

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



Biologické a imunologické aspekty lymfické boreliózy

Bakalářská práce

Kateřina Bundilová

Studijní program: B1501 – Biologie

Studijní obor: Biologie – Geografie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

Vedoucí práce: Mgr. Michal Křupka, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením Mgr. Michala Křupky, Ph.D. a použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne:

Chtěla bych moc poděkovat vedoucímu práce, panu Mgr. Michalu Křupkovi, Ph.D. za poskytnutí studijní literatury, cenné rady, trpělivost a ochotu, kterou mi věnoval během celé doby psaní mé bakalářské práce. Rovněž bych chtěla poděkovat celému Ústavu imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci za příjemné studijní i pracovní prostředí a vlídný přístup. Tato práce byla podpořena studentským grantem LF Univerzity Palackého IGA_LF_2017_009.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Kateřina Bundilová

Název práce: Biologické a imunologické aspekty lymské boreliózy

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra imunologie LF UP

Vedoucí práce: Mgr. Michal Křupka, Ph.D.

Rok obhajoby: 2017

Abstrakt:

Ve své bakalářské práci jsem se věnovala zvládnutí imunochemických metod pro specifickou imunitní odpověď potenciální účinné vakcíny proti lymské borelióze u laboratorních myší.

V literárním přehledu jsem se zaměřila na biologickou a imunologickou charakteristiku lymské boreliózy, tedy její historii, mikrobiologii etiologické agens *B. burgdorferi*, patogenezi, s ní spojenými symptomy a popis jednotlivých stadií nemoci. Následující úsek teoretické části jsem věnovala laboratorní diagnostice, prevenci a epidemiologii v Evropě a České republice. V poslední části rešerše jsem nastínila problematiku vývoje humánní vakcíny. V rámci praktické části jsem se podílela na zkoumání a vyhodnocení imunogenních vlastností chimerického polyepitopu OspC a monovalentního rekombinantního antigenu OspC pro *B. burgdorferi* s.s. pomocí imunochemické metody ELISA. Celkem byla reaktivita použitých látek vyhodnocována na šesti skupinách experimentálních myší, kdy každá byla po pěti kusech. Po dvou týdnech od první vakcinace byla provedena vakcinace druhá a po dalších 14 dnech se odebraly vzorky. Výsledky jasně ukázaly, že reakce polyOspC byly u 10 ze 12 kmenů borelií podstatně silnější než v případě monoOspC a činí tak z chimerického polyepitopu vhodného kandidáta na vývoj vakcíny proti lymské borelióze.

Klíčová slova: *Borrelia burgdorferi* s.l., *Borrelia burgdorferi* s.s., borelie, *Ixodes*, klíště, lymská borelióza, vektor, spirocheta, vakcína

Počet stran: 74

Počet příloh: 2

Jazyk: český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Kateřina Bundilová

Title of thesis: Biological and immunological aspects of Lyme disease

Type of thesis: Bachelor thesis

Department: Department of Immunology

Supervisor: Mgr. Michal Křupka, Ph.D.

The year of presentation: 2017

Abstract:

In my bachelor thesis, I have aimed at managing the basic immunochemical methods for the characteristic antibody response of a potential vaccine against Lyme borreliosis in laboratory mice.

In the theoretical part, I have focused on the biological and immunological characteristics of Lyme disease, specifically their history, and microbiology of its etiological agents – *B. burgdorferi*, the pathogenesis and specific symptoms which accompany this infection, and a description of the main stages of Lyme disease. In the next part, I have described the laboratory diagnostics, prevention, and epidemiology in both Europe and the Czech Republic. I have dedicated the last part of my theoretical introduction to the issues of developing human vaccines. In the practical part I have contributed to the research and evaluation of immunogenic characteristics of the chimeric polyepitope OspC and the monovalent recombinant antigen OspC for *B. burgdorferi* s.s. using the immunochemical method ELISA. The reactivity of the used substances were evaluated on six groups of experimental mice, which each contained five mice. After two weeks since the first vaccination, there was a second one, and 14 days later the samples were taken. The results have clearly shown that the reaction of polyOspC in 10 of the 12 strains of borrelia were significantly stronger than monoOspC, which makes the chimeric polyepitope a suitable candidate for vaccine development.

Keywords: *Borrelia burgdorferi* s.l., *Borrelia burgdorferi* s.s., borrelia, *Ixodes*, tick, Lyme disease, vector, spirochete, vaccine

Number of pages: 74

Number of appendices: 2

Language: Czech

OBSAH

ÚVOD	8
CÍLE PRÁCE.....	9
1 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	10
1.1 Historie.....	10
1.2 Mikrobiologie	11
1.2.1 Morfologické formy <i>Borrelia burgdorferi</i>	13
1.2.2 Genom	15
1.2.3 Izolace a kultivace	15
1.2.4 Přenos a vektor	16
1.2.5 Osp antigeny	18
1.3 Lymfská borelióza.....	20
1.3.1 Infekční druhy borelií	20
1.3.2 Patogeneze	21
1.3.3 Příznaky a stadia.....	23
1.4 Laboratorní diagnostika	28
1.4.1 Přímé metody.....	29
1.4.2 Nepřímé metody	30
1.5 Prevence a léčba.....	32
1.5.1 Prevence.....	32
1.5.2 Léčba	33
1.6 Epidemiologie	34
1.7 Vakcíny	39
2 MATERIÁL A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	41
2.1 Biologický materiál.....	41
2.2 Chemikálie a roztoky	41
2.3 Vakcíny	42

2.4	Kultivační media.....	43
2.5	Laboratorní přístroje	43
2.6	Spotřební materiál.....	43
3	METODY	44
3.1	Imunochemický test ELISA.....	44
4	PRAKTICKÁ ČÁST S VÝSLEDKY	45
5	DIDAKTICKÁ ANALÝZA ODBORNÉHO TÉMATU.....	60
	ZÁVĚR	62
	SEZNAM LITERATURY	63
	PŘÍLOHY	74

ÚVOD

Lymfská borelióza je jednou z nejčastějších antropozoonóz severní polokoule. Jedná se o multisystémové onemocnění způsobené spirochetami druhového komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Protože této chorobě doposud nelze u lidí předcházet účinnou vakcínou, velmi důležitou roli hraje prevence, tedy především omezení či úplná eliminace styku s vektorem *B. burgdorferi* – klíštětem.

V literárním přehledu své bakalářské práce se budu zabývat komplexním biologickým a imunologickým popisem této choroby. V praktické části se budu věnovat vyhodnocení vlastností potenciální vakcíny proti lymfské borelióze a budu za užití základních imunochemických metod srovnávat reaktivitu chimérického polyepitopu OspC a monovalentního rekombinantního antigenu OspC pro *B. burgdorferi* s.s. u experimentálních myší.

CÍLE PRÁCE

- shromáždění dostupných literárních zdrojů
- zvládnutí práce s odbornými literárními databázemi (Medline, Web of Science, Scopus)
- vypracování literární rešerše zaměřené na biologii bakteriálního rodu *Borrelia*, na imunobiologické aspekty vztahu patogen-vektor-hostitel u lymfské boreliózy a na současný stav výzkumu zaměřeného na imunoprevenci choroby
- zvládnutí imunochemických metod pro charakteristiku protilátkové imunitní odpovědi na prototypové vakcíny použité na zvířecím modelu

1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

Lymská borelióza je chronické multisystémové onemocnění a nejčastější choroba přenášená členovci v Evropě a Spojených státech amerických (Stanek & kol., 2011). I když byly příznaky spojené s lymskou boreliózou poprvé popsány začátkem 20. století, původce tohoto onemocnění, *Borrelia burgdorferi*, byl objeven poměrně nedávno. Dalšími výzkumy bylo identifikováno alespoň 18 blízce příbuzných druhů, pojmenovaných jako *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Čtyři z těchto druhů, *Borrelia Burgdorferi*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, a *Borrelia Spielmanii*, byly prokázány jako patogenní pro člověka (Rudenko & kol., 2011; Yoshinari & kol., 2010). Od zahájení výzkumů v oblasti lymské boreliózy, které započaly ve Spojených státech pod agenturou CDC (Centers for Disease Control and Prevention), čísla nakažených pozvolna narůstají (Steere & kol., 2004).

1.1 Historie

Jednou z prvních zmínek o lymské borelióze byl popis kožního onemocnění *acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA), který publikoval Buchwald v roce 1883. Během několika následujících let byl popsán lymfocytom, *erythema migrans* a objevily se zprávy, které mimo kožní změny uváděly i napadení dalších orgánů (Vasudevan & Chatterjee, 2013). Roku 1921 zveřejnil Max Jessner studii nemocného trpícího ACA se současným výskytem bolesti kloubů a zánětem hrtanu. O rok později se objevil případ meningopolyneuritidy společně s kožním erytémem, popsáný Garinem a Bujadouxem, který ale v té době ještě nebyl označen jako *erythema migrans*. Ve čtyřicátých letech 20. století bylo Bannwarthem popsáno několik nemocných, kteří měli multifokální postižení nervového systému, kterému vždy předcházelo přisátí klíštěte. Během následujících let se začalo vyskytovat množství názorů týkajících se tohoto multiorgánového onemocnění a možného propojení jednotlivých příznaků. Důležitým, avšak později opuštěným názorem, bylo tvrzení Lehnhoffa, který jako první upozornil na možnou souvislost mezi kožními lézemi *erythema migrans*, *acrodermatitis chronica atrophicans* a spirochetami. Jeho výrok však nebyl dalšími autory přijat ani nikým potvrzen (Bartůněk, 2013).

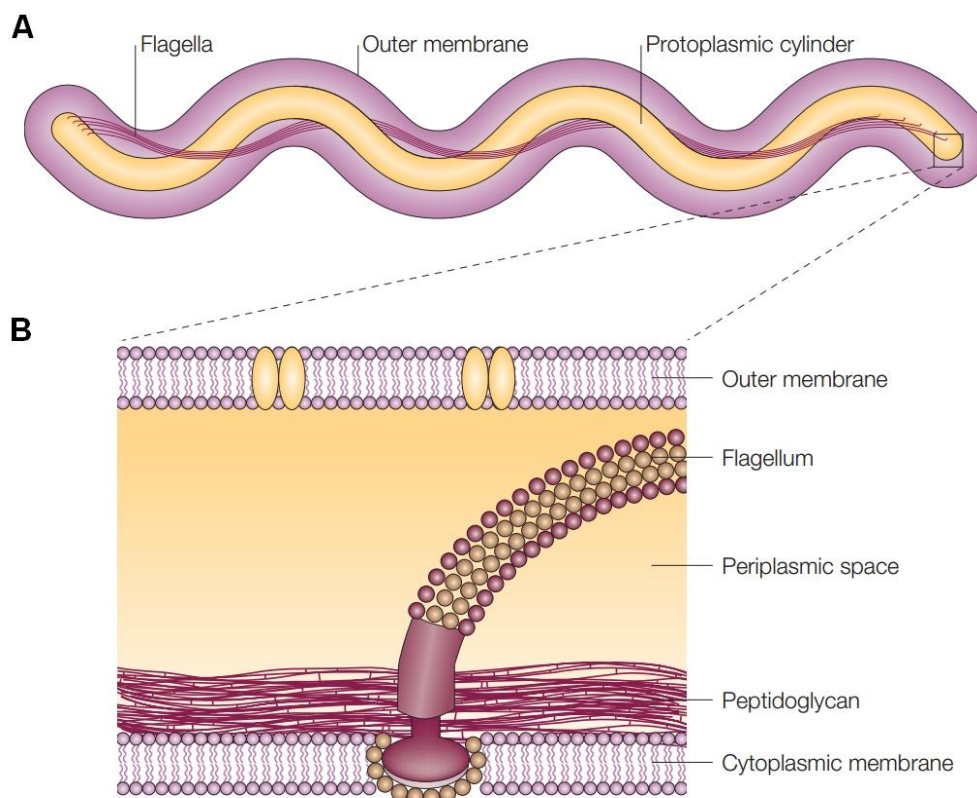
Lymská borelióza jako taková byla poprvé rozpoznána v roce 1976, a to kvůli poměrně velkému množství dětí ve městě Lyme (Connecticut), o kterých se předpokládalo, že trpí juvenilní revmatoidní artritidou (Steere & kol., 2004). U nemocných se ve 25 % případů vyskytoval kožní erytém, *erythema chronicum migrans*, který tomuto postižení

kloubů předcházet, a protože byla tato kožní léze pozorována už v Evropě ve spojitosti s přisátím klíštěte, zaměřil se výzkum touto cestou. Pozornosti neunikl fakt, že nejvíce nových případů se objevilo v létě a ze začátku podzimu, což odpovídá období s nejvyšší kulminací výskytu klíšťat, a taky že většina nakažených žila v lesnatých oblastech. Protože nemocné spojovaly i další nespecifické příznaky, jako bolesti hlavy, zatuhnutí šije, malátnost, únava, zimnice nebo horečka, došlo k pojmenování nového onemocnění – lymské nemoci. Za jejího přenašeče bylo označeno klíště hojného druhu; *Ixodes scapularis* (Steere & kol., 1978). O šest let později, v roce 1982, byla objevena i spirocheta způsobující tuto infekci – *Borrelia burgdorferi*, jež byla zařazena mezi borelie a pojmenována dle svého objevitele – Wilhelma Burgdorfera. Označení lymská borelióza získala na doporučení během III. mezinárodní konference věnované tomuto tématu v New Yorku v roce 1987 (Bartůněk, 2013).

1.2 Mikrobiologie

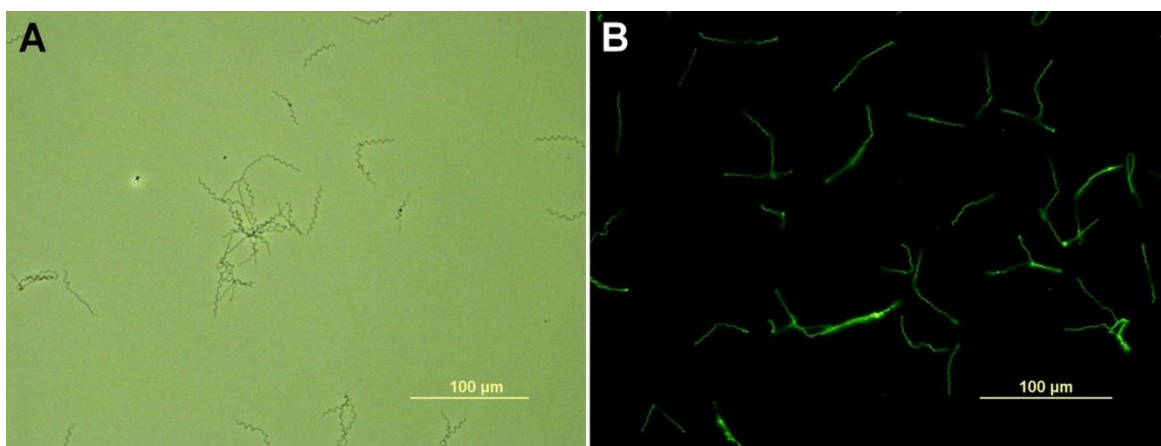
Celý rod *Borrelia* se řadí mezi gram-negativní (G-) mikroaerofilní bakterie kmene spirochet (Spirochaetes). Tyto bakterie sdílí několik společných morfologických znaků; vícevrstevný vnější plášť, vnější membránu, protoplazmatický válec, a dále periplazmatické bičíky, které se nachází mezi protoplazmatickým válcem a vnějším pláštěm (Johnson & kol., 1984). Mezi další spirochety, které jsou patogenní pro člověka, řadíme rody *Leptospira*; původce leptospirózy a *Treponema*; původce syfilidy (Tilly & kol., 2008). Tvar spirochet *Borrelia burgdorferi sensu lato* je spirálovitý a tenký, o rozměrech $0,2\ \mu\text{m} \times 4\text{--}30\ \mu\text{m}$. Buňky jsou stočené a pohybují se rotací kolem podélné osy nebo smršťováním a natahováním. Pohyb buněk zajišťuje 7–12 bičíků, čímž se *Borrelia burgdorferi* odlišuje od ostatních patogenních borelií, které jich mají 15–20. Bičíky o tloušťce $11,9 \pm 2\ \text{nm}$ vyplňuje kanálek (lumen) o průměru 7,6 nm, v jehož nitru je přítomný flagelin. Bičíky vycházejí z pólu buňky z disků v cytoplazmatické membráně a obtácejí se pod vnější buněčnou stěnou kolem těla borelie. Buněčná stěna má tři vrstvy, vnitřní vrstva je tvořena peptidoglykanem, střední lipopolysacharidem a vnější lipoproteinem. Od ostatních spirochet se borelie liší přítomností intramembránových tělísek (vláknité a zrnité útvary podobné buněčnému glykokalyxu), které je chrání v nevhodném prostředí. Buněčná stěna je od cytoplazmatické membrány oddělena periplazmatickým prostorem. Podle počtu bičíků je mezi těmito obaly vzdálenost asi 27 ± 4 až $44 \pm 10\ \text{nm}$. Všechny membrány borelií jsou dvouvrstevné s výjimkou vnitřní

peptidoglykanové membrány, která má vrstvu pouze jednu. Pokud se bičíky vysunou do prostoru, dojde k vyloučení membránových vezikulů, jejichž stavba odpovídá buněčné stěně. Význam těchto vezikulů spočívá především v pravděpodobné přítomnosti plasmidové DNA. Přílnavosti k hostitelským buňkám napomáhá posun antigenních molekul proteinů a glykosaminopeptidových receptorů nacházejících se v povrchové membráně (Hulínská, 2013a).



Obrázek č. 1: Struktura a morfologie spirochety *Borrelia burgdorferi*.

A: schéma *Borrelia burgdorferi* – bičíky vycházející z pólu buňky se obtáčejí pod vnější buněčnou stěnou kolem těla borelie, B: detailní schéma *Borrelia burgdorferi* – každý bičík je zasunut do cytoplazmatické membrány a dostává se skrze buněčnou stěnu do periplazmatického prostoru (převzato z Rosa & kol., 2005).



Obrázek č. 2: Spirochety *Borrelia burgdorferi*. A: helikální spirochety kultivované v mediu BSK II, B: helikální spirochety barvené karboxylfluoresceinsukcinimydylesterem a zobrazené ve fluorescenčním mikroskopu (foto: Kateřina Bundilová).

Borrelia burgdorferi se dokáže pohybovat v mediích gelovité konzistence, což je odlišující faktor od většiny jiných bakterií, které toto prostředí výrazně zpomaluje, až zastavuje. Je to způsobeno specifickým pohybem bičíků spirochet, kdy část kmitá ve směru a část v protisměru hodinových ručiček. Na základě měření byla nejvyšší rychlost pohybu borelie stanovena v plazmě nesrážlivé lidské krve (po přidání heparinu) obohacené o trombocyty, a to 2,8 mm/min (Charon & kol., 2009; Malawista & De Boisleury Chevance, 2008).

U borelií byly rovněž zjištěny intra- a extracelulární mnohotvárné vezikuly, o kterých se uvažuje jako o možné příčině vzniku encefalopatie u pacientů nakažených boreliózou. Jedná o rezistentní formy, nacházející se např. v neuronech nebo gliálních buňkách, které jsou schopny vázat povrchové proteiny a tím se vyhnout detekci testy ELISA či Western-blot (detekují pouze volné protilátky). Jsou rovněž schopny pozměnit povrchové antigeny do takové míry, že je imunitní systém není schopen rozpoznat, a proto je jim přisuzována role dlouhého latentního stadia a přetrvání infekce. (Hulínská, 2013a; Simon & kol., 1996).

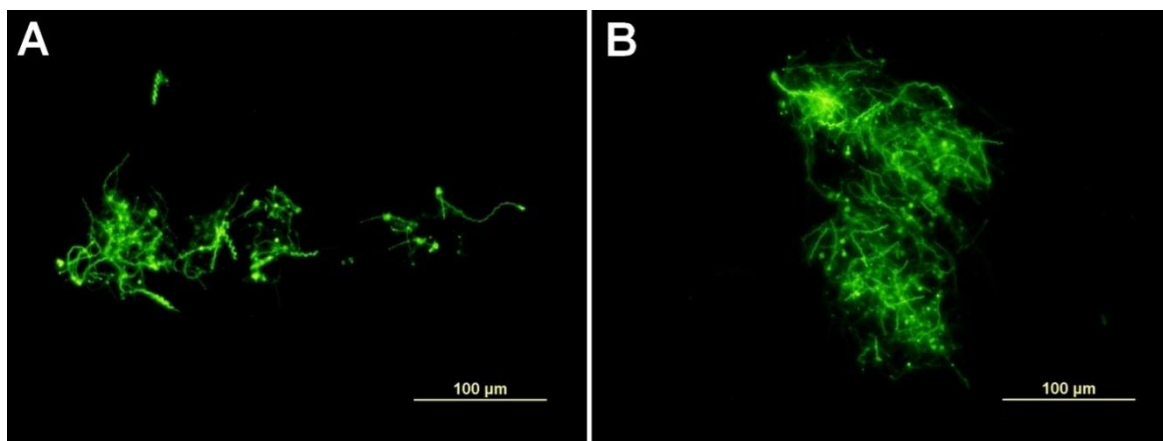
Aby borelie mohla růst a syntetizovat DNA, potřebuje i dostatek zinku. Jeho zvýšená adsorpce, společně se schopností přilnavosti borelií k leukocytům, je důkazem značného přizpůsobení se hostiteli (Hulínská, 2013a).

1.2.1 Morfologické formy *Borrelia burgdorferi*

Doposud není zcela jasné, jakým způsobem dokáže *Borrelia burgdorferi* přežít v infikované tkáni po tak dlouhou dobu. Způsob, kterým tohoto jevu lze dosáhnout, může

být přeměněny se v různé morfologické formy. Již od roku 1905 se předpokládalo, že klasická spirální (helikální) forma borelie není jedinou podobou této spirochety. Byla pozorována transformace spirochet do knoflíků, smyček, prstýnků a kuliček, rovněž shlukování do kolonií a vytváření cystických forem (Miklossy & kol., 2008).

Cysty *B. burgdorferi* jsou charakteristické zeslabenou povrchovou membránou, která postrádá některé vnější lipoproteiny, jakými jsou například Erp (E related proteins) nebo OMPs (outer membrane proteins), přítomen však zůstává vnější protein OspA, který se u živých cyst nachází na jejich povrchu, avšak u mrtvých uvnitř buňky (Hulínská & kol., 2006). Ke tvorbě cyst dochází kvůli řadě chemických i fyzikálních činitelů, ale i díky hladovění z nedostatečného množství tuku, protože borelie nedokáže vytvářet mastné kyseliny. Předpokládá se, že právě nízká metabolická aktivita cystických forem hraje významnou roli v odolnosti borelií vůči antibiotické terapii. Pro efektivitu antibiotik je bakteriální metabolická aktivita nutná, proto může tento jev objasňovat opětované vzplanutí onemocnění, ke kterému někdy dochází i po proběhnuté antibiotické léčbě (Dattwyler & kol., 1988; Preac-Mursic & kol., 1989).



Obrázek č. 3: Různé morfologické formy *Borrelia burgdorferi* barvené karboxylfluoresceinsukcinimydylesterem. Zobrazeno pod fluorescenčním mikroskopem. A: přechod mezi helikální a cystickou formou, B: struktura podobná koloniím/agregát (foto: Kateřina Bundilová).

Vlivem nepříznivých podmínek se mohou tvořit i tzv. granula, vzniklá zaškrcováním cytoplazmatické membrány. Oproti cystám jsou granula nepohyblivá pravděpodobně neživá a mají jen malé množství protoplastu, který je chráněn bezbičíkatou ztenčenou membránou (Hulínská, 2013a).

1.2.2 Genom

Genom *B. burgdorferi* je jedním z nejkomplexnějších v bakteriální říši. Skládá se z lineárního chromozomu o rozměru 950 kilobází (Brisson & kol., 2012), který je ve srovnání s jinými bakteriemi, jejichž průměrná velikost je od 580 do 9 300 kbp, relativně malý (Casjens, 2000). Nese 853 genetických elementů (ORF), které kódují proteiny potřebné k replikaci DNA, proteinovou transkripci a translaci, transportní geny a geny, které kontrolují energetický metabolismus buňky. Zbylá část genomu se nachází v 12 lineárních a 9 cirkulárních plazmidech (Hulínská, 2013a). Chromozomy ani plazmidy nenesou geny potřebné pro buněčnou biosyntézu (kvůli malému genomu), což je důvod pro limitovanou metabolickou kapacitu *Borrelia burgdorferi sensu lato*, která postrádá enzymy nutné pro biosyntézu aminokyselin, mastných kyselin, nukleotidů a kofaktorů. Tato absence rovněž vysvětluje potřebu komplexního růstového media bohatého na všechny tyto látky. Používá se hlavně tzv. Barbour-Stoenner-Kelly medium, do kterého je přidáno ještě inaktivované králíčí sérum (Fraser & kol., 1997; Křupka & kol., 2007).

Rozdílný imunogenní a patogenní vliv je způsoben rozlišnou antigenní strukturou spirochet (genotyp, fenotyp). Nejdůležitějšími epitopy *B. burgdorferi sensu lato* jsou OspA, OspC, OspE a OspF, přičemž všechny tyto proteiny mají různé sérotypy (Hulínská, 2013a). Přes 90 % genů je typických právě pro borelie, z čehož vyplývá, že produkty těchto genů mají své specializované funkce. V rámci plastidů probíhají vzájemné přestavby, čímž se značně zvyšuje proměnlivost bakterie. Genom borelie nese také 167 mutačně poškozených genů (pseudogenů), což je množství, které je v bakteriální říši abnormální (Casjens & kol., 2000).

