

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



**Srovnání laboratorního modelu pro přenos bakterie
Anaplasma phagocytophilum klíšťaty *Ixodes ricinus* a
Ixodes scapularis.**

Bakalářská práce

Eliška Kalinová

Školitel: RNDr. Veronika Urbanová, Ph.D. (AV ČR)

České Budějovice 2020

Bakalářská práce

Kalinová, E., 2020: Srovnání laboratorního modelu pro přenos bakterie *Anaplasma phagocytophilum* klíšťaty *Ixodes ricinus* a *Ixodes scapularis*. [A comparison of laboratory models for a transmission of the bacterium *Anaplasma phagocytophilum* by ticks *Ixodes ricinus* and *Ixodes scapularis*. Bc. Thesis, in Czech.] – 29 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Anaplasma phagocytophilum is a significant tick-borne pathogen which colonizes granulocytic cells in vertebrate hosts. It occurs in North America and in several countries in Europe. It causes severe diseases of domestic animals and potentially fatal disease of humans called human granulocytic anaplasmosis (HGA). This study deals with the transmission of the bacterium *A. phagocytophilum* by two tick species (*Ixodes ricinus* and *Ixodes scapularis*) and implements a laboratory model for *A. phagocytophilum* transmission by tick *Ixodes ricinus*. In the thesis, I also executed a comparison of both transmissions.

Tato práce byla financována z grantů 18-01832S a 20-05736S GAČR.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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.

V Českých Budějovicích 22. května 2020.

Poděkování

Ráda bych vyjádřila vděk všem, kteří přispěli ke vzniku této bakalářské práce. Poděkování patří v první řadě mé školitelce RNDr. Veronice Urbanové, Ph.D., za odbornou pomoc, cenné rady a bezmeznou trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat vedoucímu Laboratoře imunologie vektorů na Parazitologickém ústavu AV ČR panu RNDr. Petru Kopáčkovi, CSc., za možnost vypracovat svou bakalářskou práci právě v této laboratoři a v neposlední řadě i všem ostatním pracovníkům a studentům laboratoře za poskytnutí rad a přátelského pracovního prostředí. Velký dík patří také mé rodině za nesmírnou podporu.

Obsah

1	Úvod a literární přehled	1
1.1	Klíšťata	1
1.1.1	Taxonomické zařazení	1
1.1.2	Morfologie	1
1.1.3	<i>Ixodes ricinus</i>	1
1.1.4	<i>Ixodes scapularis</i>	2
1.2	Rod <i>Anaplasma</i>	3
1.3	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	3
1.3.1	Morfologie	3
1.3.2	Výskyt a přenos	4
1.3.3	Životní cyklus	4
1.3.4	Lidská granulocytární anaplazmóza (HGA)	5
2	Cíle práce:	6
3	Materiál a metody	7
3.1	Laboratorní zvířata	7
3.1.1	Klíšťata	7
3.1.2	Myši	7
3.2	Buněčná kultura a barvení buněk	7
3.3	Infekce myší	8
3.4	Infekce klíšťat	8
3.5	Určování míry parazitémie	8
3.5.1	Krevní roztěry	8
3.5.2	Izolace DNA z myší krve	9
3.5.3	Izolace DNA z klíšťat	9
3.6	Polymerázová řetězová reakce (PCR) a qPCR	10
3.6.1	PCR a elektroforéza	10
3.6.2	q-PCR	11
4	Výsledky	13
4.1	Infekce <i>A. phagocytophilum</i> v HL-60 buňkách	13
4.2	Infekce u SCID myší	13

4.3	Infekce u C3H/HeN myši	15
4.4	Detekce infekce u larev a nymf <i>I. ricinus</i> a <i>I. scapularis</i>	16
4.5	Přenos <i>A. phagocytophilum</i> na neinfikované myši prostřednictvím nymf <i>I. ricinus</i> a <i>I. scapularis</i>	18
4.6	Porovnání míry infekce myši v závislosti na různé době sání nymf	19
5	Diskuze	20
5.1	Srovnání modelů přenosu <i>A. phagocytophilum</i>	20
5.2	Míra infekce myši v závislosti na různé době sání nymf	21
6	Závěr	23
7	Literatura.....	24

Seznam použitých zkratk

ABM = po dosátí (after blood meal)

bp = komplementární pár bazí (base pair)

CPD = citrát-fosfát-dextróza (citrate-phosphate-dextrose)

DNA = deoxyribonukleová kyselina

dpi = dny po infekci (days post infection)

DTV = deer tick virus

EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid

FF = plné nasátí (fully fed)

HGA = human granulocytic anaplasmosis

HGE = human granulocytic ehrlichiosis

Ir = *Ixodes ricinus*

Is = *Ixodes scapularis*

MEM = minimum essential medium

*m*sp4 = major surface protein 4

PBS = fyziologický fosfátový pufr (phosphate buffered saline)

PCR = polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

qPCR = kvantitativní polymerázová řetězová reakce (quantitative polymerase chain reaction)

RPMI = kultivační médium (Roswell Park Memorial Institute)

SCID = severe combined immunodeficiency

TAE = Tris base + Acetic acid + EDTA

TBEV = virus klíšťové encefalitidy (tick-borne encephalitis virus)

TBF = tick-borne fever

UV = ultrafialové záření (ultraviolet)

1 Úvod a literární přehled

1.1 Klíšťata

Klíšťata jsou obligátní ektoparazité živící se krví obratlovců a rovněž jsou významnými přenašeči široké škály patogenů (bakterií, virů i protozoí) způsobujících nemoci zvířat i lidí (De la Fuente et al., 2008). Mnoho z nich vážně ohrožuje lidské zdraví a mohou být fatální. Jelikož jsou klíšťata jedním z nejčastějších přenašečů chorob, je třeba jim věnovat patřičnou pozornost.

1.1.1 Taxonomické zařazení

Klíšťata taxonomicky řadíme do kmene Arthropoda, třídy Arachnida, podtřídy Acari a podřádu Ixodida, který je rozdělen do tří čeledí: čeleď Ixodidae (tzv. „hard ticks – tvrdá klíšťata“), čeleď Argasidae (tzv. „soft ticks – měkká klíšťata“) a monotypická čeleď Nuttalliellidae zahrnující pouze druh *Nuttalliella namaqua* (Guglielmone et al., 2010; Sonenshine et al., 2014a).

1.1.2 Morfologie

Tělo klíšťat se skládá ze 2 hlavních částí – capitulum a idiosoma. Capitulum je přední částí těla a nachází se zde ústní ústrojí s hypostomem, na zadní části (idiosoma) jsou umístěny končetiny (Sonenshine et al., 2014a). Jejich hlavním smyslovým orgánem je tzv. Hallerův orgán umístěný na prvním páru končetin (Parola & Raoult, 2001). Tvrdá klíšťata (Ixodidae) se od ostatních čeledí liší především přítomností tvrdého štítku na dorsální straně těla zvaného scutum.

1.1.3 *Ixodes ricinus*

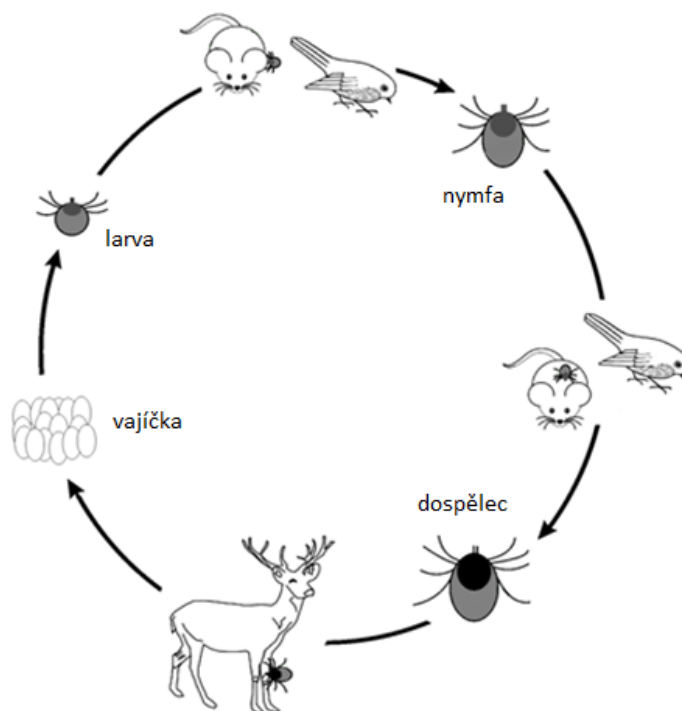
Ixodes ricinus (Linnaeus, 1758) se vyskytuje po celé Evropě, ve východní Asii a také v severní Africe. Preferuje vlhčí habitaty s vyšší vegetací jako např. louky, vřesoviště, lesní podrosty a městské parky (Parola & Raoult, 2001). Jeho životní cyklus má 3 aktivní vývojová stádia (larva, nymfa, dospělec) a trvá 2-3 roky. Stádium larvy má 3 páry končetin a hostiteli jsou obvykle menší až střední savci, na kterých saje 2-3 dny. Stádium nymfy má 4 páry končetin a saje 4-5 dní na savcích včetně člověka. Každé stádium saje zpravidla na jednom hostiteli a transformace do vyššího stádia (svlékání kutikuly) nastává po plném nasátí a opuštění hostitele. Z dospělců saje na hostiteli pouze samice a to 7-9 dní (Sonenshine et al., 2014a; Perner et al., 2016). Oplozená samice po dosátí opouští hostitele a naklade vajíčka, poté uhynie.

