

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

**Vliv infekce klíšťat *Ixodes ricinus* virem klíšťové encefalitidy
na jejich aktivitu**

Diplomová práce

Bc. Eva Výletová

vedoucí práce:

Prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

konzultant:

Mgr. Václav Hönig, Ph.D.

České Budějovice 2018

Anotace

Cílem diplomové práce bylo prostudovat vliv infekce klíšťat virem klíšťové encefalitidy na jejich chování a vývoj. Analyzovali jsme vliv infekce na sání krve, metamorfózu, lokomoci a fototaxi. Přestože se nepodařilo prokázat významný efekt infekce na chování klíšťat, získané výsledky přispívají k poznání dynamiky přenosu viru během vývojového cyklu klíšťat včetně sousání a transovariálního přenosu.

Klíčová slova: *Ixodes ricinus*, virus klíšťové encefalitidy, chování klíšťat, přenos viru

Annotation

The aim of this study was to examine the effect of tick infection with tick-borne encephalitis virus on its behaviour and development. The effect of infection on feeding performance, metamorphosis, locomotion or phototaxis was analysed. Despite the fact that we were not able to demonstrate any significant effect of infection on tick behaviour, the obtained results contribute to understanding transmission dynamics of the virus during tick life cycle including co-feeding and transovarial transmission.

Key words: *Ixodes ricinus*, tick-borne encephalitis virus, tick behaviour, virus transmission

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Prohlašuji, že jsem uvedenou práci vypracovala samostatně pouze s využitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích 18. 4. 2018

Bc. Eva Výletová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli Prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za odborné vedení a cenné rady při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Martinu Palusovi za pomoc při infikování klíšťat a Janu Erhartovi za péči o klíšťata a podnětné připomínky. Největší dík patří mému konzultantovi Mgr. Václavu Hönigovi, PhD., který mi ochotně poskytl všestrannou pomoc jak při získávání údajů pro experimentální část práce, tak při zpracování její teoretické části. Všem mým kolegům a přátelům děkuji za podporu během celého studia a mé rodině za trpělivost a neustálé povzbuzování.

Obsah

1. Úvod	6
2. Literární přehled	7
2.1.1. Klíšťata čeledi <i>Ixodidae</i>	7
2.1.2. Klíšťata rodu <i>Ixodes</i>	8
2.2. Virus klíšťové encefalidity	9
2.2.1. Taxonomie a charakteristika viru	9
2.2.2. Replikace viru	11
2.2.3. Stabilita viru	11
2.2.4. Ekologie viru	12
2.3. Klíšťová encefalitida	14
2.3.1. Geografické rozšíření	14
2.3.2. Epidemiologie	14
2.3.3. Projevy nákazy	15
2.3.4. Prevence a léčba	16
2.4. Vzájemná interakce klíštěte a viru klíšťové encefalidity	16
2.5. Vliv patogenů na jejich vektory	18
2.5.1. Vliv viru klíšťové encefalidity na aktivitu klíšťat čeledi <i>Ixodidae</i>	18
2.5.2. Vliv borelií na aktivitu klíšťat čeledi <i>Ixodidae</i>	19
2.5.3. Vliv dalších patogenů na aktivitu klíšťat čeledi <i>Ixodidae</i>	20
3. Materiál a metody	24
3.1. Laboratorní zvířata a buněčné linie	24
3.1.1. Klíšťata	24
3.1.2. Myši	24
3.1.3. Buněčné linie	24
3.1.4. Virus klíšťové encefalidity	24
3.2. Infikování larev klíštěte <i>Ixodes ricinus</i>	24
3.3. Nasávání nymf a dospělců klíštěte <i>Ixodes ricinus</i>	26
3.4. Detekce viru klíšťové encefalidity v klíšťatech	26
3.4.1. Molekulárně-biologická detekce genomické RNA viru	26
3.4.2. Plaková titrace	28
3.4.3. Porovnání stanovení množství viru pomocí plakové titrace a RT-qPCR	29
3.4.4. Efektivita přenosu viru v rámci „co-feedingu“	29
3.5. Vliv infekce na sání klíšťat	29
3.5.1. Rychlost přísátí nymf a dospělců	29
3.5.2. Doba sání nymf a dospělců	29
3.5.3. Hmotnost plně nasátých klíšťat	30
3.6. Vliv infekce na průběh životního cyklu	30
3.6.1. Rychlost přeměny plně nasátých larev a jejich přežívání	30
3.6.2. Rychlost přeměny plně nasátých nymf	30

3.6.3.	Zastoupení pohlaví.....	30
3.7.	Vliv infekce na reprodukci klíšťat	30
3.7.1.	Rychlost kladení vajíček.....	30
3.7.2.	Rychlost líhnutí larev	31
3.8.	Vliv infekce na fototaktickou aktivitu nymf a dospělců	31
3.9.	Vliv infekce na pohybovou aktivitu nymf a dospělců	32
3.10.	Analýza dat.....	33
4.	Výsledky	33
4.1.	Infikování larev klíštěte <i>Ixodes ricinus</i>	33
4.1.1.	Porovnání stanovení množství viru pomocí plakové titrace a RT-qPCR	33
4.1.2.	Vliv přenosu v rámci „co-feedingu“ na prevalenci viru	34
4.2.	Prevalence a množství viru v klíšťatech.....	34
4.2.1.	Vliv sání klíšťat na prevalenci a množství viru	34
4.2.2.	Porovnání prevalence a množství viru mezi vývojovými stádii	36
4.2.3.	Efektivita transovariálního přenosu	36
4.3.	Vliv infekce na sání klíšťat	36
4.3.1.	Rychlost přísátí nymf a dospělců	36
4.3.2.	Doba sání nymf a dospělců.....	36
4.3.3.	Hmotnost plně nasátých klíšťat.....	36
4.4.	Vliv infekce na průběh životního cyklu	37
4.4.1.	Rychlost přeměny plně nasátých larev jejich přežívání	37
4.4.2.	Rychlost přeměny plně nasátých nymf	38
4.4.3.	Zastoupení pohlaví.....	39
4.5.	Vliv infekce na reprodukci klíšťat	39
4.5.1.	Rychlost kladení vajíček.....	39
4.5.2.	Rychlost líhnutí larev	39
4.6.	Vliv infekce na fototaktickou aktivitu nymf a dospělců	39
4.7.	Vliv infekce na pohybovou aktivitu nymf a dospělců	39
5.	Diskuze	40
6.	Závěr	45
7.	Použitá literatura	46

1. Úvod

Klíšťata a choroby přenášené klíšťaty ovlivňují zdraví zvířat a lidí na celém světě a jsou také příčinou významných ekonomických ztrát. Přibližně 10 % z 867 nám známých druhů klíšťat působí jako vektory široké škály patogenů zvířat a lidí. U nás jsou nejvýznamnějšími patogeny přenášenými klíšťaty spirochety Lymeské boreliózy a virus klíšťové encefalitidy (VKE; virus KE). Mezi další klíšťaty přenášené choroby řadíme například tularémii, ehrlichiozu a babeziózu (Jongejan a Uilenberg, 2004). Není tedy překvapivé, že se klíšťatům a klíšťaty přenášeným patogenům věnuje velká pozornost.

Pro mou diplomovou práci jsem si vybrala studium vlivu infekce virem klíšťové encefalitidy na klíště *Ixodes ricinus*. K výběru tohoto tématu mě inspirovala práce studentky Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity Heleny Huspekové, která se v roce 2014 zabývala ve své diplomové práci vlivem infekce *Borrelia burgdorferi* na chování klíštěte *Ixodes ricinus*.

Klíště bývá veřejností většinou vnímáno jako obtížný parazit. Samo ovšem je také prostředím pro život dalších organismů, se kterými vstupuje do různých ekologických vztahů. Mikroorganismy patogenní pro člověka nebo jiné obratlovce nemusí být pro klíště nutně patogenní. Nicméně interakce klíšťat s mikroorganismy, které je osidlují, mohou vyvolávat významné změny jejich biologie. V případě patogenů člověka nebo zvířat mají tyto změny i zdravotnický či veterinární dopad.

Z tohoto pohledu jsou nejprozkoumanější interakce parazitů s hostiteli ve formě manipulace. Parazité mohou u svého hostitele například ovlivnit reprodukční schopnosti nebo měnit jeho fenotyp s cílem zvýšit svůj fitness. Mezi tyto strategie ovlivnění hostitele parazity patří zvýšení pravděpodobnosti predace svého hostitele nebo využití hostitele k efektivnímu rozšíření, popřípadě obraně svého potomstva. Strategie manipulace jsou extrémně rozmanité a úzce souvisí s životním cyklem parazita (Gopko a Mikheev, 2017). Obdobné ovlivnění hostitele lze nalézt i u infekce viry. Například virus vztekliny (čeled' *Rhabdoviridae*, rod *Lyssavirus*) napadá CNS teplokrevných živočichů a mezi nimi se přenáší především slinami. Způsobuje změny chování napadených zvířat, může zvýšit jejich agresivitu a tím je nutit ke svému šíření prostřednictvím kousání a škrábání (Jackson, 2007). V případě vektory přenášených nálezů přichází v úvahu i ovlivnění chování či životaschopnosti členovce, který se na přenosu nákazy podílí.

Jak již bylo uvedeno, tato práce se věnuje studiu vlivu infekce klíšťat *Ixodes ricinus* virem KE na jejich aktivitu. Konkrétně byl zkoumán možný vliv infekce viru KE na lokomoční aktivitu a sání klíšťat, dále na jejich fototaktickou aktivitu a průběh vývojového cyklu. Provedené experimenty přinesly i další zajímavé výsledky týkající se prevalence viru KE v různých stádiích klíšťat po experimentální infekci.

Cíle práce:

- za definovaných podmínek infikovat klíšťata virem KE (imerzní metoda)
- stanovit prevalenci a množství viru v klíšťatech plakovou metodou nebo RT-qPCR
- zjistit, zda infekce klíšťat virem KE ovlivňuje chování klíšťat: např. ovlivnění lokomoční aktivity, sání krve, vývoje a případně produkce vajíček
- výsledky porovnat s neinfikovanými klíšťaty a statisticky vyhodnotit

2. Literární přehled

2.1.1. Klíšťata čeledi *Ixodidae*

Čeď *Ixodidae* (klíšťatovití) řadíme do kmene *Arthropoda* (členovci), třídy *Chelicerata* (klepítkatci), řádu *Acarina* (roztoči) a podřádu *Metastigmata* (*Ixodida*). Mezi významné rody této čeledi z hlediska humánní i veterinární medicíny patří *Amblyomma*, *Boophilus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes* a *Rhipicephalus* (Jongejan a Uilenberg, 2004).

Typickým znakem čeledi *Ixodidae* je tvrdý štítek (scutum) na hřbetní straně dospělců. U samců kryje téměř celé tělo, u samic však pouze jednu třetinu, což jim při sání hostitelské krve umožňuje několikanásobně zvětšit svůj objem. U roztočů obecně rozlišujeme přední - ústní část (gnathosoma) a zadní část (idiosoma). Gnathosoma klíšťat je vybaveno ústním ústrojím s chelicerami, palpami a nápadným hypostomem, pomocí něhož se klíště udržuje během sání v kůži hostitele. Elastické idiosoma nese nohy a u některých druhů i oči. Za posledním párem nohou se nachází vyústění vzdušnic (stigmata). Larvy klíšťat mají tři páry končetin, zatímco nymfy a dospělci čtyři (Volf a Horák, 2007).

Trávicí soustava vakovitého typu má mnoho postranních výběžků. Trávení probíhá převážně intracelulárně, což je výhodné pro řadu mikroorganismů, včetně přenášených patogenů. Vnitřní prostředí střeva roztočů je při tomto způsobu trávení poměrně chudé na proteázy a další trávicí enzymy, které by mohly mikroorganismy poškodit. Anální otvor ústí v zadní části idiosomu, pohlavní otvor se naopak nachází v jeho přední části (na břišní straně) (Volf a Horák, 2007).

Hladová (exofilní) klíšťata většinou číhají na svého hostitele na vegetaci. Ke zjištění přítomnosti hostitele jim slouží Hallerův orgán umístěný na prvním páru končetin. Tento orgán je citlivý na teplo, CO₂, NH₃, H₂S a další chemické sloučeniny (Süss, 2003; Sonenshine, 2006; Volf a Horák, 2007; Šimo et al., 2014). Při kontaktu s hostitelem se klíšťata nepřisají ihned, ale pomocí sensorických orgánů umístěných zejména na palpách si vyhledají nejvhodnější místo. Sání trvá obvykle 4-8 dní. Některé druhy klíšťat vylučují zvláštní bílkovinnou hmotu zvanou „cement“, čímž posilují ukotvení hypostomu v tkáni hostitele (Volf a Horák, 2007).

Výše zmíněný Hallerův orgán je klíčovým nástrojem regulace základních behaviorálních adaptací klíšťat, které jsou nezbytné pro nalezení jejich potravy – krve. Kromě tohoto orgánu disponují klíšťata dalšími smyslovými receptory, které reagují na chemické, mechanické a teplotní podněty. Dále u nich také najdeme receptory osmo-, foto- a hygrosenzorické (Mulenga, 2014).

Klíšťata čeledi *Ixodidae* mohou být jedno, dvou nebo tříhostitelské druhy v závislosti na počtu hostitelských zvířat na kterých sají jednotlivá vývojová stadia. Larvy a nymfy se po plném nasátí převlékají. Jednohostitelské druhy sají a převlékají se dvakrát na tomtéž hostiteli, z larvy na nymfu a z nymfy na dospělé. Dvouhostitelská klíšťata se nasají a přemění z larvy na nymfu na jednom hostiteli. Nasátá nymfa odpadne a převléká se mimo hostitele. Dospělec musí najít druhého hostitele, který může, ale nemusí být stejného druhu jako první. Tříhostitelská klíšťata se převlékají mimo hostitele, volně v prostředí. Nasátá larva odpadne, přemění se na nymfu, která musí najít druhého hostitele. Po nasátí na druhém hostiteli se přemění na dospělé, který saje na třetím hostiteli (Jongejan a Uilenberg, 2004). Dospělci se mohou pářit na hostiteli i mimo něj (volně v prostředí) (Kiszewski a Spielman, 2002; Slípková, 2014). Samice po nasátí opouští hostitele a naklade velkou snůšku vajíček (Jongejan a Uilenberg, 2004).

Kromě čeledi *Ixodidae* zahrnujeme do podřádu *Metastigmata* ještě čeledi *Argasidae* (klíšťákovití) a *Nuttalliellidae*. Čeď *Argasidae* se od *Ixodidae* odlišuje

především absencí tvrdého hřbetního štítu, četností a délkou sání na hostiteli nebo počtem nymfálních stádií (Volf a Horák, 2007). Druhy této čeledi sají kratší dobu, ale opakovaně, a proto žijí v blízkosti svých hostitelů – jsou tzv. nidikolní (endofilní) (Tyson a Piesman, 2009). Čeleď *Nuttalliellidae* je reprezentována jediným druhem *Nuttalliella namaqua*. Toto klíště představuje nejbližšího společného předka čeledí *Argasidae* a *Ixodidae* a je pokládáno za živoucí fosílii (Mans et al., 2011).

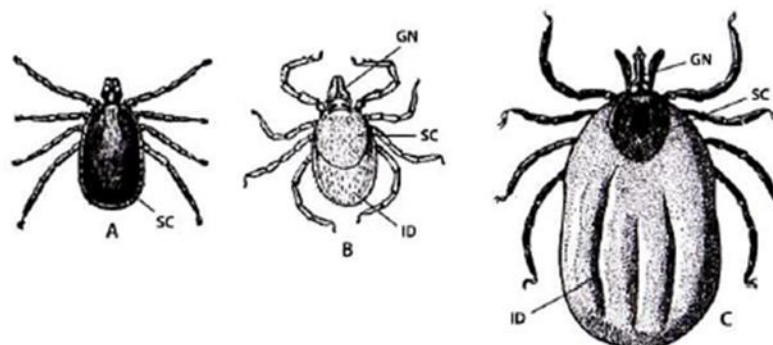
2.1.2. Klíšťata rodu *Ixodes*

Rod *Ixodes* je, s 241 druhy, nejpočetnějším rodem čeledi. Typickým znakem klíšťat tohoto rodu je zakřivení anální drážky směrem k análnímu otvoru, štítek bez výzdoby a absence očí. Mají tříhostitelský životní cyklus. Medicínsky nejvýznamnějšími druhy klíšťat v Evropě a Asii jsou *I. ricinus* a *I. persulcatus*, v Severní Americe *I. scapularis*. Široká škála různých hostitelů *I. ricinus* a *I. persulcatus* z nich činí významné vektory velkého počtu patogenů (Jongejan a Uilenberg, 2004).

Například o *I. ricinus* je známo, že pro nasátí krve využívají více než 300 druhů obratlovců, zahrnujících savce, ptáky a plazy (Anderson, 1991), přičemž každé vývojové stadium preferuje jiné druhy hostitelů. Drobní obratlovci, jako jsou hlodavci (*Apodemus* spp., *Myodes glareosus*, *Microtus* spp., *Sciurus* spp.), hmyzožravci (*Sorex* spp., *Talpa europaea*, *Erinaceus* spp.), ptáci (*Turdus* spp., *Erithacus rubecula*, *Parus* spp., *Sylvia* spp., *Sitta europaea*, *Emberiza citrinella*, *Fringilla coelebs*, *Passer montanus*, *Garrulus grandarius*) a plazi bývají napadáni hlavně larvami a příležitostně nymfami. Na větších savcích, jako jsou zajícovci (*Lepus europaeus*), šelmy (*Mustella* spp., *Meles*, *Vulpes vulpes*) a sudokopytníci (*Sus scrofa*, *Cervus* spp., *Capreolus capreolus*), parazitují i dospělci (Estrada-Peña et al., 2005; Matuschka et al., 1991; Morán Cadenas et al., 2007; Wodecka a Skotarczak, 2016).

Většina druhů rodu *Ixodes* jsou klíšťata endofilní, trávící svůj život v úkrytech svých hostitelů. Několik málo druhů tohoto rodu jsou klíšťata exofilní, tedy klíšťata vyskytující se ve fázi hledání hostitele volně na vegetaci (Gray et al., 2016). Mezi exofilní klíšťata patří i klíště obecné - *Ixodes ricinus* (Obr. 1), se kterým se setkáváme na našem území nejčastěji (Volf a Horák, 2007).

Průměrná doba trvání vývojového cyklu *I. ricinus* ve střední Evropě je dva roky, avšak při nepříznivých podmínkách kterékoli fáze vývoje může trvat až šest let (Gray, 1998). Dospělá nenasátá samička dosahuje velikosti 3-4 mm, zatímco sameček jen přibližně 2,5 mm (Heinz, 2007).



Obr. 1: Acarina, Ixodida, Ixodidae, *Ixodes ricinus* (klíště obecné) (převzato z Volf a Horák, 2007)

A – dospělý sameček, B – dospělá samička (nenasátá), C – dospělá samička (nasátá), GN – gnathosoma, SC – scutum (štítek), ID – idiosoma.

Optimální podmínky pro aktivitu klíšťat *I. ricinus* jsou v teplotním rozmezí 18-25 °C a relativní vzdušné vlhkosti mezi 86 a 96 %. Tomu odpovídá sezónní aktivita klíšťat přibližně od května do června a od srpna do září (Daniel, 2007).

Ekologie klíštěte *I. ricinus*

Životní cyklus klíšťat zahrnuje dva klíčové procesy: přeměnu do dalšího stadia nebo kladení vajíček a období hledání hostitele (Estrada-Peña de la Fuente, 2014).

Přeměna klíštěte z jednoho stadia do dalšího zahrnuje významnou přestavbu těla klíštěte spojenou s histolytickými procesy, které mohou mít významné negativní účinky na mikroorganismy osidlující klíšťata. Tyto změny nepostihují všechny orgány klíštěte do stejné míry a některé orgány tedy mohou sloužit jako útočiště mikroorganismů klíštěte, včetně patogenů (Řeháček, 1965). Po nasátí a odpadnutí ze svého hostitele larvy a nymfy *I. ricinus* hledají vhodné prostředí (např. půdu, písek, lesní hrabanku) k přeměně do dalšího stadia. Klíčovými faktory počátku a průběhu přeměny jsou teplota a dostatečný objem nasáté krve. Samice klíšťat po plném nasátí a páření kladou vejčeka v podobném prostředí, které využívají larvy a nymfy při přeměně. Čeleď *Ixodidae* je známa svou výjimečnou plodností, která je patrně nejvyšší ze všech hematofágních členovců. Snůška klíšťat této čeledi čítá až 5000 vajíček. Velikost snůšky je závislá na mnoha faktorech, například na množství nasáté krve, velikosti vajíček a druhu klíštěte (Sonenshine, 1991; Korenberg a Kovalevskii, 1994; Jongejan a Uilenberg, 2004).

Pro každé stadium *I. ricinus* je v rámci vyhledání hostitele zásadní „pátrací“ chování (z angl. *questing behaviour*) (Gilbert et al., 2014), které spočívá v aktivním vyhledávání míst na vegetaci, kde může klíště přijít do kontaktu s hostitelem (Sonenshine, 1993). Po zimní diapauze klíšťata zahajují svou pátrací aktivitu při týdenní průměrné maximální teplotě přibližně 7-8 °C (Perret et al., 2000; Randolph, 2004). Během pátrání klíšťata ztrácejí vodu, kterou obvykle získávají tím, že v intervalech sestupují do vlhkých zón, kde mohou reabsorbovat vodní páru z atmosféry. Když jsou klíšťata hydratována, stoupají opět do vegetace, kde čekají na hostitele. Období vyhledávání hostitele je tedy u klíšťat charakterizováno cykly vzestupných a klesajících pohybů ve vegetaci, regulovaných teplotou a ztrátami vody. Cykly probíhají v cirkadiánním rytmu, přičemž nejvíce těchto cyklů probíhá ve tmě (Rudolph a Knülle, 1974; Lees a Milne, 1951; Kahl a Alidousti, 1997). Podle švýcarských autorů (Perret et al., 2003) všechna vývojová stadia klíšťat *I. ricinus* disponují fotosenzitivními buňkami, které jim umožňují využít nástup tmy pro spuštění aktivity v době, kdy se snižuje rychlost ztráty vody. Energetické rezervy klíšťat spolu s jejich schopností hospodařit s vodou jsou faktory, které regulují aktivity vyhledávání hostitele a přežití klíšťat v přírodě (Estrada-Peña a de la Fuente, 2014).

Součástí životního cyklu klíštěte *I. ricinus* je také diapauza, která je definována jako zpomalení životních pochodů organismu. Diapauza je velmi důležitá pro sezónní adaptaci klíšťat. Její nástup je ovlivněn teplotou, délkou fotoperiody, stářím jedince a reprodukcí (Belozarov, 1982; Oliver, 1989; Gray et al., 2016). V laboratorních podmínkách u klíšťat dochází k absenci diapauzy z důvodu konstantně nastavené fotoperiody v chovu a/nebo vystavení klíšťat vysokým teplotám (21-24 °C) (Gray et al., 2016).

