

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

**Porovnání různých způsobů infekce klíšťat
virem klíšťové encefalitidy**

bakalářská práce

Eva Výletová

vedoucí práce:

Prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

konzultant:

Doc. RNDr. Daniel Růžek, Ph.D.

České Budějovice, 2015

Anotace

Cílem bakalářské práce bylo porovnat různé metody experimentální infekce klíšťat *Ixodes ricinus* virem klíšťové encefalitidy. K infekci imerzní metodou byl použit méně virulentní kmen viru Neudoerfl s výsledkem 5 % infikovaných klíšťat a virulentní kmen Hypr – 60 % infikovaných klíšťat. Sáním suspenze viru Neudoerfl z kapiláry se infikovalo 75 % klíšťat, infekce sáním na viremických myších byla neúspěšná. V práci je diskutována vhodnost použití testovaných metod k experimentální infekci jednotlivých vývojových stadií klíšťat.

Klíčová slova: Klíště obecné *Ixodes ricinus*, virus klíšťové encefalitidy, experimentální infekce

Annotation

The aim of the bachelor thesis was to compare various methods of *Ixodes ricinus* tick infection with the tick-borne encephalitis virus. For infection by immersion method, less virulent TBE virus strain Neudoerfl was used resulting in 5 % of infected ticks. Using more virulent strain Hypr provided 60 % of infected ticks. 75 % of ticks became infected with the Neudoerfl virus by capillary feeding. Infection of ticks by feeding on viraemic mice was unsuccessful. Applicability of tested methods for infection of tick life stages is discussed.

Key words: Castor bean tick *Ixodes ricinus*, tick-borne encephalitis virus, experimental infection

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské 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 30. 11. 2015

Eva Výletová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli Prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. a svému konzultantovi Doc. RNDr. Danu Růžkovi, PhD. za pomoc a cenné rady při psaní této práce. Velký dík též patří všem mým kolegům, kteří mi byli oporou po celou dobu studia. Zvláště děkuji RNDr. Martinu Palusovi za pomoc, postřehy a nápady. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za velkou podporu a trpělivost.

Obsah

1	Úvod.....	6
2	Přehled literatury	7
2.1	Klíšťata čeledi Ixodidae	7
2.2	Klíšťata rodu <i>Ixodes</i>	8
2.3	Virus klíšťové encefalidity - charakteristika, zástupci	9
2.4	Klíšťová encefalitida	10
2.4.1	Geografické rozšíření	10
2.4.2	Přenos viru	11
2.4.3	Projevy nákazy	12
2.4.4	Prevence a léčba.....	13
2.5	Metody infekce klíšťat v laboratorních podmínkách	13
2.5.1	Infekce sáním na hostiteli	15
2.5.2	Infekce sousáním	16
2.5.3	Infekce sáním přes membránu	17
2.5.4	Infekce sáním z kapiláry	18
2.5.5	Infekce injekcí.....	19
2.5.6	Infekce imerzní metodou	20
3	Materiál a metody	21
3.1	Laboratorní zvířata	21
3.1.1	Klíšťata	21
3.1.2	Myši.....	21
3.1.3	Morčata	21
3.2	Virus klíšťové encefalidity	21
3.2.1	Neudoerfl.....	22
3.2.2	Hypr.....	22
3.3	Buněčná linie PS	22
3.4	Infikování klíšťat	23
3.4.1	Infekce imerzní metodou	23

3.4.1.1	Imerzní metoda Neudoerfl	23
3.4.1.2	Imerzní metoda Hypr	24
3.4.2	Infekce sáním na viremických myších.....	24
3.4.3	Infekce sáním virové suspenze z kapiláry.....	26
3.5	Detekce viru klíšťové encefalidity v klíšťatech.....	27
3.5.1	Příprava vzorků	27
3.5.1.1	Povrchová desinfekce klíšťat.....	27
3.5.1.2	Homogenizace klíšťat.....	27
3.5.2	Plaková titrace	28
4	Výsledky a diskuze	29
4.1	Infekce imerzní metodou	29
4.1.1	Imerzní metoda Neudoerfl	29
4.1.2	Imerzní metoda Hypr	29
4.2	Infekce sáním na viremických myších.....	30
4.3	Infekce sáním virové suspenze z kapiláry.....	31
4.4	Porovnání použitých metod experimentální infekce	33
5	Závěr	34
6	Použitá literatura.....	35

1 Úvod

Virus klíšťové encefalitidy (dále KE) je rozšířen hlavně ve střední a východní Evropě, Rusku a Dálném Východě. V našich podmínkách je tento flavivirus původcem jedné z nejzávažnějších infekcí centrálního nervového systému člověka.

Hlavním přenašečem viru KE evropského typu je obligátní hematofágní parazit - klíšť obecné *Ixodes ricinus*. V přírodních ohniscích nákazy je virus KE udržován cirkulací mezi klíšťaty, drobnými hlodavci a hmyzožravci. Výskyt viru KE tedy úzce souvisí s jejich biologií a ekologií.

Náklazou virem KE mohou být postiženi mimo již uvedených typických rezervoárových hostitelů též náhodní hostitelé. Kromě člověka se mohou stát náhodnými hostiteli též další savci a ptáci, mimo jiné domestikovaná nebo cizokrajná zvířata chovaná v oblastech výskytu KE.

Klíšťová encefalitida je bezesporu velmi závažné onemocnění, kterému již bylo věnováno mnoho vědeckých prací. Stále však nejsou zodpovězeny všechny otázky, například v oblasti přenosu tohoto patogena a chování klíšťat nakažených KE.

V Evropě se v přírodě pohybuje prevalence viru KE u klíšťat mezi 0,1 a 5% (Lindquist a Vapalahti, 2008). Při výzkumu KE je někdy potřebné nakazit klíšťata v laboratorních podmínkách a dosáhnout mnohem vyšší prevalence viru. K tomu by měla přispět i moje práce, která si klade za cíl vyzkoušet několik metod nakažení klíšťat virem KE a následně porovnat jejich efektivitu. Závěry mé práce mohou pomoci při výběru vhodné metody s ohledem na konkrétní výzkum laboratoře zabývající se náklazou virem KE.

Cíle práce:

- porovnat různé metody infekce klíšťat *Ixodes ricinus* virem KE, konkrétně infekci klíšťat virem imerzní metodou, sáním virové suspenze z kapiláry a sáním klíšťat na viremických myších
- detekovat virus KE v klíšťatech plakovou metodou

2 Přehled literatury

2.1 Klíšťata čeledi Ixodidae

Čeďed' Ixodidae (klíšťatovití) řadíme do kmene Arthropoda (členovci), třídy Chelicerata (klepítkatci), řádu Acarina (roztoči) a podřádu Metastigmata (Ixodida). Tato čeďed' zahrnuje rody *Amblyomma*, *Boophilus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes* a *Rhipicephalus* (Jongejan a Uilenberg, 2004).

Typickým znakem této čeledi je tvrdý štítek (scutum) na hřbetní straně dospělců. U samců kryje téměř celé tělo, zatímco u samic pouze jednu třetinu, což jim při sání umožňuje několikanásobně zvětšit svůj objem. U roztočů obecně rozlišujeme přední - ústní část (gnathosoma) a zadní část (idiosoma). Gnathosoma klíšťat je vybavena typickým ústním ústrojím s chelicerami, palpami a nápadným hypostomem, pomocí něhož se klíšťe udržuje během sání v kůži hostitele. Elastická idiosoma nese nohy a popřípadě i oči (pokud jsou přítomny). Za posledním, čtvrtým párem nohou se nachází vyústění vzdušnic (stigmaty). Larvy klíšťat mají 3 páry končetin, zatímco nymfy a dospělci mají 4 páry končetin (Volf a Horák, 2007).

Trávicí soustava je vakovitého typu s množstvím 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 idiosomy, pohlavní otvor se naopak nachází v její přední části (na břišní straně) (Volf a Horák, 2007).

Hladová klíšťata většinou číhají na svého hostitele na vegetaci. Přítomnost hostitele zjišťují prostřednictvím Hallerova orgánu umístěného na prvním páru končetin. Tento orgán je citlivý na teplo, CO₂ a další chemické sloučeniny. Při kontaktu s hostitelem se klíšťata nepřisají ihned, ale pomocí sensorických orgánů umístěných zejména na palpách si vyhledají nejvhodnější místo k přisátí. 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).

Ixodidae mohou být jedno, dvou nebo tříhostitelské druhy v závislosti na počtu hostitelských zvířat na kterých sají jednotlivá vývojová stadia. Larvy a nymfy se jednou úplně nasají a pak se převlékají. Jednohostitelské druhy se převlékají dvakrát na jednom hostiteli, z larvy na nymfu a z nymfy na dospělé. Dvouhostitelská klíšťata se

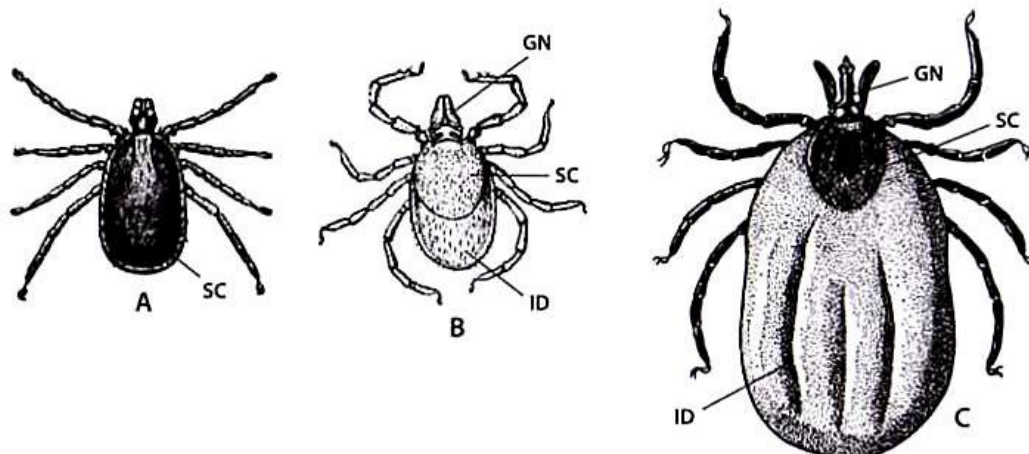
nasají a přemění z larvy na nymfu na jednom hostiteli. Nasátá nymfa odpadne a převléká se mimo hostitele. Dospělec musí najít druhého hostitele, který může, ale nemusí být stejného druhu jako první. Tříhostitelská klíšťata se nepřevlékají na hostiteli. Nasátá larva odpadne, přemění se na nymfu, která musí najít druhého hostitele. Po nasátí na druhém hostiteli se přemění na dospělce, který saje na třetím hostiteli. Dospělci se páří na hostiteli. Samice po nasátí odpadne, naklade velkou snůšku vajíček a umírá (Jongjejan a Uilenberg, 2004).

