

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovateli povinen řádně ocitovat.

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: biologie

Studijní obor: imunologie



**Bc. Tereza Prokopová**

*In vitro* test buněčné imunitní odpovědi pro diagnostiku Lymeské boreliózy  
Lyme borreliosis diagnostics using *in vitro* cellular immune response testing

Diplomová práce

Vedoucí práce/Školitel: RNDr. Karel Drbal, Ph.D.

Praha 2017

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Karla Drbala, Ph.D. a všechny informační zdroje jsem řádně citovala.

V Praze dne 15. 8. 2017

Tereza Prokopová

## Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat všem, kteří mi pomáhali během zpracování této diplomové práce. V první řadě poděkuji pracovníkům katedry buněčné biologie, kde největší dík patří mému školiteli **Karlu Drbalovi**, který byl vždy ochotný zodpovědět mi dotazy týkající se mých experimentů a vše mi trpělivě vysvětlil. Děkuji **Jozefu Jandovi**, který mi pomáhal s cytometrickým měřením. Poděkovat bych také chtěla **Valérii Grobárové**, **Janu Pačesovi**, **Abhishkovi Koladiyovi**, kteří mi byli zejména velkou psychickou podporou. Poděkování si zaslouží také **Ilaria Piga**, která mě podporovala na dálku z Itálie a **Ondřej Šásek** za podporu ze Spořilova. Děkuji **Janu Martínkovi** za spolupráci při detekci borelií v rámci letního soustředění na Běstvině. Děkuji také **Franzisce Rüger**, která se se mnou z části podílela na stanovení boreliálního genotypu, **Kasperu Sjödinovi**, který navrhl primer specifický pro boreliální gen *ospA* a děkuji také **Petře Hadlové**, se kterou jsem optimalizovala buněčný aktivační test.

Dále bych chtěla poděkovat lidem, kteří nejsou pracovníky katedry a bez kterých by nevznikla část mé práce zabývající se detekcí klíštěcí koinfekce. Děkuji **Ladislavu Burýškovi** (Protean s r.o., České Budějovice) za poskytnutí vzorků klíštěcích gDNA a sady primerů pro geny boreliální virulentních faktorů. Děkuji **Adamu Bemisovi** (Bio-Rad Laboratories, CA, Inc-Pleasanton, CA, United States), který mi poskytl primery pro molekulární typizaci.

# Obsah

ÚVOD.....	1
LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	2
Onemocnění Lymeské boreliózy.....	2
Klíště jako ekosystém.....	2
<b>Bakterie rodu <i>Borrelia</i> spp. ....</b>	<b>3</b>
Boreliální povrchové proteiny .....	3
Molekulární charakterizace borelií .....	4
<b>Propuknutí a manifestace Lymeské boreliózy .....</b>	<b>6</b>
Faktory ovlivňující propuknutí Lymeské boreliózy.....	6
Klinické manifestace .....	7
<b>Diagnostika Lymeské boreliózy.....</b>	<b>10</b>
Sérologie.....	10
Buněčná odpověď.....	13
Přímá detekce patogena .....	15
<b>CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>16</b>
<b>MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>17</b>
<b>Biologický materiál.....</b>	<b>17</b>
Izolovaná genomická DNA z klíšťat a proteiny pro buněčnou aktivaci .....	17
Krev .....	17
Primery .....	18
<b>Nukleotidové sekvence .....</b>	<b>27</b>
<b>Chemický a spotřební materiál .....</b>	<b>30</b>
Roztoky.....	30
Protilátky .....	30
Chemikálie.....	30
Ostatní spotřební materiál.....	31
<b>Metody.....</b>	<b>32</b>
Bioinformatická část.....	32
Bioinformatická kontrola konzervovanosti vybraných virulentních faktorů .....	32

Návrh primerů.....	33
Mapování primerů na sekvence genů .....	34
<b>Stanovení kvality gDNA.....</b>	<b>35</b>
<b>PCR z klíšťat.....</b>	<b>35</b>
<b>Digital droplet PCR.....</b>	<b>36</b>
<b>Detekční limit metody digital droplet PCR.....</b>	<b>42</b>
<b>Průtoková cytometrie .....</b>	<b>43</b>
Příprava buněk .....	43
Fluorescenční značení a měření .....	44
<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>46</b>
<b>Detekce boreliální DNA v gDNA pocházející z klíšťat.....</b>	<b>46</b>
<b>PCR z klíšťat.....</b>	<b>46</b>
<b>Detekce boreliové koinfekce v gDNA pocházející z klíšťat.....</b>	<b>47</b>
<b>Detekční limit metody ddPCR.....</b>	<b>49</b>
<b>Analýza nukleotidové variability vybraných virulentních faktorů .....</b>	<b>50</b>
<b>Návrh primeru .....</b>	<b>56</b>
<b>Průtoková cytometrie.....</b>	<b>57</b>
<b>DISKUZE.....</b>	<b>59</b>
<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>64</b>
<b>LITERATURA.....</b>	<b>65</b>

## Seznam obrázků a tabulek

OBRÁZEK 1: KLINICKÉ MANIFESTACE LYMESKÉ BORELIÓZY.....	2
OBRÁZEK 2: GEOGRAFICKÁ DISTRIBUCE KLÍŠŤAT RODU IXODES, KTERÁ PŘENÁŠEJÍ LIDSKÉ PATOGENY.....	3
OBRÁZEK 3: TRANSMISE BORELIE Z KLÍŠŤĚTE DO HOSTITELE.....	5
OBRÁZEK 4: ÚČINNOST PŘENOSU BORELIÍ.....	6
OBRÁZEK 5: SENZITIVITA A SPECIFITA SÉROLOGICKÉHO TESTOVÁNÍ.....	11
OBRÁZEK 6: MULTIPLEXOVÉ TESTOVÁNÍ 5 ANTIGENŮ.....	12
OBRÁZEK 7: PRŮBĚH BUNĚČNÉ DEGRANULACE.....	14
OBRÁZEK 8: SENZITIVITA DETEKCE BORELIÍ PCR METODOU.....	15
OBRÁZEK 9: MECHANISMUS VIZUALIZACE PCR PRODUKTU.....	19
OBRÁZEK 10: NAMAPOVANÉ PRIMERY PRO GEN <i>ospA</i> .....	20
OBRÁZEK 11: NAMAPOVANÉ PRIMERY PRO GEN <i>dbpA</i> .....	21
OBRÁZEK 12: NAMAPOVANÉ PRIMERY PRO GEN <i>16S rDNA</i> .....	22
OBRÁZEK 13: NAMAPOVANÉ PRIMERY PRO GEN <i>16S rDNA</i> .....	24
OBRÁZEK 14: NAMAPOVANÉ PRIMERY PRO GEN <i>16S rDNA</i> .....	25
OBRÁZEK 15: NAMAPOVANÉ PRIMERY PRO GEN <i>16S rDNA</i> .....	26
OBRÁZEK 16: PRINCIP DIGITAL DROPLET PCR.....	37
OBRÁZEK 17: DETEKCE <i>B. BURGENDORFERI</i> .....	38
OBRÁZEK 18: DETEKCE BORELIÁLNÍ DNA S POUŽITÍM KONZERVOVANÉHO PRIMERU.....	39
OBRÁZEK 19: DETEKCE <i>B. GARINII</i> .....	39
OBRÁZEK 20: DETEKCE GENU <i>dbpA</i> .....	40
OBRÁZEK 21: POZITIVNÍ A NEGATIVNÍ ZÁCHYT <i>16S rDNA</i> .....	41
OBRÁZEK 22: PANEL PROTILÁTEK PRO SLEDOVÁNÍ FENOTYPU A DEGRANULACE.....	44
OBRÁZEK 23: GATOVACÍ STRATEGIE.....	45
OBRÁZEK 24: PCR Z KLÍŠŤAT.....	46
OBRÁZEK 25: DETEKCE BORELIÁLNÍHO GENOTYPU.....	47
OBRÁZEK 26: KONCENTRAČNÍ ZÁVISLOST POČÁTEČNÍHO MNOŽSTVÍ GDNA NA POČTU KOPIÍ GENU.....	48
OBRÁZEK 27: NUKLEOTIDOVÁ KONZERVOVANOST GENU <i>ospA</i> .....	52
OBRÁZEK 28: NUKLEOTIDOVÁ KONZERVOVANOST GENU <i>ospC</i> .....	55
OBRÁZEK 29: REPREZENTATIVNÍ ZOBRAZENÍ POPULACÍ BUNĚK PO AKTIVACI S PMA/IONOMYCINEM V RŮZNÝCH ČASECH PO AKTIVACI.....	58

TABULKA 1: FIRMOU PROTEAN S R.O. DODANÉ VZORKY KLÍŠTĚCÍ GDNA A PEPTIDŮ. ....	17
TABULKA 2: POUŽITÉ PRIMERY. ....	18
TABULKA 3: NCBI GENE BANK PŘÍSTUPOVÁ ČÍSLA NUKLEOTIDOVÝCH SEKVENCÍ <i>OSPA</i> PRO <i>B. AFZELII</i> . ....	27
TABULKA 4: NCBI GENE BANK PŘÍSTUPOVÁ ČÍSLA NUKLEOTIDOVÝCH SEKVENCÍ <i>OSPA</i> PRO <i>B. BURG DORFERI</i> . ....	27
TABULKA 5: NCBI GENE BANK PŘÍSTUPOVÁ ČÍSLA NUKLEOTIDOVÝCH SEKVENCÍ <i>OSPA</i> PRO <i>B. GARINII</i> . ....	27
TABULKA 6: NCBI GENE BANK PŘÍSTUPOVÁ ČÍSLA NUKLEOTIDOVÝCH SEKVENCÍ <i>OSPC</i> PRO <i>B. AFZELII</i> . ....	27
TABULKA 7: NCBI GENE BANK PŘÍSTUPOVÁ ČÍSLA NUKLEOTIDOVÝCH SEKVENCÍ <i>OSPC</i> PRO <i>B. BURG DORFERI</i> . ....	28
TABULKA 8: NCBI GENE BANK PŘÍSTUPOVÁ ČÍSLA NUKLEOTIDOVÝCH SEKVENCÍ <i>OSPC</i> PRO <i>B. GARINII</i> . ....	28
TABULKA 9: NCBI GENE BANK PŘÍSTUPOVÁ ČÍSLA NUKLEOTIDOVÝCH SEKVENCÍ <i>DBPA</i> PRO <i>B. AFZELII</i> . ....	28
TABULKA 10: NCBI GENE BANK PŘÍSTUPOVÁ ČÍSLA NUKLEOTIDOVÝCH SEKVENCÍ <i>DBPA</i> PRO <i>B. BURG DORFERI</i> . ....	28
TABULKA 11: NCBI GENE BANK PŘÍSTUPOVÁ ČÍSLA NUKLEOTIDOVÝCH SEKVENCÍ <i>DBPA</i> PRO <i>B. GARINII</i> . ....	29
TABULKA 12: NCBI GENE BANK PŘÍSTUPOVÁ ČÍSLA NUKLEOTIDOVÝCH SEKVENCÍ PRO NÁVRH PRIMERŮ <i>OSPC</i> . ....	29
TABULKA 13: SLOŽENÍ PCR REAKČNÍ SMĚSI. ....	35
TABULKA 14: PCR REAKČNÍ PODMÍNKY. ....	35
TABULKA 15: SLOŽENÍ REAKČNÍ SMĚSI ZA POUŽITÍ BIO-RAD PRIMERŮ S PRÓBOU. ....	37
TABULKA 16: SLOŽENÍ REAKČNÍ SMĚSI ZA POUŽITÍ KLASICKÝCH PRIMERŮ A INTERKALAČNÍHO BARVIVA EVAGREEN. ....	37
TABULKA 17: PODMÍNKY DDPCR AMPLIFIKACE. ....	37
TABULKA 18: LIMITNÍ PRAHY PRO ODEČET SIGNÁLU U DDPCR REAKCE S POUŽITÍM PRÓBOVÉHO TYPU TESTU. ....	40
TABULKA 19: LIMITNÍ PRAHY PRO ODEČET SIGNÁLU U DDPCR REAKCE S POUŽITÍM PRIMERU A BARVIVA EVAGREEN. ....	40
TABULKA 20: AKTIVAČNÍ ČINIDLA A PROTILÁTKY. ....	43
TABULKA 21: DETEKČNÍ LIMIT DDPCR. ....	49
TABULKA 22: NAVRŽENÉ PRIMERY PRO GENY <i>OSPA</i> A <i>OSPC</i> . ....	56



## Abstrakt

Lymeská borelióza je multisystémové onemocnění postihující kůži, klouby, srdce a centrální nervovou soustavu. Onemocnění způsobují spirochéty patřící do komplexu *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Tyto bakterie jsou přenášeny klíšťaty rodu *Ixodes*. V roce 2016 bylo v České republice evidováno téměř 4000 nově nakažených osob. Současná sérologická diagnostika Lymeské boreliózy není dostatečně senzitivní ani specifická a nekoreluje s patologií onemocnění v časně ani v pozdní fázi. Pro správnou diagnostiku onemocnění je nezbytné detekovat patogena spolu s jeho genotypem.

Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na dva cíle. Metodou digital droplet PCR (ddPCR) jsme detekovali boreliovou DNA spolu s boreliovým genotypem. Byl stanoven detekční limit detekce boreliové DNA ve vzorcích gDNA izolovaných z klíšťat. Detekční limit se při počátečním množství 1 ng gDNA v reakci pohybuje v řádu  $10^{-17}$  g specifické boreliální DNA. Boreliová koinfekce byla detekována v 5 z 12 testovaných vzorků. Nejvíce zastoupeným druhem byla *B. garinii*, jejíž přítomnost jsme detekovali v 5 vzorcích. Na základě publikovaných sekvencí genů pro virulentní faktory byly navrženy specifické primery do konzervovaných úseků genů pro PCR tak, abychom amplifikovali jejich variabilní segmenty. Genová variabilita bude následně monitorována pomocí sekvenace.

Alternativou k současné klinické diagnostice Lymeské boreliózy jsou degranulační testy. Ty se již pro detekci jiných patogenů používají. Proto jsme se zaměřili na otestování buněčné degranulace vyvolané boreliovými virulentními faktory. Nepodařilo se nám optimalizovat pozitivní kontrolu aktivace buněk, proto jsme nezískali žádná hodnotitelná data.

**Klíčová slova:** Lymeská borelióza, boreliální koinfekce, virulentní faktory, digital droplet PCR, detekční limit, genová konzervovanost, genová variabilita, buněčná degranulace

## Abstract

Lyme borreliosis is a multisystemic disease affecting skin, joints, heart and central nervous system. The disease is caused by spirochetes of *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex. These bacteria are spread by ticks of *Ixodes* genus. In 2016 there were almost 4,000 newly infected individuals reported in the Czech Republic. Contemporary serological diagnostics of Lyme borreliosis is not sensitive nor specific enough and does not even correlate with the pathology of the disease in the early or late phases. For the correct diagnosis of the disease it is necessary to detect the pathogen and its genotype.

For this reason we had aimed at two goals. Through the digital droplet PCR (ddPCR) method we detected *Borrelia*-specific DNA and its genotype. The detection limit of borrelial DNA was set on gDNA samples isolated from the tick. Detection threshold for the initial amount of 1 ng of tick gDNA is at the range of  $10^{-17}$  g of specific borrelial DNA. *Borrelia* spp. coinfection was detected in 5 out of 12 tested samples. The most frequent type was *B. garinii* which was detected in 5 samples. On the basis of published sequences for virulent factors we have designed specific primers in conserved regions of the genes flanking their variable segments to be PCR amplified. Gene variability will be monitored through sequencing.

An alternative to the current clinical diagnostics of Lyme borreliosis is a degranulation test which is already used for other pathogen detection. That is the reason why we focused on testing the cellular degranulation caused by borrelial virulent factors. Optimization of positive control for the cell activation could not be reached which is the reason why we did not get any data for evaluation.

**Key words:** Lyme borreliosis, borelial coinfection, virulent factors, digital droplet PCR, detection limit, gene conservation, gene variability, cell degranulation

## Seznam zkratek

atb	antibiotika
CSF	„cerebrospinal fluid“, mozkomíšní mok
ddPCR	„digital droplet Polymerase Chain Reaction“, digitální dropletová PCR
DbpA	„Decorin binding protein“, decorin vážící protein
EM	erytema migrans
ELISA	„Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay“
FBS	„fetal bovine serum“, fetální bovinní sérum
ILC	„innate lymphoid cells“, přirozené lymfoidní buňky
HLA-DR	„human leukocyte antigen D-region related
LA	Lymeská arthritida
LCA	„lyme carditis“, Lymeská karditida
LB	Lymeská borelióza
LNB	Lymeská neuroborelióza
LPS	lipopolysacharid
LTT	„lymphocyte transformation test“, lymfocytární transformační test
MMP-10	„matrix metalloproteinase-10“, matrixová metaloproteáza 10
MSA	„Multiple Sequence Alignment“
nt	nukleotid
NKT	„Natural Killer T-lymphocyte“ přirozené zabíječské T- lymfocyty
NTC	„non-template control“, kontrola neobsahující DNA
PAMP	„pathogen-associated molecular pattern“, s patogenem asociovaná molekulární struktura
ORF	„open reading frame“, otevřený čtecí rámec
Osp	„Outer surface protein“, vnější povrchový protein
PCR	„polymerase chain reaction“, polymerázová řetězová reakce
PRR	„Pattern Recognition Receptor“, strukturu rozpoznávající receptor
qPCR	„quantitative PCR“, kvantitativní PCR
RFU	„relative fluorescence unit“, relativní jednotka fluorescence
VF	„virulent factor“, virulentní faktor
TLR	„Toll-like receptor“, receptor typu toll
WB	„western blot“

## Úvod

Lymeská borelióza (LB) je multisystémové onemocnění postihující kůži, klouby, srdce a centrální nervovou soustavu. LB patří mezi onemocnění, jejichž diagnostika je problematická. Současný trend je takový, že nemocných rok od roku přibývá a my nejsme ani po téměř padesáti letech po objevení LB schopni onemocnění spolehlivě odhalit.

Současná diagnostika onemocnění, založená na sérologii není specifická a nekoreluje s rozvojem onemocnění[1]–[3]. Alternativou sérologického testování je použití degranulačních testů. Degranulační testy se již v klinické praxi uplatňují[4].

Nejen přítomnost borelií, ale i jejich genotyp se podílí na výsledném onemocnění[5]. Proto jsme se rozhodli metodou ddPCR určit boreliální genotyp ve vzorcích gDNA pocházející z klíšťat. Ověřili jsme, že ddPCR metoda je dostatečně senzitivní na to, abychom mohli detekovat specifickou boreliální DNA v řádech attogramů v 1 ng gDNA. Tato práce položila základ dalším experimentům, které v budoucnu povedou k testování personalizované diagnostiky LB.

Myšlenkově jsme degranulační a genotypizační testování propojili. Provedli jsme bioinformatickou analýzu nukleotidové konzervovanosti genů pro boreliální povrchové proteiny, které se používají v klinickém testování. Na základě konzervovanosti genů pro tyto proteiny byly navrženy primery tak, aby amplifikovaly variabilní úseky genů. Ty se v budoucnu použijí pro amplifikaci s následnou sekvenací genů ve vzorcích. Na základě znalosti nukleotidové sekvence se nasynthetizují proteiny, které se použijí pro buněčnou aktivaci.

## Literární přehled

### Onemocnění Lymeské boreliózy

Lymeská borelióza (LB) je multisystémové onemocnění přenášené klíšťaty rodu *Ixodes*[6]–[8]. Ta do hostitele transmitují původce onemocnění bakterie rodu *Borrelia spp*[5], [9]. Onemocnění se manifestuje na čtyřech úrovních: kůže, nervový systém, klouby a srdce[10]. Obrázek 1 shrnuje změny postižených orgánů v závislosti na stádiu nemoci.

Orgánový systém	1. stádium: časné lokalizované	2. stádium: časné generalizované	3. stádium: pozdní
Kůže	Erytema migrans	Lymfocytom	Acrodermatitis chronica atrophicans
Nervový systém		Paréza nervus facialis, meningitida, meningoradikulitida	Chronická encefalomyelitida
Klouby		Artralgie, oligoartritida	Chronická artritida
Srdce		Karditida, perikardiální výpotek	

**Obrázek 1: Klinické manifestace Lymeské boreliózy.**

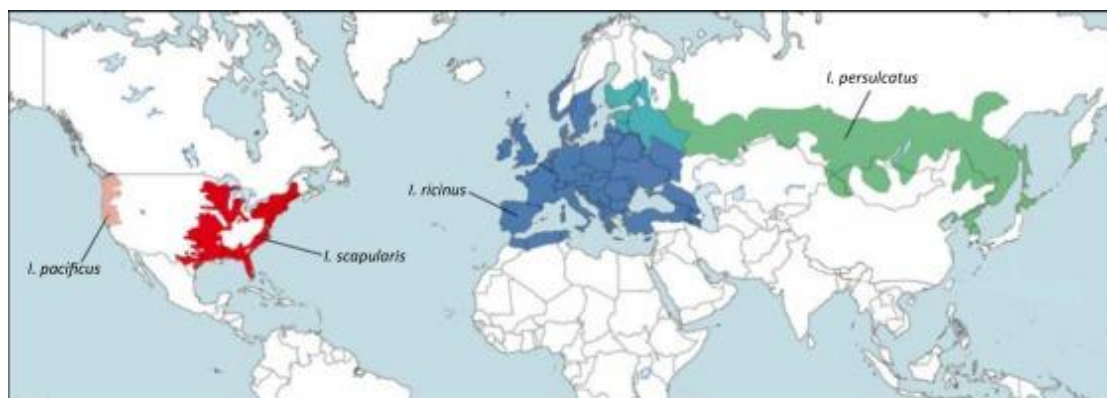
Klinické manifestace LB v závislosti na stádiu onemocnění[10].

Ročně je v ČR diagnostikováno cca 4000 nových pacientů[11], což je 40 nových pacientů na 100 000 obyvatel. V porovnání s tím je v USA ročně hlášeno skoro 30 000 nových pacientů, což znamená, že LB má v USA téměř 6× vyšší prevalenci než HIV/AIDS, odhaduje se, že skutečná prevalence je až 10x vyšší[12], [13], [14].

### Klíště jako ekosystém

Klíšťata rodu *Ixodes* jsou známými vektory přenášejícími řadu onemocnění, mezi která patří i LB[15]. Hlavní úlohu v transmisi patogena hrají čtyři druhy klíšťat: *I. pacificus*, *I. scapularis*, *I. perulcotus* a *I. ricinus*, který je nejvíce zastoupeným druhem u nás[16]. Geografické rozložení jednotlivých druhů klíšťat zobrazuje Obrázek 2.

Klíšťata často nejsou infikována pouze jedním patogenem. U klíšťat byla prokázána koinfekce různými patogeny[6], [7], [17] a zároveň kotransmise několika patogenů najednou[17]. Jednotlivé druhy klíšťat se mezi sebou liší v tom, které patogeny přenáší. Ne každý druh klíštěte nese a je schopný transmitovat stejnou kombinaci patogenů[18]. Spolu s boreliemi[19], klíšťata přenáší také bakterie kmene *Anaplasma*, dříve nazývané *Ehrlichia*[6], [17], *Rickettsie*[7], [19], protozoální *Babesie*[6], [20], bakterie rodu *Bartonella*[21] a flaviviry (*Powassan virus*)[6] způsobující klíšťovou encefalitidu[22]. V Evropě je situace taková, že v průměru 7 % klíšťat *I. ricinus* je koinfikováno alespoň 2 patogeny[23], [24]. Jedná se různou kombinaci bakterií *Borrelia spp.*, *Rickettsia*, *Babesia* a *Anaplasma*[24]. Důležitost monitorování koinfekce dokládá fakt, že u pacientů s LB, kteří jsou koinfikováni více patogeny, dochází ke zvýšení závažnosti a délky onemocnění[20]. Koinfekce vyúsťuje v propuknutí atypických symptomů, které ztěžují už tak nespecifickou diagnostiku[2], [3], [20], [21]. Nejen patogeny, ale i nepatogenní mikroorganismy osidlující klíště modulují dynamiku klíštětem přenosných infekcí[25].



**Obrázek 2: Geografická distribuce klíšťat rodu *Ixodes*, která přenášejí lidské patogeny.**

Na území USA se nacházejí dva druhy klíšťat- *I. pacificus* (růžově) na pobřeží Tichého oceánu a *I. scapularis* (červeně) na východním pobřeží a jižně od Mexického zálivu. V Evropě je hlavním vektorem patogenů *I. ricinus*, který byl však lokalizován i v severní Africe, Turecku a na Kavkaze. *I. persulcatus* (zeleně) je pozorována v okolí Baltského moře (spolu s *I. ricinus*) a v Rusku[18].

## Bakterie rodu *Borrelia* spp.

Bakterie rodu *Borrelia* spp. patří do kmene spirochét. Běžně se označují jako Gram- negativní bakterie se specifickou morfologií. Tělo *borelií* není uniformní, ale liší se v závislosti na tom, odkud v těle byly izolovány. Borelie jsou v těle lokalizovány v kůži, kloubech, myokardu, v ušních boltcích[26], moči[27], [28] nebo v mozkomíšním moku[28]. Borelie byly pozorovány intracelulárně i extracelulárně. Intracelulární lokalizace bakterií umožňuje uniknout imunitní odpovědi. Intracelulárně se borelie skrývají před imunitním systémem hostitele, osidlují fibroblasty[29], neurony a gliové buňky[30]. V případě, že se nestihnou ukrýt, jsou rozpoznány imunitním systémem hostitele, pohlceny makrofágy a zneškodněny[31].

### *Boreliální povrchové proteiny*

Borelie na svém povrchu exprimují variaci lipoproteinů, které bakteriím umožňují adaptaci v rámci těla vektora i hostitele. Zvláštností je, že borelie na svém povrchu neexprimují vysoce imunogenní lipopolysacharid (LPS), který je charakteristickým povrchovým proteinem mnoha jiných gram negativních bakterií. Z toho důvodu je modulace imunitního systému hostitele řízena primárně přes lipoproteiny na povrchu boreliálního těla[32]. Tyto proteiny jsou nazývány virulentní faktory („virulence factors“, VF), protože fungují jako s patogenem asociovaná molekulární struktura („pathogen-associated molecular pattern“, PAMP). PAMP, jsou rozpoznávány receptory rozpoznávající strukturu („pattern recognition receptor“, PRR). PRR jsou asociované s imunitními buňkami. Mezi PRR patří „toll-like receptory“ (TLR)[33]. Boreliální lipoproteiny jsou kategorizovány do tří tříd:

- Vnější povrchové proteiny („Outer surface proteins“, Osps) interagující s přirozeným imunitním systémem přes PRR[34].
- Lipoproteiny, které modulují přichycení bakterií na extracelulární matrix hostitelských buněk (např. „Decorin binding protein“, DbpA)[35].
- Lipoproteiny ovlivňující komplementovou kaskádu[36].

Velká většina boreliálních VF je plasmidově kódovaná a je přenášena horizontálně. Expresí boreliálních VF podléhá v každém z hostitelů mikroevoluci, která je závislá na okolní teplotě, pH a dalších stimulech[37]. Změna povrchové exprese VF je nezbytná po to, aby patogen mohl být transmitován z klíštěte do hostitele. Mechanismus boreliální transmise je takový, že průchod krve trávicím ústrojím klíštěte změni vnitřní prostředí klíštěte, to vede ke snížení exprese vnějšího povrchového proteinu A (“outer surface protein A”, OspA) a zvýšení exprese vnějšího povrchového proteinu C (“outer surface protein C”, OspC). Snížená exprese OspA vede ke snížení afinity borelie k proteinu TROSPA („tick receptor OspA“, klíštěcí receptor pro OspA) v trávicím traktu klíštěte. Následkem toho putují borelie do slinných žláz klíštěte. Zde se přes protein OspC vážou k proteinu slinných žláz Salp15 („salivary protein of 15 kDa“, protein slinných žláz o velikosti 15 kDa) a podstupují transfer do dalšího hostitele. Proto jsou povrchové proteiny OspA a OspC časným cílem vývoje vakcín[38]. Novým trendem ve vývoji vakcín je identifikace imunogenních epitopů proteinů OspA a OspC a vytvoření chimerního epitopu, který by se používal k vakcinaci[39]. Protein OspC je navíc antifagotickým proteinem, který borelie chrání před pohlcením makrofágy[40]. VF také pomáhají boreliím uniknout komplementovému systému hostitele[41], [42]. Dekorin vázící protein A (“decorin binding protein A”, DbpA) je studovaný proto svou rolí v navázání se na extracelulární matrix buněk hostitele. Navázání se je nezbytné pro ustanovení infekce. Borelie se pomocí DbpA váží na decorin, což je kolagen I. typu asociovaný s glukosamin glykany na povrchu buněk hostitele[35]. Tyto 3 VF (OspA, OspC a DbpA) se spolu dalšími objevují v sérologických diagnostických sadách. Respektive k diagnostice se využívá měření množství protilátek proti těmto VF[43].

### ***Molekulární charakterizace borelií***

Pro správné taxonomické zařazení nejen borelií, ale i ostatních organismů se využívá molekulárního typování. Na jeho základě můžeme borelie zařadit:

- Kmen: *Spirochaetae*
- Rod: *Borrelia*
- Druh: *B. afzelii*, *B. burgdorferi*, *B. garinii* a další
- Sérotyp: 1-7 (pro OspA)

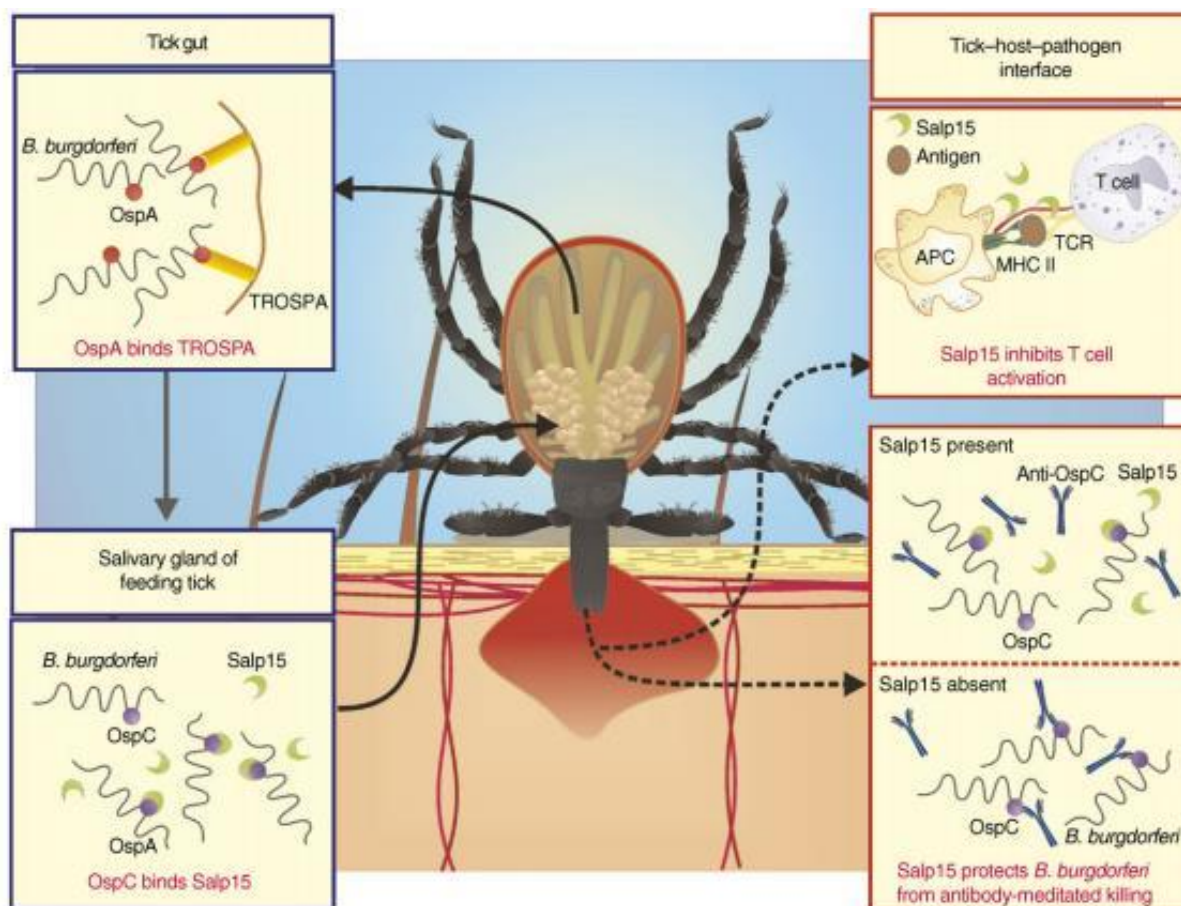
U patogenních bakterií je nejsledovanější genotyp a sérotyp. Genotypem se rozumí celý soubor genů, který daný organismus nese. Sérotyp souvisí s protilátkami, které hostitel proti danému patogenu produkuje. Odvíjí se od boreliálních vnějších povrchových proteinů, které jsou rozpoznány imunitním systémem, který proti nim následně reaguje[44]. U borelií se provádí sérotypizace na základě proteinů OspA a OspC, které se účastní transmise borelií z klíštěte do dalšího hostitele, jak zobrazuje Obrázek 3. Monitoruje se variabilita N- koncových domén. Tyto domény představují epitopy rozpoznávané imunitními buňkami. Sérotyp určuje výslednou míru boreliální virulence (schopnost vyvolat imunitní reakci)[45]. V rámci OspA vymezujeme 7 různých sérotypů[44], v rámci OspC se vymezuje 11 sérotypů[46]. Různé boreliální druhy jsou asociovány s různými sérotypy. Například *Bbss.* je asociována s OspA sérotypem 1 a 2. *B. garinii* je asociována s OspA sérotypy 3-7[44]. Výsledkem je různá antigenní specifita nejen mezi druhy, ale i v rámci jednotlivých boreliálních druhů. Antigenní specifita vyúsťuje v různé klinické manifestace[46].

