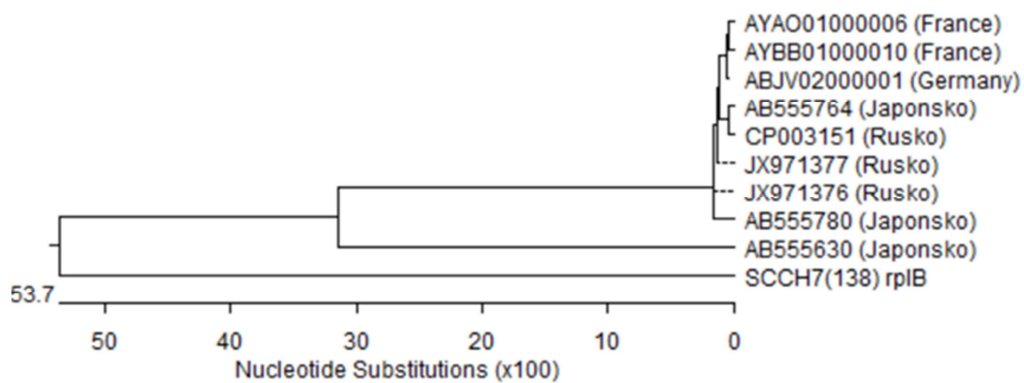
id	ST	Strain	Species	Country	clpA	clpX	nifS	pepX	pyrG	recG	rplB	uvrA
1086	370	NP81	<i>B. garinii</i>	Japan	141	102	100	127	27	124	107	109

Obr. 11: Výsledky MLST analýzy „housekeeping“ genů kmenu NP81 *B. garinii* (Japonsko). Gen *clpX* – alela 102.

Jako výsledek této analýzy můžeme konstatovat, že izolát z jihovýchodních Spojených Států a) je 100 % *B. garinii*, b) izolát *B. garinii* SCCH-7 (138) je geneticky variabilní, liší se jak od evropských tak i od asijských kmenů *B. garinii* a představuje spíše případ genetické rekombinace různých alel „housekeeping“ genů původem z různých geograficky rozdělených kmenů *B. garinii*.

Na základě celkové analýzy vybraných úseků genomu izolátu SCCH-7 (138) můžeme konstatovat, že americký izolát *B. garinii* je více podobný izolátům *B. garinii* SCCH – 7 (138) z Asie. Dalším potvrzením tohoto faktu může být srovnání částečné sekvence pro gen *rplB*.

Částečná sekvence genu pro *rplB* izolátu SCCH-7 (138) byla porovnaná s různými sekvencemi *rplB* představených v GenBank. Schematické znázornění porovnání (pomocí MegAlign) je představeno na obrázku 12.



Obr. 12: Grafické znázornění, porovnání částečné sekvence genu pro *rplB* SCCH – 7 (138) s různými izoláty z GenBanku.

Obrázek ukazuje na větší podobnost izolátu ze Spojených Států s *B. garinii* z Japonska a Ruska.

6. DISKUZE

V této práci poprvé představujeme detekci, izolaci a kultivaci *B. garinii*, uznávaného původce neuroboreliózy v Evropě, z tkání hlodavců chycených v Jižní Karolíně, USA. Poprvé se nám povedlo vyprodukovat a ocharakterizovat klonální populaci *B. garinii* původem z jihovýchodních USA i přesto, že původní izolát představoval ko – infenci dvou druhů borelií, jediného oficiálně uznávaného druhu původce LB v USA, *B. burgdorferi* s.s. a do nedávné doby považovaného za striktně „evropský“ druh *B. garinii*. Námi získaný důkaz o existenci a cirkulaci *B. garinii* na jihovýchodu Spojených států má velký význam nejen pro pochopení složité globální ekologie borelií nejen kvůli přehodnocení stávajících znalostí o geografickém rozdělení kmenů LB borelií, ale také je nesmírně důležité pro přehodnocení existujícího dogmatu o lymeské borelióze představující v USA. Přítomnost *B. garinii* na území jihovýchodních Spojených Států může mít vážný dopad na veřejné zdraví americké populace, bydlící v regionu který je dodnes považován za „LB- free“.

Severovýchodní státy a severní státy středního západu Spojených států amerických jsou tradičně uznávány jako hlavní oblasti, kde se lymeská borelióza vyskytuje endemicky. Nicméně v roce 2000 během analýzy vzorků z hlodavců obývajících pobřežní oblasti jihovýchodu Spojených států skupina Dr. Olivera zjistila, že až 69% chycených hlodavců bylo přirozeně infikováno *B. burgdorferi* s.l., což naznačuje, že pobřežní státy na jihovýchodě USA mohou také představovat riziko pro rozšíření lymeské boreliózy (Oliver et al., 2000).

Jak už je dnes známo, za jediného možného infekčního činitele, který může způsobit LB, byl a je považován v epidemických oblastech Spojených států, v souladu s CDC (Center for Disease Control and Prevention) druh *B. burgdorferi* s.s. Přirozeně, pokud další druhy borelií nejsou hledány a testovány ve Spojených státech, pak jejich prevalence zůstává neznámá. Ovšem během posledních deseti let další druhy borelie, které jsou odlišné od tradičně uznávaných ve Spojených státech (jako jsou např., *B. americana*, *B. andersonii*, *B. bissettii*, *B. carolinensis*, *B. kurtenbachii*), byly nalezené a popsány společně s dříve nepopsanými druhy na jihovýchodě Spojených států (Georgia, Florida a Jižní Karolína) (Oliver, 1996). Tím pádem, v současné době dochází k rozšiřování nejen dříve uznávaných oblastí s výskytem spirochét LB na území Spojených států, ale také k rozšiřování existujícího spektra druhů borelií, které zde mohou být nalezeny. Navíc možná přítomnost netradičních druhů borelií pro Severní Ameriku společně s druhy běžně se vyskytujícími

v USA v jižních státech byla již diskutována (Oliver et al., 2003). To potvrzuje teorii, že spirochéty nejsou pouze přítomny na jihovýchodě Spojených států, ale jejich rozmanitost je zde větší než v uznávaných endemických severních oblastech.

