

## CERTIFIKOVANÁ METODA

### **Detekce spirochét *Borrelia miyamotoi* v environmentálních vzorcích**

Metodika byla vypracována, jako výstup výzkumného projektu QK1920258 „Šíření klíšťat a klíšťaty přenášených onemocnění: nová a opomíjená rizika pro domácí a hospodářská zvířata a člověka“ v rámci Programu aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství za období 2017-2025, ZEMĚ.

#### Autoři:

MSc. Natalie Rudenko, PhD.

MSc. Maryna Golovchenko

Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.

#### Oponenti:

RNDr. Helena Langhansová, Ph.D., Přírodovědecká fakulta JU, České Budějovice

Mgr. Adam Norek, PhD., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

MVDr. Vladimír Brychta, Ministerstvo zemědělství, Praha

České Budějovice, říjen, 2020

## Obsah

Úvod .....	3
Hlavní cíl .....	4
Popis metodiky .....	4
Navrhovaná jednokroková PCR.....	6
Prokázání zbytečnosti dvoukrokové PCR .....	7
Detekce <i>Borrelia miyamotoi</i> v „spike“ vzorcích za pomoci dvoukrokové PCR.....	7
Detekce <i>Borrelia miyamotoi</i> dvoukrokovou ve vzorcích s čistou DNA. ....	8
Závěr .....	9
Doporučení.....	10
Srovnání novosti metodiky.....	10
Popis uplatnění metodiky.....	11
Ekonomické aspekty.....	11
Seznam použité literatury .....	12
Seznam publikací, které předcházely metodice .....	13
Jména oponentů a názvy jejich organizací .....	13
Dedikace.....	13

## Úvod

Nemoc *Borrelia miyamotoi* (BMD - *Borrelia miyamotoi* disease) je nově objevená a globálně rozšířená borelióza způsobená spirochétou *Borrelia miyamotoi*, která byla poprvé izolována v Japonsku v roce 1994 (Fukunaga et al., 1995). Spirochéta *B. miyamotoi* byla původně považována za symbiotickou bakterii klíšťat bez dopadů na veřejné zdraví. Nyní je stále více uznávána jako původce nemoci s nespecifickými projevy (horečkou), která je často chybně diagnostikována jako akutní lymská borelióza bez vyrážky nebo jako ehrlichioza. Mezi další spirochétové onemocnění s podobnými projevy patří návratná horečka, jejichž původci jsou také přenášeni na člověka klíšťaty. Schopnost *B. miyamotoi* vyvolat onemocnění u člověka byla zaznamenána v roce 2011, kdy Platonov a jeho kolegové popsali řadu případů infekce *B. miyamotoi* v Rusku (Platonow et al., 2011). Přítomnost *B. miyamotoi* byla potvrzena v Kanadě, na východním a západním pobřeží Spojených států, dále v mnoha evropských zemích (včetně České republiky, Dánska, Estonska, Francie, Německa, Nizozemska, Norska, Polska, Rumunska, Slovenska, Švédska a Švýcarska), v Rusku a Japonsku (Crowder et al., 2014). *B. miyamotoi* byla nalezena u všech druhů klíšťat *Ixodes* v Eurasii a Severní Americe. V Rusku byla spirochéta detekována až u 16% klíšťat *Ixodes persulcatus* a téměř ve stejném množství také u klíštěte obecného *I. ricinus* v západní Evropě a *I. scapularis* ve Spojených státech. *B. miyamotoi* je schopna transovariálního a transstadiálního přenosu v klíšťatech a koexistuje v přírodě se spirochétami lymské boreliózy (Barbour et al., 2009). Rezervoároví hostitelé *B. miyamotoi* jsou určité druhy ptáků a hlodavců podobně jako u jiných druhů borelií. Kompetentními rezervoáry *B. miyamotoi* jsou různé druhy obratlovců včetně myší (*Apodemus* spp. a *Peromyscus* spp.), hrabošů (*Microtus* spp., *Myodes glareolus* a *Microtus arvalis*), čipmanků (*Tamias* sp.), veverek (*Sciuridae* spp.), ježků evropských (*Erinaceus europaeus*) a mývalů (*Procyon* spp.). *B. miyamotoi* byla zjištěna u kosů (*Turdus merula*), sýkory koňadry (*Parus major*), budníčka menšího (*Phylloscopus collybita*), drozdů zpěvných (*Turdus philomelos*), červenky obecné (*Erithacus rubecula*) a zvonka zeleného (*Chloris chloris*). Další druhy ptáků mohou také sloužit jako rezervoároví hostitelé. Spirochéty *B. miyamotoi* byly nalezeny také u větších obratlovců, např. divokých prasat nebo jelenů (Barbour et al., 2009, Cutler et al., 2019, Heglasova et al., 2020, Cosson et al., 2014, Krause et al., 2015, Majerova et al., 2020, Wodecka et al., 2016, Han et al. 2016).