Borelie se vyznačují velmi komplexní biologii. Boreliový genom je netypický, obsahuje lineární chromosom o velikosti přibližně 910 kilopárů bází (kpb) a množství lineárních i cirkulárních plasmidů. Porovnáním sekvenčních dat ze 14 boreliových genotypů patřících do

komplexu *Bbss.* se došlo k závěru, že bakterie obsahují 7 - 23 plasmidů[47]. Právě na základě rozdílů v zastoupení a velikosti plasmidů jsou od sebe taxonomicky oddělovány různé druhy borelií. Borelie se vyznačují tím, že během svého života nebo také během kultivace in vitro ztrácejí plasmidy, proto je jejich taxonomické zařazení složité[47], [48].

Zlatým standardem bakteriální genotypizace je monitorování rozdílů v genech pro 16S rRNA, neboli *16S rDNA*. 16S rRNA je univerzálním cílem pro charakterizaci, protože ribozomální podjednotka je přítomna ve všech živých bakteriích. Bakteriální ribozomy nejsou schopné translatovat mRNA bez přítomnosti 16S rRNA podjednotky. 16S rDNA obsahuje mnoho variabilních regionů, které jsou kmen specifické. Obsahuje také konzervované úseky, které jsou cílem k návrhu primerů pro PCR charakterizaci[49], [50, s. 16].

V minulosti byl definován komplex *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*Bbsl.*). Jednalo se o komplex tří nejvirulentnějších kmenů borelií, které se podílí na propuknutí onemocnění LB. Komplex *Bbsl.* zahrnoval 3 druhy borelií: *B. afzelii*, *B. burgdorferi* (nazývanou jako *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Bbss.*) a *B. garinii*. Dnes se udává, že komplex *Bbsl.* globálně zahrnuje až 23 druhů borelií[51]. Z nichž 9 druhů borelií se podařilo izolovat z lidských pacientů: *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. bissetti*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. kurtenbachii*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. valaisiana*[52]. Z nichž LB prokazatelně způsobují: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. burgdorferi* sensu stricto a *B. spielmanii*[53]. Patogenita ostatních izolovaných druhů zůstává neobjasněná[51].



**Obrázek 3: Transmise borelie z klíštěte do hostitele.**

Transmise borelií umožňují povrchové změny boreliálních povrchových proteinů A a C („outer surface protein A“, OspA a „outer surface protein C“, OspC)[54].



## Propuknutí a manifestace Lymeské boreliózy

### *Faktory ovlivňující propuknutí Lymeské boreliózy*

Pro propuknutí onemocnění je nezbytná infestace (zakousnutí se) klíštěte. Klíště musí být infikováno určitým minimálním množstvím borelií a zároveň přisáto po danou dobu[55]. S použitím myšího modelu bylo zjištěno, že čím déle je klíště přisáto, tím stoupá pravděpodobnost, že k transmisi bakterií dojde, viz Obrázek 4. V severní Americe byly provedeny pokusy s nymfami *I. Scapularis*, které byly infikovány *B. burgdorferi sensu stricto*. Výsledkem je, že tyto nymfy nikdy nebyly schopné přenést bakterie, pokud nebyly přisáty alespoň 24 hodin a pouze ve 4 případech z 50 došlo k přenosu během druhého dne, kdy byla klíšťata přisáta[55]. V roce 2001 bylo potvrzeno paradigma vytvořené na základě tohoto myšího modelu[56]. V roce 2017 byla publikována studie, která opět potvrzuje, že k přenosu patogena do hostitele dochází hlavně v prvních 48 hodinách po infestaci[57]. V Evropě nasvědčují pokusy tomu, že klíšťata *I. ricinus* jsou schopna přenést borelie během infestace kratší než 48 hodin, ale i zde risk onemocnění roste s dobou přisátí[58]. Dalším faktorem, který se podílí na výsledné imunitní reakci hostitele, je genotyp pacienta. Hlavní roli zde hraje variabilita HLA-DR („human leukocyte antigen D-region related“) alel[59]. V populaci je situace taková, že se LB vyvine v průměru u každého pátého člověka, který byl kousnut klíštětem[60].

Duration of attachment (h)	Hojgaard et al.	des Vignes et al.	Combined	Percent
24	ND	0/50 <sup>a</sup>	0/50	0.0
48	0/31	4/50	4/81	4.9
54	3/30	ND	3/30	10.0
63	8/33	ND	8/33	24.2
72	23/29	36/52	59/81	72.8
96	ND	15/16	15/16	93.8

<sup>a</sup> No. of mice infected/no. mice exposed.  
ND, not done.

#### **Obrázek 4: Účinnost přenosu borelií.**

Porovnání výsledků dvou studií, které zjišťovaly vliv doby přisátí klíštěte *I. scapularis* na transmisi borelií. Data pochází ze studie Hojgaard et al. z roku 2008[61] a des Vignese et al. z roku 2001[55]. Z výsledků je patrné, že riziko transmise patogena se zvyšuje v závislosti na době přisátí klíštěte[61].

Největší nárůst nových pacientů je hlášeno v období červen- září, kdy jsou klíšťata nejvíce aktivní[62], což souvisí s jejich životním cyklem. Životní cyklus klíšťat je dlouhý 2-3 roky. Během svého životního cyklu prodělává klíště mnoho změn. Mění se morfologicky (z vajíčka přes larvu, nymfu až po dospělce) a žije na různých rezervoárech. Právě v období jara a časného léta přichází čas přeměny vajec na larvy. Larvy spolu s nymfami a dospělci (vylíhnutími předchozí rok) začínají sát krev, čímž roste epidemiologické riziko přenosu LB[63]. V současné době se udává, že ve střední Evropě je více jak 30 % dospělců, 20 % nymf a 8 % larev je infikovaných boreliemi[64].

Vědci předpovídají, že se LB bude stále více rozšiřovat, především kvůli klimatickým změnám, které způsobují, že se přirozené rezervoáry bakterií rodu *Borrelia*, rozšiřují do severních oblastí, kde se dříve nevyskytovaly. Těmito rezervoáry jsou: ještěrky[65], ptáci[66], drobní

savci[67] nebo velcí savci zahrnující člověka[28], [68]. Nicméně podle předpovědi bude ještě několik let trvat, než borelie dosáhnou severoamerického polárního kruhu[69]. Situace v oblasti ruské arktické oblasti, na Sibíři, je vážnější. Zde byly v roce 2016 zaznamenány první případy výskytu borelií[70].

### ***Klinické manifestace***

Ještě dříve, než onemocnění propukne, je třeba vymezit procesy, které se odehrávají v kůži při a po infestaci klíštěte. Protože je klíště přisáté většinou po více dní, musí po tento čas přemoci imunitní odpověď hostitele. Z toho důvodu klíšťaťata spolu se svými slinami injikují do místa přisátí mix farmakologicky aktivních proteinů, které blokují aktivitu keratinocytárních prozánětlivých TLR2 a TLR3<sup>30</sup>.

V prvních hodinách a dnech po infestaci se uplatňují humorální a buněčné složky přirozeného imunitního systému. Humorální obranu reprezentuje **komplementová kaskáda**. Komplement může být aktivován třemi různými cestami: klasickou cestou, lektinovou cestou a alternativní cestou. Všechny tři cesty vyúsťují formací C3 a C5 konvertáz. C3 molekula se kovalentně váže k VF na boreliovém povrchu, čímž bakterii opsonizuje. Borelie umí ve svůj prospěch využít regulátory C3 konvertáz (lidský faktor H), které boreliím umožňují štěpení C3b podjednotky komplementu. Neštěpená komplementová podjednotka C3b se stává neaktivní. Borelie tímto krokem snižují aktivaci imunitního systému[36], [73]. Na časně imunitní odpovědi se ale nepodílí pouze komplement. Během prvních 24 hodin do místa infestace migrují **buňky přirozené imunity**, které zahajují zánětlivou reakci, která se projevuje jako červená skvrna na kůži známa jako **erytema migrans** (EM). Tato skvrna může nebo nemusí být bíle ohraničena. Na zánětlivé reakci se podílí hlavně basofily, neutrofilové, eozinofily, makrofágy a dendritické buňky[74]. V zánětlivém ložisku byla odhalena zvýšená koncentrace chemoatraktantů pro neutrofilové (CXCL1 a CXCL8), makrofágy (CCL2-4) a dendritické buňky (CD11c). Sledovaná byla i koncentrace chemoatraktantů specifických pro B-lymfocyty (CXCL13, CD19 a CD20), která se v kůži před a po infestaci výrazně neliší. Stejně tak se nezměnila ani koncentrace Th2-lymfocytárních chemokinů (CCL1 a CCL22), což nasvědčuje tomu, že v prvních hodinách po infestaci se v imunitní obraně účastní hlavně přirozený imunitní systém[72]. Kontroverzní však je, že IL-5, specifický Th2-lymfocytární cytokin, se v místě zánětu objevuje už v prvním dni infestace. Od druhého dne se v místě zánětu začíná zvyšovat koncentrace IL-4, který je dalším z Th2-specifických cytokinů, z čehož vyplývá, že Th2 imunitní odpověď se plně rozvíjí až od druhého dne po infestaci klíštěte[72].

EM je často doprovázena únavou, horečkou, bolestí hlavy, ztuhlou šíjí a myalgií. Tyto symptomy však bez přítomnosti EM nejsou pro diagnostiku LB určující. EM se pokládá za první symptom LB, problémem však je, že až 30 % pacientů EM nevykazuje[75]. Tito pacienti jsou často špatně diagnostikováni, pokud vůbec[76]. Ale ani přítomnost EM doprovázené ostatními příznaky nemusí být 100% ukazatelem LB[3]. Pokud není EM včas diagnostikována a pacient není léčen antibiotiky (dále už jen atb), infekce se může rozšířit do dalších orgánů, což může vyústit v časně diseminovanou fázi (dny až týdny) nebo pozdní fázi onemocnění (měsíce až roky)[76].

Nejzávažnější a dominující manifestací diseminovaného onemocnění je **Lymeská neuroborelióza** (LNB). Jedná se převážně o akutní onemocnění. O chronickém průběhu hovoříme, pokud příznaky přetrvávají alespoň po 6 měsících a projevují se jako chronická meningitida, encephalomyelitida nebo radiculomyelitida. Vyvolané patologie se objevují v důsledku reakce imunitního systému na borelie, nikoli jako důsledek působení borelií na nervy. Patogeneze LNB zahrnuje komplexní imunitní odpověď. Ta začíná jako útok přirozeného imunitního systému namířeného proti boreliím. Borelie interagují s PRR receptory, jako je TLR 2, což vyústí v aktivaci a rekrutaci B a T- lymfocytů do CNS. Hlavním chemoatraktantem B- lymfocytů je chemokin CXCL13. Hladina CXCL13 je v CSF zvýšená jak u dětí tak dospělých pacientů trpících LNB. Je detekovatelný ještě před tím, než je možné v CNS detekovat intratekálně (uvnitř mozkových plen) produkované protilátky proti boreliím[77]. V CSF byly detekovány cytokiny specifické pro Th1, Th2, Th9 a T regulačními-lymfocyty[78]. Nové studie indikují zapojení Th 17- lymfocytů v intratekání imunitní odpovědi LNB pacientů. IL-17A, cytokin produkovaný Th17- lymfocyty je potenciální aktivátor neutrofilů v boji proti extracelulárním mikrobům. Další detekovatelné cytokiny a chemokiny jsou CXCL1 (chemoatraktant neutrofilů) produkovaný astrocyty a mozkovými microvaskulárními epiteliálními buňkami[79], dalšími jsou CCL20 (prozánětlivý protein makrofágů) spolu s atraktantem Th17- lymfocytů jsou produkovány samotnými Th17-lymfocyty.

Nejdéle známým projevem LB je **Lymeská artritida** (LA). Přidružené symptomy k Lymeské artritidě jsou: malátnost, únava, horečka, bolest hlavy, ztuhla šíje, nevolnost, zvracení, myalgie neboli bolest svalů, bolest v krku, lymphadenopathie (blíže nespecifikovatelné onemocnění lymfatických žláz), splenomegalie, malarická vyrážka, makulopapulární vyrážka (skvrny společně s pupínky), periorbitální edém (otok kolem očí) a erytematózní tonsily (skvrny na mandlích). Díky rozmanitým symptomům docházelo často k záměně onemocnění za asymptomatickou meningitidou. Lymeská artritida je důsledkem diseminace borelií do kloubů. Pacienti, u kterých se EM vyskytne, podstupují perorální a intravenózní atb léčbu. Nicméně se i tak zhruba u 10 % EM pozitivních a přeléčených pacientů, vyvine autoimunitní LA. Ta přetrvává měsíce i roky po atb léčbě[80]. U těchto pacientů dochází k synoviálnímu poškození s charakteristickou vaskulární proliferací, infiltrací mononukleárních buněk a intenzivní expresi HLA-DR molekul. Pacienti vykazují zvýšenou expresi HLA-DR alely DRB1\*0401. Tyto DRB1 molekuly váží imunodominantní epitop boreliálního proteinu OspA[81]. OspA epitop *B. burgdorferi* vykazuje částečnou sekvenční homologii s lidskými proteiny[82]. Pacienti vykazující atb-rezistentní LA infikovaní druhem borelií s OspC sérotypem A, vykazují vysoké hladiny IFN- $\gamma$  indukovaných chemokinů CXCL9 a CXCL10, které slouží jako chemoatraktanty pro CD4+ a CD8+ T efektorové lymfocyty[83]. Vysoká koncentrace IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  snižuje imunoregulační potenciál těchto CD4+ T-lymfocytů, což vede k buněčné imunodysregulaci[84]. Navíc vysoké koncentrace prozánětlivých cytokinů vedou ke stimulaci synoviálních fibroblastů a chondrocytů k expresi matrixové metaloproteinázy-10 ("matrix metalloproteinase-10", MMP-10). Velké množství MMP-10 a anti-MMP-10 protilátek v kloubech vyústí ve formování imunitních komplexů, které vedou k vyvoji autoreaktivních MMP-10 specifických B-lymfocytů, jejichž zvyšující se množství vede k následnému kloubnímu zánětu a autoimunitě[85]. Atb-rezistentní artritida je léčena methotrexatem, který inhibuje T-buněčnou aktivaci a buněčnou proliferaci[86].

Poměrně vzácným projevem je **Lymeská karditida** (LCA). Objevuje se především v rané fázi, často v závěsu po EM a v asociaci s neurologickými nebo artritickými symptomy. Typickou manifestací je atrioventrikulární defekt. Dále se může objevit arytmie, endomyokarditida a perikarditida. Chronické postižení srdce se často spojuje s LB, ale samo o sobě nestačí k diagnostikování LB. Pro potvrzení Lymeské karditidy je bez dalších příznaků nutné k potvrzení detekovat borelie v endomyokardických biopsiích[87].

## Diagnostika Lymeské boreliózy

Současný diagnostický stav Lymeské boreliózy je takový, že ani po padesáti letech po objevení LB nejsme schopni onemocnění spolehlivě odhalit. U diagnostických testů jsou sledovány hlavně 2 parametry: senzitivita neboli citlivost testu a specifita. Senzitivita vyjadřuje úspěšnost, s níž test zachytí přítomnost onemocnění u pacienta (vypočítá se jako poměr počtu skutečně pozitivních případů k součtu skutečně pozitivních a falešně negativních případů). Druhý termín specifita vyjadřuje schopnost testu přesně vybrat pacienty, u kterých nemoc nenastává (vypočítá se jako poměr počtu skutečně negativních případů k součtu skutečně negativních případů s případy falešně pozitivními). Falešně pozitivní výsledky souvisí s nízkou specifikou testu. Dalším problémem současných diagnostických metod je, že u nich nebyla prokázána korelace s rozvojem nemoci[2]. To platí hlavně o rané fázi infekce[88].

Nejnovější imunologické a parazitologické výzkumy demonstrují, že spolu s detekcí bakterií, je též důležité správně určit bakteriální genotyp. Borelie se v rámci jednotlivých genotypů liší v rychlosti transmise z klíštěte do pacienta[61]. Liší se i v rámci jednotlivých genotypů a to ve své virulenci, schopnosti vyvolat onemocnění. Výsledkem je, že nejen různé genotypy borelií, ale i variabilita jejich virulentních faktorů (VF) v rámci jednoho genotypu, se podílí na různosti klinických manifestací[89]. Monitorování této variability je důležité pro vývoj personalizované diagnostiky[90].

### Sérologie

**Sérologické testy** LB jsou zacílené na detekci specifických protilátek produkovaných B-lymfocyty nebo na detekci cytokinů (rozpuštěných látek). V současné době se jedná o nejvyužívanější diagnostickou metodu. Problémem je, že specifita a senzitivita těchto testů není dostatečná, hlavně v časných fázích onemocnění, kdy senzitivita dosahuje pouhých 50 %[1]. Výsledná hodnota specifity a senzitivity je kombinací technické reproducibility a biologické relevance. Díky kinetice protilátkové odpovědi se sérologie nehodí pro detekci časných stavů LB. V porovnání s tím se senzitivita testů v pokročilejších stádiích LB zvyšuje až k 97 %, viz Obrázek 5 na následující straně[1]. Sérologie se nedoporučuje ani k ověření účinnosti léčby LB[91]. Řada pacientů prochází sérokonverzí[92], část pacientů zůstává séronegativními, zřejmě z důvodu nedostatečného kontaktu humorálního imunitního systému s boreliemi. Navíc se výsledky testování liší i v závislosti na použitém antigenu, viz Obrázek 6[43].

Diagnostika LNB na základě detekce protilátek IgM a/nebo IgG proti Bbsl. se nedoporučuje. Ty jsou často detekovány až po 6-8 týdnech od propuknutí nemoci. Je také důležité rozlišit, jestli protilátky vznikly intratekálně nebo přešly difúzí. Nejvíce specifická s B-lymfocyty asociovaná diagnostika je detekce B-lymfocytárního chemokinů CXCL13 v CSF v onemocnění LNB[93].

V současné době se v klinické diagnostice uplatňuje **dvoustupňový test**, který zahrnuje nejprve screening (nejčastěji se používá Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, neboli ELISA), pokud je jeho výsledek pozitivní nebo nerozhodný, přichází druhý krok - imunoblot, takzvaný western blot (WB). Z testování vyplývá, že WB je málo senzitivní a nikdy by neměl být používán jako jediná diagnostická technika. Senzitivita dvoustupňového testování dosahuje v rané fázi onemocnění 30-40 % senzitivity[94].

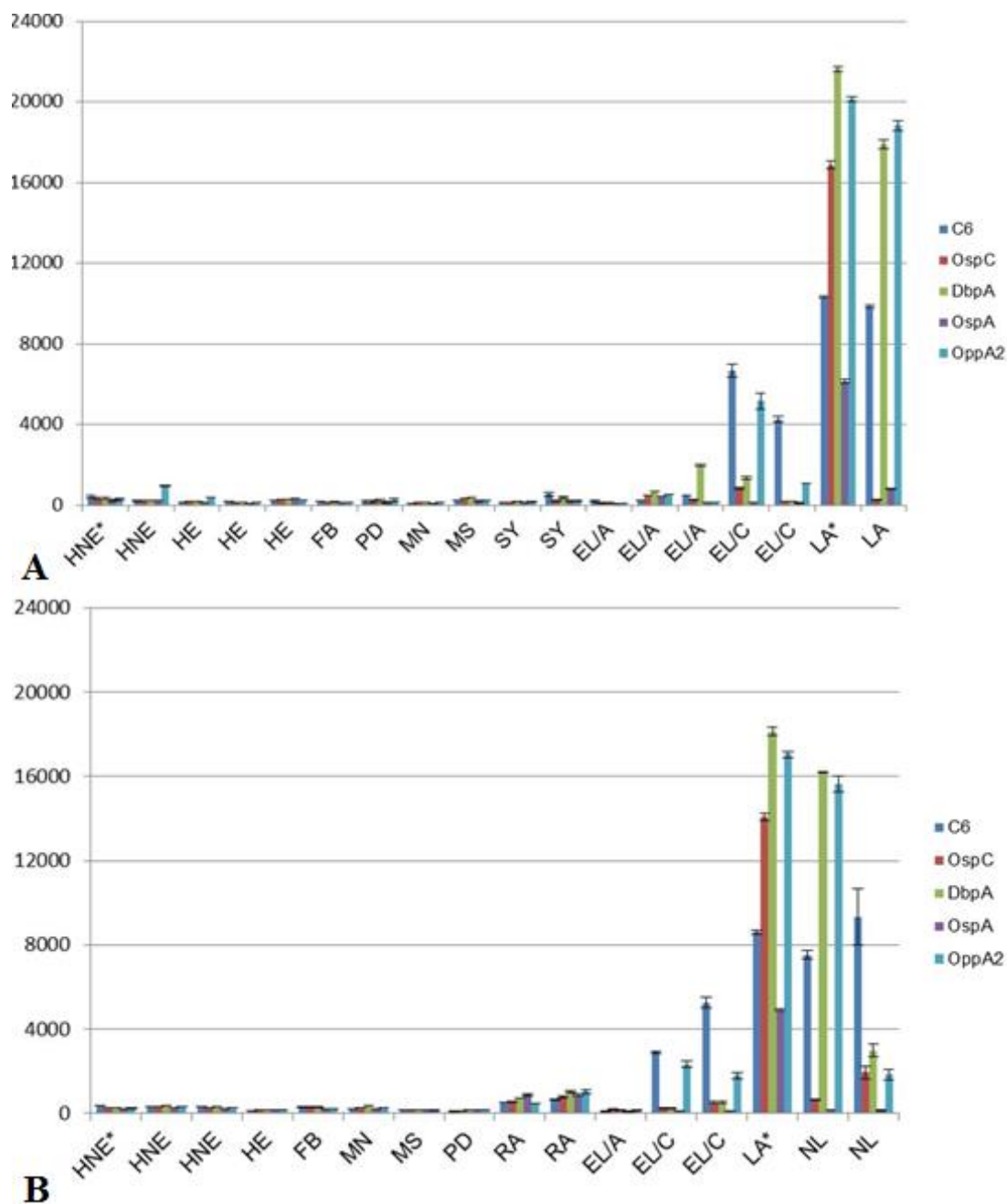
USA povolily použití **jedno- stupňového testování**. Na rozdíl od dvoustupňového testu se zde upustilo od WB. Studie zveřejněná v lednu tohoto roku porovnála výsledky různých jedno- stupňových testů mezi sebou. Testy nevykazovaly signifikantní rozdíly, jak tomu bylo u porovnání dvou- stupňových testů. Vyšlo také najevo, že senzitivita testu je vyšší u pacientů, kteří se s LB už léčí než u pacientů s akutní EM[95]. Tato studie potvrdila fakt, že test, který by byl senzitivní a specifický již v akutní fázi LB, prozatím na trhu chybí.

Case definition	Assay	Design	N (studies); N(Dx2 table); N(cases); N(controls)	Sensitivity (95 % CI)	Specificity (95 % CI)	Heterogeneity	Quality and Study Design
Erythema migrans	In-house ELISA	Case-control, Healthy controls	6, 10, 451, 658	0.41 (0.25 to 0.60)	0.97 (0.95 to 0.98)	IgG lower sensitivity than IgM. Other sources of heterogeneity were not found.	Study quality did not influence the accuracy
	In-house IB		3, 3, 182, 380	0.52 (0.38 to 0.65)	0.98 (0.94 to 0.99)		
Lyme neuroborreliosis (serum)	Commercial ELISA		13, 32, 874, 2509	0.54 (0.44 to 0.65)	0.93 (0.90 to 0.95)	IgM and IgG have similar sensitivity and specificity. IgG has a higher accuracy. Recombinant tests perform best. More recent studies perform better than earlier studies.	If serology was not part of the reference standard, then specificity was lower.
	Commercial IB		3, 5, 161, 789	0.58 (0.49 to 0.67)	0.86 (0.75 to 0.93)		
	Two-tiered tests		2, 7, 125, 190	range 0.12 to 0.64	range 0.67 to 0.96		
	In-house ELISA	Case-control, Healthy controls	6, 9, 277, 649	0.69 (0.60 to 0.76)	0.88 (0.72 to 0.97)		
Lyme neuroborreliosis (in serum)	In-house IB		5, 8, 253, 445	0.69 (0.57 to 0.80)	0.93 (0.86 to 0.97)	Sensitivity similar for IgG and IgM; specificity higher for IgG. No other sources of heterogeneity.	
	Commercial ELISA		11, 28, 484, 2920	0.81 (0.70 to 0.89)	0.94 (0.91 to 0.96)		
	Commercial IB		2, 4, 33, 286	0.81 (0.57 to 0.94)	0.92 (0.88 to 0.95)		
	Two-tiered tests		1, 5, 15, 100	range 0.41 to 0.87	range 0.88 to 0.94		
(csf)	Any ELISA	Case-control, Cross-reacting controls	6, 9, 385, 261	0.74 (0.38 to 0.93)	0.96 (0.85 to 0.99)	Sensitivity similar for IgG and IgM; specificity higher for IgG. No other sources of heterogeneity.	
	Specific AI test		7, 10, 458, 380	0.86 (0.63 to 0.95)	0.94 (0.85 to 0.97)		
Lyme neuroborreliosis (in serum)	Any ELISA or IB	Cross-sectional study	6, 12, 282, 412	0.78 (0.53 to 0.92)	0.78 (0.40 to 0.95)	Sensitivity similar for IgG and IgM; specificity higher for IgG. No other sources of heterogeneity.	
	Specific AI test (in serum and CSF)		4, 4, 102, 118	0.79 (0.34 to 0.97)	0.96 (0.64 to 1.00)		
Lyme arthritis	All ELISA	Case-control, Healthy controls	8, 26, 160, 1112	Median 0.96; interquartile range 0.93 to 1.00	Median 0.94; interquartile range 0.91 to 0.97	IgM a much lower sensitivity than IgG. No other sources of heterogeneity.	Study quality did not influence the accuracy
	All ELISA		10, 27, 256, 1415	0.97 (0.94 to 0.99)	0.95 (0.88 to 0.98)		
Acrodermatitis	In-house ELISA	Case-control, Healthy controls	4, 7, 115, 215	0.85 (0.71 to 0.93)	0.98 (0.93 to 0.99)	IgM a much lower sensitivity than IgG. No other sources of heterogeneity.	Study quality did not influence the accuracy
	In-house IB		2, 4, 98, 126	0.63 (0.33 to 0.86)	0.97 (0.93 to 0.99)		
	Commercial ELISA		10, 43, 658, 815	0.70 (0.52 to 0.83)	0.95 (0.89 to 0.98)		
	Commercial IB		1, 4, 26, 62	0.29 (0.07 to 0.68)	0.96 (0.90 to 0.98)		
Lyme borreliosis (unspecified)	Any ELISA or IB	Cross-sectional study	5, 14, 226, 914	0.77 (0.48 to 0.93)	0.77 (0.46 to 0.93)	IgM lowest sensitivity, but highest specificity, no other sources investigated.	

Number of studies is for each combination of case definition and assay category. Thus the same study may appear more than once. ELISA Enzyme Immuno Assay, IB Immunoblot, AI Antibody Index, CSF Cerebrospinal Fluid

Obrázek 5: Senzitivita a specifita sérologického testování.

Porovnání senzitivity a specifity diagnostických testů v závislosti na fázi onemocnění. V časných fázích onemocnění se senzitivita testů pohybuje kolem 50 %, v pozdějších fázích senzitivita roste[1].



**Obrázek 6: Multiplexové testování 5 antigenů.**

Testována byla přítomnost protilátek IgM specifických pro boreliální VF: C6, OspC, DbpA, OppA2. Osa y zobrazuje průměrnou fluorescenční intenzitu, na ose x jsou vyneseny patientské kategorie následovně: zdravý z neendemické oblasti (HNE), zdravý z endemické oblasti (HE), figromyalgie (FB), infekční mononukleóza (MN), roztroušená skleróza (MS), revmatoidní artritida (RA), závažná periodontitida (PD), časná/akutní fáze Lymeské boreliózy (EL/A), časná fáze Lymeské boreliózy po léčbě (EL/C) Každý vzorek vyneseny na ose x reprezentuje jednoho pacienta. (A) syphilis (SY), Lymeská artritida (LA). (B) neuroborelióza (NL)[43].

Pro detekci cytokinů produkovaných T- lymfocyty se používá **ELISPOT**. Metoda funguje na principu kvantifikace buněk produkujících určitou specifickou protilátku nebo cytokin – rozpustnou látku. Principem je, že buňky jsou inkubovány s antigenem s následnou vizualizací produkovaných cytokinů. Vizualizace probíhá enzym-substrátovou reakcí[96].

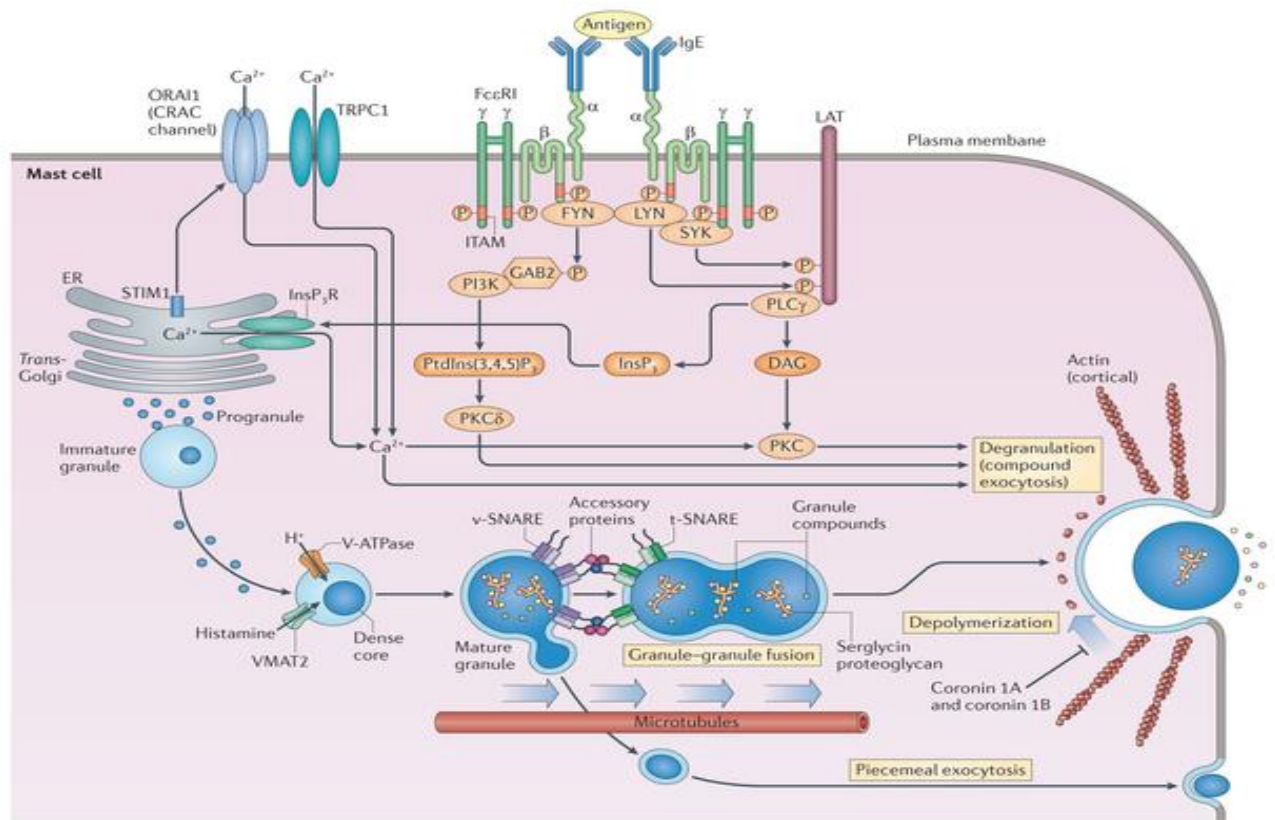
Další alternativou detekce T-lymfocytární odpovědi jsou **lymfocytární transformační testy** (LTT, „lymphocyte transformation test“), jako například LLT-Melisa („lymphocyte transformation test-memory lymphocyte immunostimulation assay“). Tento test je v Evropě používán od roku 2004. Principem LTT testů je stimulace T- lymfocytů antigeny. V případě diagnostiky LB se jedná o lyzáty antigenů *B. afzelii*, *B. bsl.* a *B. garinii* spolu s rekombinantním proteinem OspC. Senzitivita LLT testu je 89 % se specifitou 99%. U pacientů s klinicky potvrzenou LB se výsledky LTT a sérologického testování shoduje v 80 % [97].

