

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**



**Vztahy vektor - patogen - hostitel na příkladu spirochét  
lymeské boreliózy (a viru klíšťové encefalitidy)**

Diplomová práce

**Bc. Zuzana Vavrušková**

Školitel: prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.  
Školitel specialista: Mgr. Václav Hönig

České Budějovice 2012

**Vavrušková Z. 2012:** Vztahy vektor - patogen - hostitel na příkladu spirochét lymeské boreliózy (a viru klíšťové encefalidity). [Vector-pathogen-host interaction on the example of spirochetes Lyme borreliosis disease (and tick-borne encephalitis virus), Mgr. Thesis, inCzech.] **78 p.**, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotation:**

This study was focused on vector-pathogen-host interaction. Questing ticks from field were tested for presence of *Borrelia burgdorferi* s.l. and host DNA. Small rodents were trapped, ticks were collected from them, infestation patterns were estimated regarding the species and stage of ticks and species, sex and body weight of the host. Ticks acquired from hosts were tested for presence of *Borrelia burgdorferi* s.l. and tick-borne encephalitis virus. Both results from identification of hosts and from detection of pathogens were compared to be able to investigate interactions between host, vector and pathogen.

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

**České Budějovice 20. 7. 2012**

**Podpis studenta**

.....

## **Poděkování:**

Těchto pár řádek bych ráda věnovala všem, kteří mi pomáhali při vzniku této práce a při studiu. V první řadě děkuji své mamince, která bezmezně podporovala každý můj krok, ať už byl krokem do prázdna nebo o stupínek výš. Další velké poděkování náleží mému školiteli Vaškovi, hlavně za to, že to se mnou celé ty roky vydržel i když to občas nebylo lehké ani pro jednoho z nás. Mnohokrát také děkuji celému osazenstvu v naší malé laboratoři za to, že jste tu byli a drželi mě nad vodou, když bylo potřeba. Bez vás Janko, Hanko, Jarko, Pájo a Vendy by to nebylo tak snadné. Dále také děkuji prof. RNDr. Liboru Grubhofferovi, CSc, že mi dal šanci pracovat právě na tomto pracovišti, právě s těmito lidmi. V neposlední řadě děkuji Natashe Rudenko, Msc. PhD. a Marině Golovchenko, Msc. za ochotu a pomoc při práci.

# Obsah

1.	Úvod .....	1
2.	Hlavní cíle práce .....	2
3.	Literární přehled .....	3
3.1	Klíšťata .....	3
3.2	<i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> .....	6
3.3	Virus klíšťové encefalitidy .....	12
3.4	Hostitelé klíšťat a klíšťaty přenášených patogenů .....	15
4.	Materiál a metody.....	25
4.1	Sběr vzorků a popis lokalit.....	25
4.2	Příprava vzorků, izolace nukleových kyselin .....	27
4.3	Detekce patogenů .....	28
4.4	Identifikace hostitelů.....	32
4.5	Identifikace druhu vektora .....	35
4.6	Statistické zhodnocení dat.....	36
5.	Výsledky.....	37
5.1	Molekulární identifikace hostitelů u klíšťat ze sběrů.....	37
5.2	Molekulární identifikace <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. u klíšťat ze sběrů .....	44
5.3	Vztah druhu hostitele a genospecií borélií.....	47
5.4	Molekulární identifikace patogenů z klíšťat z odchycených drobných savců.....	49
6.	Diskuze .....	55
7.	Závěr .....	63
8.	Seznam použité literatury .....	64

## Seznam nepoužívanějších zkratk

PCR-polymerázová řetězová reakce („polymerase chain reaction“)

SAT-slinami aktivovaný přenos („saliva activated transmission“)

RT-PCR- reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce („reverse transcription polymerase chain reaction“)

s.s.-,sensu stricto“

s.l.-,sensu lato“

DNA-deoxyribonukleová kyselina („deoxyribonucleotide acid“)

RNA-ribonukleová kyselina („ribonucleotide acid“)

VKE-virus klíšťové encefalitidy

RLB-„reverse line blotting“

RFLP-délkový polymorfismus restrikčních fragmentů („restriction fragment lenght polymorphism“)

TROSPA-receptor klíštěte pro boreliový protein OspA („tick receptor for OspA“)

OspA, B-proteiny vnějšího povrchu („Outer surface proteins A, B“)

CNS-centrální nervový systém

LT-laboratorní teplota

BSK-Barbour-Stoner-Kellyho medium

# 1. Úvod

Klíšťata jsou významnými vektory virových, bakteriálních i protozoárních onemocnění. Mezi nejdůležitější klíšťaty přenášené nákazy patří lymeská borelióza, klíšťová encefalitida, lidská granulární anaplazmóza, tularemie, rickettsiální skvrnité horečky nebo Q horečka.

Díky způsobu získávání potravy plní hematofágní členovci (komáři, klíšťata atd.) funkci vektorů (přenašeců) infekčních agens a zajišťují tedy cirkulaci původců onemocnění v rámci přírodních ohnisek (mezi přirozenými hostiteli). Člověk je pro většinu vektorů přenášených nákaz náhodným hostitelem a konečným článkem přenosu. Při krmení na infikovaném hostiteli dochází k přenosu původce onemocnění na vektora a při následujícím sání pak patogen přechází do nového hostitele. V nakažených vektorech často přežívá patogen transstadiálně a spíše vzácně dochází k přenosu transovariálnímu (z matky na potomstvo). Do přirozených cyklů cirkulace bývá zapojena řada různých druhů hostitelů, kteří mají různou míru kompetence k přenosu patogena. Složení hostitelské fauny tak může velmi výrazně ovlivňovat frekvenci výskytu patogenů ve vektorech a tedy i riziko onemocnění hrozící člověku. Identifikace hlavních hostitelů vektorů, zejména pak hostitelů kompetentních pro přenos patogenů, je tudíž důležitou informací pro zajištění prevence přenosu těchto nákaz na člověka.

## 2. Hlavní cíle práce

1. Vypracování literární rešerše k tématu, se zaměřením na biologii klíšťat, virus klíšťové encefalidity, spirochéty lymeské boreliózy, hostitele klíšťat, kompetenci různých druhů hostitelů k přenosu spirochét *Borrelia burgdorferi* sensu lato a VKE, význam „co-feedingu“ pro cirkulaci spirochét lymeské boreliózy a VKE.
2. Molekulárně biologická detekce VKE a spirochét *Borrelia burgdorferi* sensu lato ve vzorcích hladových a částečně nasátých klíšťat odebraných z hostitelů.
3. Identifikace genospecií *Borrelia burgdorferi* sensu lato.
4. Molekulárně biologická detekce hostitele ze zbytků krve („reverse line blotting“) ve vzorcích hladových klíšťat získaných vlajkováním.
5. Analýza hostitelské specifity (respektive kompetence k přenosu u jednotlivých hostitelů) spirochét lymeské boreliózy a jejich genospecií na základě dat z molekulárně biologické identifikace hostitele.
6. Porovnání kompetence různých druhů hlodavců k přenosu VKE na základě výsledků testování klíšťat odebraných z hostitelů.
7. Relativní význam „co-feedingu“ pro cirkulaci VKE a *Borrelia burgdorferi* sensu lato v přirozených podmínkách.

## 3. Literární přehled

### 3.1 Klíšťata

#### 3.1.1 Taxonomické zařazení

Klíšťata jsou hematofágní parazité řazení do kmene členovci (*Arthropoda*), podkmene klepítkatci (*Chelicerata*), třídy pavoukovci (*Arachnida*), řádu roztoči (*Acari/Acarina*), podřádu klíšťata (*Ixodida*). Tento podřád se dále dělí na tři čeledi: *Ixodidae* („tvrdá klíšťata“), *Argasidae* (klíšťáci) a *Nuttalliellidae* (Oliver 1989, Horak et al. 2002, Sedlák 2005).

Zástupci čeledi *Argasidae* (klíšťáci) jsou větší a mají zvrásněný tělní povrch, který umožňuje rychlé zvětšení objemu klíštěte během sání. Přebytkovou tekutinu vylučují specializovanými coxálními žlázami. Klíšťáci jsou tzv. nidikolní - celý jejich životní cyklus probíhá v těsné blízkosti jejich hostitele (v norách, hnízdech apod.). Všechna stadia sají opakovaně, po relativně krátkou dobu (několik minut až hodin), mají více hostitelů a také více nymfálních stádií (3-5). Ústní ústrojí mají skryté pod tělem, takže není, na rozdíl od ostatních čeledí klíšťat, vidět z dorzálního pohledu. Samice kladou vajíčka o počtu několika set a to několikrát za život (některé druhy dokonce i bez předchozího nasátí). Kompletní vývoj trvá 2-3 roky. Na lidech parazitují zástupci druhů z rodů – *Argas*, *Ornithodoros*, *Otobius*. Jako vektory přenosu onemocnění na člověka jsou méně častí a přenášejí zejména spirochéty způsobující návratné horečky (Oliver 1989).

*Nuttalliellidae* je čeleď klíšťat reprezentovaná jediným druhem *Nuttalliella namaqua* (Bedford 1931). Tento druh má náznak dorzálního štítu a kožovitý povrch těla, takže se zdá být „vývojovým mezistupněm“ mezi čeleděmi *Argasidae* a *Ixodidae*. Jen málo je známo o životní strategii a hostitelské preferenci tohoto klíštěte, mezi předpokládané hostitele patří hlodavci, drobné šelmy a ještěrky. Jedinci tohoto druhu byli nalezeni pouze v jižní Africe (Bedford 1931, Mans et al. 2011).

Klíšťata čeledi *Ixodidae* mají chitinový dorzální štít („scutum“), který slouží jako mechanická ochrana klíštěte a jako úpon pro různé svalové skupiny. Klíšťata této čeledi jsou citlivá vůči vlhkosti a teplotě a proto mají povrch těla pokrytý voskovitou kutikulou, která zamezuje vysychání. Sají po relativně dlouhou dobu, až několika dní. Nasátou krev koncentrují a většinu vodné složky se zbavují přes slinné žlázy (zpět do hostitele). Životní



cyklus zahrnuje tři stadia a jde o klíšťata jedno až tří-hostitelská. Z hlediska přenosu onemocnění má v Evropě největší význam klíště *Ixodes ricinus*, které je významným vektorem mnoha zoonóz, jako je např.: klíšťová encefalitida, lymeská borelióza, lidská granulocytární anaplazmóza, tularemie a další. Mezi další medicínsky významné zástupce patří druhy rodů: *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma* (Parola a Raoult 2001, Swanson et al. 2006). Následující odstavce budou zaměřeny na klíště *Ixodes ricinus*.

### 3.1.2 Klíště *Ixodes ricinus*

Vývojový cyklus klíštěte *Ixodes ricinus* (Linné 1758) zahrnuje tři stadia: larva, nymfa a dospělec. Larvální stadium má tři páry nohou, zatímco nymfy a dospělci mají páry nohou čtyři. Celková doba vývoje se pohybuje mezi 2-6 lety v závislosti na klimatických podmínkách, zejména na teplotě, vlhkosti, fotoperiodě a dostupnosti vhodných hostitelů (Randolph et al. 2002, Hubálek et al. 2003, Estrada-Peña et al. 2004). Vývoj každého stádia klíštěte trvá přibližně rok a k nasátí dochází v každém stádiu jen jednou a to pokaždé na jiném hostiteli. Larvální stadia sají zejména na hlodavcích, ptácích a dalších drobných obratlovcích a poté se vyvíjí v nymfu, která se živí na různých druzích drobných a středních obratlovců. Po přeměně v dospělce se živí zejména krví velkých obratlovců. Vyhledání partnera (pomocí feromonů) a páření probíhá často přímo na hostiteli, následně se samice nasaje a klade až tisíc vajíček (Parola a Raoult 2001).

Přirozenými biotopy klíštěte *I. ricinus* jsou vlhké travnaté a zalesněné oblasti. Aktivace klíštěte nastává počátkem jara při teplotách nad 3-5 °C a při příznivé relativní vzdušné vlhkosti (45-85 %). K metamorfóze a líhnutí vajíček dochází až při teplotách nad 10 °C. Klíšťata bývají v našich podmínkách aktivní přibližně od března-dubna až do listopadu. Aktivita klíšťat vykazuje určitý sezónní rytmus - u nymf a dospělců typicky se dvěma maximy (na jaře a na podzim), u larev je obvyklý jeden vrchol aktivity uprostřed léta (červenec-srpen) (Walker 2001, Hubálek et al. 2003, Estrada-Peña et al. 2004, Lindgren a Jaenson 2006).

Stavba těla klíštěte zahrnuje „capitulum“ (přední část nesoucí ústní ústrojí) a „idiosoma“, které se dělí na dvě části – „podosoma“ nesoucí končetiny a „opisthosoma“ nesoucí vyústění dýchací soustavy, genitální a anální otvor. Z dorzálního pohledu uvidíme charakteristický dorzální štít („scutum“), který u samců kryje celé tělo a u samic jen jeho

přední část. Zbytek těla je u samic tvořen kožovitým „alloscutem“, což je částečně sklerotizovaná část kutikuly umožňující zvětšení objemu klíštěte při sání. Ústní ústrojí se skládá ze tří hlavních částí. Chelicery slouží k narušení pokožky, palpy slouží jako sensorický orgán a hrají důležitou roli při hledání místa pro přichycení a sání na hostiteli. Hypostom je část s velkým počtem zakřivených zubů a slouží k vlastnímu sání (Sonenshine 1991).

Hostitele klíšťata vyhledávají pomocí periferních sensorických orgánů na základě chemických stimulantů (hladina CO<sub>2</sub>), vzdušných vibrací a teploty. Při sání klíště vylučuje sliny, které obsahují látky, jako jsou: vazodilatátory, protizánětlivé látky, imunosupresiva, antikoagulanty apod., které mají vliv na pozdržení nepříjemných projevů infestace a tedy i odstranění klíštěte z hostitele před dokončením sání. Tyto látky také mohou napomáhat přenosu patogenů - jev známý jako slinami aktivovaný přenos („saliva activated transmission“) (např.: Zeidner et al. 1997, Nuttall a Labuda 2004, Horká et al. 2009). Po úplném nasátí klíšťata opouštějí tělo hostitele, aby našla vhodné místo pro metamorfózu, nebo vstupují do diapauzy, ve které sníží metabolismus a pozastaví vývoj, než opět nastanou vhodné podmínky (Walker 2001).

### **3.1.3 Klíště *Ixodes trianguliceps***

Tento druh klíštěte je dalším možným parazitem drobných hlodavců. Jelikož jsou tito savci zřejmě hlavními rezervoáry pro VKE a spirochéty LB, tento druh klíštěte má nejspíše určitou roli v cirkulaci těchto patogenů v přírodě. Klíště *Ixodes trianguliceps* (Birula 1895) také náleží do čeledi *Ixodidae*. Jedná se o klíště nidikolní, sající téměř výhradně na drobných savcích. *I. trianguliceps* má ve svém životním cyklu také tři hostitele a tři vývojová stadia. Všechna vývojová stadia vykazují sezónní výkyvy v aktivitě: larvy jsou aktivní téměř po celý rok s vzestupem na jaře a na podzim, nymfy a dospělci od března do listopadu a celý vývojový cyklus trvá několik let. *I. trianguliceps* se vyskytuje spíše v podhorských až horských oblastech, protože preferuje vlhké a chladnější mikroklima (Randolph 1975, Bown et al. 2003)

Podobně jako *I. ricinus*, je i *I. trianguliceps* vektorem řady patogenů člověka a zvířat: *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia microti* (Bown et al. 2003, 2006, 2008). Na některých lokalitách je dokonce zřejmě významnějším vektorem těchto patogenů než *I. ricinus*. *B. afzelii* a *B. garinii* byly izolovány z *I. trianguliceps* v Rusku, ovšem definitivní důkaz

o přenosu spirochét lymeské boreliózy dosud chybí (Gorelova et al. 1996, Nefedova et al. 2005).

Klíště *I. trianguliceps* na člověku nesaje, ale podílí se na cirkulaci patogenů v přírodním ohnisku. *I. trianguliceps* může v některých případech sdílet hostitele kompetentní k přenosu patogenů s jiným druhem klíštěte, který na člověku saje (tzv. přemostující „bridging“ vektor). Potom je přenos patogenů na člověka umožněn přemostujícím vektorem a *I. trianguliceps* hraje roli „amplifikátora“ v přirozeném cyklu patogena v ohnisku. Taková situace nastane např. při současném výskytu *I. ricinus* a *I. trianguliceps*, kdy hostitelem obou klíšťat mohou být drobní hlodavci (Nosek et al. 1967, Cotton a Watts 1967, Bown et al. 2003, 2006, 2008).

## **3.2 *Borrelia burgdorferi* sensu lato**

### **3.2.1 Taxonomické zařazení**

Spirochéty *Borrelia burgdorferi* sensu lato jsou taxonomicky zařazeny do říše *Eubacteria*, kmene *Spirochaetes*, třídy *Spirochaetes*, řádu *Spirochaetales*, čeledi *Spirochaetaceae*, rodu *Borrelia* (Garrity et al. 2004).

### **3.2.2 Morfologie**

Spirochéty komplexu *Borrelia burgdorferi* s.l. jsou gramnegativní bakterie, zahrnující druhy (genospecies) patogenní pro člověka, respektive způsobující lymeskou boreliózu. Do stejného kmene patří i jiné patogenní druhy spirochét jako např. *B. recurrentis*, *B. duttonii* (původci návratných horeček), *Treponema pallidum* (původce syfilis) nebo *Leptospira interrogans* (původce leptospirózy). Zástupci tohoto kmene mají různou morfologii buňky. Většinou jde o spirálovité struktury, které se pohybují pomocí rotace bičků uzavřených mezi dvěma povrchovými membránami (Tilly et al. 2008). Velikost buňky *B. burgdorferi* je přibližně 10-20 x 0,33 μm. Do klíštěte se spirochéta dostane v průběhu jeho sání na nakaženém hostiteli. V klíštěti se bakterie usídí ve střevním traktu a spirochéty se množí a diseminují do všech orgánů včetně slinných žláz. Nově vyvinuté stadium klíštěte může při následném sání nakazit dalšího hostitele (včetně člověka). Výskyt onemocnění způsobeného patogeny z komplexu *B. burgdorferi* s.l. je ohniskový a ovlivněný mnoha faktory – aktivitou lidí v dané oblasti, aktivitou klíšťat, frekvencí výskytu

kompetentních a nekompetentních hostitelů, klimatickými podmínkami apod. (Humair a Gern 2000, Parola a Raoult 2001, Lindgren a Jaenson 2006).

Buňka strukturálně obsahuje vlastní protoplazmatický válec obalený plazmatickou membránou a peptidoglykanovou dvouvrstvou, který je krytý ještě další vnější membránou. Bičíky zakotvené jedním koncem na pólech buňky vybíhají do periplazmatického prostoru mezi plazmatickou a vnější membránou. Rotací bičíků bakterie vlnivými pohyby prostupuje tkáněmi. V jednom svazku je uloženo 7-11 bičíků složených ze dvou druhů proteinu flagelinu - FlaA a FlaB (Sal et al. 2008, Charon et al. 2009, Liu et al. 2009).

*B. burgdorferi* je bakterie velmi náročná na kultivaci. Používají se pro ni modifikované půdy odvozené od media BSK (Barbour-Stoenner-Kelly) a kultivuje se při 23-37 °C (Elias et al. 1998, Revel et al. 2002, Postic et al. 2007).

### 3.2.3 Genom

Rod *Borrelia* má charakteristický genom složený z jednoho lineárního chromozomu a velkého počtu lineárních i kruhových plazmidů. Celý genom dosahuje velikosti až 1,5 Mb. Zatímco chromozomální homologie mezi různými druhy borélií je vysoká, v případě plazmidů se jednotlivé druhy značně liší. To je nejspíše způsobeno rychlejší evolucí plazmidové DNA v porovnání s DNA chromozomální. Chromozom obsahuje větší množství tzv. udržovacích genů v porovnání s plazmidy, které nesou, mimo jiné, geny pro membránové lipoproteiny, proteiny důležité pro dělení buňky, virulenci a geny nezbytné pro přenos a přežití v různých druzích hostitelů (Fraser et al. 1997, Casjens 2000, Casjens et al. 2012). Kódující sekvence tvoří celkem 93 % genomu, ovšem na plazmidech tyto sekvence zaujímají pouze 71 %, což ukazuje, že intergenové oblasti jsou na plazmidech delší než na chromozomu (Fraser et al. 1997, Delihis 2009, Margos et al. 2009).

### 3.2.4 Povrchové lipoproteiny

Membránové lipoproteiny se nacházejí ve vnější vrstvě cytoplazmatické membrány a v obou vrstvách membrány vnější. Tyto proteiny jsou naprosto zásadní pro přežití borélií v různých prostředích. Exprese těchto genů je regulována v závislosti na prostředí, ve kterém se borélie aktuálně vyskytuje. Tento mechanismus si *B. burgdorferi* nejspíše vyvinula pro přežití ve dvou tolik odlišných prostředích jako je obratlovec (hostitel) a bezobratlý vektor

(Hovius et al. 2007). Jelikož mají povrchové proteiny zásadní roli v mechanismech přenosu a přežívání borélií, pokusíme se fungování vybraných proteinů popsat blíže.