Bylo jen otázkou času, než se některé z „evropských“ kmenů borelie objeví ve Spojených státech a vzhledem k této situaci je nalezení ko – infekce v izolátech borelií s *B. garinii* na jihovýchodě USA pouze logickým pokračováním v rozvíjícím se trendu.

Dr. Felz s kolektivem před časem zveřejnili zprávu o detekci *B. garinii* u pacienta z jižní Georgie (USA) po kousnutí americkým klíštětem *I. scapularis* (Felz et al, 1999). Tou dobou ovšem pacient také hlásil, že pár týdnů před objevením EM (erythema migrans) cestoval po Evropě, což znemožnilo přesné určení místa nákazy. Od té doby žádný jiný důkaz o výskytu *B. garinii* v této oblasti Spojených států nebyl zaznamenán. Nicméně situace v severních pobřežních oblastech USA a Kanady vypadala trochu jinak. Během posledních deseti let byly zveřejněny četné studie o nálezech *B. garinii* u mořských ptáků a klíšťatech *I. uriae* v subarktické Eurasii (Comstedt et al., 2009), Arktidě (Larsoo, 2007) u pobřeží Labradoru (Muzaffar et al., 2009), a na Gullských ostrovech Newfoundlandu (Baggs, 2011), stejně tak jako na pobřeží Atlantiku u Severní Ameriky (Smith et al., 2006; Bunikis et al., 1996). Tyto údaje nejen rozšiřují doposud známé oblasti výskytu *B. garinii*, ale zvyšují také pravděpodobnost, že tento druh borelie může být přítomný v hnízdech dalších koloniálně žijících mořských ptáků po celém světě.

V poslední době se stále častěji objevují zprávy o výskytu různých teplokrevných obratlovců v oblastech hnízdění mořských ptáků, kteří mohou působit jako celoroční rezervoáry pro borelie v těchto oblastech hnízdění mořských ptáků. Například na ostrovech Newfoundland a Labrador byl nedávno potvrzen výskyt velkého počtu křečka dlouhoocasého (*P.maniculatus*) a dalších malých savců, kteří by mohli být možnými hostitelskými rezervoáry pro *B. garinii* (Baggs et al., 2011). Další objevení *I. scapularis* na stejných místech, např. pobřeží Maine a některé přímořské kanadské oblasti (Scott et al., 2001), přineslo zcela nový pohled na celou situaci. Dříve existující teorie o izolaci mořského cyklu *B. garinii* a její spojitost výhradně s *I. uriae* a mořskými ptáky, stejně jako existence významné bariéry k zavedení *B. garinii* spojené s mořským cyklem do jiných vektorů a rezervoárových hostitelů, jsou nyní vážně zpochybňovány. Další důkazy podporující překrývání se těchto dvou odlišných enzootických cyklů byly zaznamenány Gómez – Díaz s kolektivem (2011), kteří potvrdili, že se spirochéty LB vyměňují během svých mořských a

pozemních cyklů. Také skutečnost, že se izoláty *B. garinii* striktně neskupují podle geografického výskytu, biologických hostitelů nebo klíšťat, znova podporuje teorii o časté výměně kmenů mezi dvěma enzootickými cykly (Comstedt et al., 2011). To znamená, že spirochéty borelií, které byly zjištěné u mořských ptáků hnízdících v blízkosti nebo přímo na pobřeží Severní Ameriky, mohou být zanesené na pevninu migrujícími ptáky nebo hlodavci.

Kromě toho kompetence přenašeče *I. scapularis* pro *B. garinii* v hlodavcích již byla potvrzena (Dolan et al., 1998). A už bylo naznačeno, že zařazení *B. garinii* do cyklu, zahrnujícího klíšťata *I. scapularis* a její potenciální udržení v tomto cyklu, bude záviset na genetické populaci a rozmanitosti kmenů tohoto „evropského“ druhu borelie (Smith et al., 2006). V tomto ohledu objevení *B. garinii* v izolátech z hlodavců z Jižní Karolíny má velký význam, stejně tak i skutečnost, že námi analyzovaný kmen je odlišný od již popsanych evropských a asijských kmenů *B. garinii*. Když uvažujeme, že vzorky z jihovýchodních Spojených států jsou z roku 1995, dá se předpokládat, že populace *B. garinii* ve zmiňovaném regionu je dobře zavedená a izolát SCCH – 7 (138) není jediný. Zdá se, že je to pouze otázka času, kdy by mohla být *B. garinii* široce uvedena do populace amerických savců a ptáků a distribuována do jiných oblastí USA, což také může být v současnosti už probíhajícím procesem a to v důsledku klimatických změn, migrujících hostitelů a šířící se urbanizací.