2.2. Virus klíšťové encefalitidy

2.2.1. Taxonomie a charakteristika viru

Virus klíšťové encefalitidy řadíme do rodu *Flavivirus* a čeledi *Flaviviridae* (Mandl et al., 1997). V rámci rodu patří virus KE do skupiny klíšťaty přenášených

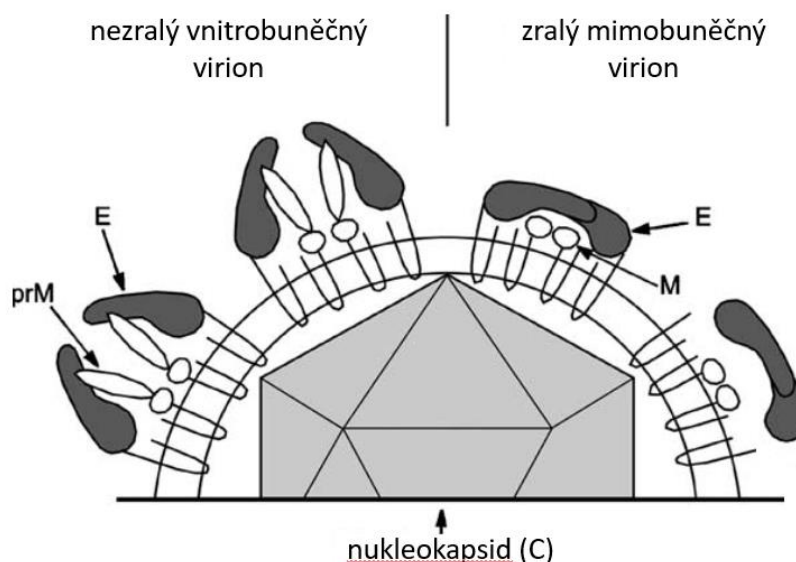
flavivirů infikujících savce, společně s dalšími patogeny člověka a zvířat, například viry Louping ill, Langat, Powasan či virem Omské hemoragické horečky (Gritsun et al., 2003).

Na základě antigenních vlastností a nukleotidových sekvencí genomu je možné rozlišit tři subtypy VKE (Ecker et al., 1999):

- Subtyp 1 – evropský, prototypový kmen Neudoerfl, hlavní vektor *I. ricinus*
- Subtyp 2 – dálnovýchodní, prototypový kmen Sofjin, hlavní vektor *I. persulcatus*
- Subtyp 3 – sibiřský, prototypové kmeny Vasilchenko a Zausaev, hlavní vektor *I. persulcatus*

Poprvé byl virus KE objeven v roce 1937 v tehdejší Sovětské svazu expedicí A. Zilbera (Zilber, 1939). Ve střední Evropě byl tento virus poprvé izolován roku 1948 v tehdejší Československu, a to hned ve dvou případech nezávisle na sobě (Gallia et al., 1949; Krejčí, 1949, 1950a, 1950b).

Virové částice (viriony) tohoto viru mají kulovitý tvar o průměru 50-60 nm. Jsou tvořeny ikozaedrální nukleokapsidou obklopenou fosfolipidovou membránou. Genom viru KE o velikosti 11 kilobází (kb) sestává z jednovláknové RNA pozitivní polarity uložené v kapsidě. Genom v kapsidě spojuje bazický kapsidový protein C (z angl. *capsid*). Fosfolipidový obal obsahuje dva virem kódované proteiny, obalový glykoprotein E (z angl. *envelope*) a membránový protein M (Mansfield et al., 2009). Protein E zprostředkovává splnutí virové a buněčné membrány interakcí s buněčnými receptory. V savčích hostitelích též vyvolává tvorbu virus-neutralizačních protilátek, které mají důležitou roli v protivirové imunitní odpovědi (Heinz et al., 2000). Membránový protein M, který se vyskytuje jen na zralých extracelulárních virionech, vzniká štěpením prekurzoru prM (Obr. 2) (Rajčáni a Čiampor, 2006).



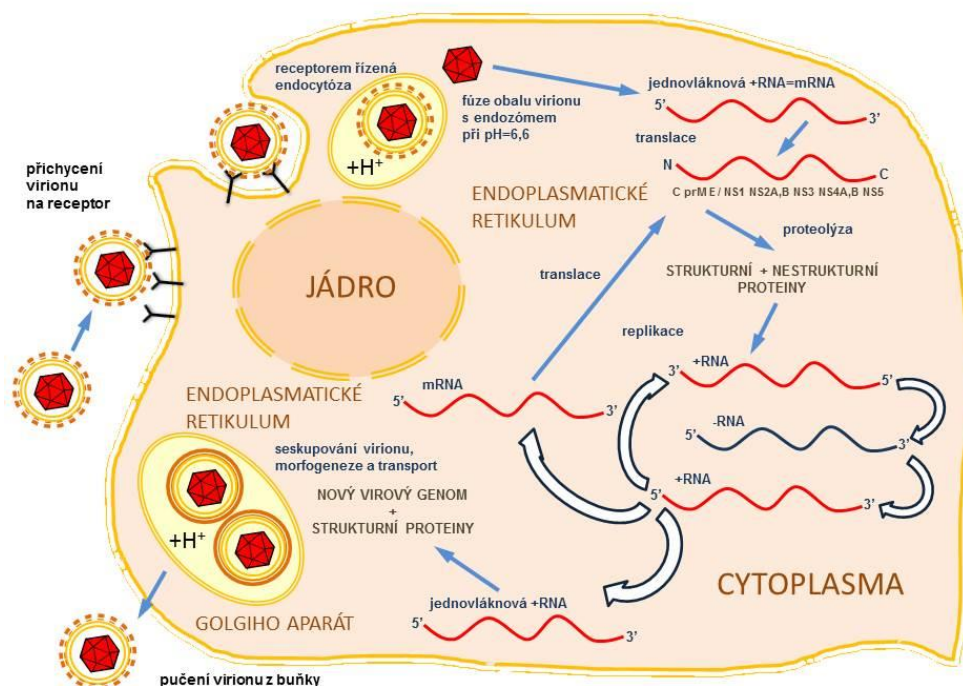
Obr. 2: Schéma strukturní organizace zralého a nezralého virionu viru KE (upraveno podle Heinz, 2003)

Virový genom obsahuje jeden otevřený čtecí rámec, který kóduje rozsáhlý polyprotein tvořený 3414 aminokyselinami. Tento polyprotein je štěpen buněčnými a virovými proteázami na výše uvedené tři strukturní (C, M a E) a sedm nestrukturních (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5) proteinů (Gritsun et al., 2003;

Mansfield et al., 2009). Strukturální proteiny jsou zodpovědné za sbalení virového genomu a pučení kapsidy, zatímco nestrukturní katalyzují replikaci genomu (Formanová et al., 2015).

2.2.2. Replikace viru

Virus KE infikuje buňky klíštěte i svého obratlovčího hostitele, přičemž způsob replikace viru se v těchto dvou systémech podstatně liší. Buňky klíšťat nejsou virovou infekcí obvykle nijak poškozovány, zatímco infekce buněk obratlovce může vést ke smrti buňky procesem apoptózy nebo nekrózy (Růžek, 2015b).



Obr. 3: Schematické zobrazení replikačního cyklu viru KE v hostitelské buňce (převzato z Palus a Růžek, 2013)

Replikace flavivirů (Obr. 3) probíhá v cytoplazmě vnímavé buňky bez spoluúčasti buněčného jádra. Adsorbované virové částice pronikají do buňky endocytózou (Rajčáni a Čiampor, 2006). Po rozložení nukleokapsidy dochází k uvolnění virové RNA. Podle RNA pozitivní polarity je syntetizováno vlákno RNA negativní polarity, které následně slouží jako předloha pro vytvoření kopií virového genomu (Mandl, 2005). Tvorba nových virionů a jejich dozrávání může probíhat dvěma cestami, označovanými jako *cis* a *trans* maturace. V případě *cis* maturace probíhá kompletace virionů v cytoplazmě, následně putují k buněčné membráně, přes kterou pučí a při tom získávají svůj obal. U *trans* maturace se již obalené viriony shromažďují v měchýřcích endoplazmatického retikula a přes Golgiho komplex se dostávají pomocí transportních váčků k buněčné membráně. Fúzí membrány váčku s buněčnou membránou se viriony uvolní do extracelulárního prostoru. V případě infekce buněk obratlovce virem KE bývá pozorována maturace typu *trans*, zatímco v buňkách klíštěte probíhá maturace cestou *cis* (Šenigl et al., 2006).

2.2.3. Stabilita viru

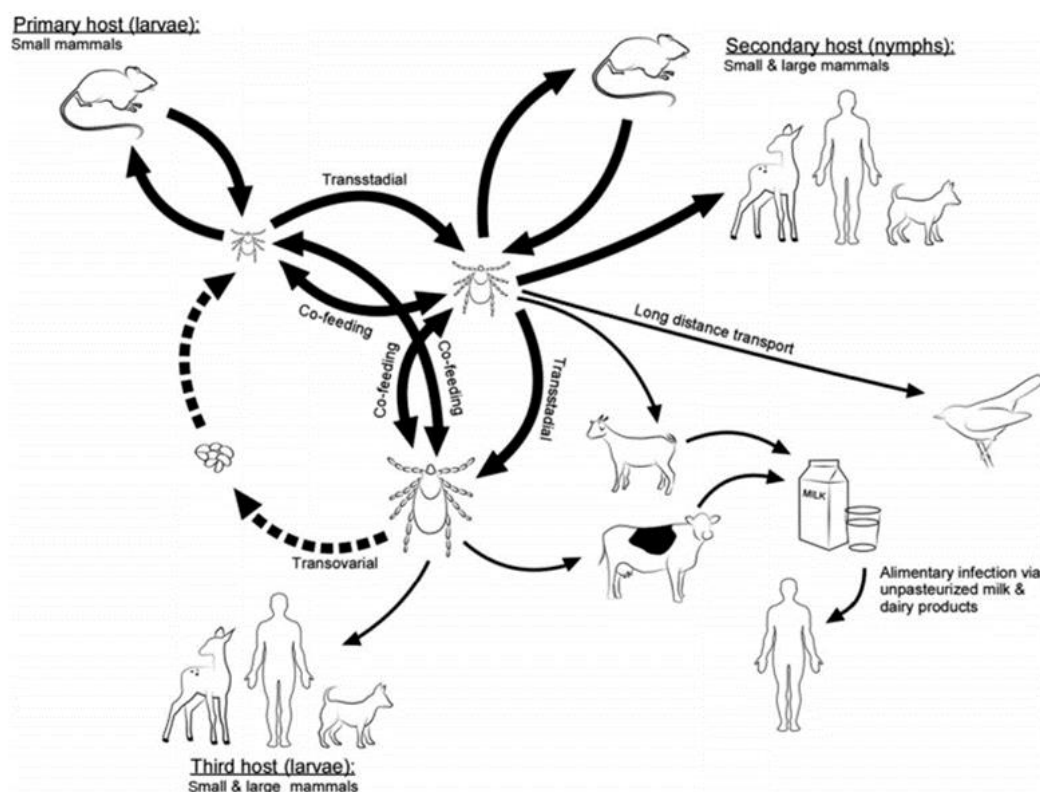
Optimální pH pro infekčnost viru je 8,4-8,8 (Karabatsos, 1980), jistou míru infekčnosti si však zachovává v širším rozmezí pH od 1,42 do 9,19 (Pogodina, 1958).

Přestože v kyselém pH dochází u E proteinu ke specifickým změnám snižujícím infekčnost, viriony zůstávají infekční ve zkyslém mléce nebo v žaludečních šťávách. Tato skutečnost vysvětluje, že se virus KE může přenášet alimentární cestou (Gritsun et al., 2003).

Díky fosfolipidové membráně je virus rychle inaktivován účinkem organických rozpouštědel a detergentů (Russell et al., 1980). Spolehlivým způsobem inaktivace viru KE je pasterizace při 72 °C (Grešíková et al., 1960). Při velmi nízkých teplotách však virus zůstává infekční téměř neomezeně (Gould, 1995). Totéž platí i pro virus KE uchovaný v lyofilizované formě při pokojové teplotě. Ve formě aerosolu jsou flaviviry stabilní při pokojové teplotě a vlhkosti 23-80 % po dobu alespoň 6 hodin (Karabatsos, 1980). Naopak inaktivovány jsou kromě pasterizace též UV zářením, gamma zářením a dezinfekčními prostředky, jako je 3-8% formaldehyd, 2% glutaraldehyd, 2-3% peroxid vodíku, 0,5-5‰ volný chlor, ethanol, 1% roztok jodu nebo fenolové jodofory (Burke a Monath, 2001; Gritsun et al., 2003).

2.2.4. Ekologie viru

Cirkulace viru KE v přírodě (Obr. 4) probíhá mezi klíšťaty a jejich obratlovčími hostiteli. Virus KE je tedy vystaven dvěma zcela odlišným podmínkám hostitelských organismů, kterým se musí přizpůsobit, včetně podmínek přechodu mezi nimi. Parametry cirkulace jsou pak dány vzájemnými vztahy mezi virem, vektorem a jejich hostiteli (Danielová a Daniel, 2015).



Obr. 4: Cirkulace viru KE v přírodě (převzato z Mlera et al., 2014)

Vektoři viru KE

Ve střední Evropě je hlavním přenašečem tohoto viru klíště *Ixodes ricinus* (Danielová a Daniel, 2015). Dalšími druhy klíšťat, které se pravděpodobně podílejí na cirkulaci viru KE v přírodě, jsou *I. persulcatus*, *I. arboricola*, *I. hexagonus*, *Heamaphysalis punctata*, *H. concinna*, *Dermacentor marginatus* a *D. reticulatus* (Gustafson, 1994).

Všechna stadia klíšťat se mohou nakazit virem KE při sání na infikovaném hostiteli, který právě prodělává virémii. Poté se virus mezi klíšťaty přenáší transstadiálně, transovariálně a pravděpodobně i kopulací (Dumpis et al., 1999). Další možností nákazy dosud neinfikovaných klíšťat je přenos při tzv. sousání (angl. „co-feeding“). Sousání je neviremický lokální přenos nákazy z infikovaného na neinfikované klíště při společném sání na stejném hostiteli, u kterého nemusí být detekovatelná virémie (Labuda et al., 1993b; Gritsun et al., 2003). K tomuto přenosu dochází dokonce i na imunním hostiteli (Labuda et al., 1997).

Přenos viru KE mezi klíštětem a hostitelem se označuje jako horizontální přenos, zatímco přenos z jedné generace klíšťat na druhou jako přenos vertikální. Klíště jednou nakažené virem KE zůstává infikováno po zbytek svého života (Nuttall a Labuda, 2003). Nejdůležitějším stadiem pro přenos viru KE jsou pravděpodobně nymfy, protože mají široké hostitelské spektrum a jsou početnější než dospělci (Süss, 2003).

V Evropě se v přírodě pohybuje prevalence viru KE u klíšťat mezi 0,1 a 5 % (Lindquist a Vapalahti, 2008). Transovariální přenos se na cirkulaci viru podílí zřejmě nízkou měrou. Pouze u 3,3-20 % samic (v závislosti na infekční dávce) infikovaných sáním dojde k přenosu viru na potomstvo (Burgdorfer a Varma, 1967). Z infikované snůšky se líhne méně než 0,5 % infikovaných larev (Danielová a Holubová, 1991). I toto malé množství je však velmi důležité pro udržení viru KE v přírodním cyklu. Hlavním faktorem přenosu viru mezi klíšťaty je však zřejmě „co-feeding“, při kterém dochází výraznému navýšení prevalence viru (Labuda et al., 1993a). Zajímavý je fakt, že klíšťata odebraná z člověka mají až o 20 % vyšší prevalenci viru KE než klíšťata z volné přírody, což může být zapříčiněno vyšší aktivitou infikovaných klíšťat nebo replikací viru při sání (Belova et al., 2012; Süss et al., 2006). Replikace viru v klíštěti zřejmě může mít vliv na úspěšnost jeho detekce v klíštěti, nicméně u nasátých klíšťat odebraných z přirozených hostitelů takto vysoký rozdíl v prevalenci zaznamenán nebyl (Pintér et al., 2013).

Hostitelé viru KE

V přírodních ohniscích nákazy jsou za hlavní hostitele a rezervoáry viru KE považováni drobní hlodavci (Dumpis et al., 1999). Další živočichové, například ptáci, vysoká zvěř a skot, mohou být virem také infikováni. Pro přenos viru KE v přírodě však mají menší význam. Člověk je pouze náhodným hostitelem a nesehrává žádnou roli v cirkulaci viru v přírodě (Gritsun et al., 2003).

Vzhledem k existenci transovariálního a transstadiálního přenosu lze považovat za dlouhodobý rezervoár viru i klíště (Slovák et al., 2014; Danielová a Daniel, 2015).

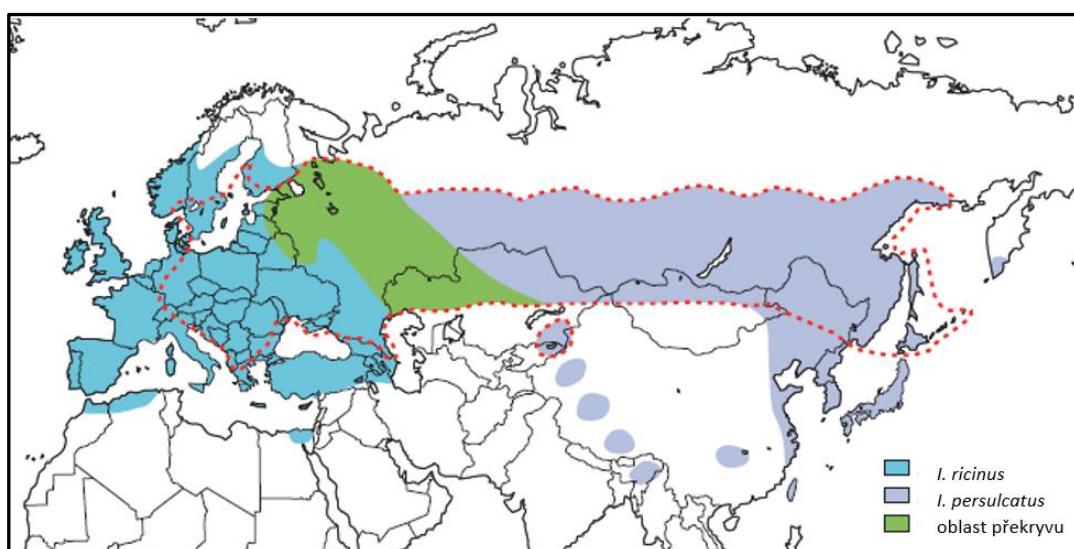
Člověk se nejčastěji infikuje virem KE při sání infikovaného klíštěte. Další možností, i když méně častou, je přenos viru alimentární cestou po požití nepasterizovaného mléka či mléčných výrobků od infikovaných zvířat (nejčastěji koz a ovcí). Byly popsány i vzácné případy nákazy inhalační cestou v laboratoři nebo prostřednictvím krevní transfuze (Süss, 2003; Hubálek a Rudolf, 2007; Kříž et al., 2009).

2.3. Klíšťová encefalitida

2.3.1. Geografické rozšíření

Klíšťová encefalitida je endemická ve střední a východní Evropě, Rusku a na Dálném Východě (Dumpis et al., 1999). Hlášené případy onemocnění KE u lidí ve světě, kterých je ročně více než 10 000 (Kunz a Heinz, 2003), jsou geograficky úzce vázány na oblasti rozšíření k přenosu kompetentních vektorů. Nedávno zaznamenané autochtonní případy onemocnění KE v Nizozemí a ve Francii potvrzují rozšiřování výskytu KE mimo dosud známé endemické oblasti (de Graaf et al., 2016; Levy et al., 2016; Weststrate et al., 2017).

Jak již bylo zmíněno (kap. 2.2.1), virus KE zahrnuje tři subtypy, evropský, dálnovýchodní a sibiřský. Hlavním vektorem evropského subtypu je klíšť *I. ricinus*, pro subtypy dálnovýchodní a sibiřský je to *I. persulcatus*. Areál rozšíření *I. ricinus* zaujímá téměř celou Evropu až po Kavkaz. *I. persulcatus* se vyskytuje v pásu, který se táhne od východu Evropy až po Čínu a Japonsko. Oba druhy klíšťat se společně vyskytují v oblastech severovýchodní Evropy (Karélie, Petrohrad, východní Estonsko a Lotyšsko (Obr. 5) (Lindquist a Vapalahti, 2008).



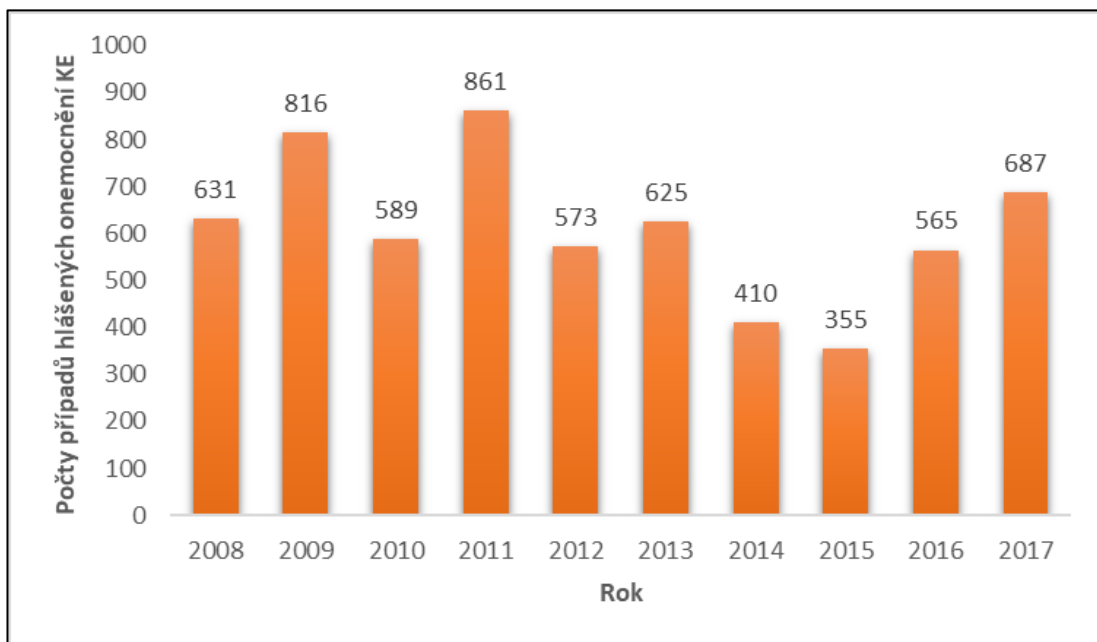
Obr. 5: Geografické rozšíření *Ixodes* spp (upraveno podle Lindquist a Vapalahti, 2008)

Modrá barva znázorňuje výskyt *I. ricinus* v západních oblastech a šedá výskyt *I. persulcatus* ve východních oblastech. Rozšíření těchto dvou vektorů se překrývá v oblasti vyznačené zelenou barvou. Tečkovaná čára značí hranice endemické oblasti KE.

2.3.2. Epidemiologie

Klíšťová encefalitida patří společně s Lymeskou boreliózou do skupiny nákaz s přírodní ohniskovostí. Výskyt přirozeného ohniska viru KE je podmíněn přítomností patogena, vektora a jejich přirozených hostitelů. Populační hustota i aktivita populací klíšťat je ovlivňována změnami klimatu a strukturou habitatu. Teplejší klima umožňuje delší sezónní aktivitu klíšťat i lidí. V posledních desetiletích byl v Evropě zaznamenán zvýšený výskyt KE nejen ve známých endemických oblastech, ale ohniska KE byla zaznamenána i v oblastech nových. Recentní výskyt KE v Evropě je ovlivněn posunem výskytu klíšťat na sever a do vyšších nadmořských výšek. V současné době existuje riziko nákazy onemocněním přenášeným klíšťaty až do 1000 m n. m. Změny přenosu KE mohou také souviset s dynamikou změn populace rezervoárových zvířat. Podíl na šíření klíšťat má například i přemnožená zvěř, zejména divoká prasata. (Daniel et al., 2003; Kříž et al., 2012; Kříž et al., 2015; Pazdiora 2015).