Kromě čeledi Ixodidae zahrnujeme do podřádu Metastigmata ještě čeleď Argasidae (klíšťákovití). Tato čeleď se od Ixodidae odlišuje především absencí tvrdého hřbetního štítku, četností a délkou sání na hostiteli nebo počtem nymfálních stadií (Volf a Horák, 2007).

2.2 Klíšťata rodu *Ixodes*

Ixodes je nejpočetnější rod tvrdých klíšťat s 241 druhy. Jsou charakteristická zakřivením anální drážky směrem k análnímu otvoru, štítkem postrádajícím výzdobu a absencí očí. Mají tříhostitelský životní cyklus. Mezi nejvýznamnější druhy v Evropě a Asii patří *I. ricinus* a *I. persulcatus*, zatímco *I. scapularis* je nejběžnějším druhem v Severní Americe. Široká škála různých hostitelů *I. ricinus* a *I. persulcatus* z nich činí významné vektory velkého počtu patogenů (Jongjejan a Uilenberg, 2004).

Na většině našeho území se setkáváme nejčastěji s klíšťetem obecným (*Ixodes ricinus* – Linnaeus, 1758) (Volf a Horák, 2007) (Obr. 1). Průměrná doba trvání vývojového cyklu *I. ricinus* ve střední Evropě je dva roky, avšak při nepříznivých podmínkách kterékoli fáze vývoje může trvat déle. Dospělá nenasátá samička má velikost 3-4 mm, zatímco sameček jen 2,5 mm (Heinz 2007). Optimální podmínky pro aktivitu klíšťat *I. ricinus* jsou při teplotě 18–25°C a vlhkosti mezi 86 a 96 %. Tomu odpovídá sezónní aktivita klíšťat s maximem květen - červen a srpen - září (Daniel, 2007).



Obr. 1: Acarina, Ixodida, Ixodidae, *Ixodes ricinus* (klíště obecné)

A – dospělý samec, B – dospělá samice (nenasátá), C – dospělá samice (nasátá), GN – gnathosoma, SC – scutum (štítek), ID – idiosoma (Volf a Horák, 2007).

2.3 Virus klíšťové encefalitidy - charakteristika, zástupci

Virus klíšťové encefalitidy řadíme do rodu *Flavivirus* a čeledi Flaviviridae (Mandl a kol., 1997). V rámci rodu patří virus KE do skupiny savčích flavivirů přenášených klíšťaty, společně s dalšími významnými lidskými patogeny, například virem Louping ill, Langat, Powasan, Omské hemoragické horečky (Gritsun a kol., 2003).

Taxonomicky je virus KE členěn na tři subtypy (Ecker a kol., 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*

Virové částice (viriony) tohoto viru mají kulovitý tvar o průměru 50 – 60 nm. Jsou tvořeny ikozaedrální nukleokapsidou obklopenou fosfolipidovou membránou. Genom viru KE sestává z jednovláknové RNA pozitivní polarity uložené v kapsidě, která je složena z kapsidového proteinu C. Fosfolipidový obal obsahuje dva virem kódované proteiny, obalový glykoprotein E a membránový protein M (Mansfield a kol., 2009).

Protein E zprostředkovává splynutí 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 a kol., 2000). Membránový protein M, který se vyskytuje jen na zralých extracelulárních virionech, vzniká štěpením prekurzoru prM (Rajčáni a Čiampor, 2006).

Díky fosfolipidové membráně může být virus rychle inaktivován pomocí organických rozpouštědel a detergentů (Russell a kol., 1980).

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 a kol., 2003).

Virus KE lze spolehlivě inaktivovat pasterizací při 72°C (Grešíková a kol., 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 (Gritsun a kol., 2003).

2.4 Klíšťová encefalitida

2.4.1 Geografické rozšíření

Klíšťová encefalitida je endemická pro střední a východní Evropu, Rusko a Dálný Východ (Dumpis a kol., 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 klíšťat (Obr. 2).



Obr. 2: Geografické rozšíření *Ixodes* spp (Lindquist a Vapalahti, 2008 – upraveno)

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.

V Evropě bylo v letech 1991–2010 ročně podchyceno průměrně 2 923 onemocnění KE (Kunze a kol., 2012). Na území České republiky bylo mezi lety 1965 a 1992 zaznamenáno 8 690 případů onemocnění KE (roční průměr 310). V letech 1993-2006 bylo zaregistrováno 8 674 případů, roční průměr se tedy zvýšil na 620 (Daniel a kol., 2008).

2.4.2 Přenos viru

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 kopulací (Dumpis a kol., 1999). Další možností nákazy dosud neinfikovaných klíšťat je tzv. sousání (angl. „co-feeding“). Sousání je neviremický přenos nákazy z infikovaného na neinfikované klíště při společném sání na stejném hostiteli, u kterého nemusí být detekovatelná virémie (Labuda a kol., 1993a; Gritsun a kol., 2003).

V přírodních ohniscích nákazy jsou hlavními hostiteli a rezervoáry viru KE drobní hlodavci (Dumpis a kol., 1999). Další zvířata, například ptáci, vysoká zvěř a skot, mohou být virem také infikována. 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 a kol., 2003).

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 a kol., 2009).

2.4.3 Projevy nákazy

Průběh onemocnění KE je ovlivněn řadou faktorů. Velké rozdíly můžeme pozorovat u jednotlivých subtypů viru KE. Infekce evropským subtypem se vyznačuje dvoufázovým průběhem s méně častými trvalými následky a s úmrtností 1–2 %. U dálnovýchodního subtypu dochází k jednofázovému průběhu se vzácným výskytem trvalých následků, zato však s mnohem vyšší úmrtností 5–60 %. Průběh infekce sibiřským subtypem bývá částečně dvoufázový s častými trvalými následky a se sklonem k chronicitě. Úmrtnost se zde pohybuje mezi 1–3 %. (Gritsun a kol., 2003; Charrel a kol., 2004; Günther a Haglund, 2005)

Dále může být průběh KE ovlivněn dávkou viru KE, jež se dostala do organismu, věkem, pohlavím, stavem imunity a 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 (meningitis, meningoencefalitis, meningoencefalomyelitis nebo meningoencefalomyeloradiculitis). Tyto se projevují nervovými příznaky, jako například světloplachost, dezorientace, změny nálad, svalový třes, paralýza kranálních 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 a kol., 2008).

Podobný průběh jako u člověka bývá v případě rozvoje onemocnění sledován též u psů. Další živočišný druh vnímavý k infekci je kůň, ačkoliv onemocnění probíhá ve většině případů asymptomaticky. U přežvýkavců probíhá infekce KE 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)

2.4.4 Prevence a léčba

Přes dlouhodobě probíhající výzkumy v této oblasti ještě nebyl vynalezen účinný lék na infekci virem KE. Léčba spočívá pouze 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 a kol., 1999).

Jedinou možností ochrany proti KE tedy zůstává prevence. Riziko nákazy může být sníženo obecnými preventivními opatřeními, 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 a kol., 2007). V Evropě jsou dostupné dvě vakcíny založené na evropských kmenech 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 a kol. 2004). Všechny tyto vakcíny obsahují viry KE pomnožené v buňkách kuřecích embryí, inaktivované formaldehydem a přečištěné. Vakcíny jsou účinné proti všem třem subtypům viru (Banzhoff a kol., 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 a kol., 2011).

2.5 Metody infekce klíšťat v laboratorních podmínkách

Při experimentálních infekcích klíšťat obecně je velmi důležité pochopení životního cyklu klíšťat, jejich optimálních životních podmínek a přirozených způsobů nákazy patogeny. Snahou je co nejvíce přizpůsobit podmínky v laboratorním chovu klíšťat těm přirozeným. Též při provádění vlastních experimentálních infekcí klíšťat je

kladen důraz na co možná nejpřirozenější způsoby infekce patogeny (Bonnet a Liu, 2012).

Experimentální infekci klíšťat v laboratorních podmínkách již byla věnována řada prací, které se zabývají nákazou viry, bakteriemi i parazity. Některé metody jsou i s jejich pozitivy a negativy shrnuty v Tab. 1

Infection method	Frequency of use	Tick species	Pathogens studied	Key references	Major strengths	Major weaknesses
Direct feeding on the host	Many studies	<i>I. ricinus</i>	<i>B. divergens</i>	Joyner <i>et al.</i> , 1963	Physiologically realistic; Relatively easy set-up; Ability to infect a large quantity of ticks	Expensive; Ethical considerations; Inability to quantify infective dose; Restricted use for wild hosts
		<i>D. andersoni</i>	<i>A. marginale</i>	Kocan <i>et al.</i> , 1986		
		<i>R. appendiculatus</i>	<i>T. parva</i>	Bailey, 1960		
		<i>A. variegatum</i>	<i>T. mutans</i>	Young <i>et al.</i> , 1996		
		<i>A. hebraeum</i>	<i>C. ruminantium</i>	Heyne <i>et al.</i> , 1987		
Injection	Few studies	<i>I. ricinus</i>	<i>B. birtlesii</i>	Reis <i>et al.</i> , 2011a	Ability to quantify infective dose	Physiologically unrealistic; High tick mortality; Live animals needed (ethical and logistical considerations)
		<i>R. appendiculatus</i>	<i>T. parva</i>	Jongejan <i>et al.</i> , 1980		
		<i>D. andersoni</i>	<i>A. marginale</i>	Kocan <i>et al.</i> , 1996		
Capillary	Many studies	<i>I. ricinus</i>	<i>B. burgdorferi</i>	Monin <i>et al.</i> , 1989	Natural infection route; Ability to quantify infective dose	Difficult set-up; Live animals needed (ethical and logistical considerations); Ingestion of blood and pathogen not simultaneous
		<i>D. andersoni</i>	<i>L. pomona</i>	Burgdorfer, 1957		
		<i>R. appendiculatus</i>	<i>T. parva</i>	Purnel et Joyner, 1967		
		<i>A. variegatum</i>	Dugbee virus	Booth <i>et al.</i> , 1991		
		<i>R. sanguineus</i>	<i>E. chaffeensis</i>	Rechav <i>et al.</i> , 1999		
		<i>D. variabilis</i>	<i>A. marginale</i>	Kocan <i>et al.</i> , 2005		
Membrane (animal skin or silicone membrane)	Many studies	<i>I. ricinus</i>	<i>B. henselae</i>	Cotté <i>et al.</i> , 2008	Natural infection route; Ingestion of blood and pathogen simultaneous; Ability to quantify infective dose; No need for live animals; Ability to infect a large quantity of ticks	Daily change of the blood (and risk of contamination); Membrane preparation required; Olfactory stimuli sometimes required (for non-animal membranes)
		<i>A. variegatum</i>	<i>T. mutans</i>	Voigt <i>et al.</i> , 1993		
		<i>R. appendiculatus</i>	<i>B. ruminantium</i>	Young <i>et al.</i> , 1996		
		<i>R. appendiculatus</i>	<i>T. parva</i>	Wallade <i>et al.</i> , 1993		
		<i>I. ricinus</i>	<i>B. divergens</i>	Bonnet <i>et al.</i> , 2007		

Tab. 1: Hlavní silné a slabé stránky experimentálních metod infekce klíšťat patogeny (Bonnet a Liu, 2012).