I. ricinus přenáší širokou škálu patogenů jako např. bakterii *Borrelia burgdorferi* sensu lato způsobující nemoc lymeskou boreliózu, protozoa rodu *Babesia* sp. způsobující babeziózu, virus klíšťové encefalitidy (TBEV), původce tularémie bakterii *Francisella tularensis*, *Anaplasma phagocytophilum* způsobující lidskou granulocytární anaplazmózu a další (Parola & Raoult, 2001; Deviatkin et al., 2020; Azagi et al., 2020).

1.1.4 *Ixodes scapularis*

Ixodes scapularis (Say, 1821) se vyskytuje na severovýchodě USA. Jeho výskyt úzce souvisí s mírou výskytu jeho primárního hostitele *Odocoileus virginianus* (Wilson et al., 1988; Eisen et al., 2017). Mezi další hostitele *I. scapularis* patří menší savci, ptáci a ještěři, ale také domestikovaná zvířata a v neposlední řadě i člověk (Sonenshine et al., 2014a). Životní cyklus tohoto klíšťe je shodný s životním cyklem druhu *I. ricinus* (viz Obrázek 1), má také 3 stádia sající na 3 různých hostitelích. Z vajíček se vylíhnou šestinohé larvy, které sají na ptácích a savcích. Po úplném nasátí, které trvá 3-5 dní nasátá larva odpadne a transformuje se do nymfy, která saje na svém hostiteli 3-4 dny. Dospělé samice sají obvykle 5-7 dní (Patnaude, 2000).

I. scapularis je v USA hlavním přenašečem původců lymeské boreliózy, lidské babeziózy a lidské granulocytární anaplazmózy (Des Vignes & Fish, 1997; Parola & Raoult, 2001), mohou však přenášet také DTV („deer tick virus“) (Aliota et al., 2014).



Obrázek 1: Životní cyklus klíšťe rodu *Ixodes*; Upraveno, převzato z Ruyts, (2017).

1.2 Rod *Anaplasma*

Rod *Anaplasma* označuje gram-negativní bakterie přenášené klíšťaty z čeledi Ixodidae. Jedná se o intracelulární patogeny savců způsobující mnohdy vážné choroby domestikovaných i divoce žijících zvířat a člověka (Sonenshine et al., 2014b).

Tento rod taxonomicky spadá do třídy Alphaproteobacteria, řádu Rickettsiales, čeledi Anaplasmataceae (Sonenshine et al., 2014b). Aktuální fylogenetickou klasifikaci řádu Rickettsiales založenou na genetické analýze 16S rRNA, groESL a genů pro povrchové proteiny vytvořil Dumler et al. (2001). V současnosti je známých minimálně 6 druhů rodu *Anaplasma* (Sonenshine et al., 2014b). Mezi druhy s celosvětovým rozšířením patří *A. marginale* způsobující horečnaté onemocnění skotu a *A. platys* vyskytující se především u psů (Rikihisa, 2011). Dalšími druhy jsou např. *A. bovis*, *A. ovis*, *A. phagocytophilum* a méně patogenní *A. centrale* (Hajdusek et al., 2013).

Různé druhy rodu *Anaplasma* napadají v hostitelské krvi různé typy buněk. *A. marginale* a *A. centrale* kolonizují erytrocyty, *A. bovis* monocyty, *A. phagocytophilum* granulocytární buňky a buňky endotelu a *A. platys* kolonizuje trombocyty (Rikihisa, 2011; Sonenshine et al., 2014b). Jednotlivé druhy se od sebe i přes genomickou příbuznost odlišují také specializací na různé hostitele i odlišnými druhy klíštěcích vektorů (Kocan et al., 2015).

1.3 *Anaplasma phagocytophilum*

Anaplasma phagocytophilum (Foggie 1949, dříve nazývána *Ehrlichia phagocytophilum*, *E. equi* a HGE agent) kolonizuje granulocyty v krvi obratlovců a způsobuje nemoci skotu i člověka. Existuje několik subpopulací druhu *A. phagocytophilum* s rozdílnou patogenitou adaptovaných na různé hostitele z řad savců i ptáků a na různé druhy klíšťat (Schotthoefer et al., 2014; Krakowetz et al., 2014).

1.3.1 Morfologie

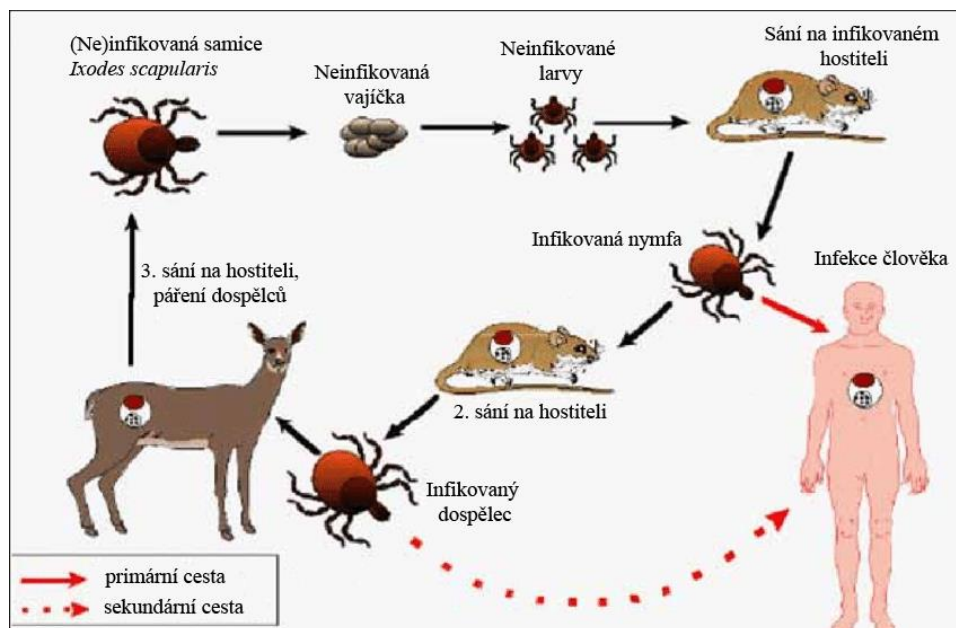
Stejně jako ostatní druhy z čeledi Anaplasmataceae má i *A. phagocytophilum* na svém povrchu dvě membrány. Velikost bakterie se pohybuje v rozmezí 0,4 – 2 μm (Rikihisa, 2011). V krvi hostitele *A. phagocytophilum* primárně přebývá v endosomech neutrofilů, kde vytváří specifické kolonie zvané moruly (Bakken & Dumler, 2008; Ayllon et al., 2015). Moruly jsou dobře viditelné pouze v krevních buňkách obratlovců, v buňkách klíštěte bývá bakterie pleomorfní (De la Fuente et al., 2016).

1.3.2 Výskyt a přenos

A. phagocytophilum se vyskytuje v Severní Americe, v Evropě a východní Asii. V USA a Kanadě je *A. phagocytophilum* přenášena druhy klíšťat *I. scapularis*, *I. spinipalpis* a *I. pacificus*. Evropskými vektory jsou druhy *I. ricinus* a *I. persulcatus* (Thomas et al., 2009; Dugat et al., 2015). Bakterií mohou být infikována během sání na hostiteli všechna vývojová stádia klíštěte (larva, nymfa i dospělec) a po infekci prvních dvou stádií klíštěte může dojít i k trans-stadiálnímu přenosu patogenu. (Bakken & Dumler, 2008).

1.3.3 Životní cyklus

Životní cyklus *A. phagocytophilum* obvykle zahrnuje 2 stádia – vegetativní retikulované stádium neschopné přežít mimo hostitelskou buňku a infekční denzní stádium (McDade, 1990). Během sání na infikovaném hostiteli se *A. phagocytophilum* dostává spolu s krví hostitele do střeva klíštěte. Uvnitř klíštěte bakterie napadá nejprve buňky střeva, kde dochází k množení bakterie binárním dělením (McDade, 1990). Následně se *A. phagocytophilum* transformuje na infekční stádium a napadá další tkáň klíštěte včetně slinných žláz, do jejichž buněk vstupuje endocytózou. *A. phagocytophilum* není zničena trávicími enzymy, jelikož endozomy s bakterií nezfúzí s lysozomy (Goodman, 2005). Ze slinných žláz pak během sání klíštěte infikuje *A. phagocytophilum* své další hostitele (Bakken & Dumler, 2008), viz Obrázek 2.



Obrázek 2: Životní cyklus *A. phagocytophilum*; Převzato z: Bacteriology – Chapter twenty one: *Rickettsia, Orientia, Ehrlichia, Anaplasma, Coxiella* and *Bartonella* (2016).