Při kolonizaci klíštěte se uplatňují zejména (lipo) proteiny OspA a OspB. Ke zvýšení exprese dochází při kolonizaci střeva klíštěte, kde OspA interaguje s receptorovým proteinem TROSPA („tick receptor for OspA“). Ten byl nalezen u *I. scapularis* a výskyt analogického receptoru se předpokládá také u dalších druhů klíšťat (Pal et al. 2004, Konnai et al. 2012). OspB hraje také roli v udržení borélií ve střevě, ale jeho receptor nebyl dosud identifikován. Sekvence pro OspA i OspB jsou kódovány pod jedním promotorem na lineárním plazmidu lp54 a oba proteiny se zřejmě uplatňují i při transstadiálním přenosu (přežívání) borélií v klíštěti (Neelakanta et al. 2007, Maruskova et al. 2008, Tsao 2009). Při sání krve dochází k reciproké regulaci genové exprese proteinů OspA/OspC. Na základě snížení syntézy OspA se borélie uvolňují ze střev. Současně je nastartována syntéza OspC, která je spojena s migrací spirochét ze střev do slinných žláz klíštěte (Gilbert et al. 2007). Na OspC se ve slinných žlázách váže protein Salp 15 (nalezen u *I. scapularis*, přibližně 15 kDa velký, sáním indukovaný protein), který posléze chrání spirochety před protilátkou zprostředkovaným zabíjením v obratlovčím hostiteli. Homology Salp15 byly také nalezeny u klíštěte *I. ricinus* (Hovius et al. 2008). OspD je spojován s replikací borélií a v klíšťatech je exprimován boréliemi v průběhu sání na hostiteli (Tsao 2009).

Na základě odlišností lipoproteinů OspA se jednotlivé genospecie rozdělují na sérotypy a protože OspA je jedním z hlavních imunogenů je toto důležité mimo jiné při vyvíjení vakcíny proti boréliím. Kromě *B. garinii* je podle Michel et al. (2003) každá evropská genospecie (např. *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*) reprezentována na úrovni fenotypu jedním sérotypem. Na úrovni DNA se k OspA subtypizaci používá analýzy délkového polymorfizmu restričních fragmenů nebo sekvenování. *B. burgdorferi* s.s. a *B. afzelii* jsou poměrně homogenní a odpovídají sérotypům OspA 1 respektive 2. *B. garinii* je více heterogenní a vykazuje celkem pět restričních vzorců odpovídajících sérotypům OspA 3-7 (Michel et al. 2003). OspA sérotyp 4 *B. garinii* byl na základě fylogenetické analýzy oddělen do samostatné genospecie nazvané *B. bavariensis* podle místa prvního nálezu izolátů (Margos et al. 2009).

V obratlovčím hostiteli je exprimován i další důležitý protein VlsE, který dovoluje boréliím změnu antigenních struktur a zprostředkovává tak ochranu před imunitní reakcí

organizmu (Steere et al. 2004). V hostiteli je tento protein exprimován ve velkém počtu různých variant zároveň, což je důsledek rekombinace genu *vlsE* a přilehlých 15-ti *vls* tichých kazet (Lin et al. 2009). Míru virulence *B. burgdorferi* ovlivňují také proteiny DbpA, B (v menší míře než OspC), kódované na dvou na sebe navazujících genových operonech. Oba proteiny jsou adheziny, které se váží na decorin a glykosaminoglykany v extracelulární matrix hostitelských tkání (Shi et al. 2008).

### 3.2.5 Variabilita v rámci komplexu

Komplex *Borrelia burgdorferi* sensu lato dosud zahrnuje 19 uznaných druhů (genospecies, genomospecies) borélií, ale popis nových druhů a variant i nadále pokračuje, takže současný počet popsáných druhů zřejmě není konečný. Borélie genospecies II je dalším ještě nepojmenovaným druhem kvůli nedostatečnému počtu charakterizovaných izolátů. Pro člověka prokazatelně patogenní jsou *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. spielmanii*, *B. bavariensis*. Mezi druhy, u kterých se předpokládá patogenita na základě nálezů v lidských vzorcích, patří např.: *B. bissettii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* (shrnuto v Rudenko et al. 2009c, Tsao 2009, Stanek a Reiter 2011).

Patogenní borélie vykazují tkáňovou specifitu. *B. burgdorferi* sensu stricto je spojována s postižením kloubů (arthritis), srdce (myokarditis), případně dalších orgánů. *B. afzelii* způsobuje zejména poškození kůže např. acrodermatitis chronica atrophicans a *B. garinii* je nejčastějším původcem neuroboreliózy, ovšem i zde jsou časté i kožní manifestace. Klinický obraz boreliózy způsobené infekcí *B. bavariensis* je podobný infekci *B. garinii* (Hovius et al. 2007, Stanek a Reiter 2011). Nejvíce zastoupenými druhy spirochét lymeské boreliózy v klíšťatech v Evropě jsou *B. afzelii*, *B. garinii* a *B. burgdorferi* sensu stricto, méně pak *B. valaisiana* a nejméně *B. lusitaniae*. Nález ko-infekce dvěma i více druhy borélií v jednom klíšťeti není výjimkou (Rauter a Hartung 2005). Přehled genospecií, jejich hlavních vektorů přenosu na člověka, hlavních hostitelů a geografického rozšíření je uveden v Tab. I.

**Tab. I Genospecie *Borrelia burgdorferi* sensu lato**

Genospecie borélií	Vektor	Hostitel/reservoár	Geografické rozšíření	Citace
<i>B. afzelii</i>	<i>I. ricinus, I. persulcatus</i>	hlodavci	Asie, Evropa	Canica et al. (1993)
<i>B. americana</i>	<i>I. pacificus, I. minor</i>	ptáci	USA	Rudenko et al. (2009b)
<i>B. andersonii</i>	<i>I. dentatus</i>	králík východoamerický	USA	Marconi et al. (1995)
<i>B. bavariensis</i>	<i>I. ricinus</i>	hlodavci	Evropa	Margos et al. (2009)
<i>B. bissettii</i>	<i>I. ricinus, I. scapularis, I. pacificus, I. minor</i>	hlodavci	Evropa, USA	Postic et al. (1998)
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>	<i>I. ricinus, I. scapularis, I. pacificus</i>	hlodavci, ptáci, ještěrky, velcí savci	Evropa, USA	Baranton et al. (1992)
<i>B. californiensis</i>	<i>I. pacificus, I. jellisonii, I. spinipalpis</i>	tarbík, jelenec běloocasý	USA	Postic et al. (2007)
<i>B. carolinensis</i>	<i>I. minor</i>	hlodavci, ptáci	USA	Rudenko et al. (2009a)
<i>B. finlandensis</i>	<i>I. ricinus</i>	neznámý	Finsko	Casjens et al. (2011)
<i>B. garinii</i>	<i>I. ricinus, I. persulcatus, I. hexagonus, I. nipponensis</i>	ptáci, ještěrky, hlodavci	Asie, Evropa	Baranton et al. (1992)
<i>B. japonica</i>	<i>I. ovatus</i>	hlodavci	Japonsko	Kawabata et al. (1993)
<i>B. kurtenbachii</i>	<i>I. scapularis</i>	hlodavci	Evropa, USA	Margos et al. (2010)
<i>B. lusitaniae</i>	<i>I. ricinus</i>	hlodavci, ještěrky	Evropa, severní Afrika	Le Fleche et al. (1997)
<i>B. sinica</i>	<i>I. ovatus</i>	hlodavci	Čína	Masuzawa et al. (2001)
<i>B. tanukii</i>	<i>I. tanuki</i>	neznámý (nejspíše psi a kočky)	Japonsko	Fukunaga et al. (1996)
<i>B. turdi</i>	<i>I. turdus</i>	ptáci	Japonsko	Fukunaga et al. (1996)
<i>B. spielmanii</i>	<i>I. ricinus</i>	hlodavci	Evropa	Richter et al. (2006)
<i>B. valaisiana</i>	<i>I. ricinus, I. granulatus</i>	ptáci, ještěrky	Asie, Evropa	Wang et al. (1997)
<i>B. yangtze</i>	<i>Haemaphysalis longicornis, I. granulatus</i>	hlodavci	Čína	Chu et al. (2008)
<i>Genospecies II</i>	<i>I. pacificus</i>	neznámý	USA	Postic et al. (2007)

### 3.2.6 Metody detekce a identifikace genospecií borélií

Metody detekce a identifikace borélií lze rozdělit na kultivační, mikroskopické a molekulárně biologické.

Kultivace borélií probíhá na různých modifikacích media BSK (Barbour-Stone-Kelly). Tato metoda umožňuje jak přímý průkaz životaschopných borélií, tak jejich namnožení pro další analýzy. Úspěšnost kultivace bývá poměrně nízká a závisí na mnoha faktorech např.: zvolená modifikace media, zdroj borélií a jejich viabilita, jejich množství. Významnou nevýhodou této metody je také relativní časová náročnost (Wang et al. 2004, Gil et al. 2005) a rozdíly v pravděpodobnosti záchytu mezi různými genospeciemi borélií (Norris et al. 1997).

Mezi metody mikroskopické se řadí pozorování borélií v temném poli, které dává přehled o přítomnosti, počtu borélií i jejich motilitě. Elektronová a fluorescenční mikroskopie umožňují zjistit jejich tvar případně detailněji studovat strukturu. Za nevýhodu těchto metod se považuje nutnost dalších analýz k určení genospecií borélií a časová i finanční náročnost elektronové a fluorescenční mikroskopie (Heroldová et al. 1998, Liu et al. 2009, van Burgel et al. 2010).

Molekulárně genetické metody používané pro detekci a identifikaci borélií jsou založeny na polymerázové řetězové reakci a následné analýze amplifikovaných fragmentů. Nejpoužívanější metodou je v současnosti sekvenace (multilokusová sekvenční analýza), která umožňuje fylogenetické porovnání různých genospecií borélií na úrovni sekvence DNA. Pro fylogenetické účely se jako nejvhodnější jeví porovnání na základě několika standardních nezávislých udržovacích („house-keeping“) genů (Margos et al. 2009). Pro sekvenování se používá celá řada dalších lokusů, jejichž vhodnost pro fylogenetické analýzy je ovšem diskutabilní (shrnutí v Margos et al. 2009). Dalšími metodami v současnosti používanými pro identifikaci borélií jsou délkový polymorfismus restričních fragmentů (RFLP) (Menardi et al. 2008) a RLB („reverse line blotting“) (Rijpkema et al. 1995, Gern et al. 2010). Tyto metody však (stejně jako sekvenování) neposkytují informaci o životaschopnosti borélií a jejich fyziologickém stavu, poskytují méně informací než sekvenování, ovšem jsou schopny detekovat i stopová množství DNA borélií ve vzorcích. Významnou výhodou metody RLB je možnost simultánní detekce a identifikace borélií a vysoká efektivita při zpracování většího množství vzorků. Pro



kvantifikaci borélií ve vzorku molekulárně biologickými metodami se využívá metody real-time PCR (Schwaiger et al. 2001, Mackay et al. 2004).

### **3.3 Virus klíšťové encefalitidy**

#### **3.3.1 Taxonomické zařazení**

Virus klíšťové encefalitidy náleží do čeledi *Flaviviridae*, rodu *Flavivirus* (Heinz et al. 2000). Řada zástupců tohoto rodu patří mezi medicínsky významné členovci přenášené viry (arboviry, „arthropod-borne viruses“). Mezi tyto viry se řadí klíšťaty přenosné („tick-borne“) viry způsobující onemocnění jako je: klíšťová encefalitida, omská hemoragická horečka, horečka Kyasanurského lesa; dále komáry přenosné („mosquito-borne“) viry jako např.: virus Dengue (subtyp 1-4), virus západního Nilu, virus Japonské encefalitidy a virus žluté zimnice; a flaviviry bez známého vektora např. virus Modoc a virus Rio Bravo (Lindenbach et al. 2007, Grard et al. 2007). Výskyt onemocnění klíšťovou encefalitidou má v mnoha evropských státech stále vzestupnou tendenci navzdory tomu, že existuje účinné očkování. Počet evidovaných případů v Evropě a Asii za poslední roky stoupl až na 10 tisíc ročně (Süss 2011).

#### **3.3.2 Charakteristika viru**

Jsou rozlišovány tři subtypy viru klíšťové encefalitidy: Evropský subtyp (prototypový kmen Neudoerfl), dálně-východní (prototypový kmen Sofjin) a sibiřský (prototypové kmeny Aina a Vasilchenko). Evropský subtyp se vyskytuje ve střední a východní Evropě, dálně-východní subtyp ve východní Evropě, Rusku, v severovýchodních oblastech Číny a v Japonsku. Sibiřský subtyp byl nalezen na severu Ruska a ve Finsku (Ecker et al. 1999, Grard et al. 2007).

Všechny subtypy sdílejí morfologii rodu *Flavivirus*, i obdobnou životní strategii. Virion se skládá z lipoproteinového obalu a nukleokapsidy obsahující genetickou informaci viru ve formě RNA. Nukleokapsida je tvořena kapsidovým proteinem C („core“). Obal je složený ze dvou druhů proteinů - E („envelope“) a M („membrane“). Membránový protein M se, mimo jiné, podílí na správném složení a průniku virionu ven z buňky a jeho prekurzorem je protein prM. Pomocí povrchového glykoproteinu E se viry dostávají do buňky, díky navázání na membránové receptory buňky a následné endocytóze virionu.

Tento protein je zároveň hlavní antigenní determinantou a významně ovlivňuje celkovou míru virulence viru. (Dumpis et al. 1999, Gritsun a Gould 2007).

Genomová RNA je přibližně 11 kb dlouhá lineární jednořetězcová molekula pozitivní polarity. Obsahuje pouze jeden čtecí rámec (ORF – „open reading frame“), kódující přibližně 3400 aminokyselin. Kódující sekvence je na obou koncích (5', 3') ohraničena netranslatovanými oblastmi (UTR – „untranslated region“). Polyprotein vzniklý přepsáním této molekuly je štěpen proteázami na strukturní a nestrukturní proteiny. Strukturní proteiny jsou tři, zmíněné v předchozím odstavci, nestrukturních proteinů je sedm a v genomu jsou řazeny následovně 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'. Nestrukturní proteiny mají důležité funkce v životním cyklu viru např. protein NS5 je součástí RNA závislé RNA polymerázy a protein NS3 je helikáza (Grešíková a Kaluzová 1997, Grard et al. 2007).

### 3.3.3 Přenos a patogeneze

Klíště *Ixodes ricinus* přenáší evropský subtyp klíšťové encefalitidy a *I. persulcatus* přenáší kmeny sibiřského a dálně-východního subtypu. Rezervoárovými hostiteli viru jsou zejména drobní hlodavci, za náhodné hostitele se považují hospodářská zvířata (prase, ovce, koza, skot) a konečným hostitelem bývá člověk, který tedy nehraje roli v cirkulaci viru v přírodě. K nákaze člověka dochází nejen při sání klíštěte, ale také při konzumaci nepasterizovaného mléka (nebo výrobků z něj) pocházejícího z viremických zvířat jako jsou kozy, ovce nebo krávy (Grešíková a Kaluzová 1997, Holzman et al. 2009). K nákaze může dojít i při vdechnutí aerosolu obsahujícího virus v laboratorních podmínkách nebo na jatkách. Virus se v tomto případě šíří podél čichového nervu přímo do mozku (Dumpis et al. 1999, Süss 2011).

V případě klasické cesty přenosu se klíště nakazí virem při sání na kompetentním hostiteli, u kterého je rozvinuta virémie. Klíště poté nese virus po celý svůj vývojový cyklus - virus přežívá v klíštěti transstadiálně. Další cestou je transovariální přenos ze samice na potomstvo. Tento způsob přenosu je poměrně málo efektivní (podle výsledků Danielové a Holubové (1991) jen 17,6 % z vajíček nakažené samice bylo infikovaných, ale jen 0,23-0,75 % z nich vylíhnutých larev stále neslo infekci), ovšem tento způsob přenosu může hrát roli v udržování viru v přírodě a to zejména při nedostatku vhodných hostitelů (Danielová et al. 2002b). Klíšťata se také mohou nakazit při společném sání („co-feeding“), kdy

nakažené klíště při sání v těsné blízkosti přenese virus na klíště nenakažené a to i na imunním hostiteli. Anglický ekvivalent „co-feeding“ je natolik rozšířený v odborném jazyce vektorové biologie, že si jej dovoluujeme používat v českém textu (Labuda et al. 1996, 1997).

Klíšťová encefalitida může mít různě závažný průběh od bezpříznakové nákazy až po těžké meningoencefalitidy. Průběh nákazy bývá dvoufázový. První fáze se objevuje 3-7 dní po přenosu viru a zahrnuje chřipkové příznaky, únavu, bolest hlavy a svalů, zvýšenou teplotu. Po týdnu příznaky vymizí a pacient se zdá být zdravý. Druhá fáze onemocnění probíhá znatelně hůře, vyskytují se příznaky zasažení centrálního nervového systému. U tohoto onemocnění se u 70-80 % nakažených pacientů druhá fáze neobjevuje vůbec. Průběh onemocnění závisí do jisté míry také na zdravotním stavu a věku pacienta a virulenci daného kmene viru (Grešíková a Kaluzová 1997, Haglund a Günther 2003, Gould a Solomon 2008).

Po napadení klíštětem se v těle virus dostává do Langerhansových buněk v kůži a poté lymfatickým systémem do spádových mízních uzlin. Průnikem do krevního řečiště se virus roznáší do různých orgánů zejména do sleziny, kostní dřeně a jater. Pomnožený virus pak proniká přes hematoencefalickou bariéru do mozku, kde napadá neurony šedé hmoty. Po prodělání klíšťové encefalitidy mohou přetrvávat dlouhodobé následky, které se nazývají post-encefalický syndrom. Jde zejména o poruchy motorických funkcí, paměti, rovnováhy, soustředění a různé paralýzy (Nuttall 1999, Haglund a Günther 2003).

Diagnóza klíšťové encefalitidy spočívá zejména ve vyšetření krve (mozkomíšního moku) na přítomnost protilátek IgM a IgG, které se ale vytváří až později a nejsou detekovány v první fázi onemocnění. Detekce viru na počátku onemocnění je možná pomocí metod RT-PCR (Haglund a Günther 2003, Achazi et al. 2011). Úmrtnost na toto onemocnění dosahuje v Evropě 1-2 % a v Asii až 30 %. Vakcína proti klíšťové encefalitidě, vyvinutá proti evropskému subtypu, díky zkřížené reaktivitě účinně chrání také proti sibiřskému a dálně-východnímu subtypu (Holzmann et al. 1992, Ecker et al. 1999).

### **3.3.4 Metody detekce viru klíšťové encefalitidy**

V současnosti jsou pro detekci viru v klíšťatech využívány téměř výhradně metody molekulárně biologické založené na reverzní transkriptázové PCR (RT-PCR)

nebo kvantifikační reverzní transkriptázové PCR (qRT-PCR) (Swaiger a Casinotti 2003, Rudenko et al. 2004). K získání živého izolátu viru se využívá intracerebrální inokulace sajících myších mláďat (např. Hayasaka et al. 1999). Další metodou je izolace viru na tkáňových kulturách (Danielová et al. 2002a).

## 3.4 Hostitelé klíšťat a klíšťaty přenášených patogenů

### 3.4.1 Definice pojmů

K problematice hostitelské specifity a kompetence k přenosu se vztahuje, celá řada pojmů. Pro lepší orientaci v textu jsou tyto pojmy níže definovány.

**Prevalence**- podíl jedinců nakažených konkrétním parazitem/patogenem z jedinců celkově vyšetřených (Margolis et al. 1982).

**Incidence**- počet nových případů onemocnění vyskytujících se v populaci za daný časový úsek (z celkového počtu nenakažených jedinců v populaci na počátku časového úseku) (Margolis et al. 1982).

**Denzita**- počet jedinců parazita daného druhu na jednotku plochy, objemu nebo hmotnosti, orgánu nebo infestovaného hostitele (v případě klíšťat se například stanovuje denzita hladových klíšťat hledajících hostitele pomocí metody vlajkování jako počet jedinců na jednotku vlajkované plochy) (Margolis et al. 1982).

**Střední abundance** (relativní denzita)- průměrný počet jedinců parazita daného druhu na jednoho vyšetřeného hostitele daného druhu (infestovaného i neinfestovaného) (Margolis et al. 1982).

**Intenzita parazitace**- počet jedinců daného druhu parazita na daném jedinci – hostiteli (Margolis et al. 1982).

**Střední intenzita parazitace** („mean density“, střední denzita)- průměrný počet jedinců konkrétního druhu parazita na infestovaného hostitele daného druhu (Margolis et al. 1982).

**Infrapopulace**- všichni jedinci jednoho druhu parazita vyskytující se na/v jednom hostiteli (Esch et al. 1975, Margolis et al. 1982).

**Suprapopulace-** soubor jedinců jednoho druhu parazita ve všech vývojových stádiích na všech druzích hostitelů v ekosystému (Esch et al. 1975, Margolis et al. 1982).