Uvedeny klíčové modely klíšťat a patogenů se souvisejícími odkazy.

Kromě zde uvedených metod (infekce sáním na hostiteli, injekcí, sáním z kapiláry a sáním přes membránu) se k experimentům používá imerzní metoda infekce a infekce sousáním. Jednotlivým způsobům experimentální infekce patogeny jsou věnovány následující kapitoly.

2.5.1 Infekce sáním na hostiteli

Využití přirozených hostitelů pro infekci klíšťat lidskými patogeny je volbou pro získání podmínek nejbližších fyziologické realitě přenosu. Chov zvířecích hostitelů a manipulace s nimi je však nákladná a složitá, někdy dokonce nemožná. V některých případech, zejména pokud jde o volně žijící živočichy, není možné využití přirozených hostitelů specifických pro některé patogeny přenášené klíšťaty.

Touto metodou je možné infikovat velké množství klíšťat všech stadií. Nelze však určit množství patogenů přijaté během sání a tím je znemožněna standardizace experimentálních podmínek. Také může být někdy složité synchronizovat parazitémii, bakteriémii či virémii hostitele se sáním klíšťat. V neposlední řadě je nutné zmínit etické hledisko. Vždy je žádoucí omezení použití laboratorních zvířat a hledání alternativních postupů.

V laboratořích jsou pro tento způsob nákazy klíšťat patogeny nejčastěji využíváni králíci a myši, někdy i větší zvířata, jako jsou telata a ovce (Bonnet a Liu, 2012). Příklady experimentálních infekcí klíšťat rodu *Ixodes* i s jejich hostiteli ukazuje Tabulka č. 2.

druh klíštěte	druh patogena	druh hostitele	autor práce
<i>I. muris</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>	myš	Dolan a kol., 2000
<i>I. ricinus</i>	<i>Babesia divergens</i>	skot	Joyner a kol., 1963 Donnelly a Peirce, 1975 Lewis a Young, 1980
	<i>Babesia divergens</i>	pískomil	Lewis a Young, 1980; Mackenstedt a kol., 1990
	<i>Borrelia burgdorferi</i> <i>Borrelia garinii</i> <i>Borelia afzelii</i>	myš	Dolan a kol., 1998
	<i>Borrelia burgdorferi</i> <i>Borrelia garinii</i> <i>Borelia afzelii</i>	myš	Fišerová a kol., 2008
	<i>Bartonella birtlesii</i>	myš	Reis a kol., 2011
	<i>Bartonella birletsii</i> <i>Bartonella henselae</i>	myš	Liu a kol., 2013
<i>I. scapularis</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i> <i>Borrelia garinii</i> <i>Borelia afzelii</i>	myš	Dolan a kol., 1998
	<i>Borrelia burgdorferi</i>	myš	Burkot a kol., 2001
	<i>Ehrlichia muris</i>	myš	Saito a Walker, 2015

Tab. 2: Příklady experimentálních infekcí klíšťat rodu *Ixodes* sáním na hostiteli.

Uvedeny příklady druhů klíšťat, patogenů a hostitelů použitých při experimentálních infekcích klíšťat rodu *Ixodes* se souvisejícími odkazy.

2.5.2 Infekce sousáním

Kromě předchozí techniky infekce sáním na viremickém hostiteli se k experimentální infekci patogeny používá metoda společného sání infikovaných a neinfikovaných klíšťat na neviremickém hostiteli. Ačkoli jde především o virové infekce, tato metoda již byla použita i pro infekci boreliemi (Gern a Rais, 1996).

Při těchto experimentech je využíváno zjištěných poznatků o sousání. Jak ukazuje např. práce Labudy a kol. (1996), sousání má velký podíl na přenosu viru a jeho cirkulaci v přírodě.

Principem metody je infikovat neinfekční jedince sáním na hostiteli v blízkosti infikovaných klíšťat. Klíšťata při sání na hostiteli střídavě sají krev a vylučují sliny,

keré v případě infekčních jedinců mohou obsahovat patogen (Jones a kol., 1997; Labuda a kol., 1993). Bylo zjištěno, že klíště během sání vylučuje 30-50 % tekutiny zpět do hostitele (Bowman a kol., 2008). Tato tekutina může být přijata při společném sání neinfikovaným klíštětem (Labuda a kol., 1993).

Tato metoda se ukazuje jako vhodný způsob napodobující přirozenou cestu infekce všech stadií klíšťat. Dochází zde k synchronní infekci, není však možné kvantifikovat infekční dávku patogena. K jejímu provedení je nutné použití živého hostitele, u kterého však není potřeba navodit virémii (Labuda a kol. 1993, Randolph 2011; Slovák a kol., 2014).

Příklady experimentálních infekcí klíšťat rodu *Ixodes* sousáním ukazuje Tabulka č. 3.

druh klíštěte	druh patogena	autor práce
<i>I. acinus</i>	Louping ill virus	Jones a kol., 1997
<i>I. ricinus</i>	virus KE	Labuda a kol., 1993a
		Labuda a kol., 1993b
	Borrelia burgdorferi	Slovák a kol., 2014
		Gern a Rais, 1996

Tab. 3: Příklady experimentálních infekcí klíšťat rodu *Ixodes* sousáním.

Uvedeny příklady druhů klíšťat, patogenů a hostitelů použitých při experimentálních infekcích klíšťat rodu *Ixodes* se souvisejícími odkazy.

2.5.3 Infekce sáním přes membránu

Tato technika spočívá v sání krve nebo kultivačního média s přídavkem patogena přes membránu. Membrána může být živočišného nebo umělého původu. Z živočišných jmenujme například buněčnou membránu z kuřecích embryí, kůži skotu, králíka, myši a pískomila. Umělá membrána může být vyrobena například ze silikonu.

Metoda infekce sáním přes membránu je dalším ze způsobů blízcím se přírodní cestě infekce. Umožňuje simultánní příjem krve nebo média a patogena, u kterého je možné kvantifikovat infekční dávku. Další výhodou je možnost nakažení velkého počtu klíšťat bez použití živého hostitele. Tato metoda však vyžaduje přípravu membrány a někdy (v případě použití membrány z umělého materiálu) i čichových podnětů. Jako čichový podnět může být použita atmosféra s obsahem CO₂ mezi 5 a

10 %, srst nebo vlasy hostitelů, klíštěcí výkaly nebo uměle vyrobené feromonové směsi (Bonnet a Liu, 2012).

Příklady experimentálních infekcí klíšťat rodu *Ixodes* sáním přes membránu i s druhy použitých membrán ukazuje Tabulka č. 4.

druh klíštěte	druh patogena	druh membrány	autor práce
<i>I. hexagonus</i>	bluetongue virus	silikon	Bouwknegt a kol., 2010
<i>I. ricinus</i>	<i>Borrelia divergens</i> <i>Bartonella henselae</i>	kůže pískomila a králíka	Bonnet a kol., 2007 Cotte a kol., 2008
	<i>Anaplasma phagocytophylum</i>	silikon	Robinson a kol., 2010
	bluetongue virus	silikon	Bouwknegt a kol., 2010
	<i>Bartonella birletsii</i> <i>Bartonella henselae</i>	kůže králíka	Liu a kol., 2013
<i>I. scapularis</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>	myší kůže	Burkot a kol., 2001

Tab. 4: Příklady experimentálních infekcí klíšťat rodu *Ixodes* sáním přes membránu

Uvedeny příklady druhů klíšťat, patogenů a hostitelů použitých při experimentálních infekcích klíšťat rodu *Ixodes* se souvisejícími odkazy.

2.5.4 Infekce sáním z kapiláry

Tato metoda též využívá přirozenou cestu nákazy klíštěte přes ústní ústrojí a trávicí trakt. Kapilára s patogenem v roztoku média je klíštěti nasazena na ústní ústrojí, čímž je umožněno klíštěti patogena nasát a následně se infikovat (Bonnet a Liu, 2012).

Výhodou metody je, že umožňuje příjem média a patogena, u kterého je možné kvantifikovat infekční dávku (Bonnet a Liu, 2012). Klíště však touto technikou požije velmi malé množství tekutiny (1-3 μ l), protože sání z kapiláry pro něj není přirozený způsob krmení (Burgdorfer 1957; Rechav a kol., 1999). Jsou zde též špatně replikovány přírodní přenosové podmínky. Klíště může touto technikou přijmout velké množství patogena bez krve. Za normálních okolností je však patogen klíštětem absorbován po celou dobu sání na hostiteli, kdy již u klíštěte začalo trávení.

Další nevýhodou je nutnost alespoň částečného nasátí klíšťat na přirozeném hostiteli, a to před nebo po sání z kapiláry. Tato metoda tedy neumožňuje klíštěti simultánní příjem krve a patogena a k jejímu provedení je potřeba živých zvířat (Bonnet a Liu, 2012).

Příklady experimentálních infekcí klíšťat rodu *Ixodes* sáním z kapiláry ukazuje Tabulka č. 5.

druh klíštěte	druh patogena	autor práce
<i>I. hexagonus</i>	bluetongue virus	Bouwknegt a kol., 2010
<i>I. ricinus</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Monin a kol., 1989
	bluetongue virus	Bouwknegt a kol., 2010
<i>I. scapularis</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Broadwater a kol., 2002
	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Korshus a kol., 2003
	<i>Rickettsia monacensis</i>	Baldrige a kol., 2007
<i>I. sinensis</i>	<i>Rickettsia monacensis</i>	Ye a kol., 2014

Tab. 5: Příklady experimentálních infekcí klíšťat rodu *Ixodes* sáním z kapiláry

Uvedeny příklady druhů klíšťat, patogenů a hostitelů použitých při experimentálních infekcích klíšťat rodu *Ixodes* se souvisejícími odkazy.