Do nedavné doby význam migrujících hostitelů a ptáků, zvláště v globální distribuci spirochét komplexu *B. burgdorferi* s.l., byl vysoce zpochybňován. Námi představená data podporují teorii transoceanského přenosu spirochét, o čemž byla první data doložena před 15 lety (Wang et al., 1999b). Námi představená data také podporují teorii o možnosti vzniku a existenci rekombinantních genotypů *Borrelia* v důsledku vlivu komplementu hostitele (Rudenko et al. 2014).

Samozřejmě je ještě brzy na diskuzi o důležitosti těchto zjištění z hlediska vlivu na veřejné zdraví. To bude záviset na patogenním potenciálu zjištěných kmenů *B. garinii* pro člověka. Tento patogenní potenciál bude předmětem dalších výzkumů, jelikož popsany druh *B. garinii* se vyskytuje v prostředí, kde jsou lidé vystaveni riziku infekce. Pokud se prokáže, že popsany americký izolát *B. garinii* má patogenní potenciál pro člověka, mohlo by to vést k potvrzení o existenci LB v Severní Americe s významně odlišnými příznaky.

7. ZÁVĚR

- ✓ Pomocí metody kultivace borelie na pevné půdě se nám podařilo úspěšně separovat dva druhy borelie z jednoho ko – infekčního izolátu, a to *B. burgdorferi* s.s. a *B. garinii*.
- ✓ Poprvé se nám podařilo získat čistou klonální kulturu *B. garinii* z amerického izolátu a tím prokázat přítomnost „evropského“ druhu borelie na jihovýchodě Spojených států Amerických (konkrétně v Jižní Karolíně).
- ✓ Pomocí multilokusové typizace vybraných úseků genomu amerického izolátu *B. garinii* SCCH – 7 (138) se nám podařilo úspěšně prokázat že: a) charakterizovaný americký izolát definitivně patří k druhu *B. garinii*, b) charakterizovaný izolát se liší od známých evropských, a asijských kmenů *B. garinii* a představuje spíše případ genetické rekombinace odlišných alel „housekeeping“ genů z různých geograficky rozdělených kmenů *B. garinii*.
- ✓ Nicméně, podle našich výsledků, fylogenetický americký izolát *B. garinii* je blíže k izolátům *B. garinii* původem z Asie nežli k evropským izolátům.
- ✓ Spekuluje, že *B. garinii* mohla být zanesená na pevninu stěhovavými ptáky a to buď přímo z evropského kontinentu, nebo z mořských ptáků, hnízdících na pobřeží Atlantiku
- ✓ Bezpochybná přítomnost *B. garinii* v jihovýchodních USA může mít velký dopad na veřejné zdraví lidské populace v regionech, kde je tenhle druh rozšířen.
- ✓ Výsledky představené práce se zpracovávají do publikace ve vědeckém časopise.

8. LITERATURA

- Baggs E. M., Stack S. H., Finney-crawley J. R., & Simon N. P. P. (2011):** *Peromyscus maniculatus*, a Possible Reservoir host of *Borrelia garinii* from the Gannet Islands off Newfoundland and Labrador; *J. Parasitol.* 97, 792–794.
- Baranton G., Postic D., Saint Girons I., Boerlin P., Piffaretti J. C., Assous M., Grimont P. A. (1992):** Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis; *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 378-383.
- Barbour A. G., & Hayes, S. F. (1986):** Biology of *Borrelia* Species; *Microbiol. Rev.* 50, 381–400.
- Bartůněk P. (2006):** Lymeská borelióza - 3., doplněné a přepracované vydání. 123 s. ISBN 8024715430.
- Bednář M., Souček A., Vávra J. (1994):** Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie. Triton, 19 – 21. ISBN 8090152147.
- Bikandi J., San Millán R., Rementeria A., & Garaiza J. (2004):** *In silico* analysis of complete bacterial genomes PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction; *Bioinformatics.* 20: 798–799.
- Brorson O., Brorson S. H. (1997):** Transformation of cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to normal, mobile spirochetes; *Infection.* 25, 240-246.
- Bunikis J., Olsen B., Fingerle V., Bonnedahl J., Wilske B., Bergstrom S. (1996):** Molecular polymorphism of the Lyme disease agent *Borrelia garinii* in Northern Europe is influenced by a novel enzootic *Borrelia* focus in the North Atlantic; *J Clin Microbiol.* 34, 364–8.
- 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; *J. Clin. Microbiol.* 150, 1741–55.

- Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach J., Grunwaldt E., Davis P. J. (1982):** Lyme disease - a tick-borne spirochetosis? *Science*; 216, 1317-1319.
- Canica M. M., Nato F., du Merle L., Mazie J. C., Baranton G., Postic D. (1993):** Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis; *Scand. J. Infect. Dis.* 25, 441-448.
- Casjens S. R., Fraser-Liggett C. M., Mongodin E. F., Qiu W. G., Dunn J. J., Luft B. J., Schutzer S. E. (2011):** Whole genome sequence of an unusual *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate; *J. Bacteriol.* 193, 1489-1490.
- Chu C. Y., Liu W., Juany B. G., Wang D. M., Juany W. J., Zhao Q. M., Zhang P. H., Wang Z. X., Tang G. P., Yang H., Cao W. C. (2008):** Novel genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks in southwestern China; *J. Clin. Microbiol.* 46, 3130-3133.
- 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, 915 – 931.
- Comstedt P. (2008):** Biology of *Borrelia garinii* Spirochetes; 1161, ISSN 0346-6612.
- Comstedt P., Asokliene L., Eliasson I., Olsen B., Wallensten A., Bunikis J. (2009):** Complex population structure of Lyme borreliosis group spirochete *Borrelia garinii* in subarctic Eurasia. *PLoS One.* 4, 5841.
- Comstedt P., Jakobsson T., & Bergstro S. (2011):** Global ecology and epidemiology of *Borrelia garinii* spirochetes; *Infection Ecology and Epidemiology.* 1, 9545.
- Damaerschalck 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. Microbiol.* 33, 602-608.
- Dolan M. C., Piesman J., Mbow M. L., Maupin G. O., Péter O., Brossard M., Golde W. T. (1998):** Vector competence of *Ixodes scapularis* and *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) for three genospecies of *Borrelia burgdorferi*; *J Med Entomol.* 35, 465–70.