Spirocheta *B. burgdorferi* dokáže jako zdroj energie využít jen omezené množství uhlíku, a to v podobě monosacharidů, jako je například glukóza, manóza, N-acetylgukosamin, nebo disacharidů jako maltóza či dimery glukosaminu. Všechny tyto sacharidy jsou při infekci borelií zpravidla k dispozici, a tak z nich spirochety mohou využít energii pro vlastní vývoj a uskutečnění celého infekčního cyklu (Von Lackum & Stevenson, 2005).

1.2.3 Izolace a kultivace

Poprvé byla izolace a kultivace spirochety borelie provedena Noguchim v roce 1912 (Noguchi, 1912). Kligler & Robertson (1922) pak v roce 1922 kultivační poznatky značně zdokonalili a přišli s možností substituce lidské peritoneální tekutiny (tekutiny

z dutiny břišní) v kultivačním mediu za zředěné králičí nebo koňské sérum. Rovněž přišli s poznatkem, že pro dobrý růst borelií je nezbytná konstantní koncentrace CO₂. Nenahraditelnou složku současných kultivačních medií, N-acetylglukosamin, vyzkoušel poprvé v roce 1971 Richard Kelly, když kultivoval infekční agens *Typhus recurrentis* (návratné horečky) – *B. hermsii* (Kelly, 1971). Medium Richarda Kellyho ale nedokázalo podporovat růst borelií z nízkého množství spirochet. S řešením přišel Herbert Stoenner, který medium obohatil o složku zvanou Yestolate, což je výtažek (získaný samovolným rozkladem buněk kvasinky pивní – *Saccharomyces cerevisiae*) který obsahuje velké množství aminokyselin. Dále přidal medium CMRL1066, které v kombinaci se všemi ostatními látkami podporovalo růst minima bakterií do koncentrované populace (Stoenner & kol., 1982). Posledním krokem k získání media využívaného v současné době už bylo jen lehké pozměnění provedené Alanem Barbourem a kolektivem v roce 1983 – medium tak získalo název BSK I (Barbour-Stoenner-Kelly I). Zbývající drobné modifikace, znovu provedené A. Barbourem, daly za vznik mediu BSK II (Barbour-Stoenner-Kelly II), které umožnilo růst borelií do hustoty 1–4x10⁸/ml, při generační době 11–12 hodin, k čemuž postačují pouze 1–2 spirochety (Barbour & kol., 1983; Barbour, 1984). Pollack a kolektiv (1993) ještě zmiňuje medium BSK-H, které je upravené přímo pro pěstování *B. burgdorferi* s.l. (obsahuje králičí sérum a želatinu) a využívá se pro komerční a výzkumné účely.

Nejvhodnější teplotou pro růst borelií *in vitro* je rozmezí 30–37 °C. Hraniční teplotou je 39 °C, kdy začíná zpomalování růstu a následně úplné zastavení v případě překročení 40 °C. V takovém případě už spirochety ztrácejí schopnost se dělit, čemuž nepomůže ani opětovné snížení teploty (Barbour, 1984). Hulínská (2013a) stanovuje optimální dobu kultivace *in vitro* na 12–14 hodin a *in vivo* 6–12 hodin. Nejvhodnější pH je okolo 7,0–8,0 a koncentrace CO₂ pod 3 % (Carroll & kol., 1999; De Martino & kol., 2006).

1.2.4 Přenos a vektor

Jediným potvrzeným a celosvětově uznávaným přenašečem lymské boreliózy jsou klíšťata rodu *Ixodes* (Hulínská, 2013a) patřící do rodu *Ixodidae* (Volf & Horák, 2007). Jedná se o roztoče se třemi hostiteli a 2–6 let dlouhým životním cyklem, jehož přesná délka se odvíjí podle prostředí, ve kterém se vyskytují. Charakteristická je rovněž nepřítomnost očí. Druhový komplex *Ixodes ricinus-persulcatus*, kam se řadí druhy

přenášející lymskou boreliózu, tedy především *Ixodes ricinus* v Evropě a *Ixodes scapularis* ve Spojených státech amerických, je celosvětově rozšířen (Capinera, 2008). Obecně přenáší klíšťata na člověka a zvířata více patogenů, než kterýkoliv jiný členovec. Dalšími častými chorobami je například klíšťová encefalitida, granulocytární anaplazmóza, babezióza, atp. (Gulia-Nuss & kol., 2016).

Lymská borelióza není jen problémem lidí. Klinické formy byly pozorovány i u domácích zvířat, jakými jsou například psi, koně, kočky a hovězí dobytek. Pozoruhodná je nepřítomnost klinických příznaků u volně žijících zvířat. Předpokládá se, že tento jev je dán dlouhodobou koevolucí borelie a jejích přirozených hostitelů, kterými jsou jeleni, zajáci a hlodavci (Křupka & kol., 2007).

Experimenty ve Spojených státech amerických, zkoumající přenos *Borrelia burgdorferi* klíštětem *Ixodes scapularis*, prokázaly velkou vektorovou kompetentnost. Možnost přenosu stejným vektorem byla zjištěna i u *Borrelia bissettii*. *Borrelia burgdorferi sensu stricto* může být rovněž přenesena klíštětem rodu *Ixodes affinis*, který však zpravidla nenapadá lidského hostitele. I když se *Ixodes minor* (na rozdíl od *I. scapularis* a *I. affinis*) neřadí do druhového komplexu *Ixodes ricinus*, byl prokázán jako účinný vektor pro *Borrelia burgdorferi* i *Borrelia bissettii* s.s. V přirozených podmínkách se ukázalo, že prevalence *Borrelia burgdorferi* s.l. u *Ixodes affinis* a *Ixodes minor* je mnohem větší než u *Ixodes scapularis*. I když tyto dva druhy zřídka napadají lidské hostitele, hrají důležitou roli jako enzootické vektory *Borrelia burgdorferi* s.l. (Oliver & kol., 2003).

Brouqui a kolektiv (2004) označuje za hlavní evropský vektor *Borrelia burgdorferi* klíště *Ixodes ricinus*. Problematika jiného přenačeče, tedy například krev-sajícího hmyzu, je v současné době neustále zkoumána. Borelie byly v trávicím traktu komárů opakovaně mikroskopicky detekovány, a to hlavně v USA. Za zdroj se považuje krev nakaženého hostitele (Magnarelli & Anderson, 1988).

Spirochety *Borrelia azfeli* byly nalezeny také v České republice na jižní Moravě, kde Halouzka a kolektiv v letech 1993–1995 nasbíral 3 580 komárů šesti druhů (*Aedes cantans*, *Aedes vexans*, *Aedes sticticus*, *Aedes geniculatus*, *Culex pipiens*, *Culex pipiens molestus*, *Culiseta annulata*) z několika různých stanovišť (nivní les, dubový les, pobřeží rybníka, sklepy a suterénní místnosti vesnických zástaveb). Pomocí mikroskopie temného pole (DFM; Dark-field microscopy) byla pozorována přítomnost spirochet v trávicím traktu a na základě množství stanovená hustota od nízké přes střední až po vysokou. Při nalezení více než 1 000 borelií byly spirochety naočkovány do media BSK II za účelem

izolace. Přítomnost borelií byla zjištěna ve čtyřech druzích komárů, a to u *Aedes cantans*, *Aedes vexans*, *Aedes sticticus*, *Culex pipiens* a *Culex pipiens molestus*. Další dva druhy, *Aedes geniculatus*, a *Cluseta annulata* byly zcela negativní. Z celkových 1 541 samiček komárů bylo 16 vzorků ze čtyř výše uvedených druhů hodnoceno jako pozitivní. U všech pozitivních vzorků byla potvrzena genospecies *Borrelia afzelii* (Halouzka & kol., 1998). Reálný přenos infekce na člověka však nebyl doposud nikým potvrzen (Bratton & kol., 2008).

Larvy a nymfy klíšťat požírou borelie z infikované krve hlodavců nebo ptáků, na kterých parazitují. Tím se část spirochet dostává do trávicího traktu (hlavně střeva), kde probíhá vývoj a růst. Dále putují při příjmu potravy hemolymfou do slinných žláz, odkud pak probíhá přenos slinami do krve hostitele. Přenos patogena do hostitele nemůže být srovnáván s intradermální injekcí se stejným počtem spirochet, protože krmící se klíště vylučuje spirochety kontinuálně a sliny klíšete farmakologicky ovlivňují imunitní systém hostitele, čímž usnadňují průnik infekce (Fišerová & kol., 2008).

1.2.5 Osp antigeny

Komplexní životní cyklus *Borrelia burgdorferi* vyžaduje vysokou adaptaci na velmi rozdílná prostředí – bezobratlý vektor a hostitele obratlovce. Spirocheta se tak musí být schopna udržet a přežít v zažívacím traktu klíšete, projít do hemolymfy, být transportována do slinných žláz a do krve hostitele. Zároveň se musí vyhnout imunitní reakci a rozšířit se do cílené tkáně hostitele. Všechny tyto úlohy umožňují klíčové povrchové proteiny (Osp), jejichž exprese je řízena v různých fázích infekce boreliemi (Křupka & kol., 2007). Hulínská (2013a) uvádí šest vnějších povrchových proteinů (Osp) přítomných u *Borrelia burgdorferi sensu lato* – OspA, OspB, OspC, OspD, OspE a OspF. Tyto lipoproteiny jsou důležitou složkou těla; bylo totiž potvrzeno, že mimořádná imunogenicita integrálních membránových proteinů, které jsou přítomny u virulentních spirochet, blízce souvisí s jejich lipoproteinovou strukturou (Brandt & kol., 1990). Několik povrchových proteinů je schopno vázat proteiny a podpořit adhezi k buňkám hostitele. Například lipoproteiny *B. burgdorferi* váží hostitelské glykosaminoglykany (GAGs), dekorin a fibronectin (Kenedy & kol., 2012).

OspA a OspB

OspA, s molekulární hmotností 31 kDa, byl popsán jako první součást povrchových lipoproteinů a je společně s OspB o molekulární hmotnosti 34 kDa exprimován jedním operonem. Geny pro oba tyto povrchové proteiny jsou umístěny na stejném plazmidu. Tyto proteiny jsou exprimovány v trávicím traktu klíšťat během jeho kolonizace po sání krve z infikovaného hostitele – obratlovce, pravděpodobně díky změně teploty a pH, nebo u kultivovaných borelií. Jejich exprese je snižována během přenosu na hostitele – obratlovce (Templeton, 2004). Bohatá exprese těchto lipoproteinů v těle klíštěte vedla k hypotéze, že OspA a OspB jsou nezbytné k přetrvání spirochety v těle klíštěte. Tato hypotéza byla dále podpořena examínací *in vitro* i *in vivo*, kde bylo patrné, že rekombinantní OspA a OspB váží extrakty ze střeva klíštěte *in vivo* (Kenedy & kol., 2012).

Hlavní funkcí OspA je vázání se na glykoprotein TROSPA (tick receptor for OspA), který se nachází ve střevním epitelu klíšťat. Biologická funkce glykoproteinu TROSPA nebyla doposud objasněna, nicméně exprese TROSPA se ukázala být podstatně zvýšena u klíšťat infikovaných boreliemi. Další domnělou funkcí OspA je navázání plasminogenu z krve hostitele při sání krve klíštětem. OspA i OspB se přímo váží na komplement receptor 3 (skládající se z CD11b, CD18) a tím spustí imunitní systém. To může být jedním z důvodů snížení exprese OspA a OspB během přenosu na hostitele – obratlovce, což minimalizuje imunitní zánětlivou reakci v počátečních fázích lymfické boreliózy. Exprese OspA je zaznamenána v pozdějších stádiích infekce, avšak není jasné, jestli je jeho zvýšená exprese během chronické infekce pouze odpovědí borelie na za jiných okolností spouštěnou zánětlivou reakci hostitele nebo zda je exprese OspA nutná pro chronickou infekci (Křupka & kol., 2007).

Xu & kol. (2010) poukazuje na fakt, že zastavením exprese OspA se zvyšuje šance poškození vnější lipoproteinové vrstvy, což může být pro spirochetu smrtelné. Schopnost přetrvat v těle hostitele po delší dobu je dána fenotypovým potlačením povrchového proteinu OspA, což imunitní systém hostitele nedokáže rozeznat a borelie tak není zneškodněna. K zahubení borelie může dojít v případě, že se OspA setká s protilátkami proti OspA, nacházejícími se ve tkáních hostitele.

OspC

Způsobilst k opuštění střeva klíštěte a doputování do slinných žláz je spojována s expresí třetího povrchového proteinu – OspC (Templeton, 2004). Jedná se

o mnohotvárný protein o molekulární hmotnosti mezi 22 a 23 kDa (Fung & kol., 1994), který boreliím umožňuje transport z trávicího traktu vektoru do hostitele (Schwan & Piesman, 2002). I když je tento protein během posledních let intenzivně zkoumán, doposud nebyla objasněna jeho biologická funkce v enzootickém cyklu *B. burgdorferi*. Ve střevě nekrmeného klíštěte produkují borelie vysoké hladiny OspA a OspB, zatímco hladina OspC je takřka nedetekovatelná. Jeho produkce začíná 36–48 hodin od nakrmení klíštěte, kdy se exprese OspA a OspB snižuje. I přes malou prozkoumanost je jasné, že OspC je virulenní faktor pro *Borrelia burgdorferi*, který je nutný pro infekci u myšího hostitele. (Kenedy & kol., 2012). Zvýšená exprese OspC před začátkem infekce je daná příjmem potravy klíštětem. Jeho vysoká exprese je ale zaznamenávána i v počátečních stádiích infekce hostitele – obratlovce. Protože je OspC terčem imunitního systému savců (jde o silný imunogen), dochází na začátku specifické imunitní odpovědi hostitele ke snížení jeho exprese (Seemanapalli & kol., 2010). Jak již bylo zmíněno, roli při expresi povrchových proteinů hraje teplota. Konkrétně u OspA a OspB je teplota pro expresi 24 °C. OspC vyžaduje 32–37 °C, což odpovídá průměrné teplotě krve endotermního hostitele (Wang & kol., 1999).

Protilátky řízené proti vnějšímu povrchovému proteinu (OspA) se prokázaly jako ochranná bariéra zvířat a lidí proti infekci *B. burgdorferi*. Z tohoto důvodu byl kladen velký důraz na vývin vakcíny proti lymské borelióze, která by byla právě na tomto principu založená (Kenedy & kol., 2012).

1.3 Lymská borelióza

1.3.1 Infekční druhy borelií

Za hlavní etiologické agens lymské boreliózy u člověka se považují druhy *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* a *Borrelia afzelii*. Jako potenciálně patogenní se považují *Borrelia bissettii*, *Borrelia valasiana*, *Borrelia lusitaniae* a *Borrelia spielmanii*. Každý tento druh má u lidského hostitele sklon vyvolávat preferenčně některé příznaky (viz Tabulka č. 1), avšak všechny druhy jsou spojovány s manifestací EM – *erythema migrans* (Chu & kol., 2008). Protože infekce *B. burgdorferi* může napadnout kůži, srdce, nervy i klouby, její diagnostika je často svízelná. Obecně platí pravidlo, že časná infekce, tedy první stadium, je pro léčbu snazší než infekce pozdní. Protože se ale lymská borelióza často vůbec neprojeví nebo jsou příznaky pouze mírné, nebývá mnohdy ani detekována

nebo se projeví až za několik let od infekce (Gern & Falco, 2000). Dalším faktorem stěžujícím diagnostiku jsou rozdílné projevy napříč kontinenty. Rozdíly v příznacích jsou patrné hlavně v oblastech, kde je lymská borelióza nejvíce sledovaná – tedy v USA, Evropě a Asii (Steere & kol., 2004).

Tabulka č. 1: Rozdílné druhy borelií a typické klinické manifestace (podle Santos, 2010)

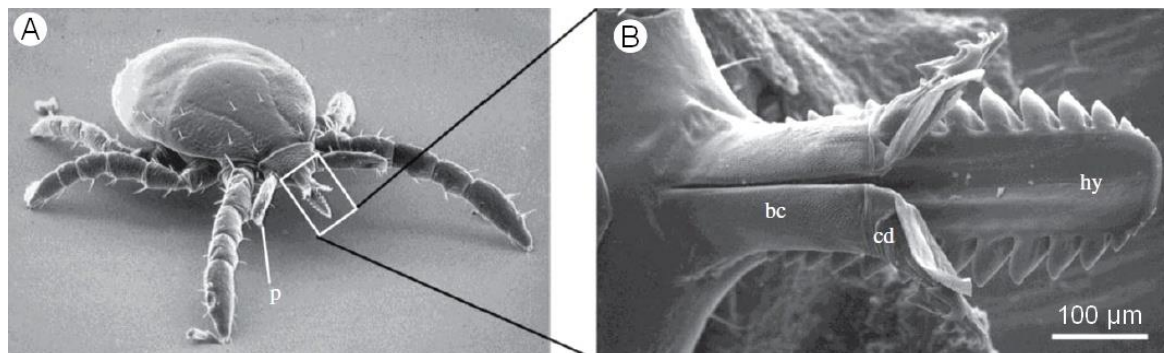
Druh borelie	Hlavní klinické manifestace
<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>	<i>Erythema migrans</i> , artritida
<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Erythema migrans</i> , lymfocytom, ACA, oční a srdeční manifestace
<i>Borrelia garinii</i>	<i>Erythema migrans</i> , lymfocytom, neurologické problémy, oční a srdeční manifestace
<i>Borrelia spielmanii</i>	<i>Erythema migrans</i>

1.3.2 Patogeneze

Samotné spirochety borelií žijí především parazitickým způsobem života – volně žijící nebyly doposud pozorovány. Jejich životní cyklus se uskutečňuje pomocí hostitele, kterým může být pták nebo savec a dále klíště rodu *Ixodes*. Z tohoto důvodu mají borelie tak komplexní a bohatý genom (viz kapitola 1.2.2), který umožňuje složitý vývojový cyklus a energeticky náročné procesy, jako je změna endotermního a exotermního hostitele. Protože se přenos mezi dvěma lidmi takřka nevyskytuje a borelie se tak nemohou dále šířit, můžeme lidského hostitele považovat za jakousi slepou uličku celého cyklu (Pícha, 2013).

Na rozdíl od ostatních krev-sajících ektoparazitních členovců mají klíšťa schopnost zůstat přichycena ke kůži hostitele i po několik dní. Tato strategie je důležitá především pro přenos lymské boreliózy, a to kvůli transportu spirochet ze slinných žláz do hostitele, ke kterému dochází zpravidla až druhý den od přisátí. Protože však klíšťa musí čelit různým mechanickým vlivům a u toho zůstat pevně přichycena na místě, vyvinula si specifické ústní ústrojí; tzv. hypostom. Jedná se o dlátovitý útvar, na němž jsou drobné zoubky a výběžky obrácené dozadu pro lepší přichycení v kůži. Jako druhou část ústního ústrojí lze považovat chelicery, které slouží primárně k sekání a přidržování se, avšak mohou napomoci průniku hypostomu do pokožky. Během krmení zůstává klíště

na místě díky specifické substanci podobné cementu, která je vylučována slinnými žlázami. Tato látka poskytuje pasivní přichycení a zároveň zabraňuje reverzibilitě při průniku do kůže hostitele. U druhu *Ixodes ricinus*, přenášejícího lymfskou boreliózu v Evropě, se ale zdá, že tato látka není přítomna a uvažuje se spíše o vyšší adaptaci samotného hypostomu a chelicer k přichycení (Richter & kol., 2013).



Obrázek č. 4: Pohled na ústní ústrojí larvy klíštěte *Ixodes ricinus*, foceně konfokálním mikroskopem (převzato z Richter & kol., 2013)

A: larva klíštěte *Ixodes ricinus*, B: ústní ústrojí klíštěte *Ixodes ricinus*, p: pedipalpy, bc: bazální capitulum, cd: chelicerální výběžky, hy: hypostom

Ve slinách klíštěte lze nalézt i látky tišící bolest, bránící srážení krve (konkrétně enzym ixodin), dále látky k uzavírání krevních kapilár a k potlačení lokální imunity (Bolehovská, 2009).

Pro uskladnění nasáté krve mají klíšťata modifikované trávicí ústrojí a vyvinuté postranní laloky. Protože se spirochety borelie nachází nejčastěji ve střevě, dochází při sání krve k jejich množení, snížení pH a zvýšení teploty, čímž dojde ke zvýšení exprese OspC a snížení OspA. Tento proces pak umožňuje spirochetám, aby se uvolnily ze stěny epitelu střeva a dostaly se cca po 24 hodinách endolymfou do slinných žláz, kde dochází k dalšímu pomnožení. Následuje proces zahuštění krve hostitele v těle klíštěte, které následně vrací přebytečnou vodu společně s boreliemi zpět do hostitele. K dalšímu pomnožení dochází v místě průniku hypostomu do pokožky, odkud se spirochety na krátkou dobu dostanou do krevního oběhu a putují dále do těla, což jim umožňuje napadat další tkáň. I když jsou borelie extracelulární bakterie, byl prokázán průnik do buněk, které jim poskytují ochranu před imunitním systémem hostitele. Vstup byl pozorován u fibroblastů, endotelových buněk a monocytů makrofágového původu. Borelie jsou schopny průniku hematoencefalitickou bariérou a vázat se na gliové a mozkové buňky. Jakmile se borelie

dostanou do těla hostitele, dojde k přetrvávající, avšak často asymptomatické infekci (Bolehovská, 2009; Pícha, 2013).

1.3.3 Příznaky a stadia

Pro kontrolu *B. burgdorferi* v těle hostitele hraje významnou roli specifická (získaná) i nespecifická (vrozená) imunita. Ještě před objevem TLRs (toll-like receptors) směřoval výzkum imunologů především na specifickou imunitu. S objevem TLRs však byla pozornost zaměřena i na imunitu nespecifickou, a to hlavně na její buňky, tedy neutrofily a makrofágy, které slouží jako spouštěcí mechanismy zánětlivé reakce a v boji proti boreliím hrají nezastupitelnou roli (Shin, 2014).

S infekcí lymskou boreliózou jsou spojovány čtyři druhy, a to *Borrelia burgdorferi* s.s., *Borrelia garinii*, *Borrelia azfeli* a *Borrelia spielmanii*. Z těchto druhů se všechny nachází na území Evropy, kdežto v USA pouze *B. burgdorferi sensu stricto*. Průměrná doba životního cyklu klíštěte bývá mezi jedním až třemi lety, a zahrnuje čtyři vývojová stadia: vajíčko, larvu, nymfu a dospělce. Klíšťata mohou být infikována ve všech těchto stadiích, i když za hlavní přenašeče *B. burgdorferi* byly označeny nymfy a dospělci (Santos & kol., 2010).

V roce 1989, Steere a kolektiv rozdělil nákazu lymskou boreliózou do třech hlavních stadií; první fáze (akutní fáze) s převládajícími kožními lézemi, druhé fáze s kloubními, neurologickými, srdečními a očními manifestacemi a třetí fáze s chronickými revmatoidními, neurologickými, očními a kloubními projevy. I přes tato rozdělení je možné pozorovat klinické manifestace různých stadií současně. Po prvním stadiu se druhé dostavuje během několika dnů či týdnů a třetí až s odstupem několika měsíců až let (Steere & kol., 2004).

Erythema migrans

Hlavní manifestací v rané fázi infekce je *erythema migrans* (EM), která je hlášena u 60–83 % případů (Santos & kol., 2010). EM je červená skvrna kruhovitěho nebo oválného tvaru, jejíž velikost se pohybuje od pěti do několika desítek centimetrů (viz Obrázek č. 5). Ta se postupně zvětšuje a dále rozšiřuje po infikované tkáni. Pro tuto lézi je typická bledší část v centru a okrajový světle červený lem, jehož přítomnost však není vždy pozorována. EM se zpravidla vyskytuje solitérně kdekoli na těle (Hercogová, 2013).



Obrázek č. 5: *Erythema migrans* (foto: James Gathany, CDC)

Klinicky jsou rozlišovány tři typy *erythema migrans*: anulární, homogenní a terčovitá (irisová). Forma anulární je typická jasně rudým lemem, který se postupně šíří do okolí. Protože se tato léze hojí od centrální části, objevuje se typická světlejší část (výbled). Povrch této léze je hladký. Typ homogenní se od anulární liší trvale zarudlým centrem. Tento typ léze se v některých případech šíří do okolí, jindy ale může zůstat nezměněný. Povrch je jako u anulárního typu hladký. Třetí, terčovitý neboli irisový typ je koncentrický, často se jedná o více než jeden kruh se společným středem a mezikružím různých barev – světle či tmavě rudé nebo v barvě kůže (Hercogová, 2013).