Existují důkazy, že *B. miyamotoi* představuje komplex více druhů nebo genotypů. Měla by být tedy označována jako *B. miyamotoi* sensu lato stejně jako je tomu u *B. burgdorferi* sensu lato (Barbour 2014). Z fylogenetických analýz typických genů jsou zřejmé tři geograficky oddělené subtypy/genotypy *B. miyamotoi*: asijský, evropský a americký. *B. burgdorferi* s.l. a *B. miyamotoi* mají shodné hostitele z řad obratlovců a stejné členovce jako vektory. Klíšťata slouží jako přenašeči pro oba druhy spirochét, ale pro *B.*

*miyamotoi* jsou navíc i rezervoárem (Cutler et al., 2019). Na rozdíl od *B. burgdorferi* s.l., u níž méně než polovina známých druhů způsobuje u lidí onemocnění lymfskou boreliózu, všechny tři dosud známé subtypy *B. miyamotoi* jsou u lidí spojeny s klinickými projevy. Spirochety *B. miyamotoi* jsou spirochetám z komplexu *B. burgdorferi* s.l. vzdáleně příbuzné. Přestože byly prokázány určité rozdíly ve struktuře genomu jak v klastru ribozomálních genů, tak i v genech kódujících dominantní imunitní proteiny, významná míra homologie byla zjištěna v genech, které se běžně používají pro molekulární detekci u obou druhů spirochet (tj. *B. burgdorferi* s.l. i *B. miyamotoi*). Jde například o geny *p66*, *16S rRNA*, *5S-23S IGR* a *16S-23S rRNA* (Krause et al., 2015). Vzhledem k běžné koexistenci a ko-infekci obou skupin spirochet u klíšťat a hostitelů je na místě zlepšení detekčních technik a vývoj nových metod, které sníží možnost falešných výsledků způsobených podobnostmi genomů obou druhů spirochet, které v přírodě existují společně. Další ekologické a medicínské studie jsou klíčem k lepšímu porozumění epidemiologického stavu a lepší diagnostice spirochetálních infekcí.

## Hlavní cíl

Hlavním cílem je zavedení citlivé a specifické metody založené na PCR poskytující spolehlivou detekci spirochet *Borrelia miyamotoi* ve vzorcích získaných v terénu i v případě přítomnosti *B. burgdorferi* s.l., či za přítomnosti možných inhibitorů PCR reakce, nebo významného přebytku necílové DNA (celková DNA hostitele). Pro zvýšení specifity molekulární detekce *B. miyamotoi* byla navržena metoda zaměřená na gen kódující glycerophosphodiester phosphodiesterase (*glpQ*), který je přítomen v genomu spirochet *B. miyamotoi*, ale chybí ve spirochetách komplexu *B. burgdorferi* s.l.