- Farmakoterapeutické informace.** – Měsíčník pro lékaře a farmaceuty (4/2006). Lymeská borelióza a její léčba. ISSN 1211 – 0647.
- Felz M. W., Chandler F. W., Jr., Oliver J. H., Jr., Rahn D. W., Schriefer M. E. (1999):** Solitary erythema migrans in Georgia and South Carolina; Arch Dermatol. 135, 1317-1326.
- Fritzsche M. (2002):** Geographical and seasonal correlation of multiple sclerosis to sporadic schizophrenia; BioMed Central. 13, 1–13.
- Fukunaga M., Hamase A., Okada K., Nakao M. (1996):** *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis; Microbiol. Immunol. 40, 877-881.
- Fukunaga M., Okada K., & Naka M. (1996):** Phylogenetic Analysis of *Borrelia* Species Based on *Flagellin* Gene Sequences and Its Application for Molecular Typing of Lyme Disease Borreliae; International Journal Systematic. 40, 898–905.
- Gern L. (2008):** *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the agent of Lyme borreliosis: Life in the wilds. Parasite-Journal De La Societe Francaise De Parasitologie. 15, 244-247.
- Gómez-díaz E., Boulinier T., Sertour N., Cornet M., Ferquel E., & McCoy K. D. (2011):** Genetic structure of marine *Borrelia garinii* and population admixture with the terrestrial cycle of Lyme borreliosis; Environmental Microbiology. 13, 2453–2467.
- Havlík J., (1990):** Infektologie; Avicenum, 377 s, 17, 177 – 178. ISBN 0806290
- Humair P. (2002):** Mini-Review Birds and *Borrelia*; Int. J. Med. Microbio. 74, 70–74.
- Ivanova 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. 22, 1462- 2920.

- Johnson R. C., Schmid G. P., Hyde E W., Steigerwalt A. G., Brenner D. (1984):** *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease; Int. J. Syst. Bacteriol. 34, 496-497.
- Kawabata H., Masuzawa T., Yanagihara Y. (1993):** Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp.nov. isolated from Ixodes ovatus in Japan; Microbiol. Immunol. 37, 843-848.
- Kurtti T. J., Munderloh U. G., Johnson R. C., & Ahlstrand G. G. (1987):** Colony Formation and Morphology in *Borrelia burgdorferi*; J. Clin. Microbiol. 25, 2054–2058.
- Křupka M., Raška M., Weigl E., (2008):** Lymeská borelióza – Biologie, patogeneze, diagnostika a léčba; Dermatologie pro praxi. 2, 236–239.
- Larsson C., Comstedt P., Olsen B., Bergstrom S. (2007):** First record of Lyme disease *Borrelia* in the Arctic; Vector Borne Zoonotic Dis. 7, 453–456.
- Le Fleche A., Postic D., Girardet K., Péter O., Baranton G. (1997):** Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis; Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 921-925.
- Marconi R. T., Liveris D., Schwartz I. (1995):** Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates; J. Clin. Microbiol. 33, 2427-2434.
- 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., Vollmer S. A., Kornet M., Garnier M., Fingerle V., Wilske B., Bormane A., Vitorino L., Collares-Pereira M., Drancourt M., Kurtenbach K. (2009):** A new

Borrelia species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes; Appl. Environ. Microbiol. 75, 5410-5416.

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.

Margos G., Vollmer S. A., Ogden N. H. Fish D. (2011): Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato; Infect. Genet. Evol. 11, 1545- 1563

Masuzawa T., Takada N., Kudeken M., Fukui T., Yano Y., Ishiguro F., Kawamura Y., Imai Y., Ezaki T. (2001): *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China; Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 1817-1824.

Muzaffar S. Bin. (2009): Helminths of Murres (*Alcidae: Ura* spp.): Markers of Ecological Change in the Marine Environment; Journal of Wildlife Diseases. 45, 672–683.

Muzaffar S. Bin., Smith R. P., Jones I. L., Lavers J., Lacombe E. H., Cahill B. K., Rand P. W. (2012): The Trans-Atlantic Movement of the Spirochete *Borrelia garinii*; Emerging avian disease. 42, 23–30.

Nuttall P. A., Labuda M. (2004): Tick – host interactions : saliva-activated transmission; Parasitology. 129, 177 – 189.

Oliver J. H., Jr. (1996): Lyme borreliosis in the southern United States: A Review; J. Parasitol. 82, 926–935.

Oliver J. H., Jr., Clark K. L., Chandler, F. W., Jr., Lin T., James A. M., Banks C. W., Huey L. O., Banks A. R., Williams D. C. & Durden L. A. (2000): Isolation, Cultivation, and Characterization of *Borrelia burgdorferi* from Rodents and Ticks in the Charleston Area of South Carolina; J. Clin. Microbiol. 38, 120 – 124.