1.3.4 Lidská granulocytární anaplazmóza (HGA)

A. phagocytophilum byla dlouho známa pouze jako patogen způsobující nemoci domestikovaných zvířat, např. TBF („tick-borne fever“ známá též jako „pasture fever“) vyskytující se především u ovcí nebo granulocytární anaplazmóza koní a psů („equine and canine granulocytic anaplasmosis“) (Thomas et al., 2009). Poprvé byla choroba způsobená *A. phagocytophilum* pozorována u člověka na počátku 90. let minulého století v USA ve státech Wisconsin a Minnesota (Chen et al., 1994; Bakken et al. 1994). Tyto státy také společně s New York (Upstate) a Massachusetts patří mezi oblasti v USA s nejvyšším výskytem HGA (CDC, 2014; CDC, 2016). V roce 2009 byl zaznamenán první případ lidské granulocytární anaplazmózy v Kanadě (Parkins et al., 2009), první případ HGA v Evropě popsali Petrovec et al. v roce 1997. V současnosti jsou zaznamenány případy HGA v různých státech po celé Evropě, avšak počet potvrzených případů HGA je i tak mnohem nižší než v USA (Bakken & Dumler, 2015; Matei et al., 2019).

Nejčastějšími symptomy pacientů s HGA bývají vysoká horečka, zimnice, nauzea, bolesti hlavy, svalů a kloubů a u mnoha pacientů můžeme pozorovat i leukopenii a trombocytopenii (Sonenshine et al., 2014b; Bakken & Dumler, 2015). Nemoc má obvykle mírný průběh a v mnoha případech symptomy odezní i bez nasazení antibiotické léčby, nicméně vyšší věk, oslabená imunita, polymorbidita, nesouvisející probíhající infekce či abúzus psychoaktivních látek mohou zhoršit celkový průběh nemoci (Goodman, 2005; Thomas et al., 2009; Sonenshine et al., 2014b). Mortalita je poměrně nízká, pohybuje se mezi 0,2 a 1,2 % (Dahlgren et al., 2011; Bakken & Dumler, 2015). K léčbě HGA se běžně používá doxycyklin či jiné tetracyklinové antibiotikum (Bakken & Dumler, 2015).

Ačkoliv k nákaze dochází primárně prostřednictvím klíšťat, může k ní dojít i jinými způsoby jako např. krevní transfuzí a kontaktem s krví infikovaných zvířat, ale též transplacentálním přenosem (Horowitz et al., 1998; Dhand, 2007; Kemperman, 2008; Bakken & Dumler, 2008; Bakken & Dumler, 2015).

2 Cíle práce:

Cílem mé bakalářské práce bylo v první řadě osvojit si základní vědecké metody nezbytné pro experimentální část práce, dále zavést laboratorní model pro přenos *A. phagocytophilum* klíštětem *I. ricinus* a v neposlední řadě porovnat přenos a průběh infekce *A. phagocytophilum* u druhů *I. ricinus* a *I. scapularis*.

3 Materiál a metody

3.1 Laboratorní zvířata

3.1.1 Klíšťata

Larvy a nymfy klíšťat *I. ricinus* a *I. scapularis* použité v této práci pocházely z laboratorních chovů Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR. Dospělá klíšťata a nymfy *I. scapularis* byly do chovů laskavě poskytnuty Dr. Michaellem L. Levinem, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA. Klíšťata byla umístěna v klima boxu ve skleněných dózách o vlhkosti 95 %, teplotě 24 °C a s denní a noční periodou 15/9 hodin.

3.1.2 Myši

Inbrední imunodeficientní SCID myši pocházely z laboratorních chovů Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR. Inbrední C3H/HeN myši (6 týdnů staré) byly zakoupeny od společnosti AnLab (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME).

Se všemi laboratorními zvířaty bylo jednáno v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání České republiky č.246/1992 Sb. podle schváleného projektu pokusů č. 25/2018.

3.2 Buněčná kultura a barvení buněk

Zmražený vzorek HL-60 promyelotické buněčné linie (ATCC, CCL-240TM) byl rozmražen při 37 °C a centrifugován 5 minut při 300 x g. Po odstranění supernatantu byl pelet resuspendován v 5 ml kultivačního média RPMI 1640 medium (Gibco) smíchaném s 10% inaktivovaným bovinním sérem (FCS, Lonza) a 2% neesenciálními aminokyselinami MEM (Gibco). Následovala centrifugace 5 minut při 300 x g. Poté byl opět odstraněn supernatant, pelet byl resuspendován v 10 ml média a přemístěn do plastových kultivačních lahviček s filtrem a kultivován v termoboxu při 37 °C s 5% CO₂.

Bakterie *A. phagocytophilum* NY18 (obdržena od prof. José de la Fuente, USA) byla udržována v HL-60 buňkách. Každé dva dny byla v buňkách kontrolována infekce a bylo přidáváno čerstvé médium. Pasáž *A. phagocytophilum* do nových HL-60 buněk probíhala každý sedmý den. Z infikovaných buněk přenesených na sklíčko byl zhotoven roztěr, který byl fixován a barven fixačním a barvicím roztokem Diff-Quik Stain Set (Siemens). Sklíčko s roztěrem buněčné kultury bylo ponecháno 10 sekund ve směsi 50% methanolu a fast green (Fix), dále 10 sekund v eosinu (I.) a nakonec 3 sekundy v thiazine dye (II.). Míra infekce buněk byla vyhodnocena pod světelným mikroskopem BX 53 (Olympus).

3.3 Infekce myši

Při dosažení 50% infekce HL-60 buněk bakterií *A. phagocytophilum*, byla kultura buněk centrifugována po dobu 5 min při 300 x g. Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován v 1,5 ml média. SCID myším bylo intraperitoneálně inokulováno 200 µl suspenze *A. phagocytophilum*. Infekce u SCID myši byla kontrolována pomocí PCR a kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) (2 až 14 dní po infekci) a vyšetřením krevních roztěrů pod světelným mikroskopem BX 53 (Olympus).

Infekce C3H/HeN myši byla provedena pasáží krve z infikovaných SCID myši dva týdny po jejich infekci. SCID myši pozitivní na infekci *A. phagocytophilum* byly usmány směsí 5% Narkamon (Spofa), 2% Rometar (Spofa) a 1× PBS (fyziologický fosfátový pufr, 8 g NaCl, 0,2 g KH₂PO₄, 2,9 g Na₂HPO₄, 0,2 g KCl do 1 l dH₂O, pH 7.3) v poměru 4:1:5. Jako prevence proti koagulaci byla krev smíchána s antikoagulačním roztokem CPD (citrát-fosfát-dextróza) (Sigma Aldrich) v poměru 6:1. Do C3H/HeN myši bylo intraperitoneálně inokulováno 200 µl infekční antikoagulované krve. Průběh infekce u C3H/HeN myši byl kontrolován stejně jako u SCID myši pomocí PCR a qPCR.

3.4 Infekce klíšťat

Po sedmi dnech od infekce C3H/HeN myši *A. phagocytophilum* bylo na každou infikovanou myš umístěno přibližně 100 larev *I. ricinus* nebo *I. scapularis*. Larvy sály do plného nasátí. Z plně nasátých larev, byla vyizolována DNA 4 dny po dosátí, 17 dní po dosátí a po metamorfóze do nymf (6 týdnů po dosátí) a infekce byla vyhodnocena pomocí PCR.

3.5 Určování míry parazitémie

3.5.1 Krevní roztěry

Z 5 µl periferní krve získané z ocasu myši byly zhotoveny krevní roztěry. Po zaschnutí byly zafixovány a barveny pomocí roztoků Diff-Quik staining kit (Siemens), jak je popsáno výše. Potvrzení infekce myších granulocytů *A. phagocytophilum* bylo provedeno pod světelným mikroskopem Olympus BX 53 (zvětšení 1000x). Fotografie byly pořízeny kamerou Olympus DP72 pomocí CellSens imaging softwaru.

3.5.2 Izolace DNA z myší krve

DNA z krve infikovaných myší byla izolována pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) podle protokolu výrobce. K 15 μ l myší krve bylo přidáno 200 μ l pufru AL a 20 μ l proteinasy K, vše bylo zvortexováno a inkubováno 10 minut při 56 °C. Ke směsi bylo přidáno 200 μ l ethanolu a vzorky byly opět zvortexovány. Vzorky byly přemístěny do DNeasy Mini Spin kolonek umístěných ve sběrných mikrozkuvkách o objemu 2 ml a centrifugovány 1 minutu při 6000 x g. Proteklý roztok ve sběrných mikrozkuvkách byl společně s mikrozkuvkami odstraněn. Kolonky byly umístěny do nových sběrných mikrozkuvek. Bylo přidáno 500 μ l pufru AW1 a vzorky byly centrifugovány 1 minutu při 6000 x g. Proteklý roztok ve sběrných mikrozkuvkách byl společně s mikrozkuvkami odstraněn. Kolonky byly umístěny do nových sběrných mikrozkuvek. Bylo přidáno 500 μ l pufru AW2 a vzorky byly centrifugovány 3 minuty při 20 000 x g. Proteklý roztok ve sběrných mikrozkuvkách byl společně s mikrozkuvkami odstraněn. Kolonky byly umístěny do nových mikrozkuvek o objemu 1,5 ml a bylo přidáno 100 μ l elučního pufru AE. Vzorky byly jednu minutu ponechány při pokojové teplotě a poté následovala centrifugace 1 minutu při 6000 x g. Izolovaná DNA byla uchovávána při teplotě 4 °C.