První časné lokalizované stadium

První stadium (early localized infection, primary Lyme disease) začíná asi po 3–32 denní inkubační době jako lokální kožní léze – *erythema migrans*, která se pomalu rozšiřuje. Může být však doprovázena dalšími nespecifickými příznaky napodobujícími chřipkové onemocnění. Infikovaný jedinec může pociťovat únavu až vyčerpanost, bolest kloubů, bolest svalů a hlavy, horečku, zatuhnutou šíji a v menším procentu případů nevolnost nebo závratě (Gern & Falco, 2000). U většiny pacientů dochází k první imunitní reakci v místě vniku spirochet do kůže. Dle histologického vyšetření je tkáň, na které je

přítomna *erythema migrans*, hustě infiltrována lymfocyty, makrofágy a malým množstvím plazmatických buněk. Mezi první reakce imunitního systému patří pohlcení a usmrcení spirochet makrofágy. V oblasti léze začínají jednojaderné buňky produkovat prozánětlivé cytokiny (TNF- α a IFN- γ) a během několika dní od infekce je u většiny pacientů patrná imunitní odpověď IgM proti OspC nebo proti 41-kDa flagelinovému proteinu spirochet. Je tedy zřejmé, že v boji proti infekci se podílí vrozená i adaptivní imunita (Steere & kol., 2004). V některých případech byly pozorovány další kožní manifestace nebo nově vytvořené léze EM, které jsou způsobeny krevním nebo lymfatickým rozšířením spirochet. Tyto léze se mohou objevit s primární lézí nebo až po jejím vymizení, které je zpravidla samovolné (Santos & kol., 2010). Protože jsou borelie schopné snížit expresi OspC a pozměnit antigenní vlastnosti proteinu VlsE (Vmp-like sequence protein Expressed), daří se jim za pomoci této strategie unikat reakci imunitního systému a nadále se šířit ve tkáních hostitele (Stanek & kol., 2012).

Druhé časné diseminované stadium

Druhé stadium (early disseminated infection, secondary Lyme disease) nastupuje do několika týdnů od prvního a průměrně trvá od čtyř do šesti měsíců. Je pro něj charakteristické systémové šíření a neurologické příznaky, jako je například bolest hlavy, závrať, ztuhlost šíje, poruchy hybnosti či poměrně často hlášena obrna lícního nervu. Lymfská artritida postihuje spíše malé klouby, dále způsobuje zánět šlach (tendinitida) a svalů (myozitida). Hlášené byly i různé arytmie, karditidy, dušnost, zánět spojivek či otok očních víček. U dětí byl pozorován tzv. boreliový lymfocytom charakteristický nafialovělými uzlíky nejčastěji lokalizovanými na ušních lalůčkách, nosu, prsních bradavkách nebo šourku (Bolehovská, 2009). V tomto stadiu byly spirochety získány z mozkomíšního moku, krve a v malém množství i ze srdeční svaloviny, sítnice, svalů, kostí, sleziny, jater, mozkových plen a mozku (Duray & Steere, 1988). Pozorovány byly i sekundární kožní léze, akutní meningitida, zánět míšních kořenů, zánět periferních nervů, silné bolesti kloubů, šlach a kostí, atd. (Steere & kol., 2004).

Třetí pozdní/chronické stadium

Za třetí stadium (chronic/persistent/late infection, tertiary Lyme disease) je označována škála příznaků, trvajících déle než 6 měsíců (Widhe & kol., 2004), které se objevují i po adekvátní antibiotické terapii. Hlavními symptomy jsou chronická únava,

muskuloskeletální bolest, bolesti hlavy, ospalost, podrážděnost a kognitivní poruchy (ztráta paměti, problémy se soustředěním, atd.). Jako nejmarkantnější se ve spojitosti s pozdním stadiem lymské boreliózy označuje právě únava, často diagnostikována jako chronický únavový syndrom (CFS; chronic fatigue syndrome), která bývá pacienty popisována jako velmi hluboká a extrémně vysilující. Důvod, proč přechází lymská borelióza do chronicity i po předešlé antibiotické léčbě, není doposud zcela objasněn, i když bylo na toto téma provedeno několik studií. Někteří autoři se domnívají, že opakující se klinické manifestace jsou zapříčiněny zánětlivými a autoimunitními jevy, které spouští přetrvávající infekce, tedy ne přítomnost infekčního agens, jako je tomu u syfilidy. Tímto by se také dalo vysvětlit, proč pacienti s chronickou lymskou boreliózou neodpovídají na antibiotickou léčbu (Santos & kol., 2010).

Postboreliový syndrom

U malého procenta pacientů byl i po antibiotické léčbě pozorován tzv. postboreliový syndrom, označovaný také jako PTLDS (Post-treatment Lyme Disease Syndrome). Tento soubor příznaků činí značné problémy při diagnostice onemocnění a byl popsán u séropozitivních i séronegativních osob. Příznaky nemocných jsou podobné těm, které se objevují u třetího stadia onemocnění lymskou boreliózou – tedy únava, bolesti svalů a kloubů, parestzie, poruchy paměti a nálad. Protože se jedná o symptomy podobné například únavovému syndromu či fibromyalgii, správné diagnózy nebývá často vůbec dosaženo. Dlouhodobá léčba, kterou pacienti často vyžadují, byla prokázána jako neefektivní a zbytečná – viz kapitola 1.5.2 (Valešová, 2013). Podle některých studií byly příznaky postboreliového syndromu na základě závažnosti označeny jako srovnatelné s roztroušenou sklerózou nebo srdečním selháním (DeLong & kol., 2012).

Lymská borelióza a gravidita

Od doby, co byla lymská borelióza poprvé popsána se objevovaly obavy týkající se průniku *B. burgdorferi* skrz placentu a možných nepříznivých vlivů na vývoj plodu či dokonce jeho smrt, jako je tomu u nemocí způsobených jinými spirochetami (Alexander & Cox, 1995). Přenos na plod byl pozorován v rámci studií u zvířat, u kterých byla kultivace za pomoci PCR z tkání plodu u různých zvířat (myši, psů a koní) pozitivní. Některé tyto studie spojovaly ztráty plodu právě v souvislosti s nákazou *B. burgdorferi* (Calda, 2013).

U člověka byl rovněž pozorován transplacentární přenos, poprvé zaznamenaný Schlesingerem a kolektivem (1985), kdy byly spirochety nalezeny v několika orgánových

soustavách u novorozence, který zemřel krátce po porodu na selhání srdce. U matky byla v prvním trimestru těhotenství pozorována *erythema migrans*, bolesti hlavy, ztuhlá šíje, bolesti kloubů, nevolnost a inguinální lymfadenopatie – tedy příznaky typické pro první stadium lymské boreliózy. Protože symptomy po několika týdnech samy vymizely, nebyla nasazena antibiotická léčba. Pozdější pitva novorozence prokázala přítomnost spirochet ve slezině, ledvinách a kostní dřeni. Dítě mělo několik kardiovaskulárních abnormalit, nicméně v srdci spirochety nalezeny nebyly. Proto není zcela jasné, jestli za smrt novorozence opravdu mohla transplacentární nákaza lymskou boreliózou nebo vrozená vada.

Po tomto zjištění následovala série podobných popsanych případů, které sice potvrzují, že transplacentární přenos borelií je možný, nicméně nelze jej považovat za příčinu smrti plodu. V jedné ze studií, ze 17 sledovaných žen, které byly během prvního trimestru nakaženy lymskou boreliózou, pouze u dvou byly pozorovány abnormality; jeden přirozený potrat a jedno dítě se syndaktylií. Ani jeden z těchto případů však nemůže být připisován infekci lymskou boreliózou (Alexander & Cox, 1995). Následovalo testování pupečnickové krve u 463 novorozenců, kdy 282 bylo z endemických oblastí výskytu klíšťat a 181 z non-endemických. Ze získaných výsledků opět nebylo možné prokázat žádné možné spojení mezi přítomností protilátek a vrozenými malformacemi (Williams & kol., 1988). Významných výsledků dosáhl Strobino & kol. (1993), který sledoval přes 2 000 žen v endemické oblasti, a pozitivní sérologii k lymské borelióze našel u 7,1 % žen. Jako v předchozích studiích však nebyla potvrzena žádná korelace mezi nákazou a vrozenými malformacemi. Kromě toho nebylo sledováno zvýšené riziko smrti plodu, nižší porodní hmotnost, atd. i přes pozitivní sérologii. Autoři všech studií však považují výsledky za neprůkazné kvůli příliš malému vzorku případů (Alexander & Cox, 1995).

V konečném důsledku tedy souvislost mezi transplacentárním přenosem lymské boreliózy z nakažené matky na plod byla prokázána, avšak přímý vliv na abnormality nebo smrt novorozenců nebyl potvrzen u zvířat ani u lidí (Elliott & kol., 2001).

Žena s potvrzenou infekcí lymskou boreliózou by měla být v péči praktického či ošetřujícího lékaře, který by měl sledovat průběh onemocnění a úspěšnost antibiotické terapie, popřípadě i symptomatickou léčbu. Toto sledování by mělo být doplněno pravidelnými ultrazvukovými vyšetřeními, která by odhalila případné malformace plodu (Calda, 2013).

1.4 Laboratorní diagnostika

Protože je lymská borelióza multisystémové onemocnění s často nespecifickými příznaky, diagnostika je mnohdy obtížná (Bolehovská & kol., 2009). K diagnostice se využívá několika přímých a nepřímých metod, které se zpravidla volí podle příznaků. Testovaná může být celá škála tělesných tekutin a tkání – odebrat se může cerebrospinální tekutina v případě podezření na neuroboreliózu, synoviální tekutina u projevů artritidy a v některých případech, u kterých se vyskytuje EM nebo ACA, lze přistoupit k provedení biopsie kůže. Vzorky lze odebrat i z dalších tkání, nicméně nejčastější metodou zůstává stále sérologie testující vzorek séra nemocného a prokazující přítomnost specifických protilátek (Brouqui & kol., 2004). Brzká diagnostika lymské boreliózy je důležitá kvůli včasnému zahájení antibiotické léčby, bez které mnohdy vstupuje do chronicity. Alarmující by pro okamžité testování měla být *erythema migrans* nebo jeden z výše uvedených příznaků následující po přisátí klíštěte, který uvádí okolo 60 % nemocných (Bolehovská & kol., 2009).

Využití sérologie je však limitující, protože některé titry sérových protilátek jsou detekovatelné až týdny po infekci a dokonce nemusí být nikdy pozitivní (Pleyer & kol., 2001). Pro průkaz infekce lymskou boreliózou se využívá hlavně sérologická detekce imunoglobulinů, což jsou proteiny, které jsou schopné vázat antigeny. Imunoglobuliny třídy M (IgM) jsou při spuštění specifické imunitní reakce vytvářeny jako první a jsou pozitivní v případě akutního vystavení patogenu – svědčí tedy o aktivně probíhající infekci. Oporoti tomu IgG se vytváří později a v krvi se objevují 2–3 týdny od propuknutí nákazy – jsou indikátory již prodělané nebo chronické infekce (Schroeder & Cavacini, 2010).

Protože se stále častěji přistupuje k detekci *B. burgdorferi* pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), mnoho studií prokázalo boreliální DNA v klinických vzorcích se sensitivitou mezi 20 až 100 %. Laboratorní diagnostika může být rozdělena na přímé metody detekce *B. burgdorferi* a nepřímé metody, které detekují imunitní odpověď proti boreliím (Pleyer & kol., 2001).

U všech stadií lymské boreliózy bývá krevní obraz v normě, zánětlivé markery zůstávají nízké, ve výjimečných případech byla pozorována lehká hepatopatie parenchymatózního typu. V případě neuroboreliózy nebo jiného postižení nervové soustavy je v mozkomíšním moku patrný obraz aseptické neuroinfekce (Roháčová, 2012).

1.4.1 Přímé metody

Mezi přímé metody se řadí hlavně mikroskopické zjištění přítomnosti spirochet borelií, dále kultivace, polymerázová řetězová reakce (PCR) nebo DNA hybridizace (Bolehovská & kol., 2009).

K rychlému průkazu borelií se využívá základní světelné mikroskopie v zástinu. Tato metoda je finančně nenáročná a lze jí hodnotit míru infekce klíšťat ve všech vývojových stádiích (Hulínská, 2013b). Společně s mikroskopií temného pole nebo mikroskopií s fázovým kontrastem je však kvůli tenkému a transparentnímu tělu spirochet velmi limitovaná, a protože se k diagnostice přistupuje často až v době, kdy je borelií v krvi příliš malé množství, byla v posledních letech upřednostněna mikroskopie založená na dvoufázové optimalizované centrifugaci spirochet z krve nebo nakrmených klíšťat. Princip spočívá v pomalé dvojí centrifugaci krve (minimálně 9–10 ml) při rychlosti 500 g po dobu 5 minut, kdy dojde ke zbavení supernatantu od erytrocytů a většina spirochet tak zůstává v krevní plazmě. Následně se tato plazma přenesení do nové zkumavky, kde je odstředěna při 5 000 g po dobu 10 minut. Ze vzniklé pelety se vytvoří roztěr na podložní sklo, který se obarví Giemsovým barvivem (azur, metylénová modř a eosin rozpuštěný ve směsi glycerolu a metanolu s naředěním destilovanou vodou) a pozoruje pod tisícinásobným zvětšením. Užití fluorescenční mikroskopie k zobrazení je samozřejmě možné, ale finančně a nástrojově náročné, čímž se omezuje včasná diagnostika v oblastech bez špičkového laboratorního vybavení. Proto je mikroskopie dvoufázové optimalizované centrifugace obecně jakousi „zlatou střední cestou“ (Larsson & Bergström, 2008).

Přímá detekce z klinických vzorků nebo klíšťat prokazuje kultivací živé spirochety v organismu a k jejímu provedení se přistupuje při nutnosti potvrzení diagnózy po evidentně proběhnuté infekci nebo k průkazu přítomnosti borelií v kůži či orgánech. Borelie vyžadují vysoce nutričně obohacenou půdu (viz kapitola 1.2.3) a užívá se proto medií BSK II, BSK-H, atd. Po 1–14 dnech se provádí kultivace statická, prováděná modifikací růstového prostředí. Z tohoto důvodu se za 14 dní musí provádět kultivace v kontinuálních podmínkách nové půdy každé 4 dny. Růst bakterií ovlivňuje teplota, UV záření, pH prostředí, osmotický tlak a oxidoredukční potenciál (Hulínská, 2013b). Umístí-li se krev s boreliemi do prostředí s nižší teplotou (chladnička), dokáží žít až 9 dní (Hulínská & kol., 1993).

Velmi spolehlivými metodami pro detekci lymfské boreliózy jsou různé druhy polymerázové řetězové reakce (PCR). Protože koncentrace spirochet v krvi je mimo akutní

infekci nízká, je lepší využít bioptického vzorku kůže z EM, kde bývá nalezena 50–70% pozitivita, synoviální tekutiny z postižených kloubů (rovněž 50–70% pozitivita) nebo mozkomíšni mok, kde je však pozitivita značně nižší, a to 10–30 %. Některé pokusy *in vitro* prokazují možnost transformace borelií v mozkomíšním moku do cyst, kdy není možné kvůli ztrátě některých antigenů provést test ELISA a přistupuje se proto k metodě PCR, která je mimo jiné vhodná i pro potvrzení chronické boreliózy. Nejčastěji se využívá polymerázové řetězové reakce označované jako q-PCR (Real-time PCR, polymerázová řetězová reakce v reálném čase), která umožňuje detekci a určení množství DNA borelií ze synoviální tekutiny, mozkomíšního moku nebo z krve pomocí specifické teploty. Po antibiotické terapii je většina pacientů PCR negativní (Gurčík, 2009).

Mezi molekulární metody řadíme ještě DNA hybridizaci, která funguje na principu detekce nukleových kyselin díky vazbě zhotovené próby, které jsou komplementární k určité nukleové kyselině. Pro tuto metodu je potřebná znalost sekvence DNA a izolace nukleové kyseliny (Hulínková, 2013b).

1.4.2 Nepřímé metody

Nepřímé metody zjišťují imunitní odpověď hostitele proti infekčnímu agens. Většina laboratorních testů, které se provádí pro zjištění lymfské boreliózy, je založena na detekci protilátek proti *B. burgdorferi* v séru. Jedná se například o test ELISA, Western-blot či nepřímou imunofluorescenční analýzu (Marques, 2015).

Problémem testování pomocí nepřímých metod je množství imunogenních lipidů, proteinů, lipoproteinů a karbohydrátových antigenů přítomných na povrchu, vnější membráně ale i v cytoplazmě těla *B. burgdorferi*. Tyto antigeny nabízí širokou škálu „terčů“ pro imunoserologické testy (Reed, 2002). Mezi hlavní antigeny se řadí povrchové proteiny (především OspA, OspB, OspC), protein flagellin obsažený v bičíku borelie a proteiny teplotního šoku (Dressler & kol., 1994). I když *B. burgdorferi* s.l. obecně exprimuje podobné antigeny, objevují se u nich podstatné rozdíly, které komplikují vývoj jediného komplexního sérologického testu, který by byl vhodný pro všechny druhy borelií (Reed, 2002). Protože testy ELISA jsou ve většině případů reaktivní proti všem těmto antigenům, může dojít ke zkřížené reaktivitě, která byla pozorována např. se spirochetami *Treponema pallidum*. Podobná situace ale nastala i s bakteriemi *Escherichia coli*, či s Epstein-Barr virem (Hulínková, 2013b). Obecně je imunitní reakce proti *B. burgdorferi* zahájena během prvních několika týdnů po infekci, s objevením specifických protilátek –

imunoglobulinů M (IgM). Tyto protilátky mohou v krvi přetrvávat až měsíce i přes antimikrobiální léčbu, proto nemůže být přítomnost IgM považována za jediné kritérium k diagnostice proběhnuté infekce. Většina pacientů bude mít detekovatelné imunoglobuliny G (IgG) cca měsíc po aktivní infekci. Tyto protilátky, stejně jako IgM, mohou přetrvat i roky po vymizení příznaků a oba antigeny mohou být po antimikrobiální terapii značně redukovány nebo zcela chybět, pokud je léčba zahájena hned v počátcích aktivní infekce (Reed, 2002).

Stanovení protilátek proti boreliím v séru či mozkomíšním moku metodou ELISA patří mezi nejběžnější metody s vysokou senzitivitou avšak nízkou specificitou vzhledem k vysoké séroprevalenci (10–20 % dospělé populace). Kvůli zkřížené reaktivitě a výskytu séronegativních forem se mohou pojit s určením špatné diagnózy (Gurčík, 2009). Pokud je pacient testován v počáteční fázi onemocnění, tedy v době časně lokalizované infekce, séropozitivita specifických protilátek se pohybuje mezi 20–50 %, v časném diseminovaném stadiu se zvyšuje na 70–90 % a 100 % v pozdním neboli chronickém stadiu (Wilske & kol., 2006). I zde platí, že se první vytvoří protilátky třídy IgM, a to zpravidla do 3–6 týdnů od začátku infekce, které mohou přetrvávat měsíce i roky. Bez přítomnosti klinických příznaků však tyto protilátky nejsou důvodem pro indikaci antibiotické léčby (Gurčík, 2009).

Potvrzovacím testem po pozitivním testu ELISA se často přistupuje k provedení metody Western-blotu (imunoblotu), který by měl mít velmi vysokou specificitu – až 95 % (Wilske & kol., 2006). Western-blot je využíván taky v případě, kdy není jisté, zda pacient opravdu trpí lymskou boreliózou nebo dojde-li k rozporuplným výsledkům během testování základními sérologickými metodami. Funguje na principu analýzy reakce protilátek proti různým proteinovým antigenům borelií nebo detekce rekombinačních antigenů. Tím si zaručuje mnohem přesnější výsledky, než kterými disponuje test ELISA s nízkou specificitou. Western-blot se v Evropě provádí s lyzáty nebo s rekombinantními antigeny *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* a *B. garinii* (Gurčík, 2009). Kritéria pro imunoblot, která jsou vydávána CDC, mohou být aplikována jen v USA a nejsou uplatnitelná na evropské pacienty (Wilske & kol., 2006). Dle výzkumu Dresslera a kolektivu (1994) se mnohou evropskými pacienty nakazit lymskou boreliózou od všech patogenních skupin spirochety *B. Burgdorferi* ale infikující kmen zpravidla není znám. Navíc se zdá, že protilátková odpověď je oproti USA značně omezená a nelze opomenout také fakt, že subklinický průběh nemoci je v Evropě mnohem častější. Kombinací všech těchto faktorů

je zřejmé, že sensitivita i specificita sérodiagnostických testů lymské boreliózy je v Evropě podstatně nižší.

Nepřímá imunofluorescenční analýza je pak využívána jen velmi zřídka pro detekci lidských IgG protilátek vůči antigenům *B. burgdorferi* (Hejnar, 2001).

1.5 Prevence a léčba

1.5.1 Prevence

Nejlepší prevencí proti potenciální nákaze lymskou boreliózou je pochopitelně vyvarování se klíšťatům. Pro lidi, kteří často navštěvují místa s vysokým výskytem klíšťat, existuje několik jednoduchých opatření, která eliminují nebo alespoň snižují riziko kontaktu s tímto roztočem. Obecně se doporučuje nosit dlouhé kalhoty, volit světlou barvu oděvu pro snazší detekci klíštěte a užívat repelent (Clark & Hu, 2008).

Právě repelenty mají v mnoha případech nezastupitelnou roli. Běžně dostupné širokospektré prostředky obsahující DEET (N,N-diethyl-3-methylbenzamid) jsou v současnosti nejefektivnější pro lidi i zvířata. Následují přípravky s picaridinem (KBR 3023) a piperidinem. Obě tyto substance mají hodinu od aplikace efektivitu nad 85 %, po dvou, třech a čtyřech hodinách je efektivita DEET 84 %, 68 % a 71 %. Oproti tomu KBR 3023 dosahuje podstatně nižších hodnot; 56 %, 55 % a 54 %. Obecně je tedy vhodné aplikaci zhruba po hodině od poslední dávky znovu opakovat (Pretorius & kol., 2003). Na trhu jsou dostupné repelenty DEET s 5–100% koncentrací, přičemž platí, že čím vyšší koncentrace, tím delší dobu je člověk chráněn a doba ochrany může při těch nejvyšších dosáhnout až 12 hodin. Účinnost je snižována stykem kůže s vodou, pocením a jinými faktory prostředí (Salafsky & kol., 2000). Nevýhodou DEET je možné slabé zdravotní riziko u dětí, je-li přípravek použit ve vysokých koncentracích, a dále riziko poškození různých plastových a syntetických povrchů. Další repelentní prostředky na přírodní bázi, obsahující česnek, eukalyptový olej nebo výtažky z voňatky citrónové (*Cymbopogon citratus*) byly testovány pouze proti komárům a mají prokazatelně nižší účinnost oproti DEET i picaridinu (Clark, 2008).

Za druh repelentu lze považovat i některé insekticidy či akaricidy, které, pokud jsou aplikovány na oblečení, mohou také poskytovat určitou ochranu. Permethrin, který se běžně užívá k odlišování u lidí, se může aplikovat na oděv či na moskytiéry a slouží jako účinná ochrana před komáry i klíšťaty (Evans & kol., 1990).

Pokud dojde k selhání repelentu i ostatních prostředků, velký význam v prevenci má i běžná denní vizuální kontrola. Je-li totiž klišť odstraněno do cca 36 hodin od přisátí, riziko přenosu borelií do těla hostitele se kvůli dlouhé době transmise minimalizuje (Clark, 2008).

1.5.2 Léčba

Léčba lymské boreliózy není ani v současné době snadným úkolem, hlavně z důvodu nespecifických klinických příznaků, ale i kvůli nedostatku standardizovaných sérologických testů a přímých detekčních metod. Obecně lze říci, že antibiotická léčba je účinná ve všech stadiích nemoci a pro všechny klinické manifestace, nicméně nejefektivnější je v počátcích onemocnění. Volba nejvhodnějších antibiotik závisí na několika faktorech, hlavně na účinnosti, farmakokinetických procesech, vedlejších účincích a ceně. Nejefektivnější antibiotika, optimální dávka ani přesná délka léčby nebyla stanovena pro žádnou z klinických manifestací (Stanek & kol., 2002).

V posledních letech byl zaznamenán trend dlouhotrvajících léceb antibiotiky, které bývají ordinovány z důvodu přetrvávajících klinických příznaků u pacientů se sérologicky pozitivními ale i negativními protilátkami proti *Borrelia burgdorferi*. Kazuistiky a nekontrolované studie popisují úspěšnost dlouhotrvající antibiotické léčby s častým návratem příznaků po jejím ukončení. Protože však byla zaznamenána značná morbidita a dokonce i úmrtí v souvislosti s tímto léčebným přístupem, bylo provedeno několik šetření, která potvrdila, že standardní délka léčení odpovídá výsledkům dlouhodobého užívání antibiotik a je tak dostačující (Klempner & kol., 2001). Antibiotickou léčbu je možné doplňovat symptomatickou terapií, obzvlášť je nutné pokusit se ztlumit bolesti související se zánětem struktur pohybového aparátu. Podávají se proto nejčastěji nesteroidní antirevmatika (ibuprofen, diklofenak, ketoprofen, atp.) popřípadě analgetika. Samotný důvod přetrvávajících symptomů nebyl dosud určen (Stanek & kol., 2002; Valešová, 2013)

Léčba bývá delší než u jiných onemocnění (až 2 týdny), a to hlavně kvůli dlouhé generační době borelií. Nejlepších výsledků dosahují betalaktamové a tetracyklinové preparáty (Křupka & kol., 2014). U dospělých se, v případě prvního a druhého stadia lymské boreliózy s přítomností EM ale bez neurologických problémů, nasazuje léčba doxycyklinem 100 mg dvakrát denně, dále amoxicillinem 500 mg třikrát denně nebo cefuroxim axetilem 500 mg dvakrát denně, vše po dobu dvou až tří týdnů (Wormser &

kol., 2011). Doxycyklin ale není vhodný pro děti do osmi let ani pro gravidní či kojící ženy. V tomto případě se doporučuje podávání amoxicilinu – ten ale nemusí být vždy dobře snášen a jako substituce se podává cefuroxim axetil, jehož nevýhodou je ale oproti předchozím preparátům vyšší pořizovací cena. Jsou-li všechny tyto možnosti vyčerpány, přistupuje se k léčbě makrolidovými antibiotiky, tedy azitromycinem nebo klaritromycinem (Křupka & kol. 2014; Wormser & kol., 2000). V první fázi lymfské boreliózy jsou cefalosporinová antibiotika první generace neúčinná. Ceftriaxony, které je možné podat pouze intravenózně za přítomnosti neurologických symptomů nebo po selhání léčby penicilinem, jakými může být meningitida nebo poškození nervů, se mohou podávat i dětem se stejnými příznaky, a to ještě v kombinaci s penicilinem (Wormser & kol., 2006). Právě ceftriaxon je kvůli dlouhému poločasu rozpadu udržován v krvi déle než ostatní antibiotika a snadněji se tak dostává do centrální nervové soustavy (Dattwyler & kol., 1987).