### ***Buněčná odpověď***

Testy založené na detekci buněčné odpovědi, produkci cytokinů a chemokinů, patří stále do vědecké sféry a v klinické diagnostice se neuplatňují. Takovým testem buněčné odpovědi je i buněčná degranulace, na kterou jsme se v práci zaměřili. Degranulace je účinnou buněčnou odpovědí zacílenou proti infekci. Mechanismus degranulace je takový, že po navázání antigenu na receptor (antigen specifický receptor, Fc-receptor, PRR, komplementový receptor) se aktivuje řada signálních drah, které vedou k uvolnění  $Ca^{2+}$  z endoplasmatického retikula. Tyto ionty se váží na kanály aktivované vápníkem, které otevírají, čímž do buňky proudí další ionty  $Ca^{2+}$  z extracelulárního prostoru a reakce se tak pozitivně amplifikuje. V další fázi dochází k fúzi granulí, která jsou mediována interakcí SNARE receptorů. Konkrétně interakcí v- SNARE a t- SNARE receptorů za asistence mnoha přídatných proteinů. Připravená granula jsou reorganizací cytoskeletu translokována k cytoplasmatické membráně. Degranulaci spuštěnou přes Fc receptor, včetně interakcí SNARE receptorů popisuje Obrázek 7 [98].

Komplexní odpověď na přítomnost struktur (nejlépe multimerních stimulů), které mají schopnost se navázat na výše zmíněné receptory a překřížit je, zahrnuje i následné fáze aktivace jako je de novo exprese aktivačních markerů, produkce cytokinů, chemokinů a změna transkripčních programů. Degranulace je nejrychlejší buněčnou odpovědí. Mezi buňky schopné degranulace patří buňky přirozeného imunitního neutrofilní granulocyty, eosinofilní granulocyty, basofilní granulocyty [99], žírné buňky [98], buňky systému adaptivního cytotoxické  $CD8^+$  T-lymfocyty [100] i buňky stojící na pomezí, jako například ILC buňky („innate lymphoid cells“), přirozené zabíječské T-lymfocyty („natural killer T-lymphocytes“, NKT) [100].





**Obrázek 7: Průběh buněčné degranulace.**

Schéma průběhu degranulace spuštěné přes vysokoafinní preceptor FcεRI. Klíčové je zvýšení koncentrace Ca<sup>2+</sup> iontů uvnitř buňky[98].

V současné době se začíná využívat schopnosti buněčné degranulace k diagnostickým účelům. Nejznámějším a nejvíce využívaným diagnostickým testem je například v alergologii využívaný BasoFlow, zaměřený na basofilní degranulaci. Při vývoji diagnostických degranulačních testů se však necílí přímo cytotoxické produkty degranulovaných vezikulů, ale látky, kterými se buňky brání proti lýze, například molekuly CD107a (*LAMP-1*), CD107b (*LAMP-2*) a CD63 (*LAMP-3*)[100]–[102]. Diagnostický test cílený přímo na Lymeskou boreliózu na trhu ještě stále chybí. Proto jsme se v práci rozhodli otestovat, jestli je možné, pomocí proteinů běžně se používající v sérologické praxi (OspA, OspC a další) navodit buněčnou aktivaci. Degranulaci molekul CD63 a CD107a jsme chtěli detekovat průtokovou cytometrií.

## ***Přímá detekce patogena***

Borelie je možné přímo detekovat mikroskopicky v biopsiích. Mikroskopie jako diagnostický nástroj však vykazuje malou specifitu a senzitivitu. Mikroskopická detekce dosahuje až 76 % falešně pozitivních výsledků[103].

Také PCR detekce z patientských vzorků je možná. Přítomnost borelií se testuje z plazmy, CSF nebo moči. Senzitivita v časně fázi onemocnění před nasazením atb léčby je pouhých 58 % a zvyšuje se s progresí onemocnění[28]. Obrázek 8 souhrnně popisuje senzitivity PCR metody v závislosti na druhu odebraného vzorku. Novinkou na poli PCR detekce je ddPCR. Pomocí této metody jsou Borelie prozatím detekovány ve vzorcích z klíšťat. Avšak díky malé náchylnosti této metody k reakčním inhibitorům a nízkému detekčnímu limitu v řádech fg-ag boreliové DNA, se nabízí použít ddPCR i pro detekci borelií v klinické praxi[104].

Specimen	Sensitivity
Skin (erythema migrans, acrodermatitis)	50–70% when using culture or PCR
Cerebrospinal fluid (acute neuroborreliosis)	10–30% when using culture or PCR *
Synovial fluid † (Lyme arthritis)	50–70% when using PCR (culture is only extremely seldom positive)

\* Up to 50% of patients with a disease duration of less than 2 weeks, compared with only 13% of patients with a disease duration of greater than 2 weeks [Lebech et al. \(2000\)](#).

† † Higher sensitivity of direct pathogen detection from synovial biopsy specimens.

### **Obrázek 8: Senzitivita detekce borelií PCR metodou.**

Senzitivita PCR metody v závislosti na původu vzorku. Nejnižší senzitivitu vykazuje PCR z mozkomíšního moku. Největší 60% senzitivitu PCR kůže a synoviální tekutiny[105].

Kultivace borelií je metoda časově náročná. Během kultivace dochází ke změně počtu plasmidů, což se projevuje změnou exprimovaných proteinů. Největší změna je pozorována v expresi VF OspC. Kultivace z biopsií EM vykazuje pozitivitu v 71%[106].

Další metodou přímé detekce, která je v klinické praxi používána, ale pro jiného patogena, je průtoková cytometrie[107].

## Cíle práce

- Metodou digital droplet PCR (ddPCR) detekovat boreliovou DNA v klíšťací gDNA.
- Detekovat borelie v klíšťatech z lokálního sběru PCR metodou.
- Prokázat koinfekci klíšťat boreliemi metodou ddPCR pomocí primerů navržených pro *16S rRNA* specifických pro 3 druhy borelií.
- Stanovit detekční limit ddPCR pro záchyt boreliové DNA v gDNA pocházející z klíšťat.
- Vizualizovat nukleotidovou konzervovanost pro geny vybraných virulentních faktorů (VF).
- Navrhnout primery pro amplifikaci VF OspA a OspC tak, aby nasedaly na konzervované úseky genů a amplikon zahrnoval variabilní úseky genů.
- Následně pomocí sekvenace PCR produktu, vzniklého reakcí s nově navrženými primery, zmonitorovat nukleotidovou variabilitu VF OspA a OspC.
- Metodou průtokové cytometrie sledovat aktivaci imunitních buněk vyvolanou boreliálními VF.

## **Materiál a metody**

### **Biologický materiál**

#### ***Izolovaná genomická DNA z klíšťat a proteiny pro buněčnou aktivaci***

Firma Protean s.r.o. pro tuto práci poskytla celkem 29 izolovaných gDNA. Pro izolaci gDNA z klíšťat byla použita guanidinová metoda s přečištěním na kolonkách se silikou. Čistotu DNA jsme ověřili pomocí spektrofotometru NanoDrop. Pracovali jsme se dvěma druhy vzorků. První byly firmou Protean s r.o. stanoveny "end-point" PCR metodou (dále už jen jako PCR) jako borelia pozitivní (end-point PCR: 30 amplifikačních cyklů, výsledná detekce PCR produktu pomocí elektroforézy na agarosovém gelu). Limit pro stanovení pozitivity byl stanoven na 400 fg boreliální DNA ve vzorku a více. Tabulka 1 zobrazuje vzorky, které byly PCR metodou označeny jako borelia pozitivní, dále je už budu označovat jejich ID s příponou neg (negativní). Obdobně budu v práci dále nazývat vzorky gDNA stanovené metodou PCR jako pozitivní (ID-poz). Tabulka 1 také shrnuje čistotu a koncentraci dodaných vzorků.

**Tabulka 1: Firmou Protean s r.o. dodané vzorky klíštěcí gDNA a peptidů.**

<b>ID gDNA</b>	<b>A260/280</b>	<b>koncentrace (ng/μl)</b>
7429-poz	1,7	12
7524-poz	1,8	44,4
7597-poz	1,8	16,7
7731-poz	2,0	30,7
7435-poz	2,0	30
7476-poz	2,0	48,5
7164-poz	2,1	11,3
7401-poz	2,0	60
7407-poz	1,9	40
7423-poz	1,7	4,1
7427-poz	1,7	8,9
7467-poz	2,1	79,3
7628-poz	2,0	9,7
7751-poz	2,1	47
7786-neg	2,6	40
7770-neg	2,2	63
7776-neg	2,0	70
7773-neg	1,9	6
7779-neg	1,8	6
7778-neg	1,4	7,5
7785-neg	2,9	4,9
7790-neg	2,1	25
7772-neg	2,0	41,5
7783-neg	2,0	6,5
7771-neg	2,0	3,6
7774-neg	1,6	5,2
7782-neg	0,85	8,6
7777-neg	2,9	25
7775-neg	1,6	12

### ***Krev***

Buffy coat zdravých dárců: Transfúzní stanice ÚHK, Praha 2

## Primery

Od firmy Protean s r.o., jsme dostali sadu 2 primerů specifických pro *dbpA* a *ospA* (dále už jen “primer ospA” a “primer dbpA”). Primery byly použity v kombinaci s interkalčním barvivem EvaGreen.

Od Adama Bemise z Bio-Rad Laboratories jsme dostali sadu 4 TaqMan průbových testů. Tento typ testu byl nasynthetizován v IDT, Integrated DNA Technologies, Iowa, USA. Jedná se celkem o 4 primery navržené na *16S rDNA* obohacené o hydrolyzovatelnou sondu. Tímto typem testu byly v gDNA detekovány 3 genotypy borelií: *B. afzelii*, *B. burgdorferi* a *B. garinii*. Čtvrtý typ nazvaný konzervovaný, je určen k obecnému záchytu boreliové DNA (dále už jen “primer Afzelii” a “primer Burgdorferi”, “primer Garinii” a “konzervovaný”). Primery pro *B. afzelii* nesou sondu HEX Fluorophore / Iowa Black Quencher, zbylé 3 primery pak FAM Fluorophore / Iowa Black Quencher. Výhodou testu nesoucího sondu je, že se pro následnou vizualizaci amplifikovaného produktu nemusí použít interkalační barvivo. Tabulka 2 zobrazuje charakteristiky použitých primerů. Obrázky 10-15 zobrazují pozice nasedání primerů.

Použití interkalačního barviva je nespecifické, protože se vmezuje mezi jakékoli dvoušroubovicové struktury, kterými mohou být například primer-dimery, popřípadě rekční produkty vzniklé nespecifickým nasedáním primeru. Výhodou použití průbových testů je vyšší specifita, protože sonda se odštěpí během polymerace nově vznikající DNA.

Obrázek 9 popisuje mechanismus, kterým funguje vizualizace výsledného PCR produktu pomocí odštěpitelné sondy a za použití interkalačního barviva.

Tabulka 2: použité primery.

Primer	Sekvence (5'→3')	Teplota nasedání (°C)	Amplikon (nt)
dbpA_FW	TTTTTGATTTTITAGTTTGTITTTCT	45	128
dbpA_R	TTAGCAGCATGTAGTTTAAACAGG		
ospA_FW	GTTAGCAGCCTTGACGAGAAAAACAGC	57	695
ospA_R	CCATTTGAGTCGTATTGTTGTAAGTTGTGT		
<u>Próbové testy:</u>			
Afzelii_FW	GCAGCTAAGAATCTTCCG	55	65
Afzelii_S	CGAAAGCTGACGGAGCG		
Afzelii_R	ACCTTCTTCATTCACGCA		
Burgdorferi_FW	GCTCAACTGTGGAGCTAT	56	83
Burgdorferi_S	ATGTCTAGAGTCTGATAGAGGAAGT		
Burgdorferi_R	AGATTCCACCCCTTACACC		
Garinii_FW	GTAAATGCCTACCAAGGCG	56	84
Garinii_S	TAAGTAACCGCCTGAGAGG		
Garinii_R	AGGAGTCTGGACCGTATCT		
konzervovaný_FW	GTCCTGGGCTACACAC	56	53
konzervovaný_S	TGCTACAATGGCCTGTACA		
konzervovaný_R	ACTGTTTCGCTTCGCTT		

### TAQMAN® PROBE-BASED ASSAY CHEMISTRY

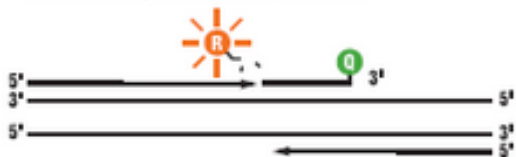
1. Polymerization: A fluorescent reporter (R) dye and a quencher (Q) are attached to the 5' and 3' ends of a TaqMan® probe, respectively.



2. Strand displacement: When the probe is intact, the reporter dye emission is quenched.



3. Cleavage: During each extension cycle, the DNA polymerase cleaves the reporter dye from the probe.



4. Polymerization completed: Once separated from the quencher, the reporter dye emits its characteristic fluorescence.



### SYBR® GREEN I DYE ASSAY CHEMISTRY

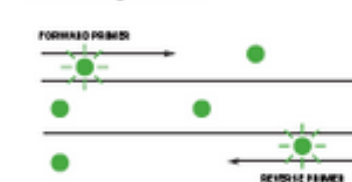
1. Reaction setup: The SYBR® Green I Dye fluoresces when bound to double-stranded DNA.



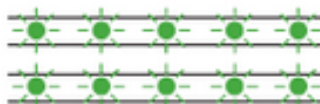
2. Denaturation: When the DNA is denatured, the SYBR® Green I Dye is released and the fluorescence is drastically reduced.



3. Polymerization: During extension, primers anneal and PCR product is generated.



4. Polymerization completed: When polymerization is complete, SYBR® Green I Dye binds to the double-stranded product, resulting in a net increase in fluorescence detected by the 7900HT system.



**Obrázek 9: Mechanismus vizualizace PCR produktu.**

Mechanismus vizualizace PCR produktu pomocí odštěpitelné sondy a interkalačního barviva. Obrázek nalevo popisuje hydrolyzu sondy při elongaci DNA, obrázek napravo zobrazuje vmezezení se interkalačního barviva (SybrGreen nebo EvaGreen) do již vzniklé dsDNA[108].



## Mapování pozice primeru pro dbpA na nukleotidovou sekvenci genu dbpA

For: TTTTGGATTTTGTAGTTTGTCT  
 Rev: TTAGCAGCATGTAGTTAACAGG

Celková délka ampliconu: 128 nt  
 MSA nukleotidové sekvence genu pro dbpA specifických primerů vytvořené v programu Kalign v. 2

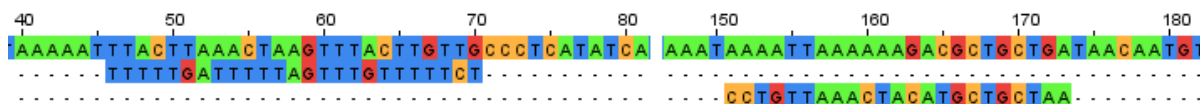
```
>JN969069.1 Borrelia burgdorferi N40 DbpA (dbpA) gene, complete cds
ATGAATAAATATCAAAAACTTTCAAAATCTTTAATTTTAAAAATTTACTTAACTAAGT
TTACTTGTTGCCCTCATATCATGCGGATTAAGAGGAGAAACAAAAATCATATTAGAACGA
AGCGCTAAAGACATTACAGATGAAATAAATAAAAATTAAGACGCTGCTGATAACAAT
GTAAATTTTGCTGCCTTTAAAGAAGACAAAACAGGCAGCAAGGTATCAGAAAATTCATTC
ATACTTGGAAGCAAAAATGCGCGGTACTACAGTAGCAGAAAAATTTGTAACAGCGATCGAA
GGGGAAGCTACAAAACTTAAAAAGACTGGAAGTAGTGGTGAATTCTCAGCAATGTACAAC
ATGATGCTTGAGGTCTCAGGCCCATTAGAAGAATTAGGAGTACTAAGAATGACAAAGACA
GTTACAGATGCGGCTGAACAACACCCTACAACACAGCTGAAGGAATACTTGAATTTGCT
AAAATAATGAAAACAAAATTACAAAGGGTTTATACAAAAACTACTGTGCCCTTAAAAAG
AAGGAAAATCCTTCTTTTACTGATGAAAAATGCAAAAATAACTAA
```

>DbpA\_FW

```
-----TTTTTGGATTTTGTAGT
TTGTTTTTCT-----
```

>DbpA\_R

```
-----CCTGTTAACTACATGCTGCTAA-----
```



**Obrázek 11: Namapované primery pro gen dbpA.**

MSA genu a primeru vytvořený v programu Kalign, vizualizace byla provedena v programu Jalview. vizualizace byla provedena v programu Jalview. Horní linie představuje sekvenci genu dbpA spolu s pozicí nukleotidů, dolní linie zobrazuje pozice nasazení primerů.



## Mapování pozice primeru pro 16S rDNA (*B. afzelii*) na nukleotidovou sekvenci 16S rDNA

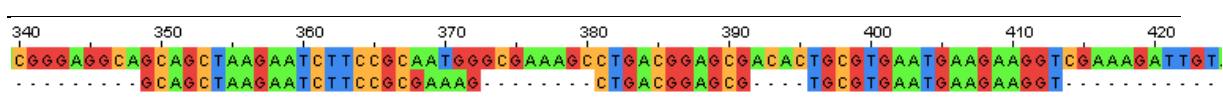
For: GCAGCTAAGAATCTTCCG  
 Rev: ACCTTCTTCATTCACGCA  
 Pro: CGAAAGCTGACGGAGCG

Délka ampliconu: 65 nt

MSA nukleotidové sekvence genu pro 16S rDNA (*B. afzelii*) a primerů vytvořené v programu Kalign v. 2

```
>gi|537496|gb|L36160.1|BORRRD Borrelia burgdorferi 16S ribosomal RNA (16S rRNA)
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGCTTAGAACTAACGCTGGCAGTGCCTTAAAGCATGCAA
GTCAAACGGAATGTAGCAATACATTTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGATGATCT
ACCTATGAGATGGGGATAACTACTAGAAATAGTAGCTAATACCGAATAAGGTCAATTAAT
TTGTTAATTGATGAAAGGAAGCCTTTAAAGCTTCGCTTGTAGATGAGTCTGCGTCTTATT
AGTTAGTTGGTGGGTTAAATGCCACCAAGACGATGATAAGTAACCGGCCTGAGAGGGTG
AACGGTCACACTGGAAGTACGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGCTAAGAAT
CTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACACTGCGTGAATGAAGAAGGTCGAAAAGA
TTGTAATAATCTTTTATAAATGAGGAATAAGCTTTGTAGGAAATGACAAAGCGATGACGT
TAATTTATGAATAAGCCCCGGCTAATTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAAGGGGC
GAGCGTTGTTCCGGATTATTGGGCGTAAAGGGTGAAGTAGGCGGATATATAAGTCTATGCA
TAAAATACCACAGCTCAACTGTGGAGCTATGTTGAAACTATATGCTAGAGTCTGATAG
AGGAAGTTAGAATTTCTGGTGTAAAGGTGGAATCTGTTGATATCAGCAAGAATACCGGAG
CGGAAGGCGAAGCTTCTGGGTCAAGACTGACGCTGAGTCACGAAAGCGTAGGGAGCAAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCTACGCTGTAAACGATGCACACTTGGTGTAACTAAAAGT
TAGTACCGAAGCTAACGTGTTAAGTGTGCCGCCCTGGGAGTATGCTCGCAAGAGTGAAAC
TCAAAGGAATTTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGATAC
GCGAGGAACCTTACCAGGGCTTGACATATATAGGATATAGTTAGAGATAATTATTCCTCCG
TTTGGGGTCTATATACAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCTGTGAGGTGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTATCTGTTACCAGCATGTAATGATGGGGACT
CAGATAAGACTGCCGGTGATAAGTCGGAGGAAGGTGAGGATGACGTCAAATCATCATGGC
CCTTATGTCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCTGTACAAAGCGAAGCGAAACAGTG
ATGTGAAGCAAAACGCACAAAGCAGGTCTCAGTCCGGATTGAAGTCTGAAACTCGACTTC
ATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTATATCAGAATGATACGGTGAATACGTTCTCGGGC
CTTGTACACACCCCGCTCACACCACCCGAGTTGAGGATACCCGAAGCTATTATTTAAC
CCGTAAGGGAGGAAGGTATTTAAGGTATGTTTAGTGAGGGGGTGAAGTCGTAACAAGGT
AGCCGTACTGGAAGTGCAGGCTGNNNNNNNNNNNNNN
```

```
>Afzelii_BioRad
-----
-----
-----
-----
-----
-----
-----GCAGCTAAGAAT
CTTCCGC-----GAAAGCTGACGGAGCG----TGCCTGAATGAAGAAGGT-----
```



**Obrázek 12: Namapované primery pro gen 16S rDNA.**

MSA genu a primeru vytvořený v programu Kalign, vizualizace byla provedena v programu Jalview. Horní linie představuje sekvenci genu 16S rDNA (*B. afzelii*), dolní linie primery, prostřední pozice znázorňuje průbu.

Mapování pozice primeru pro 16S rDNA (konzervovaný přes *B. afzelii*, *B. burgdorferi* a *B. garinii*) na nukleotidovou sekvenci 16S rDNA

For: GTCCTGGGCTACACAC  
Rev: ACTGTTTCGCTTCGCTT  
Pro: TGCTACAATGGCCTGTACA

Délka ampliconu: 53 nt

MSA nukleotidové sekvence genu pro 16S rDNA (*B. garinii* a *B. burgdorferi*) a primerů vytvořené v programu Kalign v. 2

>gi|1503976|dbj|D67018.1| Borrelia garinii DNA for 16S ribosomal RNA

-----GCTGGCAGTGCCTTAAGCATGCAA  
GTCAAACGGGATGTAGCAATACATCTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGATGATCT  
ACCTACGAGATGGGATAACTATTAGAAATAGTAGCTAATACCGAATAAAGTCAATTAAT  
TTGTTAATTGATGAAAGGAAGCCTTTAAAGCTTCGCTTGTAGATGAGTCTGCGTCTTATT  
AGCTAGTTGGTAGGGTAAATGCCTACCAAGGCGATGATAAGTAACCGGCCTGAGAGGGTG  
AACGGTCACACTGGAAGTACGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGCTAAGAAT  
CTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACACTGCGTGAATGAAGAAGGTGCGAAAGA  
TTGTAAAATTCTTTTATAAATGAGGAATAAGCTTTGTAGGAAATGACAAAGTATGACGCT  
TAATTTATGAATAAGCCCCGGCTAATTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAAGGGGC  
GAGCGTTGTTCCGGATTATTGGGCGTAAAGGGTGAGTAGGCGGATATATAAGTCTATGCA  
TAAAATACCACGGCTCAACTGTGGAAGTATGTTGAAACTATATGCTAGAGTCTGATAG  
AGGAAGTTAGAATTTCTGGTGTAAAGGTGGAATCTGTTGATATCAGAAAAGTAACCGGAG  
GCGAAGGCAACTTCTGGGTCAAGACTGACGCTGAGTCACGAAAGCGTAGGGAGCAAACA  
GGATTAGATAACCTGGTAGTCTACGCTGTAAACGATGCACACTTGGTGTAACTAAAAGT  
TAGTACCGAAGCTAACGTGTTAAGTGTGCCGCCCTGGGGAGTATGCTCGCAAGAGTGAAAC  
TCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGATAC  
GCGAGGAACCTTACCAGGGCTTGACATATATAGGATATAGTTAGAGATAATTATTCCTCCG  
TTTGGGGTCTATATACAGGTGCTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGTGAGGTGTTGGG  
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTTATCTGTTACCAGCATGTAATGGTGGGGACT  
CAGATAAGACTGCCGGTGATAAGTCCGAGGAAGGTGAGGATGACGTCAAATCATCATGGC  
CCTTATGTCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCTGTACAAAGCGAAGCGAAACAGTG  
ATGTGAAGCAAACGCATAAAGCAGGTCTCAGTCCGGATTGAAGTCTGAAACTCGACTTC  
ATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTATATCAGAAATGATACGGTGAATACGTTCTCGGGC  
CTTGTACACACCGCCCGTAC-----  
-----

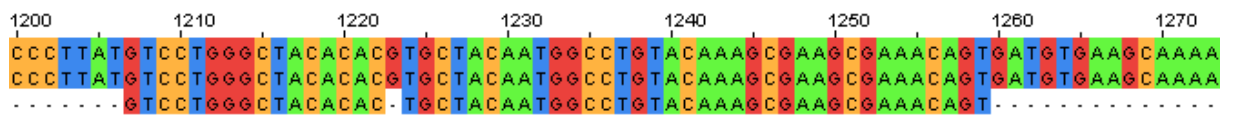
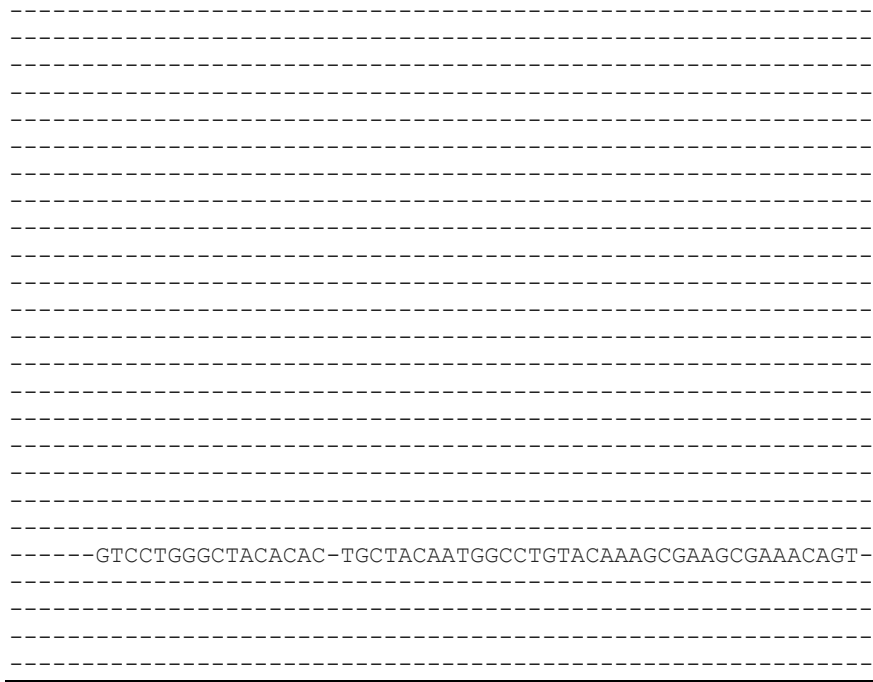
>gi|537496|gb|L36160.1|BORRRD Borrelia burgdorferi 16S ribosomal RNA (16S rRNA)

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGGCTTAGAACTAACGCTGGCAGTGCCTTAAGCATGCAA  
GTCAAACGGAATGTAGCAATACATTTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGATGATCT  
ACCTATGAGATGGGATAACTACTAGAAATAGTAGCTAATACCGAATAAAGTCAATTAAT  
TTGTTAATTGATGAAAGGAAGCCTTTAAAGCTTCGCTTGTAGATGAGTCTGCGTCTTATT  
AGTTAGTTGGTGGGTAATGCCTACCAAGACGATGATAAGTAACCGGCCTGAGAGGGTG  
AACGGTCACACTGGAAGTACGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGCTAAGAAT  
CTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACACTGCGTGAATGAAGAAGGTGCGAAAGA  
TTGTAAAATTCTTTTATAAATGAGGAATAAGCTTTGTAGGAAATGACAAAGCGATGACGCT  
TAATTTATGAATAAGCCCCGGCTAATTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAAGGGGC  
GAGCGTTGTTCCGGATTATTGGGCGTAAAGGGTGAGTAGGCGGATATATAAGTCTATGCA  
TAAAATACCACAGCTCAACTGTGGAGCTATGTTGAAACTATATGCTAGAGTCTGATAG  
AGGAAGTTAGAATTTCTGGTGTAAAGGTGGAATCTGTTGATATCAGCAAGAATACCGGAG  
GCGAAGGCAACTTCTGGGTCAAGACTGACGCTGAGTCACGAAAGCGTAGGGAGCAAACA  
GGATTAGATAACCTGGTAGTCTACGCTGTAAACGATGCACACTTGGTGTAACTAAAAGT  
TAGTACCGAAGCTAACGTGTTAAGTGTGCCGCCCTGGGGAGTATGCTCGCAAGAGTGAAAC  
TCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGATAC  
GCGAGGAACCTTACCAGGGCTTGACATATATAGGATATAGTTAGAGATAATTATTCCTCCG  
TTTGGGGTCTATATACAGGTGCTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGTGAGGTGTTGGG  
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTTATCTGTTACCAGCATGTAATGATGGGGACT  
CAGATAAGACTGCCGGTGATAAGTCCGAGGAAGGTGAGGATGACGTCAAATCATCATGGC  
CCTTATGTCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCTGTACAAAGCGAAGCGAAACAGTG  
ATGTGAAGCAAACGCATAAAGCAGGTCTCAGTCCGGATTGAAGTCTGAAACTCGACTTC  
ATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTATATCAGAAATGATACGGTGAATACGTTCTCGGGC  
CTTGTACACACCGCCCGTACACCACCCGAGTTGAGGATACCCGAAGCTATTATTTCTAAC

```

CCGTAAGGGAGGAAGGTATTTAAGGTATGTTTAGTGAGGGGGGTGAAGTCGTAACAAGGT
AGCCGTACTGGAAAGTGCGGCTGNNNNNNNNNNNN
>conserved

```



**Obrázek 13: Namapované primery pro gen *16S rDNA*.**

MSA genu a primeru vytvořený v programu Kalign, vizualizace byla provedena v programu Jalview. Horní linie představuje sekvenci genu 16S rDNA (*konzervovaný*), dolní linie primery.