2.5.5 Infekce injekcí

Infekce klíšťat přímým očkováním přes kutikulu nebo anální otvor neodpovídá přirozené cestě nakažení klíštěte patogenem (přes ústní ústrojí do trávicího traktu během sání krve) (Bonnet a Liu, 2012). Tento rozdíl může mít závažné důsledky pro vývoj patogena, zvláště když tento patogen prochází několika vývojovými stádii v klíšťecím střevě (Chauvin a kol., 2009). V důsledku nepřirozené cesty této infekce může být též obtížné výsledky experimentů vztahovat k přirozené nákaze (Bonnet a Liu, 2012).

Tato technika umožňuje kvantifikovat infekční dávku (Bonnet a Liu, 2012), není však praktická pro běžnou infekci klíšťat patogeny z důvodu vysoké úmrtnosti infikovaných klíšťat (Rechav a kol., 1999). Zvýšení míry přežití klíšťat vyžaduje po infekci jejich nasátí na přirozených hostitelích (Bonnet a Liu, 2012).

Co se týče transstadiálního přenosu patogenů v klíštěti, ukázalo se, že při využití této metody může být prevalence viru KE po přeměně klíšťat do dalšího stadia daleko vyšší než při infekci přirozenou cestou (Slovák a kol., 2014).

Příklady experimentálních infekcí klíšťat rodu *Ixodes* injekcí ukazuje Tabulka č. 6.

druh klíštěte	druh patogena	autor práce
<i>I. ricinus</i>	virus KE	Labuda a kol., 2006 Slovák a kol., 2014
<i>I. scapularis</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Kariu a kol., 2011

Tab. 6: Příklady experimentálních infekcí klíšťat rodu *Ixodes* injekcí

Uvedeny příklady druhů klíšťat, patogenů a hostitelů použitých při experimentálních infekcích klíšťat rodu *Ixodes* se souvisejícími odkazy.

2.5.6 Infekce imerzní metodou

Tato technika spočívá v ponoření klíšťat do média obsahujícího patogen. Využívá přirozenou schopnost klíšťat – zachování rovnováhy vody aktivní absorpcí. Tento mechanismus probíhá u nenasátých klíšťat přes ústní dutinu (Rudolf a Knulle, 1974). Imerzní metoda je tedy další z metod blízcích se přirozené nákaze. Používá se nejčastěji u larev, přičemž je možno synchronně nakazit velké množství jedinců. Tato metoda nevyžaduje žádné speciální vybavení, k jejímu provedení je však potřeba živých zvířat (sání krve po infekci). Nespornou výhodou je snadné provedení experimentu a reprodukovatelnost podmínek infekce. (Policastro a Schwan, 2003; Mitzel a kol., 2007; Fišerová a kol., 2008).

Příklady experimentálních infekcí klíšťat rodu *Ixodes* imerzní metodou ukazuje Tabulka č. 7.

druh klíštěte	druh patogena	autor práce
<i>I. ricinus</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i> <i>Borrelia garinii</i> <i>Borelia afzelii</i>	Fišerová a kol., 2008
<i>I. scapularis</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Policastro a Schwan, 2003
	Langat virus	Mitzel a kol., 2007 McNally a kol., 2012
	<i>Rickettsia monacensis</i>	Baldrige a kol., 2007
<i>I. sinensis</i>	<i>Rickettsia monacensis</i>	Ye a kol., 2014

Tab. 7: Příklady experimentálních infekcí klíšťat rodu *Ixodes* imerzní metodou

Uvedeny příklady druhů klíšťat, patogenů a hostitelů použitých při experimentálních infekcích klíšťat rodu *Ixodes* se souvisejícími odkazy.

3 Materiál a metody

3.1 Laboratorní zvířata

3.1.1 Klíšťata

Klíšťata *Ixodes ricinus* (larvy, nymfy, dospělci) použitá pro experiment pocházela z chovu klíšťat Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i.. Klíšťata byla chována v konstantních podmínkách při vlhkosti 98 %, teplotě 24 °C a světelném režimu nastaveném na 15 hodin světla a 9 hodin tmy. Tato klíšťata byla první generací odchovanou v laboratoři, původně byla získána ze snůšek dospělých samic odchytených v přírodě.

3.1.2 Myši

Pro experimenty byly použity SPF (specific-pathogen-free) samice myší kmene BALB/c a C3H/HeN, 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 Morčata

Pro experimenty byla použita morčata odchovaná v Laboratorních chovech Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR, v.v.i..

3.2 Virus klíšťové encefalitidy

Pro experimentální infekci klíšťat byly použity dva kmeny viru KE, kmen Neudoerfl a kmen Hypr. Oba kmeny virů byly uchovávány ve formě 20 % mozkové

suspenze při -70 °C. Manipulace s těmito patogeny probíhala sterilně v boxu s laminárním prouděním (Esco Airstream Class II) za přísných bezpečnostních podmínek (BSL2).

3.2.1 Neudoerfl

Jedná se o prototypový kmen evropského subtypu, který byl izolován v roce 1971 v Rakousku z klíštěte *Ixodes ricinus* (Mandl et al., 1988). K experimentům byla použita 4. a 5. pasáž viru v mozcích sajících myšek.

3.2.2 Hypr

Tento kmen byl původně izolován z krve 10letého dítěte s diagnózou KE v roce 1953 v České republice. K experimentům byla použita 7. pasáž viru v mozcích sajících myšek.

3.3 Buněčná linie PS

Buněčná linie PS (angl. porcine kidney stable; prasečí ledvina) byla v této práci používána pro plakovou titraci. Kultivace této linie probíhala v médiu L15 (Leibowitz) s 3% prekolostálního 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 vždy uvolněny pomocí suché trypsinizace. Ta byla prováděna dvojitým oplachem sterilním PBS („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.

3.4 Infikování klíšťat

3.4.1 Infekce imerzní metodou

3.4.1.1 Imerzní metoda Neudoerfl

Tato metoda (Mitzel a kol., 2007) byla vyvinuta k synchronní infekci larev klíšťat *Ixodes scapularis* ponořením do média obsahující virus Langat. Metoda má původ v experimentální imerzní infekci larev *I. scapularis* bakteriemi *Borrelia burgdorferi* (Policastro a Schwan, 2003). Pro potřeby této práce byla metoda vyzkoušena s larvami klíšťat *I. ricinus* a s virem Neudoerfl.

Předem byly připraveny dvě samice myši kmene C3H/HeN. Myšim byla oholena srst z části hřbetu. Na oholenou oblast byl přilepen speciálně vyrobený klobouček, který byl ještě dále zafixován náplastí.

Larvy *I. ricinus* byly udržovány při laboratorní teplotě a relativní vlhkosti 98 % v místnosti s 15 h: 9 h cyklem světlo: tma. Před vlastním experimentem byly larvy vystaveny 1 h snížené vlhkosti – 65% relativní vlhkost. Bylo použito cca 200 larev *I. ricinus*.

Infekce probíhala v laminárním boxu za přísných bezpečnostních podmínek.

Do dvou mikrozkušavek typu Eppendorf bylo napipetováno 250 μ l kompletního média L15. Poté bylo do obou mikrozkušavek přidáno po cca 100 kusech larev *I. ricinus*. Dále bylo napipetováno 250 μ l viru KE kmene Neudoerfl o titru 2×10^7 PFU/ml do jedné mikrozkušavky. Celkové množství viru zde bylo tedy 5×10^6 PFU. Do druhé mikrozkušavky bylo přidáno 250 μ l kompletního média L15. Tato zkušavka sloužila jako negativní kontrola. Všechny označené zkušavky byly uloženy do termostatu na 45 min při 34°C, přičemž byly každých 10 min jemně promíchány. Po inkubaci byly larvy 2 min chlazeny na ledu. Zchlazené larvy byly centrifugovány při 200 g po dobu 30 s a poté dvakrát promyty vychlazeným roztokem PBS (500 μ l). Po promytí byly larvy osušeny proužky filtračního papíru o velikosti cca 0,2 x 3 cm.

Do jedné hodiny po promytí byly obě skupiny larev zvlášť nasazeny na myši kmene C3H/HeN. Připravené myši byly vloženy do speciálně vyrobené drátěné sítky s otvorem na klobouček. Po vložení larev byly kloboučky zavíčkované zátkami z perforovaného plastu, které zamezily úniku larev a zároveň zajistily sajícím larvám příznivé mikroklima. Chovné nádoby s myšmi byly uloženy do větších nádob s vodou

(cca 3 cm ode dna), aby se zcela zamezilo případnému úniku larev do volného prostoru.

Po třech měsících od nakažení, kdy se již z larev vyvinuly nymfy, byla provedena homogenizace klíšťat v třecí misce (metoda popsána níže).

3.4.1.2 Imerzní metoda Hypr

Při tomto experimentu jsme též vycházeli z práce Mitzel a kol.(2007).

Larvy a nymfy *I. ricinus* byly udržovány při laboratorní teplotě a relativní vlhkosti 98 % v místnosti s 15 h: 9 h cyklem světlo: tma. Před vlastním experimentem byly nymfy vystaveny 6 dní snížené (65%) vlhkosti. Larvy byly vystaveny 4 h snížené (65 %) vlhkosti.

Infekce probíhala v laminárním boxu za přísných bezpečnostních podmínek.

Do čtyř mikroskopů typu Eppendorf bylo napipetováno 150 μ l kompletního média L15. Poté byla do mikroskopů rozdělena klíšťata. Pro infekci bylo použito zvlášť cca 70 larev a 40 nymf, pro negativní kontrolu zvlášť cca 30 larev a 20 nymf. Po přidání 50 μ l viru Hypr o titru $3,8 \times 10^7$ PFU/ml (celkové množství viru zde bylo tedy $1,9 \times 10^6$ PFU) k infikované skupině a 50 μ l kompletního média L15 ke kontrole byly všechny označené zkumavky uloženy do termostatu na 45 min při 34 °C, přičemž byly každých 10 min jemně promíchány. Po inkubaci byla klíšťata 2 min chlazená na ledu. Zchlazená klíšťata byla centrifugována při 200 g po dobu 30 s a poté dvakrát promyta vychlazeným roztokem PBS (500 μ l). Po promytí byla klíšťata osušena proužky filtračního papíru o velikosti cca 0,2 x 3 cm. Ihned po vysušení byla klíšťata přemístěna do místnosti s laboratorní teplotou a relativní vlhkostí 98 % s 15 h: 9 h cyklem světlo: tma.