3.5.3 Izolace DNA z klíšťat

Pro izolaci DNA z infikovaných klíšťat byl rovněž použit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). DNA byla izolována z 10 larev odebraných z každé myši v časových intervalech 4 dny po dosátí, 17 dní po dosátí a 6 týdnů po dosátí (po převlečení do nymf). Larvy nebo nymfy byly jednotlivě umístěny do speciálních zkuvek Extra Low Binding and Bead Beating (BIOplastics) se 3 kuličkami Triple-Pure Zirconium Beads, o průměru 3 mm (Benchmark Scientific) a byly rozdrčeny v přístroji MagNA Lyser (Roche) po dobu 90 sekund, 300 x g. Poté bylo ke vzorkům přidáno 180 μ l pufru ATL smíchaného s 20 μ l proteinasy K. Vzorky byly zvortexovány a inkubovány při 56 °C přes noc. Druhý den byly vzorky zvortexovány po dobu 15 vteřin a bylo přidáno 200 μ l pufru AL společně s 200 μ l 96% ethanolu. Vše bylo opět zvortexováno a přeneseno do DNeasy Mini Spin kolonek. Další postup izolace byl stejný, jak je zmíněno výše.

3.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR) a qPCR

3.6.1 PCR a elektroforéza

Infekce SCID myši, C3H/HeN myši a klišťat byla vyhodnocována pomocí PCR a elektroforézy. PCR reakce byla prováděna v přístroji T100 Thermal cycler (Bio-Rad). Objem jedné PCR reakce byl 25 μ l, objemy činidel jsou uvedeny v Tabulce I. Délky trvání jednotlivých kroků a teploty jsou uvedeny v Tabulce II. Izolovaná DNA z myši a klišťat infikovaných *A. phagocytophilum* byla použita jako templát pro PCR reakci.

Výsledky amplifikace genu *msp4* (major surface protein 4) *A. phagocytophilum* byly ověřeny elektroforeticky na 1% agarózovém gelu smíchaném s ethidium bromidem (0,5 μ g/ml) a připraveném rozpuštěním agarózy (VWR Chemicals) v 1x TAE pufru (40 mM Tris-acetát, 1mM EDTA, pH 8,0). Elektroforéza probíhala při napětí 100 V po dobu 30 minut. Výsledky byly vizualizovány pod UV světlem a molekulová velikost byla určena podle 100 bp DNA ladderu (Thermo Fisher Scientific).

Tabulka I: PCR reakční směs.

Činidlo	Objem [μ l]
FastStart PCR Master (Roche)	12,5
<i>msp4</i> F (10 μ M)	1
<i>msp4</i> R (10 μ M)	1
Nuclease-free H ₂ O (Top-Bio)	6,5
DNA	4

Tabulka II: PCR amplifikační program.

Proces	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
Iniciace	95	10	1x
Denaturace	95	0,50 (30 s)	40 x
Nasedání primerů	60	0,50 (30 s)	
Elongace	72	1	
Finální elongace	72	10	1x
Ochlazení	12	∞	1x

3.6.2 q-PCR

Relativní množství genu *msp4* (major surface protein 4) *A. phagocytophilum* v myší krvi bylo stanoveno pomocí qPCR a vztaženo k relativnímu množství myšího *aktinu*. Reakční směs obsahovala reagentie uvedené v Tabulce III a IV, qPCR probíhala v přístroji QuantStudio 6 (Applied Biosystems) podle programů viz Tabulka V a VI. Referenčním genem pro normalizaci testovaných vzorků byl gen pro myší *aktin* (Tabulka VII). Specifita primeru byla ověřena pomocí křivky tání.

Tabulka III: qPCR reakční směs – *A. phagocytophilum msp4* relativní kvantifikace.

Činidlo	Objem [μl]
LC SYBR Master (Roche)	12,5
<i>msp4</i> F (10 μM)	1
<i>msp4</i> R (10 μM)	1
Nuclease-free H ₂ O (Top-Bio)	5,5
DNA	5

Tabulka IV: qPCR reakční směs – *M. musculus* relativní kvantifikace genu pro *aktin*.

Činidlo	Objem [μl]
LC Probes Master (Roche)	12,5
Mm <i>aktin</i> F (10 μM)	1
Mm <i>aktin</i> R (10 μM)	1
Mm <i>aktin</i> P (10 μM)	1
Nuclease-free H ₂ O (Top-Bio)	4,5
DNA	5

Tabulka V: qPCR amplifikační program pro *msp4*.

Proces	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
Preinkubace	95	10	1x
Denaturace	95	0,33 (20 s)	50 x
Nasedání primerů	60	0,33 (20 s)	
Elongace	72	0,50 (30 s)	

Tabulka VI: qPCR amplifikační program pro myši *aktin*.

Proces	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
Preinkubace	95	10	1x
Denaturace	95	0,25 (15 s)	50 x
Nasedání primerů a elongace	60	1	

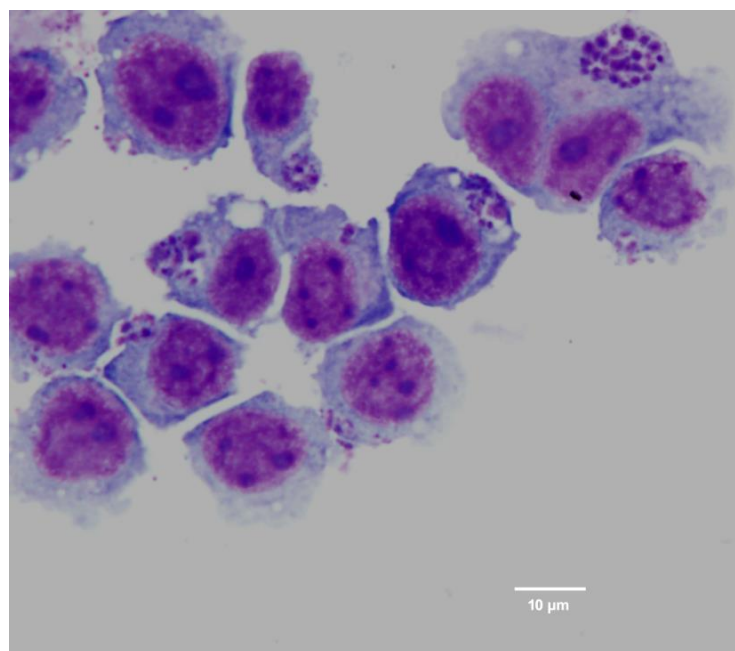
Tabulka VII: Použité primery.

Organismus	Gen	Referenční číslo	Sekvence primeru
<i>Mus musculus</i>	<i>aktin</i>	Mm <i>aktin</i> P	CACTGCCGCATCCTCTTCCTCCC
		Mm <i>aktin</i> F	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC
		Mm <i>aktin</i> R	CAATAGTGATGACCTGGCCGT
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	<i>msp4</i>	<i>msp4</i> F	TGACAGGGGAGGATCTTACG
		<i>msp4</i> R	TCTAGCTCCGCCAATAGCAT