## Mapování pozice primeru pro 16S rDNA (*B. garinii*) na nukleotidovou sekvenci 16S rDNA

For: GTAAATGCCTACCAAGGCG  
 Rev: AGGAGTCTGGACCGTATCT  
 Pro: TAAGTAACCGGCCTGAGAGG

Délka amplikonu: 84 nt

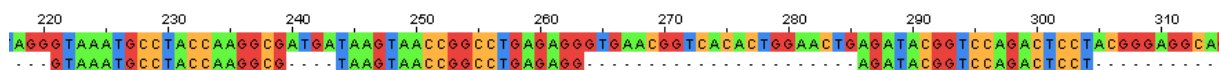
MSA nukleotidové sekvence genu pro 16S rDNA (*B. garinii*) a primerů vytvořené v programu Kalign v. 2

>gi|1503976|dbj|D67018.1| Borrelia garinii DNA for 16S ribosomal RNA

```
GCTGGCAGTGCCTTAAAGCATGCAAGTCAAACGGGATGTAGCAATACATCTAGTGGCGA
ACGGGTGAGTAACGCGTGGATGATCTACCTACGAGATGGGGATAACTATTAGAAATAGTA
GCTAATACCGAATAAAGTCAATTAATTTGTTAATGATGAAAGGAAGCCTTTAAAGCTTC
GCTTGTAGATGAGTCTGCGTCTTATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAATGCCTACCAAGGCGA
TGATAAGTAACCGGCTGAGAGGGTGAACGGTCACACTGGAACGAGATACGGTCCAGAC
TCCTACGGGAGGACGAGCTAAGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACA
CTGCGTGAATGAAGAAGGTCGAAAGATTGTAATAATCTTTTATAAATGAGGAATAAGCTT
TGTAGGAAATGACAAAGTGATGACGTTAATTTATGAATAAGCCCCGGCTAATTACGTGCC
AGCAGCCGCGTAAATACGTAAGGGGCGAGCGTTGTTCCGGATTATTGGGCGTAAAGGGTG
AGTAGGCGGATATATAAGTCTATGCATAAAAATACCACGGCTCAACTGTGGAACATGTTG
GAAACTATATGTCTAGAGTCTGATAGAGGAAGTTAGAATTTCTGGTGTAAGGGTGGAAATC
TGTTGATATCAGAAAGAATACCGGAGGCGAAGGCGAACTTCTGGGTCAAGACTGACGCTG
AGTCACGAAAGCGTAGGGAGCAAACAGGATTAGTACCCTGGTAGTCTACGCTGTAACG
ATGCACACTTGGTGTAACTAAAAGTTAGTACCGAAGCTAACGTGTTAAGTGTGCCGCT
GGGGAGTATGCTCGCAAGAGTAAAACCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTG
GAGCATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCAGGGCTTGACATATATAGG
ATATAGTTAGAGATAAATTATCCCCGTTTGGGGTCTATATACAGGTGCTGCATGGTTGTC
GTCAGCTCGTGTGTGAGGTGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTATCT
GTTACCAGCATGTAATGGTGGGACTCAGATAAGACTGCCGGTGATAAGTCGGAGGAAGG
TGAGGATGACGTCAAATCATCATGGCCCTTATGTCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG
CCTGTACAAAGCGAAGCGAAACAGTGATGTGAAGCAAACGCATAAAGCAGGTCTCAGTC
CGGATTGAAGTCTGAAACTCGACTTCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTATATCAGA
ATGATACGGTGAATACGTTCTCGGGCCTTGTACACACCGCCCGCTCAC
```

>Garinii\_BioRad

```
-----
-----
-----
-----GTAAATGCCTACCAAGGCG-----
---TAAGTAACCGCCTGAGAG-----GAGATACGGTCCAGAC
TCCT-----
-----
-----
```



Obrázek 15: Namapované primery pro gen 16S rDNA.

MSA genu a primeru vytvořené v programu Kalign, vizualizace byla provedena v programu Jalview. Horní linie představuje sekvenci genu 16S rDNA (*B. garinii*), dolní linie primery, prostřední pozice znázorňuje próbu.

## Nukleotidové sekvence

Sekvence byly získány v databázi NCBI. Vyhledávání v databázi bylo pro sekvenci genu *ospA* kmene *B. afzelii* zadáno následovně: (*ospA*) AND "*Borrelia afzelii*"[porgn:\_\_txid139]. Použité byly sekvence, u kterých byl ORF pokryt sekvencí alespoň z 75%. Sekvence pocházející z patentů nebyly zahrnuty. Všechny sekvence byly z databáze získány 15. 7. 2017 a jsou sumarizovány v Tabulkách 3-12.

**Tabulka 3: NCBI GeneBank přístupová čísla nukleotidových sekvencí *ospA* pro *B. afzelii***

n= 81, 938-712 nt

U78549.1, X85982.1, X85437.1, X85438.1, X85439.1, U78301.1, AY260457.1, AY260459.1, AY339613.1, AY502599.1, DQ479293.1, DQ479295.1, DQ479296.1, DQ479297.1, DQ479298.1, DQ479299.1, DQ479300.1, DQ479301.1, DQ479302.1, DQ479303.1, DQ479304.1, DQ479305.1, DQ479306.1, DQ479307.1, DQ479309.1, DQ479308.1, DQ479310.1, DQ479311.1, DQ479312.1, EU635992.1, KJ850254.1, U20356.1, GU826937.1, GU826938.1, GU826939.1, GU826940.1, GU826892.1, GU826893.1, GU826894.1, GU826895.1, GU826896.1, GU826897.1, GU826898.1, GU826899.1, GU826900.1, GU826901.1, GU826902.1, GU826903.1, GU826904.1, GU826905.1, GU826906.1, GU826907.1, GU826908.1, GU826909.1, GU826910.1, GU826911.1, GU826912.1, GU826913.1, GU826914.1, GU826915.1, GU826916.1, GU826917.1, GU826918.1, GU826919.1, GU826920.1, GU826921.1, GU826922.1, GU826923.1, GU826924.1, GU826925.1, GU826926.1, GU826927.1, GU826928.1, GU826929.1, GU826930.1, GU826931.1, GU826932.1, GU826933.1, GU826934.1, GU826935.1, GU826936.1

**Tabulka 4: NCBI GeneBank přístupová čísla nukleotidových sekvencí *ospA* pro *B. burgdorferi*.**

n= 99, 942-736

X16467.1, D29660.1, X62161.1, S48322.1, S48323.1, Y10837.1, Y10838.1, Y10839.1, X66065.1, Z29086.1, X62624.1, X63412.1, A24006.1, X80253.1, Y10840.1, Y10841.1, AX513363.1, AX513376.1, FB574109.1, FB574122.1, FB574129.1, FB574148.1, AX513377.1, FB574123.1, Z29087.1, X65598.1, X65599.1, X65600.1, X62387.1, X70365.1, L38657.1, X83622.1, A22442.1, X85442.1, X85739.1, X80183.1, X80251.1, X80182.1, X80184.1, X80185.1, X85443.1, X81047.1, X80186.1, AF026059.1, U20357.1, U20360.1, GU320003.1, HM756743.1, KJ830728.1, X68059.1, M57248.1, A24008.1, JF776165.1, L36036.1, GQ247743.1, GU815347.1, GU815348.1, GQ433632.1, GQ433633.1, GQ433634.1, GQ433635.1, GQ433636.1, GQ433637.1, GQ443107.1, GQ443108.1, GQ443109.1, GQ443110.1, GQ443111.1, GQ443112.1, GQ443113.1, GQ443114.1, GQ443115.1, GQ443116.1, GQ443117.1, GQ443118.1, GQ443119.1, GQ443120.1, GQ443121.1, GQ443122.1, GQ443123.1, GQ443124.1, GQ443125.1, JN413099.1, AY382159.1, L81129.1, L81132.1, GU826941.1, GU826942.1, GU826943.1, GU826944.1, GU826945.1, GU826946.1, GU826947.1, GU826948.1, GU826949.1, GU826950.1, GU826951.1, AY382160.1, JN413096.1

**Tabulka 5: NCBI GeneBank přístupová čísla nukleotidových sekvencí *ospA* pro *B. garinii*.**

n= 90, 911-736

X62161.1, D29660.1, S48322.1, S48323.1, Y10837.1, Y10838.1, Y10839.1, X66065.1, Z29086.1, X62624.1, X63412.1, A24006.1, X80253.1, Y10840.1, Y10841.1, Z29087.1, X65598.1, X65599.1, X65600.1, X62387.1, X70365.1, L38657.1, X83622.1, A22442.1, X85442.1, X85739.1, X80183.1, X80251.1, X80182.1, X80184.1, X80185.1, X85443.1, X81047.1, X80186.1, AF026059.1, U20357.1, U20360.1, GU320003.1, HM756743.1, KJ830728.1, M57248.1, X68059.1, A24008.1, GQ247743.1, L36036.1, GU815347.1, GU815348.1, GQ433632.1, GQ433633.1, GQ433634.1, GQ433635.1, GQ433636.1, GQ433637.1, GQ443107.1, GQ443108.1, GQ443109.1, GQ443110.1, GQ443111.1, GQ443112.1, GQ443113.1, GQ443114.1, GQ443115.1, GQ443116.1, GQ443117.1, GQ443118.1, GQ443119.1, GQ443120.1, GQ443121.1, GQ443122.1, GQ443124.1, GQ443123.1, GQ443125.1, JN413099.1, AY382159.1, L81129.1, L81128.1, L81132.1, GU826941.1, GU826942.1, GU826943.1, GU826944.1, GU826945.1, GU826946.1, GU826947.1, GU826948.1, GU826949.1, GU826950.1, GU826951.1, AY382160.1, JN413096.1

**Tabulka 6: NCBI GeneBank přístupová čísla nukleotidových sekvencí *ospC* pro *B. afzelii*.**

n= 103, 679-519

AF098942.1, AF334786.1, AF334788.1, X83552.1, JN828672.1, JN828675.1, D49503.1, X81521.1, X81523.1, AF230184.1, AF230185.1, AF334782.1, AF334784.1, DQ186902.1, JN828676.1, D49501.1, D49502.1, AF501318.1, AF334781.1, AF334785.1, AF334787.1, KJ850255.1, D49379.1, AF334783.1, JX888449.1, AB000348.1, AB000350.1, AB000343.1, AB009891.1, AB009898.1, AB000347.1, AB009892.1, AB000345.1, AB000349.1, AB009894.1, AB009895.1, AB009896.1, AB009899.1, AB009900.1, AB000344.1, AB000346.1, AB009893.1, AB009897.1, AB009901.1, AB009902.1, AY150204.1, AY150202.1, AY150203.1, AY150200.1, AY491407.1, AY597023.1, EU979627.1, AY150201.1, AY597024.1, AY597029.1, AY363711.1, AY363714.1, AY363717.1, DQ064602.1, AY491403.1, AY363710.1, AY363713.1, AY363715.1, AY363716.1, AY363718.1, AY363720.1, AY363712.1, AY363719.1, AY363721.1, FJ750333.1, FJ750334.1, JX103488.1,

AY150205.1, FJ750336.1, AY150206.1, FJ750335.1, JX103491.1, JX103489.1, X84774.1, X84776.1, KC207939.1, X84768.1, X84767.1, X84766.1, X84771.1, JX103492.1, JX103490.1, JX103493.1, X84775.1, X84777.1, KF958709.1, KF958710.1, KF958711.1, KF958708.1, KF958712.1, KF958713.1, KF958714.1, KF958715.1, KF958716.1, KF958717.1, KF958718.1, KF958719.1, KF958720.1

**Tabulka 7: NCBI GeneBank přístupová čísla nukleotidových sekvencí *ospC* pro *B. burgdorferi*.**

n=410, 692-520

U04281.1, AF500204.1, AF500203.1, X69590.1, AF467873.1, JN969070.1, X69594.1, X69592.1, X69593.1, X81522.1, AJ749599.1, AJ749602.1, AJ749604.1, AJ749605.1, HM756744.1, GU142956.1, KP734209.1, X69596.1, X69589.1, X81524.1, AF501316.1, AF467867.1, AF467868.1, AF467869.1, AF467870.1, AF467871.1, AF467872.1, AF467874.1, AF467876.1, AF467878.1, AJ749597.1, AJ749598.1, AJ749601.1, AJ749603.1, AJ749606.1, AJ749607.1, DQ437454.1, EF537412.1, KJ830729.1, X83555.1, AF467875.1, AF467877.1, AJ749600.1, DQ437462.1, EF537418.1, EF537419.1, EF537420.1, EF537423.1, EF537424.1, EF537425.1, EF537426.1, DQ437463.1, EF537398.1, EF537399.1, X69595.1, X73623.1, X73624.1, AF278588.1, AF278589.1, AF278596.1, AF278597.1, GU142957.1, AF278598.1, AF278599.1, X73625.1, JF754969.1, AF278590.1, AF278591.1, GU142950.1, JF723227.1, AF278584.1, AF278592.1, AF278600.1, X73626.1, AF278578.1, AF278579.1, AF278580.1, AF278581.1, AF278582.1, AF278583.1, AF278585.1, AF278586.1, AF278593.1, AF278594.1, AF278595.1, GU142954.1, GU142951.1, AF278587.1, AF074465.1, JF754970.1, JQ253802.1, AF065143.1, AF074464.1, DQ437467.1, JF723215.1, JF723216.1, JF723217.1, JF723218.1, JF723219.1, JF723220.1, JF723221.1, JF723222.1, JF723223.1, JF723224.1, JF723226.1, JF723229.1, JF723231.1, JF723233.1, JF723235.1, JF723237.1, JF723240.1, JF723244.1, JF723249.1, JF723254.1, JF723257.1, JF723258.1, JF723261.1, JF723263.1, JF723267.1, JF723268.1, JF723269.1, JF723270.1, JQ219682.1, JQ219684.1, JQ253803.1, KM881627.1, JF723225.1, JF723230.1, JF723264.1, JQ236854.1, AY150208.1, AY150209.1, GU142955.1, JF723266.1, JF723228.1, JF723232.1, JF723234.1, JF723236.1, JF723238.1, JF723239.1, JF723241.1, JF723243.1, JF723245.1, JF723246.1, JF723247.1, JF723248.1, JF723251.1, JF723253.1, JF723259.1, JF723260.1, JF723262.1, JF723265.1, JQ219683.1, JQ253800.1, JQ253801.1, JQ253804.1, JF723242.1, JQ236853.1, JQ253799.1, DQ437391.1, DQ437392.1, DQ437393.1, DQ437394.1, DQ437395.1, DQ437396.1, DQ437397.1, DQ437398.1, GU142952.1, KM269449.1, L42866.1, AF416430.1, DQ437389.1, DQ437390.1, AF223575.1, DQ437468.1, DQ437471.1, AF029861.1, AF029871.1, L42883.1, L42888.1, L42864.1, L42873.1, DQ437428.1, HM047877.1, X80255.1, AF416428.1, DQ437465.1, DQ437466.1, HM047874.1, AF029860.1, AF029862.1, AF416429.1, U08284.1, L42875.1, L42877.1, L42882.1, L42892.1, L42891.1, L42890.1, L42884.1

**Tabulka 8: NCBI GeneBank přístupová čísla nukleotidových sekvencí *ospC* pro *B. garinii*.**

n=161, 664-501

AF098941.1, JN828671.1, JN828673.1, JN828674.1, D49506.1, D49380.1, AJ749874.1, AJ749875.1, AJ749876.1, AJ841688.1, AJ841694.1, AJ841695.1, AJ841696.1, AJ841692.1, JN828670.1, D49504.1, D49507.1, X81526.1, X83553.1, D49376.1, D49378.1, D49381.1, AF230183.1, AF501317.1, DQ064601.1, AJ749868.1, AJ749877.1, AJ749878.1, AJ841689.1, AJ841690.1, AJ841691.1, JX888447.1, D49505.1, D49509.1, X83556.1, AF231450.1, DQ064600.1, AJ749869.1, AJ749871.1, JN828662.1, JN828663.1, JN828664.1, JN828665.1, JN828666.1, JN828667.1, JN828668.1, JN828669.1, D49500.1, X81525.1, D49377.1, AJ749870.1, AJ749872.1, AJ749873.1, AJ841693.1, X84772.1, X84770.1, X84773.1, X84781.1, X84784.1, AY150197.1, AY150199.1, KP795351.1, AY150192.1, AY150194.1, AY150189.1, AY491409.1, X84780.1, AY150195.1, EU979626.1, AY150187.1, AY150196.1, AY491404.1, AF080264.1, L42886.1, AF080263.1, AY150193.1, AY491410.1, AY597025.1, AY597026.1, AY597022.1, AY150198.1, DQ005955.1, AY491405.1, AY597020.1, AY491411.1, AY491406.1, KC631396.1, AY150191.1, AY491408.1, AY150188.1, AY150186.1, AY150190.1, AY150185.1, KF958721.1, KF958723.1, KF958725.1, FJ546578.1, JF331378.1, JF331379.1, JF331380.1, JF331381.1, JF331382.1, JF331383.1, JF331384.1, JF331385.1, JF331386.1, JF331387.1, JF331388.1, JF331389.1, JF331390.1, JF331391.1, JF331392.1, JF331393.1, JF331394.1, JF331395.1, JF331396.1, JF331397.1, JF331398.1, JF331399.1, JF331400.1, JF331401.1, JF331402.1, JF331403.1, JF331404.1, JF331405.1, JF331406.1, JF331407.1, JF331408.1, JF331410.1, JF331409.1, JF331411.1, JF331412.1, JF331413.1, JF331416.1, JF331417.1, JF331420.1, JF331421.1, JF331422.1, JF331423.1, JF331424.1, JF331425.1, JF331426.1, JF331427.1, JF331428.1, JF331429.1, KF958722.1, KF958724.1, FJ546566.1, FJ546568.1, FJ546569.1, FJ546573.1, FJ546574.1, FJ546575.1, FJ546565.1, FJ546571.1, FJ546579.1, JF331419.1, JF331415.1, JF331418.1, FJ546570.1, KT285871.1

**Tabulka 9: NCBI GeneBank přístupová čísla nukleotidových sekvencí *dbpA* pro *B. afzelii***

n=6, 555-510 nt

AF069284.1, AF069270.1, AF069274.1, AF069278.1, AF069267.1, AF441833.1

**Tabulka 10: NCBI GeneBank přístupová čísla nukleotidových sekvencí *dbpA* pro *B. burgdorferi*.**

n= 90, 588-468

AF069273.1, AJ748639.1, AF069268.1, AJ748562.1, AJ748638.1, AJ748641.1, AJ748645.1, EF537446.1, EF537447.1, JN969069.1, DQ437428.1, EF537445.1, EF537448.1, EF537449.1, EF537450.1, EF537451.1, EF537452.1, EF537457.1, EF537458.1, EF537461.1, EF537462.1, AJ748644.1, DQ437408.1, DQ437416.1, DQ437420.1, DQ437426.1, EF537455.1

EF537456.1, DQ437418.1, AF069269.1, AF069275.1, AF069286.1, AF441834.1, AJ748261.1, AJ748637.1, AJ748563.1, AJ748640.1, AJ748642.1, AJ748643.1, EF537454.1, HM213852.1, DQ437411.1, DQ437412.1, DQ437424.1, EF537434.1, EF537435.1, EF537436.1, EF537437.1, EF537438.1, EF537439.1, EF537440.1, EF537441.1, EF537442.1, DQ437423.1, AF079361.1, DQ437429.1, DQ437430.1, DQ437431.1, DQ437434.1, EF537453.1, U75866.1, AF069271.1, DQ437427.1, DQ437410.1, DQ437413.1, DQ437414.1, DQ437415.1, DQ437417.1, DQ437419.1, DQ437421.1, DQ437422.1, EF537466.1, AF069285.1, DQ437433.1, DQ437435.1, DQ437436.1, EF537460.1, AF069276.1, DQ437425.1, DQ437432.1, DQ437409.1, EF537443.1, EF537459.1, EF537463.1, EF537464.1, EF537467.1, EF537471.1, EF537465.1, EF537469.1, EF537444.1

**Tabulka 11: NCBI GeneBank přístupová čísla nukleotidových sekvencí *dbpA* pro *B. garinii*.**

n=31, 561-465

AF069279.1, AF441832.1, AJ841679.1, AJ841680.1, AJ841682.1, AJ841683.1, AJ841684.1, AJ841687.1, AF069272.1, AF069281.1, AJ841671.1, AJ841672.1, AF069277.1, AF079362.1, AJ841681.1, AF069283.1, AJ749593.1, AF069282.1, AF069280.1, AJ749590.1, AJ841685.1, AJ841686.1, AJ749591.1, AJ749594.1, AJ841678.1, AJ749587.1, AJ749589.1, AJ749592.1, AJ749588.1, AJ749596.1, AJ749595.1

**Tabulka 12: NCBI GeneBank přístupová čísla nukleotidových sekvencí pro návrh primerů *ospC*.**

n= 2

JN969070.1, U04281.1



## **Chemický a spotřební materiál**

### ***Roztoky***

ddPCR supermix for probes (no dUTPs): dodavatel Bio-Rad (kat.č.: 1863025)  
QX200 ddPCR EvaGreen supermix: dodavatel Bio-Rad (kat.č.: 1864033)  
Biotium EvaGreen GrandMaster Mix: dodavatel TATAA (kat.č.: 31003)  
EvaGreen Dye, 20x in water: dodavatel TATAA (kat.č.: 31000)  
Droplet Generation Oil for EvaGreen: dodavatel Bio-Rad (kat.č.:1864005)  
Droplet Generation Oil for Probes: dodavatel Bio-Rad (kat.č.:1863005)  
FlowClean cleaning agent: Beckman Coulter  
BD FACS Lysing solution: BD (kat. č.: 349202)  
RBC Lysing solution: BioLegend (kat.č.: 420301)  
ACK lysing buffer: ThermoFischer (kat.č.:A1049201)  
NH<sub>4</sub>Cl lyzační roztok: pH=7,3; 155mM NH<sub>4</sub>Cl, 5,7mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O, 0,1mM EDTA.2H<sub>2</sub>O  
HBSS: Sigma-Aldrich  
Hoechst 33258: Sigma-Aldrich  
PBS: pH=7,3; 0,79% NaCl (Lachner), 0,29% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O (Lachner), 0,11% KCl (Penta), 0,031% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Lachema)  
PMA v DMSO: Sigma-Aldrich  
Ionomycin v ethanolu: Sigma-Aldrich

### ***Protilátky***

CD4\_A647: Serotec (kat.č.: 3273819)  
CD8\_A647: Serotec (kat. č.: 3273780)  
CD14\_BV711: BioLegend (kat. č.: 301838)  
CD27\_BV421: BioLegend (kat. č.: 302824)  
CD107a\_A488: Exbio (kat. č.: A4-671-T100)  
CD63\_PE: Exbio (kat. č.: 1P-343-T100)

### ***Chemikálie***

NaN<sub>3</sub>: Sigma-Aldrich  
EDTA: Sigma-Aldrich  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Lachema  
NH<sub>4</sub>Cl : Lach-Ner s.r.o.  
KCl: Lachema  
NaOH: Lachema  
HCl: Lachema  
FBS: Sigma-Aldrich  
propidium jodid: Sigma-Aldrich  
MgCl<sub>2</sub>: Lachema  
dNTPs: Thermo Fisher  
TaqDNA polymeráza: Thermo Fisher  
TaqBuffer 10x: Thermo Fisher  
1 kb DNA ladder: NEB

### ***Ostatní spotřební materiál***

ddPCR foil heat seal: Bio-Rad

droplet generator DG8 gasket: Bio-Rad

DG8 cartridges for QX100/QX200 droplet generator: Bio-Rad

Zkumavky 1,5ml a 2ml: Eppendorf

Zkumavky 15ml: Eppendorf

Zkumavky 50 ml: NUNC

Zkumavky 5ml pro FACS: Falcon

Destička 96 jamek: Cpstar

## Metody

### *Bioinformatická část*

#### *Bioinformatická kontrola konzervovanosti vybraných virulentních faktorů*

V nukleotidové databázi **National Center for Biotechnology Information** (dostupné z: <https://www.NCBI.nlm.nih.gov/>) byly získány sekvence genů *ospA*, *ospC* a *dbpA* boreliálních kmenů *B. afzelii*, *B. burgdorferi* a *B. garinii*. Kritériem pro výběr byla alespoň 75% nukleotidová kompletnost čtecího rámce („open reading frame“, ORF) sekvencí. Nekompletní sekvence mají vliv na výpočet konzervovanosti. Data byla stažena ve formátu FASTA (text). Pro vytvoření multiple sequence alignment (MSA), ze získaných sekvencí byly použity 2 programy: **MAFFT v7.215** (dostupné z: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>) a **Kalign v2** (dostupné z: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/kalign/>). Sekvence mohou být do programů nahrány ve formátech: GCG, FASTA, EMBL, GenBank, PIR, NBRF, PHYLIP nebo UniProtKB/Swiss Prot. Program MAFFT potřebuje k vytvoření alignmentu minimálně 3 sekvence, maximálně pak 500 sekvencí, popřípadě méně než 1MB dat. Kalign v2 umožňuje pracovat až s 2000 sekvencí nebo 2 MB dat najednou. Programy dovolují upravit nastavení na mnoha úrovních, viz níže. V mém případě bylo nastavení ponecháno ve standardním formátu krom matrix a typu sekvence:

#### Standardní nastavení MAFFT

- Matrix (protein comparison matrix to be used when adding sequences to the alignment)
  - none
- Gap Open (penalty for first base/residue in a gap)
  - 1.53
- Gap Extension (penalty for each additional base/residue in a gap)
  - 0.123
- Output Order (the order in which the sequences appear in the final alignment)
  - aligned
- Tree Rebuilding Number
  - 2
- Guide tree output file
  - true
- Max Iterate (maximum number of iterations to perform when refining the alignment)
  - 2
- Perform FFTS (perform fast fourier transform)
  - none
- Sequence Type (automatic, protein, nucleic acid)
  - dna

#### Standardní nastavení Kalign v2:

- Matrix (protein comparison matrix to be used when adding sequences to the alignment)
  - none
- Gap Open Penalty (penalty for first base/residue in a gap)
  - 11
- Gap Extension Penalty (penalty for each additional base/residue in a gap)
  - 0.85
- Terminal Gap Penalties
  - 0.45
- Bonus Score
  - 0
- Output format
  - Pearson/FASTA

Takto vytvořený MSA byl vizualizován v programu **Jalview v2** (dostupné z: <http://www.jalview.org/>). Tento bioinformatický program je vytvořený v jazyku Java a je volně dostupný. Jalview je speciálně vytvořený pro interaktivní editování, analýzu a vizualizaci MSA. Umí též zpracovat sekundární strukturu, fylogenetické stromy a 3D molekulární struktury [109].

#### ***Návrh primerů***

Návrh primerů pro amplifikaci genu *ospA* a *ospC*, byl proveden v programu **Primer3 v4.0.0** (dostupné z: <http://bioinfo.ut.ee/primer3/>). Z databáze **National Center for Biotechnology Information** (dostupné z: <https://www.NCBI.nlm.nih.gov/>) byly získány 2 sekvence genu *ospC* pro *B. burgdorferi* (GeneBank ID: JN969070.1, U04281.1). Sekvence byly nahrány do programu Primer3.

#### Nastavení Primer3 v4.0.0:

- Task for primer selection
  - Pick primer list
- Included regions
  - 95, 650

Specifita všech navržených primerů byla zkontrolována v programu NCBI-BLAST (dostupné z: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)).

#### Nastavení Standard Nucleotide BLAST:

- Database
  - Others
- Organism
  - Human genomic + transcript
  - Mouse genomic + transcript
  - Ixodes ricinus (taxid:34613)
- Optimize for
  - Highly similar sequences (megablast)

Nepodařilo se navrhnout forward primer, který by neměl shodu s Homo sapiens, Mus musculus ani s Ixodes ricinus. Proto byl vybrán primer, jehož nukleotidová shoda se 3 testovanými organismy byla na 3' konci primeru nejmenší.

#### ***Mapování primerů na sekvence genů***

Sekvence genu, pro který byl primer navržen byla získána 17. 5. 2017 z databáze NCBI. Reverzní primer byl v programu Reverse Complement (dostupné z: [https://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)) přeložen do reverzně-komplementového formátu. Sekvence genu, forward primeru a přeloženého reverse primeru byly ve fasta formátu zadány do programu Kalign v. 2, kde byl ve standardním nastavení proveden MSA. Výstup byl vizualizován v programu Jalview. Namapované primery zobrazují Obrázky 10-15 a Obrázek 27.

## Stanovení kvality gDNA

Kvalita gDNA byla stanovena spektrofotometricky na spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Biocompare), viz Tabulka 1. Sledoval se poměr absorbance vzorku při dvou vlnových délkách:  $\lambda = 260$  nm a  $\lambda = 280$  nm. Absorbance při 260 nm odpovídá absorbanci nukleových kyselin, absorbance při 280 nm odpovídá absorbanci proteinů. Výsledný poměr by se měl pro čistou DNA pohybovat v rozmezí  $A_{260/280} = 1,8 - 2,0$ .

## PCR z klíšťat

Během letního soustředění mladých biologů a chemiků na Běstvině 2016 jsme spolu s Mgr. Janem Martínkem provedli testování klíšťat na přítomnost borelií. Použitá klíšťata byla odstraněna z těl účastníků soustředění.

Klíšťata byla žiletkou homogenizována. Do každé z PCR reakcí jsme vložili celé homogenizované klíště, izolaci DNA jsme neprováděli. Reakční směs pro 25  $\mu$ l reakci a podmínky reakce zobrazují Tabulky 13 a 14. Jako pozitivní kontrolu jsme použili gDNA, která byla firmou Protean s r.o. (PCR) a ddPCR ověřená jako borelia pozitivní. Nanáška pozitivní kontroly byla 5 ng gDNA. PCR produkt byl po proběhlé elektroforéze na 2% agarosovém gelu prosvícen na UV prosvěcovací lampě.

**Tabulka 13: Složení PCR reakční směsi.**

Reagencie	Koncentrace v reakci
Homogenizované klíště	variabilní
TaqDNA polymeráza	0,2 $\mu$ l
Taq buffer 10x koncentrovaný	2,5 $\mu$ l
dNTPs (10 mM)	0,5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Primery ospA (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
Sterilní H <sub>2</sub> O	doplnit do 25 $\mu$ l

**Tabulka 14: PCR reakční podmínky.**

Děj	Teplota (°C)	Trvání (s)	Počet cyklů
Aktivace enzymu	95	300	1
Denaturace	94	30	30
Nasedání primerů	56	30	30
Deaktivace enzymu	98	300	1

## Digital droplet PCR

Digital droplet PCR (dále jen ddPCR), nazývaná též PCR 3. generace, je metodou mladší než “end-point PCR” (dále jen PCR), ta má obvykle 30 reakčních cyklů a produkt je vizualizován na agarosovém gelu po proběhlé elektroforéze. Pomocí PCR není možné vzniklý produkt absolutně kvantifikovat. Metoda ddPCR výjimečná tím, že umožňuje kvantifikaci bez nutnosti použití standardu, jako je tomu u kvantitativní PCR („quantitative PCR”, dále už jen qPCR).

Inovací ddPCR metody je možnost kompartmentalizace celé 20 $\mu$ l reakce. S použitím technologie RainDance je možné generovat až miliony pikolitrových kapiček[110]. Kompartmentalizace snižuje vliv reakčních inhibitorů, které jsou v biologických vzorcích přítomny. Používali jsme přístroj QX200 generující 20 000nl kapének, který nám zapůjčila firma Bio-Rad. Při kompartmentalizaci jsou molekuly DNA spolu s reakční směsí náhodně rozděleny do dropletů. Díky náhodnosti můžou některé droplety obsahovat žádnou nebo jednu a více kopií cílené DNA. Uvnitř dropletů probíhá PCR reakce, složení reakční směsi viz Tabulka 15 a 16, podmínky reakce viz Tabulka 17 (teploty nasedání primerů se liší, popisuje je Tabulka 6). Analýza PCR produktu probíhá tak, že je droplet po dropletu proháněn přes laserový paprsek, a emisní záření excitovaného dropletu je detekováno v kanálech specifických pro fluorofor FAM (absorbuje záření při 494 nm, emituje záření o vlnové délce 518 nm) nebo HEX (absorbuje záření při 535 nm, emituje záření o vlnové délce 556 nm), viz Obrázek 16. Výsledná koncentrace sledované DNA v originálním vzorku je dopočítána z frakce dropletů, které poskytují fluorescenční signál. Ten pochází ze sondy, která je součástí primeru nebo interkalačního barviva, které je přidáno k reakční směs. Výsledná fluorescence je přepočítána na počet kopií daného genu v reakci. Program QuantaSoft v1.7. 4., ve kterém byly výsledky vyhodnoceny, umožňuje 2 způsoby vyjádření dat:

- Počet kopií genu v  $\mu$ l reakční směsi
- Počet kopií genu v dropletu

Výsledná koncentrace genu je spočítána dle rovnic, kde:

$V_{\text{droplet}}$	objem droplet
$N_{\text{neg}}$	počet negativních dropletů
$N$	absolutní množství dropletů

$$\text{koncentrace} = -\ln\left(\frac{N_{\text{neg}}}{N}\right)/V_{\text{droplet}}$$

Porovnali jsme trend v generování dropletů za použití 2 mastermixů od firmy Bio-Rad a TATAA. Ve výsledku byl používán mastermix od firmy Bio-Rad.