## Popis metodiky

Navrhovaná laboratorní metoda zahrnuje společný jednotný protokol purifikace celkové DNA z tekutých vzorků (sérum, plazma), ale i z pevných vzorků (celá klíšťata nebo zvířecí tkáň). Porovnání dostupných komerčních kitů vedlo k výběru kitu DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Německo) jako nejlepších z hlediska kvality a množství purifikované DNA. Genom *B. miyamotoi* je charakterizován lineárním chromozomem o velikosti  $\geq 900$  kb a sadou lineárních a kruhových plazmidů různých velikostí. Použití kitu DNeasy Blood and Tissue zajišťuje izolaci všech součástí genomu spirochet, které jsou významné pro jejich následnou detekci.

Metoda zahrnuje amplifikaci unikátního genu kódujícího glycerofosfodiester fosfodiesterázu (*glpQ*) umístěného na chromozomu původců návratné horečky *B. miyamotoi*. Optimalizované podmínky nám umožnily získat spolehlivé výsledky při

sníženém počtu PCR cyklů, a to i bez běžně používaných dvou krokových PCR (spacer a nested). Náš protokol poskytuje specifickou, citlivou a spolehlivou techniku detekce *B. miyamotoi*, a to jedнокrokovou PCR fragmentu *gIpQ* genu za podmínek námi optimalizovaných. HotStarTaq Plus Master Mix (Qiagen, Německo) byl použit pro amplifikaci dle protokolu od výrobce. HotStarTaq Plus Master Mix je hotová směs DNA polymerázy HotStarTaq Plus, QIAGEN PCR pufru, MgCl<sub>2</sub> a dNTP. Pipetování je omezeno na minimum, což snižuje možnost chyb a kontaminace a zároveň zajišťuje zvýšenou rychlost, reprodukovatelnost a jednoduchost celé reakce. Reakci lze snadno a rychle provést i při pokojové teplotě za využití master-mix směsi, kdy se do každé zkumavky PCR přidá 10 µl master-mix směsi HotStarTaq Plus a následně se přidá 10 µl primerů a templátové DNA zředěné ve vodě bez RNázy (tato voda je dodávána spolu se soupravou).

## Příprava celkové DNA ze vzorků životního prostředí

### 1. Vzorky

#### a) Klíšťata, biopsie kůže

Krátce (1 minutu) promyjte vzorky ve zředěném dezinfekčním prostředku SAVO (1:10), opláchněte po dobu 1 minuty v destilované vodě, poté opláchněte po dobu 2 minut v 50% lihu. Vzorky krátce osušte a vložte do 1,5 ml mikrozkuavky typu Eppendorf. Vzorek nakrájejte sterilním skalpelem na malé kousky (2-3 mm) a přidejte 180 µl ATL pufru a 20 µl roztoku proteinázy K. Krátce vortexujte a inkubujte při 56 °C přes noc.

#### b) Měkké tkáně (močový měchýř, srdce, slezina, klouby, játra, mozek)

V případě, že na vzorcích jsou zbytky krve, opláchněte je po dobu 2-3 minut v 10-15-ti násobném objemu PBS, krátce osušte poklepáním na filtrační papír a přeneste do 1,5 ml mikrozkuavky Eppendorf. Nařežte vzorek sterilním skalpelem na malé kousky (2-3 mm) a přidejte 180 µl ATL pufru a 20 µl roztoku proteinázy K. Krátce vortexujte a inkubujte při 56 °C přes noc

#### c) Tekuté vzorky (sérum, plazma, CSF)

Doplňte objem tekutého vzorku na 200 µl pomocí PBS a přidejte 20 µl roztoku proteinázy K; inkubujte při 56 °C po dobu 1 hodiny.

2. Přidejte 200 µl AL pufru do vzorků vortexujte po dobu 15 sekund.

3. Přidejte 200 µl 100% etanolu a ihned krátce vortexujte. Vzorek přeneste do DNeasy spin kolonky umístěné do čisté 2 ml odběrové zkumavky. Centrifugujte po dobu 1 minuty při 8000 ot / min

4. Vložte DNeasy spin kolonku do čerstvé sběrné zkumavky a přidejte do ní 500 µl pufru AW1. Centrifugujte po dobu 1 minuty při 8000 ot / min.