1.6 Epidemiologie

Hlavními rezervoáry *B. burgdorferi* jsou v Evropě hlodavci (především *Muridae* a *Sciuridae*), hmyzožravci (*Soricidae*, *Erinaceidae*), zajícovití (*Leporidae*) a ptactvo (Lindgren & Jaenson, 2006). Larvy, nymfy i dospělce lze nalézt na vrcholu stébel trav, často v pozici s rozevřeným ústním ústrojím a prvním párem kráčivých končetin pro snazší uchopení procházejícího hostitele. Jakmile se klíště zachytí na hostiteli, vyhledá ideální místo pro přísátí, kterým bývá zpravidla oblast hlavy či genitálií. Samotný proces průniku ústního ústrojí do kůže trvá okolo deseti minut (Cook, 2015).

Výskyt lymfské boreliózy ve světě přímo souvisí s rozšířením hlavního vektoru – klíštěte. V Evropě je možné najít primární přenašeče, klíšťata *Ixodes ricinus* a *Ixodes persulcatus*, v pobřežních oblastech Baltského moře, dále směrem na jih do celé střední Evropy až k Tichému oceánu. *Ixodes persulcatus* je více flexibilní a méně citlivé k hydrotermálním změnám prostředí než *Ixodes ricinus* (Lindgren & Jaenson, 2006). Studie prováděné v Pobaltí prokázaly, že 11,5 % klíšťat *Ixodes ricinus* bylo přenašeči *B. burgdorferi*, kdežto u *Ixodes persulcatus* bylo naměřeno až 26,3 % . I když za přenašeče *B. burgdorferi* bylo označeno více druhů klíšťat, nebylo prokázáno, že jsou zároveň schopny infikovat hostitele lymfskou boreliózou (Alekseev & kol., 2001; Lindgren & Jaenson, 2006).

Sezónní klimatické podmínky a s nimi související zeměpisná šířka a nadmořská výška značně limitují rozšíření klíšťat v Evropě. Vzhledem k tomu, že se tyto faktory v posledních letech podstatně změnily, je možné klíšťata nalézt hojně v oblastech do 1 100 m n. m. v České republice, do 1 300 m n. m. v italských Alpách a podél pobřeží Baltského moře do 65° s. š. Ve velkých nadmořských výškách, kde bývá klima pro přežití těchto členovců příliš drsné, je možné nalézt drobné klíštěcí populace, které žijí v místech, které jsou modelovány tvarem reliéfu a mohou tak nabídnout mírnější podmínky (vyšší teplotu, dostatek vlhkosti) – jedná se o oblasti koryt řek, okolo jezer a právě podél pobřeží, kde nejsou změny podnebí oproti vnitrozemským oblastem tak markantní (Lindgren & Jaenson, 2006).

Počet případů nakažených lymskou boreliózou ve světě od roku 1990 logicky stoupá a rozšiřuje se i areál výskytu vektorů. Tento nárůst v počtu diagnostikovaných lze spojovat s vyšší kvalitou diagnostických testů a celkovým povědomím o této nemoci. Nelze ale opomenout změny klimatu během posledních let a se souvisejícím oteplováním i vyšší výskyt klíšťat. V Evropě je za rok nahlášeno průměrně 85 000 případů, nicméně toto číslo je zapotřebí brát s nadhledem, protože mnoho infekcí není kvůli častým asymptomatickým nákazám vůbec diagnostikováno nebo naopak, dochází často k falešně pozitivním výsledkům. Problematickým je rovněž monitorování celé situace výskytu lymské boreliózy. Zatímco některé státy pravidelně hlásí nové případy, jiné nehlásí vůbec nebo pouze některé případy v pozdních stadiích. Přitom je důkladné sledování a hlášení této nemoci povinné a velmi důležité, avšak mnohé státy si neuvědomují zdravotní rizika související s chronickými stadii a postboreliovým syndromem (Sykes, 2014).

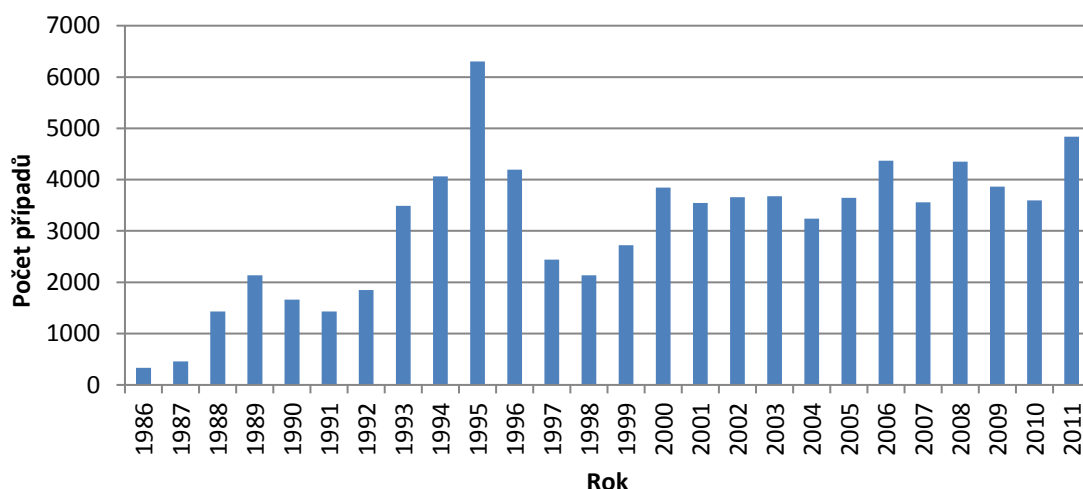
Nejrizikovějšími skupinami, co se týče výskytu onemocnění, jsou především lidé pohybující se v zalesněných oblastech – tedy dřevorubci, myslivci, lesníci, hajní a farmáři. Zvláštní skupinou silně ohroženou nákazou lymskou boreliózou je pozemní vojsko, což vyplývá z pravidelného kontrolování protilátek v krvi (Santino & kol., 1997). Některé rekreační aktivity, jakými jsou například orientační běh, lov a zahradničení také zvyšují riziko styku s klíšťaty. Nejvyšší sezónní aktivity klíšťat se liší podle regionu výskytu, přičemž denní doba nehraje v jejich aktivitě žádnou roli (Lindgren & Jaenson 2006; Mejlom, 1997).

Epidemiologická situace v ČR

Česká republika, patřící do mírného pásu, je svými klimatickými podmínkami, biotopy a celkovým geografickým charakterem velmi příznivá pro výskyt nejčastějšího vektoru lymské boreliózy v Evropě – klíštěte *Ixodes ricinus*. Absolutní počty nakažených lymskou boreliózou na území ČR se, stejně jako v celém světě, postupně zvyšují díky lepší diagnostice a povědomosti o onemocnění (Janovská, 2013).

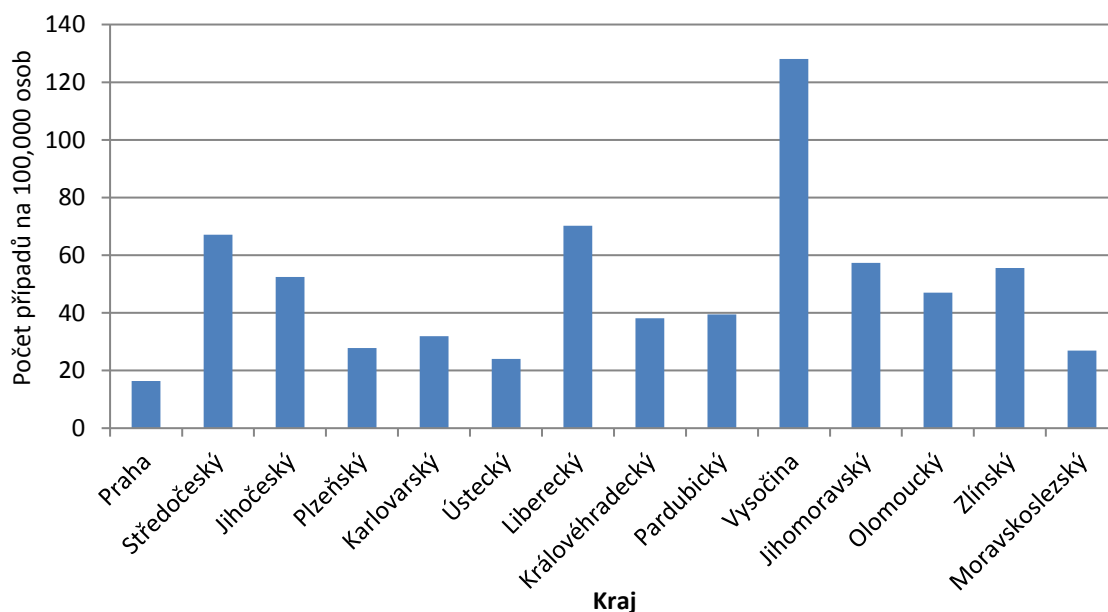
Od roku 1986 do roku 2011 bylo nahlášeno celkem 80 841 případů (viz Graf č. 1). Počátek v roce 1986 je zapříčiněn zavedením sérologické diagnostiky v tehdejší Československu, kdy se začínalo s nespecifickým antigenem *Borrelia recurrentis*, který byl od roku 1990 nahrazen specifickým antigenem *Borrelia burgdorferi sensu lato*, využívaným dodnes. Pozvolnou fluktuaci hodnot střídá prudký nárůst v letech 1993 a 1994 s kulminací v roce 1995, způsobený zvýšeným výskytem klíšťat během těchto tří let. Incidence v České republice byla v roce 1995 61,2/100 000 obyvatel. Následují roky střídání maxima a minima nemoci, avšak trend je obecně vzestupný. Značný pokles je vidět u roku 1998, kde bylo hlášeno poměrně malé množství případů (2 138), což je markantní rozdíl oproti roku 1995 s 6 302 případy. Od roku 1999 počty opět stoupají a maxima vrcholí v roce 2000, kdy bylo infikováno 37,45/100 000 osob. Během několika následujících let jsou počty stabilní, mírný nárůst je možné pozorovat v letech 2006 a 2008. K roku 2011 je incidence 45,7/100 000 osob (Janovská, 2013).

Graf č. 1: Počet hlášených případů onemocnění lymskou boreliózou v České republice v letech 1986–2011 (podle Janovská, 2013).



Nejvyšší nemocnost je v ČR obecně zaznamenávána v červenci, díky trendu lidí ve vyhledávání teplých a suchých oblastí (s vysokým výskytem klíšťat) pro sportovní a společenské aktivity, avšak může docházet i k posunutí do podzimních až zimních měsíců. Důvodem tohoto posunu je poměrně dlouhá inkubační doba při nákaze (až 3 měsíce) a častý asymptomatický průběh, případně neurčité neurologické a kloubní projevy v pozdních stádiích infekce. Rozhodujícím faktorem je změna klimatických podmínek a taky rizikové chování osob v endemických oblastech (Kříž & Beneš, 2014; Kříž & Gašpárek, 2015).

Graf č. 2: Incidence lymské boreliózy v České republice podle krajů za rok 2011 (podle Janovská, 2013).



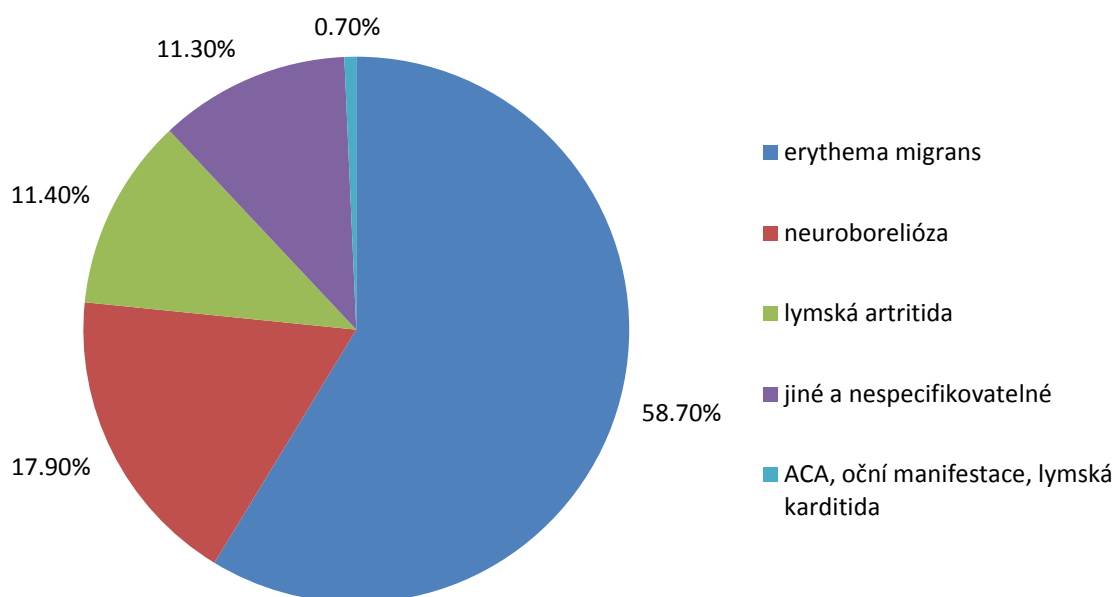
Nejvyšší incidence v jednotlivých krajích ČR dosahují kraje Vysočina se 128 případy na 100 000 obyvatel, Liberecký s 70,2/100 000 a Středočeský s 67,1 případem na 100 000 obyvatel. Důvodem tak vysokých čísel je pravděpodobně klimatická změna, která probíhá během posledních desetiletí. Ve všech těchto krajích bylo zaznamenáno zvyšování průměrné roční teploty o 1,5–1,7 % společně se zvýšením přísunu slunečního svitu na 116,2–118,9 % průměrného normálu. Roli hraje i změna půdního fondu, kdy začínají dominovat travnaté plochy a listnaté lesy. Incidenci v ostatních krajích lze vidět v Grafu č. 2 (Janovská, 2013).

Nejvíce postiženou věkovou kategorií jsou děti, s maximálním zastoupením mezi 5–9 lety, dále dospělí mezi 20–24 lety a starší 45 let. Je tomu tak pravděpodobně hlavně kvůli častějšímu pohybu, rekreačním aktivitám v přírodě a snaze o aktivní životný

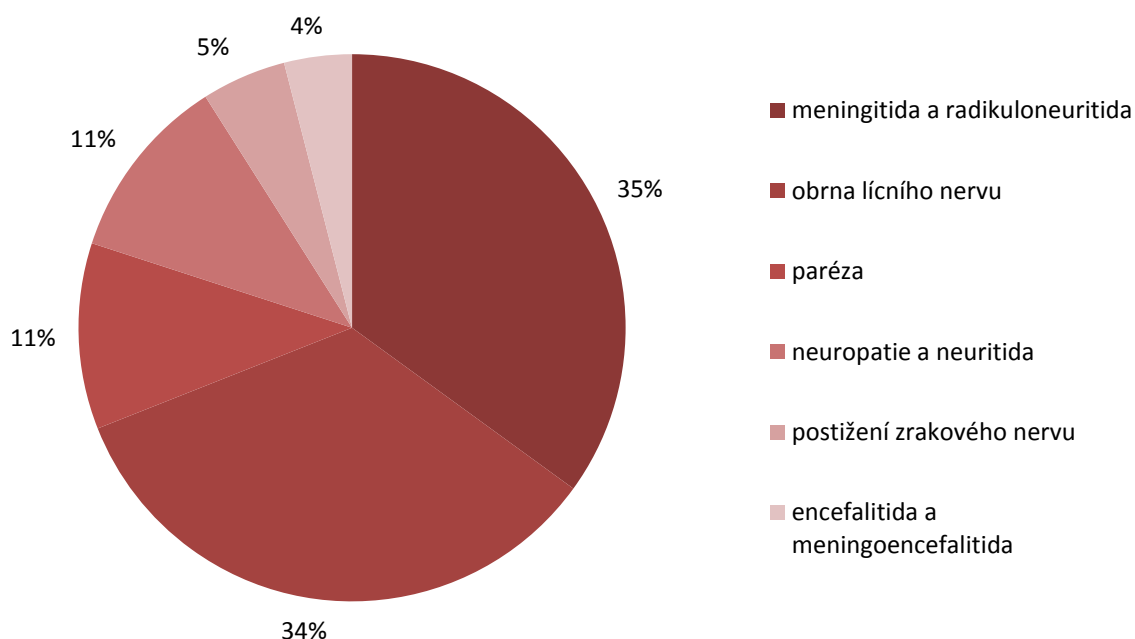
styl. Z hlediska pohlaví jsou více postihovány ženy (1,5x více než muži), opět ve věku nad 45 let. U dětí naopak převažuje vyšší incidence u chlapců mezi 5–14 lety. Na těchto datech se podílí rovněž prodlužování průměrné délky života a s tím související vyšší podíl starší věkové kategorie v populaci. Roli ovšem může hrát i větší zájem o zdravotní stav a různé preventivní programy šířící povědomost o lymské borelióze (Kříž & Beneš, 2014; Kříž & Gašpárek, 2015).

Z hlediska klinické manifestace je v ČR nejčastější výskyt EM (viz Graf č. 3). Data za rok 2014 uvádějí výsledky desetiletého výzkumu, kde byla EM pozorována u 59 % nakažených osob. Druhým nejčastěji pozorovaným příznakem jsou neurologické problémy (viz Graf č. 4) zaznamenané u cca 18 %. Třetími nejčastěji hlášenými symptomy jsou kloubní problémy a artritidy v 11,4 % a další (Kříž & Gašpárek, 2015).

Graf č. 3: Lymská borelióza v ČR podle klinických forem v letech 2002–2011 (podle Kříž & Gašpárek, 2015 a systému Epidat)



Graf č. 4: Podíl jednotlivých diagnóz neuroboreliózy v letech 2002–2011 (podle Kříž & Gašpárek, 2015 a systému Epidat)



1.7 Vakcíny

Vakcinace proti různým infekcím je vysoce efektivní metoda kontrolující šíření nemocí. Obecně slouží k ochraně proti přenosu vysoce nakažlivých chorob v lidské ale i zvířecí populaci. I když lymská borelióza není přenosná z člověka na člověka, na vývoji vakcíny se intenzivně pracuje, protože její šíření a následky se staly celosvětovým problémem veřejného zdraví (Embers & Narasimhan, 2013).

První pokusy o vývoj vakcíny započaly již v době, kdy byl pojmenován patogen lymské boreliózy (Johnson & kol., 1986). Po roce 1990 se pak výzkumy začaly soustředit hlavně na povrchové antigeny borelií a později vyšlo najevo, že ze dvou tehdy známých imunodominantních proteinů – OspA a flagellinu, pouze OspA dokáže vyvolat imunitu (Schaible & kol., 1990). Nyní už je známo, že vakcína založená na OspA působí poněkud nezvyklým způsobem – protože k expresi OspA dochází především v trávicím traktu klíštěte, protilátky tak působí mimo tělo vakcinovaného jedince. Krev, která obsahuje protilátky je nasána klíštětem a k inaktivaci spirochet borelií dojde v těle klíštěte ještě před přenesením na člověka. Aby vakcína tímto způsobem fungovala, je zapotřebí udržovat vysoký titr specifických protilátek, který ale postupně klesá pod účinnou hodnotu z důvodu

absence přímého kontaktu mezi imunitním systémem očkované osoby a borelií samotných (Křupka & kol., 2008).

Jako další možný adept pro vývoj vhodné vakcíny se ukázal povrchový protein OspC, objevený v roce 1992. Jeho účinnost byla testována na pískomilech infikovaných boreliemi, které *in vitro* vykazovaly vysokou expresi OspC, avšak pouze pár molekul OspA (Fikrig & kol., 1992) Protože je ale OspC u *B. burgdorferi* s.l. značně polymorfní, je jeho použití pro vakcínu, která by byla účinná ve více geografických oblastech značně problematické, protože by dokázal vyvolat imunitu pouze proti těm kmenům borelií, které by exprimovaly totožný sérotyp (Křupka & kol., 2011).

V roce 1998 byla U. S. Food and Drug Administration (FDA) schválena první vakcína proti lymské borelióze ve Spojených státech amerických. Byla pojmenována LYMERix, avšak na trhu byla dostupná pouze 4 roky a v roce 2002 byla pro nízký prodej (především kvůli vysoké pořizovací ceně) a neutichající žaloby, které byly zapříčiněny strachem z možných nežádoucích účinků, z trhu stažena. Uživatelé avizované nežádoucí účinky však nebyly nikdy potvrzeny (Embers & Narasimhan, 2013; Nigrovic & Thompson, 2007). Na evropský trh tato vakcína uvedena nebyla, protože byla mířena pouze proti *B. burgdorferi* s.s., která je v Evropě zastoupena minimálně a z tohoto důvodu by nebyla dostatečně účinná. Právě problematika příliš variabilních povrchových proteinů borelií je důvodem stagnace ve vývoji účinné vakcíny pro evropský trh. Tato variabilita panuje jednak mezi jednotlivými druhy, ale i v celém jejich rámci (Křupka & kol., 2008). LYMERix ještě následovala podobná vakcína ImuLyme, která se však na trh nikdy nedostala, jelikož výrobce ani nezažádal FDA o její schválení (Nigrovic & Thompson, 2007).

Ve vývoji vakcín se již objevují i další přístupy. Například použití proteinů DbpA či DbpB, P35 a P37, Oms66, VraA, dále glykolipidového antigenu cholesterolu 6-O-acyl- β -D-galaktopyranozidu, a v poslední řadě vakcíny založené na DNA, konkrétně vakcíny obsahující nukleovou kyselinu, která kóduje OspA či OspC. Na trhu jsou však dostupné pouze vakcíny veterinární, a to především pro psy. Na americkém trhu lze nalézt LymeVax (Fort Dodge), GalaxyLyme (Shering Plough) Recombitek (Merial) a ProLyme (Intervet), v Německu Merilym (Merial) a v České republice Biocan B a Borrelym 3 (Bioveta). I když jsou tyto vakcíny účinné a hojně používané, jsou protektivní pouze proti malému spektru kmenů borelií, a z tohoto důvodu je zapotřebí psy opakovaně revakcinovat (Křupka & kol., 2011).

2 MATERIÁL A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

2.1 Biologický materiál

Byly použity bakteriální druhy *B. lusitaniae* (CIP 105366), *B. valaisiana* (CIP 105367), *B. bissetii* (CIP 109136), *B. burgdorferi* s.s. (DSM 4681), *B. afzelii* (DSM 10508, typový kmen), *B. garinii* (terénní izolát, Brno), *B. garinii* (terénní izolát, Brno), *B. afzelii* (terénní izolát, České Budějovice), *B. burgdorferi* s.s. (terénní izolát, České Budějovice), *B. garinii* (terénní izolát, Brno), *B. afzelii* (kmen DSM 16073), *B. burgdorferi* s.s. (kmen SCW-53). Tyto kmeny byly lyzovány ultrazvukem a lyzát použit na coating ELISA desek. Pro vakcinaci byly použity experimentální myši kmene Balb/c.

