

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ  
CENTRUM BIOLOGIE, GEOVĚD A ENVIGOGIKY

**IDENTIFIKACE LYZUJÍCÍCH BAKTERIOFÁGŮ NA  
LABORATORNÍCH KULTURÁCH *BORRELIA BURGDORFERI*  
BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Lukáš Hádek**

*Biologie se zaměřením na vzdělávání*

Vedoucí práce: Mgr. Jaroslav Pavelka, Ph.D.

**Plzeň 2019**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a zdrojů informací.

V Plzni 26. dubna 2019

.....  
vlastnoruční podpis

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval Mgr. Jaroslavu Pavelkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a vstřícnost při zpracování této práce.

**Volná strana pro zadání práce**

## Obsah

1	Úvod .....	7
2	Bakteriofágy.....	8
2.1	Životní cyklus .....	8
2.2	Průzkum bakteriofágů v čase .....	9
2.3	Druhy bakteriofágů .....	10
2.4	Výskyt bakteriofágů .....	10
2.5	Popis možných hostitelů.....	11
2.5.1	Netopýři.....	11
2.5.2	Klíšťata .....	13
2.6	Borrelie a lymfská borelióza .....	13
2.7	Možnosti využití bakteriofágů v léčbě .....	16
2.7.1	Počátky léčby s využitím bakteriofágů.....	17
2.7.2	Možnosti moderní léčby .....	18
3	Materiál a metody.....	21
3.1	Metodika získávání bakteriofágů .....	21
3.2	Filtrace bakteriofágů .....	22
3.3	Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	23
4	Vlastní výzkum .....	24
4.1	Sběr vzorků.....	24
4.1.1	Klíšťata .....	24
4.1.2	Netopýři.....	26
4.2	Filtrace bakteriofágů .....	26
4.3	Izolace DNA .....	27
4.3.1	Izolace pomocí magnetických kuliček .....	28
4.4	Primery a PCR reakce .....	28
4.5	Agarozový gel.....	29

4.6	Čištění PCR produktů.....	29
4.7	Sekvenace .....	29
4.8	Vyhodnocení sekvence.....	29
5	Výsledky .....	30
5.1	Testování vlivu koktejlu fágů na kultury borrelií .....	30
5.2	Sekvenování.....	31
6	Diskuse .....	34
	Závěr .....	37
	Resumé.....	38
	Seznam použité literatury .....	39
	Seznam obrázků .....	45
	Seznam tabulek .....	45

# 1 Úvod

Lymfská borelióza je v dnešní době velmi rozšířená nemoc, která je přenášena klíšťaty. Odhaduje se, že je až šestkrát rozšířenější než klíšťová encefalitida. Její průběh se dělí na tři stádia. V čím vyšším stádiu se nemoc nachází, tím je sice jednodušší ji odhalit, ale za to těžší jí vyléčit (Stanek, Wormser et al 2012). Cílem této práce je otestovat metodu identifikace bakteriofága, který by podpořil antibiotika a ve spolupráci s nimi by pomohl vyléčit lymfskou boreliózu ve druhém a třetím stádiu.

I když je fágová terapie pro léčbu nemoci navrhována, nejsou příliš detailně probírány postupy léčby. Klíčové je nalezení vhodných fágů. Někteří autoři se domnívají, že by bylo nejvhodnější se v případě neurodegenerativních chorob zaměřit v první fázi na rod *Borrelia* - konkrétně na evropské a americké druhy, u kterých je potvrzeno, nebo je podezření na vyvolání lymfské boreliózy. Jedná se o druhy *B. afzelii*, *B. burgdorferi*, *B. andersonii*, *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. californiensis*, *B. carolinensis*, *B. baronii*, *B. spielmanii* (Margos et al 2011).

Je prokázáno, že u *Borrelia burgdorferi* existují fágy i v bakteriálním genomu ve formě profágů (Babb et al 2006). Proto je možné se domnívat, že existuje škála bakteriofágů napadajících kmen *Borrelia* a některé by mohly být využitelné pro léčbu. Další výzkum by měl být proto zaměřen na nalezení, případně mutagenezi u fágových částic schopných lyze u *Borrelia burgdorferi* a příbuzných druhů (viz Margos et al 2011).

Z uvedených důvodů bude výzkum zaměřen primárně na bakterie druhu *Borrelia burgdorferi*. Materiál s pravděpodobným obsahem fágů pro výzkum byl získáván z trusu netopýrů a také sběrem klíšťat.

## 2 Bakteriofágy

Bakteriofágy jsou viry, které napadají a infikují bakterie. Nacházejí se téměř všude a ve velkém množství. Jeden z mála předpokladů pro výskyt bakteriofágů je to, aby se v místech výskytu nalézali jejich hostitelé. Vyskytují se například v odpadních vodách, výkalech, půdě, ale i v hlubokých zemských tepelných průduších. Nejhojnější výskyt se odhaduje v mořské vodě. Jejich velmi vysoká úroveň specializace, dlouhá životnost a rychlá reprodukce při nalezení vhodných hostitelů přispívá k udržení vyrovnaného vztahu mezi rozmanitou škálou bakterií v různých přírodních ekosystémech. Za předpokladu, že nejsou bakteriofágy poškozeny vnějšími činiteli či vlivy a nemohou nalézt vhodného hostitele, mohou si schopnost „infekce“ uchovat až po několik desítek let (Kutter, Sulakvelidze 2004).

Bakteriofágy spolu se všemi ostatními viry jsou absolutními parazity. Přesto, že mají všechny nezbytné informace k úspěšnému řízení vlastní reprodukce v příhodném hostiteli, tak nemají žádné orgány pro výrobu energie a také nemají ribozomy pro vytváření proteinů. Proto je jejich životní cyklus přímo vázán na hostitele (Kutter, Sulakvelidze 2004).

Každý jednotlivý bakteriofág nese svůj vlastní genom. Dostane se do hostitelské buňky a z ní může řídit produkci. Genom bakteriofágů je tvořen nukleovou kyselinou RNA, nebo DNA a je uzavřený v proteinovém nebo lipoproteinovém obalu či kapsidě. Každý druh bakteriofága napadá specifický druh bakterie. Většinou jsou jedním typem fágů infikovány stejné skupiny či podskupiny jednoho druhu bakterií (Kutter, Sulakvelidze 2004).

Zatímco některé fágy mají ve svém genomu jen několik tisíc bází, doposud největší popsáný „fág G“ má 480 000 párů bází, podobně jako mají bakterie, přestože postrádají orgány, jako jsou například ribozomy (Kutter, Sulakvelidze 2004).

### 2.1 Životní cyklus

Bakteriofágy jsou řazeny mezi povinné intracelulární parazity. To znamená, že vyžadují určitou hostitelskou buňku pro svoji replikaci. Bakteriofágy se rozmnožují v bakteriálních buňkách. Při rozmnožování se nejprve bakteriofág přichytí vlákny, která se nacházejí pod hlavičkou, pomocí vláken propíchnou buňku a pronikne do ní podobně jako injekční jehla do kůže. Po spojení s bakterií vypustí bakteriofág nukleovou kyselinu



do napadené buňky. Vypuštěná nukleová kyselina se replikuje a včleňuje se do své proteinové kapsidy. Únik zralých fágů poškozuje plazmatickou membránu buňky, což může mít za následek buněčnou smrt (Beaudoin 2007).

## 2.2 Průzkum bakteriofágů v čase

Bakteriofágy byly původně považovány za klíčové pro kontrolu bakteriálních infekcí. Ve čtyřicátých a padesátých letech minulého století vznikla průkopnická studie o struktuře a fyziologii interakcí mezi hostitelem a fágem. To položilo základy molekulární biologie a nových průmyslových odvětví založených na biotechnologiích. Bakteriofágy jsou schopné infikovat téměř všechny prokaryotické skupiny. Byly a jsou snadno izolovány z půdy, vody a odpadních vod a dalších prostředí, které jsou kolonizované bakteriemi. Ekologicky jsou fágy téměř stejně přizpůsobivé jako jejich hostitelé, kteří jsou schopni přežít extrémní teploty až 95 °C a extrémní hodnoty pH až 1 (Sharp 2001).

Jako první v historii v roce 1896 popsal E. H. Hankin bakteriocidní aktivitu filtrované vody, odebrané z řek Gangy a Jummy v Indii. Hankin spekuloval, že pití říční vody je účinné v prevenci proti šíření cholery proto, že v Ganze se nachází velké množství fágů. Toto tvrzení se také později potvrdilo (Sharp 2001).

První bakteriofágy byly identifikovány až o 19 let později, v roce 1915, britským patologem Frederikem Twortem. S odstupem dvou let objevil fágy také mikrobiolog Felix d'Herelle. Oba se už od raného počátku výzkumu drželi myšlenky, že bakteriofágy budou sloužit k léčení bakteriálních nemocí (Sharp 2001).

Fágy byly v dalších letech vyhodnoceny jako prostředek pro léčení některých bakteriálních nemocí. Následovaly další rané pokusy léčby. Tato první fáze zkoumání fágů, díky objevení penicilinu v roce 1928 a také díky mnohým neúspěchům, postupně doznívala a zájem byl obnoven až prací Maxe Delbrücka a jiných během 40. let dvacátého století. Poté se bakteriofág stal ohniskem studia virologie a základního molekulárního a genetického výzkumu. Tyto rané studie položily základy pro moderní biologii fágů a vývoj molekulární biologie (Sharp 2001).

V roce 1953 byl založen Mezinárodní podvýbor, který sloužil k vypracovávání metodiky a typizaci bakteriofágů (Sharp 2001).

## 2.3 Druhy bakteriofágů

Bakteriofágy jsou rozděleny do 13 rodin. Z toho tři skupiny: *Myoviridae*, *Siphoviridae* a *Podoviridae* zahrnují bičíkaté fágy, které mají všechny dvouvláknovou DNA a jsou řazeny do řádu *Caudovirales*. Bakteriofágy nalezneme u více než 140 rodů bakterií a archeí. Od roku 1959, kdy se začaly bakteriofágy zkoumat pod elektronovým mikroskopem, jich bylo popsáno zhruba 5 100 druhů. Ze všech známých fágů tvoří 96 % všech fágů bičíkaté, přičemž rozložení je následující: 61,7 % *Siphoviridae*, 24,5 % *Myoviridae* a 13,9 % *Podoviridae* (Sharp 2001).

Současná klasifikace dle ICTV (International Committee for Taxonomy of Viruses) tvrdí, že druh viru je polytetická třída virů, která představuje replikační linii a zabírá konkrétní místo. Členové polytetické třídy mají určitý počet společných vlastností, ale ne všechny vlastnosti společné, nebo neobsahují společnou vlastnost, která by definovala určitou třídu. Jak vyplývá z této definice, rozdělení není vůbec jednoduché a mezi jednotlivými rody, či skupinami je velmi tenká hranice. Morgan a Pitts (2008) dokonce tvrdí, že bakteriofágy jsou organismy, které se dokáží vyvíjet bez formování druhů.

Dle ICTV do řádu *Caudovirales* spadají již výše zmíněné čeledi *Myoviridae*, *Siphoviridae* a *Podoviridae*. Další čeledi fágů již nejsou pevně zařazeny pod určitý řád, ale jsou v systému samostatně. Dále známe takzvané fágy mnohostěnné *Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae* a *Cystoviridae*. Dále fágy vláknité: *Inoviridae*, *Lipothrixviridae* a *Rudiviridae*. Jako poslední jsou fágy polymorfní: *Plasmaviridae* a *Fuselloviridae* (Morgan, Pitts 2008).

## 2.4 Výskyt bakteriofágů

Bakteriofágy mohou být izolovány téměř ze všech prostředí, kde se nacházejí bakterie, a jejich počty se odrážejí na velikosti populace bakterií. V surových odpadních vodách a také v ošetřených odpadních vodách se zpravidla nachází velké množství koliformních bakterií, zatímco v relativně čistých a neznečištěných řekách se nachází nižší počet (Sharp 2001).

V mořích jsou viry nejrozšířenější skupinou s počtem až  $10^7 \text{ cm}^3$ . Zpravidla je v mořích více virů než bakterií 5-25x. Také v bohatých pobřežních vodách jsou počty

několikanásobně vyšší než v otevřeném oceánu. Mořský led je v porovnání s vodou na počty virů i bakterií poměrně chudý (Sharp 2001).

V domácí nefiltrované odpadní vodě je koncentrace fágů 105–107 pfu cm<sup>-3</sup>. Také bylo zjištěno, že v 74-92 % trusu divokých savců a ptáků a 10-30 % trusu domácích zvířat, jako jsou koně, krávy a drůbež, také obsahovalo fágy (Sharp 2001).