Po 12 dnech od infekce byla provedena povrchová desinfekce klíšťat a následně jejich homogenizace pomocí přístroje Tissue Lyser II (metody popsány níže).

3.4.2 Infekce sáním na viremických myších

Před vlastním uskutečněním tohoto experimentu byla provedena zkouška virémie, která posloužila ke zjištění dne, kdy mají myši po infekci nejvyšší titr viru

v krvi. Podle toho byla upravena doba nasazení klíšťat tak, aby byla synchronizována doba nejvyšší virémie s nejsilnějším sáním klíšťat. Tímto by mělo být dosaženo nejlepšího výsledku.

Na zkoušku virémie i na vlastní pokus přenosu infekce KE z myši byly použity myši Balb/c samice 22 – 30 týdnů staré.

Zkouška virémie po subkutánní aplikaci virové suspenze byla provedena u 10 myší. Myším bylo subkutánně podáno 200 μ l viru KE kmene Neudoerfl (10^4 PFU/myš). Třetí, čtvrtý, pátý a šestý den po infekci byly vždy dvě myši vykrveny.

Na zkoušku virémie po intraperitoneální aplikaci byly použity 3 myši. Těmto myším bylo intraperitoneálně podáno 850 μ l viru KE kmene Neudoerfl (5×10^5 PFU/myš). První, druhý a třetí den po infekci byla vždy jedna myš vykrvena.

Vzorky krve byly uchovány při -70°C . Následně byly tyto vzorky vyšetřeny plakovou titrací ve 24 jamkovém panelu. Při titraci bylo zjištěno, že myši po s.c. aplikaci viru měly nejvyšší virémii čtvrtý den a myši po i. p. aplikaci viru třetí den po infekci.

Pro vlastní pokus infekce bylo předem připraveno 6 myší. Myším byla oholena srst z části hřbetu. Na oholenou oblast byl přilepen speciálně vyrobený klobouček, který byl ještě dále zafixován náplastí. Instalace kloboučku byla provedena v éterové narkóze.

Dvěma myším bylo aplikováno subkutánně 200 μ l viru KE kmene Neudoerfl (10^4 PFU/myš), dalším dvěma myším bylo aplikováno intraperitoneálně 850 μ l viru KE kmene Neudoerfl (5×10^5 PFU/myš). Poslední dvě myši sloužily jako kontrola, jedné bylo aplikováno subkutánně 200 μ l média (L15 s 3% PTS), druhé intraperitoneálně 850 μ l média (L15 s 3% PTS).

S ohledem na výsledek zkoušky virémie, průměrnou délku sání larev *I. ricinus* (3– dny) a nymf *I. ricinus* (5–6 dní) a fakt, že klíšťata sají nejvíce ke konci sání na hostiteli, bylo postupováno následovně:

Den po infekci byly na všechny myši nasazeny nymfy v počtu 10 nymf na myš. Druhý den byly k nymfám přidány larvy v počtu cca 50 larev na myš.

Šestý den po infekci byly všechny larvy i nymfy nasáté a byly uloženy při laboratorní teplotě a relativní vlhkosti 98 % v místnosti s 15 h: 9 h cyklem světlo: tma.

Za čtyři týdny od nasátí klíšťat byla provedena homogenizace pomocí přístroje Tissue Lyser II (metoda popsána níže) u části larev a nymf.

Po sedmi týdnech od nasátí klíšťat, kdy již u všech klíšťat došlo k přeměně na další stadium, byla provedena povrchová desinfekce zbylých klíšťat a následně jejich homogenizace pomocí přístroje Tissue Lyser II (metody popsány níže).

3.4.3 Infekce sáním virové suspenze z kapiláry

K tomuto experimentu bylo použito celkem 30 dospělých samic *I. ricinus*, z toho 5 samic sloužilo jako kontrola.

Klíšťata byla jednotlivě připevněna oboustrannou lepicí páskou na mikroskopická podložní skla dorsální stranou těla nahoru. Poté byla ještě zajištěna lepicí páskou přes hřbetní část těla.

Předem bylo připraveno 300 μ l virové suspenze (kmen Neudoerfl) smícháním 150 μ l média (L15, 3% PTS, 1% ATB, 1% GL) se 150 μ l viru KE o titru $1,8 \times 10^9$ PFU/ml. Celkové množství viru zde bylo tedy $2,7 \times 10^8$ PFU.

Virová suspenze o objemu 10 μ l byla pro každé klíště pomocí kapilární elevace nasáta do kalibrované mikrokapiláry (Sigma). Kontrolním klíšťatům bylo podáno pouze kompletní médium L15 o stejném objemu. Kapiláry s virovou suspenzí nebo médiem byly nasazeny klíšťatům na hypostom a obě palpy. Kapiláry byly ještě dále zafixovány na podložním skle pomocí modelíny.

Klíšťata s nasazenou kapilárou byla umístěna ve vlhké komůrce do inkubátoru s 37 °C po dobu 20 h.

Poté byla klíšťata nasazena k částečnému dosátí na morčata. Dvěma morčatům byla oholena srst z části hřbetu. Na oholenou oblast byl přilepen gumový klobouček. Klíšťata byla umístěna dovnitř kloboučku (infekční klíšťata na jedno morče, kontrolní neinfekční skupina na druhé morče), který byl poté uzavřen nalepením prodyšné tkaniny. Tato tkanina zamezila úniku klíšťat. Po šesti dnech byla částečně nasátá klíšťata umístěna do místnosti s laboratorní teplotou a relativní vlhkostí 98 % s 15 h: 9 h cyklem světlo: tma.

Dvanáctý den po sání na morčatech a dvacátý den po infekci byla u klíšťat provedena povrchová desinfekce a následně jejich homogenizace pomocí přístroje Tissue Lyser II (metody popsány níže).

3.5 Detekce viru klíšťové encefalidity v klíšťatech

3.5.1 Příprava vzorků

3.5.1.1 Povrchová desinfekce klíšťat

Tato metoda (Yoder a kol., 2003) byla použita k likvidaci povrchové mykoflóry klíšťat, která způsobovala kontaminace během detekce viru KE v klíšťatech.

Klíšťata (dospělci a nymfy maximálně po pěti, larvy po padesáti) byla umístěna do sterilních mikrozkušavek (Eppendorf). Desinfekční roztok byl připraven smícháním sterilní deionizované vody, ethanolu a 5% NaOCl v objemovém poměru 18:1:1. Vždy 500 μ l tohoto roztoku bylo přidáno ke klíšťatům do každé mikrozkušavky. Po dobu jedné minuty bylo s mikrozkušavkami jemně třepáno. Po odsátí desinfekčního roztoku byla klíšťata třikrát promyta sterilní deionizovanou vodou (1 ml). Poté byla klíšťata osušena proužky filtračního papíru o velikosti cca 0,2 x 3 cm.

3.5.1.2 Homogenizace klíšťat

Homogenizace byla prováděna dvěma způsoby, pomocí třecích misek nebo homogenizačního přístroje Tissue Lyser II (Quiagen). Při použití homogenizace pomocí třecích misek došlo k rozetření jednotlivých nymf ve vychlazených sterilních třecích miskách s 300 μ l kultivačního média L15. Druhý způsob homogenizace probíhal takto: klíšťata (dospělci a nymfy po jednom, larvy po pěti) byla umístěna do sterilních homogenizačních zkumavek obsahujících ocelovou kuličku (5 mm - Qiagen) společně s 50 μ l kompletního média L15. Poté byla provedena homogenizace pomocí přístroje Tissue Lyser II po dobu 3 min při 30 Hz. Homogenizované vzorky byly centrifugovány při 1000 g 3 minuty. Vzniklé homogenáty byly uloženy při -70 °C pro následné vyšetření plakovou titrací.

3.5.2 Plaková titrace

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

V této práci byla titrace použita k průkazu viru KE v klíšťatech a ke kontrole titru viru samotného.

Plaková titrace byla prováděna v laminárním boxu v 24jamkových panelech (TPP). Vzorky k titraci byly předem připraveny homogenizací v třecí misce nebo pomocí přístroje Tissue Lyser II, jak je uvedeno u jednotlivých experimentů. 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 médii na požadovanou koncentraci. Poté bylo do všech jamek (kromě těch s neředěným vzorkem) pipetováno 180 μ l média. Ze supernatantu jednotlivých vzorků klíšťat bylo přeneseno 200 μ l do panelu a poté desítkově naředěno. 20 μ l virové suspenze bylo přidáno k 180 μ l média do první jamky a též naředěno desítkovou řadou. Jako negativní kontrola sloužila jedna nebo dvě jamky bez přidání viru či supernatantu z klíštěte. Poté byla do všech jamek přidána buněčná suspenze PS buněk 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 (1g 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 prezentován v hodnotě PFU (plaque forming units), která vyjadřuje počet virových částic schopných tvořit plaky v 1 ml.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Infekce imerzní metodou

4.1.1 Imerzní metoda Neudoerfl

Larvy *I. ricinus* byly ponořeny do suspenze viru KE kmene Neudoerfl.

Po třech měsících od nakažení, kdy se již z larev vyvinuly nymfy, byl virus KE detekován pomocí plakové titrace (Tab. 8). Bylo vyšetřeno celkem 20 nymf, pozitivní byl však jen jeden vzorek. Úspěšnost nákazy touto metodou tedy byla 5 %.

nymfy	
vzorek č.	PFU/ml
1	9,54 x 10 ⁴

Tab. 8: Množství viru KE v pozitivních vzorcích klíšťat nakažených imerzní metodou Neudoerfl

Přesto, že Mitzel a kol. (2007) ve své práci s virem Langat uvádí 100 % úspěšnost metody při použití virové suspenze o titru 10⁷ PFU/ml, nám se tohoto výsledku dosáhnout nepodařilo, i když bylo použito stejné množství viru. Jedním z důvodů se jeví použití jiného typu flaviviru, který však podobně jako virus Langat patří do komplexu virů KE. Dalším důvodem by mohla být možnost, že se nákaza v klíšťatech nepřenese do dalšího stadia, přestože Dumpis a kol. (1999) tvrdí, že jednou nakažené klíště si udrží nákazu po celý život. Tuto teorii zpochybňuje studie Slovák a kol. (2014), která se zabývá m.j. transstadiálním přenosem viru KE kmene Hypr v klíštěti. V této práci byly nymfy *I. ricinus* v 65 % infikovány sousáním s infikovanými dospělci (nainfikovanými injekcí), po přeměně na dospělé jich však zůstalo infekčních pouze 8,5 %.