2.2 Chemikálie a roztoky

- deionizovaná voda
- chlorid sodný
- chlorid draselný
- dodekahydrát hydrogenfosforečnan sodný
- dihydrogenfosforečnan draselný
- Tween 20
- odstředěné sušené mléko
- hovězí sérový albumin
- dodekahydrát hydrogenfosforečnan disodný
- kyselina citronová
- 96% kyselina sírová

1M kyselina sírová:

- 472 ml deionizované vody
- 28 ml 96% kyseliny sírové

OPD pufr:

- 18,4 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu disodného
- 5,1 g kyseliny citronové
- rozpustit v 800 ml deionizované vody

- upravit pH na 5
- doplnit deionizovanou vodou na 1 l

Pracovní roztok 1x PBS:

- 900 ml deionizované vody
- 100 ml zásobního roztoku 10x PBS

Roztok 1% albuminu v PBS s Tweenem 20:

- 450 ml deionizované vody
- 50 ml zásobního roztoku 10x PBS
- 250 µl Tweenu 20
- 5 g hovězího sérového albuminu

Roztok 5% mléka v PBS s Tweenem 20:

- 450 ml deionizované vody
- 50 ml zásobního roztoku 10x PBS
- 250 µl Tweenu 20
- 25 g odstředěného sušeného mléka

Roztok PBS s Tweenem 20:

- 900 ml deionizované vody
- 100 ml zásobního roztoku 10x PBS
- 0,5 ml Tweenu 20

Zásobní roztok 10x PBS:

- 240 g chloridu sodného
- 6g chloridu draselného
- 40,08 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného
- 6 g dihydrogenfosforečnanu draselného
- 3 l deionizované vody

2.3 Vakcíny

- Alum polyC
- Alum wildtype C

- polyC lipozom
- wildtype C lipozom

2.4 Kultivační media

- Barbour-Stoenner-Kelly

2.5 Laboratorní přístroje

- ELISA spektrofotometr Epoch
- chladnička CNSI 3033
- laboratorní váhy 1,25 – 500 g
- magnetická míchačka Big squid white
- mikropipeta Finn timer 1 – 5 ml
- mikropipeta Finn timer F1 0,2 – 2 µl
- mikropipeta Finn timer F1 100 – 1000 µl
- mikropipeta Finn timer F1 2 – 20 µl
- mikropipeta Finn timer F1 20 – 200 µl
- mikropipeta Finn timer F230 – 300 µl – dvanáctikanálová
- mraznička G 1231
- pH metr 3310
- promývačka ELx405
- standardní počítačové vybavení
- výrobce deionizované vody AQUAL 29 XL

2.6 Spotřební materiál

- pipetovací špičky (20 µl, 200 µl, 1000 µl, 5 ml)

3 METODY

3.1 Imunochemický test ELISA

1. Do každé jamky mikrotitrační destičky se napipetuje 100 µl roztoku lyzátu použitých kmenů borelií o koncentraci 10 µl/ml. Následně se mikrotitrační destičky umístí přes noc do chladové místnosti.
2. Jamky mikrotitračních destiček promyjeme 3x roztokem PBS pufru. Následně do každé jamky nepipetujeme 300 µl 5% mléka v PBS s Tweenem 20. Dále probíhá blokování při pokojové teplotě po dobu 2 hodin. Po této době mléko vyklepneme z jamek a ty promyjeme 2x roztokem PBS s Tweenem 20.
3. Myší séra, která jsme získali při prvním odběru, naředíme roztokem 1% albuminu v PBS s Tweenem 20 v poměru 1 : 2 000.
4. Do jamek mikrotitračních destiček nepipetujeme 100 µl 1% albuminu v PBS s Tweenem 20. Následně do jamky A2 napipetujeme 100 µl standardu, obsah jamky promícháme a 100 µl roztoku přeneseme do jamky A3. Stejně postupujeme, dokud nedosáhneme jamky A11, odkud se 100 µl roztoku odpipetuje.
5. Vzorky séra nanášíme dvakrát do jamek B2–B11 v množství 100 µl. Obsah těchto jamek promícháme a 100 µl přeneseme do jamek C2–C11. Takto postupujeme až k jamkám G2 – G11. Odtud 100 µl opět odpipetujeme a necháme inkubovat v chladové místnosti do dalšího dne.
6. Mikrotitrační jamky destičky 5x promyjeme PBS s Tweenem 20. Sekundární protilátku naředíme roztokem 1% albuminu v PBS s Tweenem 20 a do všech jamek nepipetujeme 100 µl. Inkubace probíhá v místnosti s pokojovou teplotou 1,5 hodiny.
7. Jamky mikrotitračních destiček znovu 5x promyjeme PBS s Tweenem 20. Do každé z jamek nepipetujeme 100 µl reakčního roztoku OPD a necháme inkubovat od 2 do 20 minut podle rychlosti vývoje žlutého zbarvení. Reakci zastavíme 100 µl kyseliny sírové, kterou přidáme do každé jamky.
8. Absorbanci měříme spektrofotometrem ELISA a zaznamenáváme programem Gem5. Odtud exportujeme data do programu Microsoft Excel a vyhotovíme grafy pro přehlednější zobrazení reaktivity.

4 PRAKTICKÁ ČÁST S VÝSLEDKY

V praktické části své bakalářské práce jsem se věnovala zvládnutí základních imunochemických metod (především imunochemického testu ELISA) pro charakteristickou protilátkovou imunitní odpověď, které byly součástí zkoumání vlastností potenciální protektivní vakcíny proti lymfské borelióze. Úkolem této prototypové vakcíny bylo navodit specifickou imunitu proti širokému spektru patogenních kmenů borelií. Protože se však tyto druhy liší strukturou povrchových antigenů (OspA, OspC, atd.), vhodným řešením jsou tvorby chimerických polyepitopů rekombinantních proteinů OspA a OspC, které by se mohly stát potenciálními humánními vakcínami. Cílem bylo tedy testování vlastností rekombinantního polyepitopu, který obsahoval C-terminální motivy šesti imunodominantních epitopů OspC antigenů nejvýznamnějších patogenních kmenů *B. burgdorferi* s.l. a srovnání imunogenních vlastností tohoto chimerického polyepitopu OspC (polyOspC) s monovalentním rekombinantním antigenem OspC (monoOspC) pro *B. burgdorferi* s.s. na myším modelu.

Reaktivita sér byla pozorována na lyzátovém panelu borelií, které byly získány z dostupných bakteriálních sbírek, kultivovány v mediu BSK při 34 °C a lyzovány pomocí ultrazvuku. V našem případě bylo použito 12 různých kmenů borelií (viz Tabulka č. 2), kterými bylo imunizováno šest skupin laboratorních myší kmene Balb/c, ♀♀, o hmotnosti 20–25 gramů, kdy v každé ze šesti skupin bylo přítomno 5 myší (viz Tabulka č. 3). Ty byly posléze naočkovány oběma proteiny – polyOspC obsahující 6 typů OspC (viz Tabulka č. 4) a monoOspC, jejichž reaktivita v myším séru byla srovnávána imunochemickou analytickou metodou ELISA a její podrobné výsledky pro všechny použité kmeny lze vidět v tabulkách a grafech č. 5 – 16. Protože rekombinantní proteiny jsou obecně slabými imunogeny, přidání adjuvans, což je anorganická či organická chemická látka, která zesiluje imunitní reakci na použitý antigen, je důležitým faktorem. V našem případě byl použit $\text{Al}(\text{OH})_3$ – hydroxid hlinitý. Je zapotřebí zmínit i lipozomy, které lze díky jejich amfifilnímu charakteru použít jako transportní jednotky pro dopravení antigenů nebo adjuvans, protože do nich lze enkapsulovat různé látky (Křupka & kol., 2012; Prymula, 2009) Samotná vakcinace byla zopakována po 14 dnech a po dalších 14 dnech byly odebrány vzorky.

Tabulka č. 2: Použité kmeny borelií

Označení	Bakteriální druh	Bakteriální kmen/izolát
C	<i>B. lusitaniae</i>	CIP 105366
D	<i>B. valaisiana</i>	CIP 105367
E	<i>B. bissettii</i>	CIP 109136
F	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	DSM 4681
G	<i>B. afzelii</i>	DSM 10508, typový kmen
I	<i>B. garinii</i>	Terénní izolát, Brno
J	<i>B. garinii</i>	Terénní izolát, Brno
L	<i>B. afzelii</i>	Terénní izolát, Č. Budějovice
N	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Terénní izolát, Č. Budějovice
T	<i>B. garinii</i>	Terénní izolát Brno
W	<i>B. afzelii</i>	Kmen DSM 16073
Y	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	Kmen SCW-53

Tabulka č. 3: Přehled skupin laboratorních myší a druhů imunizace

Číslo skupiny laboratorních myší	Druh imunizace
I	negativní kontrola
II	polyC lipozom
III	wildtype C lipozom
IV	Alum polyC
V	Alum wildtype C
VI	kontrola Alum

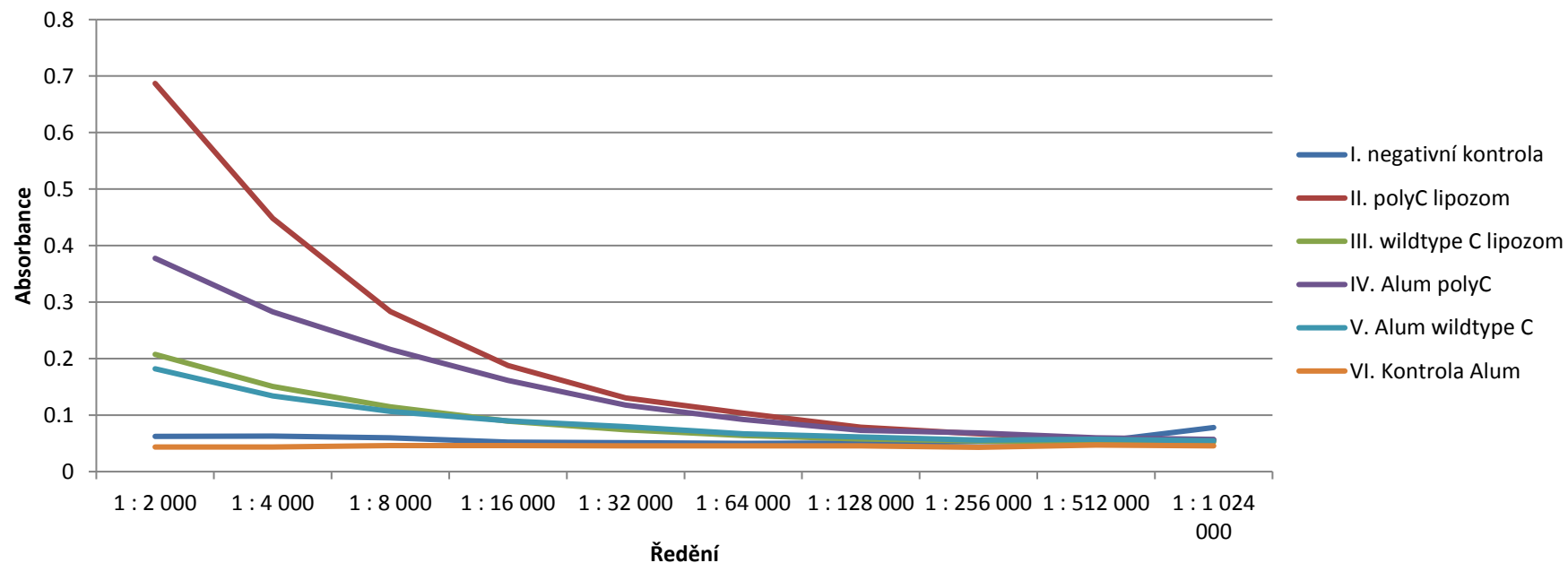
Tabulka č. 4: Přehled kmenů borelií a použitých typů OspC

Kmen borelie	Typ použitého OspC
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	A, B, I, K
<i>B. afzelii</i>	Pko
<i>B. garinii</i>	Pki

Tabulka č. 5: Výsledky testu ELISA pro *B. lusitaniae*, CIP 105366 (autoři: Bundilová, Březíková)

	1 : 2 000	1 : 4 000	1 : 8 000	1 : 16 000	1 : 32 000	1 : 64 000	1 : 128 000	1 : 256 000	1 : 512 000	1 : 1 024 000
I	0,0625	0,063	0,06	0,052	0,051	0,05	0,0505	0,053	0,0525	0,078
II	0,687	0,4485	0,2835	0,188	0,1305	0,1035	0,0785	0,067	0,0585	0,056
III	0,2075	0,1505	0,1145	0,0895	0,074	0,064	0,058	0,054	0,0525	0,0525
IV	0,3775	0,283	0,216	0,1615	0,1175	0,0925	0,073	0,0685	0,06	0,057
V	0,182	0,134	0,1065	0,09	0,0795	0,067	0,0615	0,056	0,0575	0,0545
VI	0,0435	0,0435	0,046	0,046	0,0455	0,0455	0,0455	0,043	0,047	0,0455

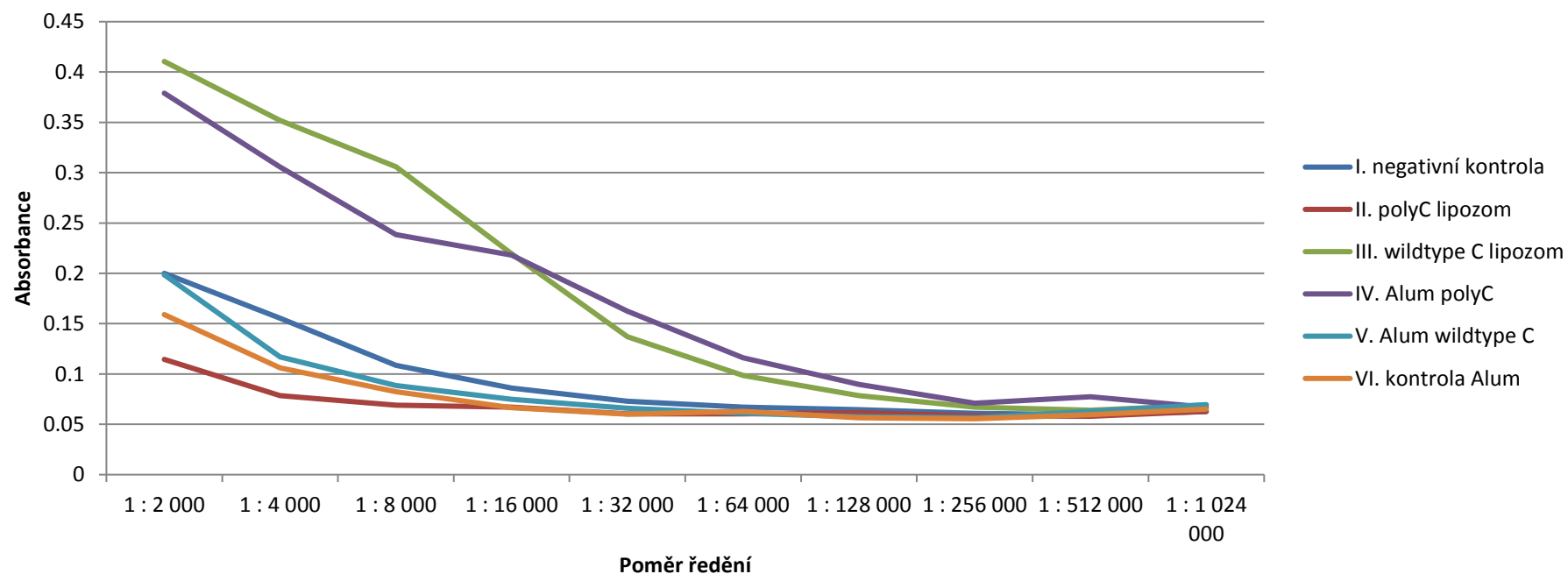
Graf č. 5: Výsledky testu ELISA pro *B. lusitaniae*, CIP 105366 (autoři: Bundilová, Březíková)



Tabulka č. 6: Výsledky testu ELISA pro *B. valasiana*, CIP 105367 (autoři: Bundilová, Březíková)

	1 : 2 000	1 : 4 000	1 : 8 000	1 : 16 000	1 : 32 000	1 : 64 000	1 : 128 000	1 : 256 000	1 : 512 000	1 : 1 024 000
I	0,2	0,1555	0,1085	0,086	0,073	0,067	0,0645	0,061	0,0595	0,0625
II	0,1145	0,0785	0,069	0,067	0,0605	0,0605	0,0615	0,0585	0,058	0,063
III	0,4105	0,352	0,306	0,2195	0,137	0,0985	0,0785	0,067	0,064	0,069
IV	0,379	0,3055	0,2385	0,218	0,1625	0,116	0,0895	0,071	0,0775	0,067
V	0,1985	0,117	0,0885	0,075	0,066	0,061	0,0575	0,0565	0,063	0,0695
VI	0,159	0,106	0,0825	0,0665	0,06	0,063	0,0565	0,0555	0,0595	0,065

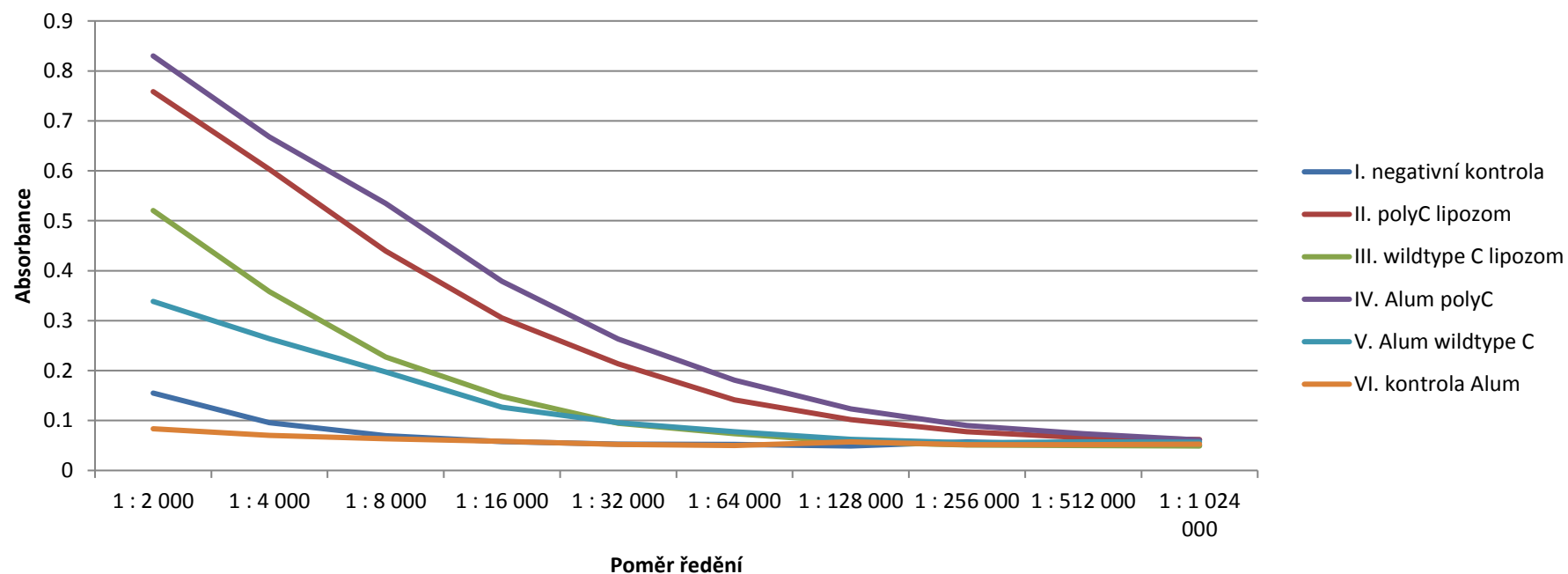
Graf č. 6: Výsledky testu ELISA pro *B. valasiana*, CIP 105367 (autoři: Bundilová, Březíková)



Tabulka č. 7: Výsledky testu ELISA pro *B. bissetii*, CIP 109136 (autoři: Bundilová, Březíková)

	1 : 2 000	1 : 4 000	1 : 8 000	1 : 16 000	1 : 32 000	1 : 64 000	1 : 128 000	1 : 256 000	1 : 512 000	1 : 1 024 000
I	0,155	0,0955	0,0695	0,058	0,0525	0,052	0,049	0,057	0,051	0,05
II	0,7585	0,603	0,4395	0,3055	0,2135	0,1415	0,102	0,0775	0,0655	0,062
III	0,5205	0,358	0,227	0,148	0,0945	0,0735	0,057	0,051	0,05	0,049
IV	0,83	0,6675	0,5345	0,379	0,263	0,181	0,1235	0,09	0,0735	0,061
V	0,3385	0,264	0,197	0,1265	0,0955	0,0775	0,0625	0,0555	0,057	0,0565
VI	0,0835	0,0705	0,0635	0,0585	0,052	0,05	0,057	0,0515	0,0515	0,053

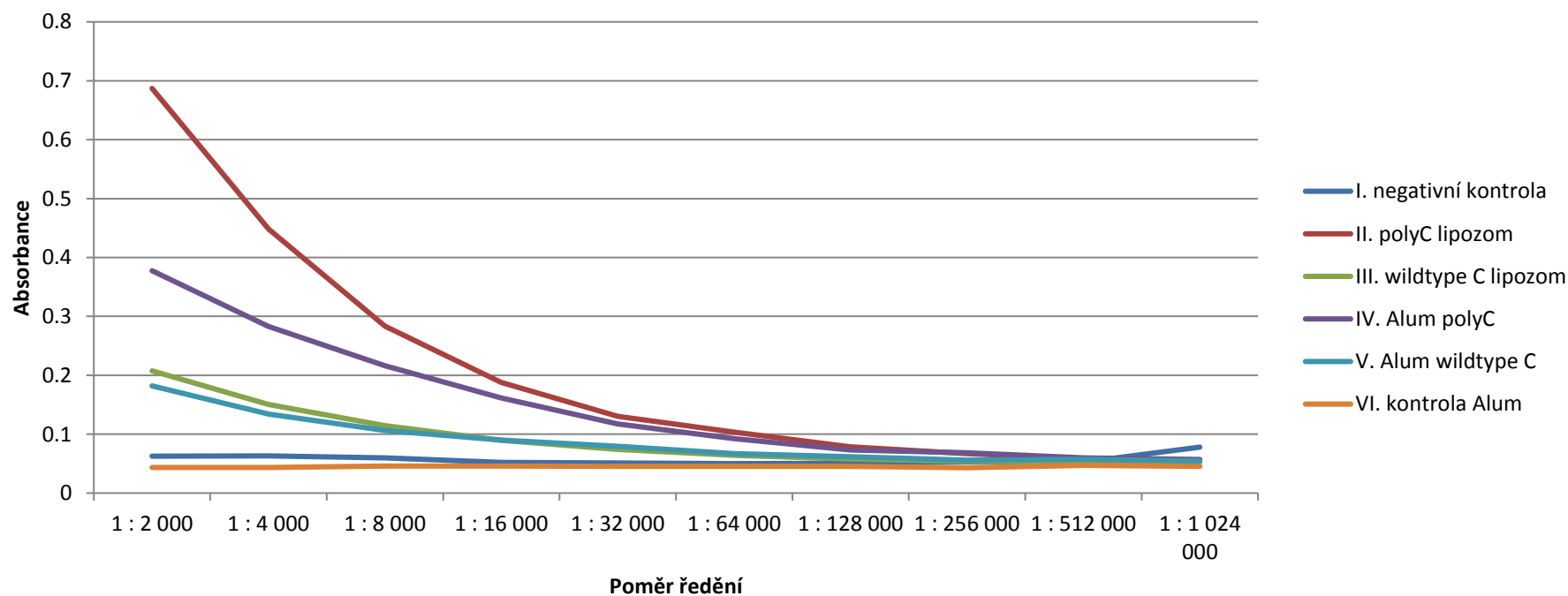
Graf č. 7: Výsledky testu ELISA pro *B. bissetii*, CIP 109136 (autoři: Bundilová, Březíková)



Tabulka č. 8: Výsledky testu ELISA pro *B. burgdorferi* s.s., DSM 4681 (autoři: Bundilová, Březíková)

	1 : 2 000	1 : 4 000	1 : 8 000	1 : 16 000	1 : 32 000	1 : 64 000	1 : 128 000	1 : 256 000	1 : 512 000	1 : 1 024 000
I	0,0625	0,063	0,06	0,052	0,051	0,05	0,0505	0,053	0,0525	0,078
II	0,687	0,4485	0,2835	0,188	0,1305	0,1035	0,0785	0,067	0,0585	0,056
III	0,2075	0,1505	0,1145	0,0895	0,074	0,064	0,058	0,054	0,0525	0,0525
IV	0,3775	0,283	0,216	0,1615	0,1175	0,0925	0,073	0,0685	0,06	0,057
V	0,182	0,134	0,1065	0,09	0,0795	0,067	0,0615	0,056	0,0575	0,0545
VI	0,0435	0,0435	0,046	0,046	0,0455	0,0455	0,0455	0,043	0,047	0,0455

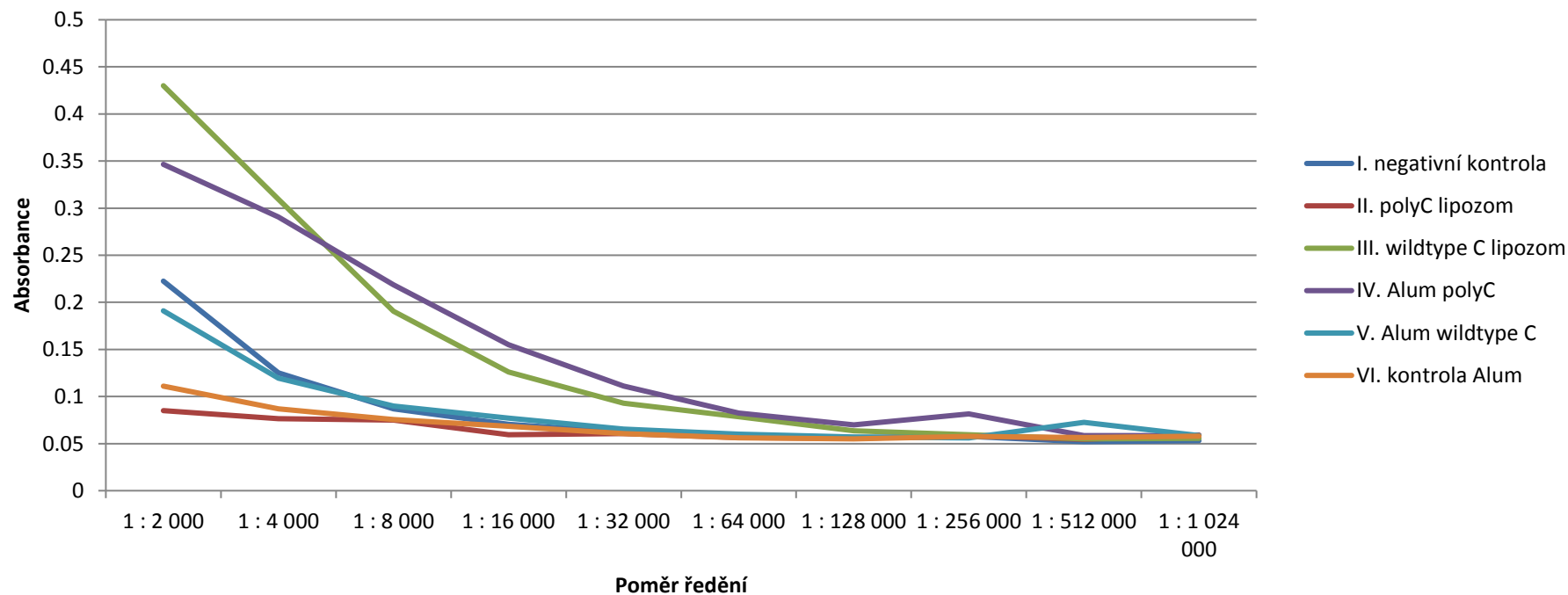
Graf č. 8: Výsledky testu ELISA pro *B. burgdorferi* s.s., DSM 4681 (autoři: Bundilová, Březíková)