S největší pravděpodobností se bakteriofágy v lytickém stádiu života vyskytují i u savců. Možní hostitelé, kteří byli vybráni pro výzkum, budou popsáni v následující kapitole.

## 2.5 Popis možných hostitelů

Jako zdroj bakterií rodu *Borrelia* se dá velmi dobře použít trus z hlodavců, například rejšků, hrabošů a myšic. Získávání vzorků je však velmi časově náročné. Aby byl sběr prováděn v souladu se zákonem, musí se hlodavci chytat do speciálních pastí, do kterých se dokáží dostat, ale už nemůžou vylézt ven. Při odchytu jim však není nijak ublíženo. Pasti se nastraží do předem vybraných míst a do pastí se umístí návnada, která slouží jako lákadlo. Musí se provádět častá a pravidelná kontrola nalíčených pastí, aby mohl být chycený subjekt včas vypuštěn. Po vypuštění hlodavců v pasti většinou zbydou výkaly, které jsou pak sbírány pro další výzkum (Kozelková 2017).

Z důvodu náročnosti odchytu živých hlodavců byla pro účely této práce použita metoda odebrání netopýřího trusu z předem vytipovaných lokalit. Tato metoda je dle názoru autora, vzhledem k snazšímu odběru potřebných vzorků, jednodušším řešením, než odchyt živých zvířat. Netopýři jsou živočichové, na kterých klíšťata velmi často parazitují, proto je velká šance, že na ně klíšťata přenesou nákazu boreliózy (Hornok, Kontschán 2014).

V následujících kapitolách budou popsáni dva vybraní živočichové – netopýr a klíště, se kterými se pracovalo ve výzkumné části práce.

### 2.5.1 Netopýři

V roce 1920 byla poprvé zaznamenána u netopýrů v Africe vzteklna. Tehdy se začalo pohlížet na netopýry jako na možné přenašeče různých virových infekcí, které mohou být pro člověka patogenní. Většina chorob přenášených na člověka v netopýrech nevykazuje žádné známky infekce. Udává se, že netopýři mohou přenášet až stovky

různých virů, přičemž pro člověka je patogenní pouze část z nich. Netopýři mohou být velmi výkonnými roznašeči virů, protože jako jediní savci jsou schopni aktivního letu, a tak jsou ideální při šíření infekce na velké dálky (SZU 2019a).

Ve světě bylo popsáno několik virů, které jsou roznášeny netopýry. Mezi ně patří například viry Nipah a Hendra z čeledi *Paramyxoviridae*, které měly za důsledek fatální zoonotické infekce jak u lidí, tak u zvířat. Další z možných virů, který v letech 2002-2003 způsobil pandemii, kde došlo skoro k 1 000 úmrtím, byl virus nazvaný SARS-CoV. Původcem tohoto viru byli nejspíše vrápenci. V neposlední řadě mohou být netopýři i rezervoárem viru Ebola (SZU 2019a).

Podřád netopýři (*Microchiroptera*) patří do řádu letounů (*Chiroptera*). Řád letounů je jediná skupina savců, která je schopná aktivního letu. Přední končetina je u netopýřů přeměněná na křídlo, jako výztuha a opora slouží kosti. Konkrétně to jsou kosti paže, předloktí, prodloužených metakarpů a článků 2. až 5. prstu. Mezi nimi je natažená velmi jemná blána, která na většině povrchu není osrstěná. Roztažená křídla několikanásobně zvětší plochu těla, proto je netopýři vždy v klidovém stádiu skládají. Zadní končetina je zakloubená obráceně, než je tomu zvykem u ostatních savců, a slouží k zavěšování. Z fyziologických vlastností je zřejmě nejpopulárnější schopnost echolokace, kterou netopýři vytvářejí v hrtanu a vypouštějí ji tlamou nebo nosem. Dále můžeme u netopýřů pozorovat jevy, jako jsou utajená březost, utajené oplození, řízená hypotermie nebo zimní spánek. Přesto, že se netopýři dorůstají poměrně malé velikosti, mohou se dožít relativně vysokého věku, a to až 40 let (Gaisler, Zima 2018).

V České republice se nachází dvě čeledi s celkem 27 druhy netopýřů. Původní rozšíření bylo ve skalách nebo štěrbinách skal, dnes jsou již některé kolonie zcela synantropní a žijí ve starých budovách a na půdách domů. Pravděpodobně nejznámější a nejrozšířenější druh netopýra v České republice je netopýr velký (*Myotis myotis*), který se považuje za českého nejhojnějšího letouna a v létě utváří kolonie až o 100 kusech, nejčastěji na půdách budov. Další zástupce české fauny je netopýr hvízdavý (*Pipistrellus pipistrellus*), který se vyskytuje v palearktické oblasti. V České republice se konkrétně vyskytuje v parcích a městech. Jemu velmi podobný druh, který byl objeven na základě rozdílů v echolokačních signálech, je netopýr nejmenší (*Pipistrellus pygmaeus*). Ten je zároveň naším nejmenším letounem, samec váží 4-6 g, samice o něco více. Netopýr rezavý (*Nyctalus noctula*) je druh vyskytující se převážně v lesích. Ukrývá se v dutinách stromů

a druhotně i ve městských objektech (Anděra 2003). Dalším v České republice rozšířeným druhem je netopýr dlouhouchý (*Plecotus austriacus*), který obývá zejména teplejší oblasti. K zimnímu spánku se ukládá ve skalních štěrbinách, v budovách nebo také v podzemních štolách. Vyskytuje se většinou v koloniích počtu 10-30 samic. Živí se především motýly a téměř jakýmkoli jiným hmyzem. Větší kořist, kterou není schopen sežrat na místě, nebo v letu, si nosí na místa, kde se krmí. Jeho zimní spánek trvá většinou od října do března až dubna (Aulagnier, Mitchell-Jones 2018).

### 2.5.2 Klíšťata

V České republice se klíšťata nacházejí hlavně ve smíšených a listnatých lesích. Je však možné je najít i na loukách, nebo v křovinatých podrostech. Ve valné většině se v české přírodě vyskytuje klíště obecné (*Ixodes ricinus*), které má charakteristický tříhostitelský cyklus. V ČR se také vyskytují další dva druhy klíšťat, které však nejsou tak rozšířené, jako klíště obecné, piják lužní (*Dermacentor reticulatus*) a klíšť lužní (*Haemophysalis concinna*). Larvy klíšťat parazitují na malých hlodavcích, ještěrkách nebo ptácích. Nymfy taktéž, ale už mohou vyhledávat i větší obratlovce. Dospělé samice parazitují na větší lesní zvěři, mohou však napadat i domácí zvířata, jako jsou různé druhy kopytníků nebo psi. Samička v hladovém stavu má běžně kolem 3,5 mm a její zbarvení je červenohnědé. Plně nasátá samička má zbarvení šedivé a dosahuje velikosti fazole. Výjimečně může klíště, které je hodně nasáté, mít až ke dvěma centimetrům. Na člověku může parazitovat jakékoli vývojové stádium. Samečci krev nesají, přesto je ale možné je nalézt na těle hostitele. Důvodem je to, že hostitel je nejpravděpodobnější místo, kde se samec může setkat se samičkou a následně kopulovat (Volf, Horák 2007).

Vývoj klíštěte obecného trvá zhruba tři roky. Každé vývojové stádium zabírá zhruba rok. Klíště obecné je u nás zpravidla hojnější v nižších polohách a pahorkatinách, ve vyšších nadmořských výškách žije jen zřídka. Jejich největší výskyt můžeme zaznamenat od března do listopadu. Nebezpečnost klíšťat spočívá především v přenosu klíšťové meningoencefalitidy, kde je původcem virus, a lymfské boreliózy, kde jsou původcem bakterie z komplexu druhů *Borrelia*. (Volf, Horák 2007).

## 2.6 Borrelie a lymfská borelióza

Státní zdravotní ústav (2019b) definuje lymfskou boreliózu jako multiorgánové onemocnění, přenášené spirochétami rodu *Borrelia burgdorferi*. V České republice téměř

výlučně boreliózu přenáší klíště (*Ixodes ricinus*). Nemoc má klinické projevy, které mohou mít různě závažný dopad na lidský organismus.

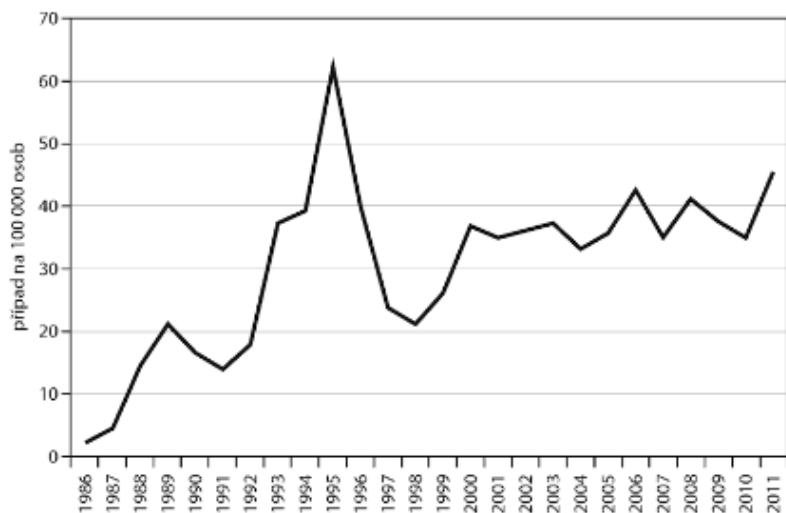
Lymfská borelióza v každém stádiu je v České republice povinně hlášenou infekční nemocí. Každý diagnostikovaný případ musí být nahlášen lékařem. Hlášení shromažďují Krajské hygienické stanice a jsou odesílána přes úložiště dat Ministerstva zdravotnictví České republiky do Státního zdravotního ústavu, kde jsou analyzována a zveřejňována (SZU 2019b).

Pokud se lymfskou boreliózou nakazí člověk, je většinou kožní infekce doprovázena rozšiřujícím se takzvaným „býčím okem“. V místě, kde se klíště nacházelo, je sytě červený rudý flíček, kolem něj je světlejší vrstva, která je zvenku ohraničená opět tmavším rudým kolem. Dále se může borelióza projevit vyrážkou a dalšími symptomy jako je horečka, bolesti a nevolnost. Pokud se infekce nezačne léčit, může se projevit jako artritida, karditis, nebo způsobit neurologické poruchy (Burns, Adams, Riley 2010).

Ohnisko nákazy lymfskou boreliózou se vyskytuje v přírodě. Nemoc má sezónní výskyt, závislý na ročním období a klimatu. Počasí ovlivňuje nejen aktivitu klíšťat, ale i chování člověka v přírodě. Nejčastější výskyt nákazy je v letních měsících, i když je diagnostikována v průběhu celého roku (Bartůněk 2013).

Počet nahlášených onemocnění v České republice v jednotlivých letech je nerovnoměrný. V roce 1995 byl pozorován nejvyšší počet nakažených lymfskou boreliózou s počtem 6 302 nahlášených nemocných. Od tohoto roku počet hlášených onemocnění pomalu klesal až do roku 1999, kdy začíná zase mírně stoupat (Bartůněk 2013). Graf vývoje počtu nahlášených onemocnění mezi lety 1986 a 2011 je zobrazen v následujícím obrázku.

Obrázek 1: Vývoj počtu nahlášených onemocnění lymfskou boreliózou mezi lety 1986 a 2011



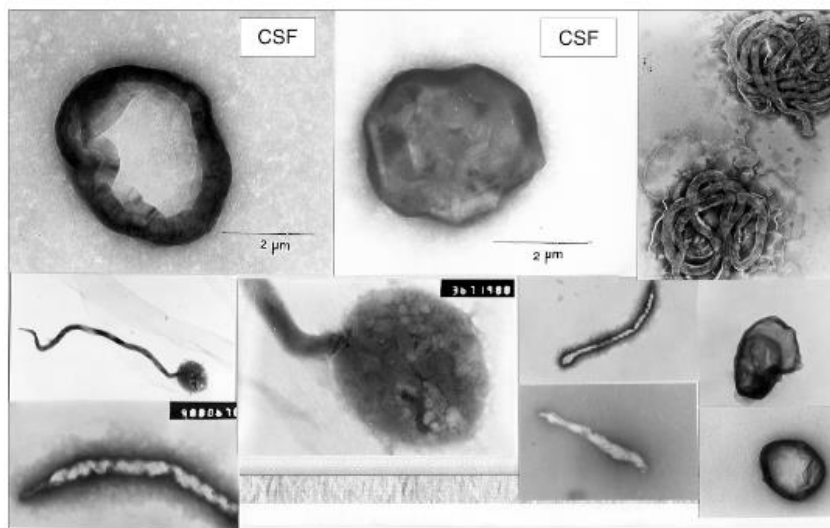
Zdroj: Bartůněk 2013

Inkubační doba nemoci je v rozmezí od 1 do 300 dnů. Přisátí klíštěte si vybavuje jen zhruba polovina nemocných. Někteří pacienti udávají vzpomínku na poštipání hmyzem, nebo si nepamatují žádnou událost (Bartůněk 2013).