4.1.2 Imerzní metoda Hypr

K tomuto experimentu byly použity larvy a nymfy *I. ricinus*, které byly ponořeny do suspenze viru KE kmene Hypr.

Po 12 dnech od nakažení byl virus KE v klíšťatech detekován pomocí plakové titrace (Tab. 9). Bylo vyšetřeno 5 směsných vzorků larev (po 5 larvách) a 5 nymf,

z toho pozitivní byly 3 směsné vzorky larev a 3 vzorky nymf. Úspěšnost nákazy touto metodou tedy byla 60 %.

larvy	
vzorek č.	PFU/ml
1	$6,82 \times 10^4$
2	2×10^3
3	$1,5 \times 10^3$
nymfy	
vzorek č.	PFU/ml
1	6×10^3
2	7×10^5
3	$6,31 \times 10^2$

Tab. 9: Množství viru KE v pozitivních vzorcích klíšťat nakažených imerzní metodou Hypr

Po neúspěchu s infekcí klíšťat imerzní metodou kmenem Neudoerfl jsme se rozhodli pokus zopakovat s použitím jiného kmene viru KE – Hyprem. Tento kmen se vyznačuje výrazně vyšší virulencí v porovnání s prototypovým kmenem Neudoerfl (Růžek 2015b). Úspěšnost tohoto pokusu byla velmi uspokojivá (60 %). Tento výsledek se blíží závěru práce Policastro a Schwan (2003), kteří tuto metodu původně vyvinuli k infekci larev *I. scapularis* bakteriemi *Borrelia burgdorferi* a dosáhli 65 % úspěšnosti nakažení. Kromě použití jiného kmene by další příčinou lepších výsledků tohoto experimentu mohla být delší doba vystavení klíšťat snížené vlhkosti před experimentem. V experimentu s kmenem Neudoerfl jsme vystavili larvy před ponořením do virové suspenze 65 % vlhkosti po dobu 1 h, zatímco v případě imerzní metody s kmenem Hypr jsme tuto dobu prodloužili na 4 h. Nymfy jsme podobně jako McNally a kol. (2012) vystavili této snížené vlhkosti po dobu 6 dní před experimentem. Také se potvrdilo, že touto technikou lze nakazit i vyšší stadia klíšťat (Mitzel a kol., 2007). Otázkou je, zda by byl virus v klíšťatech detekován i po přeměně na nymfy a dospělce.

4.2 Infekce sáním na viremických myších

Larvy a nymfy *I. ricinus* byly nasazeny k úplnému nasátí na předem infikované myši Balb/c. Myši byly infikovány subkutánně a intraperitoneálně virem KE kmene Neudoerfl.

Po 4 týdnech od nakažení byla u části larev a nymf provedena detekce viru KE pomocí plakové titrace. Bylo vyšetřeno 5 směsných vzorků larev (po 5 larvách) a 5

nymf po sání na myši infikované subkutánně a stejný počet vzorků klíšťat po sání na myši infikované intraperitoneálně.

Po sedmi týdnech od nasátí klíšťat, kdy již u všech klíšťat došlo k přeměně na další stadium, byly na přítomnost viru KE plakovou titrací testovány nymfy a dospělci. Bylo vyšetřeno 5 nymf a 5 dospělců po sání na myši infikované subkutánně a stejný počet vzorků klíšťat po sání na myši infikované intraperitoneálně.

Ze všech vzorků nebyl pozitivní na infekci virem KE ani jeden, metoda tedy nebyla úspěšná.

Přesto, že tato metoda kopíruje přirozenou nákazu klíšťat, je závislá na viru, který se replikuje v hostiteli, přičemž musí dosáhnout dostatečné úrovně virémie pro přenos na klíště (Chernesky, 1969). Možnou příčinou neúspěchu by tedy mohla být nedostatečná úroveň virémie u myši v době sání klíšťat. Další příčinou by mohla být menší virulence kmene Neudoerfl oproti kmenu Hypr (Růžek 2015b). Z důvodu časové náročnosti tohoto experimentu již nedošlo k jeho opakování s virem KE kmene Hypr.

4.3 Infekce sáním virové suspenze z kapiláry

V tomto experimentu byly použity dospělé samice *I. ricinus*, kterým byla podána suspenze viru KE kmene Neudoerfl pomocí kapiláry nasazené na ústní ústrojí.

Po 20 dnech od infekce byla u dospělců provedena detekce viru KE pomocí plakové titrace (Tab. 10). Bylo vyšetřeno 20 vzorků, z nich bylo 15 pozitivních. Úspěšnost nákazy touto metodou byla 75 %.

dospělci	
vzorek č.	PFU/ml
1	5×10^5
2	3×10^5
3	$1,82 \times 10^4$
4	$8,5 \times 10^5$
5	$2,5 \times 10^5$
6	$8,64 \times 10^6$
7	$4,04 \times 10^4$
8	2×10^5
9	$6,36 \times 10^4$
10	2×10^4
11	8×10^5
12	$9,5 \times 10^5$
13	$6,5 \times 10^5$
14	$8,18 \times 10^4$
15	1×10^2

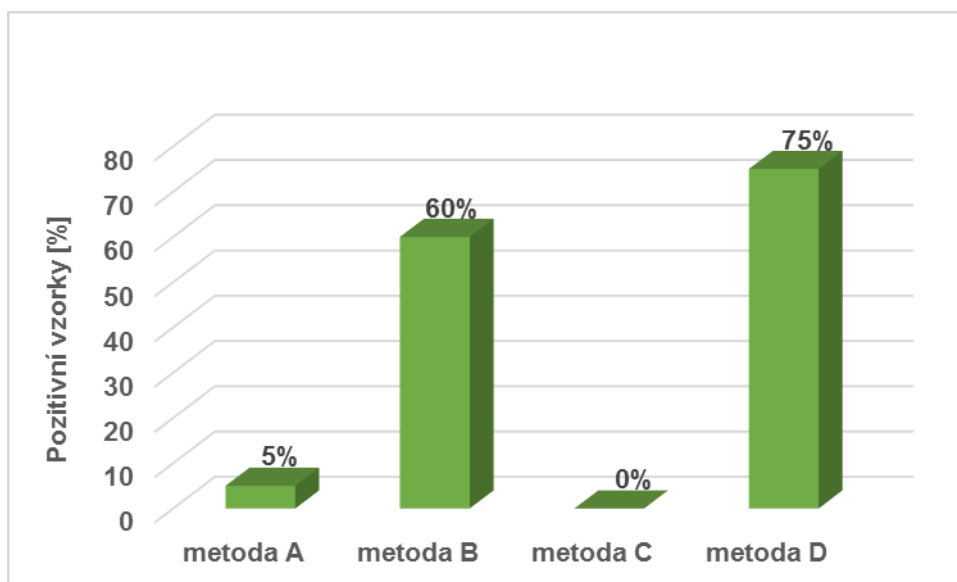
Tab. 10: Množství viru KE v pozitivních vzorcích klíšťat nakažených sáním virové suspenze z kapiláry

Výsledky tohoto experimentu se podobají výsledkům metody, kterou použili v roce 2010 Bouwknecht a kol.. Zde se snažili sáním z kapiláry nakazit čtyři druhy klíšťat čeledi Ixodidae (*I. ricinus*, *I. hexagonus*, *Dermacentor reticulatus* a *Rhipicephalus bursa*) virem bluetongue a úspěšně se jim podařilo nakazit 20 z 24 klíšťat (83,3 %). Rozdílem v metodice m.j. bylo, že Bouwknecht a kol. (2010) nechali klíšťata částečně nasát na hostiteli (králík) před sáním virové suspenze z kapiláry. My jsme však umožnili klíšťatům se nasát na hostiteli (morče) až po sání virové suspenze z kapiláry, podobně jako v práci Kopeckého a Staňkové (1998). V této práci bylo použito sání z kapiláry k nakažení klíšťat *Rhipicephalus appendiculatus* virem KE kmene Hypr. Stejně jako Bouwknecht a kol. (2010) jsme nechali klíšťata sát virovou suspenzi přes noc, na rozdíl od práce Kopeckého a Staňkové (1998), kde byly kapiláry s virovou suspenzí ponechány klíšťatům pouze dvě hodiny. Potvrdilo se, že klíšťata tímto způsobem nasají jen velmi malé množství tekutiny (Burgdorfer 1957; Rechav a kol., 1999). V našem případě klíšťata nasála v experimentu 0 – 4 μ l virové suspenze, v práci Kopeckého a Staňkové (1998) 1 – 4 μ l. To ukazuje, že prodloužení doby sání z kapiláry nemá vliv na objem přijatý klíštětem. Negativní vzorky z našeho experimentu by se daly vysvětlit tím, že některá klíšťata nenasála žádné množství virové suspenze. V tomto uspořádání experimentu je však nutno brát v úvahu možný přenos viru z infikovaných na neinfikovaná klíšťata během sousání na hostiteli.

4.4 Porovnání použitých metod experimentální infekce

V této práci byly vyzkoušeny čtyři metody infekce klíšťat virem KE v laboratorních podmínkách: imerzní metoda s použitím kmene Neudoerfl, imerzní metoda s použitím kmene Hypr, infekce na viremických myších a infekce sáním virové suspenze z kapiláry. Tyto metody jsou velmi specifické, liší se například způsobem provedení, druhem použitých stadií klíšťat, typem aplikace virové suspenze klíštěti a časem detekce infekce v klíšťatech. Všechny tyto aspekty mohou výrazně ovlivnit výsledek experimentů a mají vliv také na využití infikovaných klíšťat v laboratoři k dalším experimentům.

Pro vizuální srovnání úspěšnosti metod byl vytvořen Obr. 3. Toto srovnání je však relativní s ohledem na již zmíněné velké rozdíly v jednotlivých metodách.



Obr. 3: Počet pozitivních vzorků (v %) u klíšťat infikovaných jednotlivými metodami

Metoda A - Infekce imerzní metodou - Neudoerfl, metoda B - Infekce imerzní metodou - Hypr, metoda C - Infekce sáním na viremických myších, metoda D - Infekce sáním virové suspenze z kapiláry.

Imerzní metoda v případě použití kmene Neudoerfl nebyla příliš úspěšná (5 %), při použití kmene Hypr však úspěšnost výrazně vzrostla (60 %). Tato metoda by se mohla v laboratoři s úspěchem používat k nakažení klíšťat virem KE, protože je to velmi jednoduchá technika synchronní infekce klíšťat využívající přirozenou cestu šíření patogena v klíštěti. Protože předpokládáme transstadiální přenos viru KE, mohou najít larvy infikované touto metodou uplatnění při výzkumu i po přeměně do dalších stadií. Imerzní metodu jsme použili i k infekci nymf virem KE. V práci

Broadwater a kol. (2002), která se zabývá infekcí nymf *I. scapularis* bakteriemi *Borrelia burgdorferi* bylo dosaženo až 70 % úspěšnosti nakažení.