Tabulka č. 9: Výsledky testu ELISA pro *B. afzelii*, DSM 10508, typový kmen (autoři: Bundilová, Březíková)

	1 : 2 000	1 : 4 000	1 : 8 000	1 : 16 000	1 : 32 000	1 : 64 000	1 : 128 000	1 : 256 000	1 : 512 000	1 : 1 024 000
I	0,2225	0,125	0,087	0,0705	0,062	0,0575	0,0565	0,0575	0,052	0,053
II	0,085	0,0765	0,075	0,0595	0,0605	0,0565	0,0555	0,0585	0,0545	0,059
III	0,43	0,3095	0,1905	0,126	0,093	0,0785	0,0635	0,0595	0,055	0,0555
IV	0,3465	0,2905	0,2185	0,155	0,111	0,0825	0,07	0,0815	0,0585	0,0585
V	0,191	0,1195	0,09	0,077	0,0655	0,06	0,057	0,056	0,0725	0,0585
VI	0,111	0,087	0,0755	0,0685	0,0605	0,056	0,055	0,0575	0,0565	0,058

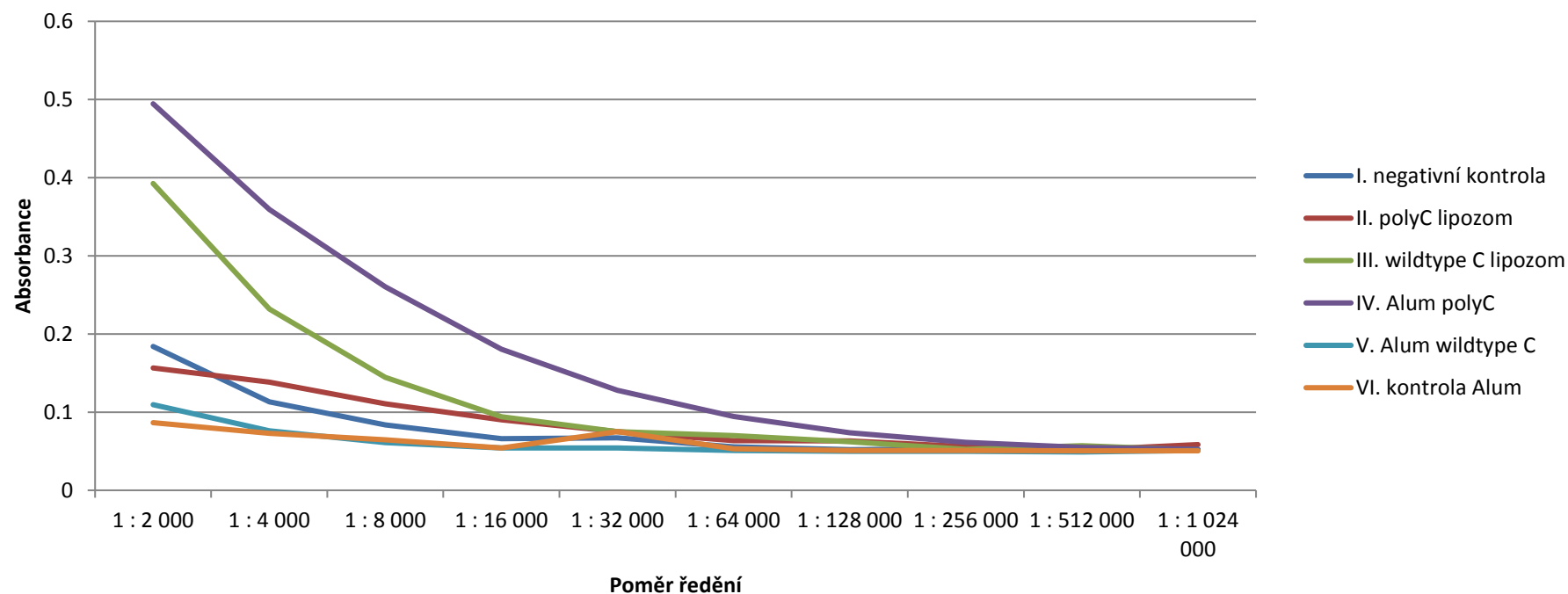
Graf č. 9: Výsledky testu ELISA pro *B. afzelii*, DSM 10508, typový kmen (autoři: Bundilová, Březíková)



Tabulka č. 10: Výsledky testu ELISA pro *B. garinii*, terénní izolát, Brno (autoři: Bundilová, Březíková)

	1 : 2 000	1 : 4 000	1 : 8 000	1 : 16 000	1 : 32 000	1 : 64 000	1 : 128 000	1 : 256 000	1 : 512 000	1 : 1 024 000
I	0,184	0,113	0,0835	0,066	0,067	0,0555	0,052	0,053	0,051	0,0515
II	0,1565	0,1385	0,1105	0,09	0,075	0,0635	0,063	0,056	0,0515	0,0585
III	0,3925	0,232	0,1445	0,094	0,075	0,07	0,062	0,0525	0,057	0,0515
IV	0,4945	0,3595	0,2605	0,1805	0,128	0,0945	0,0735	0,0615	0,055	0,0525
V	0,1095	0,076	0,061	0,054	0,054	0,051	0,05	0,05	0,049	0,051
VI	0,0865	0,073	0,0645	0,054	0,075	0,053	0,051	0,051	0,0505	0,0505

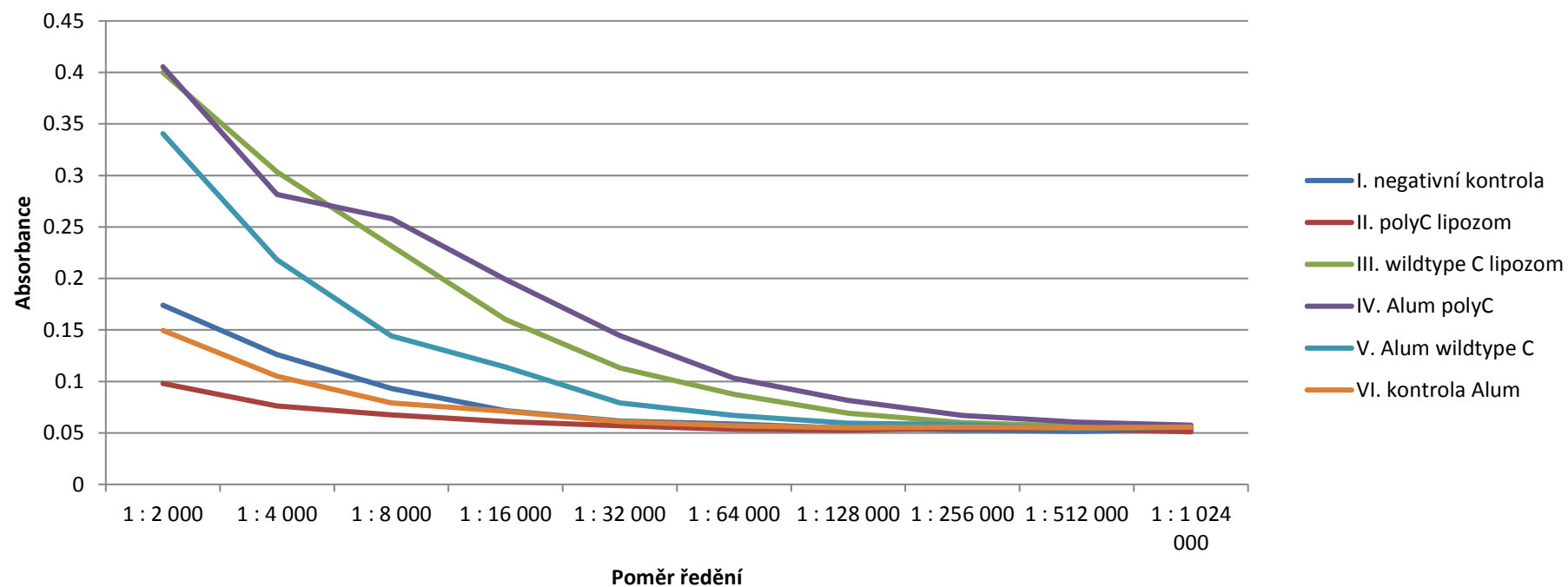
Graf č. 10: Výsledky testu ELISA pro *B. garinii*, terénní izolát, Brno (autoři: Bundilová, Březíková)



Tabulka č. 11: Výsledky testu ELISA pro *B. garinii*, terénní izolát, Brno (autoři: Bundilová, Březíková)

	1 : 2 000	1 : 4 000	1 : 8 000	1 : 16 000	1 : 32 000	1 : 64 000	1 : 128 000	1 : 256 000	1 : 512 000	1 : 1 024 000
I	0,174	0,126	0,093	0,0715	0,0615	0,0585	0,0545	0,053	0,0515	0,0535
II	0,098	0,076	0,0675	0,061	0,057	0,0535	0,0525	0,0545	0,0545	0,051
III	0,4	0,3035	0,2315	0,16	0,113	0,0875	0,069	0,06	0,0565	0,0555
IV	0,4055	0,2815	0,258	0,199	0,1445	0,103	0,0815	0,067	0,0605	0,0575
V	0,3405	0,218	0,144	0,114	0,079	0,067	0,0595	0,058	0,054	0,0555
VI	0,1495	0,105	0,079	0,071	0,061	0,057	0,055	0,0555	0,055	0,0555

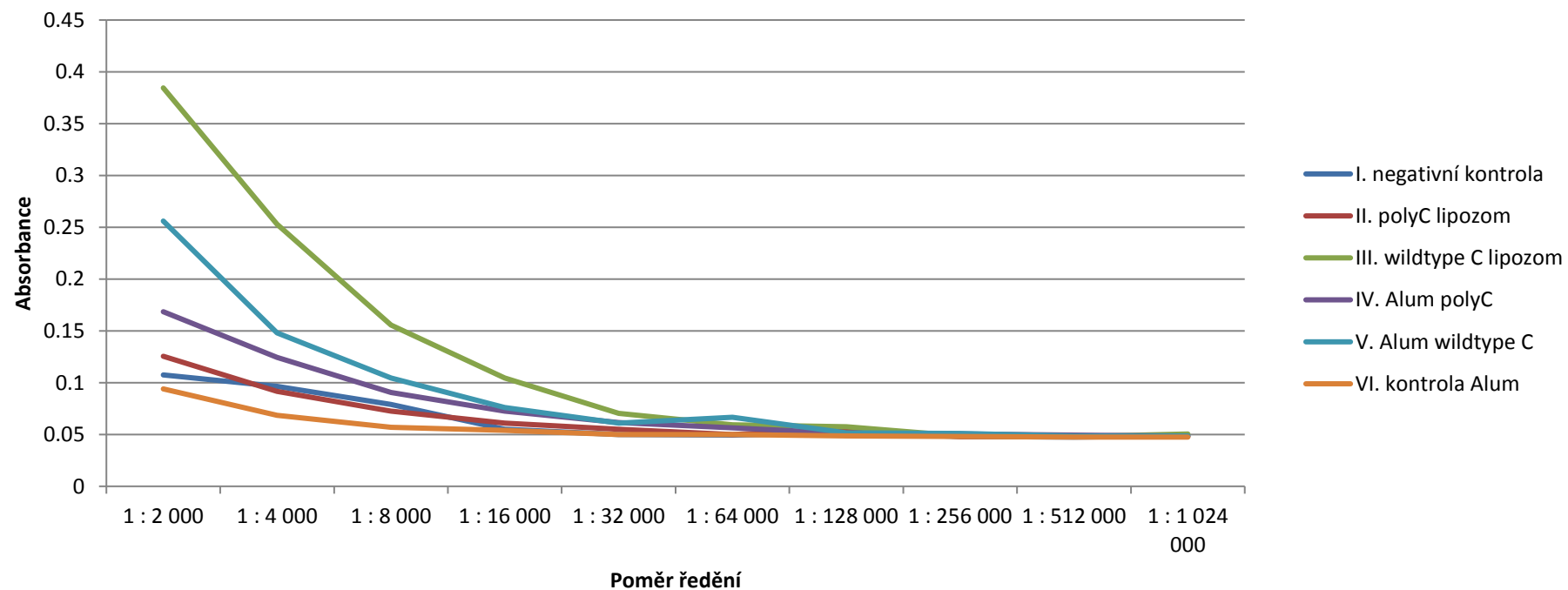
Tabulka č. 11: Výsledky testu ELISA pro *B. garinii*, terénní izolát, Brno (autoři: Bundilová, Březíková)



Tabulka č. 12: Výsledky testu ELISA pro *B. afzelii*, terénní izolát, České Budějovice (autoři: Bundilová, Březíková)

	1 : 2 000	1 : 4 000	1 : 8 000	1 : 16 000	1 : 32 000	1 : 64 000	1 : 128 000	1 : 256 000	1 : 512 000	1 : 1 024 000
I	0,1075	0,0965	0,079	0,055	0,05	0,0495	0,0515	0,048	0,0475	0,0485
II	0,1255	0,0915	0,0725	0,061	0,055	0,05	0,055	0,048	0,0485	0,048
III	0,3845	0,253	0,1555	0,1045	0,0705	0,0595	0,0575	0,0485	0,048	0,0505
IV	0,1685	0,1245	0,0905	0,0725	0,0615	0,0565	0,051	0,0505	0,0495	0,0485
V	0,256	0,148	0,1045	0,076	0,061	0,0665	0,0515	0,051	0,0485	0,0485
VI	0,094	0,0685	0,057	0,054	0,05	0,05	0,0485	0,048	0,0475	0,0475

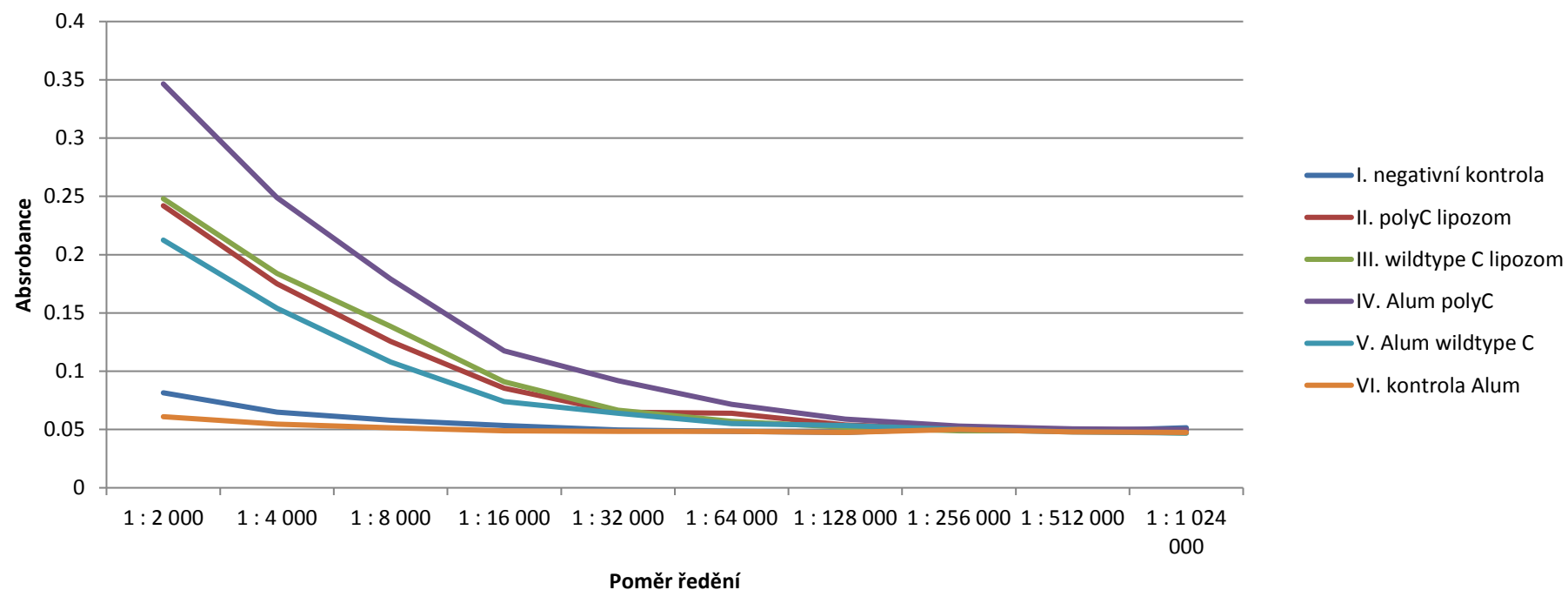
Graf č. 12: Výsledky testu ELISA pro *B. afzelii*, terénní izolát, České Budějovice (autoři: Bundilová, Březíková)



Tabulka č. 13: Výsledky testu ELISA pro *B. burgdorferi* s.s., terénní izolát, České Budějovice (autoři: Bundilová, Březíková)

	1 : 2 000	1 : 4 000	1 : 8 000	1 : 16 000	1 : 32 000	1 : 64 000	1 : 128 000	1 : 256 000	1 : 512 000	1 : 1 024 000
I	0,0815	0,065	0,058	0,0535	0,0495	0,0485	0,0475	0,051	0,0485	0,0515
II	0,242	0,175	0,1255	0,0855	0,065	0,064	0,054	0,0505	0,049	0,049
III	0,248	0,184	0,1385	0,091	0,0665	0,057	0,052	0,049	0,049	0,047
IV	0,3465	0,249	0,179	0,1175	0,092	0,0715	0,059	0,053	0,0505	0,05
V	0,2125	0,154	0,108	0,074	0,064	0,055	0,0535	0,05	0,048	0,047
VI	0,061	0,0545	0,0515	0,049	0,0485	0,0485	0,0475	0,05	0,048	0,0475

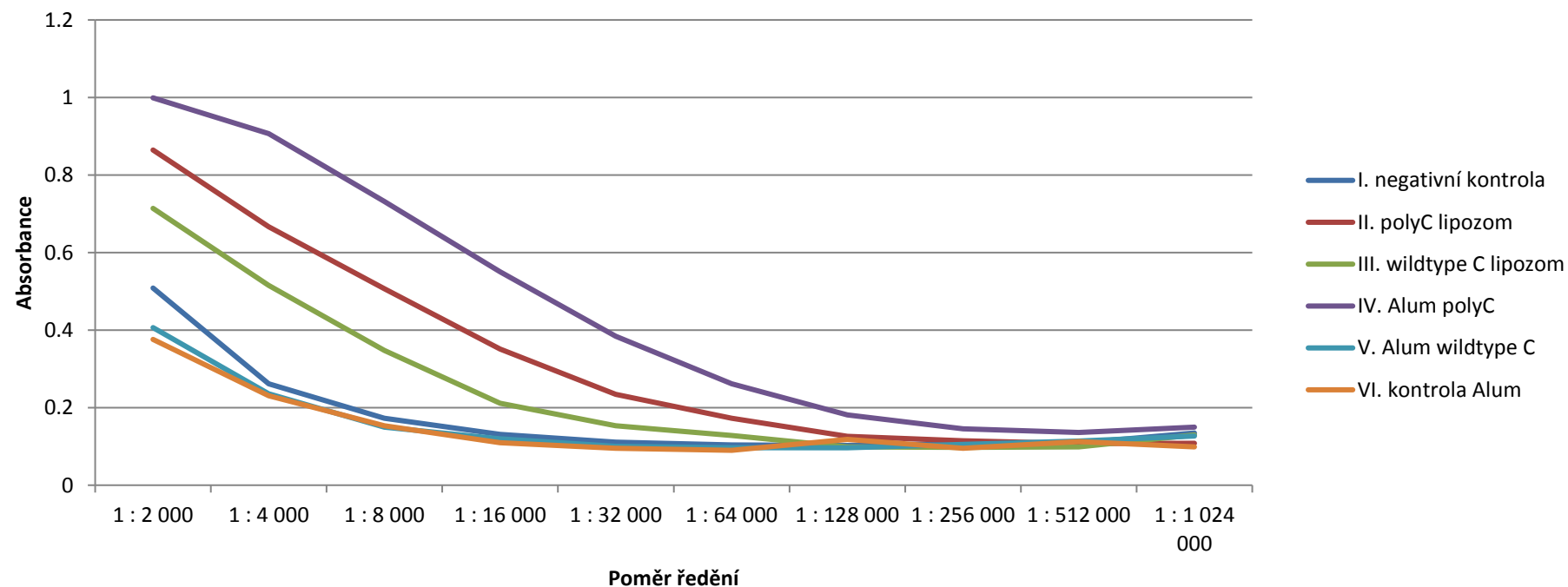
Graf č. 13: Výsledky testu ELISA pro *B. burgdorferi* s.s., terénní izolát, České Budějovice (autoři: Bundilová, Březíková)



Tabulka č. 14: Výsledky testu ELISA pro *B. garinii*, terénní izolát, Brno (autoři: Bundilová, Březíková)

	1 : 2 000	1 : 4 000	1 : 8 000	1 : 16 000	1 : 32 000	1 : 64 000	1 : 128 000	1 : 256 000	1 : 512 000	1 : 1 024 000
I	0,5085	0,2615	0,173	0,131	0,111	0,104	0,1025	0,1075	0,109	0,135
II	0,8645	0,6665	0,507	0,3515	0,2345	0,173	0,126	0,1145	0,1075	0,1085
III	0,714	0,5155	0,3475	0,2115	0,153	0,128	0,099	0,0975	0,0985	0,1295
IV	0,999	0,907	0,732	0,5505	0,384	0,2615	0,181	0,1455	0,136	0,1495
V	0,4065	0,236	0,15	0,1195	0,1	0,097	0,0965	0,105	0,114	0,127
VI	0,376	0,231	0,1535	0,1095	0,0955	0,09	0,118	0,095	0,1125	0,099

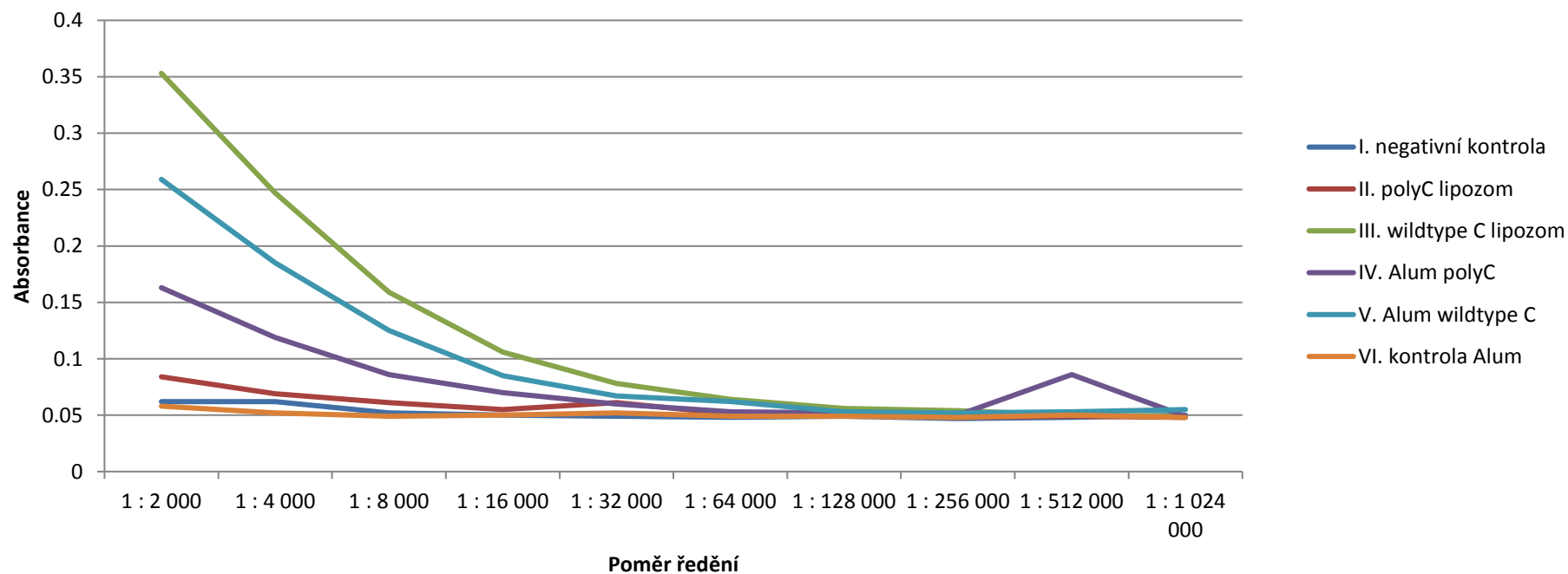
Graf č. 14: Výsledky testu ELISA pro *B. garinii*, terénní izolát, Brno (autoři: Bundilová, Březíková)



Tabulka č. 15: Výsledky testu ELISA pro *B. afzelii*, kmen DSM 16073 (autoři: Bundilová, Březíková)