5. Opakujte promývací krok s pufrém AW2. DNeasy spin kolonka se centrifuguje 3 minuty při 14 000 ot / min. Zlikvidujte odstředěnou kapalinu a opakujte centrifugaci po dobu 15 sekund. DNeasy spin kolonku přeneste do čisté 1,5 ml zkumavky Eppendorf.

6. Vymyjte DNA přidáním 30-40 µl dd H<sub>2</sub>O do středu membrány a inkubujte při pokojové teplotě po dobu 1 minuty. DNeasy spin kolonky odstředějte po dobu 1 minuty při 8 000 ot / min.

\* Krok 6 lze opakovat, aby se zvýšil výtěžek DNA.

Purifikovaná DNA se skladuje při + 4 °C. Pro delší skladování mohou být vzorky zmrazeny na -20 °C.

## Navrhovaná jednokroková PCR

PCR reakce (20 µl):

10 µl HotStarTaq Plus Master Mix

1 µl Bmiy F primer (10µM)

1 µl Bmiy R primer (10µM)

3 µl DNA ze vzorku

5 µl ddH<sub>2</sub>O

PCR primery:

Bmiy F-5'- CACCATTGATCATAGCTCACAG-3'

Bmiy R- 5'-CTGTTGGTGCTTCATTCCAGTC-3'

PCR produkt: 633 bp

Podmínky PCR:

- 1) počáteční denaturace 95°C - 5 minut
- 2) 35 cyklů [denaturace 95°C po dobu 30 s; nasedání primerů 48°C po dobu 30 s; elongace 72°C po dobu 40 s]
- 3) závěrečná elongace 72 °C po dobu 10 minut
- 4) následuje uchování DNA při teplotě + 4 °C na dobu neurčitou.

Finální PCR produkty se analyzují gelovou elektroforézou s použitím 1.2% agarózy /1xTEA.

## Prokázání zbytečnosti dvoukrokové PCR

### Detekce *Borrelia miyamotoi* v „spike” vzorcích za pomoci dvoukrokové PCR

„Spike” vzorky byly připraveny přidáním necílové DNA z klíštěte (přibližně 350 ng) k purifikované genomové DNA *B. miyamotoi*, která byla použita jako templát pro amplifikaci. Cílová DNA byla zředěna 10x z první zkumavky (80 ng čisté DNA) na 8 fg genomové DNA v reakci. Necílová DNA byla přítomna v každém ředění ve stejném množství (350 ng).

PCR reakce (20 µl):

PCR „spike” vzorku:

- 10 µl HotStarTaq Plus Master Mix (Qiagen)
- 1 µl Bmiy F primer (10µM)
- 1 µl Bmiy R primer (10µM )
- 3 µl DNA (ředění od 80 ng do 8 fg)
- 3 µl necílové DNA klíšťat (350ng)
- 2 µl ddH<sub>2</sub>O

PCR primery- první krok PCR:

Bmiy Q1 F-5'- CACCATTGATCATAGCTCACAG-3'

Bmiy Q2 R- 5'-CTGTTGGTGCTTCATTCCAGTC-3'