Metoda infekce sáním na hostiteli v našem případě zcela selhala, u žádného z vzorků se nákazu nepodařilo detekovat.

Poslední metodou, kterou jsme vyzkoušeli, byla infekce sáním virové suspenze z kapiláry. Ta se ukázala jako nejúspěšnější co se týče procenta nakažených jedinců (75 %). Klíšťata infikovaná touto metodou však mají omezené použití v laboratoři, neboť jde o dospělé, čili poslední vývojové stadium klíštěte. Práce Danielové a Holubové (1991) ukazuje, že prevalence viru KE u larev vyvinutých z vajíček infekčních samic je menší než 1 %. Stejná prevalence viru KE (<1 %) byla prokázána také v larvách v přírodě před sáním na viremickém hostiteli (Danielová a kol., 2002).

5 Závěr

Cílem práce bylo porovnat různé metody infekce klíšťat *Ixodes ricinus* virem KE, konkrétně infekci klíšťat virem imerzní metodou, sáním virové suspenze z kapiláry a sáním klíšťat na viremických myších.

Pomocí jednotlivých metod bylo dosaženo těchto výsledků úspěšnosti infekce klíšťat:

- infekce imerzní metodou Neudoerfl – 5 %
- infekce imerzní metodou Hypr – 60 %
- infekce sáním na viremických myších – 0%
- infekce sáním virové suspenze z kapiláry – 75%

Každá z těchto metod je vysoce specifická. Přes neúspěch u dvou vyzkoušených metod lze říci, že se nám podařilo dosáhnout vysoké prevalence viru KE v klíšťatech, která mohou být s ohledem na způsob infekce využita k dalším experimentům. Dosažené výsledky a zjištěné skutečnosti však otevřely další otázky, které mohou být předmětem dalších experimentů.

6 Použitá literatura

BAILEY K. P. (1960): Note on the rearing of *Rhipicephalus appendiculatus* and their infection with *Theileria parva* for experimental transmission, Bull. Epizoot. Dis. Afr. 8, 33-43.

BALDRIDGE G. D., KURTTI T. J., BURKHARDT N., BALDRIDGE A. S., NELSON C. M., OLIVA A. S., MUNDERLOH U. G. (2007): Infection of *Ixodes scapularis* ticks with *Rickettsia monacensis* expressing green fluorescent protein: A model systém, Journal of Invertebrate Pathology 94 (3), 163–174.

BALOGH Z., EGYED L., FERENCZI E., BÁN E., SZOMOR K. N., TAKÁCS M., BERENCSEI 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. 6, 331-341.

BONNET S., JOUGLIN M., MALANDRIN L., BECKER C., AGOULON A., L'HOSTIS M., CHAUVIN A. (2007): Transstadial and transovarial persistence of *Babesia divergens* DNA in *Ixodes ricinus* ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique, Parasitology 134, 197-207.

BONNET S., LIU X. Y. (2012): Laboratory artificial infection of hard ticks: a tool for the analysis of tick-borne pathogen transmission, Acarologia 52(4): 453-464.

BOOTH T.F., STEELE G.M., MARRIOTT A.C., NUTTALL P.A. (1991): Dissemination, replication, and transstadial persistence of Dugbe virus (Nairovirus, Bunyaviridae) in the tick vector *Amblyomma variegatum*, The American journal of tropical medicine and hygiene 45, 146-157.

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, Experimental and Applied Acarology 2 (2), 183-192.

BOWMAN A.S., NUTTALL P.A. (Eds.) (2008): Ticks: Biology, Disease and Control, Cambridge University Press, Cambridge, 506.

- BROADWATER A. H., SONENSHINE D. E., HYNES W. L., CERAUL S., DE SILVA. A- M. (2002):** Glass Capillary Tube Feeding *Borrelia burgdorferi*: A Method for Infecting Nymphal *Ixodes scapularis*, J. Med. Entomol. 39 (2), 285 – 292.
- BURGDORFER W. (1957):** Artificial feeding of ixodid ticks for studies on the transmission of disease agents, The Journal of infectious diseases 100, 212-214.
- BURKOT T.R., HAPP C.M., DOLAN M.C., MAUPIN G.O. (2001):** Infection of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) with *Borrelia burgdorferi* using a new artificial feeding technique, J. Med. Entomol. 38, 167-71.
- COTTE V., BONNET S., Le RHUN D., Le NAOUR E., CHAUVIN A., BOULOUIS H.J., LECUELLE B., LILIN T., VAYSSIER-TAUSSAT M. (2008):** Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*, Emerg. Infect. Dis. 14: 1074-1080.
- DANIEL M. (2007):** Nové poznatky o klíšťatech a jimi přenášených nálezích. Kurz 294014. Škola veřejného zdravotnictví IPVZ, Praha.
- DANIEL M., KRÍŽ B., DANIELOVÁ V., BENEŠ Č. (2008):** Sudden increase in tick-borne encephalitis cases in the Czech Republic, J. Med. Microbiol. 298 (1), 81-87.
- DANIELOVÁ V., HOLUBOVÁ J. (1991):** Transovarial transmission rate of tick-borne encephalitis virus „In“ *Ixodes ricinus* ticks, F. Dusbabek, V. Bukva (Eds.), Modern Acarology, Academia, Prague and SPB Academic Publishing, The Hague, 7–10.
- DANIELOVÁ V., HOLUBOVÁ J., PEJCOCH M., DANIEL M., (2002):** Potential significance of transovarial transmission in the circulation of tick-borne encephalitis virus, Folia Parasitologica 49 (4), 323–325.
- de MADRID A. N., PORTERFIELD J. S. (1969):** A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. Bulletin of the World Health Organization 40 (1), 113 - 121.
- DOLAN M. C., LACOMBE E. H., PIESMAN J. (2000):** Vector Competence of *Ixodes muris* (Acari: Ixodidae) for *Borrelia burgdorferi*, J. Med. Entomol. 37 (5), 766 – 768.
- DOLAN M. C., PIESMAN J., MBOW M. L., MAUPIN G. O., PETER O., BROSSARD M., GOLDE W. T. (1998):** Vector Competence of *Ixodes scapularis* and *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) for Three Genospecies of *Borrelia burgdorferi*, J. Med. Entomol 35 (4), 465 – 470

- DONELLY J., PEIRCE M.A. (1975):** Experiments on the transmission of *Babesia divergens* to cattle by the tick *Ixodes ricinus*, J. Parasitol. 5, 363-367.
- DUMPIS U., CROOK D., OKSI J. (1999):** Tick-borne encephalitis, Clin. Infect. Dis. 28, 882-890.
- 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 (Pt 1), 179-185.
- FIŠEROVÁ L., ČERNÁ K., HORKÁ H., KOPECKÝ J. (2008):** Two ways of experimental infection of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) with spirochetes of *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, Folia Parasitologica 55 (2) 150-154.
- GERN L., RAIS O. (1996):** Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae), J. Med. Entomol. 33 (), 189–192.”
- GOULD E.A. (1995):** Virus cryopreservation and storage, Meth. Mol. Biol., 38, 7–20.
- GREŠÍKOVÁ M., HAVRÁNEK I., GORNER F. (1960):** Vplyv pasterizácie na infektivitu vírusu klieštovej encefalitídy, Veter. Cas. 9, 462-469.
- GRITSUN T. S., LASHKEVICH V. A., Gould E. A. (2003):** Tick-borne encephalitis, Antiviral Res 57, 129–146.
- GÜNTHER G., HAGLUND M. (2005):** Tick-borne encephalopathies : epidemiology, diagnosis, treatment and prevention, CNS Drugs. 19(12), 1009-32.
- HEINZ F.X., HOLZMANN H., ESSL A., KUNDI M. (2007):** Field effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis, Vaccine 25, 7559–7567.
- HEINZ F.X. (2007):** Etiology [cit. 2015-6-12] Dostupné z: http://www.tbe-info.com/upload/medialibrary/Monograph_TBE.pdf
- 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.
- HEYNE H., ELLIOT E.G., BEZUIDENHOUT J.D. (1987):** Rearing and infection techniques for *Amblyomma* species to be used in heartwater transmission experiments, The Onderstepoort journal of veterinary research, 54, 461-71.

HUBÁLEK Z., RUDOLF I. (2007): Mikrobiální zoonózy a sapronózy, 2. vyd. (učební text), Masarykova univerzita, Brno.

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. a kol. (2004): Tick-borne virus diseases of human interest in Europe, *Clinical Microbiology and Infection* 10 (12), 1040–1055.

CHAUVIN, A., MOREAU E., BONNET S., PLANTARD O., MALANDRIN L. (2009): Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission, *Vet. Res.* 40 (2), 37.

CHERNESKY M.A. (1969): Powassan virus transmission by ixodid ticks infected after feeding on viremic rabbits injected intravenously, *Can J Microbiol.* 15, 521–526.

JONES, LINDA D., GAUNT M., HAILS R. S., LAURENSEN K., HUDSON P.J., REID H., HENBEST P., GOULD E. A. (1997): Transmission of louping ill virus between infected and uninfected ticks co-feeding on mountain hares, *Medical and Veterinary Entomology* 11 (2), 172-176.

JONGEJAN F., PERIE N.M., FRANSSSEN F.F., UILENBERG G. (1980): Artificial infection of *Rhipicephalus appendiculatus* with *Theileria parva* by percutaneous injection, *Res. Vet. Sci.*,29, 320-324.

JONGEJAN, F. a UILENBERG.G. (2004): The global importance of ticks, *Parasitology* 129 (7), 3-14.

JOYNER L.P., DAVIES S.F., KENDALL S.B. (1963): The experimental transmission of *Babesia divergens* by *Ixodes ricinus*, *Exp. Parasitol.* 14, 367-73.

KAISER R. (1999): The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994-98: a prospective study of 656 patients, *Brain* 122 (11), 2067-2078.

KARABATSOS N. (1980): General characteristics and antigenic relationships. In: Monath, T.P. (Ed.), *St. Louis Encephalitis*, APHA, Washington, DC, 159–200.

KARIU T., COLEMAN A.S., ANDERSON J.F., PAL U. (2011): Methods for rapid transfer and localization of lyme disease pathogens within the tick gut, *Journal of visualized experiments*, JoVE.