	1 : 2 000	1 : 4 000	1 : 8 000	1 : 16 000	1 : 32 000	1 : 64 000	1 : 128 000	1 : 256 000	1 : 512 000	1 : 1 024 000
I	0,062	0,062	0,052	0,05	0,049	0,048	0,049	0,047	0,048	0,05
II	0,084	0,069	0,061	0,055	0,061	0,051	0,05	0,048	0,049	0,048
III	0,353	0,247	0,159	0,106	0,078	0,064	0,056	0,054	0,05	0,049
IV	0,163	0,119	0,086	0,07	0,06	0,053	0,052	0,05	0,086	0,049
V	0,259	0,185	0,125	0,085	0,067	0,062	0,053	0,052	0,053	0,055
VI	0,058	0,052	0,049	0,05	0,052	0,049	0,049	0,048	0,05	0,048

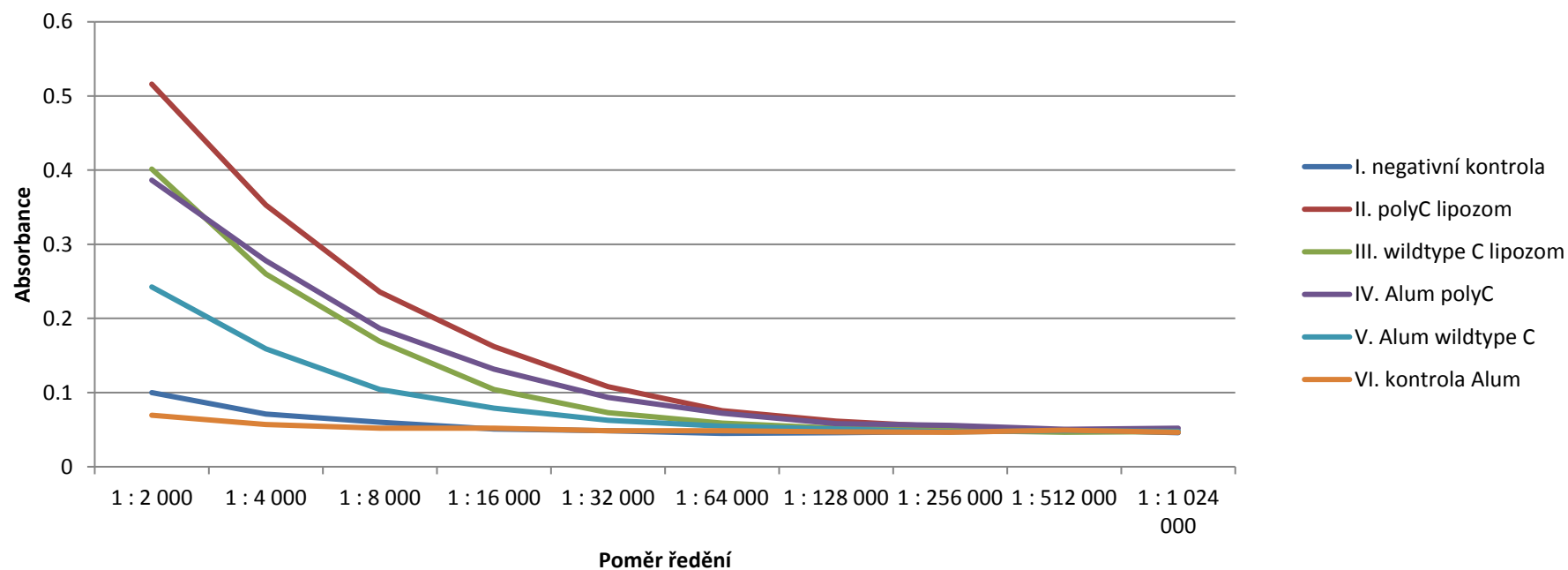
Graf č. 15: Výsledky testu ELISA pro *B. afzelii*, kmen DSM 16073 (autoři: Bundilová, Březíková)



Tabulka č. 16: Výsledky testu ELISA pro *B. burgdorferi* s.s., kmen SCW-53 (autoři: Bundilová, Březíková)

	1 : 2 000	1 : 4 000	1 : 8 000	1 : 16 000	1 : 32 000	1 : 64 000	1 : 128 000	1 : 256 000	1 : 512 000	1 : 1 024 000
I	0,1	0,071	0,06	0,051	0,0485	0,045	0,046	0,0475	0,05	0,046
II	0,516	0,353	0,2355	0,162	0,108	0,0755	0,0615	0,0535	0,0485	0,047
III	0,4015	0,26	0,169	0,104	0,073	0,059	0,052	0,049	0,0465	0,0475
IV	0,3865	0,278	0,1865	0,1315	0,0935	0,072	0,058	0,056	0,0505	0,052
V	0,2425	0,159	0,104	0,079	0,0625	0,0545	0,051	0,047	0,0485	0,048
VI	0,0695	0,057	0,052	0,052	0,0485	0,0485	0,047	0,0465	0,0495	0,0465

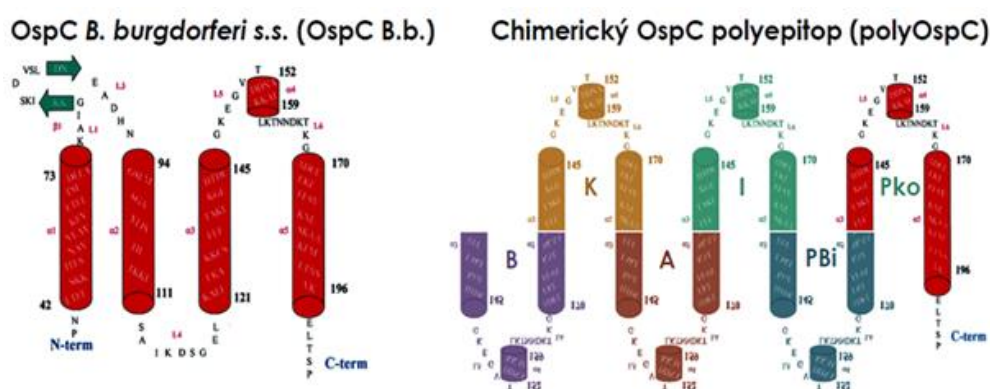
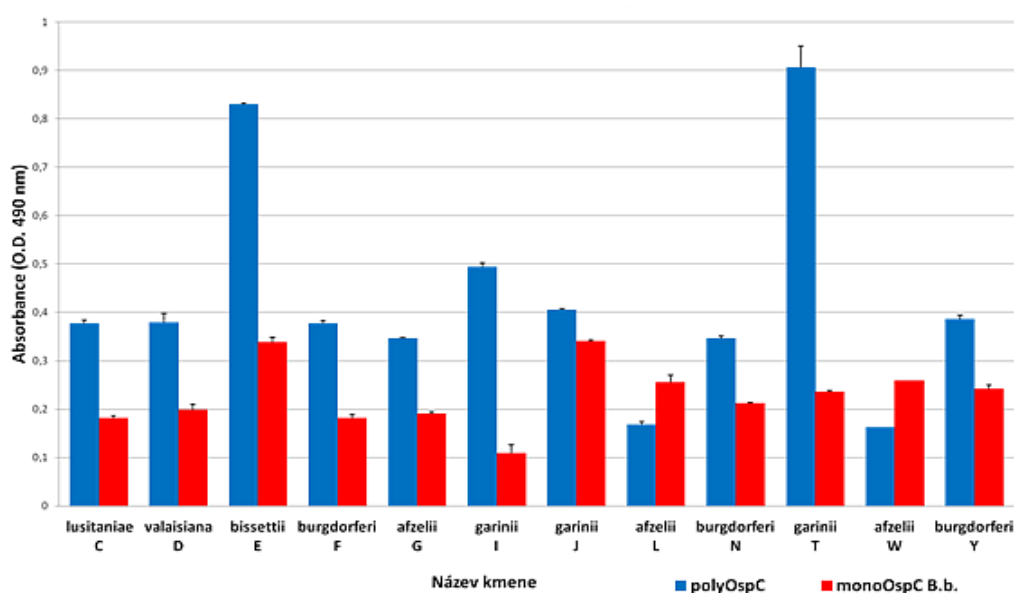
Graf č. 16: Výsledky testu ELISA pro *B. burgdorferi* s.s., kmen SCW-53 (autoři: Bundilová, Březíková)



Na základě reakcí obou proteinů bylo zjištěno, že chimerický polyepitop OspC indukoval protilátky, které rozlišovaly kmeny *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana* a *B. bissetti* a měl v 10 ze 12 případů výrazně silnější reaktivitu než monovalentní rekombinantí OspC. Pouze ve dvou případech došlo k nižší reakci polyOspC, konkrétně u dvou testovaných kmenů *B. afzelii*, u kterých mohla být vyšší reaktivita monoOspC způsobena antigenní odlehlostí těchto kmenů od OspC typu Pko použitého pro konstrukci polyOspC. Dále se prokázalo, že proteolipozomy OspC indukují specifické protilátky v intenzitě srovnatelné s $\text{Al}(\text{OH})_3$. Výsledky reaktivity sér lze vidět v souhrnném Grafu č. 17.

Tento výzkum byl prezentován na XXXIII. sjezdu českých a slovenských alergologů a klinických imunologů formou posteru (viz Příloha II) a byl oceněn prvním místem.

Graf č. 17: Reaktivita sér imunizovaných myši s lyzáty jednotlivých kmenů borelií (autor: Michal Křupka)



Obrázek č. 6: Srovnání struktury mono- a polyOspC (autor: Michal Křupka)

5 DIDAKTICKÁ ANALÝZA ODBORNÉHO TÉMATU

Zařazení problematiky lymské boreliózy do vzdělávání je poměrně svízelné, především proto, že se jedná o téma poněkud úzké a složité. Dá se však uchopit několika různými způsoby a z mého pohledu je pro žáky asi nejprínosnější částí prevence, kterou lze nejen poměrně hezky připravit, ale zároveň je pro ně ze všech kapitol nejdůležitější. Cílila jsem na žáky 2. stupně základních škol, jelikož velké množství dětí tohoto věku navštěvuje pravidelně letní tábory nebo obecně pobývá nejvíce v přírodě, kde je riziko styku s klíšťaty nejvyšší a s ním pochopitelně i riziko nákazy lymskou boreliózou. Protože nemoc poléhá dle SZÚ povinnosti hlášení každého případu (Kříž & Gašpárek, 2015), měly by tomu odpovídat i táborová opatření. Všechna prisátá klíšťata by měl zdravotník během tábora zaznamenávat do zdravotnického deníku, který je dle vyhlášky Ministerstva zdravotnictví č. 106/2001 Sb. ze dne 2. března 2001 povinen vést. Po skončení akce je pak doporučeno předat každému rodiči informace o počtu a místu prisátých klíšťat, aby se mohl, v případě výskytu příznaků odpovídajících lymské borelióze eventuálně i klíšťové encefalitidě, obrátit na ošetřujícího lékaře a dále adekvátně postupovat. Protože předání těchto informací ze zdravotnického deníku zákonnému zástupci už povinné není, preventivní programy o lymské borelióze jsou pro žáky vhodné právě z tohoto důvodu.

Z hlediska Rámcového vzdělávacího programu pro základní vzdělávání se prevence lymské boreliózy nachází na pomezí několika vzdělávacích oblastí. Nejvíce však dle mého názoru odpovídá vzdělávací oblasti Člověk a příroda ve vzdělávacím oboru Přírodopis a okruhu Biologie člověka či Biologie živočichů (RVP, 2016). Pro toto téma bohatě postačuje jedna vyučovací hodina nebo pouze její část, za výukové prostředí bych zvolila třídu či posluchárnu a nejlepší formu výuky pravděpodobně hromadnou výuku (NÚOV, 2010). Za optimální vyučovací metodu přichází v úvahu výklad doprovázený powerpointovou prezentací, popřípadě demonstrační výklad, pro snazší představení probírané látky doprovázené názorným předvedením materiálu (Nezvalová, 2006), za který lze považovat například nachytaná různá stadia klíšťat pro porovnání velikosti.

Pro snazší představivost jsem vytvořila stručné nastínění hlavních výukových cílů společně s informačním letáčkem pro žáky, kde jsou shrnuty veškeré základní informace týkající se lymské boreliózy (viz Příloha I) a měl by jim posloužit v případě nalezení prisátého klíštěte, pozorování typických příznaků nebo diagnostikování lymské boreliózy.

Hlavní výukové cíle:

- Žák je schopen popsat lymskou boreliózu a identifikovat jejího přenašeče.
- Žák ví, jaká jsou preventivní opatření proti lymské borelióze.
- Žák ví, jak správně odstranit klíště.
- Žák dokáže identifikovat příznaky lymské boreliózy.
- Žák chápe, jak je lymská borelióza léčena.
- Žák zná hlavní místa a období výskytu klíšťat a lymské boreliózy.

ZÁVĚR

V rámci praktické části jsem spolupracovala na zkoumání a vyhodnocování imunogenních vlastností potenciální vakcíny proti lymské borelióze, která by navodila specifickou imunitu proti širokému spektru patogenních kmenů borelií. Porovnávány byly účinky chimerického polyepitopu OspC obsahujícího 6 typů OspC a monovalentního rekombinantního antigenu OspC na experimentálních myších kmene Balb/c. Ty byly nejprve imunizovány 12 rozdílnými kmeny borelií a následně oběma proteiny. Vakcinace byla následně zopakována po 14 dnech a za další dva týdny byly odebrány vzorky, jejichž reaktivita byla vyhodnocována pomocí imunochemického testu ELISA. Ty jasně prokázaly, že polyOspC indukoval protilátky, které rozlišovaly kmeny *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana* a *B. bissetti*, konkrétně v 10 z 12 vyhodnocených případů. Nižší reaktivita oproti monovalentnímu rekombinantnímu antigenu OspC byla pozorována jen ve dvou případech u kmene *B. afzelii*, kde se může jednat o antigenní odlehlost OspC typu Pko, který byl použit pro konstrukci chimerického polyepitopu. Lze tedy tvrdit, že polyOspC má značný potenciál stát se prototypovou vakcínou.

SEZNAM LITERATURY

1. **Alekseev A. N., Dubinina H. V., Van De Pol I., Scholus L. M.** (2001). Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in Ixodes ticks in the Baltic regions of Russia. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(6): 2237–2242.
2. **Alexander J. M., Cox S. M.** (1995): Lyme disease and Pregnancy. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 3: 256 – 261.
3. **Barbour A. G.** (1984): Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *The Yale journal of biology and medicine* 57(4): 521 – 525.
4. **Barbour A. G., Burgdorfer W., Hayes S. F., Peter O., Aeschlimann A.** (1983): Isolation of a cultivable spirochete from *Ixodes ricinus* ticks of Switzerland. *Current Microbiology* 8(2): 123 – 126.
5. **Bartůněk P.** (2013): Historie. In: Bartůněk P., Bojar M., Calda P., Diblík P., Hergocogová J., Hoza J., Hulínská D., Janovská D., Pícha D., Valešová M.: Lymeská borelióza. Grada Publishing, a.s., Praha.
6. **Bolehovská R., Plíšek S., Plíšková L., Čermáková Z., Palička V.** (2009): Lymeská borelióza. *Klinická biochemie a metabolismus* 17(38): 24 – 28.
7. **Brandt M. E., Riley B. S., Radolf J. D., Norgard M. V.** (1990): Immunogenic integral membrane proteins of *Borrelia burgdorferi* are lipoproteins. *Infection and Immunity* 58: 983 – 991.
8. **Bratton R. L., Whiteside J. W., Hovan M. J., Engle R. L., Edwards F. D.** (2008): Diagnosis and treatment of Lyme disease. *Mayo Clinic Proceedings* 83(5): 566 – 571.
9. **Brisson D., Drecktrah D., Eggers C. H. E., Samuels D. S.** (2012): Genetics of *Borrelia burgdorferi*. *Annual review of genetics* 46: 515 – 536.
10. **Brouqui P., Bacellar F., Baranton G. & kol.** (2004): Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 10: 1108 – 1132.
11. **Calda P.** (2013): Lymeská borelióza v těhotenství. In: Bartůněk P., Bojar M., Calda P., Diblík P., Hergocogová J., Hoza J., Hulínská D., Janovská D., Pícha D., Valešová M.: Lymeská borelióza. Grada Publishing, a.s., Praha.
12. **Capinera J. L.** (2008): Ticks (Acari: Ixodida). In: Capinera J. L.: Encyclopedia of entomology. Springer Publishing, Dordrecht.

13. **Carroll J. A., Garon C. F., Schwan T. G.** (1999): Effects of environmental pH on membrane proteins in *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 67(7): 3181 – 3187.
14. **Casjens S.** (2000): *Borrelia* genomes in the year 2000. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2(4): 401 – 410.
15. **Casjens S., Palmer N., van Vugt R., Huang W. M., Stevenson B., Rosa P., Lathigra R., Sutton G., Peterson J., Dodson R. J., Haft D., Hickey E., Gwinn M., White O., Fraser C. M.** (2000): A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology* 35: 490 – 516.
16. **Clark R. P., Hu L. T.** (2008): Prevention of Lyme Disease (and other tick borne infections). *Infectious Disease Clinics of North America* 22(3): 381 – 396.
17. **Cook M. J.** (2015): Lyme borreliosis: a review of data on transmission time after tick attachment. *Journal of General Medicine* 8: 1 – 8.
18. **Dattwyler R. J., Halperin J. J., Pas H., Luft B. J.** (1987): Ceftriaxone as effective therapy in refractory Lyme Disease. *The Journal of Infectious Diseases* 155: 1322 – 1325.
19. **Dattwyler R. J., Volkman D. J., Halperin J. J., Luft B. J.** (1988): Treatment of late Lyme borreliosis – randomized comparison of ceftriaxone and penicillin. *Lancet* 1: 1191 – 1194.
20. **De Martino S. J., Sordet C. H., Piémont Y., Ruzic-Sabljic E., Thaddée Vetter M., Monteil H., Sibilia J., Jaulhac B.** (2006): Enhanced culture of *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* strains on a solid BSK-based medium in anaerobic conditions. *Research in Microbiology* 157(8): 726 – 729.
21. **DeLong A. K., Blossom B., Maloney E., Phillips S. E.** (2012): Antibiotic retreatment of Lyme disease in patients with persistent symptoms: A biostatistical review of randomized, placebo-controlled, clinical trials. *Contemporary Clinical Trials* 33(6): 1132 – 1142.
22. **Dressler F., Ackermann R., Steere A. C.** (1994): Antibody responses to the three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* on European Lyme borreliosis. *The Journal of Infectious Diseases* 169: 313 – 318.
23. **Duray P. H., Steere A. C.** (1988): Clinical pathologic correlation of Lyme Disease by stage. *Annals New York Academy of Sciences* 539: 65 – 79.

24. **Earnhart C. G., Marconi R. T.** (2007): Development of an OspC-based tetravalent, recombinant, chimeric vaccinogen that elicits bactericidal antibody against diverse Lyme Disease spirochete strains. *Vaccine* 25: 466 – 480.
25. **Elliott D., Eppes S. C., Klein J. D.** (2001): Teratogen update: Lyme Disease. *Teratology* 64: 276 – 281.
26. **Embers E., Narasimhan S.** (2013): Vaccination against Lyme Disease: past, present, and future. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3(6): 1 – 15.
27. **Evans S. R., Korch G. W., Lawson M. A.** (1990): Comparative field evaluation of Permethrin and Deet-treated military uniforms for personal protection against ticks (Acari). *Journal of Medical entomology* 27(5): 829 – 834.
28. **Fikrig E., Barthold S. W., Marcantonio N. & kol.** (1992): Roles of OspA, OspB and flagellin in protective immunity to Lyme borreliosis in laboratory mice. *Infection and immunity* 60: 657 – 661.
29. **Fikrig E., Barthold S. W., Kantor F. S., Flavell R. A.** (1991): Protection of mice from Lyme borreliosis by oral vaccination with *Escherichia coli* expressing OspA. *The Journal of Infectious Diseases* 164: 1224 – 1227.
30. **Fišerová L., Černá K., Horká H., Kopecký J.** (2008): Two ways of experimental infection of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: ixodidae) with spirochetes of *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex. *Folia Parasitologica* 55: 150 – 154.
31. **Fraser C. M., Casjens S., Huang W. M. & kol.** (1997): Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390: 580 – 586.
32. **Fung B. P., McHugh G. L., Leong J. M., Steere A. C.** (1994): Humoral immune response to outer surface protein C of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease: Role of the immunoglobulin M response in the serodiagnosis of early infection. *Infection and immunity* 62(8): 3213 – 3221.
33. **Gern L., Falco R. C.** (2000): Lyme Disease. Scientific and technical review of the office international des epizooties 19(1): 121 – 135.
34. **Gulia-Nuss M., Nuss A. B., Meyer J. M. & kol.** (2016): Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. *Nature communications* 7: 1 – 13.
35. **Gurčík L.** (2009): Súčasný trendy v diagnostike a liečbe neuroboreliózy. *Neurologie pro praxi* 10(3): 184 – 190.
36. **Halouzka J., Postic D., Hubálek Z.** (1998): Isolation of the spirochaete *Borrelia afzelii* from the mosquito *Aedes vexans* in the Czech Republic. *Medical and Veterinary Entomology* 12: 103 – 105.

37. **Hejnar P.** (2001): Specifika nepřímé diagnostiky toxoplazózy a lymeské boreliózy u dětí. *Pediatric pro praxi* 3: 112 – 115.
38. **Hercogová J.** (2013): Postižení kůže. In: Bartůněk P., Bojar M., Calda P., Diblík P., Hergocogová J., Hoza J., Hulínská D., Janovská D., Pícha D., Valešová M.: Lymeská borelióza. Grada Publishing, a.s., Praha.
39. **Hulínská D.** (2013a): Mikrobiologie. In: Bartůněk P., Bojar M., Calda P., Diblík P., Hergocogová J., Hoza J., Hulínská D., Janovská D., Pícha D., Valešová M.: Lymeská borelióza. Grada Publishing, a.s., Praha.
40. **Hulínská D.** (2013b): Laboratorní diagnostika. In: Bartůněk P., Bojar M., Calda P., Diblík P., Hergocogová J., Hoza J., Hulínská D., Janovská D., Pícha D., Valešová M.: Lymeská borelióza. Grada Publishing, a.s., Praha.
41. **Hulínská D., Bojar M., Hulínský V.** (2006): Characterization of *Borrelia burgdorferi sensu lato* from Czech patients and ticks by culture and PCR sequence analysis. In: Cabello F. C., Hulínská D., Godfrey H. P.: Molecular Biology of Spirochetes. *Live and Behavior Science* 1: 208 – 220. NATO ASI, IOS Press, Washington DC.
42. **Hulínská D., Krausová M., Janovská D., Roháčová H., Hančil J., Mailer H.** (1993): Electron microscopy, cultivation and the polymerase chain reaction of spirochetes from the blood of patients with Lyme disease. *Central European Journal of Public Health* 1: 81 – 85.
43. **Charon N.W., Goldstein S. F., Marko M., Hsieh C., Gebhardt L. L., Motaleb M. A., Wolgemuth C. W., Limberger R. J., Rowe N.** (2009): The Flat-Ribbon Configuration of the Periplasmic Flagella of *Borrelia burgdorferi* and Its Relationship to Motility and Morphology. *Journal of Bacteriology* 191: 600 – 607.
44. **Chu CH. Y, Jiang B. G., Liu W, Zhao Q. M., Wu X. M., Zhang P. G., Zhan L., Yang H., Cao W. CH.** (2008): Presence of pathogenic *Borrelia burgdorferi sensu lato* and rodents in Zhejiang, south-east China. *Journal of Medical Microbiology* 57: 980 – 985.
45. **James Gathany:** Foto *Erythema Migrans*. Centres for Disease Control and Prevention. Navštíveno dne 3. 4. 2017. Dostupné z: https://www.cdc.gov/dotw/lyme-disease/images/bullseye_928px.jpg
46. **Janovská D.** (2013): Epidemiologická situace v České republice. In: Bartůněk P., Bojar M., Calda P., Diblík P., Hergocogová J., Hoza J., Hulínská D., Janovská D., Pícha D., Valešová M.: Lymeská borelióza. Grada Publishing, a.s., Praha

47. **Johnson R. C., Hyde F. W., Rumpel C. M.** (1984): Taxonomy of the Lyme Disease spirochetes. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 57: 529 – 537.
48. **Johnson R. C., Konder C., Russel M.** (1986): Active immunization of hamsters against experimental infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 54: 897 – 898.
49. **Kelly R.** (1971): Cultivation of *Borrelia hermsii*. *Science* 173: 443 – 444.
50. **Kenedy M. R., Lenhart T. R., Akins D. R.** (2012): The role of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 66(1): 1 – 19.
51. **Klempner M. S., Hu L. T., Evans J., Schmid C. H., Johnson G. M., Trevino R. P., Norton D. L., Levy L., Wall D., McCall J., Kosinski M., Weinstein A.** (2001): Two controlled trials of antibiotic treatment in patients with persistent symptoms and a history of Lyme Disease. *The New England Journal of Medicine* 345: 85 – 92.
52. **Kligler I. J., Robertson O. H.** (1922): The cultivation and biological characteristics of *Spirochaeta obermeier (recurrentis)*. *Journal of Experimental Medicine* 35: 303 – 316.
53. **Kříž B., Beneš Č.** (2014): Lymeská borrelióza – epidemiologická data do roku 2013. Státní zdravotní ústav. Navštíveno dne 2. 4. 2017. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Lymeska_borrelioza/Lymeska_borrelioza_za_rok_2013.pdf
54. **Kříž B., Gašpárek M.** (2015): Lymeská borrelióza – epidemiologická data za rok 2014. Státní zdravotní ústav. Navštíveno dne 2. 4. 2017. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Lymeska_borrelioza/Lymeska_borrelioza_CR_data_do_roku_2014.pdf
55. **Křupka M., Mašek J., Barheldyová E., Knötigová P. T., Plocková J., Korvasová Z., Škrabalová M., Koudelka Š., Kulich P., Zachová K., Czerneková L., Strouhal O., Horynová M., Šebela M., Miller A. D., Ledvina M., Raška M., Turánek J.** (2012): Enhancement of immune response towards non-lipidized *Borrelia burgdorferi* recombinant OspC antigen by binding onto the surface of metallochelating nanoliposomes with entrapped lipophilic derivatives of norAbuMDP. *Journal of Controlled release* 160: 374 – 381.