**Vektor-** hematofágní organizmus, který při sání na infikovaném hostiteli získá patogena, má schopnost patogena dále přenášet v průběhu životního cyklu transstadiálně a má schopnost ho přenést na dalšího hostitele v průběhu následného sání (Kahl et al. 2002), jedná se o tzv. nepřímý přenos patogena (Gern et al. 1998).

**Přemost'ující vektor-** („bridging vector“) je schopen přenášet patogena na člověka, může ale nemusí být významný pro cirkulaci patogena mezi přirozenými hostiteli v přírodním ohnisku nákazy (Kahl et al. 2002).

**Rezervoárový hostitel** (kompetentní hostitel)- druh hostitele, který se významně podílí na cirkulaci patogenů v přírodě. Vektoři daného patogena na hostiteli sají, patogen se v hostiteli množí, diseminuje a přetrvává po dlouhou dobu (Gern et al. 1998, Kahl et al. 2002).

**Přemost'ující hostitel-** druh hostitele, který je parazitován více druhy vektorů a to jak vektory antropofilními (přemost'ujícími), tak vektory sajícími na člověku jen zřídka či vůbec. Tvoří spojující článek mezi cirkulací patogenů v přírodě a infekcí člověka (např. ježci jsou hostiteli antropofilního klíštěte *I. ricinus* ale i *I. hexagonus*, které člověka nenapadá (oba druhy klíšťat však mohou přenášet patogeny) (Kahl et al. 2002).

**Rezervoárová kompetence-** míra schopnosti daného druhu hostitele být rezervoárem (Gern et al. 1998).

**Nekompetentní hostitel-** takový hostitel, který není schopen dál přenést patogena na vektora (nehraje roli v cirkulaci patogena v přírodě) (Gern et al. 1998).

**Náhodný hostitel-** takový hostitel, který má schopnost přenést patogena, ale nehraje významnou roli v jeho cirkulaci v přírodě (Gern et al. 1998).

**Konečný hostitel-** takový hostitel, který je infestován vektorem, nakazí se patogenem, ale patogena dál nepřenáší (Gern et al. 1998).

**Biologický přenos-** vektor se nakazí patogenem při sání, patogen se v něm pomnoží (případně prodělá část vývojového cyklu) a je přenesen na dalšího hostitele (Šejdra et al. 2005).

**Mechanický přenos**- přenos patogena pomocí kontaminovaných končetin, na ústním ústrojí nebo výměšky vektora, které jsou zaneseny do mikrotraumat na kůži hostitele (nedochází k pomnožení patogena uvnitř vektora) (Šejdra et al. 2005).

**„Diluční efekt“**- „diluční efekt“ patogenů se podobně jako u klíšťat uplatňuje v systému vektor-patogen-hostitel. Nejvíce byly prostudovány cykly spirochét lymeské boreliózy v USA, kde jsou dobře definovaní hostitelé kompetentní a nekompetentní k přenosu spirochét. Předpokládalo se, že zvýšením druhové diverzity (zapojením nekompetentního hostitele) se sníží riziko přenosu infekce (poklesne denzita infikovaných klíšťat) (Ostfeld a Keesing 2000). Komplexní mechanistické modely ale ukazují, že když do zavedeného cyklu přijde další hostitel, zvýší se denzita infikovaných nymf jako důsledek zvýšení celkové denzity klíšťat. „Diluční efekt“ nastal teprve až v případech, kdy byly do modelu zahrnuty interakce mezi druhy hostitelů (konkurence), různá pravděpodobnost přisátí klíštěte na různé druhy hostitelů a různá míra mortality klíšťat přímo na hostitelích. To, zda k dilučnímu efektu dojde, je tedy závislé na konkrétních vztazích mezi hostiteli navzájem i mezi hostiteli a vektory (Krasnov et al. 2007, Ogden a Tsao 2009, Johnson et al. 2012, Kershenbaum et al. 2012).

### **3.4.2 Vztah hostitel - vektor - patogen**

#### **3.4.2.1 Vztah *Ixodes ricinus* - hostitel**

Hostitelské spektrum klíštěte *I. ricinus* je velice široké. Jednotlivá vývojová stadia vykazují určitou hostitelskou preferenci. Larvy jsou nejvíce citlivé vůči vysychání a proto se zdržují pouze na zemi nebo v nejnižším podrostu (Mejlon a Jaenson 1997 uvádí přibližně do 9 cm nad zemí), kde je příznivá relativní vlhkost. Podobná situace nastává u nymf, které se vyskytují na vyšším podrostu a na trávě (cca 30-39 cm). Dospělci se zdržují v závislosti na relativní vlhkosti na keřích a vyšším podrostu (50-59 cm) (Mejlon a Jaenson 1997). Díky tomuto vztahu k relativní vlhkosti vzduchu v prostředí jsou různá stadia ve styku s různými druhy hostitelů (Stafford 1994, Randolph a Storey 1999, Subak 2003). Například hostitelé dospělců jsou zejména sudokopytníci (*Sus scrofa*, *Cervus elaphus*, *Capreolus capreolus*, *Dama dama*, *Ovis musimon*), šelmy (*Vulpes vulpes*, *Martes martes*, *Meles meles*, *Felis silvestris*), zajícovci (*Lepus europaeus*, *Oryctolagus cuniculus*), větší hmyzožravci (*Erinaceus roumanicus*) či hlodavci (*Sciurus vulgaris*). Pro nymfy a larvy jsou hlavními hostiteli spíše drobnější hmyzožravci (*Talpa europaea*, *Sorex minutus*, *S. araneus*,

*Crocidura leucodon*) a hlodavci (*Glis glis*, *Micromys minutus*, *Mus musculus*, *Apodemus flavicollis*, *Microtus arvalis*), dále šelmy (*Vulpes vulpes*, *Martes martes*, *Mustela erminea*, *Felis silvestris*), sudokopytníci (*Sus scrofa*, *C. elaphus*, *C. capreolus*), zajícovci (*L. europaeus*). Z ptáků jsou významnými hostiteli *I. ricinus* zejména zástupci pořádu bahňáci (*Scolopax rusticola*) a řádů měkkozobí (*Streptopelia decaocto*), šplhavci (*Dendrocopos major*) a pěvci (*Alauda arvensis*, *Sturnus vulgaris*, *Sitta europaea*, *Fringilla coelebs*) (Nosek et al. 1967, Walker et al. 2001, Siński et al. 2006, Waldenström et al. 2007)

Obecně na intenzitu parazitace hostitelů má vliv řada faktorů např.: sezónní výskyt klíšťat, druh biotopu, mikroklima (relativní vlhkost), druh hostitele a velikost (věk) hostitele. Dále dochází ke kolísání intenzity i prevalence parazitace hostitelů klíšťaty v průběhu roku. Důvodem jsou kolísání početnosti a aktivity populací hostitelů i klíšťat (Tälleklint a Jaenson 1997). Aktivitu klíšťat ovlivňuje jak druh biotopu, ve kterém se nacházejí (složení flory, nadmořská výška), tak mikroklima (klíšťata jsou citlivá zejména na teplotu a relativní vlhkost vzduchu) (Randolph a Storey 1999). Prevalence a intenzita parazitace hostitele klíšťaty je do značné míry druhově specifická. Například bylo prokázáno, že myšice rodu *Apodemus* spp. jsou častěji parazitovány klíšťaty než norníci rodu *Myodes* spp. V tomto případě je důvodem vyvinutá imunita rodu *Myodes* spp. vůči klíšťatům (Dizij a Kurtenbach 1995). Další rozdíly v infestaci různých druhů hostitelů mohou být dány fyziologickými či behaviorálními faktory (např. větší parazitace u ptáků hnízdících na zemi) (Poupon et al. 2006, James et al. 2011, Norte et al. 2012). Velikost hostitele zase dává klíšťatům možnost se přichytit a tedy i úspěšně nasát (čím větší/starší zvíře, tím větší plocha, na kterou se může klíště přichytit). Všechny tyto faktory se vzájemně prolínají (Randolph a Storey 1999, Subak 2003, Vor et al. 2010, Kiffner et al. 2011b).

Parazité se obecně vyskytují na hostitelích agregovaně - většina klíšťat se nachází na malém počtu hostitelů (nebo většina hostitelů má jen nízký počet klíšťat). Důvodů ke shlukování parazitů v rámci hostitelské populace je hned několik. Některé druhy mají vyvinutou imunitu vůči klíšťatům (*Myodes* spp.) (Dizij a Kurtenbach 1995), hostitelé se snaží parazity mechanicky odstranit (Shaw et al. 2003) a rozdíl je také v aktivitě zvířat, jak podle pohlaví, tak podle druhu (samci *Apodemus* spp.) (Tälleklint a Jaenson 1997). Další důvod pro shlukování parazitů na hostitelích je jejich snažší komunikace a vyhledávání pohlavního partnera pomocí feromonů (Volf a Votýpka 2007).

Dále bylo prokázáno například u hlodavců (*Tamias striatus*, *Peromyscus leucopus*), že jsou více infestováni samci než samice (převážně larvami a nymfami) (Ostfeld et al. 1996, Tälleklint a Jaenson 1997, Brunner a Ostfeld 2008). Důvodem může být obecně vyšší aktivita samců než samic, případně rozdíly v imunitě způsobené hladinou testosteronu (Craine et al. 1995, Perkins et al. 2003). Míra shlukovitosti výskytu parazitů bývá popisována různými indexy agregace (Loydův index, agregační index K, „patchiness“ a „crowdiness“ atd.), které jsou používány i v případě klíšťat (Kitron et al. 1991, Stanko et al. 2006). Tyto indexy pracují většinou na základě porovnání průměrné abundance parazitů a její variance v populaci hostitele.

Agregaci klíšťat lze pozorovat i v rámci těla jedince hostitele. Důvodem je jednak vyhledání místa vhodného pro sání a zejména pak zabránění mechanickému odstranění z povrchu těla hostitele (Hart 2000, Shaw et al. 2003). Larvy jsou malé a vyhledávají místa jako je hlava a přední končetiny. Nymfy se také vyskytují na hlavě a za ušima, kde je nejhůře hostitel seškrábne nebo jinak mechanicky odstraní. Dospělci jsou nejvíce nalézáni na krku a v menší míře na hlavě. Důsledkem agregace v rámci hostitele je vznik „co-feedingových“ uskupení, což má vliv na přenos patogenů. V tomto ohledu je zvláště důležité, že shluky klíšťat nezahrnují jen jedno stadium klíštěte na jedné části těla, ale vyskytují se kombinace nymfy-larvy, nymfy-dospělci a larvy-dospělci. V takových uskupeních pak dochází k přenosu patogena z jednoho stadia na druhé, většinou z nymf a dospělců na larvy (nymfy). Jelikož nymfy a dospělci sálí vícekrát než larvy pravděpodobnost, že jsou nakaženi patogenem je vyšší (Ogden et al. 1998, Kiffner et al. 2011a).

Další důležitým faktorem ovlivňujícím abundanci klíšťat na hostitelích je uplatnění tzv. „dilučního efektu“. Podstatou mechanismu je, že pokud dojde k početnímu nárůstu v populaci hostitelů (případně výskytu nového druhu), tak abundance, prevalence a míra agregace u klíšťat klesá (Krasnov et al. 2007).

### **3.4.2.2 Vztah virus klíšťové encefalitidy - hostitel (rezervoár)**

Za rezervoárové hostitele v případě VKE jsou považováni drobní savci (hlodavci), zejména *Apodemus* spp. popřípadě *Myodes* spp. Jako nekompetentní hostitelé se jeví velcí savci (sudokopytníci) a ptáci.



U hlodavců bylo prokázáno, že mají poměrně krátkou virémii (protilátky se tvoří již po 2 dnech) a imunní hostitelé mají nižší pravděpodobnost přenosu viru na klíště. Proto se předpokládá, že zásadní cestou přenosu viru jsou „co-feedingová“ uskupení sajících klíšťat na hostiteli. V těchto uskupeních tedy dochází k lokálnímu přenosu viru i na imunním hostiteli (neviremický přenos) z nakaženého klíštěte sajícího v blízkosti klíštěte nenakaženého (nymfa-larva, nymfa-nymfa atd.). Z toho vyplývá, že v takových případech je klíště zároveň vektor i rezervoár (Labuda et al. 1993a, 1993b, Randolph et al. 1999). Tvorba „co-feedingových“ uskupení je vlastně jak důsledkem agregace v rámci populace hostitele, tak agregace v rámci jedinců hostitelů popsaných výše.

Frekvence výskytu „co-feedingových“ uskupení larev a nymf (nymfy takto často přenášejí patogeny na larvy) je ovlivněna i vnějšími faktory jako je relativní vlhkost a teplota. Při suchém klimatu jsou nymfy nuceny zůstat na nižším porostu a vyhledávat hostitele stejně jako larvální stadia (Burri et al. 2011). Dále bylo prokázáno, že zastoupení „co-feedingů“ pozitivně koreluje s velikostí hostitele. Také je prokazatelně častější výskyt na rodu *Apodemus* spp. než na *Myodes* spp., jakožto důsledek nižší parazitace *Myodes* spp. klíšťaty, související s imunitní odpovědí vůči klíštěti (která u *Apodemus* spp. nevzniká) (Dizij a Kurtenbach 1995, Kiffner et al. 2011b).

I nekompetentní hostitelé mohou nepřímo ovlivňovat výskyt viru klíšťové encefalitidy jednak tím, že umožňují přežití i nedospělých stádií klíšťat při nedostatku kompetentních hostitelů nebo při nepříznivých klimatických podmínkách a dále také tím, že poskytují zdroj potravy pro dospělé samice, které po nasátí a kopulaci produkují další generaci vajíček (Labuda et al. 2002, Carpi et al. 2008, Burri et al. 2011).

#### **3.4.2.3 Vztah vektor – virus klíšťové encefalitidy**

Hlavní kompetentní vektor pro přenos evropského subtypu VKE je v Evropě klíště *Ixodes ricinus*, pro sibiřský a dálně-východní subtyp je to *I. persulcatus* (Süss 2011). Jednou nakažené klíště pak přenáší virus na další vývojová stadia (transstadiálně) a je možný, i když jen vzácně, také přenos z matky na potomstvo (transovariálně) (Danielová et al. 2002b).

Stejně jako při přenosu borélií byl prokázán vliv proteinů v klíštěcích slinách i na přenos VKE (SAT - „salivary activated transmission“). Uplatňují se zejména supresory interferonu alfa a NK buněk (natural killers), které napomáhají jak při viremickém, tak neviremickém přenosu viru z hostitele na klíště. V případě VKE je zapojení

těchto molekul klíštěcích slin ještě významnější než v případě borélií, protože virus je intracelulární patogen. Virová infekce indukuje komplexní imunitní odpověď, kdy nakažené buňky produkují interferony, které inhibují množení viru a také dochází k aktivaci NK buněk, které ničí buňky napadené virem (Nuttall 1999, Labuda et al. 2002). Mezi další klíšťata, která jsou také schopna přenášet virus patří např.: *I. ovatus*, *Haemaphysalis concinna*, *Dermacentor reticulatus* (Süss 2011).

#### 3.4.2.4 Vztah *B. burgdorferi* s.l. - hostitel (rezervoár)

Podobně jako u ostatních klíšťaty přenášených patogenů, také u tohoto komplexu bakterií se vyskytují hostitelé s různou kompetencí k přenosu patogena. Mezi kompetentní hostitele patří drobní savci jako hlodavci: *Apodemus sylvaticus*, *A. flavicollis*, *A. agrarius*, *Myodes glareolus*, *Glis glis*, *Microtus agrestis* (např. Gern et al. 1994, Humair et al. 1999) a hmyzožravci: *Neomys fodiens*, *Sorex minutus* a *S. araneus*. Ze středně velkých savců jsou to hlodavci: *Sciurus carolinensis*, *S. vulgaris*, *Rattus norvegicus*, *R. rattus*, hmyzožravci: *Erinaceus europaeus* a zajícovci: *Lepus europaeus*, *L. timidus* (např. Craine et al. 1997, Gern et al. 1997, Humair a Gern 1998). Další kompetentní hostitelé jsou ptáci, zejména řádů dlouhokřídlí (*Alca torda*), hrabaví (*Phasianus colchicus*) a pěvci (*Erithacus rubecula*, *Fringilla coelebs*, *Parus major*, *Sylvia atricapilla*, *Troglodytes troglodytes*, *Turdus merula* atd.) (např. Humair et al. 1998, Hanincová et al. 2003, Comstedt et al. 2006). Naopak mezi nekompetentní hostitele patří velcí savci (sudokopytníci) např.: *Alces alces*, *Bos taurus*, *Capreolus capreolus*, *Cervus elaphus*, *Cervus nippon*, *Dama dama* a *Ovis aries* (Gern et al. 1998, Richter a Matuschka 2010, Mannelli et al. 2011).

K přenosu borélií taktéž může docházet i na nekompetentních hostitelích při sání klíšťat v „co-feedingových“ uskupeních (Gern a Rais 1996). Rezervoároví hostitelé borélií vykazují i určitou specifitu k přenosu jednotlivých genospecií. Je prokázána spojitost *B. garinii* a *B. valaisiana* s ptáky, *B. afzelii* a *B. bavariensis* s hlodavci a *B. lusitaniae* s ještěrkami a hlodavci. *B. burgdorferi* s.s. je spojována jak s ptáky tak s hlodavci. *B. spielmanii* je spojována také s hlodavci (zejména plch zahravní) (Rauter a Hartung 2005, Margos et al. 2009, Richter et al. 2011). Hostitelská specifita zřejmě vyplývá z odlišné reakce komplementu hostitele s genospeciemi borélií, např.: komplement hlodavců lyzuje *B. garinii* a komplement ptáků lyzuje *B. afzelii* (Kurtenbach et al. 2001, 2002). Podobně americké ještěrky (*Sceloporus occidentalis*) mají také schopnost ničit borélie. Příčinou

je zatím neidentifikovaný krevní (sérový) faktor, který zredukuje infekci boréliemi již při sání ve střevě klíštěte (nejspíše termolabilní protein) (Lane a Quistad 1998, Lane et al. 2006).

#### 3.4.2.5 Vztah vektor – *B. burgdorferi* s.l.

Spirochéty tohoto komplexu jsou přenášeny na člověka kompetentními vektory, kterými jsou většinou zástupci čeledi *Ixodidae*. V Evropě je z kompetentních vektorů nejvíce zastoupen *Ixodes ricinus*, v Americe *I. scapularis* a *I. pacificus* a v Asii *I. persulcatus* (Smetanová et al. 2007, Margos et al. 2009, Mannelli et al. 2011). Také další klíšťata mohou být vektory různých borélií, včetně původců návratných horeček např.: *Argas* spp., *Ornithodoros* spp., *Rhiphicephalus* spp., *Amblyomma* spp., *Dermacentor* spp. a jeden druh vši *Pediculus humanus* (Barbour a Hayes 1986, Lane et al. 2010, Andreotti et al. 2011, Haitham et al. 2012).

Spirochéty ve vektorech přežívají mezi vývojovými stádii – transstadiální přenos. Velmi zřídka mohou být také přenášeny ze samice na potomstvo – transovariální přenos (efektivita přenosu je velmi nízká podle Nefedové et al. (2004) pouze 1 ze 16 infikovaných samic *I. persulcatus* dokázala přenést spirochéty na vajíčka) (Nefedová et al. 2004). Přenos pomocí „co-feedingu“ mezi stádii (např. nymfa-nymfa) na nekompetentním hostiteli je také možný, ale jeho úspěšnost závisí na vzdálenosti mezi společně sajícími klíšťaty - čím blíže jsou, tím pravděpodobnější je přenos (Richter et al. 2002).

Nejdůležitější stadium pro přenos onemocnění na člověka jsou nymfy, protože sají na člověku nejčastěji (Hubálek et al. 2004). Dále se spekuluje o možnosti přenosu spirochét LB jinými hematofágními členovci než klíšťaty. *B. burgdorferi* s.l. byly nalezeny např. u komárů rodu *Culex* a *Aedes*, v tomto případě se ale pravděpodobně jedná pouze o mechanický přenos, který je charakterizován tím, že vektor (v tomto případě komár) není schopen přenést spirochéty z trávicího traktu do dalšího hostitele a tak zřejmě dochází k mechanickému přenosu patogena pomocí kontaminovaného ústního ústrojí (Kosik-Bogacka et al. 2004, Buňková et al. 2008, Nejedlá et al. 2009).

### 3.4.3 Metody identifikace hostitelů klíšťat

Současné metody identifikace hostitelů klíšťat zahrnují jak odchty zvířat a stanovení prevalence a abundance parazitů na jednotlivých druzích hostitelů (Siński et al. 2006), tak metody molekulárně biologické (Morán Cadenas et al. 2007, Schmidt et al. 2011).

Stanovení abundance a prevalence parazitů na hostitelích se většinou provádí pomocí odchytů hostitelů do pastí. U hostitele (např. hlodavce) je určen druh, přibližné stáří, pohlaví, hmotnost a poté je vyšetřen na přítomnost parazitů. Podle počtu parazitů na jedince jsou vypočteny prevalence a abundance parazita u daných druhů hostitelů. Ze získaných dat je možné po statistickém zpracování určit rozdíly v infestaci různých druhů hostitelů, druhovou diverzitu hostitelů na dané lokalitě a také závislost prevalence parazitů na pohlaví, hmotnosti, stáří jedinců (Siński et al. 2006). Zásadní nevýhodou těchto metod je, že odchyt je určitým způsobem výběrový a výsledky tedy nedávají komplexní informaci o hostitelském spektru, či zastoupení daného druhu hostitele jakožto zdroje potravy v populaci klíšťat.