Jak již bylo uvedeno, nemoc se ze zvířete na člověka přenáší kousnutím klíštěte. U infikovaného klíštěte se bakterie usídí ve střevech a skrze střevní stěnu se dostávají k orgánům včetně slinných žláz. Bakterie se na hostitele přenášejí slinami (Bartůněk 2013).

Borrelie patří mezi spirochéty a mají s nimi tedy společné znaky. Buňky mají helikální tvar. To znamená, že mají šroubovicovou symetrii. Jejich protáhlý spirálovitý tvar jim slouží k pohybu. Vnější membrána se skládá ze tří částí, vnitřní peptidoglykanové, střední lipopolysacharidové a vnější lipoproteinové, a je obklopena protoplazmatickým komplexem válců, který se skládá z cytoplazmy. Borrelie mají velmi neúplnou výbavu, a proto jsou zcela závislé na svém hostiteli. Ve vnějším prostředí nejsou schopny růstu. Velikost borrelií je na šířku zhruba 0,2  $\mu\text{m}$  a na délku od 4 do 30  $\mu\text{m}$ . Buňky mají pravidelné závitě, vzdálené 2,2  $\mu\text{m}$  od sebe. Počet závitů se pohybuje od 4 do 15. Mohou se pohybovat natahováním, či smršťováním a pohybem kolem své osy. Jako pohybový aparát slouží bičíky, kterých může být 7-12. Některé patogenní borrelie, jako jsou *B. recurrentis* a *B. hermsi* mají i větší počet bičíků, zpravidla 15-20. Bičíky jsou duté a mají kanálek, který obsahuje dřeň (Bartůněk 2006). Vzhled několika forem borrelií je zachycen na následujícím obrázku.

Obrázek 2: Různé formy rostoucích borrelií zjištěné metodou ISEM v krvi, mozkomíšním moku a synoviální tekutině



Zdroj: Bartůněk 2006

Bartůněk (2013) považuje borrelie za velmi heterogenní bakterie, které se mění nejen v důsledku vlivu prostředí, ale i změn, které organismy prodělávají při přenosu z klíštěte na hostitele. Za důležitou považuje jejich pohybovou schopnost, díky které unikají z místa obranné reakce hostitele.

## 2.7 Možnosti využití bakteriofágů v léčbě

Vzhledem k tomu, že bakteriofágy jsou viry bakterií, mohou být ve své podstatě považovány za antibakteriální činidla. V posledních desetiletích se, z důvodu stoupajícího počtu bakteriálních kmenů rezistentních vůči antibiotikům, stále častěji řeší otázka použití bakteriofágů v léčbě (Mc Grath, Sinderen 2007).

Zvyšující se odolnost nemocí vůči antibiotikům je důležitým faktorem ohrožujícím zdraví populace. Mezi důsledky rezistence bakterií vůči antibiotikům patří zvyšující se úmrtnost, stoupající počet nakažených a tím také rostoucí náklady na zdravotní péči. Alarmující je například počet dětí v Anglii nakažených v devadesátých letech dvacátého století rezistentním zlatým stafylokokem. Zlatý stafylokok (*Staphylococcus aureus*) si vytvořil odolnost nejdříve vůči antibiotiku penicilin a později i vůči jeho polosyntetické variantě meticilin. Rezistentní kmeny se rychle rozšířily do celé Evropy a počet nakažených dětí vzrostl v letech 1990-2001 až devatenáctkrát (Mc Grath, Sinderen 2007).



Léčba pomocí bakteriofágů je v současnosti stále více probíraným tématem, v lékařské praxi se ale téměř nepoužívá, přestože proti bakteriálním kmenům rezistentním vůči antibiotikům by mohla mít širší léčebné uplatnění. Dalším důvodem pro využití bakteriofágů v léčbě například u zvířat je neustálé zvyšování legislativních požadavků na bezpečnost a nezávadnost potravin, která nepřipouští zbytkovou toxicitu antibiotik (Tiwari et al 2014).

V potravinářském průmyslu mohou existovat různé zdroje kontaminace pro člověka. Možná nákaza hrozí, při práci se surovinami obsahujícími patogenní bakterie, především lidem přicházejícím s nimi do přímého styku. Použití bakteriofágů snižuje riziko kontaminace z původního produktu a jejich opětovné použití při dalším zpracování může také výrazně snížit riziko nákazy. Tyto strategie by mohly být použity hlavně na patogeny jako je *Listeria* v sýru a *Escherichiacoli* v masném průmyslu. V roce 2006 americká společnost Food and Drug Administration schválila použití bakteriofágů za předpokladu, že budou dodržovány faktory zohledňující teplotu, pH a vlhkost, které mohou výrazně ovlivnit účinnost působení fágů (Maura, Debarbieux 2011).

### **2.7.1 Počátky léčby s využitím bakteriofágů**

Félix d'Herelle po svém objevu fágů začal uvažovat o jejich využití v léčbě. Terapeutickou léčbu pomocí fágů aplikoval na pacienty nakažené úplavicí. Jeho léčba zaznamenala úspěchy a prokázala vliv bakteriofágů na uzdravení pacienta. Do roku 1922 byly vyhodnoceny fágy jako vhodný prostředek pro potlačení tyfové horečky a bacilární dysenterie (Sharp 2001).

V roce 1924 Mc Kinley použil tři až šest aplikací fágů a zastavil tak čtyři hnisavé infekce způsobené infekcí *Staphylococcus aureus*. Téhož roku popsal podání fágů perorálním užitím a zastavil tak několik případů tyfu a paratyfidní horečky. Symptomy u obou nemocí odezněly během 48 hodin. V dalších případech byly pozorovány podobné reakce, ale smrt zkoumaných lidí nastala důsledkem jiných komplikací (Sharp 2001).

Rozsáhlejší využití bakteriofágů bylo poprvé aplikováno v Indii po vypuknutí cholery v roce 1932. Přesto, že se léčba fágy jevila jako lepší řešení, než absence jakékoli léčby, tak se neprokázalo, že by byla lepší než dodržování hygienických podmínek nebo očkování (Sharp 2001).

Kontaminace mléčných startovacích kultur mléčných streptokoků bakteriofágy byla poprvé výzvou pro mlékárenský průmysl v roce 1936. Ve stejném roce byla navržena

detekce koliformních bakterií ve vodě jako indikátor kontaminace koliformními bakteriemi, a tedy míry kvality vody (Sharp 2001).

Po objevení penicilinu v roce 1928 nastal v léčbě bakteriálních onemocnění zlom a výzkum fágů pro účely medicíny ustoupil do pozadí (Sharp 2001).

Přestože Felix d'Herelle navrhol použití bakteriofágů pro léčbu lidských a zvířecích bakteriálních infekcí již na počátku 20. století, nebyl tento přístup na Západě široce přijat. Po vzniku antibiotik byl výzkum fágů přeměřován na obecnou úroveň. Ve stejné době byla ale fágová terapie praktikována v Sovětském svazu, díky spolupráci Felixe d'Herelleho s jeho gruzínskými kolegy. Většina článků, které se tímto tématem zabývají, pochází z třicátých a čtyřicátých let dvacátého století (Chanishvili 2012). Existují však i další pracoviště, nejen v Gruzii, kde se bakteriofágy v současnosti aktivně používají k léčbě lidských pacientů, zejména v Polsku (například viz Miedzybrodzki et al 2007, Weber-Dabrowska et al 2002).

### **2.7.2 Možnosti moderní léčby**

Jak již bylo řečeno, hlavním argumentem pro léčbu pomocí bakteriofágů jsou vznikající rezistence virů na antibiotika. Čas potřebný pro rozvoj antibiotické rezistence u virů se liší pro každý druh antibiotika. Například pro penicilin byla poprvé pozorována odolnost po 10 letech od zahájení léčby, zatímco pro vankomycin to bylo až po 30 letech. Mnoho zemí, včetně těch, které se považují za velmi vyspělé, vykazuje v tomto směru závažné problémy. Například ve Spojených státech se v roce 2010 odhadovalo, že více jak 80 000 pacientů je nakaženo rezistentním virem *Staphylococcus aureus*, na který nefungují antibiotika (Kutateladze, Adamia 2010).

Mezi antibiotiky a bakteriofágy existuje celá řada rozdílů. Fágy jsou nejhojnější živé bytosti na planetě a přirození nepřátelé bakterií. Rozmnožují se přirozeně a díky tomu jsou ekologicky čisté, zatímco většina antibiotik je syntetická nebo polosyntetická. Další významný faktor je ten, že rozsah fágů je mnohem užší a specializovanější než u antibiotik. To znamená, že fágy jsou zaměřené na jeden druh bakterie a mnoho z nich může provádět lýzu jen několika specifických kmenů v rámci druhu. Další výhoda spočívá v tom, že bakteriofágy nemají vliv na ostatní bakterie v těle, zatímco širokospektrální antibiotika zničí všechny bakterie nezávisle na tom, zda jsou patogenní, či nikoli. Významným faktorem je i to, že bakteriofágy nemají oproti širokospektrálním antibiotikům žádné vedlejší účinky (Kutateladze, Adamia 2010).

Aplikace fágů může být orální (ústní) či intravenózní (nitrožilní). V Polsku byla shromážděna data od 37 pacientů s osteomyelitidou. Fágový preparát (přirozeně lyzující) byl podáván orálně (jedenkrát 10ml ampule třikrát denně po neutralizaci žaludečních šťáv pomocí 10 ml dihydroxyaluminium sodium carbonate), nebo lokálně (Miedzybrodzki et al 2009).

Léčba pacientů bakteriofágy, zaměřenými například pouze proti *Borrelia burgdorferi*, může vyřešit pouze některé neurodegenerativní poruchy, zapříčiněné jen tímto druhem. Je tedy nutné objevovat bakteriofágy specializované i proti dalším druhům rodu *Borrelia* a dalším spirochétám, které zapříčiňují jiná neurodegenerativní onemocnění. Konečným cílem vědců by mělo být vytvoření fágového preparátu, který by obsahoval ať už více různých typů fágových prepalytických (lyzačních) enzymů, nebo přímo samotných fágů, schopných zacílit celou škálu bakteriálních kmenů, zejména *Borrelia*, *Chlamydia*, *Treponemas*, případně i jiných dosud neuvažovaných kmenů, které bude nutno teprve identifikovat. U dalších kmenů je možno postupovat obdobně. U kmene *Chlamydia* je známa už celá řada bakteriofágů. S jejich použitím by zřejmě bylo možné léčit Alzheimerovu chorobu vyvolanou *Chlamydia pneumoniae* (Śliwa-Dominiak 2013).

Jako zdroj dalších fágů mohou sloužit jak lidští pacienti, tak zvířata (papoušci, křečci, myši a kočky), která sice nejsou vždy nositeli druhů napadajících člověka, ale je pravděpodobné, že jejich bakteriofágy mohou napadat i blízce příbuzné druhy, které jsou pro lidi infekční. U kmene *Treponema* je znalostí o bakteriofázích zatím málo, i když jejich existence je i zde už prokázána (Mitchell 2009). Likvidace těchto bakteriálních kmenů v napadeném lidském mozku by s velkou pravděpodobností zastavila degenerativní změny popisované jako Alzheimerova choroba, roztroušená skleróza, Parkinsonova choroba a další a umožnila by postupnou obnovu mozkové tkáně. Podle účinku by se preparát používal samostatně, nebo v kombinaci s vhodnými antibiotiky (Halperin 2011).