Oliver J. H., Jr., Lin T., Gao L., Clark K. L., Banks C. W., Durden L. A., James A. M., Chandler F. W. Jr. (2003): An enzootic transmission cycle of Lyme borreliosis

spirochetes in the southeastern United States; Proc Natl Acad Sci U S A. 100, 11642–11645.

Olsén B., Jaenson T. G., Bergström S. (1995): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infected ticks on migrating birds; Appl Environ Microbiol. 61, 3082–3087.

Paster B. J., Dewhirst F. E., Weisburg W. G., Tordoff L. A., Fraser G. J., Hespell R. B., Stanton T. B., Zablen L., Mandelco L., & Woese C. R. (1991): Phylogenetic Analysis of the Spirochetes; J. Bacteriol. 173, 6101-6109 .

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.

Postic D., Assous M. V., Grimont P. A. D., Baranton G. (1994): Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S) rrl (23S) intergenic spacer amplicons. Int. J. Syst. Bacteriol. 44, 743–752.

Postic D., Ras N. M., Lane R. S., Henderson M., Baranton G. (1997): Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formely *Borrelia* group DN127); J. Clin. Microbiol. 36, 3497-3504.

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; Int. J. Med. Microbiol. 297, 263-271.

Richter D., Matuschka F. R. (2006): Perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia lusitaniae* by lizards; Appl. Environ. Microbiol. 72, 4627-4632.

Rudenko N., Golovchenko M., Lin T., Gao L., Grubhoffer L., Oliver Jr., H. J. (2009a): Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, *Borrelia americana* sp.nov; J. Clin. Microbiol. 47, 3875-3880.

Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L., Oliver Jr., H. J. (2009b): *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., Grubhoffer L., Oliver Jr. H. J. (2011):** Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health; Ticks and tick-borne Dis. 2, 123-128.
- Rudenko N., Golovchenko M., Belfiore N. M., Grubhoffer L., Oliver Jr. J. H. (2014):** Divergence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochetes could be driven by the host: diversity of *Borrelia* strains isolated from ticks feeding on a single bird; Parasites and Vectors. 7, 4.
- Scott J. D., Fernando K., Banerjee S. N., Byrne S. K., Banerjee S. N., Banerjee M., Mann R. B., Morshed M. G., Lance A. (2001):** Birds disperse ixodid (*Acar*: *Ixodidae*) and *Borrelia burgdorferi* – infected ticks in Canada; J. Med. Entomol. 38, 493–500.
- Smith Jr., R. P., Muzaffar S. B., Lavers J., Lacombe E. H., Cahill B. K., Lubelczyk C. B., and Rand P. W. (2006):** *Borrelia garinii* in seabird ticks (*Ixodes uriae*) from the Atlantic coast of North America; Em. Infect. Diseases. 12, 1909–1912.
- Tilly K., Rosa P. A., Stewart P. E. (2008):** Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*; Infect. Dis. Clin. North. Am. 22, 217–234.
- Wang G., van Dam A. P., Le Fleche A., Postic D., Péter O., Baranton G., de Boer R., Spanjaard L., Dankert J. (1997):** Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19); Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 926-932.
- Wang G., Alje P., van Dam., Schwartz I., Dankert J., (1999):** Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato: Taxonomic, Epidemiological, and Clinical Implications; J. Clin. Microbilo. 12, 633 – 653.
- Wang I. N., Dykhuizen D. E., Qiu W., Dunn J. J., Bosler E. M., and Luft B. J. (1999b):** Genetic diversity of *ospC* in a local population of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto: Genetics; 151, 15-30.

Internetové zdroje:

Belster E., & Han W. J.: rbssdisease; web page:

<https://rbssdiseases.wikispaces.com/Lyme+Disease>. Citováno 10. 10. 2014.

Matějovská T. (2006): Interakce klíště – hostitel I. Sání krve a přenos patogenů; web page:

<http://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/interakce-kliste-hostitel-i-sani-krve-a-prenos-pat.pdf>.

Citováno 16. 11. 2014.

Rosa, P.: NIAID, Laboratory of Molecular Genetics; web page:

http://www.niaid.nih.gov/LabsAndResources/labs/aboutlabs/lzp/molecularGeneticsSection/Documents/lzp_recipes.pdf. Citováno 14. 10. 2014.

Rosner B.: Is Lyme Disease Woldwild? web page: <http://www.lymebook.com/africa-europe-canada-sweden-england-uk-united-kingdom>. Citováno 14. 10. 2014.

Voght S.: Atlantic Americas Flyway; web page:

http://www.birdlife.org/datazone/userfiles/file/sowb/flyways/3_Atlantic_Americas_Factsheet.pdf Citováno 16. 10. 2014.

BLAST[®]: Basic Local ALignment Search Tool; web page:

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Citováno 20. 10. 2014.

MLST: Multi Locus Sequence Typing web page: <http://www.mlst.net/>.

Citováno 4. 11. 2014.

RestrictionMapper: On line restriction mapping the easy way; web page:

<http://www.restrictionmapper.org/>. Citováno 5. 11. 2014.