Výskyt onemocnění v České republice v posledních deseti letech ukazuje následující graf (Obr. 6).



Obr. 6: Počty hlášených onemocnění KE v ČR v letech 2008-2017. Zdroj dat SZU (Státní zdravotní ústav, 2018)

2.3.3. Projevy nákazy

Průběh onemocnění KE je ovlivněn řadou faktorů. Velké rozdíly můžeme pozorovat u jednotlivých subtypů viru KE (Tab. 1). Zda se jedná o rozdíly způsobené pouze rozdílnými vlastnostmi kmenů různých subtypů není zcela jisté.

subtyp	průběh onemocnění	trvalé následky	úmrtnost (%)
evropský	dvoufázový	nejsou časté	1-2
dálnovýchodní	jednofázový	vzácně	5-60
sibiřský	částečně dvoufázový	časté, sklon k chronicitě	1-3

Tab. 1: Průběh onemocnění KE u jednotlivých subtypů viru KE (Gritsun et al., 2003; Charrel et al., 2004)

Kromě subtypů může být průběh KE ovlivněn dávkou viru KE, jež se dostala do organismu, věkem, pohlavím, stavem imunity či genotypem hostitele (Růžek 2015a).

Dvoufázový průběh evropského typu onemocnění bývá pozorován u 70 % nemocných. Po uplynutí inkubační doby, obvykle po 7-14 dnech, přichází první fáze KE. Ta se vyznačuje nespecifickými příznaky podobnými chřipce (horečka, bolest hlavy a svalů, nevolnost). Po zhruba týdenním období bez příznaků může nastat druhá fáze, kdy se objevuje silná bolest hlavy, horečka a různé formy meningitid. Tyto

se projevují neurologickými příznaky, jako například světloplachost, dezorientace, změny nálad, svalový třes, paralýza kraniálních nervů a dýchacích svalů a paréza končetin (Kaiser, 1999; Lindquist a Vapalahti, 2008). Po prodělaném onemocnění KE přetrvávají přibližně u 26-50 % pacientů dlouhodobé neurologické následky, u 10 % z nich jsou tyto následky vážné (Banzhoff et al., 2008).

Podobný průběh jako u člověka bývá v případě rozvoje onemocnění sledován též u psů. Další živočišný druh vnímavý k infekci je kůň, ačkoliv u něj onemocnění probíhá ve většině případů asymptomaticky. U přežvýkavců probíhá infekce VKE asymptomaticky a nepředstavuje tak zdravotní problém pro samotného nakaženého hostitele. Riziko nákazy však ohrožuje člověka v roli konzumenta mléka a mléčných produktů infikovaného zvířete (Salát, 2015).

2.3.4. Prevence a léčba

Přes dlouhodobě probíhající výzkumy v této oblasti ještě nebyl vynalezen účinný lék na infekci virem KE. Léčba spočívá v potlačování příznaků. U méně závažných forem onemocnění je možné podávat pacientům pro zmírnění příznaků paracetamol, aspirin, nebo jiné nesteroidní protizánětlivé léky. U těžkých případů je možné podání kortikoidů (Dumpis et al., 1999).

Jedinou možností ochrany proti KE tedy zůstává prevence. Riziko nákazy může být sníženo obecnými preventivními opatřeními zaměřenými na minimalizaci rizika napadení klíštětem, jako je například nošení vhodného oblečení, používání repelentů a prohlídka těla po návratu z míst s výskytem klíšťat.

Nejúčinnějším preventivním opatřením je však aktivní imunizace. V současné době používané moderní vakcíny jsou bezpečné a vysoce účinné (účinnost 95-99 %) (Heinz, 2007). V Evropě jsou dostupné dvě vakcíny založené na evropských kmenech viru KE: FSME-IMMUN od firmy Baxter, Rakousko (kmen Neudoerfl) a Encepur od Novartis Vaccines and Diagnostics, Německo (kmen K 23). K dispozici jsou též varianty obou vakcín pro děti: FSME-IMMUN Junior a Encepur Kinder. Tyto vakcíny obsahují poloviční množství očkovací látky (Charrel et al., 2004). Všechny tyto vakcíny obsahují viry KE pomnožené v buňkách kuřecích embryí, inaktivované formaldehydem a přečištěné. Vakcíny jsou účinné proti všem třem subtypům viru KE (Banzhoff et al., 2008; Rendi-Wagner, 2004).

Dostupné vakcíny proti KE používané v Evropě jsou licencované pouze pro použití u lidí. Experimentálně byl však prokázán ochranný efekt těchto vakcín i proti infekcím KE u domácích zvířat (Balogh et al., 2012).

2.4. Vzájemná interakce klíštěte a viru klíšťové encefalitidy

Virus KE je klíštětem přenášen tzv. biologickým přenosem, což je přenos, kdy se infekční agens musí ve vektoru pomnožit nebo prodělat určitý vývoj dříve, než se může uskutečnit jeho přenos na nového hostitele (Šejda et al., 2005). Virus tedy musí být schopen proniknout do buněk tkání klíštěte a tam se replikovat. Předtím je ale nucen projít střevním lumen a odolat jeho proteolytickým a jiným účinkům. Po překonání střevní bariéry musí odolat účinkům hemolymfy a posléze překonat bariéru slinných žláz, případně ovarií (u transovariálního přenosu) (Nuttall a Labuda, 2003; Danielová a Daniel, 2015).

U klíšťat se vyvinulo několik jedinečných vlastností, které výrazně přispívají k jejich úspěchu jako vektorů. Je to například dlouhověkost a komplexní vývoj, hematofagie ve všech post-embryonálních stádiích života, schopnost přežít dlouhou dobu bez přijímání potravy a intracelulární trávení v buňkách střevního epitelu (Nuttall a Labuda, 2003). Dalším faktorem úspěchu přenosu jsou obranné mechanismy klíšťat, které jim umožňují udržovat patogeny na úrovni nezhoršující jejich kondici

a další rozvoj. Dlouho trvající koevoluce klíšťat s mikroorganismy, které s nimi koexistují, vedla ke vzájemné toleranci (Mans et al., 2011).

SAT

Klíště při sání na hostiteli vylučuje se slinami do rány celou řadu farmakologicky účinných látek (namířených proti obranným reakcím hostitele, či srážení krve), které umožňují úspěšné sání klíštěte. Slinami vyvolané změny v imunitní reakci však zároveň usnadňují přenos patogenů z klíštěte na hostitele. Mezi významné bioaktivní molekuly slin patří například proteiny vážící imunoglobuliny nebo histamin, regulátory NK buněk (z angl. *natural killer cell*) a interferonu či inhibitory komplementu (Nuttall, 1999; Nuttall a Labuda, 2004; Danielová a Daniel, 2015)

Usnadnění přenosu patogenů na hostitele účinkem látek obsažených ve slinách vektora se označuje jako „slinami aktivovaný (asistovaný) přenos“ (*saliva-activated (assisted) transmission*, SAT). Tento jev byl prokázán u mnoha patogenů přednášených klíšťaty včetně viru KE, podobně jako u některých patogenů přenášených hmyzem. Bylo dokázáno, že při inokulaci patogenu společně se slinami dochází ke zvýšení úspěšnosti přenosu infekce ve srovnání s inokulací samotného patogenu (Nuttall a Jones; 1991; Nuttall, 1999). Tento fenomén se uplatňuje mimo jiné i při již popsaném společném sání klíšťat (kap. 2.2.4), tzv. sousání (Labuda et al., 1993a; Danielová a Daniel 2015).

Imunitní odpověď klíšťat na infekci VKE

U bezobratlých živočichů se na rozdíl od obratlovců nevyskytuje, až na některé výjimky, typická adaptivní imunita, pro níž je charakteristická klonální selekce lymfocytů, tvorba specifických protilátek a imunologická paměť. Imunitní obrana bezobratlých živočichů je založena na reakcích vrozené imunity, které jsou rychlé a nespecifické (Hořejší a Bartůňková, 2005).

Členovci mají řadu antivirových mechanismů, které mají bránit či kontrolovat infekci (Kopáček et al., 2010). K těmto mechanismům patří zejména interference RNA (Schnettler et al., 2014), produkce antivirových peptidů, jako jsou defenziny (Talactac et al., 2017) a detekce virů prostřednictvím Toll receptorů (Rückert et al., 2014).

V souvislosti s virem klíšťové encefalitidy jsou zatím nejvíce prozkoumány zejména mechanismy nespecifické protivirové imunity založené na RNA interferenci. Například u viru Langat, který patří také do komplexu virů KE (Pletnev et al., 2000), bylo zjištěno, že vypínání některých genů zapojených do kaskády RNA interference u kultur klíštěcích buněk vedlo na různých úrovních k pozitivním efektům na množení viru. Viry se této nespecifické imunitní reakci brání zřejmě prostřednictvím produkce sfRNA (*small interfering RNA*) – krátkých RNA, které blokují proces RNA interference (Schnettler et al., 2012; Weisheit et al., 2015).

Toll receptory jsou známou skupinou strukturně-detekčních receptorů, které tvoří součást vrozeného imunitního systému obratlovců (Akira a Takeda, 2004). Nedávno byl zmapován genom klíštěte *I. scapularis*, přičemž se mimo jiné zjistilo, že i klíšťata mají pravděpodobně několik genů kódujících Toll receptory (Gulia-Nuss et al., 2016). Zatím však nevíme, zda tyto geny identifikované u klíšťat produkují funkční proteiny a hrají roli v imunitě. Některé z nich zřejmě mohou být pseudogeny nebo produkovat proteiny s vývojovou funkcí (Johnson, 2017).

Transkriptomické a proteomické analýzy buněčných linií odvozených z klíšťat *I. ricinus* a *I. scapularis* infikovaných virem KE identifikovaly několik molekul, které se také zdají být zapojeny do vrozené imunitní reakce proti flavivirům a do reakcí

buněčného stresu, jako jsou proteiny tepelného šoku HSP90, HSP70 a gp96, regulátor aktivace komplementu Faktor H a trypsin (Weisheit et al., 2015). Dále tyto analýzy odhalily rozdíly ve funkci buněčných drah v buňkách *I. ricinus* infikovaných virem KE, virem Louping ill a obligátně intracelulární bakterií *Anaplasma phagocytophilum*, v závislosti na infekčním agens. Zjistilo se, že běžně dochází ke zvýšené expresi genů spojených s apoptózou a buněčným stresem a genů, které ovlivňují vrozené imunitní reakce klíšťat, přičemž pouze infekce flaviviry vyvolává vzestup nebo snížení exprese genů spojených s Toll receptory. Tyto údaje naznačují existenci několika nezávislých mechanismů, které zajišťují regulaci invaze virů klíšťat (Mansfield et al., 2017).

Dosavadní výzkumy ukazují, že klíšťata virovou infekci tolerují, dalšími experimenty je však třeba zjistit, jaký mechanismus využívají buňky k regulaci virové infekce a proč tento mechanismus nevede k úplné eliminaci viru analogicky s imunitní odpovědí u obratlovčích hostitelů (Johnson, 2017).

2.5. Vliv patogenů na jejich vektory

Pro přenášené mikroorganismy může být výhodné určité chování vektora. U některých patogenů a jejich vektorů se vyvinul vysoce efektivní mechanismus přenosu patogenu. Přenos je zajištěn nejen morfo-fyziologickými zvláštnostmi bezobratlých hostitelů a připraveností patogenu k přechodu do obratlovčího hostitele, ale i změnami v chování infikovaných vektorů ve srovnání s neinfikovanými (Alekseev et al., 1988).

Ovlivnění chování s cílem zvýšení pravděpodobnosti přenosu můžeme pozorovat například u původce malárie, krvinkovky rodu *Plasmodium*. Bylo zjištěno, že za jejím šířením nestojí jen samotní komáři rodu *Anopheles*, ale určitý vliv na vlastní přenos této choroby mají přímo plasmodia. Oocysty plasmodií, což jsou nepřenositelná stadia tohoto patogenu, musí setrvat několik dnů ve střevě komára, než dojde k uvolnění sporozoitů, tedy stadií, které je již přenosné na obratlovce. Bylo dokázáno, že komáři rodu *Anopheles* mající ve svém střevě nepřenositelné oocysty snižují frekvenci, se kterou sají krev na hostiteli. Naopak ve chvíli, kdy nesou již k přenosu připravené sporozoity, se frekvence jejich sání krve zvyšuje (Anderson et al., 1999).

Podobný způsob ovlivnění vektora patogenem byl popsán u viru La Cross, který u člověka způsobuje encefalitidu. Zjistilo se, že komáři *Aedes albopictus* a *A. triseriatus* infikovaní virem La Cross sají hostitelskou krev v menším množství, ale častěji, v porovnání s komáři bez infekce (Jackson et al., 2012). Navíc bylo prokázáno, že komáři *A. triseriatus* infikovaní virem La Cross vykazují vyšší frekvenci páření, což zvyšuje šance k transovariálnímu a venerickému přenosu viru (Reese et al., 2009).

Také bičíkovec *Trypanosoma brucei*, původce spavé nemoci, ovlivňuje svého vektora, bodavku rodu *Glossina*. Mouchy nakažené *T. brucei* zvyšují frekvenci sání hostitelské krve až třikrát oproti nenakaženým a k nasátí potřebují více času (Jenni et al., 1980).

Následující kapitoly jsou věnovány vědeckým pracem z oblasti vlivu přenášených patogenů na klíšťata čeledi *Ixodidae*.

2.5.1. Vliv viru klíšťové encefalitidy na aktivitu klíšťat čeledi *Ixodidae*

Z dosud provedených výzkumů (Alekseev et al., 1988; Belova et al., 2012) vyplývá, že infekce virem KE zvyšuje aktivitu dospělců klíšťat při vyhledávání hostitele. Mechanismy tohoto ovlivnění zatím zůstávají neznámé. Existují však hypotézy o vlivu viru na neuroendokrinní systém klíšťat (Belova et al., 2012). Práce

z roku 2012 (Belova et al., 2012) se navíc věnovala vlivu infekce virem KE na toleranci klíšťat *I. ricinus* k repelentu DEET (N,N-diethyl-3-methylbenzamid). DEET je součástí většiny komerčních repelentů proti krev sajícímu hmyzu a klíšťatům a obvykle jeho koncentrace přesahuje 20 %. Infikovaná klíšťata vykazovala vyšší toleranci k tomuto repelentu, avšak ani ona nepřekonávala bariéru 10 % přípravku. Při nižší koncentraci repelentu než 10 %, ke které může dojít například postupným odvětráním přípravku, se virem infikovaná klíšťata pohybovala rychleji než klíšťata neinfikovaná. Tato skutečnost je dobrým důvodem pro včasné opakování aplikace repelentu při pobytu v přírodě.

Další práce (Alekseev et al., 1997) se zabývala přežíváním nymf infikovaných virem KE. Klíšťata *I. persulcatus* a *A. hebraeum* byla vystavena subletální dávce látky Dursban (širokospektrální akaricid ze skupiny organofosfátů). U nymf infikovaných virem KE došlo ke snížení jejich přežívání, naopak neinfikované nymfy obou druhů přežívaly déle. Navíc byly pozorovány rozdíly v reakci infikovaných klíšťat u pro virus KE kompetentního vektora *I. persulcatus* oproti pro přenos tohoto viru nekompetentnímu *A. hebraeum*.

Jiný typ ovlivnění klíšťat popisují dvě práce (Korotkow et al., 2006; Korotkow a Burenkova, 2006). V experimentech těchto autorů infekce virem KE způsobila fyziologické změny u klíšťat *I. ricinus* tím, že ovlivnila mechanismy regulující proces přeměny do dalšího stadia a indukce nebo ukončení diapauzy. V závislosti na podmínkách docházelo ke zkrácení doby vývoje u infikovaných klíšťat.

Přehled experimentů popisujících vliv viru KE na aktivitu klíštěte čeledi Ixodidae je umístěn na konci literárního přehledu (Tab. 2).

2.5.2. Vliv borelií na aktivitu klíšťat čeledi Ixodidae

Většina dosud provedených experimentů ukazuje, že infekce boreliemi snižuje pohybovou aktivitu převážně u dospělců, přičemž u nymf již toto s jistotou tvrdit nelze (Lefcort a Durden, 1996; Alekseev et al., 2000; Romashchenko et al., 2012; Huspeková, 2014). Jedna ze zveřejněných studií uvádí, že hraniční hodnota, od které začínají být klíšťata negativně ovlivňována, je cca 160 000 spirochet na klíště (Herrmann a Gern, 2010).

Naopak zvýšení aktivity klíšťat při vyhledávání hostitele zaznamenali ve svých experimentech autoři z Německa a Ruska (Faulde a Robbins, 2008; Naumov, 1999). Z Naumových experimentů je však patrné, že vysoká teplota ovlivňuje pohybovou a pátrací aktivitu boreliemi infikovaných klíšťat negativně do větší míry než u klíšťat neinfikovaných.

Dále bylo prokázáno, že infekce boreliemi zvyšuje pravděpodobnost přežití klíšťat v prostředí s nízkou vlhkostí a také zvyšuje jejich fototaktickou aktivitu, což zřejmě souvisí s vyšším obsahem tuku v těle infikovaných klíšťat. Také bylo zjištěno, že klíšťata infikovaná boreliemi nasávají větší množství krve oproti neinfikovaným (Herrmann a Gern, 2010; Herrmann et al., 2013; Huspeková, 2014). Zajímavým výsledkem jedné práce bylo zjištění, že infikovaná klíšťata pobývala delší dobu v místech s expozicí Osmopherinu (syntetický ženský feromon) oproti klíšťatům bez infekce (Romashchenko et al., 2012).

Z uvedených prací vyplývá, že borelie mají na klíšťata v některých parametrech jiný účinek než virus KE. Popis konkrétních rozdílů je jedním ze záměrů mé diplomové práce.

Přehled experimentů popisujících vliv borelií na aktivitu klíštěte čeledi Ixodidae je umístěn na konci literárního přehledu (Tab. 3).

2.5.3. Vliv dalších patogenů na aktivitu klíšťat čeledi Ixodidae

Z dalších patogenů, které ovlivňují svého vektora, bylo do dnešní doby věnováno nejvíce pozornosti bakterii *Anaplasma phagocytophilum*, původci lidské granulocytární anaplasmózy. Bylo zjištěno, že klíšťata infikovaná anaplasmou lépe přežívají v nízkých teplotách a jsou aktivnější, což by mohlo být způsobeno produkcí nemrznoucího glykoproteinu exprimovaného u infikovaných klíšťat (Neelakanta et al., 2010). V další práci se uvádí, že i při vysokých teplotách může infekce anaplasmou klíšťata ochránit, a navíc jsou infikovaná klíšťata vystavená vysokým teplotám aktivnější při vyhledávání hostitele oproti nenakaženým. Autoři práce tento výsledek vysvětlují tím, že proteiny HSP (proteiny teplotního šoku) chrání buňky klíšťat před stresem z vysokých teplot a společně se subolesinem (transkripční faktor) se podílejí na reakci klíšťat proti infekci (Busby et al., 2012). Experimenty vědců z Atlanty ukázaly, že klíšťata infikovaná alopatrickými izoláty *A. phagocytophilum* (vyskytující se v jiné geografické oblasti) mohou být úspěšnější v přeměně z larev na nymfy ve srovnání s neinfikovanými klíšťaty. V případě nákazy sympatrickým izolátem *Anaplasmy* (výskyt ve stejné oblasti) se v těchto experimentech rozdíl v úspěšnosti přeměny nepotvrdil (Ross a Levin, 2004).

Existuje řada dalších případů ovlivnění klíšťat infekcí bakteriálními či protozoárními patogeny. Například u larev klíšťat infikovaných prvokem rodu *Babesia* byla zaznamenána zvýšená úspěšnost sání a přeměny do nymfálního stadia (Randolph, 1991). Bakteriální infekce rickettsiemi (*Rickettsia sp.*) způsobuje vyšší pohybovou aktivitu klíšťat, zatímco na nakloněném povrchu jsou aktivnější neinfikovaná klíšťata (Kagemann a Clay, 2013). U klíšťat infikovaných jinou bakterií, *Francisella tularensis*, bylo zaznamenáno snížení bodu podchlazení oproti neinfikovaným klíšťatům (Nabbout et al., 2018).

Přehled experimentů popisujících vliv dalších patogenů na aktivitu klíštěte čeledi Ixodidae je umístěn na konci literárního přehledu (Tab. 4).