Dá se však očekávat, že lidský organismus bude proti bakteriofágům vyrábět obranné protilátky. Již bylo testováno, zda fágová terapie může v lidském těle takovou odpověď vyvolávat. Lusiak-Szelachowska et al (2014) naznačují, že antifágová aktivita v séru pacientů závisí na způsobu podání fága a typu fága. Antifágová aktivita byla detekována v séru od 122 pacientů, kteří prošli fágovou terapií ve Vratislavi při léčbě bakteriálních infekcí (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterococcus faecalis*) před a během fágové terapie. Testováno bylo také sérum 30 zdravých

dobrovolníků pomocí neutralizačního testu. Závěr výzkumu byl, že i přes vznik antifágové aktivity v séru v průběhu nebo po fágové terapii, není vyloučen příznivý výsledek samotné fágové terapie. Vznik těchto protilátek je však nutno akceptovat, proto se někteří autoři domnívají, že je potřeba mít více typů bakteriofágů proti jednotlivým druhům spirochét. Použití více druhů fágů je také nezbytné, protože fágy mohou při léčbě antibiotiky přenášet do bakterií geny umožňující rezistenci k antibiotikům (Modi et al 2013).

Zdá se, že není vhodné jednoduše nahradit antibiotika bakteriofágy. Správné se ukazuje spíše obojí kombinovat (Kutateladze, Adamia 2010). Z následující tabulky je zřetelné, že největší úspěšnost vyléčení 3 zkoumaných nemocí (sepsy, plicní infekce a artritidy + osteomyelitidy) byla při použití fágů a antibiotik, samotné fágy byly na druhém místě. Nejhorší skončila samotná antibiotika.

Obrázek 3: Efektivita použití fágové terapie proti sepsi, plicní infekci, osteomyelitidě a artritidě

**Table 1. Effectiveness of staphylococcal phage preparation against staphylococcal sepsis, septic infection of the lungs and osteomyelitis<sup>a</sup>**

Diagnosis	Phage therapy only				Phage with antibiotics				Antibiotics only			
	Total number (N)	Complete recovery	Improvement	No effect	Total number (N)	Complete recovery	Improvement	No effect	Total number (N)	Complete recovery	Improvement	No effect
Sepsis	46	19	6	21	40	31	4	5	96	22	22	52
Lung infection	60	21	25	14	61	31	24	6	55	10	21	24
Osteomyelitis and arthritis	9	9	–	–	51	51	–	–	60	60	–	–

<sup>a</sup>Soviet data on phage therapy trials from the Eliava Institute [22]. In a series of clinical trials in the 1970s, the therapeutic effectiveness of the staphylococcal phage preparation against different infectious diseases was evaluated, from which some results are listed here.

Zdroj: Kutateladze, Adamia 2010

Existují další alternativní, nebo zapomenuté postupy, které by se také mohly kombinovat s léčbou bakteriofágy a antibiotiky. V případě neurodegenerativních chorob nejsou často vůbec vzaty v úvahu. Teplota kolem 41-42 °C může výrazně inhibovat kmen *Borrelia*. V práci Reisingera (1996) je připomínána v této souvislosti také malarioterapie. U ostatních kmenů ale nic podobného prokázáno nebylo. Případná léčba neurodegenerativních onemocnění uměle navozenými horečkami by proto mohla mít nějaký účinek pouze v případech, kdy jsou potíže způsobeny kmenem *Borrelia*, i když se nedá vyloučit i *Treponema*. Pokud jsou ale neurodegenerativní změny zapříčiněny např. některým druhem rodu *Chlamydia*, tak vyšší tělesná teplota nebude účinná, protože tyto bakterie vykazují citlivost až při teplotě nad 50 °C (Reisinger 1996).

Při léčbě antibiotiky, ať již s bakteriofágy, nebo samostatně, je klíčové určit, o jaké bakterie jde a nasadit na dané druhy vhodná antibiotika. Při léčbě je také nutno vzít v úvahu, že *Borrelia burgdorferi* je schopna tvořit biofilm in vitro. Vytváření biofilmu u druhů *Borrelia* může hrát důležitou roli v jejich přežití v různých podmínkách životního prostředí, protože tímto způsobem je zajištěno pro jednotlivé buňky útočiště (Sapi et al 2012). Zvláště při léčbě antibiotiky je nutno tento biofilm nějakým způsobem rozpustit, aby byla zajištěna dostatečná účinnost antibiotik. Fágy samotné ale zřejmě přes biofilm proniknou. V pokusech bylo indikováno, že fágový koktejl specifický pro *Staphylococcus aureus*, může účinně eliminovat zlatého stafylokoka ve fytoplanktonu a ve formě biofilmu (Drilling et al 2014). Při aplikaci bakteriofágů proti *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, a *Acinetobacter baumannii*, byla zjištěna účinnost bakteriofágů na oba typy buněk, planktonní i ty, co vytváří biofilmy (Mendes 2014).

### 3 Materiál a metody

Léčba lymfské boreliózy pomocí bakteriofágů již byla mnohokrát diskutována na nejrůznějších fórech, nicméně v odborné literatuře se nedaří najít zmínku o konkrétních klinických zkouškách. Pouze na internetových stránkách pracoviště v Tbilisi (Gruzie), zaměřeného na bakteriofágy, je uvedeno, že se danou problematikou zabývá (Phage Therapy Center, 2019).

V následujících kapitolách bude popsána metodika, která byla při hledání fágů použita.

#### 3.1 Metodika získávání bakteriofágů

Bakteriofágy je možné izolovat zejména z odpadních vod a často přímo ze vzorků odpadních vod z nemocnic. Následně dochází k jejich filtraci přes filtry, které mají otvory menší než bakterie. Projdou jimi jen bakteriofágy. Ty se pak nakapou na kolonie bakterií, pěstované na Petriho miskách, a čeká se, zda kultura bakterií uhynie. V případě, že se to podaří, je k dispozici nový fág, který je použitelný k léčbě konkrétní bakterie (Miedzybrodzki et al 2009, Chaudhry et al 2014).

Přirozeným zdrojem kmenů *Borrelia*, odkud se klíšťaty šíří na člověka, je několik druhů hlodavců, zejména myšice křovinná (*Apodemus sylvaticus*), norník rudý (*Myodes glareolus*), myšice lesní (*Apodemus flavicollis*) a hraboš polní (*Microtus arvalis*).

Je nanejvýš pravděpodobné, že právě u těchto druhů savců se vyskytuje celá škála bakteriofágů, z nichž některé mohou mít požadované lyzační vlastnosti (Margos et al 2011, Burri et al 2014).

Hlodavce je nutné odchyťovat ve vhodné oblasti, která je silně promořena infekcemi. Tito hlodavci mohou být chytáni živí pomocí Shermanových pastí (Sherman® traps). Je také možné získávat bakteriofágy z výkalů odchytených hlodavců. Bakteriofágy, které napadají bakterie, se běžně vyskytují ve fekáliích lidí i zvířat (Harwood et al 2013, Basra et al 2014). Přítomnost ve výkalech je zřejmě jeden ze způsobů, jak se viry a fágy mohou šířit na další hostitele. Bakteriofágy jsou také známy jako indikátor znečištění vody fekáliemi (Muniesa et al 2012).

Protože odchyt hlodavců je komplikovaný, časově náročný a také je pro něj vyžadováno speciální povolení, které se pro univerzitu v České republice obtížně získává, přestože je jinak likvidace hlodavců zcela legální, byla zvolena jiná metoda. Cílem této metody bylo získat trus zvířat potencionálně nakažených borreliemi, protože se dá očekávat, že částí jeho obsahu budou i hledané bakteriofágy. Jako potenciální zdroj byli zvoleni netopýři. Jako další hostitelé bakteriofágů byla zvolena klíšťata, která jsou přenašeči nebezpečných bakterií. Ta byla získána metodou zvanou vlnkování v předem určených lokalitách.

### **3.2 Filtrace bakteriofágů**

Těla klíšťat, či výkaly hlodavců a netopýřů by měly být po sběru rozdrobeny ve vodě, protřepávány několik minut a po jejich první hrubé filtraci by měla následovat filtrace pomocí speciálních filtrů, které nepropouští bakterie, ale pouze samotné bakteriofágy. Tyto filtry o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$  jsou pro podobné účely využívány a jsou relativně cenově dostupné (Betts et al 2013).

Takto získaný filtrát by měl být přidán k laboratorní kultuře borrelií, pokud možno do několika vzorků. Současně s pokusem by měl být sledován i kontrolní vzorek bez přidaného roztoku. Mikroskopickým porovnáváním kontrolního vzorku a ostatních pokusů by za příznivých podmínek měly lytické fágy výrazně snižovat počet borrelií v kultuře. Takový výsledek je ale možný jen v případě, kdy se takový fág bude v kulturách vyskytovat. Jestliže se lytické fágy podaří najít, měly by být pomocí filtrů (0,45  $\mu\text{m}$ ) izolovány z kultury borrelií a několikrát použity na další kulturu (metoda pasážování).

Je vhodné zkracovat čas lyze a odběrů, tím se pravděpodobně podaří vyselektovat fagy, které spíše lyzují borrelie, nikoliv do nich jen vnikají a dále přežívají bez likvidace hostitele - lyzogenie (Betts et al 2013).

V prvním odběru je možno pro větší variabilitu získaných fágů borrelie rozbít silnou cetrifugací a získat fagy i z nich. Bakteriofagy jsou odolnější a takováto centrifugace by jim neměla škodit. Pasážování bakteriofágů je popsáno jako tzv. evoluční trénink fágů proti bakteriální rezistenci. Evoluční trénink se provádí pomocí sériového pasážování, podobně jako při vývoji vakcín. Opakované pasáže na původních kulturách bakterií zvyšují infekční kapacitu bakteriofágů pro původní hostitelské kultury bakterií. Tento evoluční trénink snižuje riziko bakteriálních rezistencí a fagy jsou tak vhodnější pro boj s bakteriálními infekcemi ve srovnání s konvenčními metodami jejich využití (Betts et al 2013).

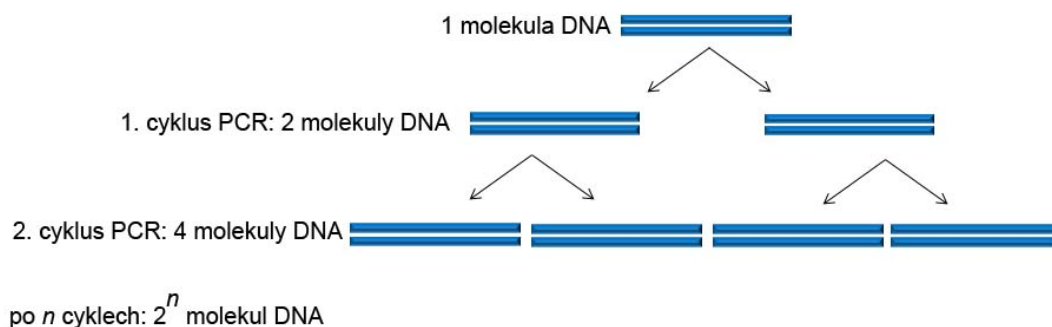
Bakteriofagy, které jsou schopny lyzovat borrelie, by měly být následně sekvenovány a jejich DNA porovnána s dosud známými druhy kvůli identifikaci (Betts et al 2013).

### **3.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

PCR je metoda, která slouží k tomu, aby se zmnožil určitý řetězec DNA. Zmnožený úsek řetězce je ohraničen primery, což jsou krátké oligonukleotidy DNA. Díky tomu, že jsou komplementární, přisedají tyto oligonukleotidy ke koncům vybraného úseku. Při reakci se využívá změn teplot, protože právě rozdílné teploty umožňují denaturaci DNA (LabGuide 2019).

První fáze PCR se nazývá fáze denaturace. Na jejím počátku se dvouřetězcová molekula DNA po dobu zhruba 5 minut zahřívá na teplotu 94 – 98 °C. Za pomoci vysokých teplot se rozruší vodíkové můstky a rozvolní se dvoušroubovice. Vzniknou dvě jednořetězcové molekuly DNA, na které na komplementárních místech nasedají primery. V dalším kroku je nutné teplotu molekuly snížit na zhruba 60 °C (tato teplota je pro každou sadu primerů rozdílná a záleží hlavně na množství párů guaninu a cytozinu). Při této teplotě nasednou primery na specifická místa šroubovice. Poté musí proběhnout syntéza DNA, která probíhá zhruba při 72-80 °C. Tyto fáze se několikrát podle potřeby opakují, dokud není dosaženo požadovaného zmnožení. Tento proces je naznačen na následujícím obrázku (LabGuide 2019).