PCR produkt: 633 bp

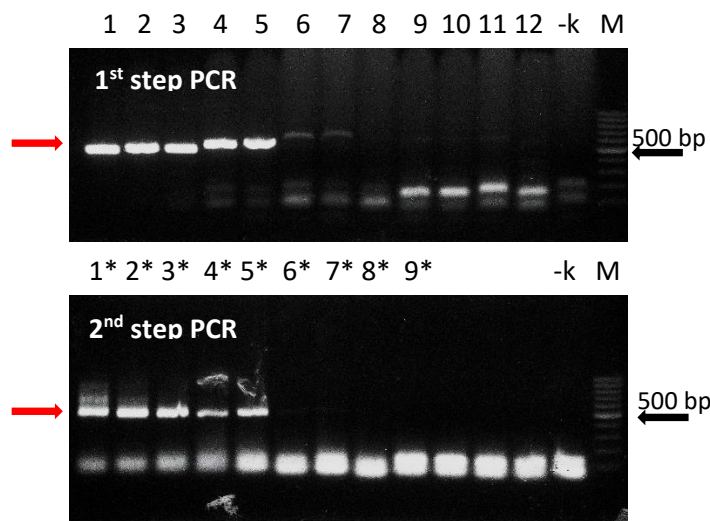
## PCR primery- druhý krok PCR

Bmiy Q3 F-5'-GCTAGTGGGTATCTTCCAGAAC-3'

Bmiy Q4 R-5'-CTTGTTGTTTATGCCAGAAGGGT-3'

PCR produkt: 424 bp

Druhý krok PCR byl proveden s primery Bmiy Q3 a Bmiy Q4 a 5  $\mu$ l PCR amplikonu z prvního kroku (templát). PCR a další analýza výsledků byly prováděny stejně, jak je popsáno výše.



1. krok *glpQ* PCR: 1-80 ng; 2- 8 ng; 3-800 pg; 4-80 pg; 5- 8 pg; 6-800 fg; 7-80 fg; 8-8 fg; 9-0.8 fg.

Spodní gel: 2. krok *glpQ* PCR s 5  $\mu$ l spacer-amplikonu jako templátu.

2. krok *glpQ* PCR potvrzuje přítomnost *B. miyamotoi* DNA ve „spike“ vzorku při použití 8 pg původního templátu (jamka 5\*).

Výsledky PCR v prvním kroku potvrdily přítomnost *glpQ* amplikonu v reakci s 8 pg původní DNA *B. miyamotoi* (jamka 5 a 5 \*). Slabý signál byl detekován v reakcích s 80 fg DNA *B. miyamotoi* přítomné ve „spike“ vzorcích (jamka 7 a 7 \*). Druhý krok PCR NEZVYŠUJE citlivost amplifikace PCR za daných podmínek; proto dvoukroková PCR je zbytečná.

## Detekce *Borrelia miyamotoi* dvoukrokovou ve vzorcích s čistou DNA.

K analýze účinnosti dvoukrokové PCR na purifikované DNA byla provedena amplifikace genu *glpQ* *B. miyamotoi* za stejných podmínek jako v případě „spike“ vzorků.

PCR reakce:

10  $\mu$ l HotStarTaq Plus Master Mix

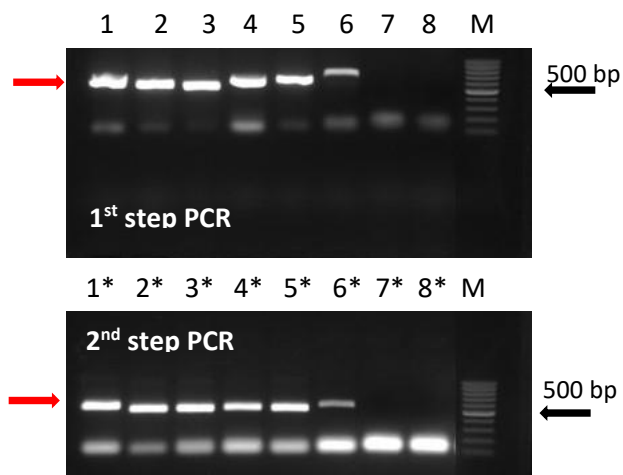
1  $\mu$ l Bmiy F primer (10 $\mu$ M)

1  $\mu$ l Bmiy R primer (10 $\mu$ M)

3  $\mu$ l *B. miyamotoi* DNA (80 ng)

5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O





1. krok *glpQ* PCR: 1-80 ng; 2- 8 ng; 3-800 pg; 4-80 pg; 5- 8 pg; 6-800 fg; 7-80 fg; 8-8 fg; 9-0.8 fg.