Samostatná kapitola by mohla být věnována vlivu smíšených infekcí klíšťat, která by ale svým obsahem již přesahovala rámec této diplomové práce.

druh klíštěte	popsaná změna chování způsobená infekcí virem KE	poznámka
<i>Ixodes ricinus</i>	Infekce virem KE u klíšťat ovlivnila mechanismy regulující proces přeměny do dalšího stadia a indukce nebo ukončení diapauzy (Korotkow et al., 2006).	přirozená infekce (klíšťata z přírody)
<i>Ixodes ricinus</i>	U infikovaných klíšťat došlo k významně urychlenému vývoji za krátkých denních podmínek (u klíšťat, která se nasála v únoru) v porovnání s klíšťaty bez nákazy (Korotkow a Burenkova, 2006).	experimentální nákaza – sání larev a nymf na infikované myši (klíšťata z chovu), VKE kmen EK-328
<i>Ixodes ricinus</i>	Infikovaní dospělci byli aktivnější při pohybu k atraktantu (ruka experimentátora) a tolerantnější k DEET (repellent) oproti neinfikovaným klíšťatům (Belova et al., 2012).	experimentální nákaza – percoxální infekce injekcí (klíšťata z chovu), VKE kmen Absettarov
<i>Ixodes persulcatus</i>	Infikované samice se k atraktantu (králíčí kůže navlhčená močí) pohybovaly rychleji a zdolaly delší trasu než samice neinfikované. Tento pohyb navíc klíšťata uskutečňovala proti gradientu vlhkosti a ve vertikálním směru (Alekseev et al., 1988).	experimentální nákaza – percoxální infekce injekcí (klíšťata z přírody), VKE kmen BK-130
<i>Ixodes persulcatus</i> <i>Amblyomma hebraeum</i>	Subletální dávka akaricidu Dursban (22,5% emulze) snížila přežívání nymf infikovaných VKE a zvýšila přežití neinfikovaných nymf (Alekseev et al., 1997).	experimentální nákaza – percoxální infekce injekcí (klíšťata z přírody), VKE kmen BK-130

Tab. 2: Vliv viru klíšťové encefalitidy na aktivitu klíštěte čeledi *Ixodidae*

druh klíštěte	popsaná změna chování nebo morfologie způsobená boreliovou infekcí	poznámka
<i>Ixodes ricinus</i>	Nymfy infikované boreliemi měly větší velikost těla oproti nymfám neinfikovaným a zároveň měly infekční nymfy v průměru o 12.1 % vyšší obsah tuku v těle. Bylo zjištěno, že infekce boreliemi zvyšuje přežití klíšťat v prostředí s nízkou vlhkostí. (Herrmann a Gern, 2010; Herrmann et al., 2013).	přirozená infekce (klíšťata z přírody), <i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>Ixodes ricinus</i>	Klíšťata infikovaná boreliemi byla více tolerantní k suchému prostředí, a také v těchto pro ně nevhodných podmínkách přežívala, v porovnání s klíšťaty neinfekčními. Přežívání infikovaných klíšťat v nepříznivých teplotních a vlhkostranných podmínkách se lišilo v závislosti na jejich vývojovém stadiu a míře infekce. Infekční nymfy přežívaly velmi dobře a míra infekce na ně neměla žádný vliv. Dospělci ale byli pozitivně ovlivněni infekcí <i>B. burgdorferi</i> jen do množství borelií cca 160 000 spirochet na jedno klíště. Při překročení této hranice začala mít infekce boreliemi na dospělé klíště negativní vliv (Herrmann a Gern, 2010).	přirozená infekce (klíšťata z přírody), <i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>Ixodes ricinus</i>	Infekce boreliemi zvýšila účinnost vyhledání hostitele u dospělých klíšťat. Počet klíšťat infikovaných boreliemi sebraných od lidí byl vyšší než klíšťat z vegetace (Faulde a Robbins, 2008).	přirozená infekce (klíšťata z přírody), <i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>Ixodes ricinus</i>	Boreliemi infikovaní dospělci vykazovali nižší pohybovou aktivitu směrem k atraktantu (myš) a přisávali se k hostiteli v delším časovém horizontu v porovnání s dospělci neinfekčními. Infikované nymfy i dospělci nasáli větší množství krve oproti neinfekčním klíšťatům, přičemž doba sání zůstala nezměněna. Vyšší fototaktická aktivita byla zaznamenána jak u infikovaných nymf, tak u infikovaných dospělců. U dospělců však toto zvýšení nebylo statisticky průkazné (Huspeková, 2014).	experimentální infekce – sání larev na infikované myši (klíšťata z chovu), <i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes persulcatus</i>	Boreliemi infikované nymfy a dospělci vykazovali nižší pohybovou aktivitu než neinfikovaná klíšťata (Alekseev et al., 2000).	přirozená infekce (klíšťata z přírody), <i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>Ixodes persulcatus</i>	Infekce boreliemi zvýšila pátrací aktivitu dospělců a nymf. Vysoká teplota negativně ovlivnila pohybovou a pátrací aktivitu ve větší míře u infikovaných klíšťat. Míra aktivity pozitivně korelovala s počtem borelií na jeden exemplář klíštěte (Naumov, 1999).	přirozená infekce (klíšťata z přírody), <i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>Ixodes persulcatus</i>	Klíšťata infikovaná boreliemi se pohybovala výrazně pomaleji než klíšťata bez infekce. Dále se infikovaná klíšťata zdržovala déle v místech s expozicí Osmopherinu oproti neinfekčním klíšťatům (Romashchenko et al., 2012).	přirozená infekce (klíšťata z přírody), <i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>Ixodes scapularis</i>	Infekční dospělci byli prokazatelně méně aktivní, velmi neochotně překonávali překážky a vyhýbali se setrvávání a lezení po povrchu ve vertikální poloze. Klíšťata infikovaná boreliemi vyhledávala své hostitele v menších výškách než klíšťata neinfikovaná. Infikované nymfy vykazovaly oproti neinfikovaným vyšší fototaxi a větší ochotu lezení ve vertikální poloze (Lefcort a Durden, 1996).	experimentální infekce – sání larev na infikované myši (klíšťata z chovu), <i>Borrelia burgdorferi</i>

Tab. 3: Vliv borelií na aktivitu klíštěte čeledi *Ixodidae*

druh klíštěte	druh patogenu	popsaná změna chování	poznámka
<i>Ixodes scapularis</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Infekce bakteriemi rodu <i>Anaplasma</i> indukovala expresi nemrznoucího glykoproteinu, který zvýšil přežívání klíšťat v nízkých teplotách a také zvýšil aktivitu klíšťat (Neelakanta et al., 2010).	experimentální infekce (klíšťata z chovu a klíštěcí buňky), izolát NCH-1
<i>Ixodes scapularis</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Subolesin (transkripční faktor), HSP20 a HSP70 (proteiny teplotního šoku) ovlivnily aktivitu klíšťat při vyhledávání hostitele. Klíšťata vystavená vysokým teplotám nakažená bakterií rodu <i>Anaplasma</i> byla při vyhledávání hostitele aktivnější než nenakažená (Busby et al., 2012).	experimentální infekce (klíšťata z chovu a klíštěcí buňky), izolát NY18
<i>Ixodes scapularis</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Infekce bakterií rodu <i>Anaplasma</i> ovlivnila expresi genů CG8 a T2, způsobujících přeskupení cytoskeletu buněk klíšťat (Ayllón et al., 2013).	experimentální infekce (klíšťata z chovu a klíštěcí buňky), izolát NY18
<i>Ixodes scapularis</i>	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Klíšťata, která sála na myších infikovaných šesti alopatrickými izoláty, vykazovala vyšší procento úspěšně přeměněných z larev na nymfy oproti klíšťatům neinfikovaným. U larev infikovaných sympatrickým izolátem byla úspěšnost přeměny podobná s neinfikovanými klíšťaty (Ross a Levin, 2004).	experimentální infekce – sání larev na infikovaných myších alopatrické izoláty (vyskytující se na jiném území než <i>I. scapularis</i>): Dawson, Gaillard, NY-8, Sp-Is, Webster a MRK sympatrický izolát (výskyt ve stejné nebo překrývající se oblasti s <i>I. scapularis</i>): Bridgeport
<i>Ixodes trianguliceps</i>	<i>Babesia microti</i>	Infekce prvoky rodu <i>Babesia</i> zvýšila úspěšnost sání larev a také zvýšila počet larev, které byly schopny přejít do nymfálního stadia (Randolph, 1991).	experimentální infekce (klíšťata z chovu), kmeny K67 a OX87
<i>Dermacentor variabilis</i>	<i>Rickettsia sp.</i>	Na rovném povrchu vykazovala klíšťata infikovaná bakterií rodu <i>Rickettsia</i> vyšší pohybovou aktivitu, zatímco na nakloněném povrchu (45 °) byla aktivnější neinfikovaná klíšťata (Kagemann a Clay, 2013).	přirozená infekce (klíšťata z přírody)
<i>Dermacentor variabilis</i>	<i>Francisella tularensis</i>	Infekce bakterií rodu <i>Francisella</i> snížila bod podchlazení u klíšťat, velikost těla však zůstala u infikovaných klíšťat stejná jako u neinfikovaných (Nabbout et al., 2018).	přirozená infekce (klíšťata z přírody)

Tab. 4: Vliv dalších patogenů na aktivitu klíštěte čeledi *Ixodidae*

3. Materiál a metody

3.1. Laboratorní zvířata a buněčné linie

3.1.1. Klíšťata

Larvy klíštěte *I. ricinus* použité pro experiment pocházely z chovu klíšťat Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. Tato klíšťata byla první generací odchovanou v laboratoři, původně byla získána ze snůšek dospělých samic odchycených v přírodě.

Všechna vývojová stadia klíštěte *I. ricinus* byla chována v konstantních podmínkách při vlhkosti 98 %, teplotě 24 °C a světelném režimu nastaveném na 15 hodin světla a 9 hodin tmy.

3.1.2. Myši

Pro experimenty byly použity SPF (*specific-pathogen-free*) samice myši kmene ICR (CD1), které byly zakoupeny od firmy AnLab, s.r.o. (dodavatel Charles River). Myši byly chovány v SPF prostorách Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR, v.v.i. v konstantních podmínkách při 22 °C a relativní vlhkosti 65 %. Chov myší probíhal v plastových boxech s podestýlkou ve formě dřevěných hoblin. Myši měly neomezený přístup k pitné vodě a kompletní potravě v podobě suchých pelet.

3.1.3. Buněčné linie

Pro plakovou titraci byla použita buněčná linie PS (angl. *porcine kidney stable*; prasečí ledvina). Kultivace této linie probíhala v médiu L15 (Leibowitz) s 3 % precolostrálního telecího séra, 1 % směsi antibiotik a antimykotik (výsledné koncentrace: Amphotericin B 0,25 µg/ml, Penicilin G 100 j./ml a Streptomycin 100 µg/ml) a 1 % L-glutaminu (výsledná koncentrace 292 µg/ml) (vše Biosera) při 37 °C v kultivačních lahvích (TPP).

Pro pasáž byly buňky uvolňovány pomocí suché trypsinizace. Ta byla prováděna dvojím oplachem sterilním PBS (fosfátem pufovaný fyziologický roztok - *phosphate buffered saline*, Biosera) a poté přidáním dvakrát 1 ml trypsinizační směsi (0,02% trypsin a 0,02% EDTA v PBS). Po vylití posledního roztoku byla lahev uložena do termostatu nastaveného na 37 °C. Po několika minutách, když byly buňky uvolněny, bylo do lahve přidáno 5 ml média. Buněčná suspenze byla připravena promícháním média a uvolněných buněk pomocí pipety. Vlastní pasáž byla prováděna naředěním suspenze do čerstvého média.

3.1.4. Virus klíšťové encefalitidy

Pro experimentální infekci klíšťat byl použit virus KE střeoevropského subtypu kmen Hypr. Tento kmen byl původně izolován z krve 10 letého dítěte s diagnózou KE v roce 1953 v tehdejší Československu. K experimentům byla použita 7. pasáž viru v mozcích sajících myšek.

Virus byl uchováván ve formě 20% mozkové suspenze při -70 °C. Manipulace s tímto patogenem probíhala sterilně v boxu s laminárním prouděním (Esco Airstream Class II) za přísných bezpečnostních podmínek (BSL2).

3.2. Infikování larev klíštěte *Ixodes ricinus*

V mé bakalářské práci (Výletová, 2015) jsem se zabývala porovnáním různých metod nakažení klíšťat *I. ricinus* v laboratorních podmínkách. Imerzní metoda

[adaptovaná dle (Policastro a Schwan, 2003; Mitzel et al., 2007)] infekce virem KE kmenem Hypr se z těchto metod jevila jako nejvhodnější pro potřeby mé diplomové práce.

Pro experimenty bylo potřeba připravit dvě skupiny larev, jednu kontrolní a druhou infikovanou virem KE. Infekce byla provedena u dvou nezávislých skupin larev, vždy bylo použito cca 400 jedinců, z toho bylo cca 200 larev (á 100 larev na zkumavku) ponořeno do virové suspenze v kompletním médiu a cca 200 larev (á 100 larev na zkumavku) do média bez viru (kontrolní skupina).

Infekce probíhala v laminárním boxu za přísných bezpečnostních podmínek. Infekce byla prováděna ve speciálně upravených 2 ml zkumavkách, které obsahovaly ještě vnitřní uzavřenou zkumavku tak, aby nedocházelo ke kontaktu média s virem či povrchově kontaminovaných klíšťat s prostředím. Do takto upravených mikrozkumavek bylo napipetováno po 100 μ l kompletního média L15. Do infekčních zkumavek bylo přidáno po 30 μ l viru KE kmen Hypr o titru $2,5 \cdot 10^8$ PFU/ml (celkové množství viru zde bylo tedy $7,5 \cdot 10^6$ PFU). Do kontrolních mikrozkumavek bylo přidáno 30 μ l kompletního média L15. Poté byla do mikrozkumavek rozdělena klíšťata (po 100 jedincích). Po krátké centrifugaci (do 6 000 G) byly značené zkumavky uloženy do termostatu na 45 min při 34 °C, přičemž byly každých 10 min jemně promíchány. Po inkubaci byly mikrozkumavky 2 min. chlazeny na ledu. Po krátké centrifugaci (do 6 000 G) byla perforována vnitřní zkumavka, centrifugací (do 6 000 G) bylo odstraněno médium a klíšťata byla následně třikrát promyta vychlazeným roztokem PBS. Po promytí byla klíšťata ještě jednou centrifugována (1 min., do 6 000 G) pro osušení.

Myši kmene ICR (CD1) (samice, min. 6 týdnů staré) byly zbaveny srsti na části zad, a na takto připravené místo jim byl připevněn „klobouček“ – uzavíratelný rezervoár, pod kterým klíšťata sají (Obr. 7). Do jedné hodiny po promytí byly obě skupiny larev zvlášť nasazeny na myši. Vnitřní mikrozkumavky byly vyjmuty z vnější zkumavky a povrchově sterilizovány otřením 4% roztokem Persterilu 36. Po odpaření Persterilu byly otevřené zkumavky umístěny do kloboučků a kloboučky byly uzavřeny. Chovné nádoby s myši byly uloženy do větších nádob s vodou (cca 3 cm ode dna), aby se zamezilo případnému úniku larev do volného prostoru.



Obr. 7: Myš ICR s „kloboučkem“ pro nasávání klíšťat (foto Eva Výletová)

3.3. Nasávání nymf a dospělců klíštěte *Ixodes ricinus*

Klíšťata nymfálního stádia a dospělé samice byly nasávány obdobně jako larvy. Nasávání těchto vývojových stádií probíhalo nejdříve čtyři týdny po poslední metamorfóze, na jednu myš bylo umístěno maximálně 10 nymfálních klíšťat nebo 2 dospělé samice spolu s 2 samci (přítomnost samců zvyšuje pravděpodobnost úspěšného nasátí samic, během sání také dochází ke kopulaci). Klíšťata byla z myši odebírána po plném nasátí, následně byla zvážena a umístěna do epruvet s menším množstvím dřevěných štěpků uzavřených vatovými zátkami. Klíšťata byla uchovávána v konstantních podmínkách při vlhkosti 98 %, teplotě 24 °C a světelném režimu nastaveném na 15 hodin světla a 9 hodin tmy, jak je uvedeno v kapitole 3.1.1. U nasátých klíšťat byl průběžně kontrolován stav metamorfózy, u samic počátek kladení, u snůšek počátek líhnutí. Kontrola probíhala prohlédnutím epruvety zvenku, aby nebyl kontrolou proces převlékání, kladení a líhnutí narušen.

3.4. Detekce viru klíšťové encefalitidy v klíšťatech

3.4.1. Molekulárně-biologická detekce genomické RNA viru

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je molekulárně biologická technika široce používaná pro amplifikaci a detekci sekvencí DNA (a RNA pro reverzní transkripci). Pro stanovení prevalence a množství viru v klíšťatech byla používána metoda jedнокrokové reverzně transkripční kvantitativní polymerázové řetězové reakce (RT-qPCR). Konkrétně byl použit kit pro detekci VKE Genesig Standard Kit (Primerdesign) v kombinaci s mastermixem OneStep, qRT-PCR Mastermix (Oasig). Jedná se o metodu založenou na principu klasické PCR schopnou detekovat a kvantifikovat virovou RNA. Na rozdíl od běžné PCR, kde se analyzuje až výsledný produkt pomocí agarózové elektroforézy, je při kvantitativní PCR zaznamenáváno množství PCR produktu v každém cyklu amplifikace. Amplifikační produkt je kvantifikován pomocí duálně značené hydrolyzační (TaqMan) sondy, která nese na 5'konci fluorescenční zářič a na 3'konci fluorescenční zhášec. Během PCR je TaqMan sonda rozštěpena 5'-3' nukleázovou aktivitou TaqDNA polymerázy a odštěpení zářiče vyústí ve zvýšení fluorescence, která je přímo úměrná množství produktů PCR. V případě uvedeného kitu byla sonda značena fluoroforem FAM. Počet kopií ve vzorku je stanoven na základě kalibrační křivky - absolutní kvantifikace. Standard o známé koncentraci templátu (součástí kitu) je desítkově nařaděn a je vytvořena kalibrační křivka, která je analyzována spolu se vzorky. Při reverzní transkriptázové PCR je celková RNA nejprve transkribována do komplementární DNA (cDNA) reverzní transkriptázou. cDNA pak slouží jako templát pro qPCR reakci. Pro účely této práce byla využita jedнокroková varianta RT-qPCR, kdy reverzní transkripce (přepis RNA do cDNA) probíhá ve stejné zkumavce bezprostředně před vlastní PCR reakcí. Výhodou jedнокrokové varianty je nižší časová náročnost, také zde odpadá zdlouhavá manipulace se vzorky, čímž se snižuje pravděpodobnost chyby v pipetování či kontaminace (Bustin, 2000; Schwaiger a Cassinotti, 2003; Dyer et al., 2007; Ergunay et al., 2016).

Výsledky kvantifikace jsou prezentovány ve formě počtu kopií genomu VKE přepočtené na klíšťe.

Purifikace virové RNA z klíšťat

Homogenizace klíšťat a purifikace virové RNA byla prováděna bezprostředně po ukončení daného experimentu s klíšťaty. V rámci každé sady vzorků byla zařazena negativní kontrola izolace, která obsahovala všechny komponenty jako testované vzorky (kromě klíštěte) a prošla celým procesem od homogenizace po detekci.

Purifikace virové RNA pomocí kitu *High Pure RNA Tissue Kit* (ROCHE)

Tento kit byl používán pro izolaci virové RNA z nenasátých klíšťat. Postup izolace byl zachován podle protokolu výrobce (*version 0.9*).

Klíšťata (všechna stádia individuálně, pouze larvy F1 generace - potomstvo infikovaných samic ve směsném vzorku po 50 jedincích) byla umístěna do sterilních homogenizačních zkumavek (2 ml, safe-lock, Eppendorf) obsahujících sterilní ocelovou kuličku (5 mm, Qiagen) společně s 400 μ l lyzačně-vazebného pufru. Poté byla provedena homogenizace pomocí přístroje Tissue Lyser II (Qiagen) po dobu 3 min při 30 Hz. Nenasáté larvy byly homogenizovány ve stejném množství pufru ve sterilních 1,5 ml zkumavkách pomocí sterilních plastových tyček (*homogenisation pestle*). Po přidání 200 μ l ethanolu se RNA selektivně navázala na speciální silikagelovou membránu v kolonce. Zbytková DNA byla štěpena pomocí DNasy (90 μ l DNase Incubation Buffer + 10 μ l DNase I). Po inkubaci (15 min při laboratorní teplotě) byly vymývány kontaminanty ze vzorků dvěma různými pufrů. Nakonec byla DNA eluována z kolonky pomocí 100 μ l elučního pufru do sterilní mikrozkušavky a následně uložena při -70 °C.

Purifikace virové RNA pomocí kitu *NucleoSpin® RNA* (MACHEREY-NAGEL)

Tento kit obsahuje kromě kolonek se speciální membránou ještě filtry pro snížení viskozity lyzátu, proto byl používán pro purifikaci virové RNA z nasátých klíšťat. Postup izolace byl zachován podle návodu výrobce.

Klíšťata byla po jednom umístěna do sterilních homogenizačních zkumavek obsahujících ocelovou kuličku (5 mm - Qiagen) společně s 350 μ l lyzačního pufru a 3,5 μ l β -mercaptoethanolu. Po homogenizaci (stejný postup jako u kitu ROCHE) byl lyzáát předčištěn pomocí filtru do sběrné zkumavky. Po přidání 350 μ l 70% ethanolu se RNA selektivně navázala na speciální silikagelovou membránu v kolonce. Následně bylo na membránu nanášeno 350 μ l odsolovacího pufru. Zbytková DNA byla štěpena pomocí 95 μ l reakční směsi DNasy. Po inkubaci (15 min při laboratorní teplotě) byly vymývány kontaminanty ze vzorků dvěma různými pufrů. Nakonec byla DNA eluována z kolonky pomocí 60 μ l RNase-free vody do sterilní mikrozkušavky a následně uložena při -70 °C.

RT-qPCR

Vzorky byly po vyjmutí z -70 °C rozmrazeny na ledu, krátce promíchány a centrifugovány.

PCR reakce byla připravována v objemu 10 μ l. Předem byla připravena směs 5 μ l mastermixu (Oasig™ lyophilised OneStep qRT-PCR Mastermix, GENESIG) a 0,5 μ l směsi sondy se specifickými primery (Primerdesign™ Ltd, Tick-borne encephalitis virus, Polyprotein gene, genesig® Advanced Kit, GENESIG) na jeden vzorek. Tato směs byla (po 5,5 μ l) napipetována do 96 jamkového panelu (LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white, ROCHE). Poté byly přidány vzorky izolované RNA nebo pozitivní a negativní kontrola izolace o objemu 4,5 μ l na jamku. Jako další negativní kontrola sloužila vždy alespoň jedna jamka bez přidání templátu. Následně byl panel přelepen průhlednou folií a vzorky v ní byly krátce centrifugovány.

Pro amplifikaci byl použit přístroj LightCycler[®] 480 (ROCHE) s parametry uvedenými v tabulce č. 5.

	kroky	doba trvání	teplota
1 cyklus	reverzní transkripce	10 min	42 °C
	aktivace enzymu	2 min	95 °C
50 cyklů (amplifikace)	denaturace	10 s	95 °C
	syntéza a sběr dat (kanál FAM)	10 min	60 °C

Tab. 5: Parametry nastavení přístroje LightCycler[®] 480

3.4.2. Plaková titrace

Tato metoda (de Madrid a Porterfield, 1969) se používá ke stanovení infekčních titrů virů. Je založena na infekci buněk v suspenzi s následnou kultivací za podmínek dovolujících vznik souvislé vrstvy buněk, ve které množící se virus vyvolá lokalizovaný cytopatický efekt viditelný po fixaci a obarvení jako plak.

V této práci byla plaková titrace použita ke stanovení titru viru 7. pasáže mozkové suspenze VKE (kmen Hypr) využité k infekci klíšťat. Dále bylo provedeno porovnání stanovení titru viru plakovou titrací se stanovením počtu kopií virové genomické RNA v klíšťatech pomocí RT-qPCR.

Plaková titrace byla prováděna v laminárním boxu v 24 jamkových panelech (TPP). Během práce byly vzorky chlazeny na ledu, panely byly v mezičase ukládány do lednice. Nejdříve byla připravena suspenze buněk PS o koncentraci 3×10^5 na 1 ml. Buňky PS byly uvolněny z kultivační lahve pomocí suché trypsinizace a spočítány v Bürkerově komůrce. Po zjištění počtu buněk byla buněčná suspenze naředěna kompletním médiem L15 (popsáno v kap. 3.1.3) na požadovanou koncentraci. Poté byly v tomtéž médiu testované vzorky naředěny desítkovým ředěním (do 180 μ l media bylo přidáno 20 μ l vzorku). Jako negativní kontrola sloužila jedna nebo dvě jamky bez přidání jakéhokoliv vzorku. Následně byla do všech jamek přidána buněčná suspenze buněk PS v množství 300 μ l na jamku. Obsah panelu byl promíchán. Po čtyřhodinové inkubaci při 37 °C a 0,5 % CO₂ byly jamky překryty přelivem z 2x koncentrovaného kultivačního média L15 a 3% roztoku karboxymethylcelulózy (Sigma) v poměru 1:1. Po následné inkubaci (5 dní při 37 °C a 0,5 % CO₂) byly panely nejprve opláchnuty ve fyziologickém roztoku a poté barveny roztokem naftalenové černě (1 g naftalenové černě, 60 ml ledové kyseliny octové, 13,6 g octanu sodného, doplněno do 1 l destilované vody) po dobu 45 minut.

Po oschnutí panelů byl pokus vyhodnocován. V nejvyšším ředění viru, v němž došlo k vytvoření jednotlivých izolovaných plaků, byl zjištěn jejich počet. Výsledek byl vyjádřen počtem plakotvorných jednotek (PFU - *plaque forming units*), který odpovídá počtu infekčních virových částic v původním vzorku. Výsledek byl následně přepočten na ml původní virové suspenze či na jednotlivé klíště.

3.4.3. Porovnání stanovení množství viru pomocí plakové titrace a RT-qPCR

Pro účel porovnání metod detekce byla připravena testovací sada vzorků z 20 infikovaných nenasátých nymf *I. ricinus*.

Z důvodu potřeby likvidace povrchové mykoflóry klíšťat byly nymfy nejprve povrchově desinfikovány. K tomu byla použita metoda (Yoder et al., 2003), která spolehlivě odstranila možné kontaminace interferující s plakovou titrací. Nymfy byly umístěny do sterilní mikrozkušavky (Eppendorf). Desinfekční roztok byl připraven smícháním sterilní deionizované vody, ethanolu a 5% NaOCI v objemovém poměru 18:1:1. K nymfám do mikrozkušavky bylo přidáno 500 µl tohoto roztoku. Po dobu jedné minuty bylo s mikrozkušavkou jemně třepáno. Po odsátí desinfekčního roztoku byla klíšťata třikrát promyta sterilní deionizovanou vodou (1 ml) a následně osušena proužky filtračního papíru o velikosti cca 0,2 x 3 cm.