Obrázek 4: Řetězení molekul



Zdroj: LabGuide.cz 2019

## 4 Vlastní výzkum

Vlastní výzkum v praxi probíhal podle metodiky popsané v kapitole 3.1. Prvním krokem byl sběr materiálu s potenciálním výskytem bakteriofágů, konkrétně se jednalo o netopýří trus a klíšťata. Poté byl materiál přefiltrován, byla izolována DNA, použita PCR reakce a její produkty byly detekované na 2% agarozovém gelu. Dále probíhalo čištění, sekvence a následné vyhodnocování sekvence.

### 4.1 Sběr vzorků

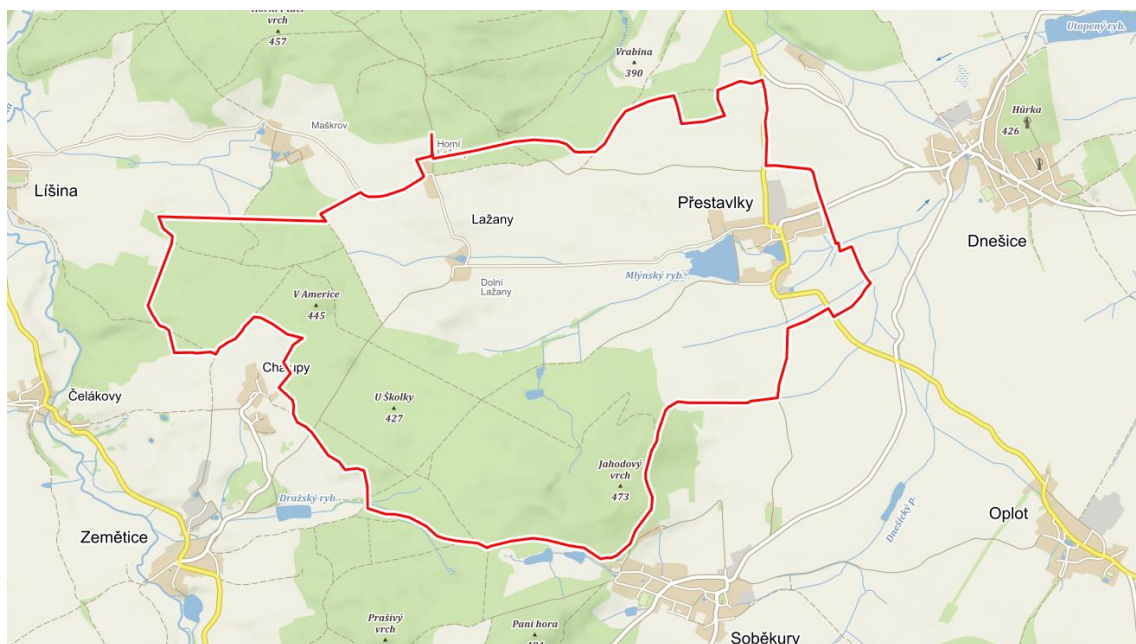
Jak již bylo řečeno, vzorky s potenciálním výskytem bakteriofágů byly získávány z těl klíšťat a netopýřího trusu. V následujících kapitolách jsou popsány lokality, ve kterých sběr probíhal a také jeho postup.

#### 4.1.1 Klíšťata

Sběr klíšťat proběhl na dvou lokalitách. Jako první lokalita byly vybrány Přestavky u Přeštic, kde byly po dobu jednoho měsíce sbírány vzorky v pravidelných intervalech jeden týden. Lokalita byla tedy navštívena celkem čtyřikrát, přičemž bylo sebráno celkem 48 klíšťat. Lokalita je vyznačena na následujícím obrázku.



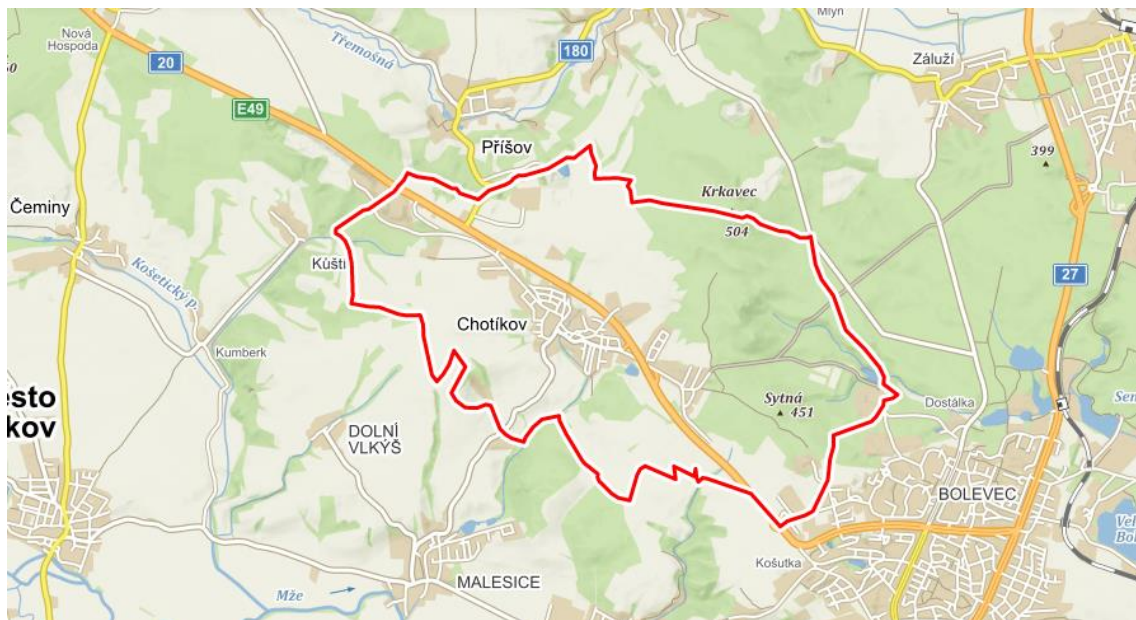
Obrázek 5: I. lokalita sběru klíšťat Přestavky



Zdroj: *Mapy.cz 2019*

Jako druhá lokalita byl zvolen Chotíkov u Plzně. Zde bylo chyceno za 3 týdny, během kterých se uskutečnilo celkem 5 návštěv, 37 klíšťat.

Obrázek 6: II. lokalita sběru klíšťat - Chotíkov



Zdroj: *Mapy.cz 2019*

Sběr probíhal klasickou metodou, takzvaným vlajkováním. Za těmito účely byla vytvořena pomyslná vlajka. Jako rukojeť posloužila 80 cm dlouhá násada a na její konec

byla přivázána bílá látka o rozměrech 80 x 80 cm. Jako další potřeby byly použity plastové zkumavky, pinzeta a lihový fix.

Klíšťata byla získávána sběrem z bavlněného prostěradla, které autor práce přichytil na dřevěnou rukojeť. Při pohybu na louce bylo plátno otíráno o vegetaci a po několika ušlých metrech bylo prostěradlo zkontrolováno. Pokud se našla nějaká klíšťata, byla měkkou entomologickou pinzetou předána do plastové zkumavky eppendorf. Každá plastová zkumavka eppendorf byla označena datem a lokalitou sběru.

Sběr klíšťat probíhal na jaře. V budoucnosti by lepším řešením nejspíše byl sběr na podzim z důvodu vyššího počtu kusů a také vyšší infikovanosti klíšťat.

#### **4.1.2 Netopýři**

Po emailové domluvě s Českou společností pro ochranu netopýřů (ČESON) byla doporučena jako nejlepší lokalita pro sběr netopýřího trusu hrad Točnick. Požadováno bylo, aby se jednalo o větší kolonii, dobře přístupné místo a aby lokalita byla nedaleko Plzně.

ČESON je společnost pro ochranu netopýřů, která vznikla v roce 1991. Tato organizace má za úkol ochranu a výzkum netopýřů. Také zjišťuje problémy, týkající se netopýřů, a informuje o nich odpovědné orgány. Dále prosazuje spolupráci mezi odborníky, amatéry a širokou veřejností. V neposlední řadě se podílí na monitoringu netopýřů na území ČR a reprezentuje státní ochranu netopýřů v tuzemsku i zahraničí (ČESON 2019).

Na hrad Točnick, kde sídlí velká kolonie netopýřů, proběhla jednorázová výprava. Netopýr dlouhouchý (*Plecotus austriacus*), který je na hradě běžnější, má na Točnicku typický výskyt v létě i zimě a největší kolonie se nachází v hradním sklepení. Druhý a zároveň poslední druh, který se na této lokalitě nachází, je netopýr velký (*Myotis myotis*), který obývá vrchol schodiště u královského paláce (ČESON 2019).

Do několika zkumavek byly nabrány vzorky trusu z obou lokalit, vrcholu schodiště i hradního sklepení. Poté byly vzorky uchovávány v mrazícím zařízení. Když byly vzorky potřeba, byly vytaženy, rozmrazeny a připraveny k použití.

#### **4.2 Filtrace bakteriofágů**

1) Po nasbírání několika kolekcí klíšťat, vždy 10 na jeden vzorek, byla klíšťata rozdrcena pomocí kovového homogenizátoru v 1,5 ml plastových zkumavkách (eppendorf), a to

ve 400 µl destilované vody s malým množstvím sterilního jemného písku. Netopýří výkaly byly rozdrceny kusem dřeva v destilované vodě a pak silně protřepávány cca 15 minut na třepačce.

- 2) Následovala filtrace obyčejným filtračním papírem. Poté byla provedena filtrace membránou (Puradisc™ 25mm Sterile a Endotoxin Free 0.45 µm PES Filter Media). Výsledný roztok vody a fágů byl uchováván ve 4 °C. Bylo také připraveno několik kontrolních vzorků, které byly po filtraci běžným filtračním papírem pouze centrifugovány, aby se vyzkoušelo, zda filtrace není příliš silná a bakteriofágy nebudou přítomny jen v malém množství.
- 3) Ve Státním zdravotním ústavu, Šrobárova 49/48, Praha 10, pod vedením RNDr. Kateřiny Kybicové, Ph.D. byly připraveny kultury kmene *Borrelia burgdorferi*.
- 4) Pro účely této práce bylo použito médium označované komerčně jako MKP, protože na základě práce Ružić-Sabljić et al (2017) se jeví jako nejvhodnější médium. Bylo zjištěno, že z 52 borreliových kmenů v médiu MKP a BSK-H byl sice vyšší počet spirochét v kultivačních zkumavkách BSK-H než v MKP, ale v médiu MKP se častěji vyskytovaly krátké a tlusté spirochéty s pravidelnými křivkami a dobrou motilitou (Ružić-Sabljić et al 2017).
- 5) Po třech dnech byla uskutečněna mikroskopická pozorování, aby bylo ověřeno, zda dochází ke zvýšenému hynutí bakterií.
- 6) Kultury borrelií byly centrifugovány, tím byly nebezpečné bakterie usmrceny. Bakteriofágy, které přečkají centrifugaci bez nehody, mohly být dále použity k dalšímu očkování bakteriální kultury, nebo k analýze pomocí PCR.

### **4.3 Izolace DNA**

Po centrifugaci byla uskutečněna izolace DNA pomocí fenol-chloroformu a magnetických kuliček. Fenol chloroform se považuje za klasický způsob izolace DNA. Uvádí se, že je tato izolace velmi časově náročná, ale dokáže poskytnout velké množství čisté DNA. Jako první krok byla zvolena tato izolace, protože s velkou účinností rozbije fágové kapsidy a uvolní nukleové kyseliny.

### 4.3.1 Izolace pomocí magnetických kuliček

V dalším kroku byla DNA izolována metodou magnetických nosičů dle postupu Trojánka (2013). Pro izolaci byly použity následující typy nosičů: F-kol 135 ox P(HEMA-co-GMA) a F-kol B 100 ox P(GMA), které jsou pokryté karboxylovými skupinami.