Detekce boreliální DNA byla provedena s primery v kombinaci s interkalčním barvivem EvaGreen. Druhým typem testování vzorků bylo použití průbového typu testu, kterým jsme určili boreliální genotyp. Dle použitého typu testu je důležité zkombinovat kompatibilní olej pro generování dropletů. Při nedodržení doporučení se negenerují žádné droplety, což jsme si ověřili.

**Tabulka 15: Složení reakční směsi za použití Bio-Rad primerů s próbou.**

Reagencie	Množství v 1 reakci (μl)
gDNA z klíštěte	10
ddPCR supermix for probe	10
Primery 20x	2

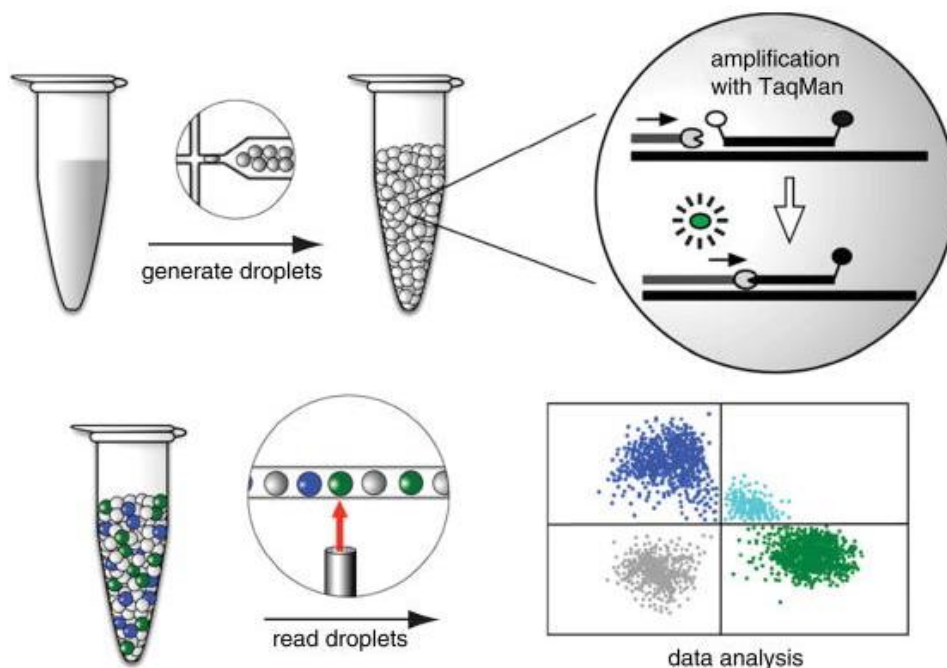
**Tabulka 16: Složení reakční směsi za použití klasických primerů a interkalačního barviva EvaGreen.**

Reagencie	Množství v 1 reakci (μl)
gDNA z klíštěte	8
ddPCR supermix for EvaGreen 2x	10
Primery 20x	2
EvaGreen 20x/ SybrGreen	2

**Tabulka 17: Podmínky ddPCR amplifikace.**

Teplota nasedání není uvedena z důvodu, že se liší pro každý jednotlivý primer.

Děj	Teplota (°C)	Rychlost přechodu	Trvání (s)	Počet cyklů
Aktivace enzymu	95	2 °C/s	300	1
Denaturace	94		30	40
Nasedání primerů	variabilní		60	40
Deaktivace enzymu	98		300	1
Chlazení	4		∞	1

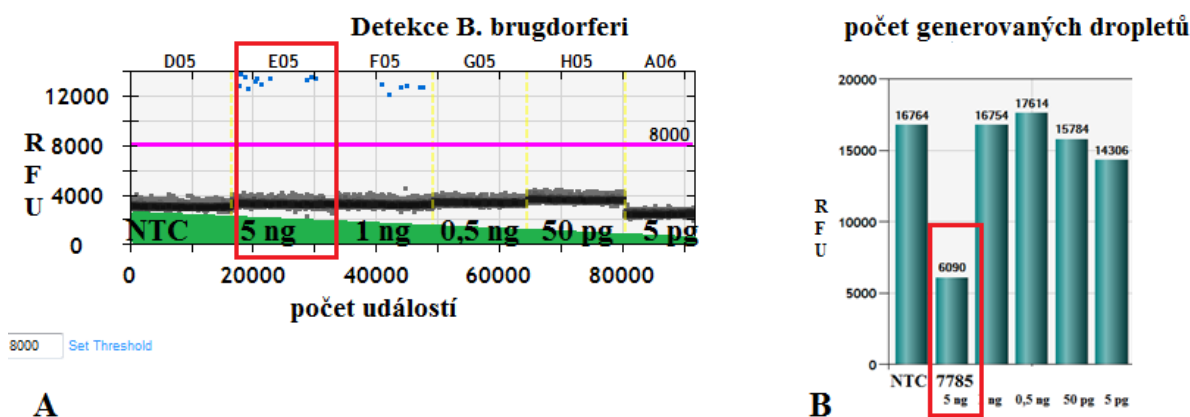


**Obrázek 16: Princip digital droplet PCR.**

Prvním krokem digital droplet PCR (ddPCR) reakce je kompartmentalizace reakční směsi do dropletů (kapének), teoreticky lze generovat až 20 000 dropletů na jednu PCR reakci. V každé kapce je náhodně rozložena cílová a “balastová” DNA. Fluorescence je měřena a zaznamenávána pro každý droplet ve dvou kanálech (FAM- modrý a HEX-zelený)[111].

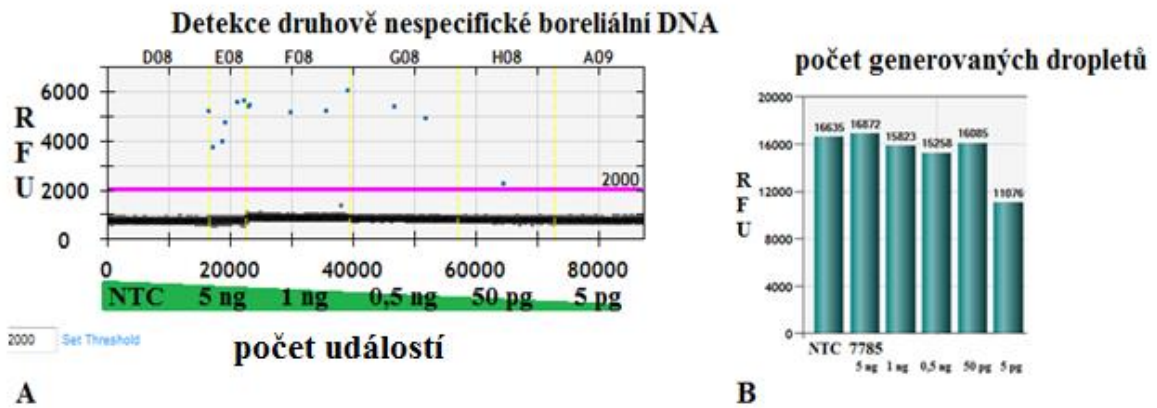


Vyhodnoceny byly pouze ty vzorky, u kterých bylo generováno alespoň 10 000 dropletů a netemplátové kontroly nevykazovaly signál. Limitní fluorescence prahy pro odečet pozitivního signálu, které jsou stanoveny na základě fluorescence dropletů neobsahujících zacílenou DNA, zobrazují Tabulky 18 a 19. Doporučuje se manuálně zvednout prahy, udané v reálných jednotkách fluorescence (dále už jen RFU, „relative fluorescence unit“) maximálně 2,5×, než je automatické nastavení[111]. Použité primery se mezi sebou liší ve výsledné fluorescenci dropletů, které neobsahují templát (černá linie). A proto se liší i v limitním prahu, který byl nastaven pro odečet specifického boreliálního signálu (růžová linie), viz Obrázky 17-20. Navíc uvádím absolutní počty generovaných dropletů, podle kterých je zřejmé, že metoda s použitím daných primerů funguje. Na Obrázku 17 (B) je vidět, že při měření s počátečním množstvím gDNA 5 ng se generovalo méně dropletů než 10 000 (6020). Na základě toho byl vzorek původně označen jako negativní. Koncentrační řadou kdy se signál objevuje i v reakci s počátečním množstvím 1 ng gDNA, je možné zpětně usoudit, že vzorek je skutečně pozitivní.



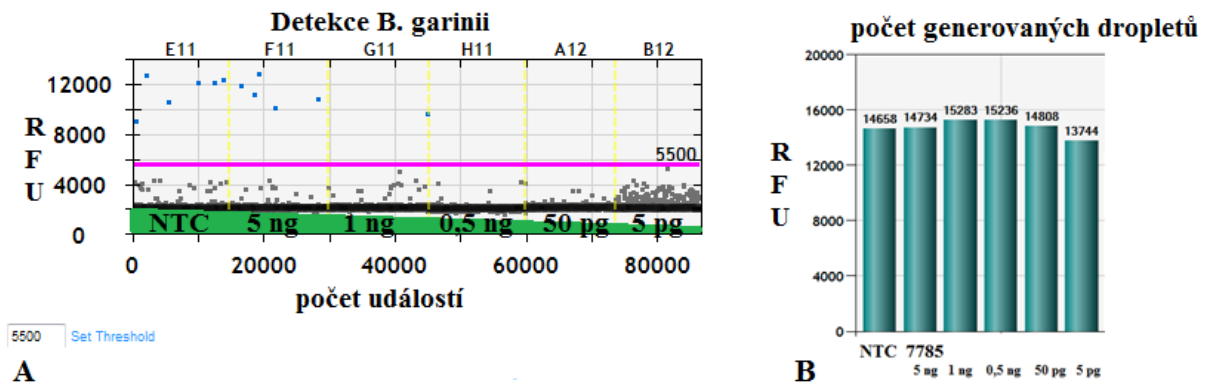
**Obrázek 17: Detekce *B. burgdorferi*.**

(A) Limitní práh pro diskriminaci pozitivního a negativního signálu byl nastaven na 8000 RFU (růžová linie). Fluorescence pozitivních dropletů se pohybuje v oblasti 12000 RFU (modré tečky- každá tečka představuje pozitivní droplet). Negativní droplet vykazují fluorescence v oblasti 3500-4000 RFU. V zeleném trojúhelníku jsou zobrazeny nanášky gDNA do reakce, NTC (netemplátová kontrola, nenese žádnou gDNA). (B) Počet generovaných dropletů nebyl optimální. Při nanáše 5 ng se generovalo pouze 6 000 dropletů (viz červený obdélník), tento vzorek proto nebyl zahrnut do analýzy. Zbylé vzorky (1 ng- 5 pg) hodnoceny byly.



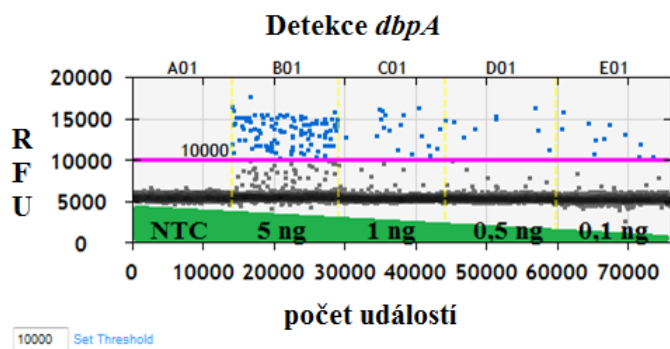
**Obrázek 18: Detekce boreliální DNA s použitím konzervovaného primeru.**

(A) Limitní práh pro diskriminaci pozitivního a negativního signálu byl nastaven na 2000 RFU (růžová linie). Fluorescence pozitivních dropletů se pohybuje v oblasti 4000-6000 RFU (modré tečky- každá tečka představuje pozitivní droplet). Negativní droplet vykazuje fluorescence v oblasti 1000 RFU. V zeleném trojúhelníku jsou zobrazeny nanášky gDNA do reakce, NTC (netemplátová kontrola, nenese žádnou gDNA). (B) Počet generovaných dropletů byl optimální.

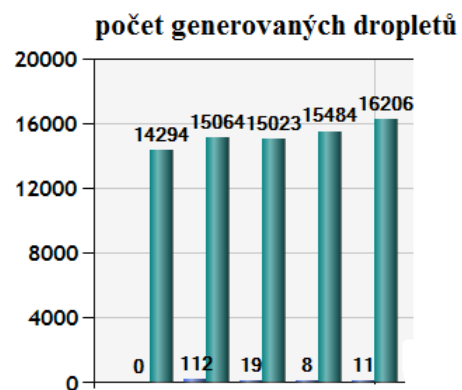


**Obrázek 19: Detekce B. garinii.**

(A) Limitní práh pro diskriminaci pozitivního a negativního signálu byl nastaven na 5500 RFU (růžová linie). Fluorescence pozitivních dropletů se pohybuje v oblasti 12000 RFU (modré tečky- každá tečka představuje pozitivní droplet). Negativní droplet vykazuje fluorescence v oblasti 2000 RFU. V zeleném trojúhelníku jsou zobrazeny nanášky gDNA do reakce, NTC (netemplátová kontrola, nenese žádnou gDNA). (B) Počet generovaných dropletů byl optimální.



**A**



**B**

**Obrázek 20: Detekce genu *dbpA*.**

Měřen byl vzorek s použitím primeru *dbpA* s barvivem EvaGreen. (A) Fluorescence pozitivních dropletů se pohybuje v rozmezí 10000-15000 RFU (modré tečky- každá tečka představuje pozitivní droplet). Droplety, které nenesou boreliální DNA mají fluorescenci okolo 5000 RFU. Limitní práh pro odečet pozitivních dropletů byl stanoven jako 10000 RFU (růžová linie). (B) Generovalo se dostatečné množství dropletů.

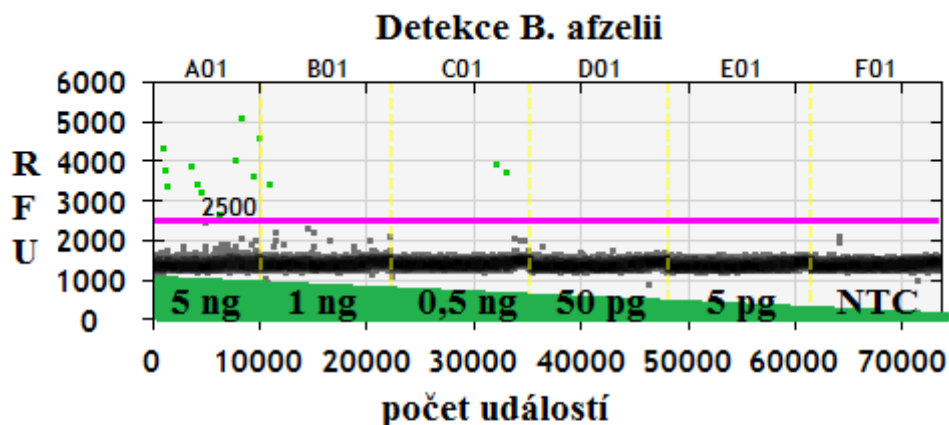
**Tabulka 18: Limitní prahy pro odečet signálu u ddPCR reakce s použitím průbového typu testu.**

Primer	limitní práh (RFU)
Afzelii	2500
Burgdorferi	8000
Garinii	5500
konzervovaný	2000

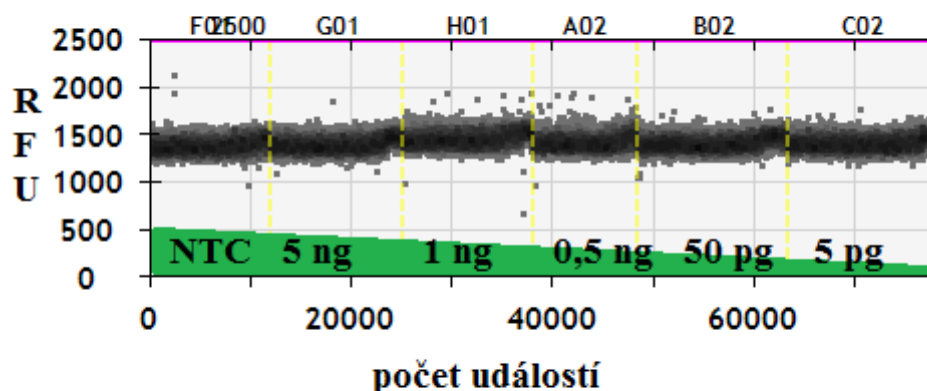
**Tabulka 19: Limitní prahy pro odečet signálu u ddPCR reakce s použitím primeru a barviva EvaGreen.**

Primer	limitní práh (RFU)
<i>dbpA</i>	10000

Na Obrázku 21 reprezentativně demonstřují, jak vypadá rozdíl ve výsledku pro borelia ddPCR pozitivní a negativní vzorek. Při porovnání *B. afzelii* negativního a pozitivního vzorku je patrné, že fluorescence dropletů, které nenesou templát se nemění a pro primer Afzelii zůstává okolo 1500 RFU a to pro vzorek nesoucí DNA, tak bez ní (NTC). Fluorescence pozitivních dropletů se pohybuje v rozmezí 3000-5000 RFU (zelené tečky- každá tečka představuje pozitivní droplet). Limitní práh pro odečet pozitivních dropletů byl stanoven jako 2500 RFU (růžová linie).



A



B

**Obrázek 21: Pozitivní a negativní záchyt 16S rDNA.**

Reprezentativní výstup ze SW QuantaSoft. (A) Ukázka výstupu pro vzorek, který byl *B. afzelii* pozitivní. Zelené body nad hranicí 2500 RFU znázorňují droplet nesoucí boreliální DNA. Měření pochází z testování vzorku 6. (B) Reprezentativní ukázka měření vzorku, který neobsahoval DNA specifickou pro *B. afzelii*. V zeleném trojúhelníku jsou zobrazeny nanášky gDNA do reakce, NTC (“nontemplate control”, netemplátová kontrola neobsahující gDNA). Růžová linie (2500 RFU) zobrazuje limitní práh, podle kterého byly droplety na základě intenzity fluorescence rozděleny na borelia pozitivní nebo negativní. V oblasti RFU 1500 (černá linie) se nachází borelia negativní droplety.

## Detekční limit metody digital droplet PCR

Z celkového množství pozitivních dropletů a velikosti amplikonu bylo výsledné množství specifické boreliové DNA dopočítáno dle Rovnice [104].

Rovnice pro výpočet počtu kopií DNA.

$$x = \frac{y \times N_A}{N \times 660}$$

kde **x** je počet kopií  
**y** je hmotnost amplikonu v g  
**N<sub>A</sub>** je Avogadrova konstanta ( $6,023 \times 10^{23}$  molekul)  
**N** je délka dsDNA amplikonu  
**660 g $\times$ mol<sup>-1</sup>** je hmotnost 1 páru bází dsDNA

Výsledná rovnice pro výpočet hmotnosti DNA.

$$y = \frac{N \times 660 \times x}{N_A}$$

Výsledný počet a fluorescence ddPCR dropletů je přepočítán na koncentraci specifické DNA v reakci před PCR cyklem. Program QuantaSoft tuto hodnotu přepočítává na 1  $\mu$ l reakce. Pro dosazení do rovnice je třeba toto číslo vynásobit 20, protože PCR reakce má objem 20  $\mu$ l.

## Průtoková cytometrie

### Příprava buněk

Jako první krok každého experimentu je důležité zajistit dostatek kontrol. Kontrolou degranulace vyvolané VF jsme zvolili absolutní aktivaci buněk chemickou stimulací. Testován byl forbol myristát acetát („phorbol myristate acetate“, PMA), PMA v kombinaci s ionomycinem nebo PMA s ionomycinem a přísadkou  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  iontů.

V průběhu celého testování byly použity krevní vzorky pocházející ze dvou zdrojů. Nejprve jsme používali krev z transfuzní stanice. Ta nám byla dodána ve formě, která se běžně nazývá anglickým termínem „Buffy coat“. Jedná se o krevní složku připravenou odstředěním jednotky plné krve, která obsahuje významný podíl leukocytů. 100  $\mu\text{l}$  krve jsme napipetovali do mikrotitrační destičky.

Následně jsme přidali 20  $\mu\text{l}$  aktivační směsi (koncentrace reagentů zobrazuje Tabulka 20) a pipetou vzorek promíchali. Destičku jsme vložili do inkubátoru (Shaking incubator NB-205: n-BIOTEK, Inc.) vyhřátého na 37 °C. Aktivační reakce byla zastavena v čase 0, 30 minut a 2 hodiny přidáním ledového 20 mM roztoku EDTA do reakční směsi. Následně jsme destičku centrifugovali na 300x g po 5 min na 4 °C (Centrifuga Allegra X-15R Centrifuge: Beckman Coulter). Supernatant byl odstraněn. U krve pocházející z ÚHKT se následně přešlo k lýze erytrocytů. K lýze erytrocytů jsme testovali komerční lyzační roztoky (BD FACS Lysing solution, RBC Lysing solution, ACK lysing buffer), se kterými jsme pracovali dle návodu. Testovali jsme také vlastní lyzační roztok na bázi  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . V tomto případě jsme ke krvi přidali lyzační roztok v poměru 1:10. Reakce probíhala 7 minut, následně byl vzorek centrifugován na 300x g po dobu 3 minut a supernatant dekantován, vzniklý pelet byl vortexován (Vortex MS2 Minishaker: IKA).

Druhým zdrojem byla naše vlastní krev. Ta byla odebírána do Heparin/ $\text{Li}^+$  nebo EDTA vakulet. Takto odebranou krev jsme pro zvýšení koncentrace leukocytů ve vzorku zakoncentrovali. Do 50ml zkumavky typu Falcon jsme přidali 4 ml plné krve a 1 ml HBSS. Přidali jsme 40 ml destilované vody. Po 20 s jsme do zkumavky přidali 4,4 ml 10x koncentrovaného PBS. Zkumavku jsme centrifugovali na 800x g po 10 minut. Supernatant jsme dekantovali a pelet mechanicky resuspendovali. Následně jsme z peletu odebrali 5 ml do 15ml zkumavky, do které jsme přidali 5 ml HBSS, zcentrifugovali na 400x g po 5 minut. Supernatant byl pipetou jemně odsát a pelet mechanicky resuspendován a rozpuštěn ve 100  $\mu\text{l}$  HBSS. Tento postup neslouží pouze k zakoncentrování vzorku, ale také k lýze erytrocytů. Následně jsme přešli k aktivaci buněk, která probíhala stejným způsobem, který je popsán výše.

Po aktivaci a zastavení aktivační reakce byly vzorky fluorescenčně značeny.

Tabulka 20: Aktivační činidla a protilátky.

Chemikálie	Výsledná koncentrace	Protilátky	Výsledné ředění ze zásobního roztoku
PMA	100 nM	CD4_A647	1:40
Ionomycin	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	CD8_A647	1:160
$\text{Mg}^{2+}$	2 mM	CD27_BV421	1:40
$\text{Ca}^{2+}$	2 mM	CD63_PE	1:40
PI	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	CD107a_BV421	1:40
		CD14_BV711	1:40

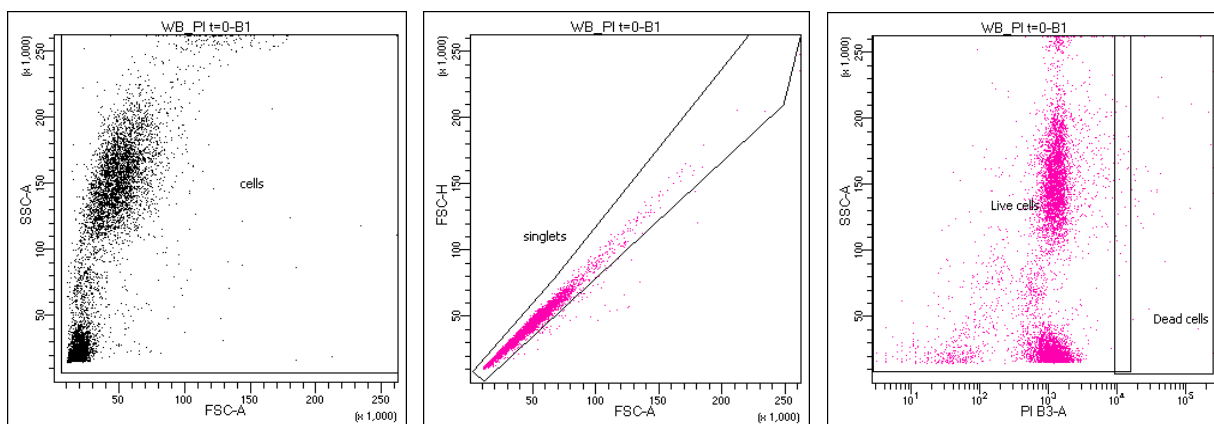
## Fluorescenční značení a měření

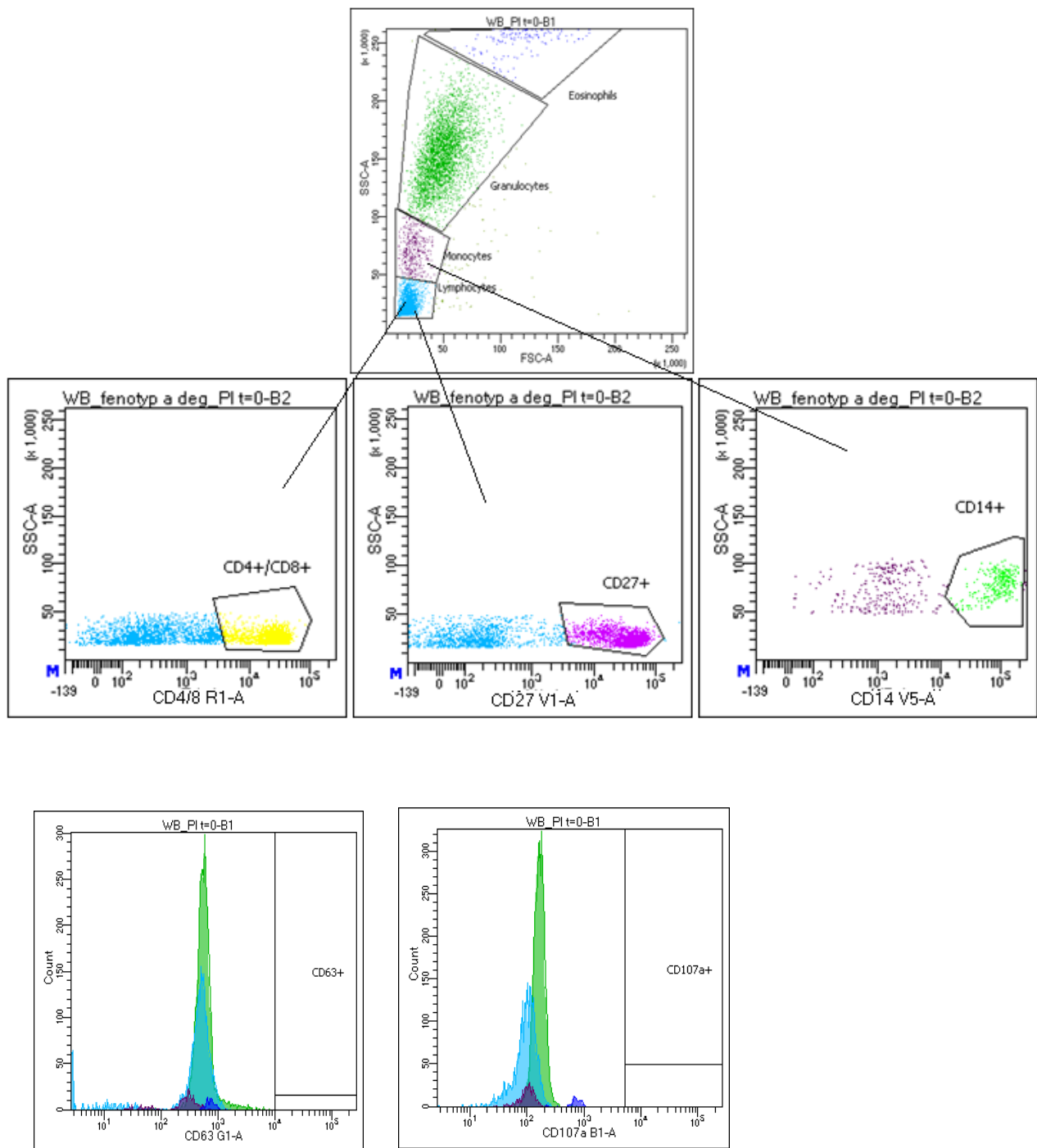
Pro fluorescenční značení jsme použili protilátky specifické pro neutrofilů a monocytů: anti-CD14, pro T-lymfocyty: anti-CD4 s anti-CD8 a anti-CD27 pro paměťové T-lymfocyty. Degranulace byla sledována pomocí protilátek anti-CD63 a anti-CD107a. Obrázek 22 zobrazuje panel použitých protilátek. Aktivované buňky jsme označili 10  $\mu$ l protilátek, ředění viz Tabulka 20, směs promíchali a vzorek uložili na 20 min na led bez přístupu světla. Po 20 minutách byly protilátky odmyty v pufru HBSS, vzorek centrifugován 300x g 3 min, dekantován, vortexován a reakční směs byla doplněna HBSS s 2% FBS do 180  $\mu$ l. Před samotným měřením jsme k buňkám pro diskriminaci mrtvých a živých buněk přidali propidium jodid (PI). Vzorek jsme následně změřili pomocí průtokové cytometrie. Měření probíhalo na přístrojích LSR II (BD Biosciences) a CytoFlex (Beckman Coulter). Data byla vyhodnocena v SW BD FACSDiva v8.0 (pro LSR II) a CytExpert v2.0 (Beckman Coulter). Na Obrázku 23 předkládám strategii gatování buněk.

VIOLET 405	PxN	Parameter name	SSC	V1	V2	V3	V4	V5	V6
	PxF	Filter			450/40	525/50	605/15	660/20	711/25
PxS	DM				505	595	630	685	760
	PxS	Label		CD27_BV421				CD14_BV711	
BLUE 488	PxN	Parameter name	SSC		B1	B2	B3	B4	
	PxF	Filter	488/10		525/50	615/20	661/11	695/40	
	PxS	DM			495	600	635	675	
	PxS	Label			CD107a_A488				
GREEN 561	PxN	Parameter name			G1	G2	G3	G4	G5
	PxF	Filter			586/15	620/15	670/14	710/20	780/60
	PxS	DM			570	615	635	685	735
	PxS	Label			CD63_PE				
RED 637	PxN	Parameter name					R1	R2	R3
	PxF	Filter					670/30	730/45	780/60
	PxS	DM					710	755	
	PxS	Label					CD4_A647 CD8_A647		

**Obrázek 22: Panel protilátek pro sledování fenotypu a degranulace.**

V rádcích barevně oddělených (fialová-červená) jsou zobrazeny použité lasery. Ve sloupcích jsou kanály, ve kterých je fluorescence snímána.





**Obrázek 23: Gatovací strategie.**

Z lymfocytární populace byly odděleny CD4 a CD8 pozitivní buňky naznačené protilátkou CD4/CD8\_A647. Paměťové buňky byly detekovány na základě exprese molekuly CD27 konjugované s fluorochromem BV421. Z monocyťů byla vyčleněna CD14 pozitivní populace. Ta byla označena protilátkou s fluorochromem BV711.