Z jednotlivých klíšťat byly připraveny homogenáty (3.4.1.) v objemu 250 µl média. Z každého vzorku bylo následně odebráno po 100 µl pro izolaci RNA a pro plakovou titraci.

Dále byly vzorky zpracovány podle postupů uvedených v kapitolách 3.4.1. a 3.4.2., pouze v případě purifikace virové RNA pomocí kitu *High Pure RNA Tissue Kit, Version 0.9* (ROCHE) bylo k 100 µl homogenátu z klíštěte přidáno pouze 300 µl lyzačně-vazebného pufru. Výsledek byl následně přepočten na jednotlivé klíště.

3.4.4. Efektivita přenosu viru v rámci „co-feedingu“

Efektivita přenosu viru v rámci „co-feedingu“ byla testována nasazením označených nymf ze skupiny infikovaných do jednoho kloboučku s nymfami kontrolními. Pokus byl proveden ve 2 opakováních, nasáté nymfy byly testovány 14 dní po dokončení sání.

3.5. Vliv infekce na sání klíšťat

Parametry vývojového cyklu klíšťat byly porovnávány mezi skupinou infikovanou v suspenzi KE (infekce jednotlivých klíšťat nebyla testována) a kontrolní skupinou. Skupina infikovaných v tomto případě tedy zahrnuje jedince qPCR pozitivní a qPCR negativní dle prevalence VKE v daném stádiu. Nasávání klíšťat probíhalo dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.

3.5.1. Rychlost přisátí nymf a dospělců

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda infekce virem KE ovlivní rychlost, jakou se klíšťata přisají na hostitele. Kontrolní skupina zahrnovala celkem 57 nymf a 9 dospělců, skupina infikovaných pak 202 nymf a 12 dospělců. Klíšťata byla kontrolována v přibližně 2 hodinových intervalech. Během kontroly byl vždy zaznamenán počet přisátých klíšťat v daný okamžik. Získaná data byla poté porovnána a statisticky vyhodnocena.

3.5.2. Doba sání nymf a dospělců

Dalším pozorováním byla zjištěna doba, po kterou infikovaná a kontrolní klíšťata sála na myši. Kontrolní skupina zahrnovala celkem 60 nymf a 7 dospělců, skupina infikovaných pak 209 nymf a 8 dospělců. Nymfy i dospělci byli kontrolováni dvakrát denně. Během kontroly byl vždy zaznamenán počet plně nasátých klíšťat v daný okamžik. Získaná data byla poté porovnána a statisticky vyhodnocena.

3.5.3. Hmotnost plně nasátých klíšťat

Pro zhodnocení rozdílů v množství nasáté krve, a tedy i výsledné hmotnosti po nasátí, byla jednotlivá klíšťata po dosátí vážena na analytických vahách (Denver Instrument, SI – 64A, Germany) a jejich váha byla zaznamenána k pozdějšímu porovnání a statistickému zhodnocení. Nasáté larvy byly váženy po 10-20 jedincích a hmotnost byla vyjádřena jako průměr na klíště. Kontrolní skupina zahrnovala celkem 61 larev, 60 nymf a 6 dospělců, skupina infikovaných pak 51 larev, 209 nymf a 8 dospělců.

3.6. Vliv infekce na průběh životního cyklu

Stejně jako v kapitole 3.5. byly i následující parametry vývojového cyklu klíšťat porovnávány mezi skupinou infikovanou v suspenzi VKE (infekce jednotlivých klíšťat nebyla testována) a kontrolní skupinou. Skupina infikovaných v tomto případě tedy zahrnuje jedince qPCR pozitivní a qPCR negativní dle prevalence VKE v daném stádiu klíštěte.

3.6.1. Rychlost přeměny plně nasátých larev a jejich přežívání

Nasáté larvy byly ponechány ve výše popsaných podmínkách chovu. Ve stanovených intervalech (30, 40, 60 a 100 dní od plného nasátí) byl zjištěn podíl živých klíšťat (nasátých larev i převlečených nymf) a převlečených nymf z celkového počtu dosátých klíšťat. Celkem bylo sledováno 51 larev ze skupiny infikovaných a 60 larev kontrolních.

3.6.2. Rychlost přeměny plně nasátých nymf

V tomto experimentu byla sledována doba, za kterou se kontrolní a infikované nymfy přeměnily v dospělé. Nymfy byly kontrolovány v intervalech 20, 30, 50, 70, 80 a 110 dnů od nasátí. Během kontroly byl vždy zaznamenán počet přeměněných nymf. Získaná data (od 27 infikovaných a 10 kontrolních jedinců) byla následně porovnána a statisticky vyhodnocena.

3.6.3. Zastoupení pohlaví

Dalším parametrem pro posouzení rozdílů mezi infikovanými a neinfikovanými jedinci bylo zaznamenání zastoupení pohlaví po metamorfóze u nymf. Sledováno bylo 7 skupin nasátých nymf po dobu 110 dnů od dokončení sání. Získaná data (od 90 jedinců ze skupiny infikovaných a 50 kontrolních jedinců) byla následně porovnána a statisticky vyhodnocena.

3.7. Vliv infekce na reprodukci klíšťat

I v případě experimentů týkajících se reprodukce klíšťat byly parametry porovnávány mezi skupinou klíšťat infikovaných v suspenzi (infekce jednotlivých klíšťat nebyla testována) a kontrolní skupinou. Skupina infikovaných zde tedy zahrnuje jedince qPCR pozitivní a qPCR negativní dle prevalence VKE.

3.7.1. Rychlost kladení vajček

V rámci porovnání rozdílů v průběhu reprodukčního cyklu infikovaných a neinfikovaných jedinců byla zaznamenána doba potřebná od plného nasátí samice po počátek kladení. Samice byly kontrolovány přibližně 2 krát týdně. Získaná data (od 8 infikovaných a 5 kontrolních jedinců) byla následně porovnána a statisticky vyhodnocena.

3.7.2. Rychlost líhnutí larev

Dalším kritériem pro porovnání reprodukčních schopností infikovaných a neinfikovaných klíšťat bylo sledování doby, za kterou se z vykladených vajíček vylíhly první larvy. Jednotlivé snůšky vajíček byly kontrolovány přibližně 2 krát týdně. Získaná data (od 8 infikovaných a 5 kontrolních) jedinců byla následně porovnána a statisticky vyhodnocena.

3.8. Vliv infekce na fototaktickou aktivitu nymf a dospělců

Pro tento experiment byla použita uzavřená aréna rozdělená pevnou průhlednou přepážkou na dvě poloviny, přičemž jedna polovina sloužila pro pokusy s infikovanými a druhá s neinfikovanými klíšťaty (Obr. 8). V aréně byla udržována relativní vlhkost pomocí navlhčené molitanové podložky v rozmezí 70-80 % a teplota cca 25 °C. Nad přepážku arény byl instalován zdroj světla: 50 W, 420 lm, 4200 K.

Do arény byly umístěny Petriho misky, které byly z poloviny zastíněné neprůsvitnou páskou. Druhé poloviny misek zůstaly vystaveny světlu.



Obr. 8: Aréna pro fototaktické experimenty s klíšťaty (foto Eva Výletová)

Do každé misky bylo umístěno max. 10 jedinců na pomezí světla a stínu. Klíšťata byla ponechána v těchto podmínkách přesně jednu hodinu, poté byl zaznamenán počet jedinců nacházejících se na zastíněné a osvětlené polovině. Klíšťata ze skupiny infikovaných byla po provedení experimentu testována na přítomnost VKE pomocí RT-qPCR.

V tomto experimentu byla porovnávána nenasátá qPCR pozitivní klíšťata s klíšťaty kontrolními. Jedinci ze skupiny infikované v suspenzi VKE ale qPCR negativní byli z experimentu vyřazeni. Celkem bylo na fototaxi otestováno 23 infekčních RT-qPCR pozitivních nymf a 8 dospělců, 56 kontrolních nymf a 18 dospělců.

3.9. Vliv infekce na pohybovou aktivitu nymf a dospělců

Stejně jako u fototaktických experimentů i v tomto případě byla porovnávána nenasátá qPCR pozitivní klíšťata s klíšťaty kontrolními. Výsledky získané s qPCR negativními jedinci byly z experimentu vyřazeny.

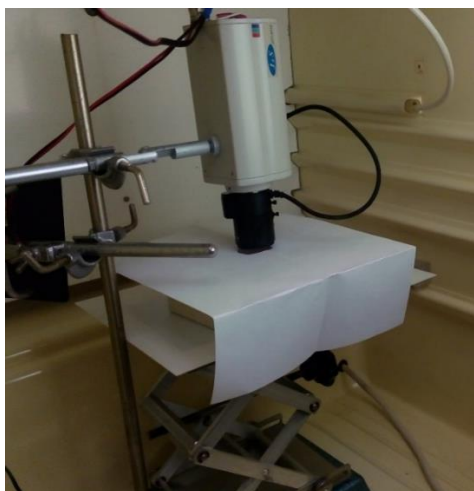
V tomto experimentu byl zjišťován rozdíl v délce trasy, kterou infikovaná nebo neinfikovaná klíšťata urazí během 30 minut. Pro sledování a zaznamenání pohybu bylo využito automatizované videosledování pomocí CCD kamery a softwaru EthoVision (Noldus information technology, 1997).

Klíšťata byla jednotlivě umístěna do jamek 12 jamkového keramického titračního panelu (rozměr jamek: průměr 15 mm, hloubka 2 mm) (Obr. 9). Sledování byli vždy čtyři jedinci daného stádia najednou (2 z infekční skupiny a 2 ze skupiny kontrolní). Přes panel byla přetažena přilnavá průhledná fólie pro zabránění pohybu klíšťat mimo jamku. Panel byl uložen do temperovaného boxu (teplota 21 °C) se stacionární kamerou (Obr. 10). Digitálně zaznamenaná trasa byla následně vyhodnocena ve formátu délky uražené trasy v daném 30 minutovém intervalu.

Celkem bylo takto otestováno 12 RT-qPCR pozitivních nymf a 7 dospělců, 20 kontrolních nymf a 6 dospělců.



Obr. 9: Panel s nymfami připravenými k videosledování (foto Eva Výletová)



Obr. 10: Stacionární kamera CCD v temperovaném boxu - pod papírem vložen panel s klíšťaty (foto Eva Výletová)

3.10. Analýza dat

Data byla statisticky zpracována pomocí programů GraphPad Prism 7 (verze 7.03) a Statistica 13 (verze 13.02), které byly použity spolu s MS Excel i pro vytvoření následných grafů a tabulek. U dat s normálním rozdělením je střední hodnota vyjádřena jako průměr a variabilita dat jako směrodatná odchylka (SD), u dat s rozdělením statisticky průkazně odchylným od normálního rozdělení bylo použito mediánu a rozsahu hodnot. Byly používány následující statistické testy:

- Pearsonův-Chi-kvadrátový test nebo Fisherův exaktní test (v případě nízkých frekvencí) pro porovnání prevalencí
- Kolmogorov-Smirnovův a Shapiro-Wilkův test pro testování shody s normálním rozdělením
- t-test pro data která nevykazovala statisticky významnou odchylku od normálního rozdělení (dvou-výběrový pro 2 nezávislé skupiny dat, případně párový pro porovnání paralelních vzorků v plakové titraci a RT-qPCR apod.); pro data postrádající homogenitu variancí byla uplatněna Welchova korekce
- neparametrické období t-testu, pokud i po transformaci (log) byla distribuce dat statisticky průkazně odlišná od normální (Wilcoxonův párový test, Mann-Whitneyův test
- Mantel-Coxův test a Gehan-Breslow-Wilcoxonův test pro porovnání křivek přežívání klíšťat či rychlosti metamorfózy

Rozdíly s $p < 0,05$ byly považovány za statisticky průkazné. V grafech jsou statisticky významné rozdíly označeny symbolem * pro $p < 0,05$.

4. Výsledky

4.1. Infikování larev klíštěte *Ixodes ricinus*

Larvy byly infikovány ve dvou nezávislých opakováních a následně testovány na přítomnost viru jednak jako nenasáté 14 dní po infekci imerzí a dále také po nasátí přibližně po 3 týdnech po ukončení sání. U nenasátých larev dosahovala prevalence viru KE průměrně (2 opakování) 51,6 % ($SD = \pm 10,17$), u nasátých pak 75 % ($SD = \pm 35,36$), rozdíly mezi opakováními pokusu nebyly statisticky průkazné. Množství viru dosahovalo v mediánu $3,5 \cdot 10^4$ (rozsah $46,7 - 6,5 \cdot 10^5$) kopií/klíště u nasátých larev, kde nebyl průkazný rozdíl mezi opakovanými infekcemi. U nenasátých klíšťat byl však zaznamenán statisticky průkazný rozdíl ($p < 0,01$), kdy při první experimentální infekci bylo dosaženo vyššího mediánu počtu kopií genomu VKE $5,1 \cdot 10^3$ (rozsah $553 - 1,4 \cdot 10^5$) oproti pokusu druhému $1,6 \cdot 10^2$ (rozsah $22 - 1,1 \cdot 10^3$).

Prevalence a množství viru po nasátí infikovaných larev je shrnuto v rámci následující kapitoly (4.2).

4.1.1. Porovnání stanovení množství viru pomocí plakové titrace a RT-qPCR

Porovnáním prevalence VKE u nenasátých nymf paralelně testovaných RT-qPCR (50 %) a plakovou titrací (45 %) nebyl mezi metodami zjištěn statisticky průkazný rozdíl. Výsledek se shodoval u 19 z 20 testovaných klíšťat, v jednom případě byl vzorek pozitivní v RT-qPCR, ale plakovou titrací nebyl virus zachycen. Ten byl naopak zaznamenán při porovnání množství viru v klíšťatech zjištěném těmito dvěma metodami ($p < 0,01$). Počet kopií genomu VKE v RT-qPCR dosáhl mediánu $1,1 \cdot 10^4$ kopií/klíště (rozsah $1,1 \cdot 10^3 - 4,6 \cdot 10^4$), zatímco počet plaků (odpovídá počtu infekčních virových částic) stanovený pomocí plakové titrace dosáhl mediánu pouze $2,0 \cdot 10^2$ PFU/klíště (rozsah $3,5 \cdot 10^1 - 2,0 \cdot 10^3$).

Pomocí plakové titrace byla prokázána existence živých infekčních virových částic v infikovaných klíšťatech po přeměně z larev na nymfy.

4.1.2. Vliv přenosu v rámci „co-feedingu“ na prevalenci viru

Efektivita přenosu viru v rámci „co-feedingu“ klíšťat byla testována nasazením označených nymf ze skupiny infikovaných do jednoho kloboučku s nymfami kontrolními. Pokus byl proveden ve 2 opakováních. V prvním pokusu byly infikovány 4 z 10 původně neinfikovaných nymf (40 %), v opakovaném pokusu pak 2 z 10 (20 %), rozdíly nebyly statisticky průkazné. V obou případech vykazovala myš příznaky typické pro infekci VKE. Množství viru u klíšťat infikovaných v rámci „co-feedingu“ dosahovalo mediánové hodnoty $1,1 \cdot 10^4$ kopií na klíště (rozsah $35-5,2 \cdot 10^4$). V porovnání s množstvím viru u nasátých nymf infikovaných imerzní metodou nebyl nalezen statisticky průkazný rozdíl ($1,3 \cdot 10^4$; $119-9,7 \cdot 10^4$).

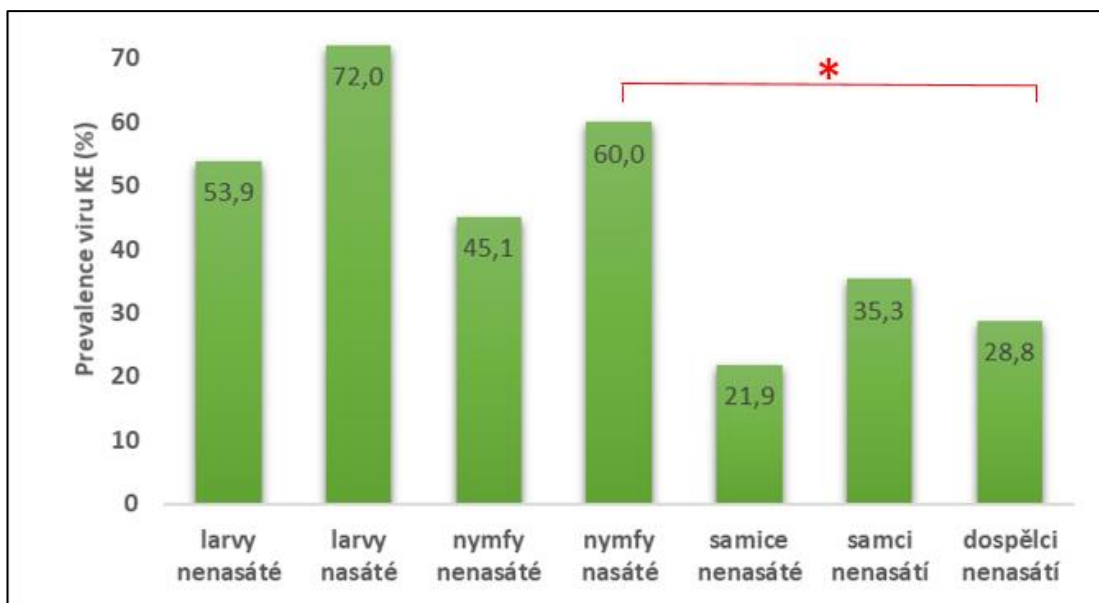
4.2. Prevalence a množství viru v klíšťatech

4.2.1. Vliv sání klíšťat na prevalenci a množství viru

Pro stanovení vlivu sání na prevalenci a množství viru v klíštěti byly pro každé stádium porovnány výsledky získané RT-qPCR pro nenasátá a nasátá klíšťata (Tab. 6, obr. 11 a 12). Zjištěné rozdíly v prevalenci viru mezi nenasátými a nasátými klíšťaty téhož stádia nebyly statisticky průkazné. Stejně tomu bylo u porovnání množství viru.

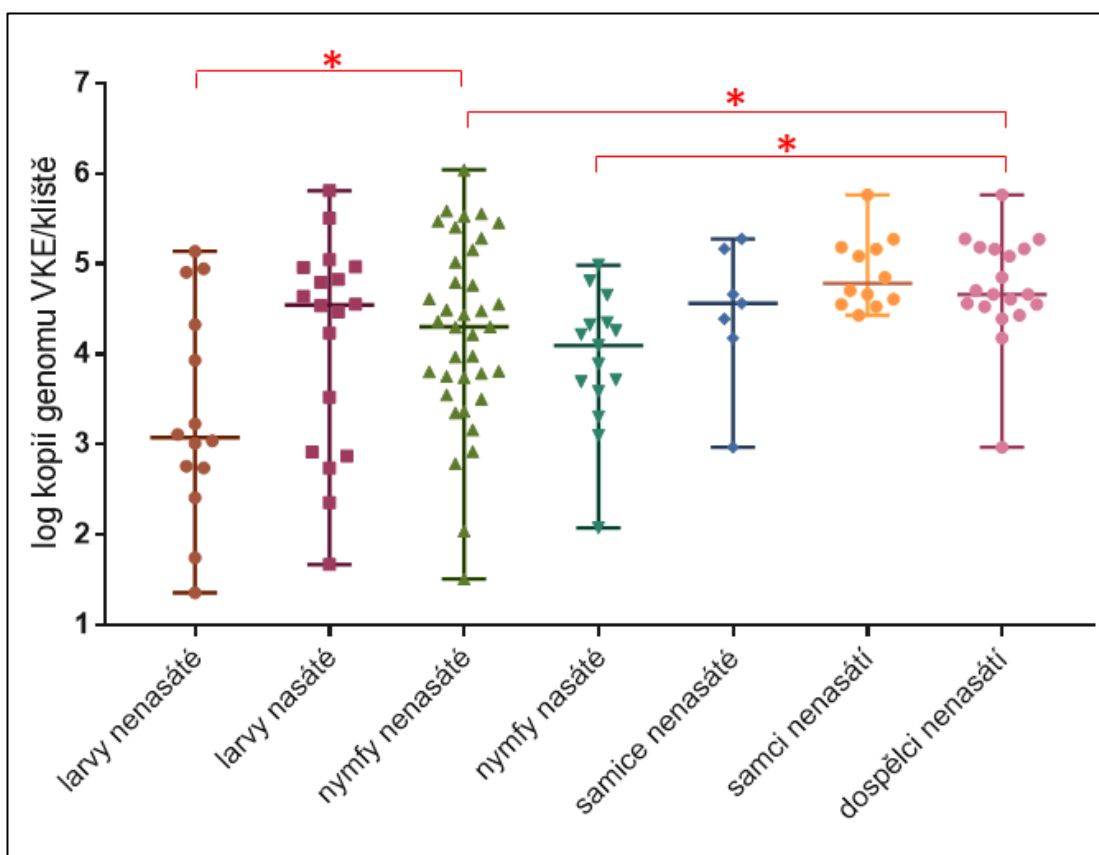
	pozitivní/ testování	prevalence viru (%)	počet kopií genomu VKE/klíště	rozsah
larvy nenasáté	14/26	53,9	$1,2 \cdot 10^3$	22,7 - $1,4 \cdot 10^5$
larvy nasáté	18/25	72,0	$3,5 \cdot 10^4$	46,7 - $6,5 \cdot 10^5$
nymfy nenasáté	37/82	45,1	$2,0 \cdot 10^4$	32,3 - $1,1 \cdot 10^6$
nymfy nasáté	15/25	60,0	$1,3 \cdot 10^4$	119 - $9,7 \cdot 10^4$
samice nenasáté	7/32	21,9	$3,7 \cdot 10^4$	933 - $1,9 \cdot 10^5$
samci nenasátí	12/34	35,3	$6,1 \cdot 10^4$	$2,7 \cdot 10^4$ - $5,8 \cdot 10^5$
dospělci nenasátí	19/66	28,8	$4,6 \cdot 10^4$	933 - $5,8 \cdot 10^5$

Tab. 6: Prevalence a množství viru KE u jednotlivých stádií klíšťat



Obr. 11: Prevalence viru KE u jednotlivých stádií klíšťat *I. ricinus*

Rozdíly s $p < 0,05$ jsou označeny *



Obr. 12: Množství viru KE u jednotlivých stádií klíšťat

Jednotlivé body označují množství viru v klíšťatech, horizontální úsečka medián u dané kategorie a chybové úsečky rozsah, hvězdičky označují statisticky signifikantní rozdíly $p < 0,05$

4.2.2. Porovnání prevalence a množství viru mezi vývojovými stádii

Zjištěné rozdíly v prevalenci mezi nenasátými larvami a nymfami, stejně jako mezi nasátými larvami a nymfami (Tab. 6, obr. 11 a 12), nebyly statisticky průkazné. Průkazný rozdíl v prevalenci u na sebe navazujících stádií byl zjištěn pouze u nasátých nymf (60 %) a nenasátých dospělců (28,8 %) ($p < 0,05$). Zde byl průkazný rozdíl zaznamenán i v případě porovnání množství viru ($p < 0,05$), kde došlo k mírnému nárůstu při metamorfóze nasátých nymf ($1,3 \cdot 10^4$) na dospěléce ($4,6 \cdot 10^4$). Dále byly statisticky významné rozdíly zaznamenány v porovnání množství viru u nenasátých larev ($1,2 \cdot 10^3$) a nymf ($2,0 \cdot 10^4$) a nenasátých nymf ($2,0 \cdot 10^4$) a dospělců ($4,6 \cdot 10^4$) ($p < 0,05$).