Tabulka 1: Komponenty použité v separační směsi

Komponenta	Objem(μl)	
5 M NaCl	100	200
Hrubý lyzát buněk	25	50
40% PEG 6000	100	200
Magnetický nosič (2mg/ml)	25	50
Celkem	250	500

Zdroj: vlastní zpracování dle Trojánka 2013

Při izolaci nejdříve došlo ke smíchání všech komponent a poté byla celá směs inkubována při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Po uplynutí 15 minut byly zkumavky vloženy do magnetického separátoru na dalších 5 minut a tím se odseparovaly magnetické nosiče. Magnetické nosiče, na kterých zůstala navázaná DNA, byly promyty 500μl 70% ethanolu. Směs magnetických částic se promíchala spolu s ethanolem a celá směs se na 1 minutu vložila do magnetického separátoru, čímž se vyseparovaly magnetické nosiče. Do zkumavky se odpipetoval supernatant. Dále se magnetické nosiče s navázanou DNA promyly v 200 μl ethanolu a znovu se nechaly odseparovat magnetické nosiče po dobu jedné minuty za použití magnetického separátoru. Supernatant byl opatrně přepipetován ze zkumavky a zbylý ethanol se nechal odpařit. DNA, která byla absorbovaná na magnetických nosičích, byla eluována do 50μl TE pufru při laboratorní teplotě. Po dalších 60 minutách byly odseparovány nosiče za použití magnetického separátoru a eluát obsahující DNA byl odebrán do nové zkumavky (Trojánka 2013).

### 4.4 Primery a PCR reakce

Byla použita dvojice primerů navržená pro identifikaci fágů příbuzných bakteriofágu T7, nazvaných Lav1 (5'-ACHGARGGYGARATHG-3') a Lav 2 (5'-CVCCTTGYTGRTTDC-3'), a odzkoušených v práci Kozelkové (2017). Bakteriofágy patřící do rodiny T7 fágů se vyskytují jako *Enterobacteria phage T7*, *Enterobacteria phage T3*, *Enterobacteria phage K1F*, *Yersinia pestis phage phiA1122*, *Yersinia phage*

*Berlin*, *Yersinia phage phiYeO3-12*, *Vibriophage VP4* a *Pseudomonas phage gh-1* (Lavigne a kol. 2005, Kozelková 2017). Dvojice primerů obsahuje nspecifické báze označované jako degenerované, což umožňuje amplifikaci DNA různých bakteriofágů (Lavigne a kol. 2005).

Pro PCR reakce s těmito primery pro rodinu T7 fágů (Lav 1,2) byly zvoleny stejné reakční podmínky jako u Kozelkové (2017): iniciační denaturace 94 °C, 5 minut, dalších 35 cyklů denaturace 94 °C po dobu 1 minuty, anelační teplota byla 51,1 °C - 0,5 °C na cyklus po dobu 1 minuty, extenze v 72 °C, 2 minuty, a konečná fáze extenze 72 °C po dobu 10 minut (Dwivedi a kol. 2012, Kozelková 2017).

#### **4.5 Agarozový gel**

Produkty PCR reakce byly detekovány na 2% agarozovém gelu (Serva) v TAE pufru (Tris-acetate-EDTA). Byla použita elektroforéza (Consort) při 100 V po dobu 60 minut. Pro stanovení velikosti vlastních PCR produktů byl použit tzv. ladder (marker), připravenými DNA fragmenty o různých velikostech 50-1 350 bp (od firmy New England Biolabs).

#### **4.6 Čištění PCR produktů**

Při čištění PCR bylo použito vyříznutí pruhu z agarozového gelu s příslušnou DNA. Následně byly produkty čištěny na kolonkách kitem na čištění DNA z gelu (firma QIAGEN). DNA byla rozpuštěna a přechovávána v elučním pufru.

#### **4.7 Sekvence**

Sekvenaci prováděly Sekvenační laboratoře Přírodovědecké fakulty Praha - OMICS-genomika, Biocev Sangerovou metodou.

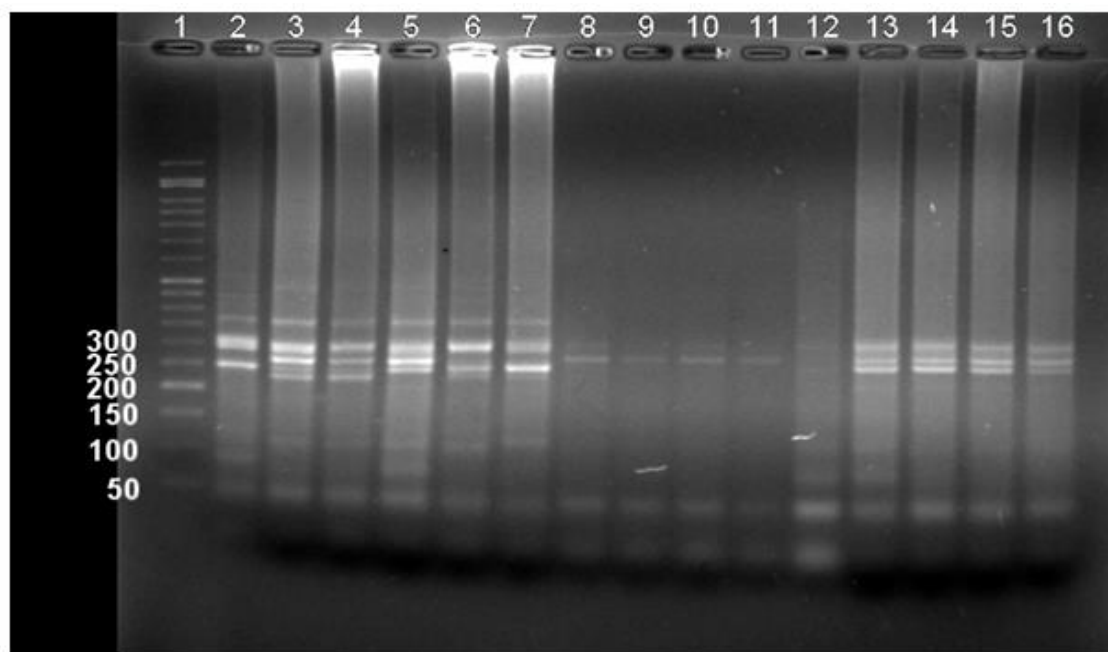
#### **4.8 Vyhodnocení sekvence**

Sekvence byly analyzovány na webových stránkách NCBI (The National Center for Biotechnology) pomocí databáze BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

## 5 Výsledky

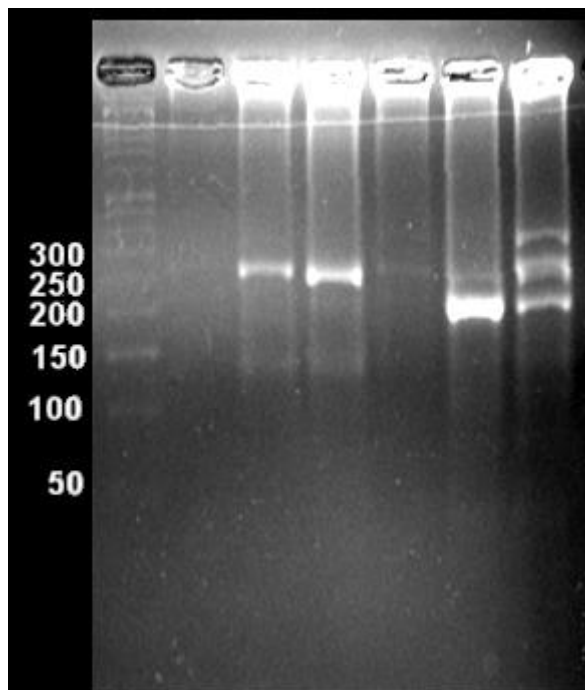
### 5.1 Testování vlivu koktejlu fágů na kultury borrelií

Podářilo se izolovat bakteriofágy a injikovat kultury borrelií. Kultury byly hodnoceny po třech dnech a následně kontrolovány ještě další dva dny. Bohužel u testovaných vzorků nebyl pozorován znatelný úbytek bakterií. Výjimku tvořilo několik kultur, kde nebyla provedena filtrace, ale jen centrifugace, která se ukázala jako nedostatečná a v kulturách se namnožily jiné druhy bakterií, které konkurovaly borreliím o živiny. V kulturách po řádné filtraci s 0,45  $\mu\text{m}$  se kontaminující bakterie neobjevily. Nicméně i tyto kultury byly testovány na přítomnost bakteriofágů, protože v kulturách borrelií, kde byly injikovány, by měly být zachytitelné oproti kontrolním, kde injikovány nebyly, přestože nemusely nutně infikovat samotné borrelie. Byla prokázána poměrně rozsáhlá přítomnost bakteriofágů, s obvykle větším zastoupením z trusu netopýrů, než v případě extraktu z klíšťat (viz obr. 7, obr. 8). V kontrolní kultuře, kde byla izolována pouze DNA z borrelií, bez infikovaných fágů, podle očekávání žádné fágy detekovány nebyly (obr. 8).



Obrázek 7: Agarózový gel s produkty PCR reakce s kulturami *B. burgdorferi* s fágy z trusu netopýrů (*Myotis myotis*, *Plecotus austriacus*) a fágy extrahovanými z klíšťat (*Ixodes ricinus*) Primery LAV 1 ,2

1 ladder, 2-7 jednotlivé kultury z *B. burgdorferi* s fagy z netopýrů po centrifugaci, 8-13 fagy z rozdrcených klíšťat, 14-16 kontrola - jen fagy izolované z netopýřího trusu fagy



Obrázek 8: Agarózový gel s produkty PCR reakce s kulturami *B. burgdorferi* s fagy extrahovanými z klíšťat (*Ixodes ricinus*) Primery LAV 1,2

1 ladder, 2 kontrola *B. burgdorferi* bez přidaných fágů, 3-7 jednotlivé kultury z *B. burgdorferi* s fagy z klíšťat po centrifugaci,

## 5.2 Sekvenování

PCR produkty byly podrobeny sekvenaci, ale většinu produktů nebylo možno sekvenovat, protože se jednalo o směsi DNA z různých fágů. Pro získání kvalitních sekvencí by bylo nutné provést také klonování do plasmidu a kultivace bakterií s vektory, obsahujícími vždy jen jednu kopii DNA.



Obrázek 9: Sekvenogram jednoho z bakteriofágů izolovaných z klíšťat, na spodní části píků je vidět příměs další sekvence

Na obrázku 9 je dokumentována sekvence DNA z částečně úspěšně sekvenovaných fágů. Sekvence byla porovnávaná v databázi BLAST s dalšími dosud známými sekvencemi a byla nalezena částečná shoda s některými bakteriemi, zejména se jednalo o střevní gram pozitivní anaerobní bakterie *Blautia* sp., *Clostridium bolteae*, či *Lachnoclostridium* sp, taktéž izolovaná ze střevního obsahu, ale u člověka, viz obrázek 10. Jako další, nepříliš překvapivé, zjištění této práce lze uvést totožnost některých střevních bakterií u člověka a klíšťat (*Ixodes ricinus*).



[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Blautia sp. N6H1-15 strain KCTC 15426 chromosome, complete genome  
 Sequence ID: [CP030280.1](#) Length: 3297975 Number of Matches: 1

Range 1: 2370846 to 2370959 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
107 bits(118)	2e-19	92/114(81%)	0/114(0%)	Plus/Minus

```

Query 144 TATGCTGAAAGTAGGAGTATTGGTATCTGGAGGAGGAACCAATCTCCAGGCAATTCTGGA 203
Sbjct 2370959 TATGATGAAAATGGCAGTTTTGGTATCCGGAGGCGGAACCAACCTTCAGGCAATTTAGA 2370900

Query 204 TGCCATCGACAATAAAATTATACCAATGCCAGGTGACAGTGGTAATCAGCAA 257
Sbjct 2370899 TGCCATGGACAGCGGAGGATTACCAATGCCAGGTGTCTGTGGTAATCAGCAA 2370846
  
```

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

[Clostridium] bolteae strain ATCC BAA-613, complete genome  
 Sequence ID: [CP022464.2](#) Length: 6570176 Number of Matches: 1

Range 1: 4162635 to 4162791 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
104 bits(115)	2e-18	118/157(75%)	1/157(0%)	Plus/Minus

Features: [phosphoribosylglycinamide formyltransferase](#)  
[phosphoribosylformylglycinamidine cyclase](#)

```

Query 102 TATGTGATTGGCTCTATCGAAGACGGAAAAGA-GGGAATGACCTTATGCTGAAAGTAGGAG 160
Sbjct 4162791 TATGTAGTGGGCTCCATTGAAAAGGAGAGAAAGGGTGTATCCTTATGCTAAGAGTGGCG 4162732

Query 161 TATTGGTATCTGGAGGAGGAACCAATCTCCAGGCAATCTGGATGCCATCGACAATAAAA 220
Sbjct 4162731 TACTGGTATCCGGAGGCGGAACCAATCTTCAGGCAATTTGGACGCCGTGGATCATGGTG 4162672

Query 221 TTATACCAATGCCAGGTGACAGTGGTAATCAGCAA 257
Sbjct 4162671 ATATTACCAATGCAGAGGTATCTGTGGTCATCAGCAA 4162635
  