KOCAN K.M., YOSHIOKA J., SONENSHINE D.E., de la FUENTE J., CERAUL S.M., BLOUIN E.F., ALMAZAN C. (2005): Capillary tube feeding system for

studying tick-pathogen interactions of *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae), J. Med. Entomol. 42, 864-874.

KOCAN K.M., YOSHIOKA J., SONENSHINE D.E., de la FUENTE J., CERAUL S.M., BLOUIN E.F., ALMAZAN C. (2005): Capillary tube feeding system for studying tick-pathogen interactions of *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae), J. Med. Entomol. 42, 864-874.

KOPECKÝ J., STAŇKOVÁ I. (1998): Interaction of virulent and attenuated tick-borne encephalitis virus strains in ticks and a tick cell line, Folia Parasitologica 45 (3), 245-250.

KORSHUS J B., MUNDERLOH U. G., BEY R. F., KURTTI T. J. (2003): Experimental infection of dogs with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto using *Ixodes scapularis* ticks artificially infected by capillary feeding, Medical Microbiology and Immunology 193 (1), 27-34.

KŘÍŽ B., BENEŠ C., DANIEL M. (2009): Alimentary transmission of tick-borne encephalitis in the Czech Republic (1997-2008), Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 58 (2), 98-103.

KUNZ C., HEINZ F. X. (2003): Tick-borne encephalitis Vaccine, 21, S1–S2.

KUNZE U. (2012): Tick-borne encephalitis (TBE): an underestimated risk...still: report of the 14th annual meeting of the International Scientific Working Group on Tick-Borne Encephalitis (ISW-TBE, Tics. Tick. Borne. Dis. 3 (3), 197-201.

LABUDA M. NUTTAL P. A., KOŽUCH O., ELECKOVA E., WILLIAMS T., ZUFFOVA E., SABO A. (1993b): Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature, Experientia, 49, 802–805.

LABUDA M., AUSTYN J.M., ZUFFOVA E., KOŽUCH O., FUCHSBERGER N., LYSY J., NUTTAL ,P.A. (1996): Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission, Virology 219, 357–366.

LABUDA M., JONES L. D., WILLIAMS T., DANIELOVÁ V., NUTTAL P.A. (1993a): Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between co-feeding ticks, J. Med. Entomol. 30, 295-299.

- LABUDA M., TRIMNELL A. R., LIČKOVÁ M., KAZIMÍROVÁ M., DAVIES G. M., LISSINA O., HAILS R. S. a NUTTALL P. A. (2006):** An Antivector Vaccine Protects against a Lethal Vector-Borne Pathogen, *journal.ppat*.
- LEWIS D., YOUNG E.R. (1980):** The transmission of a human strain of *Babesia divergens* by *Ixodes ricinus* ticks, *J. Parasitol.* 66, 359-60.
- LINDQUIST L., VAPALATHI O. (2008):** Tick-borne encephalitis, *Lancet.* 371: 1861-1871.
- LIU, X Y., COTE M., PAUL R. E. L., BONNET S.I. (2013):** Impact of feeding system and infection status of the blood meal on *Ixodes ricinus* feeding, *Tics. Tick. Borne. Dis.* 5 (3), 323–328
- MACALUSO K.R., SONENSHINE D.E., CERAUL S.M., AZAD A.F. (2001):** Infection and transovarial transmission of *Rickettsiae* in *Dermacentor variabilis* ticks acquired by artificial feeding, *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 1, 45-53.
- MACKENSTEDT U., GAUER M., MELHORN H., SCHEIN E., HAUSCHILD S. (1990):** Sexual cycle of *Babesia divergens* confirmed by DNA measurements, *Parasitol. Res.* 76, 199-206.
- MANDL C. W., ECKER M., HOLZMANN H., HEINZ F. X. (1997).** Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudorfl and high virulence strain Hypr. *J. Gen. Virol.*78, 1049-1057.
- MANDL C. W., HEINZ F. X., KUNZ C. (1988):** Sequence of the structural proteins of tickborne encephalitis virus (western subtype) and comparative analysis with other flaviviruses., *Virology* 166, 197-205.
- MANSFIELD K. L., JOHNSON N., PHIPPS L. P., STEPHENSON J. R., FOOKS A. R., SOLOMON T. (2009):** Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis, *J. Gen. Virol.*, 90 (Pt 8), 1781-1794.
- MCNALLY K. L., MITZEL D. N., ANDERSON J. M., RIBEIRO J. M. C., VALENZUELA J. G., MYERS T. G., GODINEZ A., WOLFINBARGER J. B., BEST S. M. a kol. (2012):** Differential salivary gland transcript expression profile in *Ixodes scapularis* nymphs upon feeding or flavivirus infection, *Tics. Tick. Borne. Dis.*3 (1), 18–26.
- MITZEL D. N., WOLFINBARGER J. B., LONG R. D., MASNICK M., BEST S., BLOOM M. E. (2007):** Tick-borne flavivirus infection in *Ixodes scapularis* larvae: Development of a novel method for synchronous viral infection of ticks, *Virology* 365 (2), 410-418.

- MONIN R., GERN L., AESCHLIMANN A. (1989):** A study of the different modes of transmission of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes ricinus*, Zbl. Bakt. Suppl 18, 14-20.
- POGODINA V. (1958):** The resistance of tick-borne encephalitis virus to the effects of gastric juice, Vopr. Virusol., 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*, Journal of Medical Entomology 40 (3), 364-370.
- PURNELL R.E., JOYNER L.P. (1967):** Artificial feeding technique for *Rhipicephalus appendiculatus* and the transmission of *Theileria parva* from the salivary secretion. Nature 216, 484-485.
- RAJČÁNI J., ČIAMPOR F. (2006):** Lekárska virológia. Veda, Bratislava.
- RANDOLPH S. E. (2011):** Transmission of tick-borne pathogens between co-feeding ticks: Milan Labuda's enduring paradigm, Tics. Tick. Borne. Dis. 2 (4), 179–182.
- REHAV Y., ZYZAK M., FIELDEN L.J., CHILDS J.E. (1999):** Comparison of methods for introducing and producing artificial infection of ixodid ticks (Acari: Ixodidae) with *Ehrlichia chaffeensis*, J. Med. Entomol 36, 414-419.
- REIS C., COTE M., Le RHUN D., LECUELLE B., LEVIN M.L., VAYSSIER-TAUSSAT M., BONNET S.I. (2011):** Vector competence of the tick *Ixodes ricinus* for transmission of *Bartonella birtlesii*, PLoS Negl Trop Dis 5, 1186.
- RENDI_WAGNER P. (2004):** Risk and prevention of tick-borne encephalitis in travelers, J. Travel Med. 11, 307-312.
- ROBINSON, M.T., MORGAN E. R., WOODS D., SHAW S. E. (2010):** The development of a qPCR assay to detect tick (Ixodida) DNA and its implementation for the study of tick-borne pathogen transmission, Experimental Parasitology 126 (4), 506–509.
- RUDOLPH D., KNULLE 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., DALRYPLE J.M. (1980):** Chemical and antigenic structure of flaviviruses. In: Schlesinger, R.W. (Ed.), The Togaviruses, Biology, Structure, Replication, Academic Press, New York.

RŮŽEK D , DANIELOVÁ v., DANIEL M., CHMELÍK V., CHRDLA A., PAZDIORA P., PRYMULA R., SALÁT J. SÝKORA J., ŽAMPACHOVÁ E. (2015): Klíšťová encefalitida, Grada Publishing, Praha.

RŮŽEK D. (2015a): Patogeneze klíšťové encefalitidy „In“ RŮŽEK D , DANIELOVÁ v., DANIEL M., CHMELÍK V., CHRDLA 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., CHRDLA A., PAZDIORA P., PRYMULA R., SALÁT J. SÝKORA J., ŽAMPACHOVÁ E. (2015): Klíšťová encefalitida, Grada Publishing, Praha.

SAITO, T, B, WALKER D. H. (2015): A Tick Vector Transmission Model of Monocytotropic Ehrlichiosis, J. Inf. Dis. 212 (6), 968-977.

SALÁT J. (2015): Klíšťová encefalitida ve veterinární medicíně „In“ RŮŽEK D , DANIELOVÁ v., DANIEL M., CHMELÍK V., CHRDLA A., PAZDIORA P., PRYMULA R., SALÁT J. SÝKORA J., ŽAMPACHOVÁ E. (2015): Klíšťová encefalitida, Grada Publishing, Praha.

SLOVÁK M., KAZIMÍROVÁ M., SIEBENSTICHOVÁ M., USTANÍKOVÁ K., KLEMPA B., GRITSUN T., GOULD E. A., NUTTAL P. A (2014): Survival dynamics of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks, Tics. Tick. Borne. Dis. 5 (6), 962-969.

SÜSS J. (2003): Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines, Vaccine 21 (1), 19-35.

VOIGT W.P., YOUNG A.S., MWAURA S.N., NYAGA S.G., NJIHIA G.M., MWAKIMA F.N., MORZARIA S.P. (1993): In vitro feeding of instars of the ixodid tick *Amblyomma variegatum* on skin membranes and its application to the transmission of *Theileria mutans* and *Cowdria ruminatum*, Parasitology 107 (3), 257-263.

VOLF P., HORÁK P. (2007): Paraziti a jejich biologie, Triton, Praha

VOTAVA M., ČERNOHORSKÁ L., HEROLDOVÁ M., HOLÁ V., MEJZLÍKOVÁ L., ONDROVČÍK P., RŮŽIČKA F., DVOŘÁČKOVÁ M., WOZNICOVÁ V., ZAHRADNÍČEK O. (2003): Lékařská mikrobiologie speciální, Neptun, Brno.

WALLADE S.M., YOUNG A.S., OCHIENG S.A., MWAURA S.N., MWAKIMA F.N. (1993): Transmission of *Theileria parva* to cattle by *Rhipicephalus appendiculatus*

adults fed as nymphae in vitro on infected blood through an artificial membrane, *Parasitology* 107 (3), 249-256.

YE, X., SUN Y., JU W., WANG X., CAO W., WU M. (2014): Vector competence of the tick *Ixodes sinensis* (Acari: Ixodidae) for *Rickettsia monacensis*, *Parasites and Vectors* 7, 512.

YODER, J. A., HANSON P. E., ZETTLER L. W., BENOIT J. B., GHISAYS 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 (8), 4994-4996.

YOUNG A.S., WALADDE S. M., MORZARIA S. P. (1996): Artificial feeding systems for ixodid ticks as a tool for study of pathogen transmission, *Ann N Y Acad Sci*, 791, 211-8.