Proto byly uskutečněny pokusy o identifikaci hostitele předchozích stádií klíšťete u klíšťat po metamorfóze, nenasátých hledajících hostitele. V současnosti jsou tyto metody založeny na amplifikaci a následné detekci hostitelské DNA ze zbytků krve ve střevě klíšťete. Dosud bylo popsáno několik metodik založených na reverzní hybridizaci se specifickými oligonukleotidovými sondami (RLB-„reverse line blotting“). Jednotlivé metody se liší lokusem, který je pro amplifikaci vybrán. Nejpoužívanější molekulárně biologickou metodou je detekce a identifikace hostitele s využitím fragmentu mitochondriálního genu kódujícího 12S rRNA (Morán Cadenas et al. 2007, Humair et al. 2007, Scott et al. 2012). Tento gen zároveň poskytuje dostatečnou variabilitu, která umožňuje určit hostitele dokonce na úrovni rodu nebo druhu. Díky tomuto postupu je možné identifikovat velké množství vzorků za relativně krátký čas, i když jde o metodu relativně drahou a úspěšnost identifikace hostitelů se odvíjí od stáří klíšťete (doby od jeho posledního sání). V dřívější metodice byly využívány amplifikované fragmenty nukleární 18S rRNA (Pichon et al. 2003, 2005) nebo genu pro cytochrom b mitochondrií (Kirstein a Gray 1996), které mají větší mezidruhovou variabilitu. Byla sice získána stejná senzitivita, ale nebylo dosaženo takové specifity a rozsahu v určení druhů hostitelů jako s použitím 12S rDNA.

Relativně novou molekulární metodou pro identifikaci hostitelů klíšťat je měření poměrů přirozených stabilních izotopů dusíku a uhlíku ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) v klíšťatech. Tato metoda byla původně používána pro studie potravních řetězců v přírodě. Poměry těchto izotopů a jejich předvídatelné modifikace jsou charakteristické pro různé hostitele a odráží hostitelské zdroje potravy. Tato metoda není jen schopná určit druh hostitele, ale také přibližné období, kdy na něm klíště naposledy sálo. Navíc tato metoda nemá odlišné výsledky v průběhu trávení potravy klíštětem, protože tyto izotopy jsou inkorporovány do jeho tkání. Velkou nevýhodou je zhoršující se senzitivita metody v průběhu stárnutí klíštěte a hlavně neschopnost identifikovat vzorky jednotlivých klíšťat (minimální možná velikost vzorku jsou tři klíšťata o celkové hmotnosti minimálně 0,28 mg). Tato metoda se stále vyvíjí (Schmidt et al. 2011).

## 4. Materiál a metody

### 4.1 Sběr vzorků a popis lokalit

V přírodních oblastech byla klíšťata sbírána metodou vlajkování. Podstatou této metody je vláčení bílého flanelového pruhu látky („vlajky“) po vegetaci a sbírání klíšťat, která se na ni zachytí. Sběry probíhaly v rozmezí března-říjen 2009-2010 na vybraných lokalitách Jihočeského kraje: Stromovka (České Budějovice), Zavadilka (České Budějovice), Blatná, Dačice, Netolice. Sběry prováděli RNDr. Patrik Kilian a Mgr. Václav Hönig. Klíšťata rozříděná do skleněných zkumavek podle vývojového stadia byla převezena do laboratoře a uchovávána při -75 °C až do jejich dalšího zpracování.

Odchyty hlodavců byly prováděny v období květen 2008-září 2011 na lokalitách Lužnice-Splavy, Římov, Lísek, Stará řeka, Chlum u Třeboně - Samoty a Hejtman. Odchyty prováděli RNDr. Miroslav Šimek (ZF, JU), Jitka Havlová (ZF, JU), Mgr. Václav Hönig a RNDr. Patrik Kilian (PřF, JU). Zvířata byla odchyťována do živolovných pastí s návnadou. Pasti byly kladeny v liniích a kontrolovány po soumraku a za úsvitu. Odchycená zvířata byla uspána a byly zaznamenány jejich tělesné parametry: délka těla, délka ocasu, délka zadní končetiny, délka ušního boltce, pohlaví, přibližné stáří, lokalita odchyty atd. Při opakovaných odchycích byla zvířata označena zastřihnutím prstu na končetině. Poté byla zvířeti prohledána srst, nalezená klíšťata byla odstraněna pomocí pinzety a rozříděna do 1,5 ml mikrozkušavek podle místa přisátí. Klíšťata sající agregovaně v uskupení - „co-feedingu“ (do vzdálenosti 0,4 cm od sebe) byla sbírána do stejné mikrozkušavky. Údaje o zaklíštění jednotlivých odchycených zvířat a výskytu „co-feedingových“ uskupení byly zaznamenány. Zvíře bylo po odeznění účinků anestézie vypuštěno zpět do přírody v lokalitě odchyty (Siński et al. 2006). Klíšťata byla krátkodobě uchována při 4 °C, následně byla zapsána do tabulky podle vývojového stadia a místa přisátí a kódem byla v evidenci přiřazena k danému zvířeti a lokalitě.

Jednotlivé lokality se lišily charakterem biotopu. Stromovka [48° 58' 14.140"N; 14° 27' 28.505"E] je typická urbánní oblast (městský lesopark), kde se lidé věnují venkovním aktivitám všeho druhu. Vyskytují se zde smíšené lesíky – břízy, duby, borovice lesní (*Betula pendula*, *Quercus* spp., *Pinus silvestris*) s nízkým travnatým a bylinným podrostem a také upravované travnaté plochy s okrasnými křovinami. Vzhledem k lokalizaci parku zde bývají vyšší zimní teploty a také příznivá vlhkost pro životní cyklus

klíšťat. Hostitelská fauna je zastoupena především drobnými obratlovci ježek západní, myšice lesní, veverka obecná (*Erinaceus europaeus*, *Apodemus flavicollis*, *Sciurus vulgaris*), středně velkými obratlovci liška obecná (*Vulpes vulpes*), ptáky kos černý, sojka obecná (*Turdus merula*, *Garrulus glandarius* atd.) a velmi zřídka i velkými obratlovci srnec obecný (*Capreolus capreolus*).

Lokalita Zavadilka [48° 58' 47.32''N; 14° 25' 47.41''E] je periurbánní smíšený les v blízkosti městské zástavby. Převažují zde stromy jako např. smrk ztepilý (*Picea abies*), borovice lesní (*Pinus silvestris*), dub zimní (*Quercus petraea*), zřídka lípa srdčitá (*Tilia cordata*), topol osika (*Populus tremula* L.) a líska obecná (*Corylus avellana*). Podrost byl složen zejména z borůvčí a travin. Fauna je zastoupena drobnými hlodavci (*Apodemus* spp., *Myodes glareolus*, *Microtus* spp., *Sciurus vulgaris*), ptáky s větším podílem sudokopytníků- srnec obecný, prase divoké (*Capreolus capreolus*, *Sus scrofa*).

Všechny následující lokality patří mezi přírodní lokality a proto očekáváme přibližně shodné zastoupení fauny s předchozí lokalitou. Lokalita Netolice [49° 2' 28.288"N, 14° 10' 41.897"E] je situována poblíž lesní cesty, turistické trasy a osady Peklo. Tento biotop je spíše sušší (orientace na jih) s převahou listnatých stromů jako jsou lípy (*Tilia cordata*), duby (*Quercus* spp) a jen v malém zastoupení smrk (*Picea abies*), bříza (*Betula pendula*), buk (*Fagus sylvatica*), jasan (*Fraxinus excelsior*). Podrost tvořily především trávy - třtina křovištní (*Calamagrostis epigejos*), srha říznačka (*Dactylis glomerata*), lipnice roční (*Poa annua*), medyněk měkký (*Holcus mollis*) a byliny - rozrazil lékařský (*Veronica officinalis*).

Také lokalita Blatná [49° 26' 42.54''N; 13° 52' 56.57''E] je v blízkosti vesnické zástavby a tedy úzkém kontaktu s lidmi. Terén je plochý s pestrou mozaikou flóry ekotonového charakteru. Flóra je zastoupena řadou dřevin jako např. javor mléč (*Acer platanoides*), topol osika (*Populus tremula* L.), líska obecná (*Corylus avellana*), vrba jíva (*Salix caprea*), borovice lesní (*Pinus silvestris*), dub zimní (*Quercus petraea*), habr obecný (*Carpinus betulus*), třešeň ptačí (*Prunus avium*). Podrost zde tvořily rostliny druhů – lipnice hajní (*Poa nemorosa*), kostřava ovčí (*Festuca ovina*), srha říznačka (*Dactylis glomerata*), kaprad' samec (*Dryopteris filix-mas*), třtina křovištní (*Calamagrostis epigejos*), rozrazil lékařský (*Veronica officinalis*), hluchavky (*Lamium* sp.).

Poslední lokalita Dačice [49° 5' 56.90''N; 15° 26' 24.06''E] je charakterizována nízkým porostem opadavých stromů. Nejvíce zastoupený je dub letní (*Quercus robur*)

s příměsí smrku ztepilého (*Picea abies*). Z keřového patra je zastoupen převážně smrk ztepilý. Bylinné patro je zde narozdíl od ostatních lokalit zastoupeno bohatou vegetací s druhy např.: ptačinec velkokvětý (*Stellaria holostea*), hrachor jarní (*Lathyrus vernus*), plicník lékařský (*Pulmonaria officinalis*), třezalka tečkovaná (*Hypericum perforatum*), zvonek kopřivolistý (*Campanula trachelium*) a ostružiník maliník (*Rubus idaeus* L.).

## 4.2 Příprava vzorků, izolace nukleových kyselin

Veškerá manipulace s klíšťaty a vzorky probíhala v boxu s laminárním prouděním (Telstar-Bioultra, třída II.). Byly připravovány celkem 3 typy vzorků: vzorky nenasátých klíšťat pro izolaci DNA pro detekci borélií a molekulárně biologickou identifikaci hostitele, vzorky klíšťat z hostitelů pro izolaci DNA pro detekci borélií, vzorky klíšťat z hostitelů pro izolaci RNA pro detekci viru klíšťové encefalitidy. RNA byla izolována pomocí kitu QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini Kit (Qiagen). DNA v případě nenasátých klíšťat byla izolována pomocí „chelexové“ metody a v případě vzorků klíšťat z hostitelů, obsahujících vzhledem k částečnému nasátí více potenciálních inhibitorů PCR, pomocí kitu DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) (souhrnně viz. Tab. II).

**Tab. II Typy vzorků a metody zpracování**

Typ vzorku	Způsob přípravy	Počet klíšťat/vzorek	Izolovaná NK	Navazující metody*
Vlajkovaná klíšťata	„Chelexová“ metoda	1	DNA	RLB-host, RLB-bor
Klíšťata z odchycených hostitelů	QIAamp <sup>®</sup> Viral RNA Mini Kit (Qiagen)	1	RNA	RT-PCR
Klíšťata z odchycených hostitelů	DNeasy Blood & Tissue (Qiagen)	1	DNA	RLB-bor

\* RLB-host- metoda „reverse line blotting“ pro indentifikaci hostitele (Humair et al. 2007), RT-PCR- reverzní trnaskriptázová polymerázová řetězová reakce pro detekci RNA viru KE, RLB-bor- metoda „reverse line blotting“ pro detekci a identifikaci genospecií *Borrelia burgdorferi* s.l. (Gern et al. 2010).

Nenasátá klíšťata sbíraná vlajkováním byla rozdělena po jednom do homogenizačních zkumavek se 150 µl sterilního fosfátem pufrovaného fyziologického roztoku (PBS-



„phosphate buffered saline“; 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 1,5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8,1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,3), byla přidána sterilní ocelová kulička (5 mm) (Qiagen) a homogenizace proběhla v přístroji TissueLyser II (Qiagen) po 3 min při 30 Hz.

Vzorky byly následně zpracovány pomocí „chelexové“ metody (Walsh et al. 1991, Rudenko et al. 2005). Ke zhomogenizovaným vzorkům byla po 400 µl rozpipetována 10% suspenze Chelex<sup>®</sup> 100 Resin (BioRad Laboratories, USA) v TE pufru (10 ml 1M Tris + 2 ml 0,5M EDTA pH 8 v 1 l destilované vody). Vzorky byly inkubovány přes noc v přístroji Mixing block MB-102 (Bioer) při 56 °C za míchání 800 třepů/min. Po další inkubaci 10 min. při 95 °C byly vzorky promíchány a centrifugovány 1 min při maximálních otáčkách. Vzniklý supernatant byl odebrán do sterilních 1,5 ml mikrozkušavek a skladován při -75 °C. Tento supernatant byl použit k detekci a identifikaci druhů borélií a detekci hostitelské DNA. Celý postup zahrnoval i přípravu negativní kontroly neobsahující klíště.

Částečně nasátá i nenasátá klíšťata z odchycených zvířat byla po jednom umístěna do označených homogenizačních mikrozkušavek obsahujících ocelovou kuličku (5 mm) (Qiagen) společně s 200 µl sterilního PBS („phosphate buffered saline“) a homogenizována pomocí přístroje TissueLyser II (Qiagen) po 3 min při 30 Hz. Poté bylo 80 µl použito pro izolaci DNA pomocí komerčního kitu DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) přesně podle návodu výrobce (DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Handbook 07/2006). Dalších 100 µl vzorku bylo použito pro izolaci RNA pomocí kitu QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini Kit (Qiagen) podle návodu výrobce (QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini handbook 04/2010). Příprava vzorků a izolace nukleových kyselin zahrnovala také negativní kontrolu, která neobsahovala klíště. Vzniklý eluát s izolovanou virovou RNA byl použit jako templát pro reverzní transkriptázovou PCR (RT-PCR), jejíž princip spočívá v přepsání virové RNA do cDNA („complementary DNA“).

## **4.3 Detekce patogenů**

### **4.3.1 Virus klíšťové encefalitidy**

RNA viru klíšťové encefalitidy byla detekována pomocí reverzní transkriptázové PCR (RT-PCR). Jako templát pro RT-PCR byl použit eluát, s izolovanou virovou RNA. Nejprve bylo do 0,2 ml mikrozkušavek rozpipetováno po 2 µl primeru TBE 1(R) (Generi-Biotech, ČR) a po 4 µl vzorku (pro pozitivní kontrolu 1 µl kontrolní RNA kmen Neudoerfl a 3 µl DEPC H<sub>2</sub>O, pro negativní kontrolu reverzní transkripce 4 µl DEPC H<sub>2</sub>O). Promíchané vzorky byly inkubovány v termálním cycleru GenePro (Bioer) při 70 °C 5 min a poté byly

mikrozkumavky ihned zchlazeny na ledu. Do každé mikrozkumavky bylo napipetováno po 19  $\mu$ l reakční směsi, která obsahuje: 5x M-MLV reakční pufr (5  $\mu$ l), směs dNTP 10 mM (1,25  $\mu$ l), Ribolock-inhibitor RNáz (0,75  $\mu$ l), M-MLV reverzní transkriptázu (1  $\mu$ l), DEPC H<sub>2</sub>O (11  $\mu$ l). Po promíchání byly vzorky inkubovány 60 min při 37 °C a následně byl enzym inaktivován inkubací 10 min při 70 °C. Takto vzniklá cDNA byla uskladněna při -75 °C a později použita pro PCR.

PCR proběhla za následujících podmínek. Do požadovaného objemu reakční směsi Combi PPP master mix byly přidány primery TBE 1(R), TBE 1(F) (Generi-Biotech, ČR) (Swaiger a Cassinotti 2003) po 1  $\mu$ l/vzorek a směs rozpipetována do 0,2  $\mu$ l mikrozkumavek po 21  $\mu$ l. Po přidání templátu proběhla PCR reakce v termálním cycleru GenePro (Bioer). Výsledné koncentrace v reakční směsi na 1 reakci: 1x koncentrovaný Combi PPP master mix (Top-Bio, ČR) (75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,01% Tween20; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 200  $\mu$ M dATP; 200  $\mu$ M dCTP; 200  $\mu$ M dGTP; 200  $\mu$ M dTTP; 2,5 U Taq purple DNA polymerázy; stabilizátory a aditiva), Primery TBE 1(F) (GGGCGGTTCTTGTCTCC), TBE 1 (R) (ACACATCACCTCCTTGTCAGACT) (0,4  $\mu$ M), DEPC voda.

Podmínky PCR reakce: 1. Úvodní denaturace při 95 °C po 10 min

2. 35 cyklů: Denaturace při 95 °C po 15 s

Nasedání primerů při 60 °C po 30s

Elongace při 72 °C po 30s

3. Udržovací teplota 14 °C

Elektroforetická separace PCR produktů proběhla na 2% agarózovém gelu v pufru TAE (40 mM Tris-acetát, 2 mM EDTA, pH 8,3; Merck). Ke 13  $\mu$ l vzorku bylo přidáno 2,2  $\mu$ l nanášecího pufru 6x Orange DNA Loading Dye (Fermentas) smíchaného s 5x koncentrovaným barvivem SYBR Green (Amresco, USA). Separace probíhala při 110 V po 1 h, výsledné proužky byly vizualizovány na UV transiluminátoru a fotograficky zdokumentovány. Ve vzorcích pozitivních na virus klíšťové encefalitidy byl pozorován fragment o velikosti 68 pb a porovnán s pozitivní kontrolou.

### 4.3.2 *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Genospecie borélií byly detekovány a identifikovány pomocí metody RLB („reverse line blotting“) (Gern et al. 2010). Tato metoda je založena na hybridizaci druhově specifických oligonukleotidových sond ukotvených na membráně s PCR produkty značenými biotinem a jejich následné detekci pomocí chemiluminiscence. Část genomu borélií zvolená pro amplifikaci obsahuje variabilní intergenový mezerník umístěný mezi dvěma kopiemi genů pro ribozomální RNA podjednotek 23S a 5S. Jako pozitivní kontrola byla v této metodě použita DNA izolovaná z kultury *B. burgdorferi* s.s. kmen B31 a do negativní kontroly byla místo templátové DNA přidána PCR H<sub>2</sub>O.

Pro RLB byla použita membrána Biodyne<sup>®</sup> C (Pall Corporation) aktivovaná v roztoku 16% EDAC (N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride) (Merck, SRN) po 10 min. při laboratorní teplotě. Na membránu byly v miniblottu nanášeny 5' amino značené sondy naředěné na koncentraci 500 nM v roztoku 500 mM NaHCO<sub>3</sub> o pH 8,4 (0,84 g NaHCO<sub>3</sub> do 20 ml H<sub>2</sub>O). SONDY byly na membráně inkubovány 1 min. při laboratorní teplotě (LT), následně byla membrána inaktivována 100 mM NaOH (0,4g NaOH do 100 ml H<sub>2</sub>O) po 10 min. při LT. Po promytí v roztoku 2x SSPE/0,1 % SDS (89 ml H<sub>2</sub>O, 10 ml SSPE 20x, 1 ml SDS 10 %) po 5 min. při 60 °C byla membrána připravena k použití. Použité sondy a jejich sekvence jsou uvedeny v Tab. III.

Pomocí „touch down“ PCR s primery 23Sbor (TCAGGGTACTTAGATGGTTCCTT) a 5Sbor (značený biotinem) (biotin-GAGTTCGCGGGAGAGTAGGTTATT) (Alekseev et al. 2001) byly připraveny značené PCR produkty. Složení PCR reakce bylo stejné jako v předchozím případě.

#### **Podmínky „touch down“ PCR:**

##### **I. ČÁST PROGRAMU (9 cyklů):**

1. Počáteční denaturace 5 min. při 94 °C
2. Denaturace 20 s při 94 °C
3. Nasedání primerů 30 s při 60 °C
4. Elongace 30 s při 72 °C

- v každém následujícím cyklu byla teplota nasedání primerů snížena o 1 °C, dokud nedosáhla 52 °C.

## II. ČÁST PROGRAMU (40 cyklů):

5. Denaturace 20 s při 94 °C

6. Nasedání primerů 30 s při 52 °C

7. Elongace 30 s při 72 °C

III. KONEČNÁ ELONGACE 7 min. při 72 °C a udržování při 14 °C dokud nebyly vzorky vyndány z cycleru.

PCR produkty byly naředěny v roztoku 2x SSPE/0,1 % SDS (20 µl produktu + 180 µl roztoku 2x SSPE/0,1 % SDS) a denaturovány 10 min. při 99 °C. Denaturované vzorky byly ihned zchlazeny na ledu a membrána inkubována v 2x SSPE/0,1 % SDS 5 min. při LT. Membrána byla uzavřena do blotteru tak, aby nanesené sondy byly kolmo na jamky miniblotteru a připravené vzorky byly naneseny do jamek. Poté následovala hybridizace 60 min. při 42 °C. Následně byly vzorky z miniblotteru odsáty a membrána promývána 2x v roztoku 2x SSPE/0,5 % SDS (170 ml H<sub>2</sub>O, 20 ml SSPE 20x, 10 ml SDS 10 %) po 10 min. při 52 °C. Poté byla membrána inkubována v roztoku konjugátu streptavidin-peroxidáza (2x SSPE/0,5 % SDS + 3 µl konjugátu) 30 min. při 42 °C. Nakonec byla membrána promývána 2x nejprve v roztoku 2x SSPE/0,5 % SDS 10 min. při 42 °C a poté 2x v roztoku 2x SSPE po 5 min. při LT.