4.2.3. Efektivita transovariálního přenosu

Efektivita transovariálního přenosu byla testována na snůškách samic pocházejících ze skupiny klíšťat infikovaných v suspenzi VKE. U dvou samic z této skupiny došlo nejen k úspěšnému vykladení ale také vylíhnutí larev. Larvy byly následně testovány pomocí RT-qPCR na přítomnost VKE (ve směsných vzorcích po 50 jedincích). Z každé samice bylo testováno po 1000 larev. Na přítomnost RNA viru byl pozitivně testován jediný směsný vzorek, minimální proinfikovanost larev pocházejících z infikované samice dosáhla tedy 0,001 %.

4.3. Vliv infekce na sání klíšťat

Parametry vývojového cyklu klíšťat byly porovnávány mezi skupinou infikovanou v suspenzi KE (infekce jednotlivých klíšťat nemohla být testována, aby klíšťata přežila) a kontrolní skupinou. Skupina infikovaných v tomto případě tedy zahrnuje jedince qPCR pozitivní a qPCR negativní s prevalencí VKE přibližně odpovídající výsledkům uvedeným v kapitole 4.2.

4.3.1. Rychlost přisátí nymf a dospělců

Infikované nymfy se statisticky průkazně přisávaly pomaleji (v průměru za 6,1 h; $SD = \pm 6,753$) než nymfy kontrolní (v průměru za 3,5 h; $SD = \pm 2,245$) ($p < 0,001$). Infikovaní dospělci naopak potřebovali k přisátí na myš průměrně kratší dobu (10,9 h; $SD = \pm 16,96$) než kontrolní dospělci (23,4 h; $SD = \pm 27,64$). Tyto rozdíly ovšem nebyly statisticky průkazné.

4.3.2. Doba sání nymf a dospělců

Doba sání u infikovaných a neinfikovaných nymf byla takřka totožná, u obou skupin dosahovala mediánu 76 h. Minimální a maximální doba potřebná k plnému nasátí se u skupiny infikovaných nymf pohybovala mezi 72 a 152 h, u kontrolní skupiny mezi 59 a 120 h. U dospělých samic se však projevil statisticky průkazný rozdíl ($p < 0,05$), kontrolní samice se nasály v průměru za kratší dobu (183,6 h; $SD = \pm 6,986$) než samice infikované (202,5 h; $SD = \pm 15,53$).

4.3.3. Hmotnost plně nasátých klíšťat

Porovnáním hmotnosti klíšťat po nasátí bylo zjištěno, že průměrná hmotnost nasáté larvy činila 0,4059 mg ($SD = \pm 0,2293$) pro skupinu infikovaných a 0,4067 mg ($SD = \pm 0,2293$) pro skupinu kontrolních, rozdíly nebyly statisticky průkazné. Kontrolní nymfy nasály statisticky průkazně ($p < 0,05$) větší množství krve (medián 4,6 mg; rozsah 2,1-5,7 mg) oproti nymfám infikovaným (medián 3,4 mg; rozsah 1,6-5,7 g). U dospělců nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl, obě skupiny (infikovaných i neinfikovaných dospělců) dosahovaly po nasátí v průměru podobné váhy. Infikované samice vážily v průměru 343,2 mg ($SD = \pm 35,41$), samice z kontrolní skupiny 317,3 mg ($SD = \pm 44,7$).

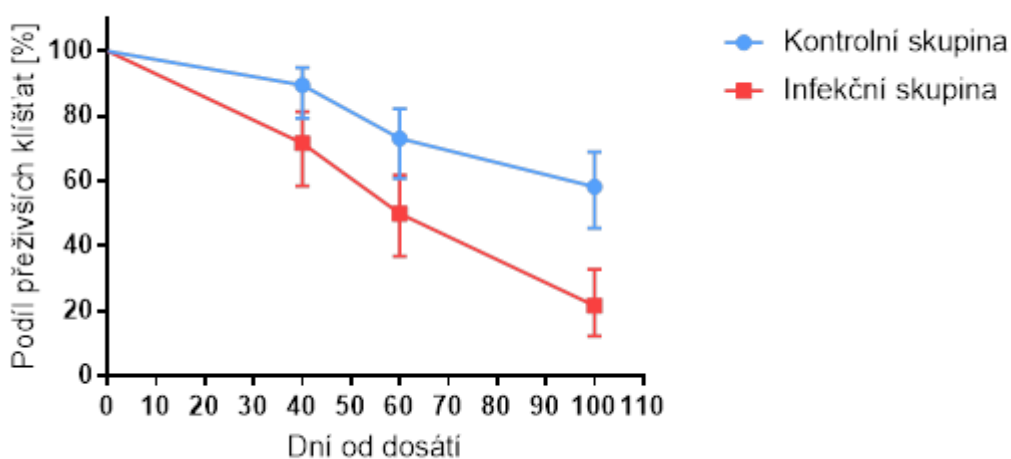
Dále bylo statistickým porovnáním shledáno, že doba sání pozitivně korelovala s hmotností nasátých nymf (Spearman $r=0,2241$; $p<0,05$). Korelace nebyla statisticky průkazná pro samice.

4.4. Vliv infekce na průběh životního cyklu

Stejně jako v kapitole 4.3. byly i následující parametry vývojového cyklu klíšťat porovnávány mezi skupinou infikovanou v suspenzi KE (infekce jednotlivých klíšťat nemohla být testována, aby klíšťata přežila) a kontrolní skupinou. Skupina infikovaných v tomto případě tedy zahrnuje jedince qPCR pozitivní a qPCR negativní s prevalencí VKE přibližně odpovídající výsledkům uvedeným v kap. 4.2.

4.4.1. Rychlost přeměny plně nasátých larev jejich přežívání

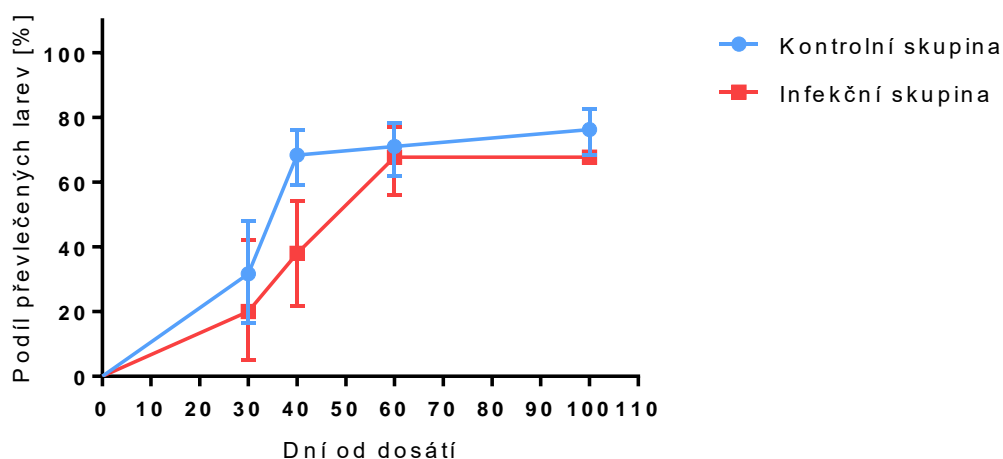
Larvy dosahovaly stupně plného nasátí cca třetí až pátý den (70-120 h). Kontrolní klíšťata přežívala statisticky průkazně lépe ($p<0,001$) než klíšťata ze skupiny infikované VKE (Obr. 13).



Obr. 13: Křivka přežívání nasátých larev klíštěte *I. ricinus*

V jednotlivých bodech je uveden podíl přeživších klíšťat, chybové úsečky označují 95% konfidenční interval.

Metamorfóza z larev na nymfy byla taktéž statisticky průkazně rychlejší u skupiny kontrolních klíšťat než u infikovaných ($p<0,05$). Střední doba potřebná pro metamorfózu dosáhla u skupiny kontrolní 40 dnů, zatímco u skupiny infikované 60 dnů. Ve skupině infikovaných úspěšně metamorfovalo 67,7 % nymf, zatímco ve skupině kontrolní 76,3 % (Obr. 14).



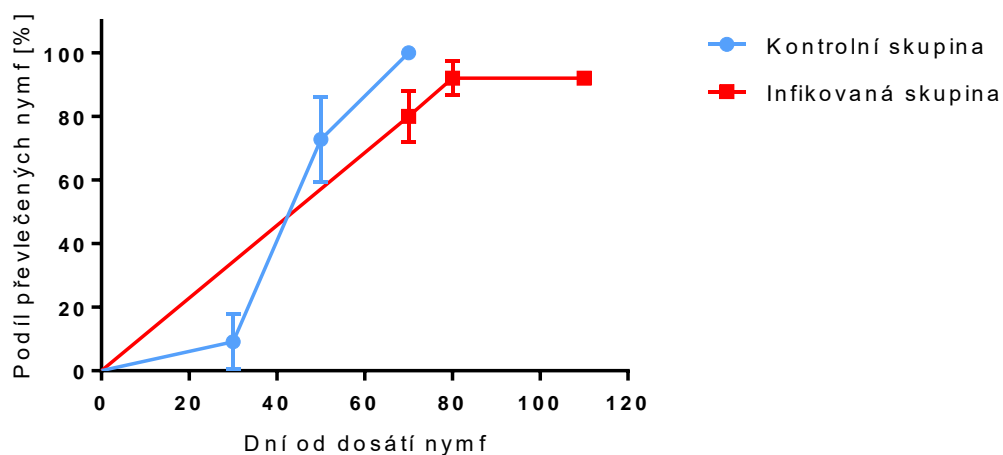
Obr. 14: Průběh metamorfózy u nasátých larev – porovnání skupiny infikované VKE se skupinou kontrolní

V jednotlivých bodech je uveden podíl metamorfovaných klíšťat, chybové úsečky označují 95% konfidenční interval.

4.4.2. Rychlost přeměny plně nasátých nymf

Plně nasáté nymfy byly ponechány ve výše popsaných podmínkách chovu a ve stanovených intervalech byl zjištěn podíl převlečených nymf a zastoupení pohlaví.

Během 110 dnů od dokončení sání prodělalo u infikované skupiny pouze 92 % klíšťat metamorfózu, zatímco u kontrolní skupiny došlo k převlečení všech dosátých nymf. Rychlost převlékání byla i zde statisticky významně vyšší u kontrolní než u infikované skupiny ($p < 0,001$). Střední doba potřebná k metamorfóze dosáhla u infikované skupiny 70 dní, zatímco u kontrolní 50 dní (Obr. 15)



Obr. 15: Průběh metamorfózy u nasátých nymf – porovnání skupiny infikované VKE se skupinou kontrolní

V jednotlivých bodech je uveden podíl metamorfovaných klíšťat, chybové úsečky označují 95% konfidenční interval.

4.4.3. Zastoupení pohlaví

Podíl samic ve skupinách infikovaných klíšťat dosáhl průměrné hodnoty 51,9 % (SD=±15,9). U klíšťat kontrolních bylo samic průměrně 59,29 % (SD=±21,8). Tento rozdíl nebyl statisticky průkazný.

4.5. Vliv infekce na reprodukci klíšťat

I v případě experimentů týkajících se reprodukce klíšťat byly parametry porovnávány mezi skupinou infikovanou v suspenzi KE (infekce jednotlivých klíšťat nemohla být testována, aby klíšťata přežila) a kontrolní skupinou. Skupina infikovaných v tomto případě tedy zahrnuje jedince qPCR pozitivní a qPCR negativní s prevalencí VKE přibližně odpovídající výsledkům uvedeným v kapitole 4.2.

4.5.1. Rychlost kladení vajíček

Rychlost kladení vajíček byla definována jako doba potřebná od plného nasátí samic k vykladení prvních vajíček. Průměrná doba potřebná ke kladení vajíček u skupiny infikovaných klíšťat (18,75 dne, SD=±4,43) nebyla statisticky průkazně odlišná od skupiny kontrolní (15,00 dne, SD=±6,671).

4.5.2. Rychlost líhnutí larev

Rychlost líhnutí larev byla definována jako doba potřebná od počátku kladení samic k vylíhnutí prvních larev. Průměrná doba potřebná k líhnutí larev u skupiny infikovaných klíšťat (34,13 dne, SD=±7,72) nebyla statisticky průkazně odlišná od skupiny kontrolní (37,40 dne, SD=±9,84).

4.6. Vliv infekce na fototaktickou aktivitu nymf a dospělců

Pro připomenutí bych chtěla uvést, že v tomto experimentu byla porovnávána nenasátá klíšťata ze skupiny infikovaných v suspenzi VKE, která byla qPCR pozitivní, s klíšťaty kontrolními. Výsledky jedinců ponořených v suspenzi VKE, kteří ale byli následně qPCR negativní, byly z experimentu vyřazeny.

Preference osvětlené či zastíněné části misky nebyla statisticky průkazná u nymf ani u dospělců a to ani po párovém porovnání skupin z jednotlivých experimentů. Po jedné hodině pobytu klíšťat v Petriho misce byla u qPCR pozitivních nymf zaznamenána fototakticky pozitivní reakce v 61 % a u kontrolních v 48 %. U dospělců byl rozdíl vyšší: 45 % u qPCR pozitivních oproti 26 % u klíšťat kontrolních. Nicméně stále se nejednalo o rozdíl statisticky průkazný.

Klíšťata obecně nepreferovala ani světlo ani stín, jejich rozmístění nebylo statisticky průkazně odlišné od náhodného.

4.7. Vliv infekce na pohybovou aktivitu nymf a dospělců

I v posledním popsaném experimentu byla porovnávána pouze qPCR pozitivní nenasátá klíšťata ze skupiny infikovaných v suspenzi VKE s klíšťaty kontrolními. Výsledky jedinců ponořených v suspenzi VKE, kteří byli následně qPCR negativní, byly z experimentu vyřazeny.

Infikované nymfy urazily během 30 minut experimentu delší trasu než nymfy kontrolní, rozdíl ovšem nebyl statisticky průkazný. Průměrná trasa infikovaných nymf činila 116,4 cm/30 min (SD=±46,52), zatímco kontrolní skupina ušla v průměru 90,7 cm/30 min (SD=±49,95). U dospělců tomu bylo naopak, kontrolní skupina ušla v průměru 65,2 cm (SD=±50,58) a infikovaná 48,6 cm (SD=±29,32). Zaznamenaný rozdíl ani zde nebyl statisticky průkazný.

5. Diskuze

Klíště *I. ricinus* je významným vektorem velkého počtu patogenů, v našich podmínkách především spirochet Lymeské boreliózy a viru KE (Jongejan a Uilenberg, 2004). Klíšťová encefalitida je závažné onemocnění, kterému již bylo věnováno mnoho vědeckých prací. Stále však nejsou zodpovězeny všechny otázky. Tato diplomová práce je věnována studiu vlivu VKE na samotná klíšťata. Kromě obecného významu - doplnění informací k interakcím mezi vektorem a patogenem, má toto téma i praktický dopad. Pokud by docházelo u infikovaných klíšťat ke změnám chování či vývojového cyklu, mohly by tyto změny ovlivnit i intenzitu cirkulace viru KE v přírodě, a tedy i riziko infekce člověka.

Infikování klíšťat a detekce viru KE v klíšťatech

Pro navržené experimenty bylo třeba nakazit klíšťata experimentální cestou, neboť při použití klíšťat sebraných z přírody bychom získali jen málo infekčních jedinců (prevalence VKE se v Evropě pohybuje mezi 0,1 a 5 % (Lindquist a Vapalahti, 2008)). Dalším důvodem k experimentální infekci pro behaviorální a vývojové experimenty je fakt, že jsme chtěli použít co možná nejhomogennější skupinu klíšťat, co do věku, doby uplynuté od posledního sání, energetických zásob a pravděpodobně i složení mikrobiomu tak, aby se experimentální a kontrolní skupina lišily pouze infekcí VKE.

Při výběru vhodné metody infekce VKE jsme využili poznatky získané vypracováním mé bakalářské práce s názvem „Porovnání různých způsobů infekce klíšťat virem klíšťové encefalitidy“ (Výletová, 2015). Existuje několik způsobů infekce klíšťat flaviviry, které mohou být v laboratorní praxi použity. Jedná se o infekci sáním na viremickém hostiteli (Řeháček, 1962), sousáním s infikovanými klíšťaty (Slovák et al., 2014), sáním z kapiláry nebo přes membránu (Bouwknegt et al., 2010), dále inokulací viru do haemocoelu (Labuda et al., 2006; Slovák et al., 2014) nebo ponořením klíšťat do suspenze viru (imerzní metoda) (Mitzel et al., 2007; Belova et al., 2012; Výletová, 2015). Každá z uvedených metod má své výhody a nevýhody, mezi které řadíme blízkost přirozené infekci, nutnost použití živých zvířat, možnost nákazy velkého počtu a různých stádií klíšťat, možnost kvantifikace infekční dávky atd. Tyto faktory jsou samozřejmě relativní vzhledem ke konkrétnímu typu experimentu, pro který jsou klíšťata infikována.

Pro účely této práce byla k infikování klíšťat virem KE zvolena imerzní metoda (adaptovaná dle Mitzel et al., 2007), která spočívá v ponoření larev do virové suspenze. Mezi zásadní výhody tohoto způsobu infekce patří synchronní infekce klíšťat, relativně vysoká účinnost a blízkost přirozenému způsobu infekce. Předpokládá se vstup viru alimentární cestou. Virus je tak následně vystaven všem překážkám jako při přirozené infekci, na rozdíl například od infekce inokulací do hemocoelu, která obchází jak proces trávení, tak bariéru střeva (Nuttall et al., 1994). Metoda infekce klíšťat navíc ovlivňuje i transstadiální přežívání viru (Slovák et al., 2014). U výše zmíněných způsobů infekce VKE je dosahováno prevalence 5-100 %. Efektivita infekce je závislá mimo jiné na výši titru viru a na konkrétním kmeni VKE (Slovák et al., 2014; Výletová, 2015). Z předchozích experimentů (Výletová, 2015) vyplývá, že právě použitý kmen Hypr má vysokou efektivitu infekce imerzní metodou.

Vzhledem k citlivosti a rychlosti provedení jsme pro zjištění prevalence a množství viru KE v klíšťatech standardně používali metodu jedнокrokové RT-qPCR, pomocí které jsme stanovovali počet kopií genomu VKE. Metoda tedy není schopna rozlišit skutečně infekční částice od pouhých kopií RNA, či částic defektních. Infekčnost viru v experimentálně infikovaných klíšťatech a podíl skutečně infekčních částic z celkového počtu kopií genomu VKE jsme stanovili paralelní detekcí VKE

pomocí RT-qPCR a plakové titrace. Obě metody byly podobně citlivé v určení prevalence v nenasátých nymfách (RT-qPCR 50 % prevalence; 10 z 20 vzorků a plaková titrace 45 %; 9 z 20). Ačkoli nevíme, zda důvodem neshody výsledků obou metod u jednoho z klíšťat je obecně nižší citlivost plakové titrace, či potenciální kontaminace vzorku pro RT-qPCR (negativní kontrola izolace i beztemplátová kontrola negativní) nebo skutečná nepřítomnost infekčních virionů, můžeme zobecnit, že většina RT-qPCR pozitivních klíšťat skutečně obsahovala infekční virus. Statisticky průkazný rozdíl byl však zaznamenán u množství viru v klíšťatech detekovaném těmito metodami. Počet kopií genomu VKE v RT-qPCR dosáhl mediánu $1,1 \cdot 10^4$ kopií/klíště, zatímco počet plaků stanovený pomocí plakové titrace dosáhl mediánu pouze $2,0 \cdot 10^2$ PFU/klíště. Infekční viriony tedy tvoří přibližně 1/50 z celkového počtu kopií genomu VKE v nenasátých nymfách infikovaných imerzní metodou jako larvy.

Prevalence a množství viru KE v jednotlivých stádiích klíšťat

Přirozený cyklus VKE v klíšťatech zahrnuje kromě viremického přenosu také přenos v rámci tzv. „co-feedingu“ (nákaza vznikající při společném sání klíšťat na stejném hostiteli v těsné blízkosti u sebe) (Gritsun et al., 2003; Labuda et al., 1993b). Tento fenomén je považován za vysoce účinný mechanismus přenosu zajišťující dlouhodobé přežití VKE v přírodních ohniscích (Labuda et al., 1993b; Randolph et al., 1997). Efektivita „co-feedingového“ přenosu se pohybuje od 10 % až po 93 % procent v závislosti na druhu hostitele a kmenu VKE (Kazimírová et al., 2012; Labuda et al., 1993b, 1993c, 1996; Slovák et al., 2014). Vliv „co-feedingu“ na prevalenci viru KE jsme předpokládali i v našich experimentech, proto jsme se ho pokusili kvantifikovat. Při společném sání s infikovanými nymfami se nakazilo průměrně 30 % nymf neinfikovaných. To je nižší efektivita přenosu, než v případě experimentů Slováka a kolegů (60 %), který měl podobné uspořádání a byl použitý stejný kmen viru. Nicméně jako zdroj infekce byly použity dospělé samice (Slovák et al. 2014). Domníváme se, že efektivitu této cesty přenosu může ovlivňovat i stádium infekčních i infikovaných klíšťat.

Porovnáním prevalence a množství viru u různých vývojových stádií klíšťat před a po sání jsme dospěli k zajímavým výsledkům. V první řadě naše experimenty potvrdily skutečnost, že i u klíšťat infikovaných experimentálně dochází k transstadiálnímu přežívání viru KE v klíšťatech (Benda, 1958a, 1958b; Slovák et al., 2014). Dále jsme zjistili, že prevalence viru KE v průběhu životního cyklu fluktuuje. Po každém sání jsme zaznamenali nárůst prevalence, naopak přeměna do dalšího stádia měla pokaždé za následek její snížení. Tyto výsledky jsou obecně v souladu se studiemi publikovanými dříve (Belova et al., 2012; Slovák et al., 2014). Nejpravděpodobnějším důvodem zvýšení prevalence po sání klíšťat je přenos viru z klíšťat infikovaných na klíšťata dosud neinfikovaná v rámci „co-feedingu“. Zjištěné rozdíly v prevalenci u nenasátých a nasátých klíšťat přibližně odpovídají stanovené efektivitě „co-feedingového“ přenosu. Roli by zde mohl hrát také fakt, že sání klíšťat významně podporuje replikaci viru (Belova et al., 2012; Slovák et al. 2014). Po nasátí tedy může u některých klíšťat překročit množství viru limit detekce použité metody. Vzhledem k tomu, že v našem případě nebyl nalezen statisticky průkazný nárůst množství viru u nasátých klíšťat oproti klíšťatům nenasátým, zásadním příspěvkem je zřejmě přenos v rámci „co-feedingu“.

Pokles v prevalenci byl zaznamenán po metamorfóze larev i nymf, což potvrzuje hypotézu, že proces metamorfózy spojený se značnou histolytickou aktivitou negativně ovlivňuje transstadiální přežívání viru (Nuttall a Labuda, 2003). U klíšťat infikovaných v rámci „co-feedingu“ byla zaznamenána 14% úspěšnost přežívání viru při metamorfóze nasátých nymf na dospělé. V našem případě se

jednalo o úspěšnost přibližně 50 %. Rozdíl může být způsoben například tím, že v našich experimentech byla část klíšťat infikována imerzní metodou jako larvy. V případě viru Powassan dosahovala míra transstadiálního přežívání viru přibližně 10 % pro nasáté larvy a 54 % pro nasáté nymfy klíštěte *I. scapularis* infikované sáním na viremickém hostiteli (Costero a Grayson, 1996).