9. POUŽITÉ ZKRATKY

LB – lymeská borelióza

bp – báze

kp - kilobáze

BSK – Barbour – Starry – Kelly medium

B. burgdorferi s.l. – *Borrelia burgdorferi* sensu lato

B. burgdorferi s.s. – *Borrelia burgdorferi* sensu stricto

ospA, *ospC*, – vnější povrchové proteiny A, C,

EM – erythema migrans

DNA – deoxyribonukleová kyselina

rRNA – ribosomální RNA

I. ricinus – *Ixodes ricinus*

I. scapularis – *Ixodes scapularis*

I. persulcatus - *Ixodes persulcatus*

I. uriae – *Ixodes uriae*

TBE - Tick – Borne Encephalitis/ klíšťová encefalitida

IGS – mezigenetický úsek

CDC - Centers for Disease Control and Prevention

RLB - Reverse Line Blot hybridizace

RFLP - Analýza polymorfismu restrikčních fragmentů

USA - United States of America

MLST- Multilokusová sekvenční typizace

10. PŘÍLOHY

Přílohy č. 1

Nukleové sekvence izolátu SCCH -7 (138):

1. Částečná sekvence genu pro *clpA*.

AGATTCAAACATAAAAAGAGTCATAACAAAAGAGGATGTTTGTGATCTGATTAAGTCTGTTGTTG
GCTCTAATATTTTTAATTTTTGAAGAGTATGATAGTGAGTTGTTAATTAATTTAGAGAATAGAATAA
AAAAAGAACTTATTATACATGATAGTTTAATATTTGATTTGATACTAAATATAAAACTATTTAAAT
TTAATTTACTTGCCAACAGAAGTACTATTGGCATATTTGCCTTTATTGGTCCTTCTGGAGCGGGAA
AATGCAAATTGACGGATATTTTATCAGAAGAGCTTGGAAATTCAAAAATTTAGTCTTAATATGGGC
GAATATAGCGATTTTAATTTCTTTGATAGATTGATTGGACCTGTTTTAAGTAATGAAGGGTATTAT
GAATCTACTAGATTTTTTAATTTTTTAAACAAATCTTCTAATTCTATTATTTTTCTATCAGATTTTGA
TAAATGTAATAAAAGGGTTTTAAATTTTTTTTTGGAAGGATTTAAAACAGGCAAGCTTTTTGATGG
TCTTGGGAAAAGGCAAGTTTATCAGAAAGTTTAATAGTAATAAGCGTTAATGCTGAGAGCAATG
AGCTTAATAGTATTGGCTTTAAAAACAAAATGACAGGGGAAAATGATTTTAATCTTATATTAGAG
AAGAGATTTCTAATGAATTTTTAGAGTTAATAGATTATGTTCTTTTATTTAAATCTATTGATGAGT
TAGATTTTGAAAAATGTTTTTAATGAGCTTAATCGTTTTGCTAGGATATTGAGAGATAGAAAAT
TTGATGTTTTTTTTGAGAAAAGTGTTATTGATTATATTCGGGAAAAGATTTATGGAAAGGGTTATG
GATTA AAAAGGAT TAAA – 874 bp.

2. Částečná sekvence genu pro *cplX*.

AACTTTAACAGAAGCTGGATATGTTGGTGAAGATGTAGAAAATATTTTGCTTAAATTAATACATG
CTGCTCATGGGGATGTTAGTCTAGCTGAGAAAGGATTATTTATATAGACGAAATAGATAAAAATT
GCTAAAAAAAATGAAAACGTTTCAATAACAAGAGATGTTTCTGGAGAAGGGGTTTCAGCAGGCTTT
GTTAAAGATCATTGAGGGTACTATTGCTAATGTTCTCCAAGAGGTGGTAGAAAGCATCCTTATG
AGGATACTATTGAAATTAATACTCAAAATATACTCTTTATATGTGGTGGCGCTTTTGTGGGCTTG
AAAATATTGTTAAGAATCGAATAAACAAAAGTTCTATTGGGTTTTTCAGCAATTGAAAAAAGAAT
ATAGAGGACACTTCATTAAGTATTTAGAAATGGAAGATTTGATTAATTTGGCTTGATACCAGA
GTTTGTGGTAGACTTCTGTACATTCGTATCTTGAAAAGTTAAATAAAGAAGATTTGATGAAAAT
ATTAGTTGATCCTCAAAATTCATTATTAACAGTATTATTATATGTTTAAAATGGATAATGTTGA
ATTGGTATTTGAAAAGATGCTTTGGAATCAATTGTAGATGAAGCTATTCTAAAAAATACTGGGG
CAAGAGGTCTTAGATCTATTTAGAGGGTCTTCTTAAAGATGTTATGTTTGAGGTTCTTCGATTA
GCAAGACTAAG – 730 bp.

3. Částečná sekvence genu pro *nifS*.

GATTTTCAAACAAATAAAAAGCAATGCAGAAAAGGTCAAGTTTTTAAGGAAAGATTTTCCTATTT
TAAACAAACAGTTTGATAATAAGAATATAATTTATTTTGACAATGCAGCAACCTCTCAAAGCCT
AAAAAAGTAATTTATTCTAGCATTGAATATTATGAAAATTACAACGCAAATGTACATAGAAGCGG
CCACAAATTTGCAATTCAATCTAGCATAAAAATTGAAAAACAAGAGAACTTGTA AAAAATTTCA
TTAATGCAGAATCTTCAAAAATATAATTTACCTCTGGAACCTACGGATGGAATTAACACCATC
GCAAGCTCATTTTTTACTCAAAATACTTTAAAAAAGATGAAATTATTCTTACAACCTCTTGAA
CATAATAGTAATTTGCTGCCATGGGCAAAGCTTGCAAATAGCTAATCTAACAATTAAGTTTGTG
AAATTC AATGAAATGGGAATTATTACCCCGAAGAAATTGAAAACTTATTACAGAAAAAACA
AGCTTATAAGCATTT CAGGAATAAATAACCTTGGGAACAATGAATGATTTAGAAATCTATTGGG
AAAATCGCAAAAAAATAATAATATAAGTCTTTTTGTAGATGCTGCACAAATG – 637 bp.