Hybridizovaná DNA byla na membráně detekována pomocí chemiluminiscenčního detekčního kitu (ECL detection kit, GE Healthcare) podle návodu výrobce. K připravené membráně byl v temné komoře přiložen citlivý film (KODAK<sup>®</sup> BioMax Light Film, Francie), který byl exponován po dobu 2 hodin. Film byl následně vyvolán standardním postupem.

Pro opakované použití byla membrána dehybridizována v roztoku 1% SDS (180 ml H<sub>2</sub>O, 20 ml SDS 10 %) po 1 h při 80 °C a promyta v roztoku 20 mM EDTA (4 ml 0,5M EDTA, pH 8 do 100 ml H<sub>2</sub>O) o pH 8 po 15 min. při LT. Pro dlouhodobé skladování byla membrána uložena v plastovém sáčku při 4 °C.

**Tab. III Sondy použité při RLB pro identifikaci druhu borélií**

Sondy zkratka	Genospecie	Sekvence (5' - 3')	Citace
SL	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	5'- amino-CTTTGACCATATTTTTATCTTCCA	Rijpkema et al. (1995)
SS	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	5'- amino-ACACCAATATTTAAAAAACATAA	Rijpkema et al. (1995)
AF	<i>B. afzelii</i>	5'- amino-AACATTTAAAAAATAAATTCAAGG	Rijpkema et al. (1995)
GA	<i>B. garinii</i>	5'- amino-AACATGAACATCTAAAAACATAAA	Rijpkema et al. (1995)
GANE	<i>B. garinii</i>	5'- amino-CAAAAACATAAATATCTAAAAACATAA	Poupon et al. (2006)
GANE1	<i>B. garinii</i>	5'- amino-AAAATCAATGTTTAAAGTATAAAAT	Gern et al. (2010)
VSNE	<i>B. valaisiana</i>	5'- amino-TATATCTTTTGTTCATCCATGT	Poupon et al. (2006)
LUSINE	<i>B. lusitaniae</i>	5'- amino-TCAAGATTTGAAGTATAAAATAAAA	Poupon et al. (2006)
LUSINE1	<i>B. lusitaniae</i>	5'- amino-CATTCAAAAAATAAACATTTAAAAACAT	Gern et al. (2010)
LUSINE2	<i>B. lusitaniae</i>	5'- amino-AAATCAAACATTCAAAAAATAAAC	Gern et al. (2010)
SPINE2	<i>B. spielmanii</i>	5'- amino-GAATGGTTTATTCAAATAACATA	Gern et al. (2010)
SPINE3	<i>B. spielmanii</i>	5'- amino-GAATAAGCCATTTAAATAACATA	Gern et al. (2010)
BISNE1	<i>B. bissetii</i>	5'- amino-AAACACTAACATTTAAAAAACAT	Gern et al. (2010)
BISNE2	<i>B. bissetii</i>	5'- amino-AACTAACAAACATTTAAAAAACAT	Gern et al. (2010)

#### 4.4 Identifikace hostitelů

K identifikaci fragmentů hostitelské DNA byla použita metoda RLB s podobným postupem jako pro identifikaci genospecií borélií, pouze při promývání po hybridizaci membrány byla teplota zvýšena na 54 °C. Membrána pro hostitele obsahovala také rozdílné sondy (viz. Tab. IV). Značený PCR produkt pro hybridizaci byl připraven pomocí „touchdown“ PCR za shodných podmínek jako v předchozím případě, ale s odlišnými primery: 12S-6F (CAAACCTGGGATTAGATACC), 12S-9R (značený biotinem) (biotin-

AGAACAGGCTCCTCTAG). Pomocí těchto primerů byl amplifikován úsek ribozomální DNA obratlovců (Morán Cadenas et al. 2007).

**Tab. IV Sondy použité při RLB pro identifikaci hostitele (Humair et al. 2007)**

Číslo	Název sondy	Cílový organizmus
		Sekvence (5' - 3')
1	1-Small rodents (Drobní hlodavci)	<i>Muroidea (Muridae, Cricetidae)</i>
		<b>5' amino-GGCGGTACTTTATATCCAT</b>
2	Artiodactyla (Sudokopytníci)	<i>Bovidae, Cervidae, Suidae</i>
		<b>5' amino-TATTCGCCAGAGTACTAC</b>
3	Aves (Ptáci)	Ptáci
		<b>5' amino-TACGAGCACAAACGCTTAA</b>
4	Lizards (Ještěrky)	Ještěrky
		<b>5' amino-GAGAACTACAAGTGAAAACT</b>
5	Clethrionomys	<i>Myodes (Clethrionomys) glareolus</i> (norník rudý)
		<b>5' amino-AAACTTCAACATTTATAAAACAAAAG</b>
6	Apodemus sp.	<i>Apodemus sylvaticus</i> (myšice křovinná), <i>A. flavicollis</i> (myšice lesní)
		<b>5' amino-TAAACTTAAATAATTTAATAACAAAACAT</b>
7	M. agrestis/Micromys	<i>Microtus agrestis</i> (hraboš mokřadní), <i>Micromys minutus</i> (myška drobná)
		<b>5' amino-CTTAGCCCTAAACTTTAATAATT</b>
8	M. arvalis	<i>Microtus arvalis</i> (hraboš polní)
		<b>5' amino-AAACCTCAATAATTTAGAAACAAAAA</b>
9	M. minutus	<i>Micromys minutus</i> (myška drobná)
		<b>5' amino-AAACTTTAATAATTCACACAAAAT</b>
10	R. norvegicus	<i>Rattus norvegicus</i> (potkan obecný)
		<b>5' amino-AACCTTAATAATTAACCTACAAAAT</b>
11	S. vulgaris	<i>Sciurus vulgaris</i> (veverka obecná)
		<b>5' amino-AACATAGACACTCAATTAACAAG</b>
12	M. Glis	<i>Myoxus glis</i> (plch obecný)
		<b>5' amino-AAACCCTTACTAACGCAAC</b>
13	L. europaeus	<i>Lepus europaeus</i> (zajíc polní)

		<b>5' amino-TTAAACCTAAATAATTCCTAACAAA</b>
14	E. europaeus	<i>Erinaceus europaeus</i> (ježek západní)
		<b>5' amino-GACAGTTACTTAACAAAATTGTA</b>
15	S. araneus	<i>Sorex araneus</i> (rejsek obecný)
		<b>5' amino-GGTATTTAACCTAACAAAAATAC</b>
16	Neomys sp.	<i>Neomys anomalus</i> (rejsek černý), <i>N. fodiens</i> (rejsek vodní)
		<b>5' amino-ACAAAATTACTCGCCAGAG</b>
17	T. europaea	<i>Talpa europaea</i> (krtek obecný)
		<b>5' amino-ACCAAGACAATCAAGTTAACA</b>
18	V. vulpes	<i>Vulpes vulpes</i> (liška obecná)
		<b>5' amino-CTATAACAAAACAATTCGCCA</b>
19	M. meles	<i>Meles meles</i> (jezevec lesní)
		<b>5' amino-GATAACTCACAGAACAAAAC</b>
20	M. erminea	<i>Mustela erminea</i> (lasice hranostaj)
		<b>5' amino-CATAAATAGTTCTAACAACAAAAC</b>
21	M. putorius	<i>Mustela putorius</i> (tchoř tmavý)
		<b>5' amino-CTAAACATAAATAATTATCACAACAA</b>
22	C. capreolus	<i>Capreolus capreolus</i> (srnec obecný)
		<b>5' amino-CCTAAACACAAGTAATTAATATAACAA</b>
23	S. scrofa	<i>Sus scrofa</i> (prase divoké)
		<b>5' amino-ACCCAAATAGTTACATAACAAAA</b>
24	Turdus sp./Parus sp.	<i>Turdus merula</i> (kos černý), <i>T. iliacus</i> (drozd čvrčala), <i>T. philomelos</i> (drozd zpěvný), <i>T. pilaris</i> (drozd kvíčala), <i>Parus major</i> (sýkorka koňadra), <i>P. caeruleus</i> (sýkorka modřinka)
		<b>5' amino-TGATGCTCGATATTACCTG</b>
25	E. rubecula	<i>Erithacus rubecula</i> (červenka obecná)
		<b>5' amino-ATCTTGATGCTCCACCTTA</b>
26	Parus sp.	<i>Parus major</i> (sýkorka koňadra), <i>P. caeruleus</i> (sýkorka modřinka)
		<b>5' amino-TGAGCGTCCGCCTGA</b>
27	P. ater	<i>Parus ater</i> (sýkorka uhelníček)
		<b>5' amino-TTGATGCTTAACATTACCTGA</b>
28	Fringilla	<i>Fringilla coelebs</i> (pěnkava obecná), <i>F. montifringilla</i> (pěnkava jikavec),

	sp./Pyrrhula sp.	<i>Pyrrhula pyrrhula</i> (hýl obecný)
		<b>5' amino-TGATGCTTACCCCTACTAA</b>
29	<i>P. modularis</i>	<i>Prunella modularis</i> (pěvuška modrá)
		<b>5' amino-TGATGCTTAACCCTACCTA</b>
30	<i>S. europaea</i>	<i>Sitta europaea</i> (brhlík lesní)
		<b>5' amino-TATACAACCTAAGCATCCG</b>
31	<i>S. atricapilla</i>	<i>Sylvia atricapilla</i> (pěnice černohlavá)
		<b>5' amino-GCTCGATCTTACTGGAG</b>
32	<i>T. troglodytes</i>	<i>Troglodytes troglodytes</i> (střízlík obecný)
		<b>5' amino-TGATGCTTTATATAACCCAAG</b>
33	<i>G. glandarius</i>	<i>Garrulus glandarius</i> (sojka obecná)
		<b>5' amino-TTGACACTCTATGCTACCT</b>

## 4.5 Identifikace druhu vektora

Poškození zejména ústního ústrojí klíšťat při jejich odebírání z uspaných drobných savců znemožňovalo identifikaci klíšťat podle morfologických znaků. Proto bylo k rozlišení *Ixodes ricinus* a *I. trianguliceps* použito PCR dle metodiky Paulauskas et al. (2008). Složení reakce bylo opět stejné jako v předchozích případech. Použity byly primery Ixri-F (GGAAATCCCGTCGCACG) a Ixri-R (CAAACGCGCCAACGAAC) (Paulauskas et al. 2008).

Nastavení PCR programu: 1. Úvodní denaturace při 95 °C po 10 min

2. 35 cyklů: Denaturace při 95 °C po 15 s

Nasedání primerů při 45 °C po 30s

Elongace při 72 °C po 30s

3. Udržovací teplota 14 °C

V případě *I. ricinus* byl získán fragment o velikosti 150 pb u *I. trianguliceps* o velikosti 200 pb. Produkty byly odlišeny podle velikosti pomocí elektroforetické separace na 2% agarózovém gelu.



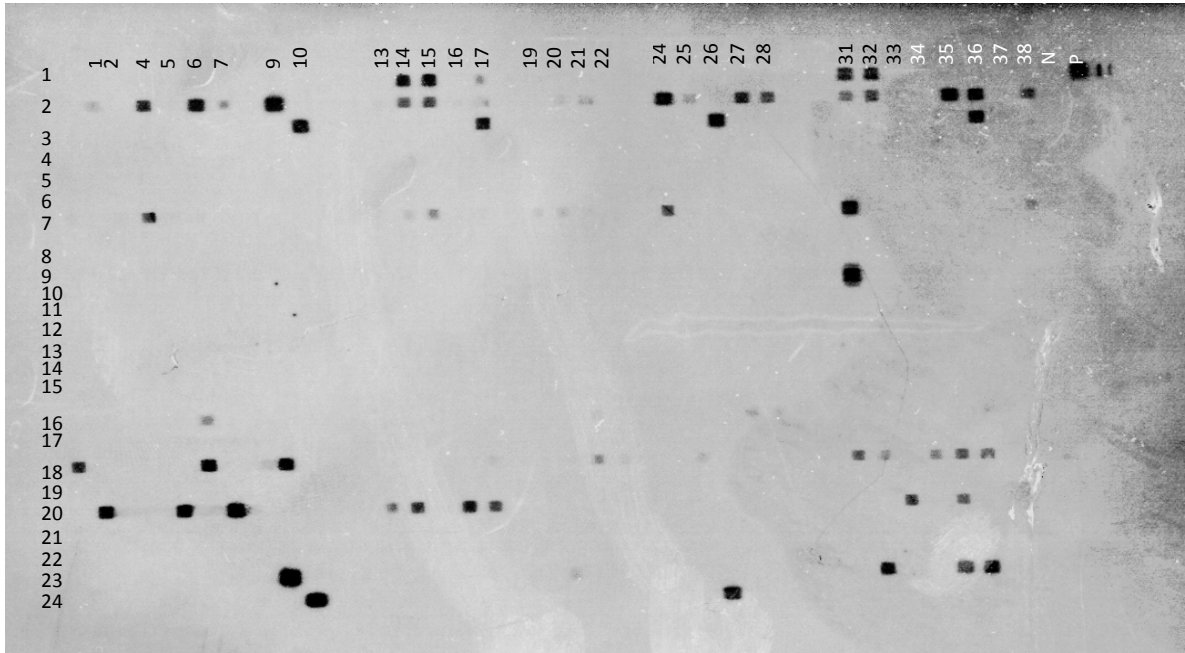
## 4.6 Statistické zhodnocení dat

Pro veškerá statistická zhodnocení byl použit program STATISTICA ver.10 (StatSoft, USA). Pro porovnání prevalencí a úspěšností identifikací bylo použito kontingenčních tabulek a test Pearsonův  $\chi^2$ . Dále byl použit Fisherův exaktní test a Mann-Whitney U test, lineární regrese. Za statisticky průkazné byly považovány výsledky  $p < 0,05$ .

## 5. Výsledky

### 5.1 Molekulární identifikace hostitelů u klíšťat ze sběrů

Celkem bylo testováno 669 vzorků (642 nymf a 27 dospělců) na přítomnost hostitelské DNA. Příklad výsledku metodiky RLB je uveden na Obr. 1.



**Obr. 1** Příklad výsledku identifikace druhů hostitelů klíšťat pomocí metody RLB (horizontálně-sondy, vertikálně-vzorky, sondy číslované podle pořadí v Tab. IV)

#### 5.1.1 Úspěšnost identifikace

Z celkově 669 vzorků proběhla identifikace úspěšně u 66 % (444 pozitivních vzorků). Úspěšnost identifikace nymfálních stádií dosáhla 65 % (420). Kontrolně byly provedeny i sběry dospělců na lokalitě Stromovka. U dospělců dosáhla úspěšnost identifikace 89 % (24/27). Rozdíly v úspěšnosti identifikace mezi stádii byly statisticky průkazné pouze při porovnání celkových hodnot (Pearsonův  $\chi^2$  test;  $p < 0,01$ ), při porovnání hodnot jen v rámci lokality Stromovka, nebyly nalezeny statisticky průkazné rozdíly. Podrobnější výsledky jsou uvedeny v Tab. V.

**Tab. V Úspěšnost identifikace podle vývojových stadií klíšťat**

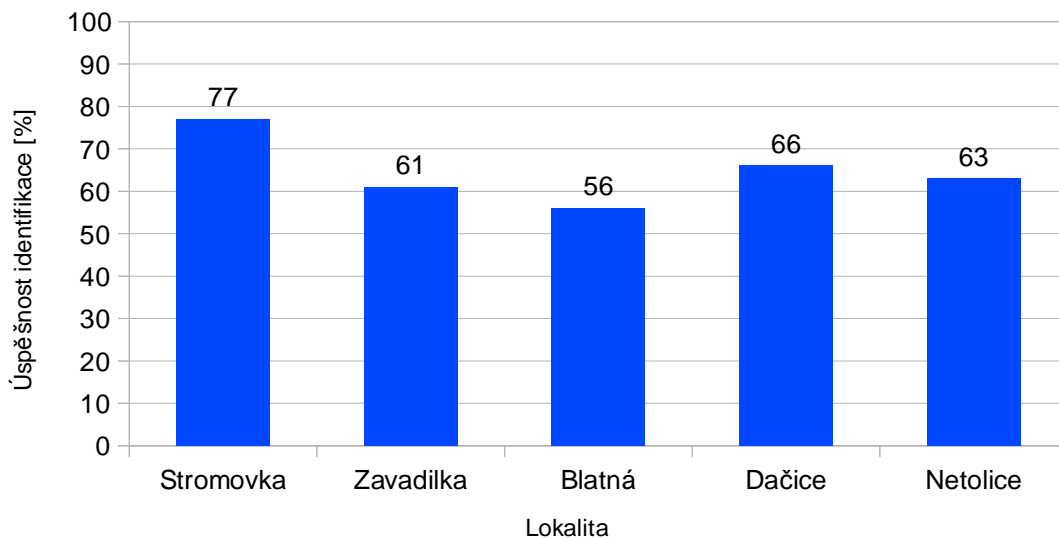
Stadium klíštěte	Počet identifikovaných vzorků (z celkového počtu)	Podíl identifikovaných z celkového počtu identifikovaných vzorků
Samice	11 (12)	92 %
Samci	13 (15)	87 %
Nymfy	420 (642)	65 %
Celkem	444 (669)	66 %

Vzorky byly získány v průběhu roku 2009 (211) a 2010 (458). Úspěšnost identifikace v závislosti na roku sběru byla průkazně vyšší v roce 2009 (77 %) než 2010 (61 %) (Pearsonův  $\chi^2$  test;  $p < 0,01$ ). Rozdíly v úspěšnosti identifikace hostitelů, mezi jednotlivými měsíci sběru (v letech 2009 a 2010), nebyly statisticky průkazné (viz. Tab. VI).

**Tab. VI Úspěšnost identifikace podle měsíce sběru**

Měsíc, rok sběru	Počet identifikovaných vzorků (z celkového počtu)	Podíl identifikovaných z celkového počtu vzorků
Duben 2010	49 (83)	59 %
Červen 2010	123 (201)	61 %
Srpen 2010	63 (100)	63 %
Říjen 2010	46 (74)	62 %
Duben 2009	37 (51)	73 %
Květen 2009	29 (35)	83 %
Červen 2009	67 (84)	80 %
Červenec 2009	11 (19)	58 %
Srpen 2009	19 (22)	86 %

Vzorky byly získány z následujících lokalit: Stromovka, Zavadilka, Blatná, Dačice, Netolice. Úspěšně identifikováno bylo u lesoparku Stromovka 163 z 211 (77 %) vzorků, u lokalit Zavadilka 96/158 (61 %) vzorků, Blatná 56/100 (56 %), Dačice 66/100 (66 %) a Netolice 63/100 (63 %) viz Obr. 2. Rozdíly v úspěšnosti identifikace mezi jednotlivými lokalitami byly statisticky průkazné (Pearsonův  $\chi^2$  test;  $p < 0,01$ ).



**Obr. 2** Úspěšnost identifikace hostitele v závislosti na lokalitě

### 5.1.2 Celkové zastoupení hostitelů *I. ricinus*

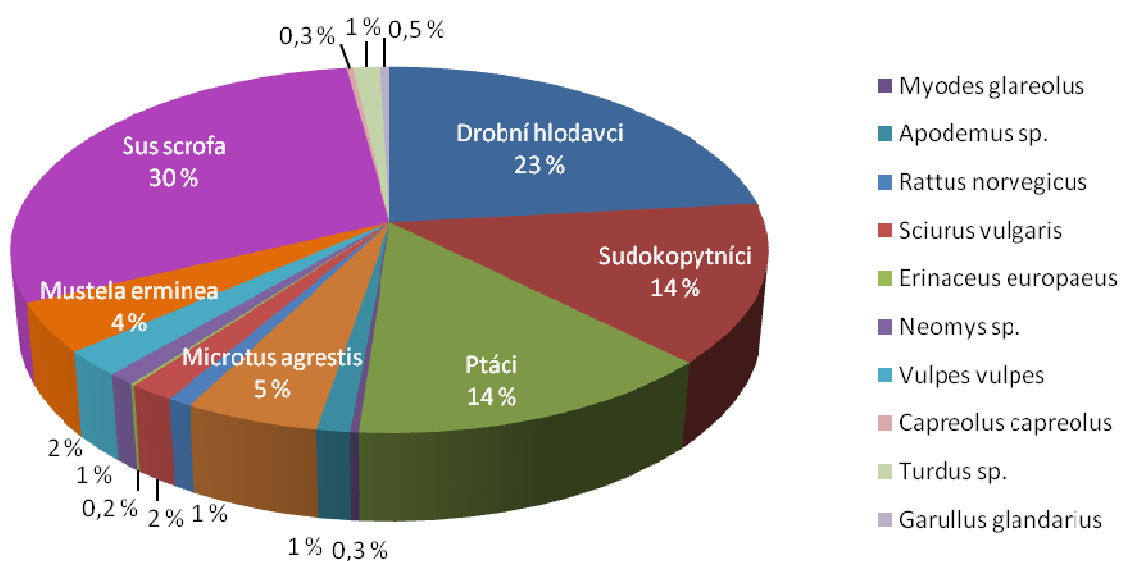
Z dostupných 4 skupinových a 29 rodových/druhových sond hybridizoval alespoň jeden vzorek s 3 skupinovými (žádný nehybridizoval se sondou „lizards/ještěrky“) respektive s 13 rodovými/druhovými sondami. Nejvíce zastoupenými skupinami byly sudokopytníci a drobní hlodavci, kteří společně poskytli zdroj potravy pro téměř 3/4 klíšťat.