V případě množství viru byl zaznamenán statisticky významný nárůst vždy v porovnání nenasátých klíšťat jednoho stádia s nenasátými klíšťaty stádia následujícího (larvy a nymfy, nymfy a dospělci). Domníváme se, že množství viru stoupá zároveň se zvětšujícím se tělesným objemem klíštěte a množstvím buněk, které mohou být infikovány.

Vliv infekce VKE na sání klíšťat

Infikované nymfy se přisávaly statisticky průkazně později, ale sály po stejnou dobu jako nymfy kontrolní. Po dosátí však dosahovaly průkazně nižší hmotnosti. Výpočet doby sání byl korigován na čas přisátí, navíc v porovnání s celkovou dobou sání jsou hodinové rozdíly zanedbatelné. Domníváme se tedy, že rozdíl v hmotnosti byl způsoben nižší rychlostí přijímání krve u infikovaných nymf – kontrolní nymfy byly schopné za stejnou dobu přijmout více krve.

Pozorované rozdíly jsou nepřímo potvrzené výsledky získanými u dospělců, kde kontrolní skupina klíšťat potřebovala statisticky významně kratší dobu k plnému nasátí. Zde však rozdíl v dosahovaných hmotnostech nebyl statisticky průkazný. Důvodem může být nižší prevalence VKE u dospělců a tedy zahrnutí větší části fakticky VKE negativních klíšťat. V analogickém pokusu u klíšťat infikovaných boreliemi nebyl pozorován žádný statisticky průkazný efekt na rychlost přisávání (Huspeková, 2014).

Rozdílné počty jedinců při sledování rychlosti přisátí, době sání a hmotnosti plně nasátých byly způsobeny tím, že některá klíšťata unikla pod kloboučkem naší pozornosti nebo u nich nedošlo k úplnému nasátí.

Vliv infekce VKE na průběh životního cyklu klíšťat

Dalšími experimenty jsme chtěli zjistit možný vliv infekce VKE na průběh metamorfózy klíšťat. Obecně docházelo u infikovaných klíšťat (nasátých larev a nymf) k pomalejší metamorfóze, která měla i nižší úspěšnost. U infikovaných klíšťat *I. ricinus* v dříve publikovaných studiích bylo pozorováno naopak zrychlení metamorfózy, ovšem v závislosti na sezónních biorytmech klíšťat a diapauze (Korotkow et al., 2006; Korotkow a Burenkova, 2006; Herrmann et al., 2013). Vliv sezóny nebyl v rámci naší studie zohledněn, takže je možné, že pokud bychom experimenty načasovali do jiného období, dostali bychom jiné výsledky. Přestože jsou klíšťata chována za standardizovaných světelných a teplotních podmínek, určitá míra sezónních změn se v jejich chování projevuje (změny v ochotě přisát se na hostitele, dosát se do stavu plného nasátí apod.).

U infikovaných nasátých larev byla pozorována i vyšší mortalita v porovnání s kontrolními klíšťaty. V dosud publikovaných studiích byl popisován spíše pozitivní vliv sledovaných mikroorganismů na přežívání v neoptimálních podmínkách jako snížená relativní vlhkost (Herrmann et al., 2013) či rezistenci k repelentům (Belova et al., 2012). V případě infekce spirochetami lymeské boreliózy byl ovšem prokázán pozitivní vliv borelií na přežívání jen do určitého hraničního množství spirochét. Po překročení této hranice byl naopak negativní (Herrmann a Gern, 2010). Je možné, že v případě infekce imerzní metodou dochází k infekci vyšším množstvím viru, než je v přírodě běžné. Minimálně v případě částečně nasátých klíšťat odebraných z lidí je ovšem průměrné množství viru na klíště spíše vyšší než v našich výsledcích

(Gäumann et al., 2010; Lindblom et al., 2014). Výše uvedenou hypotézu tedy v případě VKE považujeme spíše za nepravděpodobnou.

Poměr pohlaví se jevil jako další epidemiologický parametr. Jelikož u dospělců klíštěte *I. ricinus* sají krev jen samice (Süss, 2003), mohl by posun poměru pohlaví ve prospěch samic mít pozitivní dopad na cirkulaci viru v přírodě. Lépe by se mohl uplatnit i transovariální přenos. Vliv infekce VKE na poměr mezi pohlavími však nebyl v této diplomové práci prokázán. Obdobně tomu bylo v případě dalších parametrů vývojového cyklu klíštěte spojených s reprodukcí. Nebyly zjištěny rozdíly mezi infikovanou a kontrolní skupinou ani v době potřebné ke snůšce ani líhnutí larev. Naopak byl potvrzen transovariální přenos a jeho poměrně nízká frekvence (Danielová a Holubová, 1991). Z infikované snůšky bylo pozitivních pouze 0,001 % larev. V kombinaci s tím, že maximálně 20 % infikovaných samic (Burgdorfer a Varma, 1967) vůbec přeneše virus na potomstvo je celkový příspěvek transovariálního přenosu opravdu mizivý, nicméně ne nulový. Vezmeme-li v potaz, že larvy z jedné snůšky mohou následně sát na jednom hostiteli, kde se uplatní přenos v rámci „co-feedingu“, může mít tento mechanismus zásadní vliv na přežívání viru v málo aktivních ohniscích (Danielová et al., 2002; Nuttall a Labuda, 2003).

Vliv infekce VKE na fototaktickou aktivitu

Jak již bylo několikrát zmíněno, klíšťata jsou velmi citlivá na nevyhovující podmínky prostředí, zejména na nízkou úroveň vlhkosti ve spojení s vysokými teplotami (Daniel, 2007; Randolph, 2004; Gray et al., 2016). Světlo je zřejmě jedním z důležitých regulátorů aktivity klíštěte (Perret et al., 2003). Pokud by infekce VKE nějakým způsobem fototaktické preference klíšťat měnila, mohla by například prodloužit dobu, po kterou je schopno aktivně číhat na hostitele a zvýšit tak pravděpodobnost jeho nalezení. U klíšťat infikovaných boreliemi bylo takovéto ovlivnění fototaktické aktivity prokázáno u nymf, u dospělců nebyl rozdíl statisticky průkazný (Lefcort a Durden, 1996; Huspeková, 2014). Proto jsme se rozhodli využít již zkonstruovanou arénu (Huspeková, 2014) a zopakovat pokus s klíšťaty infikovanými VKE. Výsledky experimentů však vliv infekce KE na fototaxi klíšťat neprokázaly. Po aklimatizaci se klíšťata infikovaná VKE zdržovala na osvětlené či zastíněné ploše v průměru podobně jako klíšťata neinfikovaná a ani jedna ze skupin nepreferovala osvětlenou, či zastíněnou část arény.

Vliv infekce VKE na pohybovou aktivitu

Poslední experiment byl zaměřen na rozdíly v pohybové aktivitě klíšťat infikovaných a neinfikovaných VKE. Podle některých studií infekce VKE aktivitu klíšťat při vyhledávání hostitele na rozdíl od infekce boreliemi zvyšuje (Alekseev et al., 1988; Lefcort a Durden, 1996; Alekseev et al., 2000; Belova et al., 2012; Romashchenko et al., 2012; Huspeková, 2014). Vyšší aktivita klíšťat by mohla přispět k větší úspěšnosti při vyhledávání hostitele a tím i k efektivnějšímu přenosu patogenu. Dříve publikované studie sledovaly pohyb klíšťat směrem k atraktantu. Bohužel nám se nepodařilo tyto pokusy napodobit, jelikož klíšťata nejevila snahu o pohyb směrem k atraktantu, ani snahu o šplhání po připravených tyčkách simulujících vegetaci. Náš experiment byl koncipován jako sledování délky trasy zdolané klíšťaty za určený časový úsek bez jakékoliv stimulace. Naše výsledky hypotézu zvýšené aktivity infikovaných klíšťat nepotvrdily. Infikované nymfy sice urazily v průměru delší trasu než nymfy neinfikované, tento rozdíl však nebyl statisticky průkazný. Z dospělců byli dokonce kontrolní jedinci aktivnější, ačkoli ani zde ne statisticky průkazně. Odlišné výsledky by mohly být způsobeny absencí atraktantu. Dále by měl být brán zřetel na to, zda byla klíšťata v době pokusu hladová či nikoliv. My jsme v experimentech použili klíšťata vždy nejdříve 30 dní po přeměně, což jsme považovali pro ochotu

klíšťat vyhledávat hostitele za dostačující. Dalším faktorem ovlivňujícím pohyb by mohla být sezónní fluktuace aktivity klíšťat. Vliv těchto faktorů byl však minimalizován přímým porovnáním infikovaných a kontrolních skupin klíšťat ze stejné kohorty.

Počty dospělců použitých v behaviorálních experimentech nebyly z pohledu statistického zhodnocení zcela optimální. Byly plánovány pokusy ještě s jednou skupinou dospělců, u kterých ale, zřejmě vlivem sezónních změn, nedošlo zatím k přeměně z nymf. Také jsme nechtěli navyšovat spotřebu myši nad únosnou míru a během experimentů jsme nemohli měnit model nasávání klíšťat.

Jednou z původních inspirací k testování behaviorálních změn u klíšťat infikovaných VKE byl fakt, že u částečně nasátých klíšťat odebraných z lidí byla opakovaně zjištěna významně vyšší prevalence než u hladových klíšťat volně v přírodě (Mel'nikova et al., 1997; Süss et al., 2006; Belova et al., 2012; Lindblom et al., 2014). Dosud provedené behaviorální analýzy naznačovaly, že infekce VKE může ovlivnit chování klíšťat tak, že zvýší svoji aktivitu při vyhledávání hostitele. Tím by virus KE zvyšoval své šance k přenosu a teoreticky i k napadení člověka. Alternativním vysvětlením je pomnožení viru po nasátí krve, které má za následek překročení limitu detekčních metod, a tedy zdánlivé zvýšení prevalence. Na druhou stranu u nasátých klíšťat odebraných z přirozených hostitelů tak vysoký rozdíl v prevalenci zaznamenán nebyl (Pintér et al., 2013), což odporuje oběma zmíněným hypotézám. Domníváme se, že důvod by mohl mít spojitost s existencí populační genetické variability klíšťat vázané na hostitele (Kempf et al., 2011). Tedy, že člověk je častěji infestován klíšťaty, která jsou vázána na rezervoárového hostitele VKE. Nicméně se zatím jedná o pouhou spekulaci.

6. Závěr

Cílem práce bylo nejprve infikovat klíšťata virem KE a následně určit prevalenci a množství viru KE v infikovaných klíšťatech. Dále byla práce zaměřena na sledování odchylek v chování nebo vývoji infikovaných klíšťat.

- Imerzní metodou se podařilo infikovat larvy *I. ricinus* s dostatečnou prevalencí pro navržené experimenty.
- Byly zjištěny rozdíly v prevalenci i množství viru v jednotlivých stádiích klíštěte. Každé sání prevalenci VKE v klíšťatech zvýšilo, každá přeměna měla naopak za následek její snížení. V případě množství viru byl zaznamenán statisticky významný nárůst vždy v porovnání nenasátých klíšťat jednoho stádia s nenasátými klíšťaty stádia následujícího (larvy a nymfy, nymfy a dospělci).
- Porovnáním různých parametrů chování a vývoje klíšťat *I. ricinus* infikovaných a neinfikovaných VKE byly zjištěny tyto skutečnosti:
 - Infekce virem KE ovlivňuje dobu, za kterou jsou nymfy schopné se přisát na svého hostitele. Infikované nymfy se přisály za delší časové období v porovnání s nymfami neinfikovanými. U dospělců se rozdíl v době přisátí neprojevil.
 - Rozdíl v hmotnosti byl zaznamenán pouze v případě nymf, infikované nymfy nasály menší množství hostitelské krve než neinfikované, přičemž délka sání u nich zůstala nezměněna. Infikovaní dospělci potřebovali k plnému nasátí delší dobu než kontrolní.
 - Infekce virem KE negativně ovlivnila rychlost a úspěšnost přeměny larev i nymf a délku přežívání nasátých larev a nenasátých nymf.
 - Vliv infekce VKE se neprojevil na poměru pohlaví ani sledovaných reprodukčních schopnostech klíšťat.
 - Aktivita klíšťat nebyla infekcí VKE nijak ovlivněna.
 - Infekce VKE nezpůsobila u klíšťat změnu v jejich preferenci osvětlených či neosvětlených stanovišť.

Ačkoliv tato práce nepotvrdila významný vliv VKE na chování klíšťat a jejich vývojový cyklus, přinesla zajímavé poznatky z oblasti dynamiky množení a přežívání viru v průběhu životního cyklu a parametrů alternativních způsobů přenosu jako je přenos v rámci „co-feedingu“ a transovariální přenos. Znalost těchto parametrů je zásadní například pro formulaci epidemiologických modelů cirkulace VKE.

7. Použitá literatura

- Akira S., Takeda K., 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499–511.
- Alekseev A.N., Burenkova L.A., Chunikhin S.P., 1988. Behavioral characteristics of *Ixodes persulcatus* P. Sch. (*Ixodidae*) infected with tick-borne encephalitis virus. *Med. parazitol. (Moscow)*. No. 2. P. 71-75.
- Alekseev A.N., Jensen P.M., Dubinina H.V., Smirnov, L.A., Makrouchina N.A., Zharkov, S.D., 2000. Peculiarities of behaviour of taiga (*Ixodes persulcatus*) and sheep (*Ixodes ricinus*) ticks (*Acarina: Ixodidae*) determined by different methods. *Folia Parasitol. (Praha)* 47, 147–153.
- Alekseev A.N., Korotkow J.S., Burenkova L.A., 1997. Virus–Pesticide interactions in *Ixodes persulcatus* and *Amblyomma hebraeum* ticks (*Acarina: Ixodidae*). *Exp. Appl. Acarol.* 21, 561–568.
- Anderson J.F., 1991. Epizootiology of Lyme borreliosis. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 77, 23–34.
- Anderson R.A., Koella J.C., Hurd H., 1999. The effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infection on the feeding persistence of *Anopheles stephensi* Liston throughout the sporogonic cycle. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 266, 1729–1733.
- Ayllón N., Villar M., Busby A.T., Kocan K.M., Blouin E.F., Bonzón-Kulichenko E., Galindo R.C., Mangold A.J., Alberdi P., Pérez de la Lastra J.M., Vázquez J., de la Fuente J., 2013. *Anaplasma phagocytophilum* Inhibits Apoptosis and Promotes Cytoskeleton Rearrangement for Infection of Tick Cells. *Infect. Immun.* 81, 2415–2425.
- Balogh Z., Egyed L., Ferenczi E., Bán E., Szomor K.N., Takács M., Berencsi G., 2012. Experimental Infection of Goats with Tick-Borne Encephalitis Virus and the Possibilities to Prevent Virus Transmission by Raw Goat Milk. *Intervirology* 55, 194–200.
- Banzhoff A., Bröker M., Zent O., 2008. Protection against tick-borne encephalitis (TBE) for people living in and travelling to TBE-endemic areas. *Travel Med. Infect. Dis.* 6, 331–341.
- Belova O.A., Burenkova L.A., Karganova G.G., 2012. Different tick-borne encephalitis virus (TBEV) prevalences in unfed versus partially engorged ixodid ticks – Evidence of virus replication and changes in tick behavior. *Ticks Tick-Borne Dis.* 3, 240–246.
- Belozerov V.N., 1982. Diapause a biologické rytmy u klíšťat. V: Obenchain FD, Galun R, editory. *Fyziologie klíšťat*. Pergamon Press; Oxford, str. 469-500.
- Benda R., 1958a. The common tick *Ixodes ricinus* L. as a reservoir and vector of tick-borne encephalitis. I. Survival of the virus (strain B3) during the development of the tick under laboratory conditions. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 2.
- Benda R., 1958b. The Common Tick, *Ixodes ricinus* L. as a Reservoir and Vector of Tick-Borne Encephalitis. II. Experimental Transmission of Encephalitis to Laboratory Animals by Ticks at Various Stages of Development. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 2, 331–44.
- Bouwknegt C., van Rijn P.A., Schipper J.J.M., Hölzel D., Boonstra J., Nijhof A.M., van Rooij E.M.A., Jongejan F., 2010. Potential role of ticks as vectors of bluetongue virus. *Exp. Appl. Acarol.* 52, 183–192.

- Burgdorfer W., Varma M.G., 1967. Trans-stadial and transovarial development of disease agents in arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 12, 347–376.
- Burke D.S., Monath T.P., 2001. Flaviviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, London, New York, Tokyo, pp. 1043–1125.
- Busby A.T., Ayllón N., Kocan K.M., Blouin E.F., de la Fuente G., Galindo R.C., Villar M., de la Fuente J., 2012. Expression of heat shock proteins and subolesin affects stress responses, *Anaplasma phagocytophilum* infection and questing behaviour in the tick, *Ixodes scapularis*. *Med. Vet. Entomol.* 26, 92–102.
- Bustin S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 25, 169–193.
- Charrel R.N., Attoui H., Butenko A.M., Clegg J.C., Deubel V., Frolova T.V., Gould E.A., Gritsun T.S., Heinz F.X., Labuda M., Lashkevich V.A., Loktev V., Lundkvist A., Lvov D.V., Mandl C.W., Niedrig M., Papa A., Petrov V.S., Plyusnin A., Randolph S., Süss J., Zlobin V.I., de Lamballerie X., 2004. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 1040–1055.
- Costero A., Grayson M., 1996. Experimental Transmission of Powassan Virus (*Flaviviridae*) by *Ixodes scapularis* Ticks (Acari:Ixodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 55, 536–46.
- Daniel M., Danielová V., Kříž B., Jirsa A., Nožička J., 2003. Shift of the tick *Ixodes ricinus* and tick-borne encephalitis to higher altitudes in central Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2003 May;22(5):327-8.
- Daniel M., 2007. Nové poznatky o klíšťatech a jimi přenášených nákazách. Kurz 294014. Škola veřejného zdravotnictví IPVZ, Praha.
- Danielová V., Daniel M., 2015. Virus klíšťové encefalitidy – Ekologie viru klíšťové encefalitidy „In“ Růžek D., Danielová V., Daniel M., Chmelík V., Chrdle A., Pazdiora P., Prymula R., Salát J. Sýkora J., Žampachová E., 2015. Klíšťová encefalitida, Grada Publishing, Praha
- Danielová V., Holubová J., 1991. Transovarial transmission rate of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks. „In“ *Modern Acarology*, Volume 2. Dusbabek F., Bukva V. (Eds.), p. 7-10. Academia and SPB Academic Publishing bv, Prague and The Hague.
- Danielová V., Holubová J., Pejcoch M., Daniel M., 2002. Potential significance of transovarial transmission in the circulation of tick-borne encephalitis virus. *Folia Parasitol. (Praha)* 49, 323–325.
- de Graaf J.A., Reimerink J.H.J., Voorn G.P., bij de Vaate E.A., de Vrie, A., Rockx B., Schuitemaker A., Hira V., 2016. First human case of tick-borne encephalitis virus infection acquired in the Netherlands, July 2016. *Eurosurveillance* 21.
- de Madrid A.T., Porterfield J.S., 1969. A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bull. World Health Organ.* 40, 113–121.
- Dumpis U., Crook D., Oksi J., 1999. Tick-borne encephalitis. *Clin. Infect. Dis.* 28, 882–890.
- Dyer J., Chisenhall D.M., Mores C.N., 2007. A multiplexed TaqMan assay for the detection of arthropod-borne flaviviruses. *J. Virol. Methods* 145, 9–13.

- Ecker M., Allison S.L., Meixner T., Heinz F.X., 1999. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J. Gen. Virol.* 80, 179–185.
- Ergunay K., Tkachev S., Kozlova I., Růžek D., 2016. A Review of Methods for Detecting Tick-Borne Encephalitis Virus Infection in Tick, Animal, and Human Specimens. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt.* N 16, 4–12.
- Estrada-Peña A., de la Fuente J., 2014. The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antiviral Res.* 108, 104–128.
- Estrada-Peña A., Osácar J.J., Pichon B., Gray J.S., 2005. Hosts and pathogen detection for immature stages of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in North-Central Spain. *Exp. Appl. Acarol.* 37, 257–268.
- Faulde M.K., Robbins R.G., 2008. Tick infestation risk and *Borrelia burgdorferi* s.l. infection-induced increase in host-finding efficacy of female *Ixodes ricinus* under natural conditions. *Exp. Appl. Acarol.* 44, 137.
- Formanová P., Černý J., Bolfíková B.Č., Valdés J.J., Kozlova I., Dzhihoe, Y., Růžek D., 2015. Full genome sequences and molecular characterization of tick-borne encephalitis virus strains isolated from human patients. *Ticks Tick-Borne Dis.* 6, 38–46.
- Gallia F., Rampas J., Hollender L. 1949. Laboratorní infekce encefalitickým virem. *Čas. Lék. Čes.* 9: 224-229.
- Gäumann R., Mühlemann K., Strasser M., Beuret C.M., 2010. High-Throughput Procedure for Tick Surveys of Tick-Borne Encephalitis Virus and Its Application in a National Surveillance Study in Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4241–4249.
- Gilbert L., Aungier J., Tomkins J.L., 2014. Climate of origin affects tick (*Ixodes ricinus*) host-seeking behavior in response to temperature: implications for resilience to climate change? *Ecol. Evol.* 4, 1186–1198.
- Gopko, M.V., Mikheev, V.N., 2017. Parasitic manipulations of the host phenotype: Effects in the internal and external environments 2017.
- Gould, E.A., 1995. Virus cryopreservation and storage. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 38, 7–20.
- Gray J.S., 1998. Review The ecology of ticks transmitting *Lyme borreliosis*.
- Gray J.S., Kahl, O., Lane, R.S., Levin, M.L., Tsao, J.I., 2016. Diapause in ticks of the medically important *Ixodes ricinus* species complex. *Ticks Tick-Borne Dis.* 7, 992–1003.
- Grešíková M., Havránek I., Gorner F. 1960. Vplyv pasterizácie na infektivitu vírusu kliestovej encefalitídy, *Veter. Cas.* 9, 462-469.
- Gritsun T.S., Lashkevich, V.A., Gould, E.A., 2003. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res., Viral Bioterrorism and Biodefence* 57, 129–146.
- Gulia-Nuss M., Nuss A.B., Meyer J.M., Sonenshine D.E., Roe R.M., Waterhouse R.M., Sattelle D.B., de la Fuente J., Ribeiro J.M., Megy K., Thimmapuram J., Miller J.R., Walenz B.P., Koren S., Hostetler J.B., Thiagarajan M., Joardar V.S., Hannick L.I., Bidwell S., Hammond M.P., Young S., Zeng Q., Abrudan J.L., Almeida, F.C., Ayllón, N., Bhide, K., Bissinger, B.W., Bonzon-Kulichenko E., Buckingham S.D., Caffrey D.R., Caimano M.J., Croset V., Driscoll T., Gilbert D., Gillespie J.J., Giraldo-Calderón G.I., Grabowski J.M., Jiang D., Khalil S.M.S., Kim D., Kocan K.M., Koči J., Kuhn R.J., Kurtti T.J., Lees K., Lang E.G., Kennedy R.C., Kwon H., Perera R., Qi Y., Radolf J.D.,

- Sakamoto J.M., Sánchez-Gracia A., Severo M.S., Silverman N., Šimo L., Tojo M., Tornador C., Van Zee J.P., Vázquez J., Vieira F.G., Villar M., Wespiser A.R., Yang Y., Zhu J., Arensburger P., Pietrantonio P.V., Barker S.C., Shao R., Zdobnov E.M., Hauser F., Grimmelikhuijzen C.J.P., Park Y., Rozas J., Benton R., Pedra J.H.F., Nelson D.R., Unger M.F., Tubio J.M.C., Tu Z., Robertson H.M., Shumway M., Sutton G., Wortman J.R., Lawson D., Wikel S.K., Nene V.M., Fraser C.M., Collins F.H., Birren B., Nelson K.E., Caler E., Hill C.A., 2016. Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. *Nat. Commun.* 7. Günther, G., Haglund, M., 2005. Tick-borne encephalopathies: epidemiology, diagnosis, treatment and prevention. *CNS Drugs* 19, 1009–1032.
- Gustafson R., 1994. Epidemiological studies of *Lyme borreliosis* and tick-borne encephalitis. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 92, 1–63.
- Heinz F.X., 2007. Etiology [cit. 2015-6-12] Dostupné z: http://www.tbe-info.com/upload/medialibrary/Monograph_TBE.pdf
- Heinz F.X., 2003. Molecular aspects of TBE virus research. *Vaccine, Tick-Borne Encephalitis: Virus, Disease, and Prevention* 21, S3–S10.
- Heinz F.X., Collet M.S., Purcell R.H., Gould E.A., Howard C.R., Houghton M., Moormann R.J.M., Rice D.M., Theil H.J., 2000. Family Flaviviridae. „In“ van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E., Estes M.K., Lemon S., Maniloff J., Mayo M.A., McGeogch D., Pringle C.R., Wickner R.B. (Eds.), *Virus taxonomy*. In: *Proceedings of the 7th International Committee for the Taxonomy of viruses*. Academic Press, San Diego, California, 859-878.
- Herrmann C., Gern L., 2010. Survival of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) Under Challenging Conditions of Temperature and Humidity is Influenced by *Borrelia burgdorferi* sensu lato Infection. *J. Med. Entomol.* 47, 1196–1204.
- Herrmann C., Voordouw M.J., Gern L., 2013. *Ixodes ricinus* ticks infected with the causative agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, have higher energy reserves. *Int. J. Parasitol.* 43, 477–483.
- Hořejší V., Bartůňková J., 2005. *Základy imunologie*. TRITON, 3. vydání.
- Hubálek Z., Rudolf I., 2007. *Mikrobiální zoonózy a saponózy*, 2. vyd. (učební text), Masarykova univerzita, Brno.
- Huspeková H., 2014. Studium vlivu infekce *Borrelia burgdorferi* sensu lato na chování klíštěte obecného *Ixodes ricinus*. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Přírodovědecká fakulta. Katedra medicínské biologie. Vedoucí práce J. Kopecký.
- Jackson A.C., 2007. Pathogenesis. In: Jackson AC, Wunner WH, editors. *Rabies*. 2nd ed. London: Elsevier Academic Press; p. 341–381
- Jackson B.T., Brewster, C.C., Paulson, S.L., 2012. La Crosse Virus Infection Alters Blood Feeding Behavior in *Aedes triseriatus* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 49, 1424–1429.
- Jenni L., Molyneux D.H., Livesey J.L., Galun R., 1980. Feeding behaviour of tsetse flies infected with salivarian trypanosomes. *Nature* 283, 383–385.
- Johnson, N., 2017. Tick-Virus Interactions: Toll Sensing. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7.
- Jongejan F., Uilenberg G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitology* 129 Suppl, S3-14.