56. **Křupka M., Raška M., Běláková J., Horynová M., Novotný R., Weigl E.** (2007): Biological aspects of Lyme Disease spirochetes: Unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. *Biomedical Papers* 151(2): 175 – 186.
57. **Křupka M., Raška M., Weigl E.** (2008): Lymeská borelióza – biologie, patogeneze, diagnostika a léčba. *Dermatologie pro praxi* 2(5–6): 236 – 239.
58. **Křupka M., Strojil J., Raška M.** (2014): Současné možnosti diagnostiky, léčby a prevence lymeské boreliózy. *Praktické lékařnictvo* 4(2-3): 79 – 82.
59. **Křupka M., Zachová K., Weigl E., Raška M.** (2011): Prevention of Lyme Disease: promising research or Sisyphean task? *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 59: 261 – 275.
60. **Larsson Ch., Bergstrom S.** (2008): A novel and simple method for laboratory diagnosis of relapsing fever orreliosis. *The Open Microbiology Journal* 2: 10 – 12.
61. **Lindgren E., Jaenson T. G. T.** (2006): Pathogen transmission cycle. In: Lindgren E., Jaenson T. G. T.: Lyme borreliosis in Europe: Influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. World Health Organization Europe paper, Geneva. Navštíveno dne: 29. 3. 2017. Dostupné z: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0006/96819/E89522.pdf
62. **Magnarelli L. A., Anderson J. F.** (1988): Ticks and biting insects infected with the etiologic agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Microbiology* 26(8): 1482 – 1486.
63. **Malawista S. E., de Boisfleury Chevance A.** (2008): Clocking the Lyme Spirochete. *PLOS One* 3(2): e1633.
64. **Marques A. R.** (2015): Laboratory diagnosis of Lyme Disease: Advances and challenges. *Infectious Disease Clinics of North America* 29: 295 – 307.
65. **Mejlon H. A.** (1997): Diel activity of *Ixodes ricinus* Acari: Ixodidae at two locations near Stockholm, Sweden. *Experimental & Applied Acarology* 21: 247 – 255.
66. **Miklossy J., Kasas S., Zurn A. D., McCall S., Yu S., McGeer P. L.** (2008): Persisting atypical and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and local inflammation in Lyme neuroborreliosis. *Journal of Neuroinflammation* 5:40, 1176 – 1194.
67. **Národní ústav odborného vzdělávání** (2010): Charakteristiky jednotlivých metod a forem výuky. Praha. Navštíveno dne: 5. 4. 2017. Dostupné z: http://www.nuov.cz/uploads/AE/evaluacni_nastroje/manual_archu.pdf

68. **Nezvalová, D.** (2006): Výukový proces (Vybrané didaktické kategorie). Evropský sociální fond v ČR. Praha. Navštíveno dne: 5. 4. 2017. Dostupné z: http://esfmoduly.upol.cz/texty/vyuk_proces.pdf
69. **Nigrovic L. E., Thompson K. M.** (2007): The Lyme valine: a cautionary tale. *Epidemiology & Infection* 135(1): 1 – 8.
70. **Noguchi H.** (1912): The pure cultivation of *Spirochaeta duttni*, *Spirochaeta kochi*, *Spirochaeta obermeieri* and *Spirochaeta novyi*. *Laboratories of The Rockefeller Institute for Medical Research* 16(2): 199 – 210.
71. **Oliver J. H., Lin T., Gao L., Clark K. L., Banks C. W., Durden L. A., James A. M., Chandler F. W.** (2003): An enzootic transmission cycle of Lyme borreliosis spirochetes in the southeastern United States. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(20): 11642 – 11645.
72. **Pícha D.** (2013): Patogeneze. In: Bartůněk P., Bojar M., Calda P., Diblík P., Hergocogová J., Hoza J., Hulínská D., Janovská D., Pícha D., Valešová M.: Lymeská borelióza. Grada Publishing, a.s., Praha.
73. **Pleyer U., Priem S., Bergmann L., Burmester G., Hartmann Ch., Krause A.** (2001): Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine of patients with ocular Lyme borreliosis. *British Journal of Ophthalmology* 85: 552 – 555.
74. **Pollack R. J., Telford S. R., Spielman A.** (1993): Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. *Journal of Clinical Microbiology* 31: 1251 – 1255.
75. **Preac-Mursic V., Weber K., Pfister H. W., Wilske B., Gross B., Baumann A., Prokop J.** (1989): Survival of *Borrelia burgdorferi* in antibioticly treated patients with Lyme borreliosis. *Infection* 17: 355 – 359.
76. **Preac-Mursic V., Wilske B., Patsouris E., Jauris S., Will G., Soutschek E., Eainhardt S., Lehnert G., Klockmann U., Mehraein P.** (1992): Active immunization with pC protein of *Borrelia burgdorferi* protects gerbils against *B. burgdorferi* infection. *The Journal of Infectious Diseases* 20(6): 342 – 349.
77. **Pretorius A. M., Jensenius M., Carke F., Ringertz S. H.** (2003): Repellent efficacy of DEET and KBR 3023 against *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 40(2): 245 – 248.
78. **Probert W. S., Craford M., Cadiz R. B., Le Febvre R. B.** (1997): Immunization with outer surface protein (Osp) A, but not OspC, provides cross-protection mce

- challenged with North American isolates of *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of Infectious Diseases* 175: 400 – 405.
79. **Prymula R.** (2009): Nové trendy v očkování. *Interní medicína pro praxi* 11(2): 66 – 70.
 80. **Rámcový vzdělávací program základní vzdělávání** (2016): Člověk a příroda. Výzkumný ústav pedagogický v Praze. Praha. Navštíveno dne: 5. 4. 2017. Dostupné z: < http://www.nuv.cz/uploads/RVP_ZV_2016.pdf>
 81. **Reed K. D.** (2002): Laboratory Testing for Lyme Disease: Possibilities and practicalities. *Journal of Clinical Microbiology* 40(2): 319 – 324.
 82. **Richter D., Matuschka F. R., Spielman A., Mahadevan L.** (2013): How ticks get under your skin: insertion mechanics of the feeding apparatus of *Ixodes ricinus* ticks. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280: 1 – 6.
 83. **Roháčová H.** (2012): Lymeská borrelióza. *Interní medicína pro praxi* 14(5): 203 – 205.
 84. **Rosa P. A., Tilly K., Stewart P. E.** (2005): The burgeoning molecular genetics of the Lyme Disease spirochaete. *Nature Reviews Microbiology* 3: 129 – 143.
 85. **Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L., Oliver J. H.** (2011): Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2(3): 123 – 128.
 86. **Salafsky B., He Y. X., Li J., Shibuya T., Ramaswamy K.** (2000): Short report: study on the efficacy of a new long-acting formulation of N, N-diethyl-m-toluamide (DEET) for the prevention of tick attachment. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62(2): 169 – 172.
 87. **Santino I., Dastoli F., Sessa R., Del Piano M.** (1997): Geographical Incidence of Infection with *Borrelia burgdorferi* in Europe. *Panminerva Medica* 39: 208 – 214.
 88. **Santos M., Júnior V. H., Ribeiro-Rodrigues R., Talhari S.** (2010): Lyme boreliosis. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 85(6): 930 – 938.
 89. **Seemanapalli S. V., Xu Q., Mc Shan K., Liang F. T.** (2010): Outer surface protein C is a dissemination-facilitating factor of *Borrelia burgdorferi* during mammalian infection. *PLoS ONE* 5: e15830.
 90. **Shin S.** (2014): Insight into the pathogenesis of Lyme disease. *Journal of Bacteriology and Virology* 44(1): 10 – 22.

91. **Schaible U. E., Kramer M. D., Eichmann K., Modolell M., Museteanu C., Simon M. M.** (1990): Monoclonal antibodies specific for the outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi* prevent Lyme borreliosis in severe combined immunodeficiency (scid) mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87(10): 3768 – 3772.
92. **Schaible U. E., Wallich R., Kramer M. D., Gern L., Anderson J. F., Museteanu C., Simon M. M.** (1993): Immune sera to individual *Borrelia burgdorferi* isolates or recombinant OspA thereof protect SCID mice against infection with homologous strains but only partially or not at all against those of different OspA/OspB genotype. *Vaccine* 11: 1049 – 1054.
93. **Schlesinger P. A., Duray P. H., Burke B. A., Steere A. C., Stillman M. T.** (1985): Maternal-fetal transmissions of the Lyme Disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Annals of Internal Medicine* 103(1): 67 – 68.
94. **Schroeder H. W., Cavacini L.** (2010): Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125(2 0 2): 41 – 52.
95. **Schwan T. G., Piesman J.** (2002): Vector interaction and molecular adaptations of Lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. *Emerging Infectious Diseases journal* 8(2): 115 – 121.
96. **Sigal L. H.** (1999): Lyme Disease and the Lyme Disease vaccines. *Bulletin on the Rheumatic Diseases* 48: 1 – 4.
97. **Sigal L. H., Zahradnik J. M., Lavin P., Patella S. J., Bryant G., Haselby R., Holton E., Kunkel M., Adler-Klein D.** (1998): A vaccine consisting of recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A to prevent Lyme Disease. *The New England Journal of Medicine* 339: 216 – 222.
98. **Simon M. M., Wallich R., Kramer M. D.** (1996): *Borrelia burgdorferi* infection of inbred strains of mice provides insights into cellular and molecular parameters of pathogenesis and protection of Lyme disease: A viewpoint. *Journal of spirochetel and tick-borne diseases* 3: 45 – 52.
99. **Stanek G., Strle F., Gray J., Wormser G. P.** (2002): History and characteristics of Lyme borreliosis. In: Grey J., Kahl O., Lane R. S., Stanek G.: Lyme borreliosis – biology, epidemiology and control. Cabi Publishing, Wallingford.
100. **Stanek G., Wormser G. P., Gray J., Strle F.** (2012): Lyme borreliosis. *Lancet* 379: 461 – 473.

101. **Steere A. C., Broderick T. F., Malawista S. E.** (1978): *Erythema chronicum migrans* and Lyme arthritis: Epidemiologic evidence for a tick vector. *American Journal of Epidemiology* 108: 312 – 321.
102. **Steere A. C., Coburn J., Glickstein L.** (2004): The emergence of Lyme disease. *The Journal of Clinical Investigations* 113: 1093 – 1101.
103. **Stoenner H. G., Dodd T., Larson C.** (1982): Antigenic variation of *Borrelia hermsii*. *Journal of Experimental Medicine* 156: 1297 – 1311.
104. **Strobino B. A., Williams C. L., Abid S., Chalson R., Spierling P.** (1993): Lyme disease and pregnancy outcome: A prospective study of two thousand parental patients. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 169: 367 – 374.
105. **Sykes R. A.** (2014): An estimate of Lyme borreliosis incidence in Western Europe. *Journal of the Royal Medical Society* 22(1): 76 – 87.
106. **Templeton T. J.** (2004): *Borrelia* outer membrane surface proteins and transmission through the tick. *Journal of Experimental Medicine* 199(5): 603 – 606.
107. **Tilly K., Rosa P. A., Stewart P. E.** (2008): Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infectious Disease Clinics of North America* 22(2): 217 – 234.
108. **Valešová M.** (2013) Postižení kloubů. In: Bartůněk P., Bojar M., Calda P., Diblík P., Hergocogová J., Hoza J., Hulínská D., Janovská D., Pícha D., Valešová M.: *Lymeská borelióza*. Grada Publishing, a.s., Praha.
109. **Vasudevan B., Chatterjee M.** (2013): Lyme borreliosis and skin. *Indian Journal of Dermatology* 58(3): 167 – 174.
110. **Volf P., Horák P.** (2007): *Čeled' Ixodidae (klíšťovití)*. In: Volf P., Horák P.: *Paraziti a jejich biologie*. Nakladatelství Triton s.r.o., Praha.
111. **Von Lackum K., Stevenson B.** (2005): Carbohydrate utilization by the Lyme borreliosis spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *FEMS Microbiology Letters* 243(1): 197 – 179.
112. **Vyhláška Ministerstva zdravotnictví č. 106/2001 Sb.:** O hygienických požadavcích na zotavovací akce pro děti, ve znění pozdějších předpisů. In: ASPI [právní informační systém]. Wolters Kluwer ČR. Navštíveno dne 5. 4. 2017.
113. **Wang I. N., Dykhuizen D. E., Qiu W., Dunn J. J., Bosler E. M., Luft B.** (1999): Genetic diversity of OspC in a local population of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *Genetic* 151: 15 – 30.

114. **Widhe M., Jarefors S., Erkefelt C., Vrethem M., Bernstöm S., Forsberg P., Ernerudh J.** (2004): *Borrelia*-Specific interferon- γ and interleukin-4 secretion in cerebrospinal fluid and blood during Lyme borreliosis in humans: association with clinical outcome. *The Journal of Infectious Diseases* 189: 1881 – 1891.
115. **Williams C. L., Beach J. L., Curran A. S., Spierling P.** (1988): Lyme disease during pregnancy: A cord blood serosurvey. *Annals of the New York Academy of Sciences* 539: 504 – 506.
116. **Wilske B., Fingerle V., Schulte-Spechtel U.** (2006): Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 49: 13 – 21.
117. **Wilske B., Preac-Mursic V., Jauris S., Hofmann A., Pradel I., Soutschek E., Schwab E., Will G., Wanner G.** (1993): Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 61: 2182 – 2191
118. **Wormser F. P., O'Connell S.** (2011): Treatment of infection caused by *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Expert review of Anti-infective Therapy* 9(2), 245 – 260.
119. **Wormser G. P., Dattwyler R. J., Shapiro E. D., Halperin J. J., Steere A. C., Klempner M. S., Krause P. J., Bakken J. S., Strle F., Stanek G., Bockenstedt L., Fish D., Dumler J. S., Nadelman R.** (2006): The clinical assesment, treatment, and prevention of Lyme Disease, human granulocytic Anaplasmosis, and Babesiosis: clinical practise guidelines by the infectious diseases dociety of America. *Clinical Infectious Diseases* 43: 1089 – 1134.
120. **Wormser G. P., Nadelman R. B., Dattwyler R. J., Dennis D. T., Shapiro E. D., Steere A. C., Rush T. J., Rahn D. W., Coly P. K., Persing D. H., Fish D., Luft B. J.** (2000): Practice guidelines for the treatment of Lyme Disease. *Clinical Infectious Diseases* 31: 1 – 14.
121. **Xu Q., McShan K., Liang F. T.** (2010): Two regulatory elements required for enhancing OspA expression in *Borrelia burgdorferi* grown in vitro but repressing its expression during mammalian infection. *Microbiology* 156: 2194 – 2204.
122. **Yoshinari N. H., Mantovani E., Bonoldi V. L. N., Marangoni R. G., Gauditano G.** (2010): Brazilian Lyme-like disease or Baggio-Yoshinari syndrome: Exotic and emerging Brazilian tick-borne zoonosis. *Revista Da Associacao Medica Brasileira* 56(3): 363 – 369.

PŘÍLOHY

- informační leták pro žáky 2. stupně základních škol
- poster z XXXIII. sjezdu českých a slovenských alergologů a klinických imunologů

Příloha I (autor: Kateřina Bundilová)



Obr. 1

✓ Co je to Lymeská borelióza?

Lymeská borelióza je onemocnění **způsobené bakteriemi**, které přenáší roztoci – **klíšťata**. Tyto bakterie se do těla dostanou při přisátí klíštěte. Je to nejčastější nemoc přenášaná členovci ve světě, a pokud není léčena, může způsobovat vleklé zdravotní problémy.

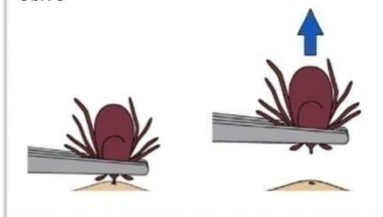
✓ Jak jí předcházet?

Nejlepší prevencí je kontrola **těla po každém pobytu v přírodě**. Dále nošení **dlouhého rukávu a kalhot**, ideálně **světlé barvy** pro snazší detekci klíšťat. Nymfy a larvy jsou tak malé, že je mnohdy velmi snadné je přehlédnout. **Kontrolu těla je proto nutné provádět pořádně!**

Obr. 2



Obr. 3



✓ Co dělat, když už najdu přisáté klíště?

Jakmile najdeš přisáté klíště, je zapotřebí jej **co nejrychleji odstranit**. Nejlepším způsobem je uchopit klíště pinzetou těsně za místem vkuasu a **opatrně jej vytrhnout**. Ústní ústrojí klíštěte vypadá jako rovná pilka, proto **nená smysl s klíštětem zbytečně kroutit**.

✓ Varovné signály

To, že jsi našel přisáté klíště, ještě neznamená, že jsi nakažený lymeskou boreliózou! Je ale zapotřebí, abys místo, kde klíště bylo, pravidelně několik dní **kontroloval**. Malé zarudnutí je běžné a normální. Pokud se ale objeví **skvrna, která vypadá trochu jako střelecký terč**, navštiv co nejdříve svého ošetřujícího lékaře. To samé platí, pokud se u tebe s odstupem času objeví **necitlivost ve tváři, pokleslý koutek úst** nebo například **otok** (koleno, kotník, atd.). Neměl bys podceňovat ani **výraznější únavu, bolesti hlavy, svalů či kloubů**. Borelióza má mnoho způsobů, kterými se může projevit!



Obr. 4



Obr. 5

✓ Jak se léčí?

Proti borelióze zatím neexistuje žádná vakcína, která by tě mohla ochránit. **Nejdůležitější je proto prevence!** Když už ti lékař z krve zjistí, že boreliózu máš, pravděpodobně dostaneš antibiotika, které budeš brát asi dva týdny. V takovém případě by tvé příznaky měly brzy vymizet **bez trvalých následků či vleklých problémů**.

✓ Kde se v České republice nachází nejvíce infikovaných klíšťat?

Nejvíce infikovaných klíšťat lze nalézt v okresech **Kutná Hora, Písek a Uherské Hradiště**. To však neznamená, že se boreliózou nemůžeš nakazit ani v místě, kde je její výskyt nižší. Dáváš si proto **pozor na všech travnatých loukách, v listnatých ale i jehličnatých lesích**, a to hlavně mezi **jarem a podzimem**, kdy je aktivita klíšťat největší.



Obr. 6

Obr. 1: <http://www.nd.nl/Uploads/2016/12/IMG-p24Iricinusvrouwtjeinhetgras.original.jpg> [online] [cit. 2017-04-12] - upraveno

Obr. 2: http://www.pittwateranimalhospital.com.au/images/ticks_02-left.png [online] [cit. 2017-04-12] - upraveno

Obr. 3: <https://www.cdc.gov/ticks/images/removal-ab.jpg> [online] [cit. 2017-04-12] - upraveno

Obr. 4: http://eva8.co.uk/skin/common_files/images/news/icons/TickAlert_200.jpg [online] [cit. 2017-04-12] - upraveno

Obr. 5: <https://www.cdc.gov/lyme/images/lyme-symptoms.jpg> [online] [cit. 2017-04-12] - upraveno

Obr. 6: https://www.kliste.cz/images/upload/borel_okresy_2016.jpg [online] [cit. 2017-04-12]

Rekombinantní polyepitop odvozený od vybraných antigenních variant proteinu OspC *Borrelia burgdorferi* sensu lato indukuje na myším modelu specifickou protilátkovou odpověď proti širokému spektru kmenů *Borrelie*



Křupka M.^{1,*}, Březíková K.¹, Bundilová K.¹, Barkociová L.¹, Mašek J.², Lukáč R.², Vrzal V.³, Nepeřený J.³, Turánek J.², Raška M.¹

1 - Ústav imunologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

2 - Oddělení farmakologie a imunoterapie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

3 - Bioveta a.s., Ivanovice na Hané

*krupka.olomouc@gmail.com

Úvod

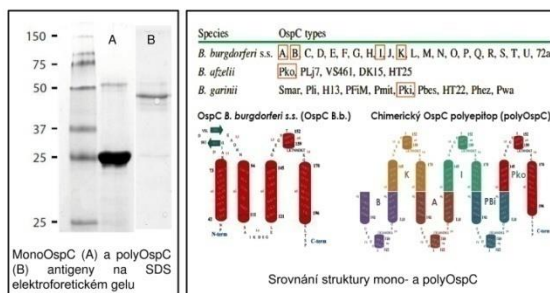
Lymeská borelióza je multisystémové onemocnění způsobované spirochetami druhového komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) a přenášené klišaty. U části pacientů i po jejím prodělání přetrvávají chronické zdravotní problémy s nejasnou etiologií. Vývoj vakcíny je značně komplikován výraznou variabilitou v rámci komplexu *B. burgdorferi* s.l. Dosud bylo popsáno nejméně 9 druhů patogenních pro člověka, výrazná je ale také variabilita vnitrodruhová. U námi testovaného antigenu OspC (outer surface protein C) bylo dosud popsáno cca 40 sekvenčně odlišných variant, pro konstrukci široce protektivní vakcíny tak bude nutné do složení zahrnout několik antigenních typů proteinu¹⁾.

V naší studii jsme testovali vlastnosti rekombinantního polyepitopu obsahujícího C-terminální motivy 6 typů OspC a srovnali jeho imunogenní vlastnosti s monovalentním rekombinantním antigenem OspC *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.).

Metodika

Sekvence genu pro monovalentní OspC (monoOspC) byla získána pomocí PCR²⁾, sekvence pro polyepitopový antigen (polyOspC) byla připravena synteticky. Oba proteiny byly exprimovány v *E. coli* BL21 (DE3) a purifikovány pomocí afinitní chromatografie. Z purifikovaného antigenu byly odstraněny rezidua lipopolisacharidu pomocí fázové extrakce do detergentu Triton X-114. Identita proteinů byla potvrzena pomocí MALDI-TOF.

Oba proteiny byly použity k vakcinaci laboratorních myší kmene Balb/c, ♀, 20 – 25g, 5 kusů ve skupině. Jako adjuvans byl použit hydroxid hliníkový. Vakcinace byla po 14 dnech zopakována a za dalších 14 dní byly odebrány vzorky.



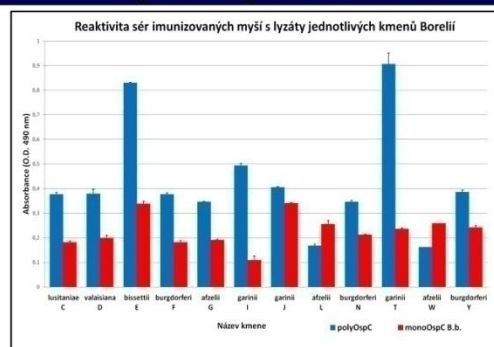
Jednotlivé kmeny *B. burgdorferi* s. l. byly kultivovány v BSK mediu při 34°C, promyty a lyzovány pomocí ultrazvuku. Lyzát byl použit na coating ELISA desek (koncentrace proteinu 10 µg/ml).

Reaktivita sér byla stanovena pomocí ELISA testu za použití sekundární protilátky značené HRP. Stanovení bylo provedeno v dubletu a výsledek vyjádřen jako absorbance při ředění séra 1:2000.

Použité bakteriální kmeny

- C - *B. lusitanae*, kmen CIP 105366
- D - *B. valaisiana*, kmen CIP 105367
- E - *B. bissettii*, kmen CIP 109136
- F - *B. burgdorferi* s.s., kmen DSM 4681
- G - *B. afzelii*, DSM 10508, typový kmen
- I - *B. garinii*, terénní izolát, Brno
- J - *B. garinii*, terénní izolát, Brno
- L - *B. afzelii*, terénní izolát, České Budějovice
- N - *B. burgdorferi* s.s., terénní izolát, České Budějovice
- T - *B. garinii*, terénní izolát, Brno
- W - *B. afzelii*, kmen DSM 16073
- Y - *B. burgdorferi* s.s., kmen SCW-53

Výsledky a diskuze



Pomocí rekombinantní technologie s expresí v *E. coli* a následně purifikace se podařilo získat oba antigeny v dostatečné kvantitě i kvalitě pro vakcinační testy.

Séra myší vakcinovaných polyOspC vykazovala vyšší reaktivitu s 10 z 12 testovaných kmenů, což ukazuje na potenciál při vývoji vakcíny poskytující reaktivitu k širokému spektru patogenních *Borrelie*. Nižší byla u polyOspC reaktivita se dvěma ze tří sledovaných kmenů druhu *B. afzelii*. Tento jev je pravděpodobně způsoben antigenní odlehlostí těchto kmenů od kmene Pko, jehož sekvence byla použita pro konstrukci polyOspC.

Poděkování

Projekt byl podpořen studentským grantem Lékařské fakulty UP LF_2016_011

Literatura:

- 1) Krupka M., Zachova K., Weigl E., Raska M. (2011) Prevention of lyme disease: promising research or sisyphian task? Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 59(4):261-75.
- 2) Krupka M., Masek J., Barkociová L. et al. (2016) The Position of His-Tag in Recombinant OspC and Application of Various Adjuvants Affects the Intensity and Quality of Specific Antibody Response after Immunization of Experimental Mice. PLoS One. e0148497.