U některých vzorků byl identifikován více než jeden hostitel (166/669 vzorků, 37 %) a to statisticky průkazně více u dospělců (21/27; 78 %) než u nymf (145/642, 23 %) (Pearsonův  $\chi^2$  test;  $p < 0,01$ ). Vzorky, u kterých se shodovala rodová/druhová identifikace s identifikací skupiny, byly započteny jako jedna identifikace a to právě jako ta více specifická (rodová/druhová) sonda. U ostatních vzorků, u kterých byl identifikován více než jeden hostitel, byli započtení všichni hostitelé jako jednotlivé identifikace.

Ve vzorcích, u kterých byl hostitel úspěšně identifikován až na úroveň rodu/druhu bylo nejčastěji detekovaným hostitelem prase divoké (*Sus scrofa*). Dále byly významně zastoupeni hraboši (*Microtus agrestis*), lasice (*Mustela erminea*), liška (*Vulpes vulpes*), veverka (*Sciurus vulgaris*), drozdí/kosi (*Turdus* sp.), myšice (*Apodemus* sp.) a rejsci (*Neomys fodiens*). Podrobné výsledky jsou uvedeny v Tab. VII, Obr. 3.

**Tab. VII Zastoupení skupin druhů a druhů hostitelů**

Druh hostitele	Počet identifikací (% z celkového počtu identifikací)
Drobní hlodavci	154 (23,0 %)
Sudokopytníci	93 (14,0 %)
Ptáci	91 (13,7 %)
<i>Myodes glareolus</i>	2 (0,3 %)
<i>Apodemus</i> sp.	8 (1,2 %)
<i>Microtus agrestis</i>	33 (5,0 %)
<i>Rattus norvegicus</i>	6 (1,0 %)
<i>Sciurus vulgaris</i>	11 (1,7 %)
<i>Erinaceus europaeus</i>	1 (0,2 %)
<i>Neomys fodiens/anomalus</i>	7 (1,0 %)
<i>Vulpes vulpes</i>	15 (2,3 %)
<i>Mustela erminea</i>	29 (4,4 %)
<i>Sus scrofa</i>	197 (30,0 %)
<i>Capreolus capreolus</i>	2 (0,3 %)
<i>Turdus</i> sp.	9 (1,4 %)
<i>Garullus glandarius</i>	3 (0,5 %)

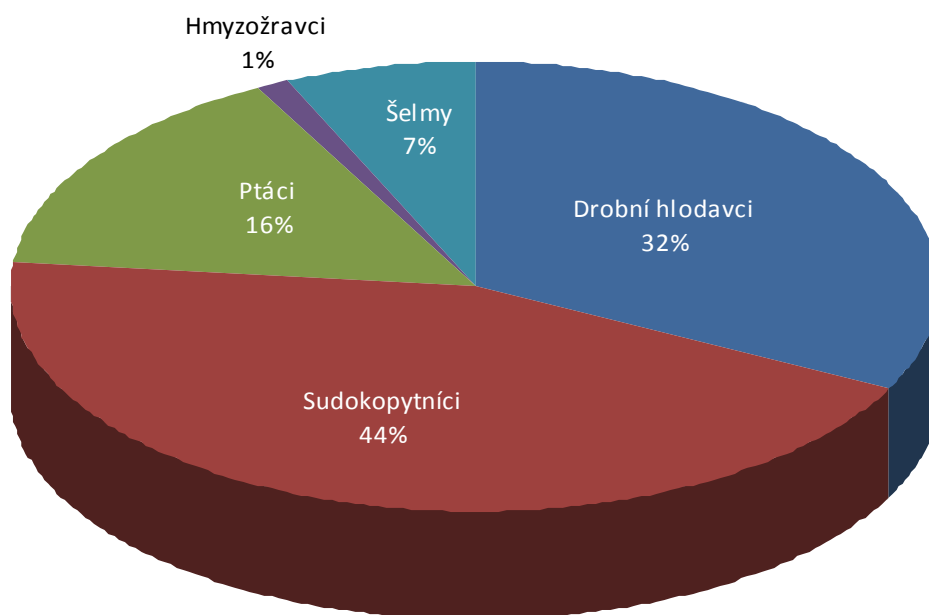


**Obr. 3** Celkový přehled skupin druhů a druhů hostitelů

Pro větší přehlednost byly následně všechny úspěšně identifikované vzorky zařazeny k některé ze skupin hostitelů (drobní hlodavci, sudokopytníci, ptáci, hmyzožravci, šelmy). Souhrnné výsledky jsou uvedeny v Tab. VIII., Obr. 4.

**Tab. VIII** Celkové zastoupení skupin druhů hostitelů

Druh hostitele	Počet identifikací
Drobní hlodavci	214 (32 %)
Sudokopytníci	292 (44 %)
Ptáci	103 (16 %)
Hmyzožravci	8 (1 %)
Šelmy	44 (7 %)



**Obr. 4** Celkové zastoupení skupin druhů hostitelů

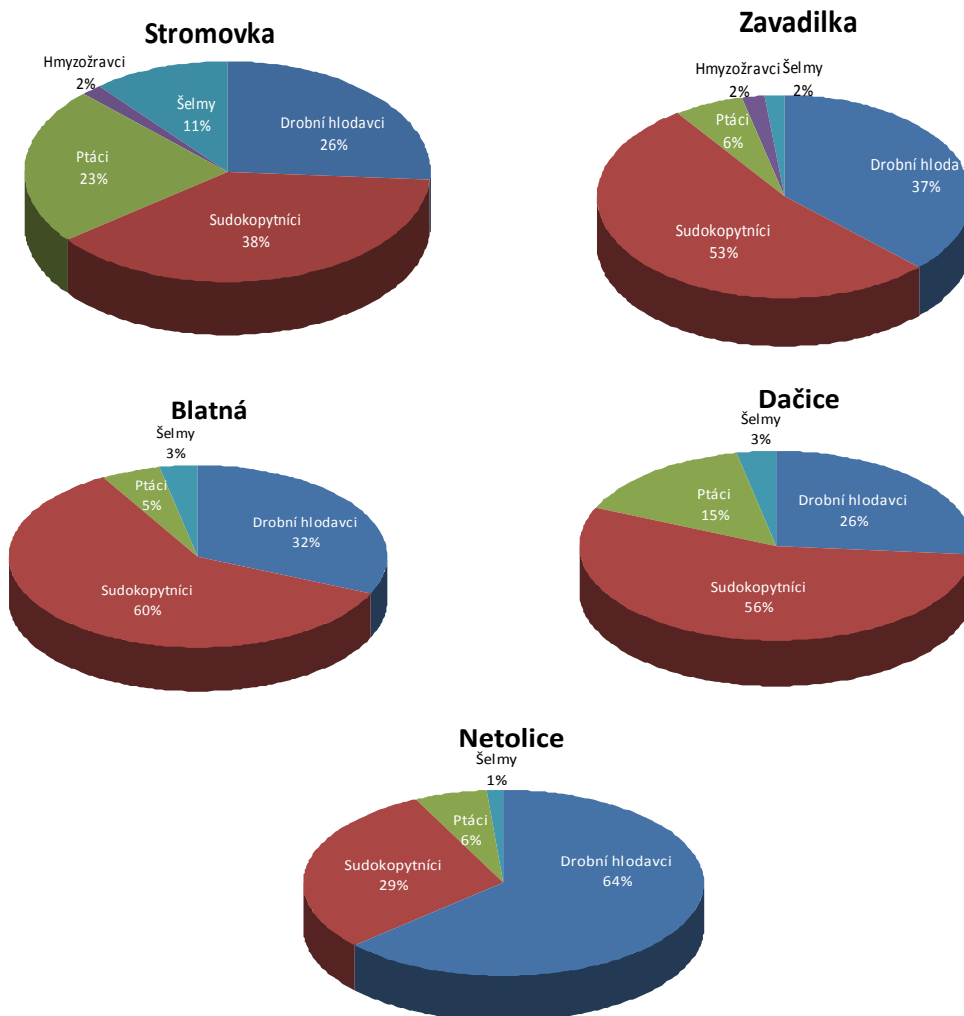
### 5.1.3 Zastoupení druhů hostitelů na jednotlivých lokalitách

Na každé z lokalit bylo zjištěno odlišné zastoupení skupin druhů i druhů hostitelů. Ze skupin druhů hostitelů, kromě lokality Stromovka, převažovali na všech lokalitách drobní hlodavci. Na lokalitě Stromovka byly nejvíce zastoupeni ptáci. Z druhů hostitelů na všech lokalitách převažoval *Sus scrofa*. Druhy, jako např. *Rattus norvegicus*, *Erinaceus europaeus*, *Vulpes vulpes* a *Garullus glandarius*, se vyskytovaly výhradně na lokalitě Stromovka. Bližší informace o zastoupení hostitelů viz Tab. IX, Obr. 5.

**Tab. IX Zastoupení druhů hostitelů na jednotlivých lokalitách.**

	Stromovka	Zavadilka	Blatná	Dačice	Netolice
Drobní hlodavci	50 (15 %)	30 (26,6 %)	14 (23,3 %)	21 (24 %)	39 (57 %)
Sudokopytníci	42 (12,6 %)	28 (25 %)	5 (8,3 %)	14 (16 %)	4 (6 %)
Ptáci	67 (20 %)	5 (4,4 %)	2 (3,3 %)	13 (15 %)	4 (6 %)
<i>Myodes glareolus</i>	1 (0,3 %)	0	0	0	1 (1,5 %)
<i>Apodemus</i> sp.	3 (0,9 %)	1 (0,9 %)	4 (6,7 %)	0	0
<i>Microtus agrestis</i>	26 (7,8 %)	4 (3,5 %)	0	2 (2,3 %)	1 (1,5 %)
<i>Rattus norvegicus</i>	6 (1,8 %)	0	0	0	0
<i>Sciurus vulgaris</i>	1 (0,3 %)	7 (6,2 %)	1 (1,7 %)	0	2 (3 %)
<i>Erinaceus europeus</i>	1 (0,3 %)	0	0	0	0
<i>Neomys fodiens/anomalus</i>	5 (1,5 %)	2 (1,8 %)	0	0	0
<i>Vulpes vulpes</i>	15 (4,5 %)	0	0	0	0
<i>Mustela erminea</i>	21 (6,3 %)	2 (1,8 %)	2 (3,3 %)	3 (3,5 %)	1 (1,5 %)
<i>Capreolus capreolus</i>	0	0	1 (1,7 %)	1 (1,2 %)	0
<i>Sus scrofa</i>	86 (26 %)	32 (28 %)	30 (50 %)	33 (38 %)	16 (23,5 %)
<i>Turdus</i> sp.	6 (1,8 %)	2 (1,8 %)	1 (1,7 %)	0	0
<i>Garullus glandarius</i>	3 (0,9 %)	0	0	0	0

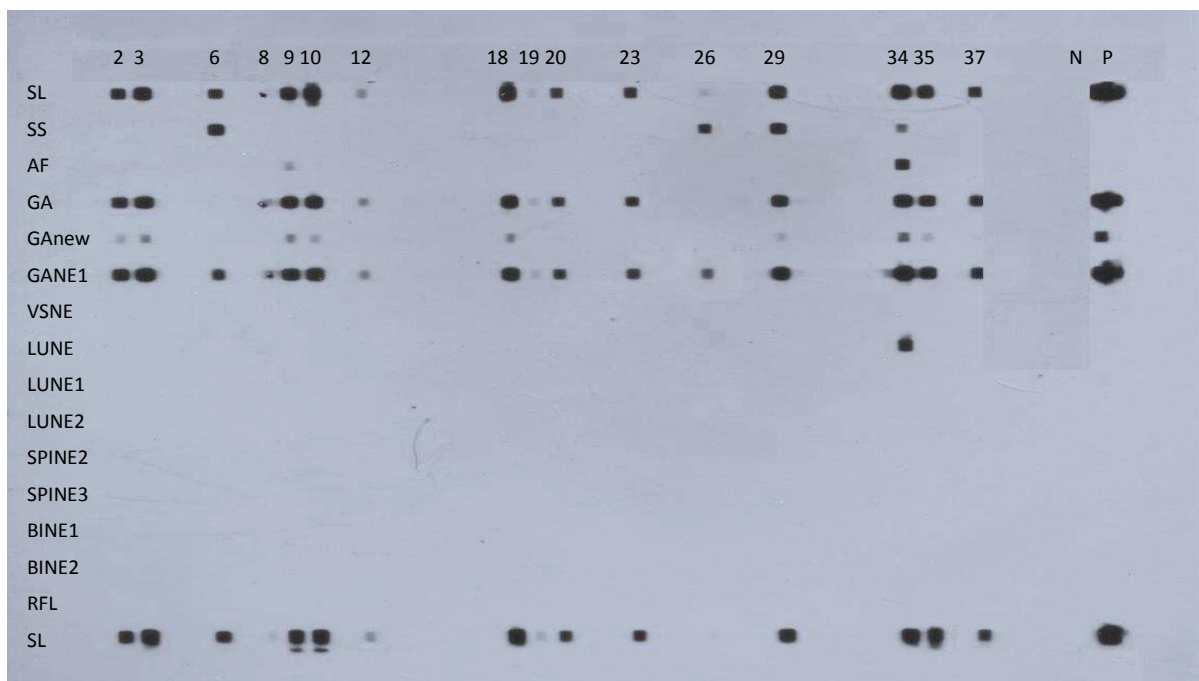




**Obr. 5** Zastoupení skupin druhů hostitelů na různých lokalitách

## 5.2 Molekulární identifikace *Borrelia burgdorferi* s.l. u klíšťat ze sběrů

Celkem bylo vyšetřeno 669 klíšťat na přítomnost DNA *Borrelia burgdorferi* s.l. (642 nymf a 27 dospělců), která pocházela z celkem 5 lokalit. Všechna klíšťata byla testována na spirochéty *B. burgdorferi* s.l. pomocí metody RLB (příklad výsledku je znázorněn na Obr. 6).



**Obr. 6** Příklad výsledku detekce *Borrelia burgdorferi* s.l. pomocí metody RLB

V rámci porovnání lokalit byly opět nalezeny průkazné rozdíly v prevalenci jak u všech klíšťat, tak i pouze u nymf (dospělci byly sbíráni pouze na lokalitě Stromovka) (Pearsonův  $\chi^2$  test;  $p < 0,01$ ). Prevalence borélií se pohybovala od 11 % na lokalitě Stromovka až po 27 % na lokalitě Netolice (Tab. X).

**Tab. X** Prevalence komplexu *B. burgdorferi* s.l. na jednotlivých lokalitách

Lokalita	Počet pozitivních nymf (z celkového počtu)	Prevalence borélií
Stromovka	14 (184)	11 %
Zavadilka	33 (158)	21 %
Blatná	27 (100)	27 %
Dačice	17 (100)	17 %
Netolice	23 (100)	23 %
<b>Celkem</b>	<b>114 (642)</b>	<b>18,4 %</b>

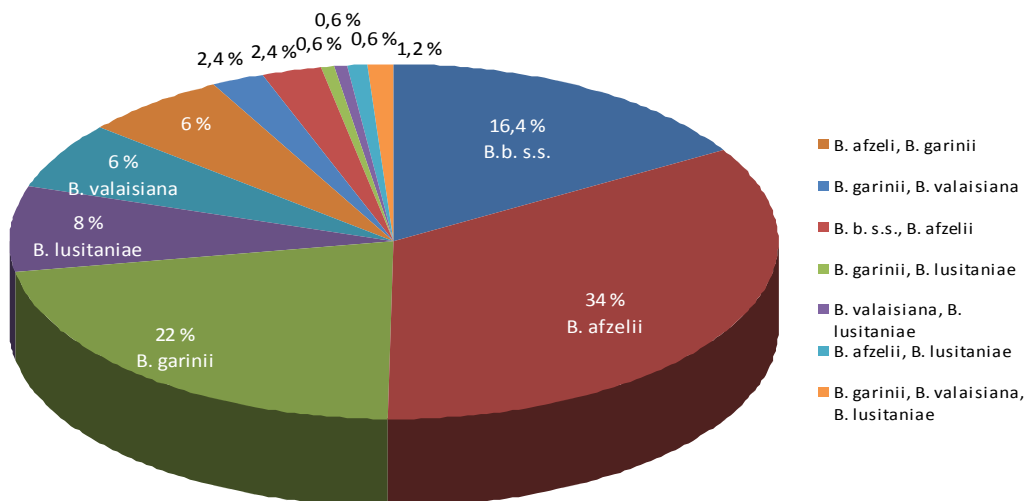
Celková prevalence *B. burgdorferi* dosáhla 18,4 % (123 pozitivních vzorků z 669). Prevalence u nymf (17,8 %) byla statisticky průkazně nižší než u dospělců (33,3 %) (Pearsonův  $\chi^2$  test;  $p < 0,01$ ) (viz. Tab. XI).

**Tab. XI Prevalence borélií v jednotlivých stádiích klíšťat**

Stadium	Počet vyšetřených	Počet pozitivních	Prevalence
Nymfy	642	114	17,8 %
Samice	12	3	25 %
Samci	15	6	40 %
Dospělci	27	9	33 %
<b>Celkem</b>	<b>669</b>	<b>123</b>	<b>18,4 %</b>

V průběhu sezóny 2009 i 2010 prevalence borelií mírně kolísala. Celková prevalence byla v roce 2009 statisticky průkazně nižší (11 %) než v roce 2010 (22 %) (Pearsonův  $\chi^2$  test;  $p < 0,01$ ). Nejvyšší prevalence *B. burgdorferi* s.l. byla zjištěna v dubnu 2010 (25,3 %) a nejnižší v dubnu 2009 (6 %) (popř. v květnu 2010, 0 %). Rozdíly v prevalenci v jednotlivých měsících nebyly statisticky průkazné (Pearsonův  $\chi^2$  test;  $p < 0,05$ ).

Metoda RLB umožnila identifikaci borélií na úrovni genospecií. Mezi pozitivními vzorky byly nejvíce zaznamenány infekce *B. afzelii* (n=56) a *B. garinii* (36), dále *B. burgdorferi* sensu stricto (27) a nejméně *B. lusitaniae* (13) a *B. valaisiana* (10). Byly také zaznamenány ko-infekce více druhů zároveň celkem ve 23 případech (19 %). Ko-infekce dvěma druhy se objevila v kombinacích *B. afzelii* a *B. garinii* (n=10), *B. garinii* a *B. valaisiana* (4), *B. burgdorferi* s.s. a *B. afzelii* (4), *B. garinii* a *B. lusitaniae* (1), *B. valaisiana* a *B. lusitaniae* (1), *B. afzelii* a *B. lusitaniae* (1). Ko-infekce třemi druhy byla zaznamenána pouze ve dvou případech a jednalo se o druhy *B. garinii*, *B. valaisiana* a *B. lusitaniae* (viz. Obr. 7).