```

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Lachnoclostridium sp. YL32, complete genome  
 Sequence ID: [CP015399.2](#) Length: 7225339 Number of Matches: 1

Range 1: 6445251 to 6445398 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
102 bits(112)	8e-18	112/148(76%)	1/148(0%)	Plus/Plus

```

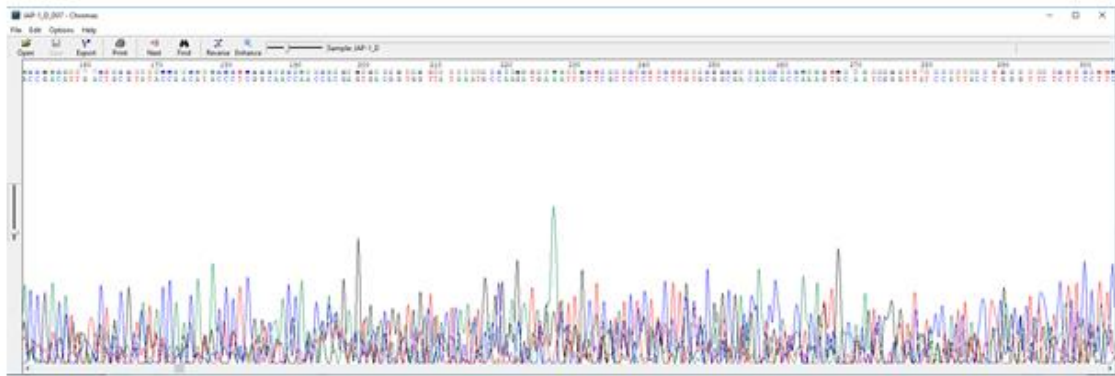
Query 111 GGCTCTATCGAAGACGGAAAAGA-GGGAATGACCTTATGCTGAAAGTAGGAGTATTGGTAT 169
Sbjct 6445251 GGCTCCATTGAAGAAGGAGAGAAAGGGTGTCTTATGCTAAGAGTAGGCGTACTGGTAT 6445310

Query 170 CTGGAGGAGGAACCAATCTCCAGGCAATCTGGATGCCATCGACAATAAAATTATACCA 229
Sbjct 6445311 CCGGCGGCGGAACCAATCTCCAGGCTATTTGGACGCCGTGGATCATGGTGATATTACCA 6445370

Query 230 ATGCCAGGTGACAGTGGTAATCAGCAA 257
Sbjct 6445371 ATGCAGAGGTATCCGTTGTCATCAGTAA 6445398
  
```

Obrázek 10: Zde je možno vidět sekvenční shody s některými už sekvenovanými bakteriemi, avšak s žádným fágem.

Nemožnost sekvenace směsi DNA různých fágů je demostrována na obrázku 11, kde je zřetelně vidět směs sekvencí.



Obrázek 11: Sekvenogram většiny sekvenovaných DNA bakteriofágových sekvencí prokazuje směs sekvencí různého původu

## 6 Diskuse

Hlavní cíl práce, nalézt fága či fágy, schopné lyzovat některé spirochéty, zejména některé druhy borrelií, se nepodařil. Zpětně se může jevit cíl jako příliš ambiciózní, ale podle zatím dosažených dílčích výsledků se jeví jako reálný. Podařilo se najít značné množství fágů. Jestliže mezi nimi nebyl žádný schopný lyzovat borreliie, pak příčina byla nejspíše v nedostatečně infikovaném materiálu. Pro další zkoumání by bylo vhodné provést sběr klíšťat v podzimním období, kdy je vyšší šance nasbírat dostatečné množství vzorků a klíšťata jsou více infikovaná borreliemi, anaplasмами a podobně. Dále by bylo vhodné zaměřit se na lokality, kde je prokázán vysoký výskyt klíšťat infikovaných borreliemi. U netopýrů by pak bylo vhodné v dalším výzkumu zajistit větší množství materiálu z více lokalit.

Jak plyne z výsledků prezentovaných na obrázcích 9 a 10, podařilo se jako vedlejší výstup identifikovat bakteriofága, který zřejmě existuje ve formě profága v mnohých střevních bakteriích lidí i klíšťat. Existence začleněných profágů vykazujících homologii s volnými fágy naznačuje, že tyto fágy by mohly být aktivovány a spustit lyzi těchto bakterií. Je velmi zvláštní, že člověk i klíšťata mají velmi podobné bakterie v trávicí soustavě, jinak by asi nebyly napadány stejnými fágy. Bohužel nebyl nalezen žádný zdroj, kde by bylo možné ověřit, či zjistit souvislosti, studium nepatogenních bakterií u klíšťat (*Ixodes ricinus*), není zřejmě zatím příliš rozsáhlé. Dle domněnky autora se může jednat o souvislost parazitismu klíšťat na savcích, ale také to žádnou souvislost mít nemusí.

V některých orgánech u klíšťat již byly nalezeny různé druhy bakterií, jako jsou *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia spielmanii*, *Borrelia afzelii* a *Borrelia garini*. Dále zde byly

nalezeny i bakterie *Anaplasma phagocytophilum* a *Rickettsia helvetica*, které byly jedny z nejběžnějších nalezených, a mnohé další (Lejal et al 2019).

Pro poznání funkce střevních bakterií je užitečná znalost jejich parazitů, kteří s nimi koexistují a současnou vědou nebyli zatím identifikováni. Je naděje, že se podaří nalézt fagy i pro borreliie, které jsou také součástí stejných vnitřních ekosystémů jako bakterie sdílející střeva lidí i klíšťat. Je možno shrnout, že podle očekávání se potvrdilo, že trus různých druhů netopýrů obsahu velké množství fágů a řadu fágů u sebe nesou i populace klíšťat (*Ixodes ricinus*).

Podle produktů PCR se jednotlivé kultury lišily v počtu a zastoupení fágů, mezi jednotlivými vzorky z původně netopýřího trusu jsou rozdíly v počtu a intenzitě namnožených fragmentů DNA. Tyto fragmenty byly namnoženy z kultur s borreliemi (obr. 7, pozice 2-7), ale je s podivem, že kontrolní vzorky z původních vzorků z trusu, které nebyly společně s borreliemi, vykazují menší variabilitu a jsou prakticky jednotné (obr. 7, pozice 22-16). Lze samozřejmě uvažovat i o určité formě parazitismu na samotných borreliích, avšak jejich úbytek oproti kontrole pozorovatelný nebyl. Stejně tak vzorky z klíšťat vypadají velmi shodně, nepodařilo se najít rozdíly jako v práci Kozelkové (2017). Naproti tomu namnožené fragmenty z kultur borrelií opět variabilitu vykazují (obr. 7 a 8). Tento zvláštní jev je možná náhodně dán nepříliš velkým počtem vzorků, ale zasloužil by si další experimenty.

Důkaz existence DNA bakteriofágů v kulturách společně s *B. burgdorferi*, a neexistence bakteriofágů v čisté kultuře *B. burgdorferi* (viz obrázek 8) potvrzuje, že metodika je funkční. Způsob získávání fágů je vhodný a je zřejmé, že fagy přežívají v kulturách *B. burgdorferi*, i v tekutém médiu, ve kterém jsou *B. burgdorferi* pěstovány, přestože se jednalo o fagy, které nenapadají přímo *B. burgdorferi*.

Sekvenování nalezených fágů bylo obtížné, protože se obvykle podařilo namnožit stejně dlouhé sekvence různých druhů fágů. Bylo by možné zaklonovat tyto PCR produkty do plasmidů a znovu je namnožit v recipientních bakteriích, protože do každého plasmidu se včlení pouze jedna kopie DNA. Tím by bylo možné získat nesmíchané DNA bakteriofágů pro sekvenaci. Z časových a zejména finančních důvodů ale nebyly tyto analýzy uskutečněny. Cílem práce také nebylo detekovat fágové parazity střevních bakterií, ale najít účinného likvidátora nebezpečných spirochét.

Protože podle všeho nebyl v nalezených fázích ani jeden schopný lyzovat bakterie *B. burgdorferi*, je proto nutné rozšířit sběr materiálu na lokality s větší pravděpodobností výskytu nakažených jedinců. Po konzultacích s RNDr. Kateřinou Kybicovou, Ph.D., (Kybicová osobní sdělení), byla vytipována lokalita v Prokopském údolí u Prahy, kde je podle dlouhodobých odběrů silné zastoupení klíšťat (*Ixodes ricinus*), přenášejících různé druhy borrelií. Po odběrech je nutno nyní již vyzkoušenou metodu opakovat se slibnějším materiálem.

## **Závěr**

Výsledkem této práce je další příspěvek ke studiu bakteriofágů. Poprvé byly bakteriofágy aplikovány do tekutého média, které vyžadují laboratorní kultury borrelií. Vytvořená a prakticky odzkoušená metodika se ukázala jako zcela použitelná, i když se fága lyzujícího borrelie zatím najít nepodařilo. Samotné studium problematiky bakteriofágů je důležité z vědeckého i praktického hlediska. Nabízí potenciál pro tvorbu efektivnějších léků v boji s mnoha bakteriálními infekcemi, na které ve vyšších stádiích nezabírají samotná antibiotika, protože se u nich vyvinula rezistence. Na tuto práci by proto měla navazovat další s větším záběrem možných hostitelů spirochét, kde se dají očekávat jejich viroví parazité. I získání mírně lyzujících fágů by bylo úspěchem, protože je možné jejich lyzační schopnosti různými technikami zvyšovat. V současné době přináší výzkum i dílčí výsledky, jako například rozpoznání parazitů střevních bakterií.

## Resumé

This thesis results in another contribution to the study of bacteriophages. A methodology, which has proven to be fully applicable, has been created and practically tested. For the first time, bacteriophages were applied to liquid media, which is required by borrelia laboratory cultures, and the bacteriophages were collected and examined. Although the main goal hasn't been achieved and borrelia lysing phages haven't been identified yet, the proof of the existence of bacteriophage DNA in cultures together with *B. burgdorferi*, and the absence of bacteriophages in pure B culture (see Figure 8), prove that this methodology is functional. The method of obtaining phages is appropriate, and it is clear that phages survive in *B. burgdorferi* cultures, even in liquid media in which *B. burgdorferi* is grown, although the phages used in the experiment don't directly attack *B. burgdorferi*. The study of bacteriophages is important from both scientific and practical point of view. It offers the potential to create more effective medicines to combat many bacterial infections that aren't cured by antibiotics alone in their higher stages because they have developed some resistance.

## Seznam použité literatury

### Knižní zdroje

ANDĚRA, Miloš. *Encyklopedie naší přírody I. - Fauna*. Praha: Libri, 2003. 368 s. ISBN 80-7277-162-0.

AULAGNIER, Stéphane, A. J. MITCHELL-JONES, P. HAFFNER et al. *Savci Evropy, severní Afriky a Blízkého východu: s popisem všech známých druhů*, Plzeň: Ševčík, 2018. 272 s. ISBN 978-80-7291-250-6.

BARTŮŇEK, Petr. *Lymeská borelióza*. 3., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1543-0.

BARTŮŇEK, Petr. *Lymeská borelióza*. 4., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2013a. 168 s. ISBN 978-80-247-4355-4.

BEAUDOIN, Rene N., Danielle R. DECESARO, Debrah L. DURKEE et al. Isolation of a Bacteriophage From Sewage Sludge and Characterization of Its Bacterial Host Cell. *Rivier Academic Journal*. 2007, 3(1). ISSN 1559-9388.

GAISLER, Jiří a Jan ZIMA. *Zoologie obratlovců*. 3., přepracované vydání. Praha: Academia, 2018. 696 s. ISBN 978-80-200-2702-3.

KOZELKOVÁ, Tereza. Screening a identifikace bakteriofágů v lokálních populacích hlodavců. Plzeň, 2017. 46 s. Bakalářská práce. Západočeská univerzita v Plzni. Fakulta pedagogická.

KUTTER, Elizabeth, Alexander SULAKVELIDZE. *Bacteriophages: Biology and Applications*. CRC Press: Boca Raton, 2004. 528 s. ISBN 978-02-0349-175-1.

MC GRATH, Stephen a Douwe van SINDEREN. *Bacteriophage: genetics and molecular biology*. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2007. 344 s. ISBN 978-1-904455-14-1.

TROJÁNEK, Zdeněk. Izolace DNA z rostlinných tkání pro použití v polymerázové řetězové reakci. Brno, 2013. 84 s. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta chemická.