4 Výsledky

4.1 Infekce *A. phagocytophilum* v HL-60 buňkách

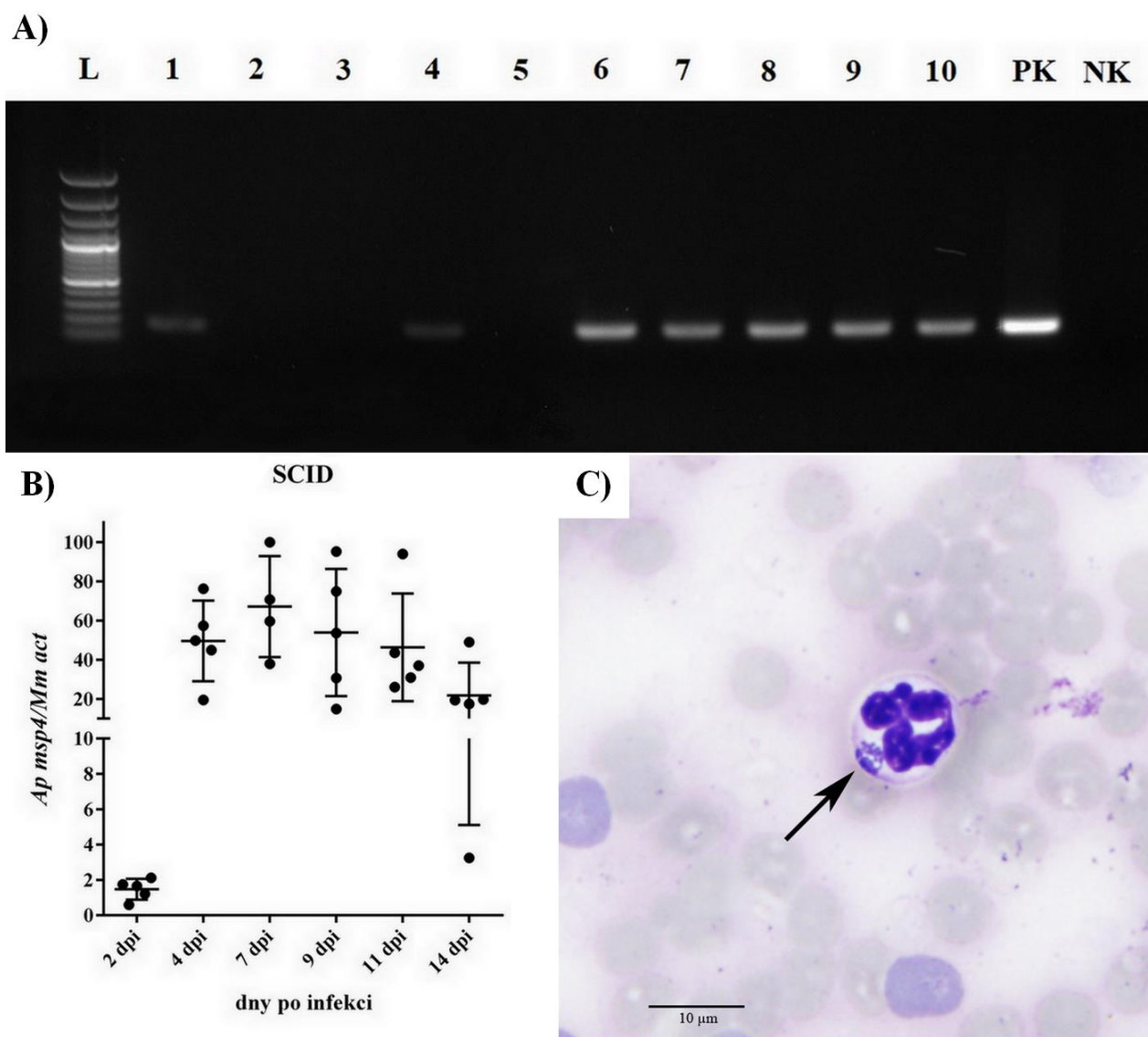
Bakterie *A. phagocytophilum* byla úspěšně kultivována v HL-60 buňkách (Obrázek 3). Před pasáží do čerstvé kultury HL-60 buněk byla infekce *A. phagocytophilum* v kultuře minimálně 50 %.



Obrázek 3: Infekce *A. phagocytophilum* v HL-60 buňkách; Buňky barveny pomocí Diff-Quick Stain Set. Jádro-růžově, cytoplasma-modře.

4.2 Infekce u SCID myši

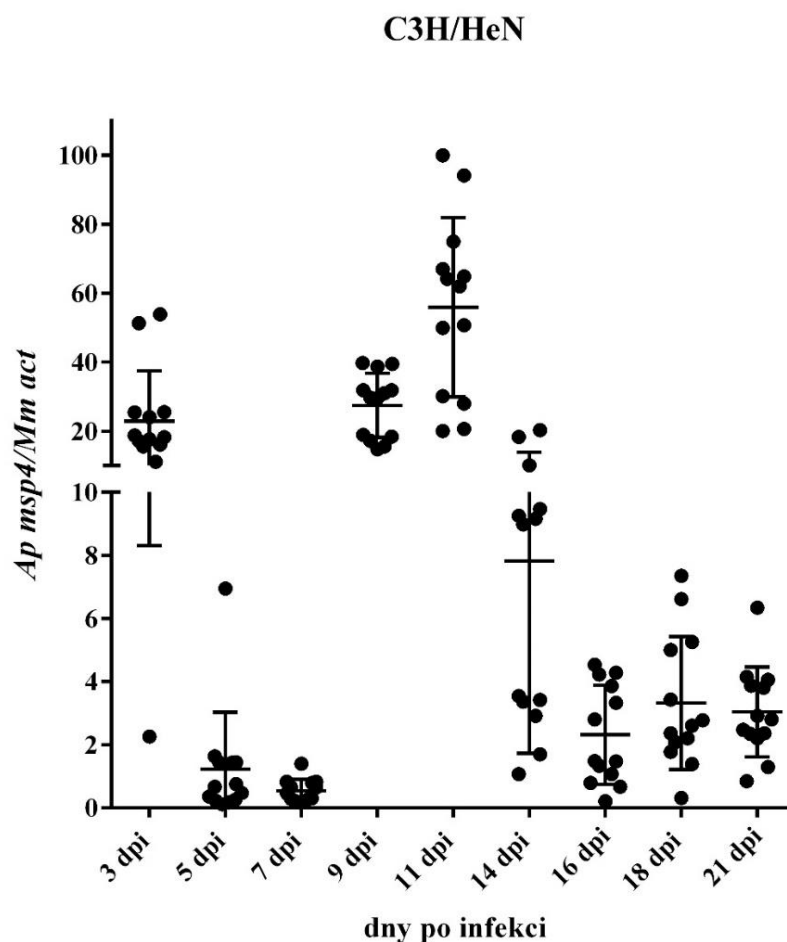
Po inokulaci pěti SCID myši kulturou *A. phagocytophilum* byla pozorována infekce nakažených myšiček po dobu 14 dní každé 2-3 dny od počátku infekce. Vývoj infekce v myšičkách byl pozorován pomocí PCR (Obrázek 4A) a následně qPCR metody, kdy DNA byla izolována z periferní krve myšiček. Z elektroforetického gelu je patrné, že po čtyřech dnech od inokulace kulturou HL-60 nakaženou *A. phagocytophilum* byla u všech pěti myšiček prokázána přítomnost bakterie. Průběh infekce u SCID myšiček v dalších dnech shrnuje následující graf (Obrázek 4B). Infekce vzrůstá mezi druhým a čtvrtým dnem od inokulace bakterií a následující týden osciluje kolem podobné vysoké hodnoty. Po dvou týdnech od inokulace začala infekce mírně klesat. Přítomnost *A. phagocytophilum* byla rovněž prokázána mikroskopicky (Obrázek 4C).



Obrázek 4: Detekce a průběh infekce *A. phagocytophilum* v krvi SCID myši; (A) Fotografie elektroforetického gelu (metoda PCR) znázorňující infekci *A. phagocytophilum* u SCID myši.; L = ladder (100 bp), 1-5 = myš č.1-5 dva dny po infekci, 6-10 = myš č.1-5 čtyři dny po infekci, PK = pozitivní kontrola, NK = negativní kontrola; (B) Relativní kvantifikace genu *msp4* *A. phagocytophilum*, vztaheno ke genu pro *aktin* z myši *M. musculus*, dpi = dny po infekci; (C) *A. phagocytophilum* (označena šipkou) v granulocytu SCID myši (9dpi).

4.3 Infekce u C3H/HeN myši

Z infikovaných SCID myši (14 dpi) byla pasážována krev do třinácti C3H/HeN myši. Záměrem pasáže krve z imunodeficientních SCID myši do C3H/HeN myši bylo zvýšení virulence patogenu. Průběh a míra infekce v hostiteli byly pozorovány pomocí PCR a qPCR metody. Po 3 dnech od pasáže byla infekce pozorovatelná u všech myši. Mezi 5. a 7. dnem od pasáže nastal pokles, avšak 9. den začala infekce rapidně vzrůstat, až dosáhla 11. den nejvyšší hodnoty. Od 14. dne míra infekce opět poklesla (Obrázek 5). Sedmý den infekce C3H/HeN myši *A. phagocytophilum* bylo na každou infikovanou myš umístěno přibližně 100 larev *I. ricinus* nebo *I. scapularis*. Larvy sály do plného nasátí.



Obrázek 5: Průběh infekce u C3H/HeN myši; Relativní kvantifikace genu *msp4* *A. phagocytophilum*, vztaženo ke genu pro *aktin* z myši *M. musculus*.

4.4 Detekce infekce u larev a nymf *I. ricinus* a *I. scapularis*

Z deseti larev *I. ricinus* nebo *I. scapularis* z každé myši byla ve třech časových intervalech 4 dny po dosátí (4 dny ABM), 17 dní po dosátí (17 dní ABM) a po metamorfóze larev do nymf (6 týdnů ABM) vyizolována DNA a infekce jednotlivých klíšťat byla vyhodnocena pomocí PCR. U klíšťat druhu *I. ricinus* 4 dny po dosátí byla infekce klíšťat téměř sto procent. Po dalších 13 dnech se počet infikovaných larev snížil na poloviční hodnotu 55,7 % a po metamorfóze do nymf (6 týdnů po dosátí) byla míra infekce v klíšťatech již jen 8,3 % (Tabulka VIII).

Tabulka VIII: Míra infekce larev a nymf druhu *I. ricinus* kontrolovaná pomocí PCR.