4. Částečná sekvence genu pro *pepX*.

AATCAACGAAGGATTTAAATACAATACTCACGACAATTTAACAGTAATAAATAGCACTAAAAAA
ACAATAAAAGATAATATCTTAGAACAACTTGGAATAGAATATGAAAATTTTCTATCTTGTGATCT
AATATTCACAGAATCACAACCTTCTAAAATAATAGGAACTGAAGGAGAATTTTTAGCCTCTAAAA
ATCTTGATAACAAATCGGGATGCCATGCAATCATGAACTCTTATATCCACACAAGCAATAATAAA
AATAAAATAGCTGTATTTTTTGATAACGAAGAAGTAGGATCTTTAACCTCAAGAGGCGCTGATTC
CAATCTTTTATCAGAAGTTTTAGAAAAGAATCGATCTTGCTCTTAACTTAACCAGAGAAGAGCATT
AATAAAAACAAAACAATCATTAAATATATCTATTGATAGCGTTCACGGCATTTCATCCAGGATATG
CATCTAAACATGATCCAAACTATCAAGCGACTCTAAGTAAAGGTGTAGTTGTAATAAATAGCGCA
AATTCAGATACGCAACAACCTCAACAGGATTTGCAAAATTAATAAATTTGGCTATTAATAAATAA
TATTAAGATTCAAGAAATAATAATGAAAGCAAATGTTCTTCAGGCACAACAATTGTCCAAT –
647 bp.

5. Částečná sekvence genu pro *pyrG*.

CGTGATTGCAAGTTCTGAGAATAGCGAGATGCTGATAATTGAAATTGGTGGAACTGTAGGAGATA
TGAAAAATTTTTATTGAGACAGTAAGGCAAATAAGACATGAGATTGGAAGCAGCAATATT
GCTTTTATTCATTTAACCTATGTACCAAGTCCAGCTGGAATTAATGAGCAAAAATCTAAACCTACT
CAACAGAGTGTTAAAACCTTTAAATAAAGCAGGCATTTTCCCCGATCTGATTATTGCTAGAAGCTCT
CAAGTATTAACAGATCAAATCAGAAAAAAGTGGCAATGTTTTGTAATGTTGAGAGCACTTCTAT
TATTGATAATATTGATGTTTCTACTATTTATGAAATTCCTATATCTTTTTACAAACAAGGCGTACAT
GAGATTTAAGTTCTAAGTTGAATATCAAGGTTGATCCAAAAATAGAAGAGCTTTCAAAGCTTGT
AGGAGTTATAAAATCTAATTTTTTTGCGCCTAAAAAATTATTAATATTGCCATTTGTGGCAAATA
TGCTGAACTTGATGATTCTTATGCGTCAATTTCGAGAGTCTTTGGTTCATGTTGGAGCCAATTTGGA
TTTACTTATTAAGCACTCTAATTGATTCTAATGATTTAAATGAGAGTTATTTAAAAGAGTTTGA
CGGCATTATTGTTCCCGGCGGCTTTGGGGGAAAGGATATGAAGGTAATAATTATTGCTATTAAT
ATGCTCGTGAAAATGACATTCCCTTTCTTGGAATTTGTCTT – 763 bp.

6. Částečná sekvence genu pro *recG*.

TTCAGGGCTGCCTTTAATTGAAGCTGGATATCAAGTGGCATTATGGCACCTACTGATCTTTTGGC
TCGTCAACATTATGATAATTTATCCAACATATTGTCTTCTTTAACATTTTCAGTGACTCTTTTGACA
GGTAGTTTGAAAAAGAAGGATAAAGAACAAGCATTAGAAAAGTATTAAGTGGAGTTTCTGGTTT
AATAGTTGGAACACATTCTATTTTTTACGAAAGTACAGAATTTAAAAGATTAGCATATGTTATTAT
TGACGAGCAGCATAAATTTGGAGTTGTTCAAAGAGAAGAGCTTAAAAATAAAGGAGAAGGGGTA
GACATACTTTAATGTCTGCAACACCTATTCTAGAAGTTTTGCGCTAACACTTTTTGGTGATCTTG
AAGTCTCACTTATTAATAACTTTACCCAAGGGCCGTTTACCTATTACTACTTATTTAGCAAAACATG
GCAATGAAGATAAAGTTTATGATTTTTAAGAAAAGAGCTCTTAAAGGGTCATCAGGTTTATTTTG
TTTATCCATTGATTCATCTTCAGAAAAATTCGAATTAAGACGTTAATAATATGTATTTAAAAT
TGAAGGAAGTGTGTTAGTGAATATGTTGTAGACATGCTTCATTCTAAGTTGCCATCTGATTTAAAAG
AAGAAATTATGAAGAATTTTTATTCTAAAAGGTAGATATTTTGGTGGCTACTAGTGTTATTGAGG
TGGAATCGATTGTCCAATGCA – 748 bp.

7. Částečná sekvence genu pro *rplB*.