VOLF, Petr a Petr HORÁK. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton, 2007. 318 s. ISBN 978-80-7387-008-9.

## Elektronické zdroje

BABB K, T. BYKOWSKI, S. P. RILEY, M. C. MILLER, E. DEMOLL, B. STEVENSON. *Borrelia burgdorferi* EbfC, a novel, chromosomally encoded protein, binds specific DNA sequences adjacent to erp loci on the spirochete's resident cp32 prophages. *JBacteriol.* 2006, 188, 4331-4339. DOI: 10.1128/JB.00005-06.

BASRA S., H. Anany, L. Brovko, A. M. Kropinski, M. W. Griffiths. Isolation and characterization of a novel bacteriophage against *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Arch Virol.* 2014, 159(10), 2659-2674. DOI: 10.1007/s00705-014-2122-3.

BETTS A, M. VASSE, O. KALTZ, M. E. HOCHBERG. Back to the future: evolving bacteriophages to increase their effectiveness against the pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Evol Appl.* 2013, 6, 1054-1063. DOI: 10.1111/eva.12085.

BURNS, Logan H., Claire A. ADAMS, Sean P. RILEY et al. BpaB, a novel protein encoded by the Lyme disease spirochete's cp32 prophages, binds to erp Operator 2 DNA. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(16), 5443–5455. DOI:10.1093/nar/gkq284

BURRI, C., O. SCHUMANN, C. SCHUMANN, L. GERN. Are Apodemus spp. mice and *Myodes glareolus* reservoirs for *Borrelia miyamotoi*, *Candidatus*, *Neoehrlichia mikurensis*, *Rickettsia helvetica*, *R. monacensis* and *Anaplasma phagocytophilum*? *Ticks Tick Borne Dis.* 2014, 5(3), 245-251. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2013.11.007

CHANISHVILI N. Phage therapy-history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Adv Virus Res.* 2012, 83, 3-40. DOI: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3.

CHAUDHRY W. N., I. U. HAQ, S. ANDLEEB, I. QADRI. Characterization of a virulent bacteriophage LK1 specific for *Citrobacter freundii* isolated from sewage water. *J Basic Microbiol.* 2014, 54(6), 531-541. DOI: 10.1002/jobm.201200710

DRILLING A, S. MORALES, C. JARDELEZA, S. VREUGDE S, P. SPECK, P. J. WORMALD. Bacteriophage reduces biofilm of *Staphylococcus aureus* ex vivo isolates from chronic rhinosinusitis patients. *Am J Rhinol Allergy.* 2014, 28, 3-11. DOI: 10.2500/ajra.2014.28.4001.



HALPERIN J. J. Nervous system lyme disease: is there a controversy? *Semin Neurol.* 2011, 31(3), 317-324. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1287652>.

HARWOOD V. J., A. B. BOEHM, L. M. SASSOUBRE, K. VIJAYAVEL, J. R. STEWART, T. T. FONG, M. P. CAPRAIS, R. R. CONVERSE, D. DISTON, J. EBDON, J. A. FUHRMAN, M. GOURMELON, J. GENTRY-SHIELDS, J. F. GRIFFITH, D. R. KASHIAN, R. T. NOBLE, H. TAYLOR, M. WICKI. Performance of viruses and bacteriophages for fecal source determination in a multi-laboratory, comparative study. *Water Res.* 2013, 47(18), 6929-6943. DOI: [10.1016/j.watres.2013.04.064](https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.064).

HORNOK, Sándor, Jenő KONTSCHÁN, Dávid KOVÁTS et al. Bat ticks revisited: *Ixodes ariadnae* sp. nov. and allopatric genotypes of *I. vespertilionis* in caves of Hungary. *Parasites & Vectors*, 2014, 7, 202. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-202>

KUTATELADZE, M., R. ADAMIA. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 2010, 28(12), 591–595. DOI: [10.1016/j.tibtech.2010.08.001](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.08.001)

LEJAL, Emilie, S. MOUTAILLER, L. ŠIMO, M. VAYSSIER-TAUSSAT a T. POLLET. Tick-borne pathogen detection in midgut and salivary glands of adult *Ixodes ricinus*. *Parasites & Vectors*, 2019, 12, 152. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3418-7>

LUSIAK-SZELACHOWSKA M., M. ZACZEK, B. WEBER-DĄBROWSKA, R. MIĘDZYBRODZKI, M. KŁAK, W. FORTUNA, S. LETKIEWICZ, P. ROGÓŻ, K. SZUFNAROWSKI, E. JOŃCZYK-MATYSIAK, B. OWCZAREK, A. GÓRSKI. Phage Neutralization by Sera of Patients Receiving Phage Therapy. *Viral Immunol.* 2014, 3. DOI: [10.1089/vim.2013.0128](https://doi.org/10.1089/vim.2013.0128)

MARGOS G., S. A. VOLLMER, H. NICHOLAS, N. H. OGDEN, D. FISH. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Infection, Genetics and Evolution*, 2011, 11(7), 1545–1563. DOI: [10.1016/j.meegid.2011.07.022](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.022)

MAURA, D., L. DEBARBIEUX. Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 90(3), 851-859. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3227-1>

MENDES JJ, C. LEANDRO, C. MOTTOLA, R. BARBOSA, F. A. SILVA, M. OLIVEIRA, C. L. VILELA, J. MELO-CRISTINO, A. GÓRSKI, M. PIMENTEL, C. SÃO-JOSÉ, P. CAVACO-SILVA, M. GARCIA. In vitro design of a novel lytic bacteriophage

cocktail with therapeutic potential against organisms causing diabetic foot infections. *J Med Microbiol.* 2014, 63(8), 1055-1065. DOI: 10.1099/jmm.0.071753-0.

MIEDZYBRODZKI R, W. FORTUNA, B. WEBER-DABROWSKA, A. GÓRSKI. Phage therapy of staphylococcal infections (including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment. *Postepy Hig Med Dosw.* 2007, 3(61), 461-465. ISSN 1732-2693.

MITCHELL H. L., S. G. DASHPER, D. V. CATMULL, R. A. PAOLINI, S. M. CLEAL, N. SLAKESKI, K. H. TAN, E. C. REYNOLDS. *Treponema denticola* biofilm-induced expression of a bacteriophage, toxin-antitoxin systems and transposases. *Microbiology.* 2010, 156, 774-88. DOI: 10.1099/mic.0.033654-0.

MODI Sheetal R., H. H. LEE, C. S. SPINA, J. J. COLLINS. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature.* 2013, 11, 499(7457), 219-222. DOI: 10.1038/nature12212.

MORGAN, G. J., W. B. PITTS. Evolution without species: The case of mosaic bacteriophages. *The British Journal for the Philosophy of Science,* 2008, 59(4), 745-765. DOI: 10.1093/bjps/axn038

MUNIESA M, F. LUCENA, A. R. BLANCH, A. PAYÁN, J. JOFRE. Use of abundance ratios of somatic coliphages and bacteriophages of *Bacteroides thetaiotaomicron* GA17 for microbial source identification. *Water Res.* 2012, 46(19), 6410-8. DOI: 10.1016/j.watres.2012.09.015.

REISINGER E, I. WENDELIN, R. GASSER, G. HALWACHS, M. WILDERS-TRUSCHNIG, G. KREJS. Antibiotics and increased temperature against *Borrelia burgdorferi* in vitro. *Scand J Infect Dis.* 1996, 28:155-7

RUŽIĆ-SABLJIĆ E., V. MARASPIN, D. STUPICA, T. ROJKO, P. BOGOVIČ, et al. Comparison of MKP and BSK-H media for the cultivation and isolation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *PLOS ONE.* 2017, 12(2), e0171622. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171622>

SAPI E, S. L. BASTIAN, S. M. MPOY, S. SCOTT, A. RATTELLE, N. PABBATI, A. PORURI, D. BURUGU, P. A. THEOPHILUS, T. V. PHAM, A. DATAR, N. K. DHALIWAL, A. MACDONALD, M. J. ROSSI, S. K. SINHA, D. F. LUECKE. Characterization of biofilm formation by *Borrelia burgdorferi* in vitro. *PLoS One.* 2012, 7(10), e48277. DOI: 10.1371/journal.pone.0048277.

SHARP, Richard. Bacteriophages: biology and history. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2001, 76(7), 667-672. DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.434>

ŚLIWA-DOMINIAK J, E. SUSZYŃSKA, M. PAWLIKOWSKA, W. DEPTUŁA. Chlamydia bacteriophages. *Arch Microbiol*. 2013, 195(10-11), 765-71. DOI: 10.1007/s00203-013-0912-8.

STANEK, Gerold, G. WORMSER, J. GRAY, F. STRLE. Lyme borreliosis. *The Lancet*, 2012, 379(9814), 461-473. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60103-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60103-7)

TIWARI, R., K. DHAMA, A. KUMAR, A. RAHAL a S. KAPOOR. Bacteriophage therapy for safeguarding animal and human health: a review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2014, 17(3), 301-315. DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24897784>

WEBER-DABROWSKA B., M. ZIMECKI, M. MULCZYK, A. GÓRSKI. Effect of phage therapy on the turnover and function of peripheral neutrophils. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002, 11;34(2), 135-8. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2002.tb00614.x

## Webové stránky

ČESON: ČESON - Česká společnost pro ochranu netopýrů. *Ceson.org* [online]. 2019 [cit. 2019-03-26]. Dostupné z: [www.ceson.org/](http://www.ceson.org/)

LabGuide.cz: Metody. PCR. *Labguide.cz* [online]. 2019 [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/pcr/>

Mapy.cz. *Mapy.cz* [online]. 2017 [cit. 2019-04-17]. Dostupné z: <https://mapy.cz/zakladni?x=14.4476995&y=50.0760994&z=11>

Phage Therapy Center<sup>TM</sup>: Phage Therapy: Chronic Lyme Disease. *Phagetherapycenter.com* [online]. 2019 [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: [https://www.phagetherapycenter.com/pii/PatientServlet?command=static\\_lyme](https://www.phagetherapycenter.com/pii/PatientServlet?command=static_lyme)

Státní zdravotní ústav: Aktuality. Netopýři jako zdroj nebezpečných infekcí. *Szu.cz* [online]. 2019a [cit. 2019-04-01]. Dostupné z: [http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy\\_EM/22\\_2013/06\\_cerven/195\\_netopyri.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/22_2013/06_cerven/195_netopyri.pdf)

Státní zdravotní ústav: Lymeská borrelióza – epidemiologická data za rok 2014. *Szu.cz* [online]. 2019b [cit. 2019-04-04]. Dostupné z: [http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Lymeska\\_borrelioza/Lymeska\\_borelioza\\_CR\\_data\\_do\\_roku\\_2014.pdf](http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Lymeska_borrelioza/Lymeska_borelioza_CR_data_do_roku_2014.pdf)

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Vývoj počtu nahlášených onemocnění lymfskou boreliózou mezi lety 1986 a 2011 .....	15
Obrázek 2: Různé formy rostoucích borrelií zjištěné metodou ISEM v krvi, mozkomíšním moku a synoviální tekutině.....	16
Obrázek 3: Efektivita použití fágové terapie proti sepsi, plicní infekci, osteomyelitidě a artritidě .....	20
Obrázek 4: Řetězení molekul .....	24
Obrázek 5: I. lokalita sběru klíšťat Přestavlky .....	25
Obrázek 6: II. lokalita sběru klíšťat - Chotíkov.....	25
Obrázek 7: Agarózový gel s produkty PCR reakce s kulturami <i>B. burgdorferi</i> s fágy z trusu netopýrů ( <i>Myotis myotis</i> , <i>Plecotus austriacus</i> ) a fágy extrahovanými z klíšťat ( <i>Ixodes ricinus</i> ) Primery LAV 1 ,2 .....	30
Obrázek 8: Agarózový gel s produkty PCR reakce s kulturami <i>B. burgdorferi</i> s fágy extrahovanými z klíšťat ( <i>Ixodes ricinus</i> ) Primery LAV 1 ,2 .....	31
Obrázek 9: Sekvenogram jednoho z bakteriofágů izolovaných z klíšťat, na spodní části píků je vidět příměs další sekvence .....	32
Obrázek 10: Zde je možno vidět sekvenační shody s některými už sekvenovanými bakteriemi, avšak s žádným fágem. ....	33
Obrázek 11: Sekvenogram většiny sekvenovaných DNA bakteriofágových sekvencí prokazuje směs sekvencí různého původu .....	34

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Komponenty použité v separační směsi .....	28
---	----