## Výsledky

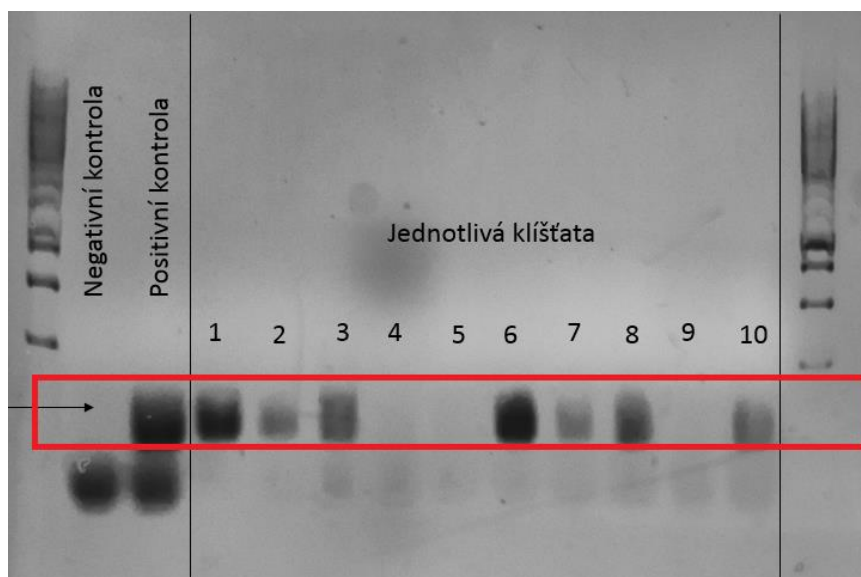
### Detekce boreliální DNA v gDNA pocházející z klíšťat

Z literatury je patrné, že ovlivnění ddPCR metody reakčními inhibitory, kterých je v biologických vzorcích velké množství, je v porovnání s kvantitativní PCR (“quantitative PCR”, qPCR) nižší[112]. Proto bylo mým cílem detekovat boreliální DNA ve vzorcích klíštěcí gDNA (která je mixem DNA mnoha živočišných druhů) právě metodou ddPCR. Testovány byly vzorky gDNA, které firma Protean s r.o. metodou PCR stanovila jako borelia negativní. Použit byl druhově nespecifický primer pro gen kódující Decorin binding protein A (*dbpA*) s interkalačním barvivem EvaGreen (Bio-Rad). Z literatury plyne, že ddPCR je dostatečně robustní, proto jsme vzorky neměřili v biologickém opakování[113]. Stanovovali jsme absolutní množství kopií genu v měřeném vzorku.

Prokázali jsme pozitivní záchyt boreliální DNA ve vzorku klíštěcí gDNA, který byl firmou Protean s r.o. pomocí metody PCR označen jako borelia negativní. Z výsledku plyne, že ddPCR je více senzitivní než metoda PCR.

### PCR z klíšťat

Během letního soustředění na Běstvině jsme detekovali borelie v homogenizovaných klíšťatech. Před reakcí nebyla provedena izolace DNA, ale celé klíště bylo vloženo do reakční směsi. Použity byly primery pro gen *ospA*. 5 ng klíštěcí gDNA, která byla firmou Protean s r.o. (PCR) a námi pomocí ddPCR ověřená jako borelia pozitivní vzorek, jsme použili jako pozitivní kontrolu. Obrázek 24 zobrazuje výsledek testování.



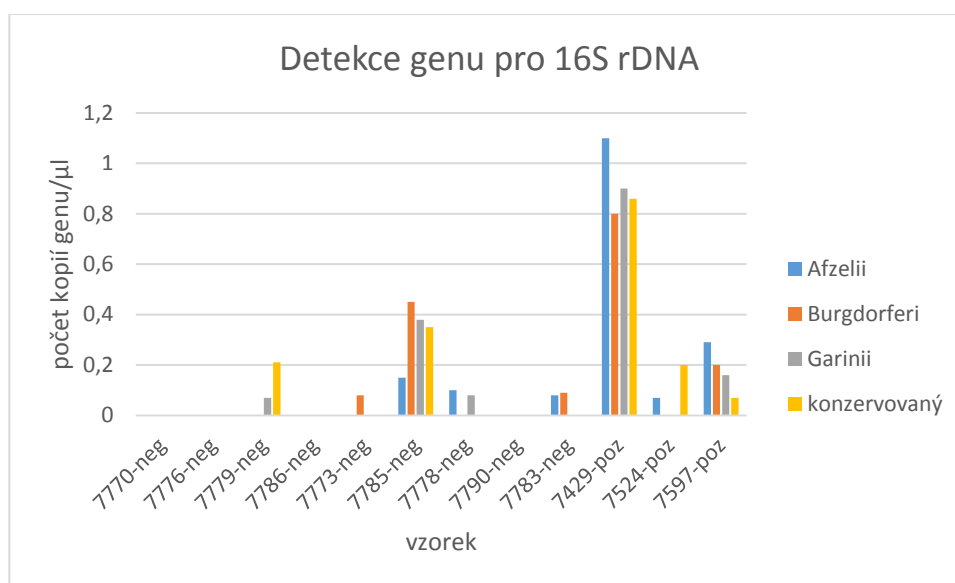
**Obrázek 24: PCR z klíšťat.**

Obrázek znázorňuje výsledek PCR provedené s primery pro gen *ospA*. Jako negativní kontrola byla použita voda. Pozitivní kontrola je gDNA, která byla firmou Protean s r.o. (PCR) a ddPCR ověřená jako borelia pozitivní. V červeném poli jsou zvýrazněné *ospA* pozitivní vzorky. Použit byl 1 kb marker molekulové hmotnosti.

Při testování PCR metodou vyšlo 70 % všech testovaných klíšťat jako borelia pozitivní.

## Detekce boreliové koinfekce v gDNA pocházející z klíšťat

Na základě potvrzení vyšší sensitivity ddPCR metody v porovnání s PCR metodou, byly testovány vzorky negativní na borelie (ověřeno metodou PCR). Jako kontrola detekce boreliální DNA byly proměřeny vzorky PCR metodou stanovené jak borelia pozitivní. Pro zvýšení specifity testování jsme stanovovali boreliální genotyp, viz Obrázek 25. Použity byly primery specifické pro 16S rDNA. Primery byly navrženy jako druhově specifické pro tyto druhy: *B. afzelii*, *B. burgdorferi* a *B. garinii*. Byl použit i primer, který není druhově specifický (konzervovaný primer). S jeho použitím očekáváme nejsilnější amplifikaci. Konzervovaný primer byl navržen pro obecný záchyt boreliální DNA, měl by proto amplifikovat gen pro 16S rDNA u všech přítomných druhů borelií ve vzorku.

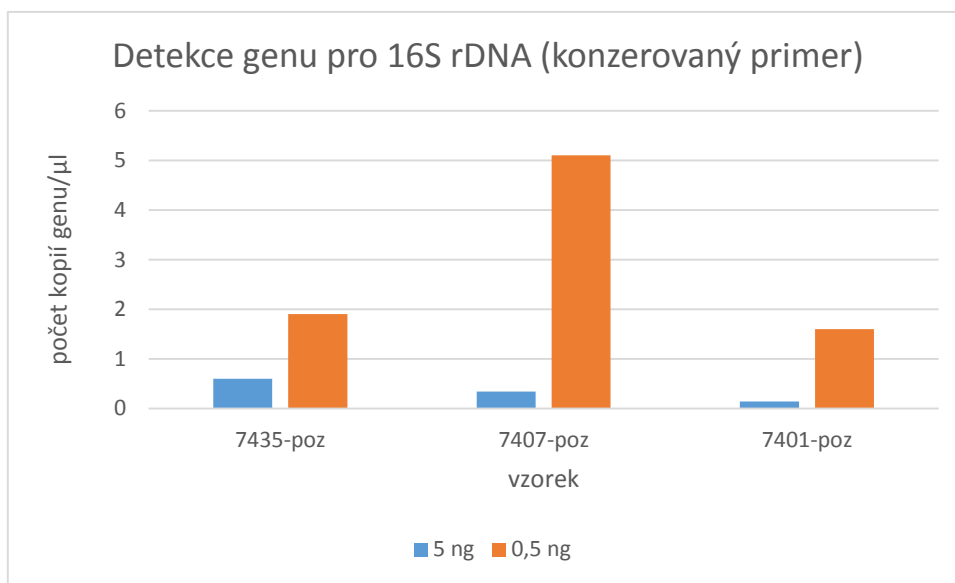


**Obrázek 25: Detekce boreliálního genotypu.**

Testována byla přítomnost boreliální DNA pomocí 3 genotypově specifických primerů a jednoho konzervovaného (určeného pro obecný záchyt boreliální DNA). Všechny použité primery jsou specifické pro 16S rDNA. Data pochází z reakcí, do kterých byl vnesen 1ng klíšťecí gDNA.

Z výsledků vyplývá, že jsme schopni detekovat přítomnost borelií spolu s jejich genotypem i u vzorků, které byly metodou PCR potvrzené jako borelia negativní. Předpoklad, že s použitím konzervovaného primeru budeme schopni detekovat větší množství genu, se nepotvrdil. Pouze 5 z 12 testovaných vzorků vykazovaly pozitivitu s použitím konzervovaného primeru. 5 z 9 testovaných vzorků, které byly metodou PCR ověřeny jako borelia negativní, bylo metodou ddPCR bylo určeno za pozitivní. Ve vzorcích byla detekována nejen přítomnost borelií, ale i jejich genotyp. Z těchto 5 vzorků 1 vzorek obsahoval DNA specifickou pro všechny 3 testované druhy: *B. afzelii*, *B. burgdorferi* a *B. garinii*.

Proměřili jsme koncentrační závislost množství pozitivních dropletů v závislosti na počátečním množství gDNA, viz Obrázek 26. Do reakce bylo přidáno 5 ng a 0,5 ng klíčící gDNA. K amplifikaci byl použit konzervovaný primer. Proměřeny byly 3 vzorky PCR metodou ověřené jako pozitivní. Očekávali jsme, že tyto vzorky budou obsahovat více boreliální DNA, než vzorky PCR metodou ověřené jako borelia negativní. Se zvyšujícím se počtem kopií genu ve vzorku se zvyšuje pravděpodobnost, že se kopie genu dostane do dropletu a bude amplifikována. Proto jsme u PCR borelia pozitivních vzorků očekávali lineární závislost počtu kopií genu na množství počáteční gDNA v reakci.



**Obrázek 26: Koncentrační závislost počátečního množství gDNA na počtu kopií genu.**

Testována byla linearita záchytu kopií genu v závislosti na počátečním množství gDNA v reakci. Použit byl konzervovaný primer, počáteční nanáška gDNA byla 5 ng a 0,5 ng.

Z výsledků plyne, že jsme schopni pozorovat trend snižujícího se počtu kopií genu v závislosti na počátečním množství gDNA. Ale závislost není lineární. 10x nižší nanáška gDNA do reakce se neprojeví 10x nižším počtem detekovaných kopií genu.

## Detekční limit metody ddPCR

Po detekci druhově specifické boreliální DNA v borelia negativních vzorcích jsme spočítali detekční limit ddPCR metody, viz Tabulka 21. Detekční limit byl spočítán pro všechny používané primery (druhově specifické i nespecifické). Při výpočtu jsme vycházeli z nanášky gDNA do reakce, ke které jsme výsledné limity vztáhli. K výpočtu jsme použili rovnici uvedenou níže.

Výsledná rovnice pro výpočet hmotnosti DNA.

$$y = \frac{N \times 660 \times x}{N_A}$$

Názorné dosazení pro absolutní kvantifikaci produktu dbpA:

$$y = \frac{128 \times 660 \times 0,8}{N_A} = 7,0 \times 10^{-20} g$$

kde **x** je počet kopií  
**y** je hmotnost amplikonu v g  
**N<sub>A</sub>** je Avogadrova konstanta ( $6,023 \times 10^{23}$  molekul)  
**N** je délka dsDNA amplikonu  
**660 g $\times$ mol<sup>-1</sup>** je hmotnost 1 páru bází dsDNA

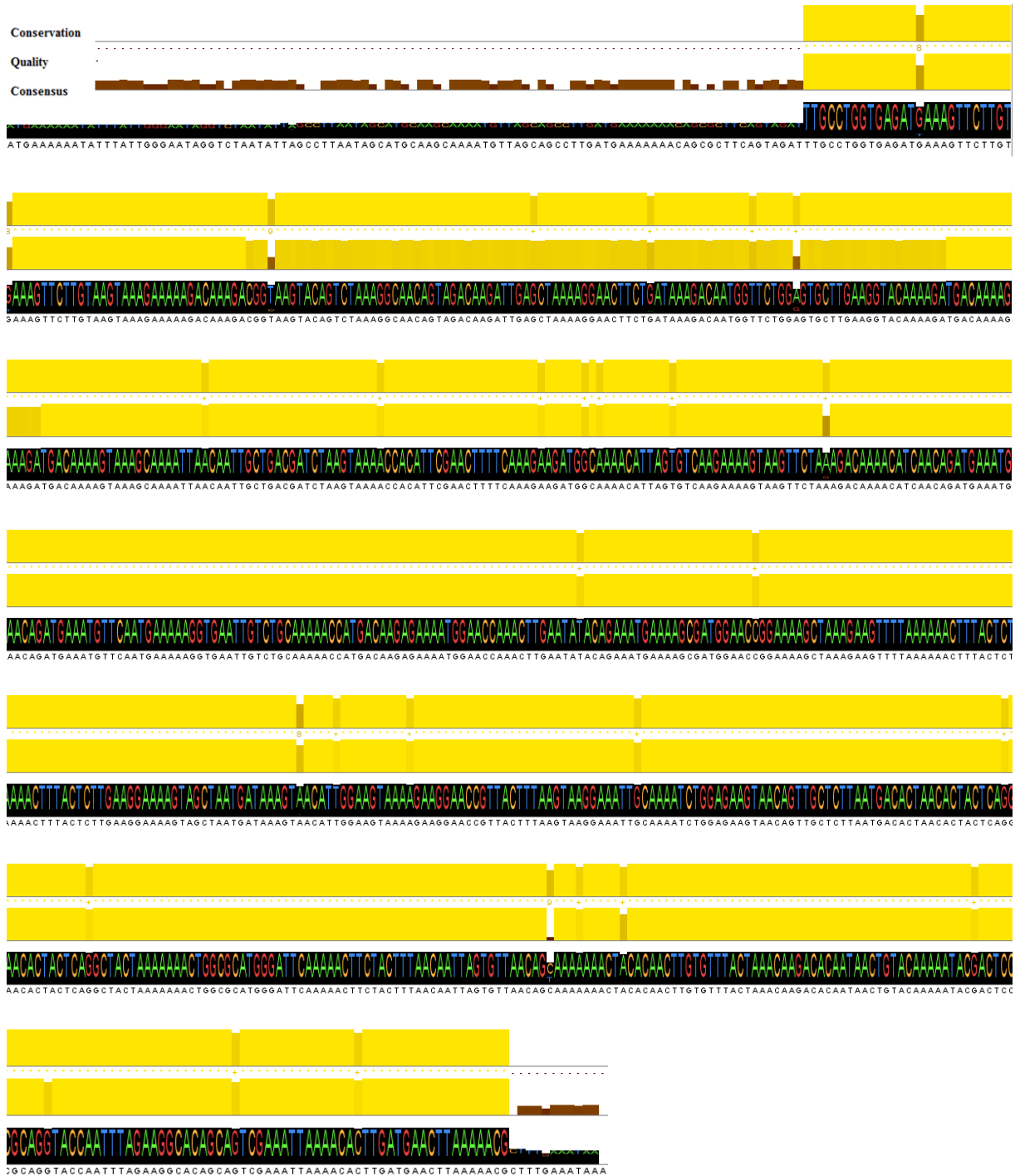
Tabulka 21: Detekční limit ddPCR.

Primer	Amplion (nt)	DNA input (pg)	Počet kopií (v $\mu$ l)	Množství boreliové DNA (g)
Afzelii (16S rDNA)	65	50	0,11	$1,6 \times 10^{-16}$
Burgdorferi (16S rDNA)	83	1000	0,2	$3,6 \times 10^{-16}$
konzervovaný (16S rDNA)	53	500	0,07	$8,1 \times 10^{-17}$
Garinii (16S rDNA)	84	50	0,08	$8,7 \times 10^{-17}$
dbpA	128	100	0,8	$7,0 \times 10^{-20}$

Metodou ddPCR s použitím průbového typu testu je možné zachytit patogena v gDNA v koncentraci až v řádech fg-ag. Detekční limit se liší v závislosti na použitém typu testu[114].

## Analýza nukleotidové variability vybraných virulentních faktorů

Na základě literatury, která se zmiňuje o variabilitě boreliálních VF, jsme vizualizovali nukleotidovou konzervaci pro dva vybrané VF: *OspA* (Obrázek 27) a *OspC* (Obrázek 28). Cílem bylo vizuálně porovnat míru nukleotidové konzervace v rámci dvou *OspA* a *OspC* mezi sebou. Zároveň s tím byla porovnána i nukleotidová variabilita v rámci 3 boreliálních druhů nejprve pro *OspA* a následně i pro *OspC*.



A

Conservation

Quality

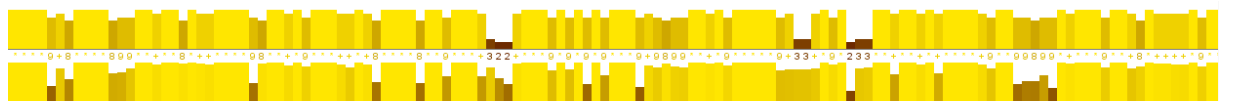
Consensus

Consensus

TTGAAAAATATTTATTGGGAATAGGCTAAATATTAGCCTTAATAGCATGTAAGCAAATGTAGCAGCCTTGACGAGAAAAACAGCGACACTTCATTTTCAGTAGATTTGCCTGGTGAATGAA



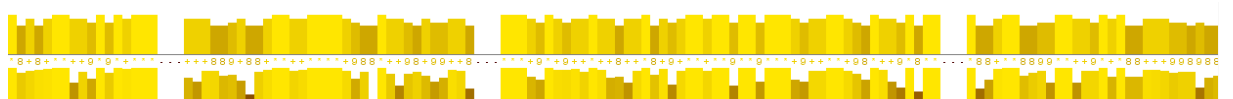
CTGGTGAATGAAAGTCTGTAGCAAGAAAAACAAAGACGGCAAGTACGATCTAATTGCAACAGTAGACAAGCTTGAGCTTAAAGAACTCTGATAAAAAACATGGACTGGAGTACTTGAAGCGTAAAC



TAAGCGTAAAGCTGACAAAAGTAAAGTAAATTAACAATTTCTGACGATCTAGGTCAAACCACACTGAAAGTTTCAAAGAAGATGGCAAAAACACTAGTATCAAAAAAGTAACTTCCAAAAGACAAGTCATCAACA



AAGTCATCAACAGAGAAAAATTCAAAGAAAAAGGTGAATCTGAAAAAAATTAACAAGAGCAGACGGAAACCAGACTTGAATACACAGAAATTAAGAAGATGGATATGCTGGAAAAAGCTAAAGAGGTTTT



CTAAAGAGTTTTAAAAAGGCTATGTTCTGAAAGAACTCTAACTGCTGAAGGCAAAACAACATGGTGTAAAGAAGGAAGCTTACTTTAAAGCAAAAATATGATTCAAAATCTGGGGAAGTTTCAGTTGAAT

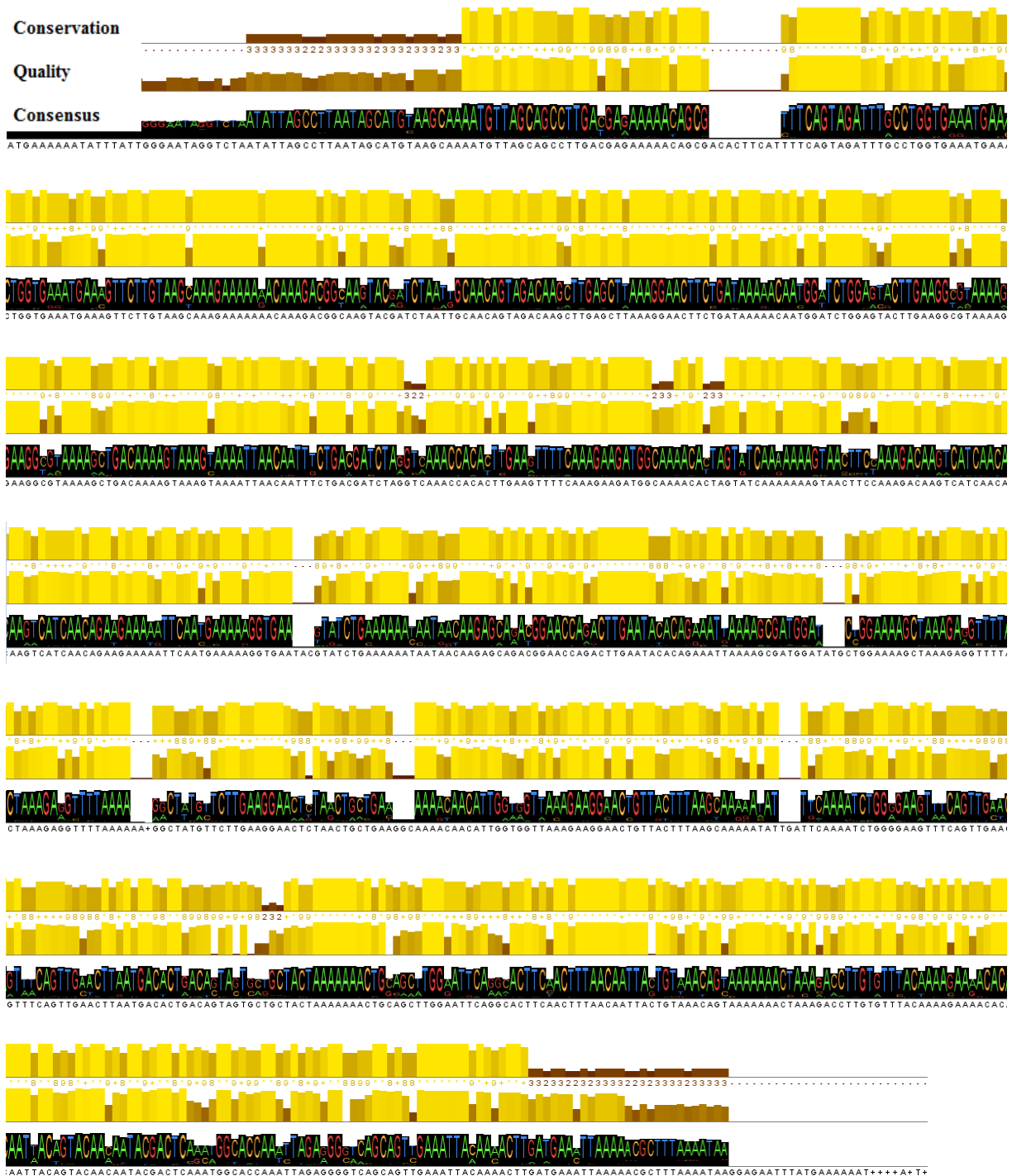


GTTTCAGTTGAACTTAATGACACTGACAGTAGTGCTGCTACTAAAAAACTGACGCTTGAATTCAGGCCTTCAACTTTAACAATTAAGTAAACAGTAAAAAACTAAAGACCTTGTGTTACAAAAGAAAAACG



CAAAAGAAACACAATACAGTACAATAAGACTCAAGACCAAACTAGAAGGTCAGCAGTGAATTAACAACTGATGAATTA AAAACGCTTAAAAATA

B

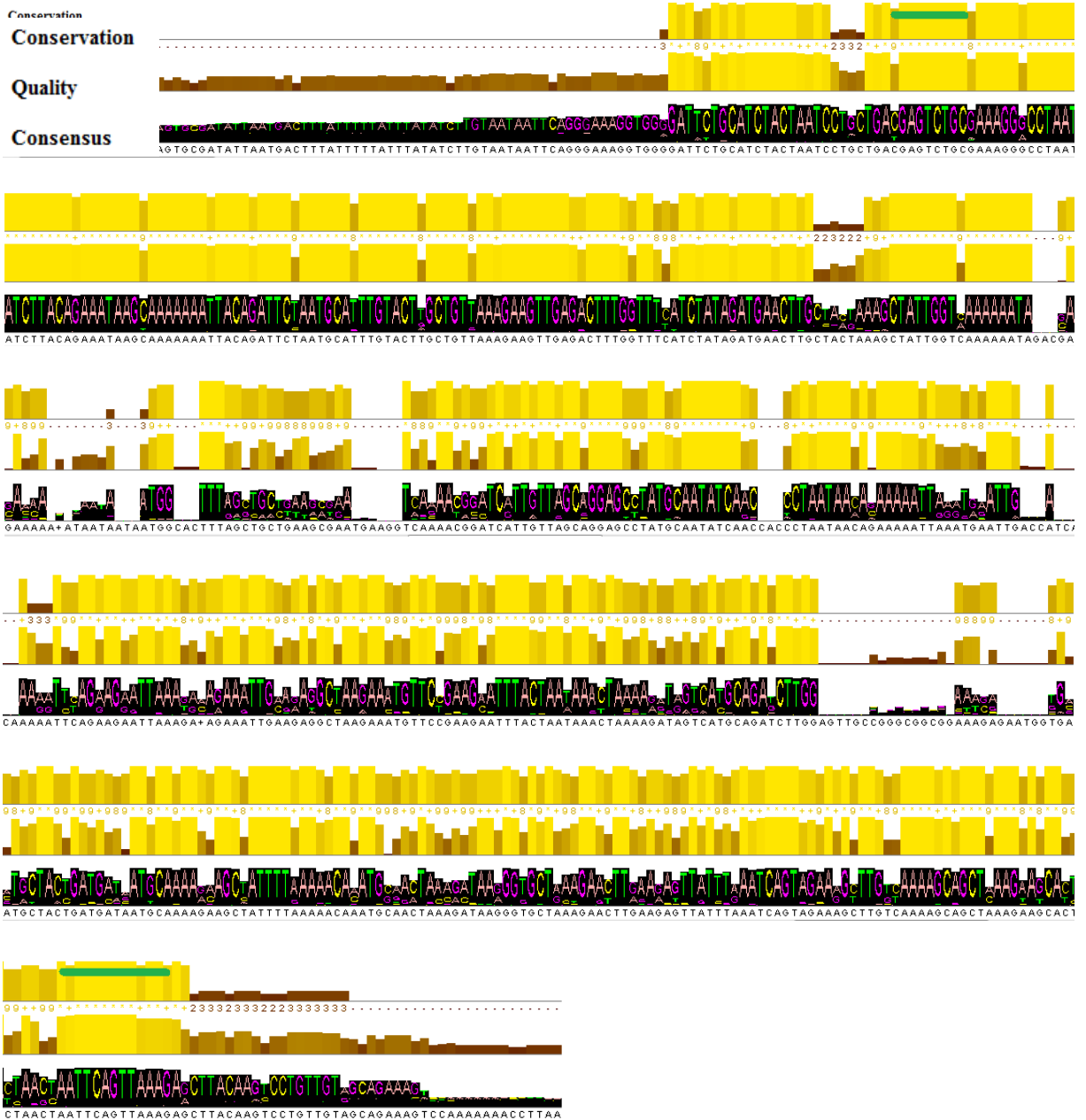


## C

**Obrázek 27: Nukleotidová konzervovanost genu *ospA*.**

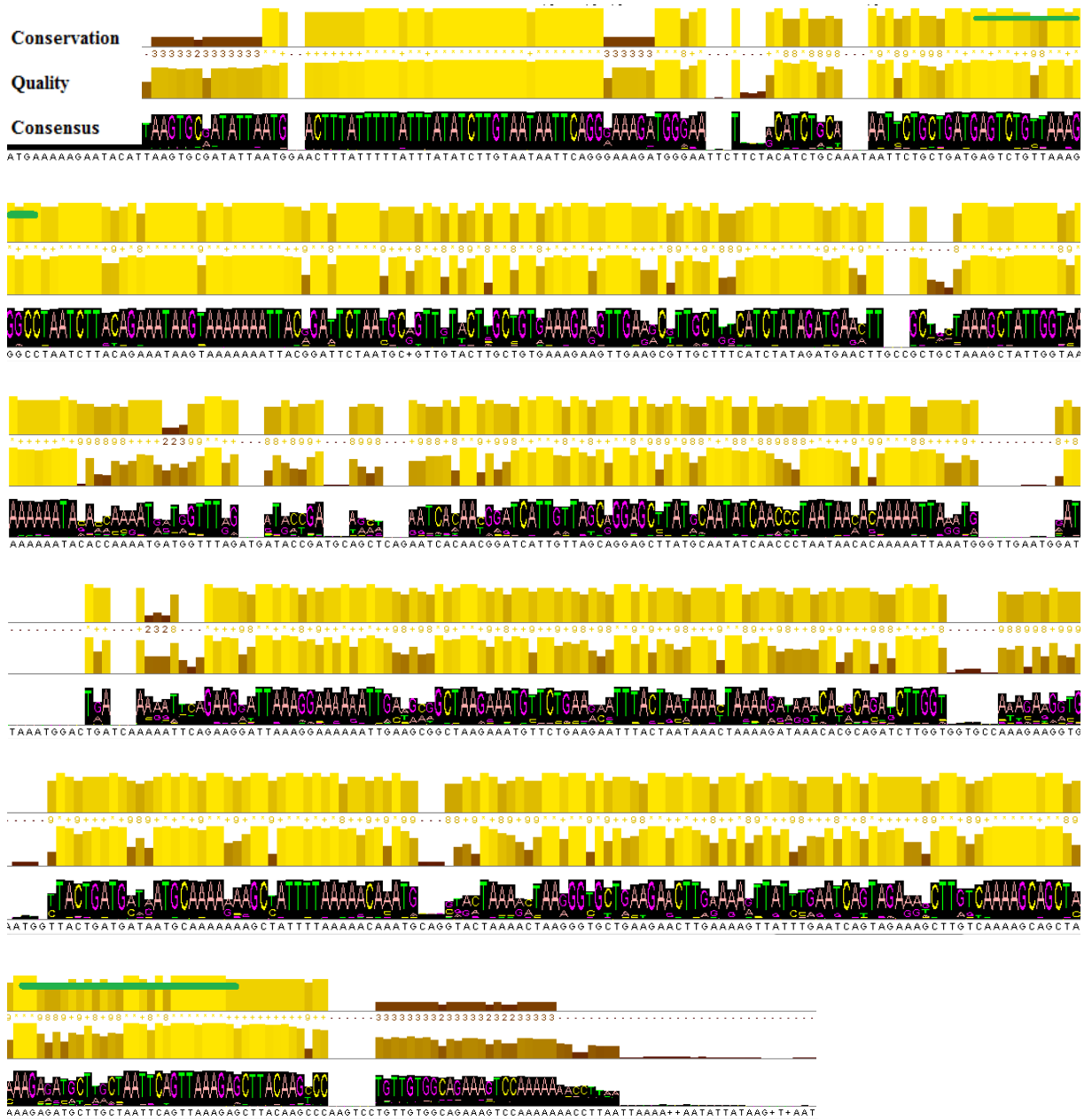
Obrázek zobrazuje MSA ("multiple sequence alignment") vytvořený v programu Kalign, který byl vizualizován v programu Jalview. Finální výstup byl fragmentován do dílů po 125 nukleotidech. Každý díl se skládá ze 3 oblastí: konzervace, kvalita sekvence a konsenzus. 1. řada odpovídá konzervaci. Čím je obdélník vyšší a žlutější, tím je oblast genu konzervovanější. (A) Vizualizace pro 81 sekvencí specifických pro *B. afzelii*. (B) Vizualizace pro 99 sekvencí specifických pro *B. burgdorferi*. (C) Vizualizace pro 90 sekvencí specifických pro *B. garinii*.

Gen *ospA* druhu *B. afzelii*, vykazuje největší konzervovanost jak v rámci boreliálních druhů, tak v rámci dvou porovnávaných genů. V dalším kroku jsme porovnali mezidruhovou konzervovanost genu pro *OspC*.



A





**B**



## C

**Obrázek 28: Nukleotidová konzervovanost genu *ospC*.**

Obrázek zobrazuje MSA ("multiple sequence alignment") vytvořený v programu Kalign, který byl vizualizován v programu Jalview. Finální výstup byl fragmentován do dílů po 125 nukleotidech. Každý díl se skládá z 3 oblastí: konzervace, kvalita sekvenční a konsenzus. 1. řada odpovídá konzervaci. Čím je obdélník vyšší a žlutější, tím je oblast genu konzervovanější. Zelenou linií jsou zobrazeny pozice nasedání primeru *ospC*, který jsem navrhla. Postup jeho návrhu spolu s nukleotidovou sekvencí popisují na další straně. (A) Vizualizace pro 103 sekvencí specifických pro *B. afzelii*. (B) Vizualizace pro 410 sekvencí specifických pro *B. burgdorferi*. (C) Vizualizace pro 161 sekvencí specifických pro *B. garinii*.