- Kagemann J., Clay K., 2013. Effects of Infection by *Arsenophonus* and *Rickettsia Bacteria* on the Locomotive Ability of the Ticks *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis*, and *Ixodes scapularis*. *J. Med. Entomol.* 50, 155–162.
- Kahl O., Alidousti I., 1997. Bodies of liquid water as a source of water gain for *Ixodes ricinus* ticks (*Acari: Ixodidae*). *Exp. Appl. Acarol.* 21, 731–746.
- Kaiser R., 1999. The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994-98: a prospective study of 656 patients. *Brain J. Neurol.* 122 (Pt 11), 2067–2078.
- Karabatsos N., 1980. General characteristics and antigenic relationships. In: Monath, T.P. (Ed.), *St. Louis Encephalitis*, APHA, Washington, DC, 159–200.
- Kazimířová M., Mantel N., Raynaud S., Slovák M., Ustaniková K., Lang J., Guy B., Barban V., Labuda M., 2012. Evaluation of Chimeric Yellow Fever 17D/Dengue Viral Replication in Ticks. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 12, 979–985.
- Kempf F., de Meeûs T., Vaumourin E., Noel V., Taragel'ová V., Plantard O., Heylen D.J.A., Eraud C., Chevillon C., McCoy K.D., 2011. Host races in *Ixodes ricinus*, the European vector of Lyme borreliosis. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 11, 2043–2048.
- Kiszewski A.E., Spielman A., 2002. Preprandial inhibition of re-mating in *Ixodes* ticks (*Acari: Ixodidae*). *J. Med. Entomol.* 39, 847–853.
- Kopáček P., Hajdušek O., Burešová V., Daffre, S., 2010. Tick innate immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 708, 137–162.
- Korenberg E.I., Kovalevskii Y.V., 1994. A Model for Relationships among the Tick-Borne Encephalitis Virus, Its Main Vectors, and Hosts, in: *Advances in Disease Vector Research*, Advances in Disease Vector Research. Springer, New York, NY, pp. 65–92.
- Korotkow J.S., Burenkova L.A., 2006. Influence of the tick-borne encephalitis virus on metamorphosis of the *Ixodes ricinus* engorged larvae and nymphs. *Sib. Med.* 36–41.
- Korotkow J.S., Burenkov, L.A., Pivanova G., 2006. Tick-borne encephalitis virus as an amplifier of the metamorphosis of *Ixodes ricinus* (*Acari: Ixodidae*) tick nymphs under long-day photoperiodic condition. *Med. Parazitol.* 52–55.
- Krejčí J., 1949. Epidemie virusových meningoencefalitid na Vyškovsku. *Lék. Listy* 4: 73-75, 112-116, 132-134.
- Krejčí J., 1950a. Vlastnosti viru izolovaného mnou z krve a z moku za epidemie meningoencefalitidy na Vyškovsku 1948. *Lék. Listy* 5: 373-381.
- Krejčí J., 1950b. Isolace viru lidské meningoencefalitidy z klíšřat. *Lék. Listy* 5: 406-409.
- Kříž B., Beneš, C., Daniel, M., 2009. Alimentary transmission of tick-borne encephalitis in the Czech Republic (1997-2008). *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. Cas. Spolecnosti Epidemiol. Mikrobiol. Ceske Lek. Spolecnosti JE Purkyne* 58, 98–103.
- Kříž B., Daniel M., Beneš Č., Malý M., Kolář J., Potůčková M., Štefanová E., 2015. Mapování přírodních ohnisek zoonóz přenosných na člověka v ČR a jejich změny ovlivněné modifikacemi klimatu. [cit. 2018-03-03]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/mapovani-prirodnich-ohnisek-zoonoz-prenosnych-na-cloveka-v>.

- Kříž B., Malý, M., Beneš, C., Daniel, M., 2012. Epidemiology of Tick-Borne Encephalitis in the Czech Republic 1970–2008. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12, 994–999.
- Kunz C., Heinz, F.X., 2003. Tick-borne encephalitis. *Vaccine* 21 Suppl 1, S1-2.
- Labuda M., Austyn J.M., Zuffov, E., Kozuch O., Fuchsberger N., Lysy J., Nuttall P.A., 1996. Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology* 219, 357–366.
- Labuda M., Danielová V., Jones L.D., Nuttall, P.A., 1993a. Amplification of tick-borne encephalitis virus infection during co-feeding of ticks. *Med. Vet. Entomol.* 7, 339–342.
- Labuda M., Jones L.D., Williams, T., Danielov V., Nuttall, P.A., 1993b. Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks. *J. Med. Entomol.* 30, 295–299.
- Labud, M., Kozuch O., Zuffov, E., Elecková E., Hails R.S., Nuttall P.A., 1997. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology* 235, 138–143.
- Labuda M., Nuttall P.A., Kozuch O., Elecková E., Williams T., Zuffová E., Sab, A., 1993c. Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature. *Experientia* 49, 802–805.
- Labuda M., Trimnell A.R., Ličkov, M., Kazimírová M., Davies G.M., Lissina O., Hail R.S., Nuttall, P.A., 2006. An Antivector Vaccine Protects against a Lethal Vector-Borne Pathogen. *PLOS Pathog.* 2, e27.
- Lees A.D., Milne A., 1951. The seasonal and diurnal activities of individual sheep ticks (*Ixodes ricinus* L). *Parasitology* 41, 189–208.
- Lefcort H., Durden L.A., 1996. The effect of infection with Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) on the phototaxis, activity, and questing height of the tick vector *Ixodes scapularis*. *Parasitology* 113 (Pt 2), 97–103.
- Levy M., Abi-Warde M.-T., Rameau, A.-C., Fafi-Kremer, S., Hansmann, Y., Fischbach, M., Higel, L., 2016. [Tick-borne encephalitis in a child in a nonendemic country: A case report]. *Arch. Pediatr. Organe Off. Soc. Francaise Pediatr.* 23, 1055–1058.
- Lindblo P., Wilhelmsson, P., Fryland L., Sjöwal J., Haglund, M., Matussek A., Ernerud J., Vene S., Nyman D., Andreassen Å., Forsberg P., Lindgren P.-E., 2014. Tick-borne encephalitis virus in ticks detached from humans and follow-up of serological and clinical response. *Ticks Tick-Borne Dis.* 5, 21–28.
- Lindquist L., Vapalahti O., 2008. Tick-borne encephalitis. *The Lancet* 371, 1861–1871.
- Mandl C.W., 2005. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Res., Replication strategies of neurotropic viruses and influence on cellular functions* 111, 161–174.
- Mandl C.W., Ecker M., Holzmann H., Kunz C., Heinz F.X., 1997. Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerfl and high virulence strain Hypr. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 5), 1049–1057.
- Mans B.J., de Kler, D., Pienaar R., Latif A.A., 2011. *Nuttalliella namaqua*: A Living Fossil and Closest Relative to the Ancestral Tick Lineage: Implications for the Evolution of Blood-Feeding in Ticks. *PLoS ONE* 6.

- Mansfield K., Johnson N., Phipps L., Stephenson J.R., Fooks A., Solomon T., 2009. Tick-borne Encephalitis Virus—A Review of an Emerging Zoonosis.
- Mansfield K., Cook C., Ellis R.J., Bell-Sakyi L., Johnson N., Alberd, P., de la Fuente J., Fooks A.R., 2017. Tick-borne pathogens induce differential expression of genes promoting cell survival and host resistance in *Ixodes ricinus* cells. *Parasit. Vectors* 10.
- Matuschka F.R., Fischer P., Musgrave K., Richte, D., Spielman A., 1991. Hosts on which nymphal *Ixodes ricinus* most abundantly feed. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44, 100–107.
- Mel'nikova O., D Botvinkin A., Danchinova G., 1997. Comparative data on the tick-borne encephalitis virus infectiousness of hungry and satiated taiga ticks (based on the results of an immunoenzyme analysis). *Med. Parazitol. (Mosk.)* 44–9.
- Mitzel D.N., Wolfinbarger J.B., Long R.D., Masnick M., Bes, S.M., Bloo, M.E., 2007. Tick-borne flavivirus infection in *Ixodes scapularis* larvae: development of a novel method for synchronous viral infection of ticks. *Virology* 365, 410–418.
- Morán Cadenas F., Rais O., Humair P.F., Douet V., Moret J., Gern L., 2007. Identification of host bloodmeal source and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in field-collected *Ixodes ricinus* ticks in Chaumont (Switzerland). *J. Med. Entomol.* 44, 1109–1117.
- Mulenga A., 2014. Molecular biology and physiology of chemical communication. „In“ *Biology of Ticks* .2014, Volume 1. Second Edition. Daniel E., Sonenshine and R. Michael Roe (Eds.). Oxford and New York: Oxford University Press.: xv + 540 p.; ill.; index. ISBN: 978-0-19-974405-3.
- Nabbout A.E., Taylor B.J., Kho J., Mitton M., Rossolimo T., 2018. The Correlation of *Francisella tularensis* on Size and Supercooling of *Dermacentor variabilis*. *Int. J. Biol.* 10.
- Naumov R.L., 1999. The exploratory activity of the *Borrelia*-infected taiga tick *Ixodes persulcatus*. *Parazitologiya* 33, 251–256.
- Neelakanta G., Sultana H., Fish D., Anderson J.F., Fikrig E., 2010. *Anaplasma phagocytophilum* induces *Ixodes scapularis* ticks to express an antifreeze glycoprotein gene that enhances their survival in the cold. *J. Clin. Invest.* 120, 3179–3190.
- Nuttall P.A., 1999. Pathogen-tick-host interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE virus. *Zentralblatt Bakteriologie. Int. J. Med. Microbiol.* 289, 492–505.
- Nuttall P.A., Jones L.D., 1991. Non-viraemic tick-borne virus transmission: mechanism and significance. „In“ *Modern Acarology*, Volume 2. Dusbabek F., Bukva V. (Eds.), p. 3-6. Academia and SPB Academic Publishing by, Prague and The Hague.
- Nuttall P.A., Jones L.D., Labuda M., Kaufman W.R., 1994. Adaptations of arboviruses to ticks. *J. Med. Entomol.* 31, 1–9.
- Nuttall P.A., Labuda M., 2004. Tick-host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology* 129 Suppl, S177-189.
- Nuttall P.A., Labuda M., 2003. Dynamics of infection in tick vectors and at the tick–host interface. *Adv. Virus Res.* 60, 233–272.
- Oliver J., 1989. Biology and Systematics of Ticks (Acari:Ixodida). *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 20, 397–430.

- Palus M., Růžek D., 2013. Klíšťová encefalitida – stále více otazníků než jasných odpovědí, *Vakcinologie*, roč. 7, č. 4, s. 158-164. ISSN: 1802-3150.
- Pazdiora P.: Epidemiologie klíšťové encefalitidy. „In“ Růžek D., Danielová V., Daniel M., Chmelík V., Chrdle A., Pazdiora P., Prymula R., Salát J. Sýkora J., Žampachová E., 2015. Klíšťová encefalitida, Grada Publishing, Praha.
- Perret J.L., Guerin P.M., Diehl P.A., Vliman, M., Gern L., 2003. Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*. *J. Exp. Biol.* 206, 1809–1815.
- Perret J.L., Guigoz E., Rais O., Gern L., 2000. Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). *Parasitol. Res.* 86, 554–557.
- Pintér R., Madai M., Vadkerti E., Németh V., Oldal M., Kemenesi G., Dallos B., Gyuranecz M., Kis, G., Bányai K., Jakab F., 2013. Identification of tick-borne encephalitis virus in ticks collected in southeastern Hungary. *Ticks Tick-Borne Dis.* 4, 427–431.
- Pletnev A.G., Karganova G.G., Dzhivanyan T.I., Lashkevich V.A., Bray M., 2000. Chimeric Langat/Dengue Viruses Protect Mice from Heterologous Challenge with the Highly Virulent Strains of Tick-Borne Encephalitis Virus. *Virology* 274, 26–31.
- Pogodina V.V., 1958. The Resistance of Tick-Borne Encephalitis Virus to the Effects of Gastric Juice. *Probl. Virol.* 3, 295–299.
- Policastro P.F., Schwan T.G., 2003. Experimental Infection of *Ixodes scapularis* Larvae (Acari: Ixodidae) by Immersion in Low Passage Cultures of *Borrelia burgdorferi*. *J. Med. Entomol.* 40, 364–370.
- Rajčáni J., Čiampor F., 2006. *Lekárska virológia*. Veda, Bratislava.
- Randolph S.E., Gern L., Nuttall P.A., 1997. Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol. Today Pers. Ed* 12, 472–9.
- Randolph S.E., 2004. Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. *Parasitology* 129 Suppl, S37-65.
- Randolph S.E., 1991. The effect of *Babesia microti* on feeding and survival in its tick vector, *Ixodes trianguliceps*. *Parasitology* 102 Pt 1, 9–16.
- Reese S.M., Beaty M. K., Gabitzsch E. S., Blair C. D., Beaty B. J., 1999. *Aedes triseriatus* females transovarially infected with La Crosse virus mate more efficiently than uninfected mosquitoes. *Journal of Medical Entomology*, 46: 1152-1158.
- Rendi-Wagner P., 2004. Risk and Prevention of Tick-borne Encephalitis in Travelers. *J. Travel Med.* 11, 307–312. <https://doi.org/10.2310/7060.2004.19107>
- Romashchenko A.V., Ratushnyak A.S., Zapara T.A., Tkachev S.E., Moshkin, M.P., 2012. The correlation between tick (*Ixodes persulcatus* Sch.) questing behaviour and synganglion neuronal responses to odours. *J. Insect Physiol.* 58, 903–910.
- Ross D.E., Levin M.L., 2004. Effects of *Anaplasma phagocytophilum* Infection on the Molting Success of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) Larvae. *J. Med. Entomol.* 41, 476–483.

- Rückert C., Bell-Sakyi L., Fazakerley J.K., Fragkoudis R., 2014. Antiviral responses of arthropod vectors: an update on recent advances. *Virusdisease* 25, 249–260.
- Rudolph D., Knülle, W., 1974. Site and mechanism of water vapour uptake from the atmosphere in ixodid ticks. *Nature* 249, 84–85.
- Russell P.K., Brandt W.E., Dalrymple J.M., Brandt W., 1980. Chemical and antigenic structure of flaviviruses.
- Růžek D., 2015a. Patogeneze klíšťové encefalitidy. „In“ Růžek D., Danielová V., Daniel M., Chmelík V., Chrdle A., Pazdiora P., Prymula R., Salát J. Sýkora J., Žampachová E., 2015. Klíšťová encefalitida, Grada Publishing, Praha.
- Růžek D., 2015b. Virus klíšťové encefalitidy – obecná charakteristika. „In“ Růžek D., Danielová V., Daniel M., Chmelík V., Chrdle A., Pazdiora P., Prymula R., Salát J. Sýkora J., Žampachová E., 2015. Klíšťová encefalitida, Grada Publishing, Praha.
- Řeháček J., 1962. Transovarial transmission of tick-borne encephalitis virus by ticks. *Acta Virol.* 6, 220–226.
- Řeháček J., 1965. Development of animal viruses and rickettsiae in ticks and mites. *Annu. Rev. Entomol.* 10, 1–24.
- Salát J., 2015. Klíšťová encefalitida ve veterinární medicíně. „In“ Růžek D., Danielová V., Daniel M., Chmelík V., Chrdle A., Pazdiora P., Prymula R., Salát J. Sýkora J., Žampachová E., 2015. Klíšťová encefalitida, Grada Publishing, Praha.
- Schnettler E., Sterken M.G., Leung J.Y., Metz S.W., Geertsema C., Goldbach R.W., Vlak J.M., Koh A., Khromykh, A.A., Pijlman G.P., 2012. Noncoding flavivirus RNA displays RNA interference suppressor activity in insect and Mammalian cells. *J. Virol.* 86, 13486–13500.
- Schnettler E., Tykalov H., Watson, M., Sharma M., Sterken M.G., Obbard D.J., Lewis S.H., McFarlane M., Bell-Sakyi L., Barry G., Weisheit S., Best S.M., Kuhn R.J., Pijlman G.P., Chase-Topping M.E., Goul E.A., Grubhoffer L., Fazakerley J.K., Kohl A., 2014. Induction and suppression of tick cell antiviral RNAi responses by tick-borne flaviviruses. *Nucleic Acids Res.* 42, 9436–9446.
- Schwaiger M., Cassinotti P., 2003. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J. Clin. Virol.* 27, 136–145.
- Šenigl F., Grubhoffer L., Kopecký J., 2006. Differences in maturation of tick-borne encephalitis virus in mammalian and tick cell line. *Intervirology* 49, 239–248.
- Slípková G., 2014. Vliv oplodnění samic klíštěte *Ixodes ricinus* na průběh sání a trávení hostitelské krve. Středoškolská odborná činnost, Obor:4 - Biologie. SZŠ a VOŠZ České Budějovice. Vedoucí práce P. Kopáček.
- Slovák M., Kazimírová M., Siebenstichová M., Ustaníková K., Klempa B., Gritsun T., Gould E.A., Nuttall P.A., 2014. Survival dynamics of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks. *Ticks Tick-Borne Dis.* 5, 962–969.
- Sonenshine D.E., 1991. *Biology of Ticks*, Volume 1. Oxford University press, New York – Oxford.
- Sonenshine D.E., 1993. *Biology of Ticks*. Volume 2. Oxford University press, New York – Oxford.

- Sonenshine D.E., 2006. Tick pheromones and their use in tick control. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 557–580.
- Státní zdravotní ústav, 2018. Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2008-2017 - absolutně. [cit. 2018-04-03]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2008-2017-absolutne>.
- Süss J., 2003. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine, Tick-Borne Encephalitis: Virus, Disease, and Prevention* 21, S19–S35.
- Süss J., Klaus C., Diller R., Schrader C., Wohank N., Abel, U., 2006. TBE incidence versus virus prevalence and increased prevalence of the TBE virus in *Ixodes ricinus* removed from humans. *Int. J. Med. Microbiol., Proceedings of the VIIIth International Potsdam Symposium on Tick-borne Diseases (IPS-VIII)* 296, 63–68.
- Šimo L. Sonenshine D. E, Park Y., Žitnan D., 2014. The Nervous and Sensory Systems: Structure, Function, Proteomics and Genomics, „In“ *Biology of Ticks, Volume 1. Second Edition.* Sonenshine D.E., Roe R.M. Oxford and New York: Oxford University Press.: xv + 540 p.; ill.; index. ISBN: 978-0-19-974405-3
- Šejda J., Šmerhovský Z., Göpfertová D., 2005. Výkladový slovník epidemiologické terminologie. Vyd. 1. Praha: Grada Publishing, 120 s. ISBN 8024710684.
- Talactac M.R., Yada Y., Yoshii K., Hernandez E.P., Kusakisako K., Maeda H., Galay R.L., Fujisaki K., Mochizuki M., Tanaka T., 2017. Characterization and antiviral activity of a newly identified defensin-like peptide, HEdefensin, in the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Dev. Comp. Immunol.* 68, 98–107.
- Tyso K.R., Piesman, J., 2009. Lyme Disease Spirochete-Tick-Host Interactions. *Adv. Insect Physiol.* 37.
- Volf P., Horák P., 2007. Paraziti a jejich biologie, Triton, Praha
- Výletová E., 2015. Porovnání různých způsobů infekce klíšťat virem klíšťové encefalitidy. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Zemědělská fakulta. Katedra biologických disciplín. Vedoucí práce J. Kopecký.
- Weisheit S., Villar M., Tykalová H., Popara M., Loecherbac, J., Watso, M., Růžek D., Grubhoffe L., de la Fuente J., Fazakerley J.K., Bell-Sakyi L., 2015. *Ixodes scapularis* and *Ixodes ricinus* tick cell lines respond to infection with tick-borne encephalitis virus: transcriptomic and proteomic analysis. *Parasit. Vectors* 8.
- Weststrate A.C., Knappe D., Laverman G.D., Schot B., Prick J.J., Spit S.A., Reimerink J., Rockx B., Geeraedts F., 2017. Increasing evidence of tick-borne encephalitis (TBE) virus transmission, the Netherlands, June 2016. *Eurosurveillance* 22.
- 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. AAEM* 23, 59–63.
- Yoder J.A., Hanson P.E., Zettler L.W., Benoit J.B., Ghisay, F., Piskin K.A., 2003. Internal and External Mycoflora of the American Dog Tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae), and Its Ecological Implications. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4994–4996.

Zilber L. A.,1939. Vesennij (vesenně-letnij) endēmičeskij kleščevoj encefalit. Arch. Biol. Nauk 56 (2): 9-37.