	Počet infekčních larev <i>I. ricinus</i> z celkového počtu.		
Myš	4 d ABM	17 d ABM	6 t ABM
1	10/10	5/10	2/10
2	10/10	7/10	1/10
3	10/10	6/10	1/10
4	10/10	8/10	0/10
5	10/10	6/10	1/10
6	9/10	7/10	0/10
celkem	98,3 %	55,7 %	8,3 %

(d = dny, t = týdny, ABM = po dosátí)

U druhu *I. scapularis* dosahovala infekce *A. phagocytophilum* 4 dny po dosátí mnohem nižších hodnot. Na rozdíl od předchozího druhu činila 58,6 %. Po dalších 13 dnech klesla na 37,1 % a po metamorfóze do nymf (6 týdnů po dosátí) se míra infekce v klíšťatech ustálila na 15,7 %, což je ve srovnání s *I. ricinus* téměř dvojnásobná hodnota (Tabulka IX).

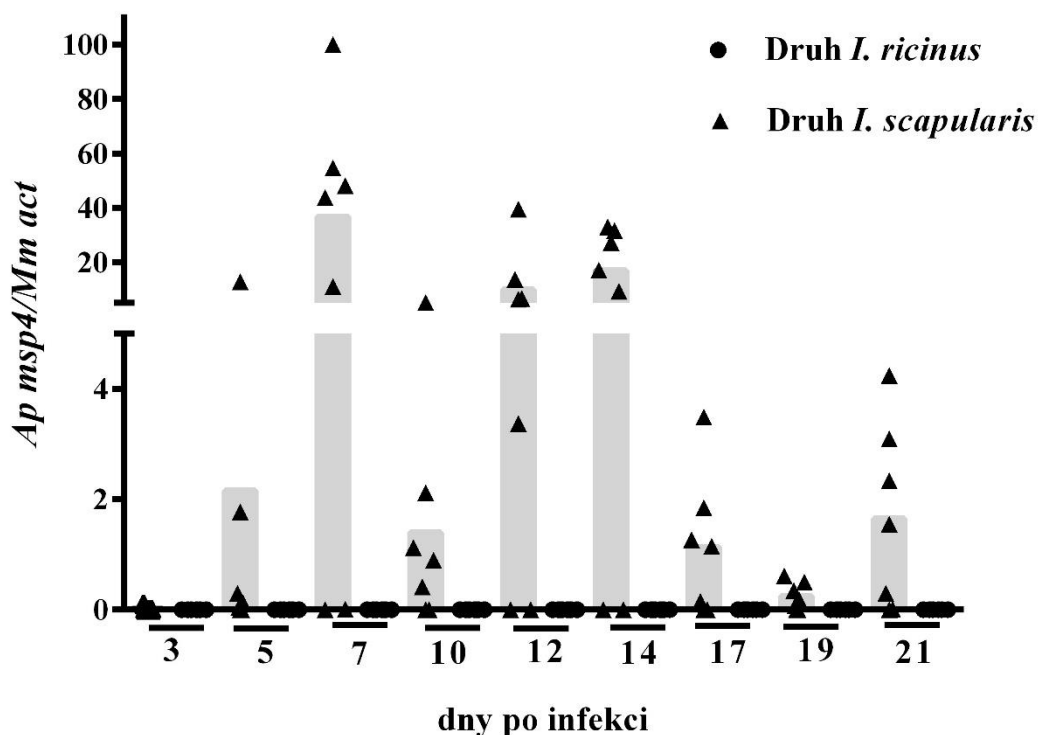
Tabulka IX: Míra infekce larev a nymf druhu *I. scapularis* kontrolovaná pomocí PCR.

Myš	Počet infekčních larev <i>I. scapularis</i> z celkového počtu.		
	4 d ABM	17 d ABM	6 t ABM
1	7/10	5/10	0/10
2	6/10	9/10	3/10
3	6/10	0/10	0/10
4	7/10	3/10	2/10
5	6/10	3/10	3/10
6	2/10	3/10	1/10
7	7/10	3/10	2/10
celkem	58,6 %	37,1 %	15,7 %

(d = dny, t = týdny, ABM = po dosátí)

4.5 Přenos *A. phagocytophilum* na neinfikované myši prostřednictvím nymf *I. ricinus* a *I. scapularis*

Nymfy infikované *A. phagocytophilum* získané způsobem popsaným v předchozím experimentu sály na neinfekčních C3H/HeN myších (na každé myši sálo 15 nymf). Průběh a míra infekce myší byly vyhodnocovány pomocí qPCR metody a jsou zobrazeny níže (Obrázek 6). Z grafu je patrné, že žádná ze 6 myší, na kterých sály nymfy *I. ricinus*, se neinfikovaly *A. phagocytophilum*, zatímco nymfy *I. scapularis* touto bakterií nakazily 5 ze 7 myší.



Obrázek 6: Přenos infekce na C3H/HeN myši nymfami *I. ricinus* a *I. scapularis*; Relativní kvantifikace genu *msp4* *A. phagocytophilum*, vztaženo ke genu pro *aktin* z myši *M. musculus*; ● = míra infekce myší, na kterých sály nymfy druhu *I. ricinus*; ▲ = míra infekce myší, na kterých sály nymfy druhu *I. scapularis*.

4.6 Porovnání míry infekce myši v závislosti na různé době sání nymf

Následující pilotní experiment byl proveden s nymfami *I. scapularis* infikovanými *A. phagocytophilum*. Infikované nymfy byly rozděleny do tří skupin. Nymfy první skupiny sály 24 hodin, druhé skupiny 48 hodin a poté byly z myši odebrány. Nymfy poslední skupiny sály na myších do plného nasátí (FF). Každé dva až tři dny od začátku sání klišťat byla odebírána krev z myši, která následně sloužila k izolaci DNA a ke kontrole infekce *A. phagocytophilum* pomocí PCR metody. Z následující tabulky (Tabulka X) vyplývá, že s delším časem sání nymf *I. scapularis* roste úspěšnost přenosu infekce na myši.

Tabulka X: Počet infikovaných myši v závislosti na různé délce sání nymf *I. scapularis*.

Délka sání	Počet infikovaných myši
24h	1/5
48h	2/5
FF	4/6

(FF = do plného nasátí)

5 Diskuze

V posledních letech dochází v Evropě ke změnám geografického rozšíření i abundance evropského druhu klíštěte *Ixodes ricinus*, což vede k objevování nových klíšťaty přenášených onemocnění a k nárůstu výskytu stávajících (Gray et al., 2009; Medlock et al., 2013). Důvodem jsou nejen klimatické změny, ale také lidské faktory jako cestování a častější trávení volného času v přírodě (Beugnet & Marie, 2009). Pro další výzkum a vývoj nových efektivních metod pro kontrolu přenosu a šíření infekce *A. phagocytophilum* v Evropě je důležité zavést model přenosu bakterie klíštětem *I. ricinus*, který napodobuje přirozený životní cyklus *A. phagocytophilum* v přírodě. Hlavním záměrem této práce bylo zavedení modelu pro přenos bakterie *A. phagocytophilum* druhem klíštěte *I. ricinus* v laboratorních podmínkách a porovnání průběhu infekce u druhů *I. ricinus* a *I. scapularis*.

5.1 Srovnání modelů přenosu *A. phagocytophilum*

A. phagocytophilum lze kultivovat v lidské promyelotické buněčné linii HL-60, což bývá v experimentech nejčastější volbou, ačkoliv Hodzic et al. (1998a) zjistil, že kultivaci *A. phagocytophilum* v HL-60 buňkách se snižuje patogenita bakterie. Další možností může být kultivace v klíštěcích buňkách ISE6 a IDE8 pocházejících z druhu *I. scapularis* (Atif, 2015; Almazan, 2020). V mé práci byla *A. phagocytophilum* kultivována v HL-60 buňkách, avšak ke zvýšení virulence byla provedena pasáž krve ze SCID do C3H/HeN myši, jelikož jsme v naší laboratoři v předchozích experimentech zjistili, že C3H/HeN myši nakažené pasáží krve z infikovaných SCID myši mají mnohem vyšší míru parazitémie v porovnání s myšmi, které byly nakažené *A. phagocytophilum* z kultury buněk HL-60.

Průběh infekce u klíšťat se mezi oběma druhy liší již v míře infekce po dosátí larev a po metamorfóze do nymf. Larvy obou druhů sály v době nárůstu infekce v C3H/HeN myších (7-10 dpi). Míra infekce u larev *I. ricinus* čtyři dny po dosátí dosahovala téměř 100 %. Po metamorfóze do nymf však klesla na 8,3 %. Infekce klesla po metamorfóze do nymf také u *I. scapularis*, avšak ne tak výrazně (z 58,6 % na 15,7 %). Zajímavé je porovnání vývoje infekce *A. phagocytophilum* s infekcí *Borrelia afzelli* v larvách a nymfách *I. ricinus*. V pokusu s kmenem CB43 bakterie *B. afzelli* bylo po metamorfóze pozitivních 90-100 % nymf, které předtím sály na infekčních C3H/HeN myších jako larvy (Pospisilova et al., 2019).