Spodní gel: 2. krok *glpQ* PCR s 5 µl spacer amplikonu jako templátu.

2. krok *glpQ* PCR potvrzuje přítomnost DNA *B. miyamotoi* ve vzorcích, kde bylo 800 fg původního purifikovaného templátu (jamka 6\*).

Výsledky PCR v prvním kroku potvrdily přítomnost amplikonu *glpQ* v reakci s přítomností 800 fg DNA *B. miyamotoi* (jamka 6 a 6 \*). Druhý krok PCR NEZVYŠUJE citlivost amplifikace PCR za daných podmínek, proto je použití dvoukrokové PCR zbytečné.

## Závěr

Analýza genomů *B. miyamotoi* a spirochét z komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato potvrdila, že vybraný cílový gen *glpQ* je přítomen pouze u *B. miyamotoi*, čímž se zvýšila specificita detekční metody. Přítomnost LB spirochét ve vzorcích (v případě ko-infekce) detekci *B. miyamotoi* neovlivňuje.

Hmotnost 1 genomu *B. miyamotoi* je srovnatelná s hmotností 1 genomu spirochety LB, což odpovídá cca 2 fg DNA. Jednokroková PCR s vybranými primery a za navrhovaných podmínek vedla k pozitivní amplifikaci části genu *glpQ* v reakci, kde bylo jako templát použito 800 fg spirochetální DNA (400 spirochét / reakce). Množství jednotlivých *B. miyamotoi* v infikovaných klíšťatech bylo dříve detekováno analýzou 16S rRNA LUX real-time PCR jako průměr  $2,1 \times 10^5$  spirochét / klíště a jako průměr  $6,6 \times 10^2$  spirochét / klíště v případě smíšené infekce (Wilhelmsson et al., 2013). Navrhovaná jednokroková PCR provedená standardním způsobem umožňuje detekci 40 spirochét ve vzorku (80 fg DNA) i za přítomnosti necílové DNA, a to i v laboratořích se základním technickým vybavením, což potenciálně umožní snížení nákladů na PCR analýzu. Druhý krok amplifikace nezvyšuje citlivost PCR, a proto jej považujeme za zbytečný.

## Doporučení

Při detekci spirochét v environmentálních vzorcích doporučujeme použití jedнокrokové PCR provedené konvenčním způsobem, která je zaměřena na amplifikaci *glpQ* genu *B. miyamotoi*. Nepřítomnost genu *glpQ* ve spirochétách z komplexu *Borrelia burgdorferi* s.l., které by mohly být přítomny ve vzorcích spolu s *B. miyamotoi*, zvyšuje specifitu navrhované metody. Citlivost této metody se zvyšuje s vyšší koncentrací DNA *B. miyamotoi* ve vzorcích.

Počáteční ředění purifikovaného vzorku DNA NENÍ doporučeno. Při ředění purifikované DNA může dojít ke snížení množství cílové DNA na hladinu nižší, než kterou je možné pomocí konvenční PCR detekovat.

## Srovnání novosti metodiky

Použití jediného protokolu pro purifikaci celkové DNA z klíšťat nebo jiných pevných nebo tekutých vzorků z terénu zkracuje čas potřebný pro přípravu vzorků. Kity DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Německo) nebyly nikdy předtím použity k celkové purifikaci DNA z klíšťat. V rámci úpravy protokolu pro purifikaci DNA z klíšťat jsme zahrnuli počáteční krok inkubace nakrájených tvrdých klíšťat přes noc při 56 ° C v pufru 1 a v roztoku proteinázy K. Po tomto kroku byl použit standartní postup/protokol dle výrobce. Objem elučního roztoku byl záměrně snížen, aby byla DNA koncentrována.