Nukleotidové sekvence genu *OspC* jsou vizuálně více konzervované než sekvence genu pro *OspA*. V rámci genu *ospC* nebyly pozorovány velké rozdíly v konzervovanosti mezi jednotlivými boreliálními druhy, jako tomu bylo u genu *OspA*. *OspA* patřící *B. Afzelii* vykazuje větší konzervovanost genu *OspA* patřící boreliálním kmenům *B. burgdorferi* a *B. garinii*.

## Návrh primeru

Pro amplifikaci boreliálního VF *OspC* jsme navrhli specifické primery. Ty byly navrženy na základě předchozí vizualizace genové konzervace. Primery nasedají na konzervovaných úsecích genů tak, aby amplifikovali co možná největší část variabilní nukleotidové sekvence. Výsledné amplikony vzniklé testováním vzorků pocházejících z lokálních sběrů klíšťat měly být následně sekvenovány. Sekvenaci by byla zmonitorována nukleotidová variabilita genu *ospA* i *ospC* na daném území.

Na základě 2 nukleotidových sekvencí genů *ospC* specifických pro *B. burgdorferi* (GeneBank ID: JN969070.1, U04281.1) byly v programu Primer3 navrhnuty primery *OspC*. Pozice nasedání primerů byla vybrána tak, aby primery nasedaly na konzervované úseky genu. Konzervace byla vizualizována pro MSA genů *ospC* boreliálních kmenů *B. afzelii*, *B. burgdorferi* a *B. garinii*. Specifita primerů byla ověřena v programu NCBI-BLAST. Ačkoli byly primery *OspC* navrženy na základě genu *B. burgdorferi*, nasedají na *B. afzelii*, *B. burgdorferi* a *B. garinii*, viz Obrázek 26.

Tabulka 22: Navržené primery pro geny *ospA* a *ospC*.

<b>Primer</b>	<i>ospC_For101</i> : ATGAGTCTGTAAAGGGCCTAATCT
<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	59, 94
<b># nukleotidů</b>	25
<b>Shoda na 3' konci</b>	ano
<b># specifických nukleotidů</b>	<i>Homo sapiens</i> 10 <i>Mus musculus</i> 7 <i>Ixodes ricinus</i> 17
<b>Primer</b>	<i>ospC_Rev619</i> : CTTTAACTGAATTAGCAAGCATCTCTTTAGCTGC
<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	60, 8
<b># nukleotidů</b>	34
<b>Shoda na 3' konci</b>	ne
<b>Primer</b>	<i>OspA_For15</i> : TAACCCTTATCCAGATTATAATCGGA
<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	61,7
<b># nukleotidů</b>	26
<b>Shoda na 3' konci</b>	ne
<b>Primer</b>	<i>OspA_Rev483</i> : TTTTAAAACCTCTTTAGCTTTTCCGG
<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	60,1
<b># nukleotidů</b>	26
<b>Shoda na 3' konci</b>	ne

Primery byly navrženy tak, aby byly univerzální. Primery pro gen *ospC* nasedají na sekvence genů všech 3 boreliálních druhů, na které jsme se v práci zaměřili (*B. afzelii*, *B. burgdorferi* a *B. garinii*). Primer specifický pro *ospA* navrhl Kasper Sjödin. Po následném namapování primeru pro gen *ospA* jsme zjistili, že primer *OspA\_For15* není specifický.

## Průtoková cytometrie

Cílem bylo navrhnout nový test, který by pomohl lepší diagnostice Lymeské boreliózy. V současné době se v klinickém testování, například alergologii, uplatňují degranulační testy[4], [107]. Proto jsme se rozhodli detekovat degranulaci imunitních buněk, navozenou boreliálními VF. Pro detekci jsme zvolili průtokovou cytometrii, jejichž klinické využití je stále na vzestupu. Podobně navržené testy, jako byl ten náš, se již začínají používat, avšak pro jiné patogeny. Předpokladem testu je, že imunitní buňky pacientů s LB jsou již předaktivovány a proto budou při reakci s boreliálními VF reagovat rychleji, než buňky zdravých dárců. Borelie se v rámci geografické lokality liší svými VF. Proto je důležité aktivovat buňky těmi formami VF, které jsou lokální, specifické pro danou oblast. Výběr VF, které byly použity pro navození aktivace, koreluje s proteiny, které se používají v klinické praxi, ty jsou však globální, nejsou geograficky specifické. Mezi používané VF patří i OspA a OspC, pro které jsme navrhli primery. PCR produkt měl být následně sekvenován, čímž by se odhalili nukleotidové změny v genech VF specifické pro naši lokální oblast.

Degranulaci jsme detekovali jako externalizaci molekul CD107a a CD63 na povrchu granulocytů, monocytů a T-lymfocytů. Jako pozitivní kontrolu absolutní aktivace buněk jsme použili kombinaci PMA/ionomycin. Absolutní aktivaci se nám nepodařilo navodit, proto jsme se v práci věnovali hlavně optimalizaci této chemicky navozené aktivace. Provedli jsme celkem 15 druhů optimalizačních pokusů. V první řadě jsme otestovali účinnost použitých protilátek. Navrhli jsme protilátkový panel tak, aby docházelo k co možná nejmenším přesvitům mezi detekčními kanály. Měnili jsme složení a kombinaci aktivačních složek stejně jako časy, po které aktivace probíhala. Testovali jsme různé lyzační roztoky (BD FACS Lysing solution, RBC Lysing buffer, ACK lysing buffer, lyzační roztok na bázi  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) a typy vakulet, do kterých byla krev odebírána (EDTA, Heparin/ $\text{Li}^+$ ). Na Obrázku 29 ukazují reprezentativní výsledky pocházející z chemické aktivace krve, pro aktivaci byla použita směs PMA/ionomycin (v koncentraci PMA 1 nM, ionomycin 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) po dobu 0 min, 30 min a 120 min aktivace.

Well: B2

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	8,745	###	100.0
cells	8,745	100.0	100.0
singlets	8,680	99.3	99.3
Live cells	8,577	98.8	98.1
Granulocytes	4,300	50.1	49.2
Monocytes	550	6.4	6.3
CD14+	274	49.8	3.1
Lymphocytes	3,531	41.2	40.4
CD27+	2,375	67.3	27.2
CD4+/CD8+	1,879	53.2	21.5
Eosinophils	130	1.5	1.5
CD63+	7	0.1	0.1
CD107a+	3	0.0	0.0
Dead cells	84	1.0	1.0

**A**

Well: B5

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	7,369	###	100.0
cells	7,369	100.0	100.0
singlets	7,320	99.3	99.3
Live cells	7,214	98.6	97.9
Granulocytes	3,528	48.9	47.9
Monocytes	516	7.2	7.0
CD14+	244	47.3	3.3
Lymphocytes	2,995	41.5	40.6
CD27+	1,964	65.6	26.7
CD4+/CD8+	1,489	49.7	20.2
Eosinophils	121	1.7	1.6
CD63+	2	0.0	0.0
CD107a+	0	0.0	0.0
Dead cells	91	1.2	1.2

**B**

Well: B8

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	6,957	###	100.0
cells	6,957	100.0	100.0
singlets	6,909	99.3	99.3
Live cells	2,461	35.6	35.4
Granulocytes	152	6.2	2.2
Monocytes	388	15.8	5.6
CD14+	109	28.1	1.6
Lymphocytes	1,811	73.6	26.0
CD27+	490	27.1	7.0
CD4+/CD8+	355	19.6	5.1
Eosinophils	66	2.7	0.9
CD63+	0	0.0	0.0
CD107a+	17	0.7	0.2
Dead cells	4,700	68.0	67.6

**C**

**Obrázek 29: Reprezentativní zobrazení populací buněk po aktivaci s PMA/ionomycinem v různých časech po aktivaci.** Výsledek chemické aktivace buněk. Metoda není optimalizovaná. Gatovací strategie odpovídá strategii popsané v metodě průtokové cytometrie (Obrázek 23). (A) Aktivace po dobu 0 min. (B) Aktivace po dobu 30 min. (C) Aktivace po dobu 120 min.

Nepodařilo se nám navodit buněčnou aktivaci. Proto jsme nepřešli ke kroku aktivace buněk bakteriálními VF. Metodickým problémem, se kterým jsme se během aktivace potýkali, byla úmrtnost buněk po 2 hodinové aktivaci. Tento test si žádá více času pro optimalizaci.

## Diskuze

Tato práce vznikla jako reakce na málo senzitivní a specifickou klinickou diagnostiku Lymeské boreliózy[2], [76], [115]. V roce 2016 bylo v České republice evidováno téměř 5000 nově nakažených osob, avšak tito diagnostikovaní pacienti zřejmě tvoří pouhý vršek ledovce. Potřebu vývoje nového diagnostického testu dokládá fakt, že Evropská unie přislíbila, skrze Horizon 2020, v rámci „ID Lyme“ projektu, 2 miliony eur mezinárodnímu konsorciu, skládajícího se z participujících pracovišť v Německu, Rakousku a Holandsku, za uvedení nového diagnostického testu na trh[116].

V důsledku toho, že je současná diagnostika LB málo senzitivní, jsme se v této diplomové práci zaměřili na nové metodické postupy, které by do budoucna mohly sloužit pro zlepšení diagnostiky tohoto onemocnění.

Nejprve jsme se zaměřili na detekci borelií v klíštěti. Hlavním cílem bylo ověřit hypotézu, že digital droplet PCR (ddPCR) metoda je citlivější než PCR a určit genotyp detekovaných borelií. Detekce genotypu borelií je důležitá, borelie se mezi sebou liší v klinických manifestacích, které u pacientů vyvolávají[89]. Detekce borelií v přisátém klíštěti velmi napomáhá klinické diagnostice. Přínos testování klíšťat je patrný hlavně v případech, kdy se u pacienta nevyvine charakteristická EM. Pacient by tak unikl časné diagnóze a zvýšilo by se u něj riziko, že se borelie diseminují do těla, kde způsobí pozdější komplikace[53]. Testování klíšťat momentálně patří do komerční sféry. Ve světě i na území ČR existuje mnoho firem, které se testováním klíšťat zabývají. Přítomnost boreliální DNA v klíštěti se hlavně v minulosti testovala pomocí “end-point” PCR s použitím specifických primerů. U takovýchto komerčních testů je nezbytné, aby použitá metoda dosahovala určité specifity (detekce borelií) a sensitivity (v určitém množství).

U klinického stanovení se často určuje detekční limit metody. Vztáhnuto k boreliálnímu testování jde o určení nejmenšího množství boreliální DNA, které je možné ve vzorku klíštěcí gDNA detekovat. Tento limit je důležitý, spíše než v komerčním testování, ve výzkumu. Pro komerční testování je více důležité nastavení “cut-off” hranice pro označení klíštěte jako vektora schopného transmise borelií. Aby přisáté klíště bylo označené jako borelia pozitivní, musí obsahovat borelie v takovém množství, aby mohly být v dostatečném množství transmittovány do pacienta, přemoci jeho imunitní systém a vyvolat onemocnění. To, že je klíště infikováno boreliemi neznamená, že se LB u pacienta projeví. Je tedy důležité přesně kvantifikovat množství borelií obsažených v klíštěti. Od firmy Protean s r.o. jsme dostali vzorky klíštěcí DNA metodu PCR potvrzené jako pozitivní a negativní. “Cut-off” hodnota byla firmou Protean s r.o. stanovena na 400 fg boreliové DNA v klíštěcí gDNA. Tato hodnota koreluje se finálním stavem pacientů. V závislosti na zpětné vazbě od zákazníků Firma Protean s r.o. stanovila senzitivitu své metody na 96%. To znamená, že pokud klíště obsahovalo méně než 400 fg boreliální DNA, pacient z 96 % neonemocněl.

Protože PCR metoda není schopna přímé kvantifikace, byla postupně nahrazena metodou kvantitativní PCR (“quantitative polymerase-chain reaction”, qPCR). Metoda qPCR se zdá být poměrně dobrým diagnostickým nástrojem, nicméně je časově náročná, drahá a hlavně není schopna absolutní přímé kvantifikace[117]. Další limitací qPCR je, že je to metoda poměrně náchylná k reakčním inhibitorům, které se v klíštěcích homogenizátech vyskytují, což může vést ke snížené účinnosti reakce s následnou chybou v přepočtu koncentrace sledovaného genu[117]. Nicméně senzitivita qPCR se pohybuje v rozmezí od 80 do 100 % v závislosti na použitém vzorku a provedení testu[118]. V souvislosti s kvantifikací se jako alternativa ke qPCR nabízí použití metody ddPCR. Pro detekci málo abundantních molekul vykazuje ddPCR oproti qPCR stejné nebo lepší výsledky[119]. Tuto skutečnost jsem si sama ověřila během kurzů „Hands-on qPCR“ a „Single cell analysis“, pořádaných firmou TATAA Biocenter, kterých jsem se účastnila. Variabilita biologických opakování je menší s použitím ddPCR než

qPCR, což je dalším plusem[120]. Metody qPCR a ddPCR se shodují v 70 % případech testování[117]. Kompartmentalizace reakční směsi při ddPCR vede k naředění reakčních inhibitorů, což vede k větší senzitivě metody[121]. Proto je ddPCR vhodná k diagnostickým účelům[119].

Metoda ddPCR má však také několik nedostatků. Patří mezi ně malá stabilita generovaných dropletů[104]. Ty se mohou při nešetrné manipulaci rozbít a znehodnotit celé testování. Dalším limitem je technologické nastavení. S metodu ddPCR je možné v jednom čase testovat pouze 8 vzorků. Oproti tomu metoda qPCR umožňuje testování až 384 vzorků najednou. Velkou výhodou ddPCR proti ostatním PCR technikám je možnost absolutní kvantifikace templátu bez nutnosti použití interního standardu. Při hodnocení relevantnosti ddPCR dat jsou sledovány dva parametry- počet generovaných dropletů a výsledný počet kopií templátu v reakci.

V mé práci jsme analyzovali gDNA pocházející z klíšťat, která obsahuje DNA mnoha dalších živočišných druhů. Výsledný počet druhů se odvíjí od klíštěcí koinfekce a od počtu hostitelů, na kterých se studované klíště krmilo. Má hypotéza byla, že specifická boreliová DNA je ve vzorcích obsažena minoritně, proto byly hodnoceny všechny vzorky bez ohledu na výsledný počet kopií templátu. Při hledání minimálního množství gDNA, které je potřebné vložit do reakce, jsme často pozorovali, že výsledný počet kopií templátu nebyl úměrný vloženému množství gDNA do reakce. Vysvětlením může být, že terciální struktura DNA může bránit přístupu enzymu k příslušnému genu. Řešením by bylo přidání restriktivního enzymu, jako například BamHI, do ddPCR mastermixu[122]. Myslím si ale, že nejpravděpodobnějším důvodem je, že cílená DNA se ve vzorku vyskytuje v malém množství, proto se náhodně distribuuje do dropletů, což se projeví nelinearitou ve výsledku.

Detekční limit, který jsme stanovili pro detekci borelií v klíštěcím vzorku se pohybuje v rozmezí  $10^{-16}$ –  $10^{-20}$  g v závislosti na použitém primeru. Část našich dat byla prezentována formou posteru na konferenci American Society for Microbiology 2016 v Bostonu.

Tento limit souhlasí s limitem, který byl pro metodu ddPCR stanoven s použitím syntetických oligonukleotidů se pohyboval v řádech femotogramů až attogramů, tj.  $10^{-15}$ - $10^{-18}$  g[113]. Spočítaný detekční limit ddPCR nekoreluje s propuknutím nemoci u pacienta. Udává pouze nejmenší množství DNA, které jsme ve vzorku gDNA schopni detekovat. Nízký detekční limit je však důležitý pro identifikaci minoritních populací bakterií.

V současné době se k detekci bakteriální infekce používají i další metody než jen PCR. Avšak metoda ddPCR je díky svým technologickým parametrům dobrým kandidátem pro detekci koinfekce. Fluorescence je detekována ve dvou kanálech: FAM a HEX. Díky tomu mohou experiment navrhnout i ve formě multiplexu. Za použití barviv detekovatelných ve 2 kanálech (HEX a FAM) a rozlišení velikosti ampliconu se dnes navrhuje tetraplexové testy[123], [124]. Dalším přístupem v diagnostice je použití metody kombinující obohacení vzorku integrující akustickou separaci s následnou PCR reakcí na mikročipu. Detekční limit pro tuto metodu je 1000 bakterií/ml krve[125]. Nejnovější metodou detekce bakterií je T2 magnetická rezonance, u které se detekční limit podařilo snížit až na 5 borelií/ml krve[126], [127].

Z literatury je patrné, že klinické manifestace onemocnění jsou souhrou všech patogenů přítomných v těle pacienta. Koinfekce borelií s dalšími patogeny často vede ke změně příznaků a vážnosti onemocnění[20], [21], [128]. Nejen koinfekce dalšími patogeny, ale i různými druhy borelií se podílí na různých manifestacích onemocnění[5], [90]. Proto jsme se rozhodli testovat nejen přítomnost borelií, ale i jejich genotyp, který jsme sledovali pomocí amplifikace 16S rDNA. K tomuto účelu jsme od Adama Bemise z Bio-Rad Laboratories dostali nasyntetizované sety průbových testů specifické pro obecný záchyt boreliální 16S rDNA, dále pro záchyt 16S rDNA specifické pro *B. afzelii*, *B. burgdorferi* a *B. garinii*. Z literatury plyne, že koinfekce více boreliálními kmeny se vyskytuje u téměř 40 % všech infikovaných klíšťat[129][130]. Vlastním

testováním jsme došli k závěru, že 5 ze 12 všech testovaných vzorků vykazovalo pozitivitu pro více jak 2 kmeny borelií. Nejvíce zastoupeným kmenem borelií je *B. garinii*, která byla přítomna v 5 vzorcích. Tento výsledek opět koreluje s literaturou, kde nejvíce zastoupeným kmenem je *B. garinii*[131] po které následuje *B. afzelii*[130]. Pro porovnání ke kontinentálním podmínkám, ve Skotsku představuje nejzastoupenější genoskupinou *B. afzelii*[132]. Výsledek vždy závisí na zdroji, ze kterého byla klíšťata pro analýzu získána. Například ptáci jsou známým rezervoárem pro *B. garinii*[133] a malí obratlovci jsou rezervoárem *B. afzelii*[132], [133]. Výsledek také vždy závisí na počtu provedených pozorování. V rámci mého pokusu byla k testování použita gDNA pocházející z klíšťat, která pochází ze všech oblastí ČR. Hlavně z oblastí kolem velkých měst, jako je Praha, Brno. V těchto oblastech mají lidé větší povědomí o diagnostických službách a více jich využívají.

Genotyp byl sledován pomocí próbových testů. Jedná se o primery obohacené o hydrolyzovatelnou próbu. Fluorescenční signál je detekován pouze v tom případě, kdy je amplifikována specifická DNA.

Během testování jsme mezi sebou porovnali výsledky měření všech 4 primerů. A porovnali míru koinfekce klíšťat boreliemi. Zajímavé bylo, že droplety neobsahující boreliální DNA vykazovaly jinou fluorescenci v závislosti na použitém primeru. Fluorescence negativních dropletů se pohybovala v rozmezí 1000-5000 RFU. Proto jsme porovnali také fluorescenci negativních dropletů, které byly generovány za použití primeru *dbpA*. Zde se fluorescence pohybovala také v řádu 5000. S použitím primeru pro gen *dbpA* byl detekován mnohem větší počet pozitivních dropletů než s použitím primerů specifických pro 16S rDNA. To je zarážející, protože 16S rDNA je abundantnějším genem než *dbpA*, proto bych očekávala při detekci genu *dbpA* nižší signál. Vysvětlením je zřejmě způsob navrhnutí celého testu. Při analýze vzorků pocházejících z próbového typu testu byl výsledný signál velmi specifický, proto ho bylo detekováno méně i přes to, že 16S rDNA je genem více abundantním než *dbpA*. Při detekci výsledného produktu *dbpA* se použilo interkalační barvivo EvaGreen, které se nespecificky váže do dsDNA. Proto výsledný signál nemusel být specifický pro boreliální DNA, ale mohl pocházet z formovaných primer-dimerů. Dalším možným vysvětlením je, že vzorky obsahovaly více druhů borelií. To by se projevilo konstantním signálem získaným z detekce druhově specifické 16S rDNA, ale vyšším signálem pro druhově nespecifické amplikony genu *dbpA*. V souvislosti s druhovou specifitou a nespecifitou bych však musela detekovat velký signál při reakci s konzervovaným typem primeru, což se nestalo, a proto se přikláním k vysvětlení, že jde o tvorbu nespecifických struktur.

Po stanovení detekčního limitu ddPCR jsme se rozhodli detekovat nukleotidovou variabilitu dvou vybraných VF: *OspA* a *OspC*. Jedná se o proteiny, které jsou využívány v diagnostických setech. Právě nízký detekční limit ddPCR může pomoci odhalit druhy borelií, které ostatní detekční metody nejsou schopny zachytit. Nukleotidová variabilita měla být zmonitorována sekvenací PCR produktu. Na základě sekvenčních dat měly být produkovány proteiny, jejichž nukleotidová variabilita odráží geografický původ. Tyto lokálně specifické proteiny mohou být použity k buněčné aktivaci. Proto byla následným krokem vizualizace konzervovanosti nukleotidové sekvence pro geny *ospA* a *ospC* boreliálních druhů *B. afzelii*, *B. burgdorferi* a *B. garinii*. Sekvence byly získány v databázi NCBI a multiple sequence alignment (MSA) byl vytvořen v programu Kalign v2[134]. MSA je možné získat pomocí mnoha programů, například v programu MUSCLE[135], T-Coffee[136], MAFFT[137] a v dalších. V mém případě bylo kritérium přesnost a rychlost zpracování. Shoda ve zpracování byla ověřena u programu MAFFT a Kalign v2. Kalign v2. však vykazuje vyšší rychlost zpracování[134].

Při výsledném porovnání konzervovanosti genů pro *ospA* a *ospC* a *dbpA* je vizuálně zřejmé, že gen *ospC* je konzervovanější než *ospA*. Gen *ospA* není v rámci tří zkoumaných boreliálních kmenů stěně konzervovaný. Větší konzervovanost vykazuje gen specifický pro *B. afzelii*. Vliv na výsledek však může mít původ borelií, jejichž sekvence jsou v databázi



zveřejněny. Z vizualizovaných MSA byly navrženy primery pro *ospA* a *ospC*. Na základě MSA vizualizací byly navrženy primery pro následné experimenty tak, aby nasedaly na konzervované úseky a amplifikovaly variabilní části genů. Na základě sekvencí z lokálních klíčtčích sběrů měla být monitorována nukleotidová variabilita genů *ospA* a *ospC*. Detailní porozumění variability těchto genů a výsledných exprimovaných proteinů může být využito pro lepší diagnostiku nebo například při vývoji nových vakcín[138]. Výsledné primery byly zkontrolovány programem BLAST na nespecifické nasedání k jiným genům. Tento krok je pro vzorky, jakými jsou klíčtčata zcela nezbytný. Klíčtčecí gDNA, se kterou pracujeme je směsí mnoha DNA. Obsahuje klíčtčecí DNA, DNA hostitele, na kterém saje a další DNA podle toho, kterými patogeny je infikováno. V takové směsi není snadné navrhnout primery, které by byly zcela specifické pro borelie.

Během letního soustředění jsme s Mrg. Janem Martínkem testovali přítomnost borelií v lokálních sběrech klíčtčat. Výsledek 70% infikovanosti klíčtčat byl překvapivý. Z mapy promořenosti klíčtčat je patrné, že promořenost v oblasti Běstvin, která spadá pod Pardubický kraj, je 8% [139]. Na výsledku se jistě projevilo provedení celé metody, které probíhalo doslova v „polních podmínkách“ tábora, tudíž nebylo zcela sterilní. Také malý počet testovaných klíčtčat hrál zajiště roli.

Druhý přístup, který jsme v práci použili je orientován patientsky, jedná se o degranulační buněčný test. Cílem tohoto přístupu bylo boreliálními VF navodit degranulaci imunitních buněk. Degranulace byla sledována průtokovou cytometrií jako externalizací molekul CD63 a CD107a. Na základě potvrzení hypotézy, že patientské vzorky se v degranulaci liší od zdravých dárců, by se v budoucnu mohla vyvinout personalizovaná diagnostika LB. Celá práce je provázána myšlenkou, že po optimalizaci buněčného degranulačního testu se přejde k detekci borelií v lokální geografické oblasti (střední Čechy). Metodou ddPCR s primery navrženými tak, aby amplifikovaly variabilní úseky genů, budou identifikovány borelie, které předchozím metodám zůstaly utajené. Výsledné amplikony by měly být sekvenovány. Na základě sekvencí pak produkovány VF, které by se použily k buněčné aktivaci. Aktivací buněk VF, se kterými se pacient při nakažení opravdu mohl setkat, můžeme dopomoci vývoji personalizované diagnostiky LB.

Degranulaci buněk přirozené imunity jsme chtěli sledovat pomocí průtokové cytometrie. Degranulační testy se v klinické praxi, hlavně alergologii, již používají stejně jako cytometrická detekce patogenů v patientských vzorcích [107], [140], [4]. Zaměřili hlavně na degranulaci eozinofilů, bazofilů, neutrofilů a monocytů. Jedná se o buňky přirozené imunity, které se jako první účastní eliminace patogena v těle[72], [74]. Předpokladem bylo, že u pacientů s LB jsou imunitní buňky již předaktivovány boreliálními VF, tudíž budou a nově dodanými VF reagovat rychleji, než by tomu mělo být u zdravých lidí.

Jako pozitivní kontrolu absolutní degranulace jsme použili forbol myristát acetát („phorbol myristate acetate“, PMA) v kombinaci s ionomycinem a dvojmocnými ionty. PMA je malou organickou molekulou, která difunduje skrz plasmatickou membránu do cytoplasmy, kde okamžitě aktivuje protein kinázu C. PMA tak aktivuje buňky, aniž by došlo ke stimulaci receptorů. Ionomycin byl do reakce přidán pro navození uvolnění  $Ca^{2+}$  iontů[141]. Právě koncentrace  $Ca^{2+}$  iontů je důležitá pro zahájení NFAT signalizace, která vede k buněčné aktivaci[98]. Testovány byly různé koncentrace PMA, ionomycinu i iontů  $Ca^{2+}$  a  $Mg^{2+}$ . Pokud by nás zajímaly pouze T- lymfocyty, mohli bychom k aktivaci použít fytohematoglutinin („phytohaematoglutinin“, PHA)[142]. My jsme se však primárně zaměřili na buňky přirozené imunity. Ty se totiž jako první účastní obrany proti boreliím[72], [74]. Kvůli nedostatečné pozitivní kontrole nemáme získaný výsledek aktivace krve pomocí VF k čemu vztáhnout. Proto

získaná data považujeme za nehodnotitelná. Vysvětlením neúčinné aktivace může být použití znehodnoceného PMA nebo ionomycinu. Dalším problémem nám činily trombocyty, které se už při odběru krve aktivovaly a degranulovaly. Jejich filtrováním na základě polohy na SSC-A vs. FSC-A jsme odfiltrovali i zacílené buňky. Pro další experimenty by se trombocyty daly odfiltrovat fluorescenčním značením povrchových molekul CD9 nebo CD151[143]. Celkově si tato metoda bude vyžadovat více času na optimalizaci.

## Závěr

Touto prací jsme chtěli nastínit důležitost zavedení nových metodických postupů v diagnostice LB. Poukázali jsme na možnost využití metody ddPCR, pro její vyšší senzitivitu v porovnání k PCR a qPCR, v klinické diagnostice LB. Pro lepší léčbu onemocnění je důležitá nejen včasná detekce borelií, ale také určení jejich genotypu.

Výsledky naší práce:

- Metodou digital droplet (ddPCR) byla detekována boreliová DNA v klíštěcí gDNA.
- PCR metodou byla stanovena přítomnost borelií v 7 z 10 přísátých klíšťat.
- Metodou ddPCR byla prokázána koinfekce klíšťat kmeny *B. afzelii*, *B. burgdorferi* a *B. garinii*. 5 z 12 testovaných vzorků bylo infikováno alespoň dvěma druhy borelií. *B. garinii* je nejvíce zastoupeným kmenem borelie v klíštěti *I. ricinus*. Byla přítomna v 5 z 12 testovaných vzorků.
- Detekční limit ddPCR byl stanoven pro *16S rDNA* specifickou pro *B. garinii*  $9,0 \times 10^{-17}$  g pro *B. afzelii*  $1,6 \times 10^{-16}$  g, pro *B. burgdorferi*  $1,6 \times 10^{-16}$  g specifické boreliové DNA v klíštěcí gDNA. S primerem pro gen *dbpA* je detekční limit  $7,0 \times 10^{-20}$  g boreliové DNA.
- Byla provedena vizualizace nukleotidové konzervace genů *ospA* a *ospC* pro *B. afzelii*, *B. burgdorferi*, *B. garinii*. Gen *ospA* je více konzervovaný než *ospC*. *B. afzelii* vykazuje v nukleotidové sekvenci genu *ospA* větší konzervovanost než zbylé dva boreliální druhy.
- Na základě provedené vizualizace byly navrženy primery pro *ospA* a *ospC* tak aby nasedaly na konzervované úseky genů a amplifikovaly variabilní úseky. Primer *OspA\_For15*, který byl navržen Kasperem Sjödinem není specifický.
- Nepodařilo se detekovat aktivaci imunitních buněk vyvolanou chemickými stimuly.

## Literatura

- [1] M. M. G. Leeflang *et al.*, „The diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis in Europe: a systematic review and meta-analysis", *BMC Infect. Dis.*, roč. 16, č. 1, pro. 2016.
- [2] T. van Gorkom *et al.*, „Disagreement between the results from three commercial tests for the detection of *Borrelia*-specific serum antibodies in the Netherlands associated with antibiotic treatment for Lyme borreliosis: a retrospective study", *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, s. 1–10, čvc. 2017.
- [3] J. Goddard, „Not All Erythema Migrans Lesions Are Lyme Disease", *Am. J. Med.*, roč. 130, č. 2, s. 231–233, úno. 2017.
- [4] B. Eberlein *et al.*, „Optimizing of the basophil activation test: Comparison of different basophil identification markers", *Cytometry B Clin. Cytom.*, roč. 88, č. 3, s. 183–189, kvě. 2015.
- [5] T. Cerar *et al.*, „Differences in Genotype, Clinical Features, and Inflammatory Potential of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto Strains from Europe and the United States", *Emerg. Infect. Dis.*, roč. 22, č. 5, s. 818–827, kvě. 2016.
- [6] R. Tokarz, T. Tagliafierro, D. M. Cucura, I. Rochlin, S. Sameroff, a W. I. Lipkin, „Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia microti*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia miyamotoi*, and Powassan Virus in Ticks by a Multiplex Real-Time Reverse Transcription-PCR Assay", *mSphere*, roč. 2, č. 2, s. e00151-17, dub. 2017.
- [7] E. Tjisse-Klasen, H. Sprong, a N. Pandak, „Co-infection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Rickettsia* species in ticks and in an erythema migrans patient", *Parasit. Vectors*, roč. 6, s. 347, 2013.
- [8] „Prevalence of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Genospecies in *Ixodes ricinus* Ticks in Europe: a Metaanalysis". [Online]. Dostupné z: <http://aem.asm.org/content/71/11/7203>. [Viděno: 05-čvc-2017].
- [9] A. C. Steere *et al.*, „The Spirochetal Etiology of Lyme Disease", *N. Engl. J. Med.*, roč. 308, č. 13, s. 733–740, bře. 1983.
- [10] M. A. Carolina, *Pediatric: Překlad 6. vydání*. Grada Publishing, a.s., 2014.
- [11] „Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2007-2016 - absolutně, SZÚ". [Online]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2007-2016-absolutne>. [Viděno: 23-čer-2017].
- [12] R. B. Stricker a L. Johnson, „Lyme Disease: Call for a “Manhattan Project” to Combat the Epidemic", *PLOS Pathog*, roč. 10, č. 1, s. e1003796, led. 2014.
- [13] „Lyme disease data tables | Lyme Disease | CDC". [Online]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/lyme/stats/tables.html>. [Viděno: 07-srp-2017].
- [14] B. M. Kuehn, „CDC estimates 300,000 US cases of Lyme disease annually", *JAMA*, roč. 310, č. 11, s. 1110, zář. 2013.
- [15] W. Burgdorfer, A. G. Barbour, S. F. Hayes, J. L. Benach, E. Grunwaldt, a J. P. Davis, „Lyme disease-a tick-borne spirochetosis?", *Science*, roč. 216, č. 4552, s. 1317–1319, čer. 1982.
- [16] G. Xu, Q. Q. Fang, J. E. Keirans, a L. A. Durden, „Molecular phylogenetic analyses indicate that the *Ixodes ricinus* complex is a paraphyletic group", *J. Parasitol.*, roč. 89, č. 3, s. 452–457, čer. 2003.
- [17] M. L. Levin a D. Fish, „Acquisition of Coinfection and Simultaneous Transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* Ticks", *Infect. Immun.*, roč. 68, č. 4, s. 2183–2186, dub. 2000.