Z výsledků mých pokusů vyplývá, že larvy *I. ricinus* po metamorfóze do nymf nebyly schopny přenést infekci na C3H/HeN myši, na rozdíl od *I. scapularis*. Zajímavé pozorování přinesl Hodzic et al. (2001) v jehož pokusu nebyla přenesena infekce na všechny myši, ačkoliv na nich sálo šest infekčních nymf *I. scapularis* do plného nasátí. Experimenty zabývající se přenosem *A. phagocytophilum* dokázaly, že k nákaze myši je potřeba vysokého počtu bakterií (10^4 - 10^5) (Hodzic et al., 1998b) anebo vysoký počet infekčních klíšťat (Pusterla et al., 1999; Levin et al., 1999). Lze se tedy domnívat, že v nymfách *I. ricinus* v mém experimentu nebylo dostatečné množství patogenu pro infekci myši a zároveň bylo infikováno malé procento nymf (8,3 %). Tento jev by mohl souviset s faktem, že larvy, jakožto anatomicky nejmenší vývojové stádium, jsou schopny nasát menší množství krve než ostatní stádia, a tudíž i méně bakterií v ní obsažených (Almazan et al. 2020).

Dalším vysvětlením, proč nymfy *I. ricinus* nepřenesly infekci na C3H/HeN myši, může být kombinace kmenu NY18 *A. phagocytophilum* pocházejícího z USA s tímto evropským druhem klíštěte. Z mého pozorování je zřejmé, že na rozdíl od evropského druhu *I. ricinus* je americký druh *I. scapularis* vhodnějším vektorem pro kmen NY18 *A. phagocytophilum*. Několik studií prokázalo, že kmeny *A. phagocytophilum* se liší v infekčnosti, přičemž určitý kmen infekční pro jeden organismus, nemusí být infekční pro jiný (Stannard et al., 1969; Foley et al., 2009).

5.2 Míra infekce myši v závislosti na různé době sání nymf

Výsledky posledního pilotního experimentu s nymfami *I. scapularis* ukazují, že s delším časem sání nymf roste úspěšnost přenosu infekce na C3H/HeN myši. Při sání po dobu 24 hodin byla nakažena 1 myš z 5 (navíc pod detekční hladinou), při sání 48 hodin byly nakaženy 2 myši z 5. Až při sání nymf do plného nasátí byla nakažena více jak polovina myší (4 ze 6). Tyto výsledky se shodují s experimentem provedeným Katavalos et al. (1998), ve kterém byla nakažena pouze jedna C3H/HeJ myš z 28 při sání nymf *I. scapularis* méně než 30 hodin. Oproti tomu při sání nymf 36 hodin a více bylo nakaženo přes 2/3 myší z celkového počtu 25. Model tedy přinesl poznatek, že k přenosu infekce *A. phagocytophilum* je potřeba nejméně jeden den sání nymf. Podobné výsledky přinesl i experiment, ve kterém byly nymfy *I. scapularis* schopné přenést infekci na C3H/HeJ myši až po sání alespoň 48 hodin (Hodzic et al., 1998b).

V rozporu s těmito pozorováními je pokus provedený Des Vignes et al. (2001), který pracoval s *A. phagocytophilum* přirozeně se vyskytující v klíšťatech. V práci se zabýval především přenosem bakterie *Borrelia burgdorferi*, přenosu bakterie *A. phagocytophilum* byla věnována pozornost pouze okrajově. V tomto experimentu došlo k přenosu infekce *A. phagocytophilum* na 2 ze 3 myší při sání nymf druhu *I. scapularis* po dobu 24 hodin. Je pravděpodobné, že tento výsledek může být ovlivněn malým počtem myší, vliv by mohl mít i přirozený původ *A. phagocytophilum*. Jelikož v tomto pokusu klíšťata a tudíž i *A. phagocytophilum* pocházely z volné přírody, myši mohly být nakažené infekčnější formou *A. phagocytophilum*, v nymfách se rovněž mohlo vyskytovat více různě virulentních kmenů této bakterie.

Bylo by zajímavé provést tento pilotní experiment znovu a s větším počtem myší a nymf a s různými kmeny bakterie *A. phagocytophilum*. Jelikož pokud by docházelo k přenosu *A. phagocytophilum* při sání nymf 24 hodin, znamenalo by to, že odstranění klíštěte po jednom dni nemusí být dostatečné k zabránění přenosu infekce (Des Vignes et al., 2001).

6 Závěr

Larvy obou klíštěcích druhů se nakazily při sání na C3H/HeN myších infikovaných bakterií *A. phagocytophilum*. Při metamorfóze do nymf infekce výrazně klesla – u *I. ricinus* z 98,3 % na 8,3 % a u *I. scapularis* z 58,6 % na 15,7 %. Nymfy druhu *I. ricinus* nebyly schopné infikovat C3H/HeN myši bakterií *A. phagocytophilum*. S delším časem sání nymf *I. scapularis* roste úspěšnost přenosu infekce *A. phagocytophilum* na myši.

7 Literatura

ALIOTA, M. T.; DUPUIS, A. P.; WILCZEK, M. P.; PETERS, R. J.; OSTFELD, R. S.; KRAMER, L. D.; The Prevalence of Zoonotic Tick-Borne Pathogens in *Ixodes Scapularis* Collected in the Hudson Valley, New York State. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*. 2014, 14 (4), 245-250.

ALMAZAN, C.; FOURNIOL, L.; ROUXEL, C.; ALBERDI, P.; GANDOIN, C.; LAGREE, A. C.; BOULOUIS, H. J.; DE LA FUENTE, J.; BONNET, S. I.; Experimental *Ixodes ricinus*-Sheep Cycle of *Anaplasma phagocytophilum* NV2Os Propagated in Tick Cell Cultures. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020, 7, 40.

ATIF, F. A.; *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: Rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. *Parasitology Research*. 2015, 114, 3941–3957.

AYLLON, N.; VILLAR, M.; GALINDO, R. C.; KOCAN, K. M.; SIMA, R.; LOPEZ, J. A.; VAZQUEZ, J.; ALBERDI, P. et. al; Systems Biology of Tissue-Specific Response to *Anaplasma phagocytophilum* Reveals Differentiated Apoptosis in the Tick Vector *Ixodes scapularis*. *PLOS Genetics*. 2015, 11 (3), e1005120.

AZAGI, T.; HOORNSTRA, D.; KREMER, K.; HOWIUS, J. W. R.; SPRONG, H.; Evaluation of Disease Causality of Rare *Ixodes ricinus*-Borne Infections in Europe. *Pathogens*. 2020, 9 (2), 150.

BACTERIOLOGY – Chapter twenty one: *Rickettsia*, *Orientia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Coxiella* and *Bartonella*. In: Microbiology and Immunology On-line [online]. University of South Carolina School of Medicine, 2016 [cit. 2020-05-14]. Dostupné z: <https://microbiologybook.org/mayer/ehrlich-nh-hge.gif>.

BAKKEN, J. S.; DUMLER, S.; CHEN, S. M.; ECKMAN, M. R.; VANETTA, L. L.; WALKER D. H.; Human Granulocytic Ehrlichiosis in the Upper Midwest United States. A New Species Emerging? *Journal of the American Medical Association*. 1994, 272 (3), 212-218.

BAKKEN, J. S.; DUMLER, S.; Human Granulocytic Anaplasmosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2008. 22, 433-448.

BAKKEN, J. S.; DUMLER, S.; Human Granulocytic Anaplasmosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2015. 29, 341-355.

- BEUGNET, F.; MARIE, J. L.; Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Veterinary Parasitology*. 2009, 163 (4), 298–305.
- CDC; Notice to Readers: Final 2013 Reports of Nationally Notifiable Infectious Diseases. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2014, 63 (32), 702-715.
- CDC; Notice to Readers: Final 2015 Reports of Nationally Notifiable Infectious Diseases. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2016, 65 (46), 1306-1321.
- CHEN, S. M.; DUMLER, J. S.; BAKKEN, J. S.; WALKER, D. H.; Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiological agent of human disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994, 32, 589–95.
- DAHLGREN, F. S.; MANDEL, E. J.; KREBS, J. W.; MASSUNG, R. F.; MCQUISTON, J. H.; Increasing incidence of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* in the United States, 2000-2007. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2011, 85 (1), 124–131.
- DE LA FUENTE, J.; ESTRADA-PEÑA, A.; VENZAL, J. M.; KOCAN, K. M.; SONENSHINE, D. E.; Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience*. 2008, 13, 6938-6946.
- DE LA FUENTE, J.; ESTRADA-PEÑA, A.; CABEZAS-CRUZ, A.; KOCAN K. M.; *Anaplasma phagocytophilum* Uses Common Strategies for Infection of Ticks and Vertebrate Hosts. *Trends in Microbiology*. 2016, 24 (3), 173-180.
- DES VIGNES F.; FISH D.; Transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by host-seeking *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in southern New York State. *Journal of Medical Entomology*. 1997, 34 (4), 379-382.
- DES VIGNES, F.; PIESMAN, J.; HEFFERNAN, R.; SCHULZE, T. L.; STAFFORD, K. C.; FISH, D.; Effect of Tick Removal on Transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* Nymphs. *The Journal of Infectious Diseases*. 2001, 183 (5), 773-778.
- DEVIATKIN, A. A.; KHOLODILOV, I. S.; VAKULENKO, Y. A.; KARGANOVA, G. G.; LUKASHEV, A. N.; Tick-Borne Encephalitis Virus: An Emerging Ancient Zoonosis? *Viruses*. 2020, 12 (2), 247.