Metody vyvinuté dříve pro detekci *Borrelia miyamotoi* v různých vzorcích byly zaměřeny na použití genomových lokusů, které sdílejí homologii mezi skupinou spirochét způsobujících návratnou horečku, kam patří *B. miyamotoi*, a spirochét způsobujících lymfskou boreliózu (bičik, 16s rRNA, 16S-23S ITG, p66). Tímto postupem může s vysokou pravděpodobností dojít k nespécifické amplifikaci a vzniku falešně pozitivních výsledků. Naši metodu detekce jsme založili na genomovém lokusu, který je jedinečný pro *B. miyamotoi* a chybí v genomu spirochét komplexu *B. burgdorferi* s.l. (gen kódující glycerofosfodiester fosfodiesterázu, *glpQ*), čímž je zajištěna vysoká specifita reakce.

Dříve vyvinuté metody používají dvoukrokovou amplifikaci, která ve všech ohledech prodlužuje čas detekčního postupu, finanční zátěž analýz a v případě nespécifčnosti zvyšuje počet falešně pozitivních výsledků. Dokázali jsme, že za podmínek, které jsme použili, je jedнокroková amplifikace dostatečná pro detekci spirochét ve vzorcích různého původu, snižuje náklady na detekci a možnost výskytu falešně pozitivních výsledků. Zavedená metoda je použitelná i pro vzorky lidského původu.

## Popis uplatnění metodiky

Navrhovaná metoda detekce spirochét *Borrelia miyamotoi* byla vyvinuta pro analýzu celkové DNA purifikované z tvrdých klíšťat (Ixodidae), séra anebo pevných zvířecích tkání (stejně jako i vzorků lidského původu) ve všech výzkumných, lékařských, veterinárních, zemědělských či jiných laboratořích se základním vybavením. Tato metoda je navržena tak, aby zajistila spolehlivou detekci spirochét návratné horečky v tekutých a pevných živočišných tkáních a v klíšťatech.

Následné sekvenování amplifikovaných fragmentů (pokud je taková analýza vyžadována) umožňuje přesnou identifikaci druhů spirochét bez dalšího metodologického zapojení. Navrhovaný postup eliminuje potřebu použití drahého laboratorního vybavení (Real time PCR cycler) a může ji provádět kdokoli, kdo ovládá základní protokoly PCR. Navrhovaný protokol umožňuje jak analýzu studovaných vzorků s jednoduchou detekcí „pozitivní / negativní“, tak je schopen poskytnout i rozsáhlá vědecká data bez použití dalších laboratorních metod (*in silico* analýzy).

## Ekonomické aspekty

Zavedení navrhovaného protokolu v jakékoli laboratoři se základním technickým vybavením a personálem, který ovládá základní metody molekulární biologie, nevyžaduje pro jeho implementaci žádné další investice. Protokol lze snadno přizpůsobit materiálu, se kterým pracuje testovací laboratoř a kapacitě jejích zaměstnanců. Pro výpočet průměrné ceny analýzy 1 vzorku jsme vycházeli z cen stanovených pro rok 2020 dodavatelskými společnostmi.

### Základní analýza

Izolace DNA (DNeasy blood and tissue kit, kat. Č. 69506 Qiagen) - 75 Kč  
PCR mastermix (HotStarTaq Plus Master Mix Kit, kat. Č. 203645, Qiagen) - 10 Kč  
Spotřební materiál (plast, agaróza, pufr) - 25 Kč  
Základní cena celkem: 110 Kč

### Rozšířená analýza (volitelně)

Izolace amplikonu z agarózy (odstředivé filtrační jednotky Ultrafree-DA kat. Č. 42600, MERCK) - 60 Kč  
Sekvenování - 100 Kč (SeqMe s.r.o.)  
Rozšířená analýza - cena celkem: 210 Kč

## Seznam použité literatury

Fukunaga M., Takahashi Y., Tsuruta Y., Matsushita O., Ralph D., McClelland M., et al. 1995. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. *Int J Syst Bacteriol.* 45(4):804-10.