**Obr. 7** Zastoupení genospecií mezi pozitivními vzorky

### 5.3 Vztah druhu hostitele a genospecií borélií

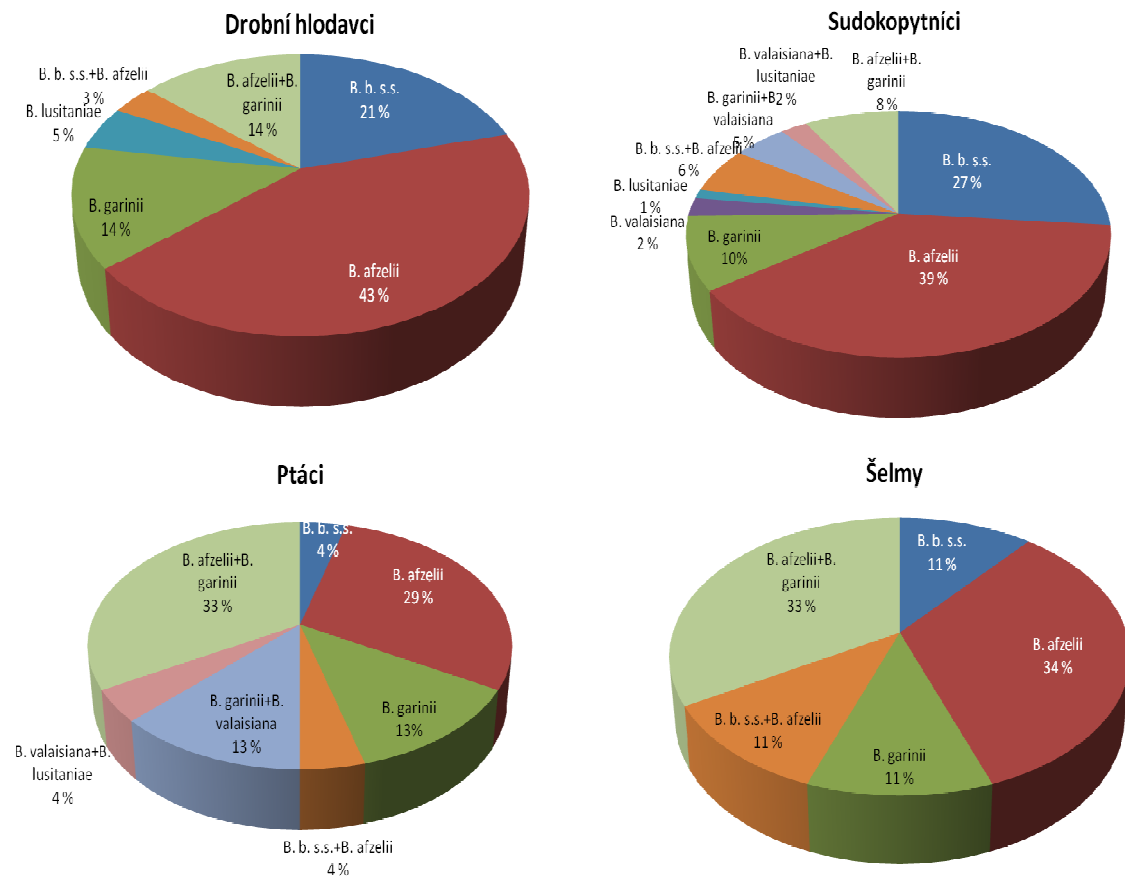
Vzhledem ke zmíněné hostitelské preferenci borélií byly dále analyzovány vztahy mezi druhem hostitele klíštěte a genospecií borélie, která byla u daného klíštěte identifikována. Pro analýzu byly vybrány pozitivní vzorky na DNA borélií, u kterých se současně podařilo identifikovat hostitele. Celkem bylo zahrnuto 174 vzorků včetně více-hostitelských (v tomto případě byli dané genospecii borélie přiřazeni oba hostitelé).

Mezi klíšťaty infikovanými boréliemi byly nejvíce zastoupenými hostiteli drobní hlodavci a sudokopytníci. *B. burgdorferi* s.s. se nejvíce vyskytovala ve spojení s druhem *Sus scrofa*, *B. afzelii* ve spojení s drobnými hlodavci a sudokopytníky. *B. garinii* byla nejvíce zastoupená ve spojení s drobnými hlodavci. Ko-infekce dvěma druhy borélií se vyskytovaly převážně ve spojení s druhem *S. scrofa* a ptáky (viz Tab. XII). Frekvence výskytu borélií u klíšťat sajících na různých skupinách druhů hostitelů se průkazně nelišila.

**Tab. XII Vztah hostitelé a genospecie borélií**

Druh hostitele	Počet vzorků	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i>	<i>B. valaisiana</i>	<i>B. lusitaniae</i>	Double
Drobní hlodavci	52 (30 %)	12 (33 %)	21 (31 %)	8 (40 %)	0	3 (75 %)	8 (18 %)
Sudokopytníci	30 (17 %)	3 (8 %)	20 (30 %)	1 (5 %)	1 (50 %)	0	5 (11 %)
Ptáci	20 (12 %)	1 (3 %)	7 (10 %)	2 (10 %)	0	0	10 (22 %)
<i>Apodemus flavicollis</i>	2 (1 %)	0	2 (3 %)	0	0	0	0
<i>Microtus agrestis</i>	2 (1 %)	0	0	0	0	0	2 (4 %)
<i>Sciurus vulgaris</i>	2 (1%)	0	2 (3 %)	0	0	0	0
<i>Vulpes vulpes</i>	9 (5 %)	1 (3 %)	3 (5 %)	1 (5 %)	0	0	4 (9 %)
<i>Capreolus capreolus</i>	2 (1 %)	0	2 (3 %)	0	0	0	0
<i>Sus scrofa</i>	51 (29 %)	19 (53 %)	10 (15 %)	7 (35 %)	1 (50 %)	1 (25 %)	13 (29 %)
<i>Garullus glandarius</i>	4 (2 %)	0	0	1 (5 %)	0	0	3 (7 %)
<b>Celkem</b>	<b>174</b>	<b>36 (21 %)</b>	<b>67 (39 %)</b>	<b>20 (11 %)</b>	<b>2 (1 %)</b>	<b>4 (2 %)</b>	<b>45 (26 %)</b>

Výskyt *B. burgdorferi* s.s. a *B. afzelii* byl statisticky průkazně vyšší v klíšťatech nasátých na hlodavcích (39/58; 67 %) než na ptácích (9/24; 38 %) (Pearsonův  $\chi^2$  test;  $p < 0,05$ ). Výskyt samotné *B. afzelii* v klíšťatech nasátých na hlodavcích (35/68; 51 %) byl průkazně vyšší než na ostatních skupinách druhů hostitelů (67/174; 39 %) (Fisherův exaktní test;  $p < 0,05$ ). Obdobně zastoupení *B. garinii* a *B. valaisiana* je statisticky průkazně vyšší v klíšťatech nasátých na ptácích (13 %) než na ostatních skupinách druhů hostitelů (6 %) (Pearsonův  $\chi^2$  test;  $p < 0,01$ ). Souhrnné výsledky jsou uvedeny na Obr. 8.



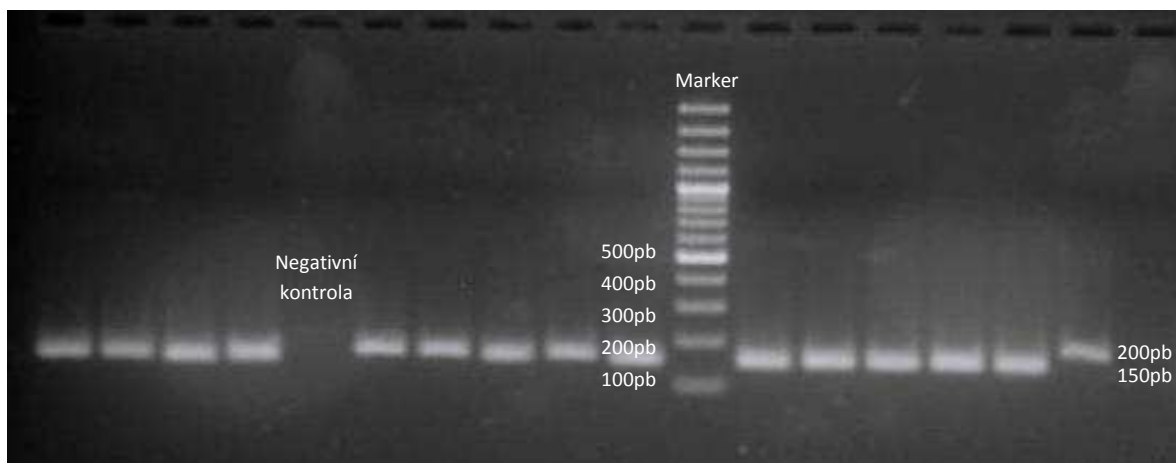
**Obr. 8** Zastoupení genospecií borélií v klíšťatech nasátých na různých skupinách druhů hostitelů

## 5.4 Molekulární identifikace patogenů z klíšťat z odchycených drobných savců

### 5.4.1 Charakteristika infestace drobných savců klíšťaty

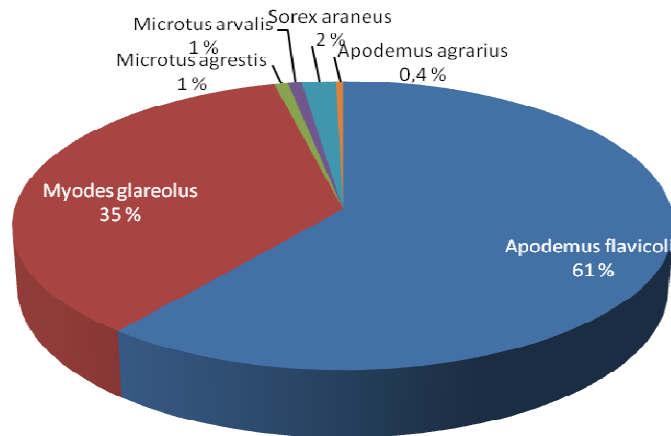
Celkově bylo na 8 lokalitách (Lužnice-Splavy, Lísek, Římov, Samoty, Stará řeka, Jindřichův Hradec, Hejtmanský rybník, Zavadilka) odchyceno 266 jedinců drobných savců (106 samic, 138 samců, 22 neurčených) z toho bylo klíšťaty infestovaných 92 (35 %) jedinců. Z 312 klíšťat bylo 271 (87 %) určeno jako *Ixodes ricinus* a 10 (3 %) jako *I. trianguliceps* a 31 (10 %) nebylo možné identifikovat (tyto vzorky byly vyřazeny z detekce patogenů pro podezření na degradaci DNA). Příklad identifikace druhu vektora pomocí PCR je uveden na Obr. 9. Převážnou většinu klíšťat tvořila larvální stadia 91 % (283/312), menšinový podíl zaujímaly nymfy 9 % (29/312). Mezi vzorky pocházejícími

z drobných hlodavců se neobjevil ani jediný dospělec. V případě larev bylo nasátých 46 % (130/283), zatímco u nymf bylo statisticky nasátých klíšťat 65 % (19/29) průkazně více (Pearsonův  $\chi^2$  test;  $p < 0,05$ ).



**Obr. 9** Příklad PCR pro detekci *I. ricinus* a *I. trianguliceps*

Z druhů hostitelů zastoupených v odchytech převažoval *Apodemus flavicollis* 61 % (162/266 jedinců), pohlaví bylo zastoupeno 60 (37 %) samicemi a 91 (56 %) samci (u 11 jedinců pohlaví neurčeno (6 %)). Druhým nejvíce zastoupeným druhem byl *Myodes glareolus* 36 % (95/266 jedinců), z toho 44 (46 %) samic a 44 (46 %) samců (u 7 jedinců pohlaví neurčeno (8 %)). Mezi další nalezené druhy hostitelů patří *Sorex araneus* (5 jedinců) *Microtus arvalis* (2), *M. agrestis* (2) a *A. agrarius* (1). Zastoupení druhů hostitelů je znázorněno na Obr. 10.



**Obr. 10** Zastoupení druhů mezi odchycenými drobnými hlodavci

V Tab. XIII je znázorněna prevalence výskytu klíšťat, střední abundance a intenzita parazitace na různých druzích hostitelů. Prevalence klíšťat byl statisticky průkazně vyšší na *A. flavicollis* (39 %) než na *M. glareolus* (25 %) (Pearsonův  $\chi^2$  test;  $p < 0,05$ ), obdobné výsledky byly získány pro střední abundanci (Mann-Whitney U test;  $p < 0,01$ ). Rozdíly v intenzitě parazitace byly neprůkazné (Mann-Whitney U test;  $p = 0,0565$ ).

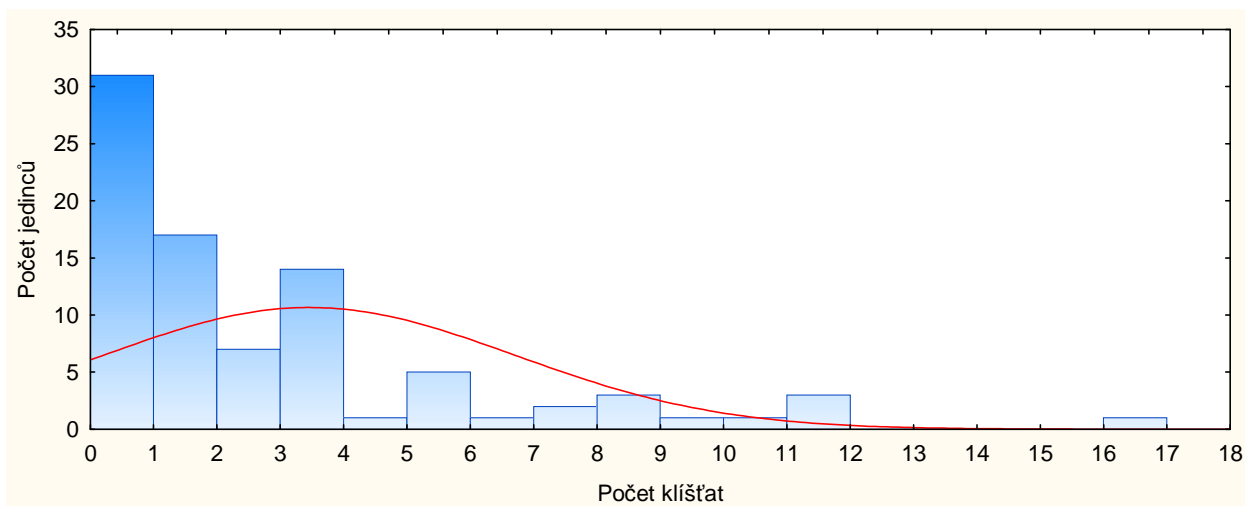
**Tab. XIII** Prevalence, střední abundance a intenzita parazitace podle druhů hostitelů

Druh hostitele	Počet jedinců	Prevalence klíšťat	Střední abundance (klíšťata/jedince)	Intenzita parazitace (klíšťata/jedince)
<i>Apodemus flavicollis</i>	162	39 %	1,4	3,7
<i>Myodes glareolus</i>	95	25 %	0,7	2,8
<i>Sorex araneus</i>	5	20 %	0,2	1
<i>Microtus agrestis</i>	2	100 %	2	2
<i>Microtus arvalis</i>	2	50 %	2,5	5
<i>Apodemus agrarius</i>	1	100 %	1	1
<b>Celkem</b>	<b>266</b>		<b>1,2</b>	<b>3,4</b>

Rozdíly v těchto parametrech mezi samicemi a samci nebyly statisticky průkazné.



Podle získaných údajů byly vypočítány indexy pro distribuci klíšťat na hostitelích. Agregoční index dosahoval 0,02 (<1=agregovaný výskyt); „Mean crowding“ 8,2 (>střední abundance=agregovaný výskyt) a „Patchiness“ 7 (>1=agregovaný výskyt). Všechny tyto indexy ukazují silnou agregovanost klíšťat na hostitelích stejně jako následující histogram intenzity parazitace hostitelů klíšťaty (Obr. 11).

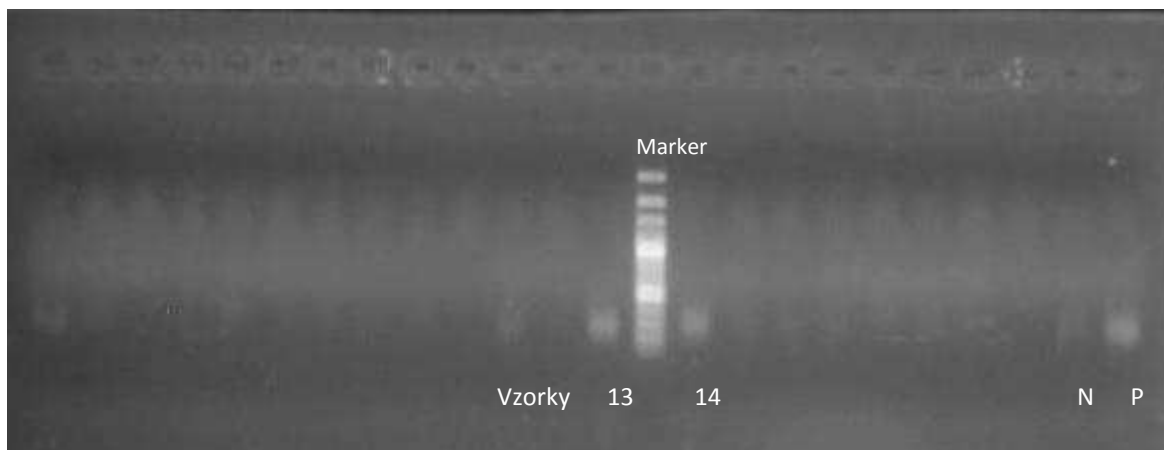


**Obr. 11** Histogram intenzity parazitace

Výsledky testu lineární korelace hmotnosti hostitelů a intenzity parazitace nebyly průkazné.

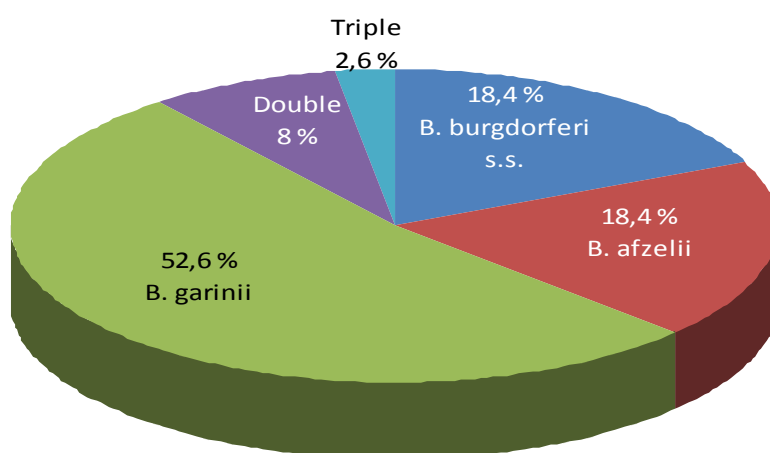
### 5.4.2 Detekce a identifikace patogenů

Prevalence viru klíšťové encefalitidy dosáhla 1,4 % (4/279). Příklad výsledku detekce viru klíšťové encefalitidy pomocí RT-PCR je na Obr.12. Všechna klíšťata nakažená VKE byla druhu *I. ricinus*.



**Obr. 12** Příklad výsledku RT-PCR viru klíšťové encefalitidy

Prevalence spirochét lymeské boreliózy celkově dosáhla 10,4 % (29/279). Zastoupení genospecií borélií je znázorněno na Obr. 13. Celkově převažovala *B. garinii* (20), dále *B. afzelii* (7) a *B. burgdorferi* s.s. (7) byly zastoupené stejnou měrou. Ve 3 vzorcích se vyskytly ko-infekce dvěma druhy (*B. afzelii*+*B.garinii* (2) a *B. burgdorferi* s.s.+*B.garinii* (1)). Ko-infekce třemi druhy se vyskytla pouze jednou (*B. afzelii*+*B. garinii*+*B. burgdorferi* s.s.). Nakažená klíšťata byla převážně druhu *I. ricinus*, jen dvě klíšťata infikovaná boréliemi byla druhu *I. trianguliceps* (*B. garinii*, *B. afzelii*). Rozdíly v prevalenci borélií mezi těmito dvěma druhy klíšťat, 10 % (27/269) pro *I. ricinus* a 20 % (2/10) pro *I. trianguliceps*, nebyly statisticky průkazné.



**Obr. 13** Zastoupení genospecií *Borelia burgdorferi* s.l.

Většina klíšťat z odchycených hostitelů byla nalezena v „co-feedingových“ uskupeních (74 %). Spirochéty LB byly nalezeny u klíšťat v „co-feedingu“ v 7 % a mimo něj v 16 %. Naopak virus klíšťové encefalitidy byl nalezen pouze v „co-feedingových“ uskupeních (1,7 %), jak je uvedeno v Tab. XIV. V „co-feedingu“, kde se nacházelo alespoň jedno nakažené klíště bylo průměrně 52 % klíšťat infikováno boréliemi.

**Tab. XIV Prevalence patogenů v „co-feedingových“ uskupeních**

	Počet klíšťat	Podíl z celkového počtu	Klíšťata nakažená LB	Klíšťata nakažená VKE
„Co-feeding“	206	74 %	7 %	1,7 %
Mimo „co-feeding“	73	26 %	16 %	0 %
<b>Celkem</b>	<b>279</b>		<b>10,4 %</b>	<b>1,4 %</b>

Klíšťata infikovaná virem byla nalezena ve všech 4 případech pouze na druhu *A. flavicollis*. Klíšťata infikovaná boréliemi byla z většiny nalezena také na druhu *A. flavicollis* (24/29), ale i na *Myodes glareolus* (3), *Microtus agrestis* (1) a *A. agrarius* (1). Zastoupení jednotlivých genospecií v závislosti na druhu hostitele je uvedeno v Tab. XV.

**Tab. XV Vztah hostitelé a genospecie borélií**

Druh hostitele	Počet infikovaných klíšťat	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i>	Double	Triple
<i>Apodemus flavicollis</i>	24 (83 %)	5	6	16	2	1
<i>Myodes glareolus</i>	3 (10 %)	1	1	2	1	0
<i>Microtus agrestis</i>	1 (3,5 %)	1	0	1	0	0
<i>Apodemus agrarius</i>	1 (3,5 %)	0	0	1	0	0
<b>Celkem</b>	<b>29</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>20</b>	<b>3</b>	<b>1</b>

## 6. Diskuze

Klíšťaty přenášené patogeny v přírodě cirkulují mezi vektory a kompetentními hostiteli. Trojúhelník přenosu: vektor-patogen-hostitel je provázán řadou vzájemných interakcí, které v konečném důsledku ovlivňují výskyt infekce v prostředí. V této práci bylo hlavním cílem studovat tyto vztahy, především druhovou diverzitu hostitelů klíšťat (vzorky ze sběrů), prevalenci patogenů v klíšťatech (virus klíšťové encefalitidy, spirochéty *Borrelia burgdorferi* sensu lato), hostitelskou preferenci genospecíí borélií a také stanovit základní charakteristiky parazitace klíšťaty u drobných hlodavců, kteří jsou považováni za nejvýznamnější hostitele obou výše zmíněných patogenů (Nuttall et al. 2000, Rauter a Hartung 2005, Siński et al. 2006, Hovius et al. 2007).