- DHAND, A.; NADELMAN, R. B.; AGUERO-ROSENFELD, M.; HADDAD, F. A.; STOKES, D. P.; HOROWITZ, H. W.; Human Granulocytic Anaplasmosis During Pregnancy: Case Series and Literature Review. *Clinical Infectious Diseases*. 2007, 45 (5), 589-593.
- DUGAT, T.; LAGREE, A-C.; MAILLARD, R.; BOULOUIS, H-J.; HADDAD, N.; Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2015, 5, 1-18.
- DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R.; Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2001, 51, 2145-2165.
- EISEN, R. J.; KUGELER, K. J.; EISEN, L.; BEARD, CH. B.; PADDOCK, CH. D.; Tick-Borne Zoonoses in the United States: Persistent and Emerging Threats to Human Health. *ILAR Journal*. 2017, 58 (3), 319-335.
- FOLEY, J. E.; NIETO, N. C.; MASSUNG, R.; BARBET, A.; MADIGAN, J.; BROWN, R. N.; Distinct Ecologically Relevant Strains of *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerging Infectious Diseases*. 2009, 15 (5), 842-843.
- GOODMAN, J. L.; Human granulocytic anaplasmosis (ehrlichiosis). GOODMAN, J. L.; DENNIS, D. T.; SONENSHINE, D. E.; *Tick-Borne Diseases of Humans*. Washington, D. C.: ASM Press, 2005, s. 218-238. ISBN 1555812384.
- GRAY, J. S.; DAUTEL, H.; ESTRADA-PEÑA, A.; KAHL, O.; LINDGREN, E.; Effects of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Diseases in Europe. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2009, 593232.
- GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I. G.; SHAO, R.; BARKER, S. C.; The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*. 2010, 2528, 1-28.

HAJDUSEK, O.; SIMA, R.; AYLLÓN, N.; JALOVECKA, M.; PERNER, J.; DE LA FUENTE, J.; KOPACEK, P.; Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2013, 3, 26.

HODZIC, E.; IJDO, J. W.; FENG, S.; KATAVALOS, P.; SUN, W.; MARETZKI, C. H.; FISH, D.; FIKRIG, E.; TELFORD, S. R.; BARTHOLD, S. W.; Granulocytic Ehrlichiosis in the Laboratory Mouse. *The Journal of Infectious Diseases*. 1998a, 177 (3), 737-745.

HODZIC, E.; FISH, D.; MARETZKI, C. M.; DE SILVA, A. M.; FENG, S.; BARTHOLD, S. W.; Acquisition and transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998b, 36 (12), 3574-3578.

HODZIC, E.; FENG, S.; FISH, D.; LEUTENEGGER, C. M.; FREET, K. J.; BARTHOLD, S. W.; Infection of Mice with the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis after Different Routes of Inoculation. *The Journal of Infectious Diseases*. 2001, 183 (12), 1781-1786.

HOROWITZ, H. W.; KILCHEVSKY, E.; HABER, S.; AGUERO-ROSENFELD, M.; KRANWINKEL, R.; JAMES, E. K.; WONG, S. J.; CHU, F. et al.; Perinatal transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *New England Journal of Medicine*. 1998, 339 (6), 375-378.

KATAVALOS, P.; ARMSTRONG, P. M.; DAWSON, J. E.; TELFORD, S. R.; Duration of Tick Attachment Required for Transmission of Granulocytic Ehrlichiosis. *The Journal of Infectious Diseases*. 1998, 177 (5), 1422-1425.

KEMPERMAN, M.; NETIZEL, D.; JENSEN, K.; GORLIN, J.; PERRY, E.; MYERS, T.; MILEY, T.; MCQUINSTON, J.; EREMEEVA, M. E.; NICHOLSON, W.; SINGLETON, J.; ADJEMIAN, J.; *Anaplasma phagocytophilum* Transmitted Through Blood Transfusion – Minnesota, 2007. *Morbidity and Mortality Weekly Review*. 2008, 57 (42), 1145-1148.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; CABEZAS-CRUZ, A.; The genus *Anaplasma*: new challenges after reclassification. *Revue Scientifique et Technique - Office International des Epizooties*. 2015, 34 (2), 577-586.

KRAKOWETZ, C. N.; DIBERNARDO, A.; LINDSAY, L. R.; CHILTON, N. B.; Two *Anaplasma phagocytophilum* Strains in *Ixodes scapularis* Ticks, Canada. *Emerging Infectious Diseases*. 2014, 20 (12), 2064-2067.

LEVIN, M. L.; DES VIGNES, F.; FISH, D.; Disparity in the natural cycles of *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic Ehrlichiosis. *Emerging Infectious Diseases*. 1999, 5 (2), 204-208.

MATEI, I. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; CUTLER, S. J.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; VARELA-CASTRO, L.; POTKONJAK, A.; ZELLER, H.; MIHALCA, A. D.; A review on the eco-epidemiology and clinical management of human granulocytic anaplasmosis and its agent in Europe. *Parasites & Vectors*. 2019, 12 (1), 599.

MCDADE, J. E.; Ehrlichiosis – A Disease of Animals and Humans. *The Journal of Infectious Diseases*. 1990, 161 (4), 609-617.

MEDLOCK, J. M.; HANSFORD, K. M.; BORMANE, A.; DERDAKOVA, M.; ESTRADA-PEÑA, A.; GEORGE, J. C.; GOLOVLJOVA, I.; JAENSON, T. G. T.; JENSEN, J. K. et al.; Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasites & Vectors*. 2013, 6, 1.

PARKINS, M. D.; CHURCH, D. L.; JIANG, X. Y.; GREGSON, D. B.; Human granulocytic anaplasmosis: First reported case in Canada. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 2009, 20 (3), e100-e102.

PAROLA, P.; RAOULT, D.; Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat. *Clinical Infectious Diseases*. 2001, 32 (6), 897-928.

PATNAUDE, M. R.; Common name: blacklegged tick or deer tick, scientific name: *Ixodes scapularis* Say (Arachnida: Acari: Ixodidae). *Featured Creatures* [online]. University of Florida, 2000, EENY-143, [cit. 2020-04-27]. Dostupné z: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/urban/medical/deer_tick.htm.

PERNER, J.; PROVAZNIK, J.; SCHRENKOVA, J.; URBANOVA, V.; RIBIERO, J. M. C.; KOPACEK, P.; RNA-seq analyses of the midgut from blood- and serum-fed *Ixodes ricinus* ticks. *Scientific Reports*. 2016, 6, 36695.

PETROVEC, M.; FURLAN, S. L.; ZUPANC, T. A.; STRLE, F.; BROUQUI, P.; ROUX, V.; DUMLER, J. S.; Human Disease in Europe Caused by a Granulocytic *Ehrlichia* Species. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997, 35 (6), 1556-1559.

POSPISILOVA, T.; URBANOVA, V.; HES, O.; KOPACEK, P.; HAJDUSEK, O.; SIMA, R.; Tracking of *Borrelia afzelii* Transmission from Infected *Ixodes ricinus* Nymphs to Mice. *Infection and Immunity*. 2019, 87 (6), e00896-18.

- PUSTERLA, N.; LEUTENEGGER, C. M.; CHAE, J. S.; LUTZ, H.; KIMSEY, R. B.; DUMLER, J. S.; MADIGAN, J. E.; Quantitative evaluation of ehrlichial burden in horses after experimental transmission of human granulocytic *Ehrlichia* agent by intravenous inoculation with infected leukocytes and by infected ticks. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999, 37 (12), 4042-4044.
- RIKIHISA, Y.; Mechanisms of Obligatory Intracellular Infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2011, 24 (3), 469-489.
- RUYTS, S. C.; Ecological interactions between ticks, hosts and forest types and the impact on Lyme borreliosis risk. 2017, PhD thesis, Ghent University, Ghent, Belgium.
- SCHOTTHOEFER, A. M.; MEECE, J. K.; FRITSCH, T. R.; A Clinical, Diagnostic, and Ecological Perspective on Human Anaplasmosis in the Upper Midwest. *Wisconsin Medical Journal*, 2014, 113 (3), 107-114.
- SONENSHINE, D. E.; ROE, M. R.; *Biology of ticks – Volume 1*. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2014a. ISBN 978-0-19-974405-3.
- SONENSHINE, D. E.; ROE, M. R.; *Biology of ticks – Volume 2*. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2014b. ISBN 978-0-19-974406-0.
- STANNARD, A. A.; GRIBBLE, D. H.; SMITH, R. S.; Equine ehrlichiosis: a disease with similarities to tick-borne fever and bovine petechial fever. *Veterinary Record*. 1969, 84 (6), 149.
- THOMAS, R. J.; DUMLER, J. S.; CARLYON, J. A.; Current Management of Human Granulocytic Anaplasmosis, Human Monocytic Ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2009, 7 (6), 709-722.
- WILSON, M. L.; TELFORD, S. R. III.; PIESMAN, J.; SPIELMAN, A.; Reduced abundance of immature *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) following elimination of deer. *Journal of Medical Entomology*. 1998, 25 (4), 224-228.