Crowder C.D., Carolan H.E., Rounds M.A., Honig V., Mothes B., Haag H., et al. 2014. Prevalence of *Borrelia miyamotoi* in Ixodes ticks in Europe and the United States. *Emerg Infect Dis.* 20(10):1678-82.

Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., Makhneva N.A., Toporkova M.G., Maleev V.V., et al. 2011. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg Infect Dis.* 17(10):1816-23.

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

Cutler S., Vayssier-Taussat M., Estrada-Peña A., Potkonjak A., Mihalca A.D., Zeller H. 2019. A new *Borrelia* on the block: *Borrelia miyamotoi* – a human health risk? *Euro Surveill.* 24(18):pii=1800170.

Krause P.J., Fish D., Narasimhan S., Barbour A.G. 2015. *Borrelia miyamotoi* infection in Nature and in humans. *Clin Microbiol Infect* 21: 631–639

Cosson J.-F., Michelet L., Chotte J., Le Naour E., Cote M., Devillers E., et al. 2014. Genetic characterization of the human relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in vectors and animal reservoirs of Lyme disease spirochetes in France. *Parasit Vectors.* 7(1):233.

Wodecka B, Skotarczak B. 2016. Identification of host blood-meal sources and *Borrelia* in field-collected *Ixodes ricinus* ticks in north-western Poland. *Ann Agric Environ Med.* 23(1):59-63.

Han S, Hickling GJ, Tsao JI. High prevalence of *Borrelia miyamotoi* among adult blacklegged ticks from white-tailed deer. 2016. *Emerg Infect Dis.* 22(2):316-8.

Barbour A.G. 2014. Phylogeny of a relapsing fever *Borrelia* species transmitted by the hard tick *Ixodes scapularis*. *Infect Genet Evol.* 27:551–558.

Wilhelmsson P., Lindblom P., Fryland L., Ernerudh J., Forsberg P., Lindgren P.-E. 2013. Prevalence, diversity, and load of *Borrelia* species in ticks that have fed on humans in regions of Sweden and Åland Islands, Finland with different Lyme borreliosis incidences. *PLoS One.* 8(11):e81433.

## Seznam publikaci, které předchazely metodice

Heglasová I., Rudenko N., Golovchenko M., Zubrikova D., Miklisova D., Stanko M. 2020. Ticks, fleas and rodent-hosts analyzed for the presence of *Borrelia miyamotoi* in Slovakia: the first record of *Borrelia miyamotoi* in a *Haemaphysalis inermis* tick. *Ticks and Tick-borne Diseases* 11, 101456.

Majerová K., Hönig V., Houda M., Papežík P., Fonville M., Sprong H., Rudenko N., Golovchenko M., Černá Bolfíková B., Hulva P., Růžek D., Hofmannová L., Votýpka J., Modrý D. 2020. Hedgehogs, squirrels and blackbirds as sentinel hosts for active surveillance of *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia burgdorferi* complex in urban and rural environments “; *Microorganisms* 2020, 8(12), 1908; <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121908>

## Jména oponentů a názvy jejich organizací

RNDr. Helena Langhansová, Ph.D.,

Přírodovědecká fakulta JU, Branišovská 31, 37005, České Budějovice, Czech Republic

Mgr. Adam Norek, PhD.,

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 296/70, 621 00 Brno, Czech Republic

MVDr. Vladimír Brychta,

Ministerstvo zemědělství, Těšnov 65/17, 110 00, Praha 1, Česká republika

## Dedikace

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu za podpory Ministerstva Zemědělství číslo QK1920258 s názvem „Šíření klíšťat a klíšťaty přenášených onemocnění: nová a opomíjená rizika pro domácí a hospodářská zvířata a člověka“.