TAAGCCGACTTTATCTTTTGATGATTTGAGCAAAGGTAATGATCCTTTAAAATCTTTAACAAAAGG
TAAAAAGTTGAAATCGGGCAGAGATTCTTCTGGTAGAATTAGTATTAGAAGAAGAGGTGGTGGGC
ATAAGAGAAAATATAGGTTGATTGATTTAATCGAAGAGATAAATTTAGCATTCTGCTCGAGTT
GCTTCTATTGAATATGATCCTAATAGAAGTGCTAATATAGCTTTGCTTGTTTATAAAGATGGAGAA
AAAAGGTATATTATTTCTCCTAAAGGGATTAAGGTTGGAGATGTTTTGGAAAGTGGTCCGAATGC
CCCAATTAATAATTGGCAATGCCTTACCCCTTGAAAACATTCCTATTGGAAGGACTATTCACAATAT
CGAGCTTAATGTAGGAAGGGGTGGACAGCTTGTAAGAAGTGCTGGGGGATATGCCATGATGCTTG
CTTCTGATGGGAATTATGTCACTGTAAAATTGTCATCTGGTGAATGAGGTTAATTTTCAAAAAAT
GTATTGCAACAATTGGTGAATTTGGGAATGAAGATTATGCCAATGTTTCTATAGGGAAGGCCGGT
AAAAGTAGGTGGCTTGGTAGAAGACCTAAAGTTAGAGGTGTTGCTATGAATCCTGTTGACCATCC
GCATGGTGGTGGTAAGGAA – 673 bp.

8. Částečná sekvence genu pro *ospA*.

TGAGCTTAAAGGAACTTCTGATAAAAGCAATGGTTCiGGGGTACTTGAAGGTGAAAAAGCTGACA
AAAGTAAAGCAAAATTAACAATTTCTCAAGATTTAAATCAAACCACATTTGAAATTTTCAAAGAA
GATGGCAAAACATTAGTGTCAAGAAAAGTAAATCTAAAGACAAGTCATCAACAGAAGAAAAAT
TTAATGATAAAGGTAAATTAAGTGA AAAAGTAGTAACAAGAAAAGACGGWACCAGACTTGAATA
CACAGACATACAAAACGATGGATCCGGAAAAGCTAAAGAAGTTTTAGCAGGCCTTACTCTTGAAG
GAACTCTAACTGCTGACGGCGAAACAAAATTAACAGTTACAGAAAAAACTGTTACTTTAAGCAAA
AACATTTCAAATCTGGAGAAATAACAGTTGATCTTAAGGACACTGACTCTAGCGCTGATAAAAA
ATCCGGGACATGGGATTCAGATACTTCTACTTTAACAATTATAAAAAACAGCAAGAAAACATAACA
A - 519 bp.

9. Částečná sekvence genu pro *ospC*.

TATTTATATCTTGTAATAATTCAGGTGGGGATACTGCATCTACTAATCCTGATGAATCTGTAAAG
GGCCTAATCTTACAGAAATAAGCAAAAAAATTACAGATTCTAATGCATTTGTACTGGCTGTGAAA
GAAGTTGAGGCTTTGATCTCATCTATAGATGAACTTGCTAAAGCTATTGGTCAAAGAATACAACA
AAATGGTTTAGTTGCTGATGCGGGTCACAACAGCGCATTGTTAGCAGGAGCCCATGAAATATCAA
TCCTAATAACACAAAATTAGATGGATTA AAAAGGTTTAGAAGGATTA AAAAGCAGAGATTGCAGA
AGCTAAGAAATATTCTGAAGCATTTACTAAAAAACTAAAAGATAATCATGCACAGCTTGGTATAC
AGAATGGTGCTTCTCTTGATGATGAGGCAAAAAAAGCTATTTTAAAAACAAATGTGGACAAAACC
AAGGGTGCTGAAGAGCTTGAAAAGTTATTTAAAT – 489 bp.

10. Částečná sekvence genu pro *flagellin*.

AAGGAATTGGCAGTTCAATCAGGTAACGGTACATATTCAGACGCAGACAGAGGTTCTATACAAAT
TGAAATAGAGCAACTTACAGACGAAATTAATAGAATTGCTGATCGGGCTCAATATAACCAAATGC
ACATGTTATCAAACAAATCAGCTTCCAAAATGTAAGAACAGATGAAGA ACTTGGAAATGCAACCT
GCAAAAATCAACACACCAGCGTCACTTTCAGGATCTCAAGCTTCTTGACCTTAAGAGTTCATGT
GGGAGCAATCAAGATGAAGCGATTGCTGTAAATATTTATGCTGCTAATGTTGCAAACTATTCTCT
GGTGAAGGAGCTCAGGCTGCTCAGACTGCACCTGTTCAAGCCGGAGCTCAACAAGAAGAGCTCA
ACAACCAGCACCTGCTACAGCGCCTTCTCAGGGTGGAGTTAATTCTCCTGTTAATGTTACAACCAC
AGTTGACGCTAATAACATCTCTTGCTAAAATAGAAAATGC – 497 bp.

11. Částečná sekvence mezigenového *rrf* – *rrl* úseku 5S – 23S.

TCATCTCGTCTTTTTATTTTACCCTGGTGGTTAAAGAAAAGAGGAAACACCTGTTATCCTTCCGAA
CACTGAATTTAATCTCTTATTCGCTGATGGTACTGCGAGTTCGCGGGAGAGTAAGTTGTTGCCAGG
GTTTTGTTTTATGCTTAAACATTGATTTTATTTTTATGTTTTAGATGTTTCATGTTTTGAATGT
TTTATTCAAATAATATAAAAAATAAAATATATATTGACATGGATTAACAAAGATATCTATTATTC
TAGTTGTATAAACAAATTGGCAAATAGAGATGGGAGATAAAAAATATGGTCAAAGTAATAAGAG
TCTATGGTGAATGCCTAGGAGC