- [18] A. Rizzoli *et al.*, „Ixodes ricinus and Its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health", *Front. Public Health*, roč. 2, pro. 2014.
- [19] S. Skarphéðinsson, B. F. Lyholm, M. Ljungberg, P. Søgaaard, H. J. Kolmos, a L. P. Nielsen, „Detection and identification of *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia helvetica* in Danish *Ixodes ricinus* ticks", *APMIS*, roč. 115, č. 3, s. 225–230, bře. 2007.
- [20] P. J. Krause *et al.*, „Concurrent Lyme Disease and Babesiosis: Evidence for Increased Severity and Duration of Illness", *JAMA*, roč. 275, č. 21, s. 1657–1660, čer. 1996.
- [21] E. Eskow, R. V. Rao, a E. Mordechai, „Concurrent infection of the central nervous system by *Borrelia burgdorferi* and *Bartonella henselae*: evidence for a novel tick-borne disease complex", *Arch. Neurol.*, roč. 58, č. 9, s. 1357–1363, zář. 2001.
- [22] „Onemocnění přenášená klišťaty v České republice, SZÚ". [Online]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/onemocneni-prenasena-klistaty-v-ceske-republice>. [Viděno: 05-srp-2017].
- [23] M. Andersson, S. Bartkova, O. Lindestad, a L. Råberg, „Co-Infection with ‘*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*’ and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* Ticks in Southern Sweden", *Vector-Borne Zoonotic Dis.*, roč. 13, č. 7, s. 438–442, dub. 2013.
- [24] A.-M. Schötta, M. Wijnveld, H. Stockinger, a G. Stanek, „Approaches for Reverse Line Blot-Based Detection of Microbial Pathogens in *Ixodes ricinus* Ticks Collected in Austria and Impact of the Chosen Method", *Appl. Environ. Microbiol.*, roč. 83, č. 13, s. e00489-17, led. 2017.
- [25] N. M. Abraham *et al.*, „Pathogen-mediated manipulation of arthropod microbiota to promote infection", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, roč. 114, č. 5, s. E781–E790, led. 2017.
- [26] M. C. Dolan *et al.*, „Vector competence of the blacklegged tick, *Ixodes scapularis*, for the recently recognized Lyme borreliosis spirochete *Candidatus Borrelia mayonii*", *Ticks Tick-Borne Dis.*, roč. 7, č. 5, s. 665–669, čvc. 2016.
- [27] A. R. Bergmann, B. L. Schmidt, A.-M. Derler, a E. Aberer, „Importance of Sample Preparation for Molecular Diagnosis of Lyme Borreliosis from Urine", *J. Clin. Microbiol.*, roč. 40, č. 12, s. 4581–4584, led. 2002.
- [28] D. Pícha *et al.*, „Examination of specific DNA by PCR in patients with different forms of Lyme borreliosis", *Int. J. Dermatol.*, roč. 47, č. 10, s. 1004–1010, říj. 2008.
- [29] J. Wu, E. H. Weening, J. B. Faske, M. Höök, a J. T. Skare, „Invasion of eukaryotic cells by *Borrelia burgdorferi* requires  $\beta(1)$  integrins and Src kinase activity", *Infect. Immun.*, roč. 79, č. 3, s. 1338–1348, bře. 2011.
- [30] J. A. Livengood a R. D. Gilmore, „Invasion of human neuronal and glial cells by an infectious strain of *Borrelia burgdorferi*", *Microbes Infect.*, roč. 8, č. 14–15, s. 2832–2840, pro. 2006.
- [31] X. Naj a S. Linder, „Actin-Dependent Regulation of *Borrelia burgdorferi* Phagocytosis by Macrophages", in *The Actin Cytoskeleton and Bacterial Infection*, Springer, Cham, 2016, s. 133–154.
- [32] S. Rahman, M. Shering, N. H. Ogden, R. Lindsay, a A. Badawi, „Toll-like receptor cascade and gene polymorphism in host–pathogen interaction in Lyme disease", *J. Inflamm. Res.*, roč. 9, s. 91–102, kvě. 2016.
- [33] C. L. Jones a D. S. Weiss, „TLR2 Signaling Contributes to Rapid Inflammasome Activation during *F. novicida* Infection", *PLOS ONE*, roč. 6, č. 6, s. e20609, čer. 2011.
- [34] M. R.-E.-I. Benhnia *et al.*, „Signaling through CD14 attenuates the inflammatory response to *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease", *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, roč. 174, č. 3, s. 1539–1548, úno. 2005.

- [35] J. Salo, V. Loimaranta, P. Lahdenne, M. K. Viljanen, a J. Hytönen, „Decorin binding by DbpA and B of *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, and *Borrelia burgdorferi* sensu Stricto", *J. Infect. Dis.*, roč. 204, č. 1, s. 65–73, čvc. 2011.
- [36] S. W. de Taeye, L. Kreuk, A. P. van Dam, J. W. Hovius, a T. J. Schuijt, „Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: it takes three to tango", *Trends Parasitol.*, roč. 29, č. 3, s. 119–128, bře. 2013.
- [37] K. E. Tracy a N. Baumgarth, „*Borrelia burgdorferi* Manipulates Innate and Adaptive Immunity to Establish Persistence in Rodent Reservoir Hosts", *Front. Immunol.*, roč. 8, úno. 2017.
- [38] „Lyme disease vaccine".
- [39] J. R. Izac, L. D. Oliver, C. G. Earnhart, a R. T. Marconi, „Identification of a defined linear epitope in the OspA protein of the Lyme disease spirochetes that elicits bactericidal antibody responses: Implications for vaccine development", *Vaccine*, roč. 35, č. 24, s. 3178–3185, kvě. 2017.
- [40] S. E. Carrasco *et al.*, „Outer Surface Protein OspC Is an Antiphagocytic Factor That Protects *Borrelia burgdorferi* from Phagocytosis by Macrophages", *Infect. Immun.*, roč. 83, č. 12, s. 4848–4860, led. 2015.
- [41] F. Röttgerding *et al.*, „Immune evasion of *Borrelia miyamotoi*: CbiA, a novel outer surface protein exhibiting complement binding and inactivating properties", *Sci. Rep.*, roč. 7, bře. 2017.
- [42] J. A. Caine a J. Coburn, „Multifunctional and Redundant Roles of *Borrelia burgdorferi* Outer Surface Proteins in Tissue Adhesion, Colonization, and Complement Evasion", *Front. Immunol.*, roč. 7, říj. 2016.
- [43] M. E. Embers, N. R. Hasenkampf, M. B. Barnes, E. S. Didier, M. T. Philipp, a A. C. Tardo, „Five-Antigen Fluorescent Bead-Based Assay for Diagnosis of Lyme Disease", *Clin. Vaccine Immunol.*, roč. 23, č. 4, s. 294–303, dub. 2016.
- [44] B. Wilske *et al.*, „An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis.", *J. Clin. Microbiol.*, roč. 31, č. 2, s. 340–350, led. 1993.
- [45] „FSD\_14-0699.pdf". .
- [46] L. Råberg *et al.*, „Evolution of antigenic diversity in the tick-transmitted bacterium *Borrelia afzelii*: a role for host specialization?", *J. Evol. Biol.*, roč. 30, č. 5, s. 1034–1041, kvě. 2017.
- [47] S. R. Casjens *et al.*, „Plasmid diversity and phylogenetic consistency in the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi*", *BMC Genomics*, roč. 18, s. 165, 2017.
- [48] X. Yang, T. G. Popova, M. S. Goldberg, a M. V. Norgard, „Influence of Cultivation Media on Genetic Regulatory Patterns in *Borrelia burgdorferi*", *Infect. Immun.*, roč. 69, č. 6, s. 4159–4163, led. 2001.
- [49] A. Patel, K. A. Harris, a F. Fitzgerald, „What is broad-range 16S rDNA PCR?", *Arch. Dis. Child. - Educ. Pract.*, bře. 2017.
- [50] J. L. Sperling *et al.*, „Comparison of bacterial 16S rRNA variable regions for microbiome surveys of ticks", *Ticks Tick-Borne Dis.*, roč. 8, č. 4, s. 453–461, čer. 2017.
- [51] E. Ružić-Sabljić a T. Cerar, „*Borrelia* Genotyping in Lyme Disease", *Open Dermatol. J.*, roč. 10, č. Suppl 1: M2, s. 6–14, bře. 2016.
- [52] N. Rudenko, M. Golovchenko, L. Grubhoffer, a J. H. Oliver, „Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health", *Ticks Tick-Borne Dis.*, roč. 2, č. 3, s. 123–128, zář. 2011.
- [53] G. Stanek, G. P. Wormser, J. Gray, a F. Strle, „Lyme borreliosis", *The Lancet*, roč. 379, č. 9814, s. 461–473, úno. 2012.

- [54] J. W. R. Hovius, A. P. van Dam, a E. Fikrig, „Tick–host–pathogen interactions in Lyme borreliosis", *Trends Parasitol.*, roč. 23, č. 9, s. 434–438, zář. 2007.
- [55] F. des Vignes, J. Piesman, R. Heffernan, T. L. Schulze, K. C. Stafford, a D. Fish, „Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs", *J. Infect. Dis.*, roč. 183, č. 5, s. 773–778, bře. 2001.
- [56] R. B. Nadelman *et al.*, „Prophylaxis with Single-Dose Doxycycline for the Prevention of Lyme Disease after an *Ixodes scapularis* Tick Bite", *N. Engl. J. Med.*, roč. 345, č. 2, s. 79–84, čvc. 2001.
- [57] M. C. Dolan *et al.*, „Transmission of the Lyme Disease Spirochete *Borrelia mayonii* in Relation to Duration of Attachment by Nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae)", *J. Med. Entomol.*
- [58] M. Crippa, O. Rais, a L. Gern, „Investigations on the Mode and Dynamics of Transmission and Infectivity of *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* Ticks", *Vector-Borne Zoonotic Dis.*, roč. 2, č. 1, s. 3–9, bře. 2002.
- [59] L. Kovalchuka *et al.*, „Immunogenetic Markers Definition in Latvian Patients with Lyme Borreliosis and Lyme Neuroborreliosis", *Int. J. Environ. Res. Public. Health*, roč. 13, č. 12, s. 1194, pro. 2016.
- [60] G. Stanek, „Tick Bites and *Borrelia* Infection: A Problem for Mammalian Species", in *Comparative Medicine*, Springer, Cham, 2017, s. 167–175.
- [61] A. Hojgaard, R. J. Eisen, a J. Piesman, „Transmission Dynamics of *Borrelia burgdorferi* s.s. During the Key Third Day of Feeding by Nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae)", *J. Med. Entomol.*, roč. 45, č. 4, s. 732–736, čvc. 2008.
- [62] „Ministerstvo zdravotnictví: Aktivita klíšťat je letos nadprůměrná". [Online]. Dostupné z: [https://www.mzcr.cz/dokumenty/-ministerstvo-zdravotnictviaktivita-klisat-je-letos-nadprumerna\\_12325\\_1.html](https://www.mzcr.cz/dokumenty/-ministerstvo-zdravotnictviaktivita-klisat-je-letos-nadprumerna_12325_1.html). [Viděno: 05-srp-2017].
- [63] J. S. Gray, O. Kahl, R. S. Lane, M. L. Levin, a J. I. Tsao, „Diapause in ticks of the medically important *Ixodes ricinus* species complex", *Ticks Tick-Borne Dis.*, roč. 7, č. 5, s. 992–1003, čvc. 2016.
- [64] P. Waindok, S. Schicht, V. Fingerle, a C. Strube, „Lyme borreliae prevalence and genospecies distribution in ticks removed from humans", *Ticks Tick-Borne Dis.*
- [65] L. Tomassone *et al.*, „Importance of Common Wall Lizards in the Transmission Dynamics of Tick-Borne Pathogens in the Northern Apennine Mountains, Italy", *Microb. Ecol.*, s. 1–8, kvě. 2017.
- [66] D. Heylen, A. Krawczyk, I. Lopes de Carvalho, M. S. Nuncio, H. Sprong, a A. C. Norte, „Bridging of cryptic *Borrelia* cycles in European songbirds", *Environ. Microbiol.*, roč. 19, č. 5, s. 1857–1867, kvě. 2017.
- [67] A. Obiegala, N. Król, C. Oltersdorf, J. Nader, a M. Pfeffer, „The enzootic life-cycle of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) and tick-borne rickettsiae: an epidemiological study on wild-living small mammals and their ticks from Saxony, Germany", *Parasit. Vectors*, roč. 10, s. 115, bře. 2017.
- [68] A. Roome *et al.*, „Impact of white-tailed deer on the spread of *Borrelia burgdorferi*", *Med. Vet. Entomol.*, roč. 31, č. 1, s. 1–5, bře. 2017.
- [69] N. H. Ogden *et al.*, „Risk maps for range expansion of the Lyme disease vector, *Ixodes scapularis*, in Canada now and with climate change", *Int. J. Health Geogr.*, roč. 7, s. 24, 2008.
- [70] J.-F. Magnaval *et al.*, „A Serological Survey About Zoonoses in the Verkhoyansk Area, Northeastern Siberia (Sakha Republic, Russian Federation)", *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N*, roč. 16, č. 2, s. 103–109, úno. 2016.

- [71] Q. Bernard *et al.*, „Ixodes tick saliva suppresses the keratinocyte cytokine response to TLR2/TLR3 ligands during early exposure to Lyme borreliosis”, *Exp. Dermatol.*, roč. 25, č. 1, s. 26–31, led. 2016.
- [72] M. Glatz, T. Means, J. Haas, A. C. Steere, a R. R. Müllegger, „Characterization of the early local immune response to Ixodes ricinus tick bites in human skin”, *Exp. Dermatol.*, roč. 26, č. 3, s. 263–269, bř. 2017.
- [73] P. Kraiczy *et al.*, „Complement resistance of *Borrelia burgdorferi* correlates with the expression of BbCRASP-1, a novel linear plasmid-encoded surface protein that interacts with human factor H and FHL-1 and is unrelated to Erp proteins”, *J. Biol. Chem.*, roč. 279, č. 4, s. 2421–2429, led. 2004.
- [74] P. J. Krause *et al.*, „Dermatologic Changes Induced by Repeated Ixodes scapularis Bites and Implications for Prevention of Tick-Borne Infection”, *Vector-Borne Zoonotic Dis.*, roč. 9, č. 6, s. 603–610, úno. 2009.
- [75] A. C. Steere, J. Coburn, a L. Glickstein, „The emergence of Lyme disease”, *J. Clin. Invest.*, roč. 113, č. 8, s. 1093–1101, dub. 2004.
- [76] A. M. et Al, „Current Guidelines, Common Clinical Pitfalls, and Future Directions for Laboratory Diagnosis of Lyme Disease, United States - Volume 22, Number 7—July 2016 - Emerging Infectious Disease journal - CDC”.
- [77] P. Gyllemark, P. Forsberg, J. Ernerudh, a A. J. Henningsson, „Intrathecal Th17- and B cell-associated cytokine and chemokine responses in relation to clinical outcome in Lyme neuroborreliosis: a large retrospective study”, *J. Neuroinflammation*, roč. 14, úno. 2017.
- [78] A. Pietikäinen, M. Maksimow, T. Kauko, S. Hurme, M. Salmi, a J. Hytönen, „Cerebrospinal fluid cytokines in Lyme neuroborreliosis”, *J. Neuroinflammation*, roč. 13, s. 273, říj. 2016.
- [79] C. A. Brissette, E. D. Kees, M. M. Burke, R. A. Gaultney, A. M. Floden, a J. A. Watt, „The multifaceted responses of primary human astrocytes and brain microvascular endothelial cells to the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*”, *ASN NEURO*, roč. 5, č. 3, srp. 2013.
- [80] A. C. Steere, D. Gross, A. L. Meyer, a B. T. Huber, „Autoimmune Mechanisms in Antibiotic Treatment-Resistant Lyme Arthritis”, *J. Autoimmun.*, roč. 16, č. 3, s. 263–268, kvě. 2001.
- [81] A. C. Steere *et al.*, „Antibiotic-refractory Lyme arthritis is associated with HLA-DR molecules that bind a *Borrelia burgdorferi* peptide”, *J. Exp. Med.*, roč. 203, č. 4, s. 961–971, dub. 2006.
- [82] E. E. Drouin, L. Glickstein, W. W. Kwok, G. T. Nepom, a A. C. Steere, „Human Homologues of a *Borrelia* T cell Epitope Associated with Antibiotic-Refractory Lyme Arthritis”, *Mol. Immunol.*, roč. 45, č. 1, s. 180–189, led. 2008.
- [83] K. Strle, K. L. Jones, E. E. Drouin, X. Li, a A. C. Steere, „*Borrelia burgdorferi* RST1 (OspC type A) genotype is associated with greater inflammation and more severe Lyme disease”, *Am. J. Pathol.*, roč. 178, č. 6, s. 2726–2739, čer. 2011.
- [84] N. K. Vudattu, K. Strle, A. C. Steere, a E. E. Drouin, „Dysregulation of CD4+CD25hi+ T cells in the synovial fluid of patients with antibiotic-refractory Lyme arthritis”, *Arthritis Rheum.*, roč. 65, č. 6, s. 1643–1653, čer. 2013.
- [85] J. T. Crowley *et al.*, „Matrix metalloproteinase-10 is a target of T and B cell responses that correlate with synovial pathology in patients with antibiotic-refractory Lyme arthritis”, *J. Autoimmun.*, roč. 69, s. 24–37, kvě. 2016.
- [86] A. Johnston, J. E. Gudjonsson, H. Sigmundsdottir, B. R. Ludviksson, a H. Valdimarsson, „The anti-inflammatory action of methotrexate is not mediated by lymphocyte apoptosis,



- but by the suppression of activation and adhesion molecules", *Clin. Immunol. Orlando Fla*, roč. 114, č. 2, s. 154–163, úno. 2005.
- [87] J. M. Costello, M. E. Alexander, K. M. Greco, A. R. Perez-Atayde, a P. C. Laussen, „Lyme Carditis in Children: Presentation, Predictive Factors, and Clinical Course", *PEDIATRICS*, roč. 123, č. 5, s. e835–e841, kvě. 2009.
- [88] G. P. Wormser, J. Nowakowski, R. B. Nadelman, P. Visintainer, A. Levin, a M. E. Aguero-Rosenfeld, „Impact of clinical variables on *Borrelia burgdorferi*-specific antibody seropositivity in acute-phase sera from patients in North America with culture-confirmed early Lyme disease", *Clin. Vaccine Immunol. CVI*, roč. 15, č. 10, s. 1519–1522, říj. 2008.
- [89] E. C. Coipan *et al.*, „Imbalanced presence of *Borrelia burgdorferi* s.l. multilocus sequence types in clinical manifestations of Lyme borreliosis", *Infect. Genet. Evol.*, roč. 42, s. 66–76, srp. 2016.
- [90] E. Baranova *et al.*, „Rational Design of Antigens to Improve the Serodiagnosis of Tick-Borne Borreliosis in Central Regions of Russia", in *Infectious Diseases and Nanomedicine I*, Springer, New Delhi, 2014, s. 9–21.
- [91] M. Glatz, M. Golestani, H. Kerl, a R. R. Müllegger, „Clinical relevance of different IgG and IgM serum antibody responses to *Borrelia burgdorferi* after antibiotic therapy for erythema migrans: long-term follow-up study of 113 patients", *Arch. Dermatol.*, roč. 142, č. 7, s. 862–868, čvc. 2006.
- [92] A. W. Rebman, L. A. Crowder, A. Kirkpatrick, a J. N. Aucott, „Characteristics of seroconversion and implications for diagnosis of post-treatment Lyme disease syndrome: acute and convalescent serology among a prospective cohort of early Lyme disease patients", *Clin. Rheumatol.*, roč. 34, č. 3, s. 585–589, bře. 2015.
- [93] B. Barstad *et al.*, „Cerebrospinal Fluid B-lymphocyte Chemoattractant CXCL 13 in the Diagnosis of Acute Lyme Neuroborreliosis in Children", *Pediatr. Infect. Dis. J.*, čer. 2017.
- [94] A. Moore, C. Nelson, C. Molins, P. Mead, a M. Schriefer, „Current Guidelines, Common Clinical Pitfalls, and Future Directions for Laboratory Diagnosis of Lyme Disease, United States", *Emerg. Infect. Dis.*, roč. 22, č. 7, čvc. 2016.
- [95] G. L. Bradshaw, R. K. Thueson, a T. J. Uriona, „Improved serodiagnostic performance for Lyme disease by use of two recombinant proteins in ELISA as compared to standardized two tier testing.", *J. Clin. Microbiol.*, s. JCM.01004-17, srp. 2017.
- [96] C. Jin, D. R. Roen, P. V. Lehmann, a G. H. Kellermann, „An Enhanced ELISPOT Assay for Sensitive Detection of Antigen-Specific T Cell Responses to *Borrelia burgdorferi*", *Cells*, roč. 2, č. 3, s. 607–620, 2013.
- [97] V. von Baehr, „The Lymphocyte Transformation Test for *Borrelia* Detects Active Lyme Borreliosis and Verifies Effective Antibiotic Treatment", *Open Neurol. J.*, roč. 6, č. 1, s. 104–112, říj. 2012.
- [98] S. Wernersson a G. Pejler, „Mast cell secretory granules: armed for battle", *Nat. Rev. Immunol.*, roč. 14, č. 7, s. 478–494, čvc. 2014.
- [99] T. Ganz, „Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity", *Nat. Rev. Immunol.*, roč. 3, č. 9, s. 710–720, zář. 2003.
- [100] P. Sun *et al.*, „NK cell degranulation as a marker for measuring antibody-dependent cytotoxicity in neutralizing and non-neutralizing human sera from dengue patients", *J. Immunol. Methods*, roč. 441, s. 24–30, úno. 2017.
- [101] M. Ramadass a S. D. Catz, „Molecular mechanisms regulating secretory organelles and endosomes in neutrophils and their implications for inflammation", *Immunol. Rev.*, roč. 273, č. 1, s. 249–265, zář. 2016.

- [102] G. Cruse, A. M. Gilfillan, a D. Smrz, „Flow cytometry-based monitoring of mast cell activation", *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, roč. 1220, s. 365–379, 2015.
- [103] A. Aase *et al.*, „Validate or falsify: Lessons learned from a microscopy method claimed to be useful for detecting *Borrelia* and *Babesia* organisms in human blood", *Infect. Dis.*, roč. 48, č. 6, s. 411–419, čer. 2016.
- [104] J. L. KING, A. D. SMITH, E. A. MITCHELL, a M. S. ALLEN, „Validation of droplet digital PCR for the detection and absolute quantification of *Borrelia* DNA in *Ixodes scapularis* ticks", *Parasitol. Camb.*, roč. 144, č. 4, s. 359–367, dub. 2017.
- [105] B. Wilske, V. Fingerle, a U. Schulte-Spechtel, „Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis", *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, roč. 49, č. 1, s. 13–21, úno. 2007.
- [106] E. Ružić-Sabljić *et al.*, „Comparison of MKP and BSK-H media for the cultivation and isolation of *Borrelia burgdorferi sensu lato*", *PLOS ONE*, roč. 12, č. 2, s. e0171622, úno. 2017.
- [107] C. Fontana, S. Crussard, N. Simon-Dufay, D. Pialot, N. Bomchil, a J. Reyes, „Use of flow cytometry for rapid and accurate enumeration of live pathogenic *Leptospira* strains", *J. Microbiol. Methods*, roč. 132, s. 34–40, led. 2017.
- [108] „TaqMan® vs. SYBR® Green Chemistries". [Online]. Dostupné z: <http://www.biosyn.com/tew/taqman-vs-sybr-green-chemistries.aspx>. [Viděno: 20-čvc-2017].
- [109] A. M. Waterhouse, J. B. Procter, D. M. A. Martin, M. Clamp, a G. J. Barton, „Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench", *Bioinformatics*, roč. 25, č. 9, s. 1189–1191, kvě. 2009.
- [110] A. Färkkilä *et al.*, „FOX L2 402C>G Mutation Can Be Identified in the Circulating Tumor DNA of Patients with Adult-Type Granulosa Cell Tumor", *J. Mol. Diagn.*, roč. 19, č. 1, s. 126–136, led. 2017.
- [111] „Bulletin\_6407.pdf". .
- [112] H. Doi, T. Takahara, T. Minamoto, S. Matsushashi, K. Uchii, a H. Yamanaka, „Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (PCR) Outperforms Real-Time PCR in the Detection of Environmental DNA from an Invasive Fish Species", *Environ. Sci. Technol.*, roč. 49, č. 9, s. 5601–5608, kvě. 2015.
- [113] H. Mellert *et al.*, „Development and Clinical Utility of a Blood-Based Test Service for the Rapid Identification of Actionable Mutations in Non-Small Cell Lung Carcinoma", *J. Mol. Diagn.*, roč. 19, č. 3, s. 404–416, kvě. 2017.
- [114] „ASM Poster.pdf". .
- [115] G. Stanek *et al.*, „Lyme borreliosis: Clinical case definitions for diagnosis and management in Europe", *Clin. Microbiol. Infect.*, roč. 17, č. 1, s. 69–79, led. 2011.
- [116] M. U. of Vienna, „€ 2 million for European Lyme Borreliosis innovation | MedUni Vienna", *Medical University of Vienna*. [Online]. Dostupné z: <https://www.meduniwien.ac.at/web/en/about-us/news/detailseite/2016/news-from-august-2016/eur-2-million-for-european-lyme-borreliosis-innovation/>. [Viděno: 28-říj-2016].
- [117] Y. Zhao, Q. Xia, Y. Yin, a Z. Wang, „Comparison of Droplet Digital PCR and Quantitative PCR Assays for Quantitative Detection of *Xanthomonas citri* Subsp. *citri*", *PLoS ONE*, roč. 11, č. 7, čvc. 2016.
- [118] A. V. Easton *et al.*, „Multi-parallel qPCR provides increased sensitivity and diagnostic breadth for gastrointestinal parasites of humans: field-based inferences on the impact of mass deworming", *Parasit. Vectors*, roč. 9, s. 38, led. 2016.

- [119] S. C. Taylor, G. Laperriere, a H. Germain, „Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data", *Sci. Rep.*, roč. 7, kvě. 2017.
- [120] C. Koepfli *et al.*, „Sensitive and accurate quantification of human malaria parasites using droplet digital PCR (ddPCR)", *Sci. Rep.*, roč. 6, pro. 2016.
- [121] R. H. Sedlak, J. Kuypers, a K. R. Jerome, „A multiplexed droplet digital PCR assay performs better than qPCR on inhibition prone samples", *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, roč. 80, č. 4, s. 285–286, pro. 2014.
- [122] T. C. McMahon, B. W. Blais, A. Wong, a C. D. Carrillo, „Multiplexed Single Intact Cell Droplet Digital PCR (MuSIC ddPCR) Method for Specific Detection of Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) in Food Enrichment Cultures", *Front. Microbiol.*, roč. 8, bř. 2017.
- [123] E. Zonta *et al.*, „Multiplex Detection of Rare Mutations by Picoliter Droplet Based Digital PCR: Sensitivity and Specificity Considerations", *PLOS ONE*, roč. 11, č. 7, s. e0159094, čvc. 2016.
- [124] D. Dobnik, D. Štebih, A. Blejec, D. Morisset, a J. Žel, „Multiplex quantification of four DNA targets in one reaction with Bio-Rad droplet digital PCR system for GMO detection", *Sci. Rep.*, roč. 6, s. srep35451, říj. 2016.
- [125] P. Ohlsson *et al.*, „Integrated Acoustic Separation, Enrichment, and Microchip Polymerase Chain Reaction Detection of Bacteria from Blood for Rapid Sepsis Diagnostics", *Anal. Chem.*, roč. 88, č. 19, s. 9403–9411, říj. 2016.
- [126] J. L. Snyder *et al.*, „T2 Magnetic Resonance-based Direct Detection of Three Lyme Disease-Related *Borrelia* Species in Whole Blood Samples", *J. Clin. Microbiol.*, s. JCM.00510-17, kvě. 2017.
- [127] „T2 Magnetic Resonance-based Direct Detection of Three Lyme Disease-Related *Borrelia* Species in Whole Blood Samples". [Online]. Dostupné z: <http://jcm.asm.org/content/early/2017/05/25/JCM.00510-17.abstract>. [Viděno: 05-čvc-2017].
- [128] M. Adler, T. Swe, a A. T. Naing, „Concurrent babesiosis and serological evidence of Lyme disease in a young patient", *J. Community Hosp. Intern. Med. Perspect.*, roč. 7, č. 1, s. 46–48, led. 2017.
- [129] A. Mannelli, L. Bertolotti, L. Gern, a J. Gray, „Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe: transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change", *FEMS Microbiol. Rev.*, roč. 36, č. 4, s. 837–861, čvc. 2012.
- [130] S. I. Bonnet, F. Binetruy, A. M. Hernández-Jarguín, a O. Duron, „The Tick Microbiome: Why Non-pathogenic Microorganisms Matter in Tick Biology and Pathogen Transmission", *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, roč. 7, 2017.
- [131] Z. Hubálek a J. Halouzka, „Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review", *Eur. J. Epidemiol.*, roč. 13, č. 8, s. 951–957, pro. 1997.
- [132] J. Mc, G. L, B. As, a F. Kj, „The Heterogeneity, Distribution, and Environmental Associations of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato, the Agent of Lyme Borreliosis, in Scotland., The Heterogeneity, Distribution, and Environmental Associations of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato, the Agent of Lyme Borreliosis, in Scotland", *Front. Public Health Front. Public Health*, roč. 2, 2, s. 129–129, 2014.
- [133] A. Zintl *et al.*, „Ticks and Tick-borne diseases in Ireland", *Ir. Vet. J.*, roč. 70, s. 4, led. 2017.
- [134] T. Lassmann, O. Frings, a E. L. L. Sonnhammer, „Kalign2: high-performance multiple alignment of protein and nucleotide sequences allowing external features", *Nucleic Acids Res.*, roč. 37, č. 3, s. 858–865, úno. 2009.

- [135] R. C. Edgar, „MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput", *Nucleic Acids Res.*, roč. 32, č. 5, s. 1792–1797, bře. 2004.
- [136] L. W *et al.*, „The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework.", *Nucleic Acids Res.*, roč. 43, č. W1, s. W580–4, čvc. 2015.
- [137] K. K a S. Dm, „MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability.", *Mol. Biol. Evol.*, roč. 30, č. 4, s. 772–780, dub. 2013.
- [138] A. Christodoulides, A. Boyadjian, a T. Kelesidis, „Spirochetal Lipoproteins and Immune Evasion", *Front. Immunol.*, roč. 8, bře. 2017.
- [139] „Klíště.cz – Výskyt nakažených klíšťat v krajích". [Online]. Dostupné z: <https://www.kliste.cz/cz/vse-o-klistratech/clanek/vyskyt-nakazenych-klisat-v-krajich>. [Viděno: 14-srp-2017].
- [140] B. Moshaver, F. de Boer, H. van Egmond-Kreileman, E. Kramer, C. Stegeman, a P. Groeneveld, „Fast and accurate prediction of positive and negative urine cultures by flow cytometry", *BMC Infect. Dis.*, roč. 16, s. 211, kvě. 2016.
- [141] V. Boss, D. J. Talpade, a T. J. Murphy, „Induction of NFAT-mediated Transcription by G-coupled Receptors in Lymphoid and Non-lymphoid Cells", *J. Biol. Chem.*, roč. 271, č. 18, s. 10429–10432, bře. 1996.
- [142] C. R. van der Torren *et al.*, „Immunogenicity of human embryonic stem cell-derived beta cells", *Diabetologia*, roč. 60, č. 1, s. 126–133, led. 2017.
- [143] S. J. Israels a E. M. McMillan-Ward, „Platelet tetraspanin complexes and their association with lipid rafts", *Thromb. Haemost.*, roč. 98, č. 5, s. 1081–1087, 2007.