Ve vzorcích klíšťat získaných vlajkováním byl pomocí metody RLB určen hostitel. Úspěšnost identifikace dosahovala u nymf 65 % a u dospělců 89 %, což je vyšší než 44-49 % jak uvádí dosavadní studie, které používají stejný protokol (Humair et al. 2007, Morán Cadenas et al. 2007). V našem případě byl použit jiný protokol izolace DNA (Chelex 100 Resin) než v případě citovaných studií (alkalická lýza), takže rozdíl v citlivosti by mohl být způsoben vyšší efektivitou naší izolační metodiky.

V závislosti na lokalitě sběru byla úspěšnost identifikace nejvyšší u lesoparku Stromovka (77 %). Přibližně stejnou úspěšnost identifikace měly lokality Zavadilka, Dačice, Netolice (61-66 %) a nejmenší úspěšnost byla zaznamenána na lokalitě Blatná (56 %). Rozdíly v úspěšnosti identifikace hostitele i mezi velmi blízkými lokalitami byly pozorovány i ve studii Morán Cadenas et al. (2007). Rozdíly se zde vysvětlují různými teplotami na lokalitách, které mají mít vliv na rychlost trávení nasáté krve v klíšťatech. Estrada-Peña et al. (2005) připisují nižší efektivitu detekce hostitele stresu v důsledku neoptimální vzdušné vlhkosti. V Morán Cadenas et al. (2007) prokázali rozdíly v úspěšnosti identifikace v průběhu sezóny. Obecně vyšší úspěšnost byla zjištěna u klíšťat sbíraných na jaře a na podzim a nižší u klíšťat získaných z letních sběrů. V našem případě byla mezi vzorky získanými na lokalitě Stromovka zastoupena klíšťata sbíraná na jaře více než u ostatních lokalit, kde byla většina vzorků získána v létě. Rozdíly mezi lokalitami by tedy mohly být ovlivněny jak sezónou sběru, tak teplotními podmínkami. Úspěšnost identifikace ve vztahu k roku sběru byla průkazně vyšší v roce 2009 (77 %) než v roce 2010 (61 %). Rozdíly v úspěšnosti identifikace v roce 2009 a 2010 však připisujeme spíše rozdílům mezi lokalitami, protože všechny vzorky z roku 2009 pocházeli pouze z lokality Stromovka.

Mezi identifikovanými hostiteli klíštěte *I. ricinus* byli celkově zastoupeni s většinovým podílem sudokopytníci (44 %) (zejména *Sus scrofa*), drobní hlodavci (32 %) (*Microtus agrestis*, *Sciurus vulgaris*, *Rattus norvegicus* a *Apodemus flavicollis*). Druhy *R. norvegicus*, *E. europaeus* a *Garrulus glandarius* se vyskytovaly výhradně na lokalitě Stromovka, která byla v rámci sledovaných lokalit výjimečná svým urbánním charakterem.

Vzhledem k tomu, že většinu vzorků tvořila nenasátá klíšťata nymfálního stádia, která sála pouze ve stádiu larvy, je překvapující vysoké zastoupení přežvýkavců, coby zdroje potravy. Obdobné výsledky byly ovšem získány i v dalších studiích využívajících stejnou metodiku molekulární identifikace hostitele (Morán Cadenas et al. 2007, Humair et al. 2007), nebo ve studiích, které používaly jiné sekvence sond a primerů (Estrada-Peña et al. 2005). Jak vyplývá z přímého vyšetření hostitelů na infestaci klíšťaty, larvy *I. ricinus* se na velkých savcích vyskytují (Tälleklint a Jaenson 1997, Walker et al. 2001, Kiffner et al. 2010), ale jak významnou část celkové populace larev tyto druhy hostitele udržují je zřejmé až z výsledků molekulární identifikace. Populační denzita velkých savců je sice nižší než u drobných savců, ale významné rozdíly jsou i v intenzitě parazitace - zatímco hlodavci bývají infestováni maximálně stovkami klíšťat (1-450), velcí savci mohou nést až několik tisíc klíšťat (Tälleklint and Jaenson 1997). Vysoká intenzita infestace např. sudokopytníků (zejména dolních končetin) larvami a nymfami může být důsledkem vlivu klimatu na chování klíšťat. Nymfy, které se za příznivých podmínek (vlhkost a teplota) pohybují na vyšším podrostu, jsou v teplém a suchém klimatu nuceny vyhledávat hostitele na nižším podrostu (tedy společně s larvami) (Randolph a Storey 1999, Hart 2000, Shaw et al. 2003). Vysoká intenzita parazitace sudokopytníků je také dána tím, že mají větší povrch těla a tím dávají klíšťatům také větší možnost k přichycení a sání. Rozdíly v infestaci hlodavců a velkých savců mohou být dále ovlivněny výraznými sezónními fluktuacemi v populaci hlodavců. Celkově se tedy jednotlivé lokality mohou v závislosti na řadě biotických i abiotických podmínek významně lišit zastoupením jednotlivých skupin hostitelů.

V našem případě bylo překvapivě vysoké zastoupení druhu *S. scrofa* na všech lokalitách. Vzhledem k tomu, že vysoké zastoupení *S. scrofa* bylo zjištěno i pro oblast urbánního parku Stromovka, kde je výskyt tohoto druhu hostitele velmi nepravděpodobný, domníváme se, že šlo spíše o důsledek zkřížené hybridizace s jiným druhem sudokopytníka, jelikož detekce tohoto druhu byla téměř vždy současně se sudokopytníky. Informace o infestaci divokých prasat se v literatuře v rámci této práce nepodařilo nalézt.

U některých vzorků byl identifikován více než jeden hostitel (37 %). V porovnání s výsledky Morán Cadenas et al. (2007), byl v našem případě podíl vzorků s více hostiteli vyšší. Vzhledem k vysoké citlivosti metody, může být příčinou kontaminace mezi vzorky. Převážnou většinu zaujímal nymfální stadia (642), jen malý podíl dospělci (27) a larvy nebyly zastoupeny. Sbírána byla nenasátá klíšťata. U nymf tedy v době sběru proběhlo pouze jedno sání u dospělců sání 2. V případě dospělců je tedy možné vysvětlit detekci více hostitelů tím, že se podařilo detekovat zbytky DNA i z předchozího sání (u dospělců byl více než jeden hostitel identifikován statisticky průkazně častěji než u nymf). Přítomnost více druhů fragmentů hostitelské DNA u nymf je možné vysvětlit přerušáním sání a jeho dokončením na jiném hostiteli (Gray et al. 1999). Je známo, že se hostitelé sajících klíšťat mechanicky zbavují a je také známo, že klíšťata, která jsou od hostitele oddělena před dokončením sání, mohou sání dokončit na jiném hostiteli (Wang a Nuttall 2001, Wang et al. 1999).

Klíšťata získaná vlnkováním byla vyšetřena pomocí RLB na přítomnost DNA borélií a celková prevalence dosáhla 18,4 %. Vyšší počet sání u dospělců zvyšuje také pravděpodobnost přenosu infekce na klíšťata, proto byla prevalence u dospělců průkazně vyšší než u nymf (Ogden et al. 1998, Kiffner et al. 2011). V rámci lokalit byly nalezeny průkazné rozdíly v prevalenci jak u celkového počtu klíšťat, tak pouze u nymf (dospělci byli sbíráni pouze na lokalitě Stromovka). Toto zjištění lze vysvětlit tím, že lokality se od sebe liší biotopem i dostupností kompetentních hostitelů, mikroklimatem a dostupností potravy pro hostitele (Boyard et al. 2008).

Pomocí metody RLB bylo také identifikováno zastoupení jednotlivých genospecií borélií ve vlnkovaných klíšťatech. Nejpočetněji zastoupené jsou *B. afzelii* a *B. garinii* a méně *B. burgdorferi* s.s., *B. lusitaniae* a *B. valaisiana*. Toto rozdělení se shoduje s dosud publikovanými studiemi zastoupení genospecií borélií v Evropě (Rauter a Hartung 2005). U celkem 19 % nakažených klíšťat byla identifikována více než jedna genospecie borélií. Ko-infekce dvěma druhy byla nečastější *B. afzelii* a *B. garinii*, což odpovídá nejvyšší frekvenci výskytu těchto dvou genospecií obecně. Ko-infekce třemi druhy byla identifikována jen v několika vzorcích (*B. garinii*, *B. valaisiana* a *B. lusitaniae*). Tyto ko-infekce mohou být důsledkem sání klíšťat s různými patogeny v „co-feedingových“ uskupeních nebo sáním klíšťat na hostitelích nakažených více druhy borélií zároveň (Gern a Rais 1996). Také přerušené sání na jednom infikovaném hostiteli a dokončení sání na jiném

infikovaném hostiteli a transovariální přenos borélií (transovariálně nakažená larva se při sání může nakazit dalším druhem borélie) jsou možnými vysvětleními těchto záchytů (Wang a Nuttall 2001, Danielová et al. 2002b).

Různé druhy borélií mají různou hostitelskou preferenci (Kurtenbach et al. 2001, 2002) (způsobenou rozdíly v efektivitě reakcí komplementu různých hostitelů na různé druhy borélií), proto byly analyzovány vztahy mezi druhem hostitele nakaženého klíštěte a genospecií borélie. Nejvíce zastoupenými hostiteli nakažených klíšťat byly drobní hlodavci (30 %), sudokopytníci (17 %) a ptáci (12 %), to znamená, že tyto skupiny nejspíše obsahují nejvíce druhů hostitelů kompetentních pro přenos borélií. Gray et al. (1999) a Estrada-Peña et al. (2005) poukazují na nízké uplatnění hlodavců jakožto rezervoárů *B. burgdorferi* v Irsku a Španělsku. Ovšem na španělských lokalitách byla poměrně nízká i infestace hlodavců klíšťaty (larvami a nymfami) a v obou studiích byla nízká frekvence výskytu *B. afzelii* v klíšťatech obecně. Zdrojem borélií mají být v těchto lokalitách zejména ptáci. V našem případě byla *B. afzelii* naopak nejvíce zastoupená a odchycení hlodavci vykazovali vysokou míru infestace. Nejnižší prevalence borélií byla nalezena na lokalitě s nejvyšším podílem ptáků. Role hlodavců v cirkulaci borélií, je tedy spíše specifická pro daný geografický region nebo habitat. Vliv může mít i obecně se zvyšující výskyt *B. afzelii* v Evropě od západu k východu (Hubálek a Halouzka 1997, Rauter a Hartung 2005). Borélie byly nalezeny jak přímo v biopsiích drobných hlodavců (Khanakah et al. 2006, Siňsky et al. 2006), tak v klíšťatech z hlodavců odebraných (např. Siňsky et al. 2006).

Relativně vysoké zastoupení sudokopytníků ve vzorcích pozitivních na spirochéty LB je v rozporu s dosud uvedenými teoriemi o nízké kompetenci sudokopytníků k přenosu borélií (Gray et al. 1999, Walker et al. 2001, Hartemink et al. 2008, Vor et al. 2010, Kiffner et al. 2010). Je možné tedy předpokládat zvýšenou úspěšnost „co-feedingových“ přenosů u tohoto druhu hostitelů. Přenos borélií pomocí „co-feedingu“ byl popsán u ovcí (Ogden et al. 1997), i když je většina genospecií borélií k ovčímu komplementu citlivá (Kurtenbach et al. 2002, Bhide et al. 2005). Průkaz živých borélií v kůži jelenů sika (Kimura et al. 1995) i srnců (Pichon et al. 2000) tuto možnost dále podporují. Estrada-Peña et al. (2005) našli klíšťata infikovaná *B. afzelii* na druhu *S. scrofa* a tak je možné předpokládat, že by tento druh mohl být významným rezervoárem borélií. Dostupných informací na definitivní potvrzení této teorie zatím není dostatek.

Stejně jako v Morán Cadenas et al. (2007) *B. burgdorferi* s.s. a *B. afzelii* byly průkazně častěji nalezeny v klíšťatech nasátých na hlodavcích (67 %) než na ptácích (38 %). Samotná *B. afzelii* byla v klíšťatech nasátých na hlodavcích (51 %) průkazně častěji detekována než v klíšťatech nasátých na ostatních skupinách druhů hostitelů (39 %). Zastoupení *B. garinii* a *B. valaisiana* je statisticky průkazně vyšší v klíšťatech nasátých na ptácích (13 %) než na ostatních skupinách druhů hostitelů (6 %). Toto zjištění koresponduje s dosavadní předpokládanou hostitelskou preferencí genospecií borélií (shrnuté v Margos et al. 2009, Richter et al. 2011), ačkoliv není tak striktní jak vyplývalo z dřívějších studií. Ve spojení s drobnými hlodavci a druhem *S. scrofa* byly nejčastěji nalezeny *B. burgdorferi* s.s. a *B. garinii*. *B. afzelii* byla nejvíce nalezena u drobných hlodavců a sudokopytníků. Neobvyklý výskyt *B. garinii* u hlodavců lze objasnit přítomností Osp A sérotypu 4 = *B. bavariensis*, jejíž přítomnost se bohužel nepodařilo potvrdit (zřejmě kvůli degradaci DNA ve vzorcích). *B. garinii* byla nalezena také přímo ve vzorcích orgánů drobných hlodavců (zejména *A. flavicollis*) (Khanakah et al. 2006). V citované práci ovšem také nebylo zkoumáno zastoupení různých OspA sérotypů, respektive *B. bavariensis*. *B. lusitaniae* byla nejvíce nalezena u drobných hlodavců, kteří jsou spolu s ještěrkami pravděpodobně jejími kompetentními hostiteli (Le Fleche et al. 1997, Margos et al. 2009).

Drobní savci odchycení na několika lokalitách byli vyšetřeni na přítomnost klíšťat. Klíšťata byla z převážné většiny druhu *I. ricinus* a druh *I. trianguliceps* byl zastoupen spíše minoritně. Tyto výsledky souhlasí s biotopy míst odchytů, jelikož *I. trianguliceps* se spíše vyskytuje v chladnějších podhorských oblastech (Randolph 1975, Bown et al. 2003), je majoritní zastoupení *I. ricinus* předpokládané.

V zastoupení druhů odchycených hostitelů převažoval *Apodemus flavicollis* (61 %) a *Myodes glareolus* (36 %). Prevalence klíšťat byla průkazně vyšší u *A. flavicollis* (39 %) než u *M. glareolus* (25 %), podobné výsledky byly zjištěny pro střední abundanci. Tyto výsledky jsou v souladu s dříve prováděnými studiemi (Tälleklint a Jaenson 1997, Gray et al. 1999, Siński et al. 2006). Důvodem proč je *M. glareolus* méně infestován klíšťaty je nespíše jeho přirozená imunita proti těmto parazitům (Dizij a Kurtenbach 1995), druh *A. flavicollis* je také více aktivní a překonává i větší vzdálenosti při vyhledávání potravy než *M. glareolus*. Naopak ve studii Estrada-Peña et al. (2004) byla u *M. glareolus* nalezena vyšší prevalence klíšťat i vyšší střední intenzita parazitace.



Samci hlodavců jsou obecně více infestováni než samice (Täleklint a Jaenson 1997, Perkins et al. 2003), což lze vysvětlit jednak jejich vyšší aktivitou, dále pak celkově větší velikostí těla (Craine et al. 1995, Perkins et al. 2003) i imunologickými dopady testosteronu. V této práci nebyly nalezeny rozdíly v infestaci samic a samců (podobně Siňský et al. 2006 pro *M. glareolus*, Estrada-Peña et al. 2005), stejně jako nebyl potvrzen ani vztah hmotnosti k intenzitě parazitace. To by mohlo být důsledkem doby odchytu hlodavců, kdy samci i samice byli stejně aktivní a ze stejné kohorty v rámci níž se dosud neprojevíly výrazné rozdíly v infestaci podle pohlaví ani podle velikosti těla.

Distribuce klíšťat na hostitelích vykazovala vysokou agregovanost. V rámci hostitele bylo nejvíce klíšťat nalezeno, podobně jako u dalších studií, na hlavě jedinců obzvláště na uších. Agregace klíšťat na hostitelích je způsobena pravděpodobně snahou hostitelů o mechanické odstranění klíšťat z těla, a to vysvětluje velký počet nalezených „co-feedingových“ uskupení, jak bude uvedeno později (Taleklint a Jaenson 1997, Hart 2000, Shaw et al. 2003).

Celkově bylo vyšetřeno 279 klíšťat z odchycených drobných savců. Pozitivních na přítomnost *B. burgdorferi* s.l. bylo nalezeno 29 (10,4 %) a pozitivní na virus klíšťové encefalitidy byla 4 klíšťata (1,4 %), všechna druhu *Ixodes ricinus*. Prevalence borélií v larvách (nasátých) odpovídá prevalencím u nymf nenásátých hledajících hostitele (Rauter a Hartung 2005). Prevalence viru klíšťové encefalitidy odpovídá dosavadním studiím z vlajkovaných klíšťat v jižních Čechách (Danielová et al. 2002a) a studii Burri et al. (2011) u klíšťat sbíraných z odchycených hlodavců. Z genospecií borélií byla nejvíce zastoupena *B. garinii*, *B. afzelii* a pak *B. burgdorferi* s.s. Vysoké zastoupení *B. garinii* u klíšťat odebraných z hlodavců si vysvětlujeme přítomností Osp A serotypu 4 respektive *B. bavariensis*. *B. bavariensis* se ovšem nepodařilo, přes opakované pokusy o sekvenování, prokázat.

Infikovaná klíšťata byla druhu *Ixodes ricinus* jen ve dvou případech se jednalo o *I. trianguliceps*. *I. trianguliceps* zde pravděpodobně nehraje zásadní roli v cirkulaci borélií z důvodu nízkého zastoupení tohoto druhu na lokalitách (a tedy i velmi nízké pravděpodobnosti přenosu patogenů na člověka pomocí „bridging“ vektora). Také rozdíly mezi prevalencí těchto dvou druhů klíšťat nebyly statisticky průkazné. Borélie v *Ixodes trianguliceps* byly prokázány již dříve (Postic et al. 1997).

Klíšťata z odchycených hostitelů byla z většiny nalezena v „co-feedingových“ uskupeních (74 %). V obdobné studii Burri et al. (2011) bylo nalezeno jen 13,5-33 % klíšťat v „co-feedingových“ uskupeních, ačkoli prevalence klíšťat a intezita parazitace dosahovaly mnohem vyšších hodnot. V našem případě byla tedy klíšťata v rámci hostitelů extrémně agregovaná. Další možností je, že i přes pečlivou kontrolu každého odchyceného zvířete, nebyla objevena klíšťata, která se vyskytovala samostatně (v případě Burri et al. 2011 byla klíšťata ponechána dosát a opustit hostitele ve speciální kleci se sběrnou vodní nádržkou).

Virus klíšťové encefalitidy byl nalezen výhradně u klíšťat v „co-feedingových“ uskupeních. V každém „co-feedingu“ bylo ovšem nalezeno pouze jedno infikované klíště a celkem se jednalo o 4 vzorky. Můžeme říci, že infikovaná klíšťata se v „co-feedingových“ uskupeních vyskytují, k pravděpodobnosti přenosu na další klíšťata v uskupení se z dosavadních dat vyjadřovat nemůžeme. Pro stanovení míry uplatnění „co-feedingového“ přenosu by bylo potřeba získat mnohem více vzorků. Celková prevalence v „co-feedingu“ (1,7 %) výrazně nepřevyšuje prevalenci obvyklou u hladových nymf. Tento výsledek potvrzuje, že přenos viru má v těchto uskupeních větší efektivitu než mimo ně a tak dochází k přenosu viru i nevíremickou cestou (Burri et al. 2011).

Prevalence borélií v „co-feedingu“ byla 7 % a mimo něj 16 %. V případě borélií není přenos patogena v „co-feedingovém“ uskupení tak efektivní, jako v případě VKE, kde se virus v podkoží přenáší pomocí Langerhansových buněk, a jeho efektivita se rapidně snižuje se zvětšující se vzdáleností mezi klíšťaty (Richter et al. 2002). Nižší prevalence borélií v „co-feedingových“ uskupeních, spolu s průměrně 52 % infikovaných klíšťat v infikovaném „co-feedingu“ je vysvětlitelná snad jen menší tendencí klíšťat infikovaných boréliemi vytvářet „co-feedingová“ uskupení.

Na hlodavcích byla nalezena velká převaha larev (91 %) oproti nymfám (9 %). Podobné výsledky uvádí studie Gray et al. (1999). Současný výskyt larev a nymf na hostitelích bývá považován za jednu z podmínek podporujících cirkulaci patogenů v populaci klíšťat. Simultánní výskyt obou stádií může být způsoben rychlým nárůstem teplot na jaře majícím za následek simultánní start aktivity obou stádií (Labuda a Randolph 1999). V našem případě ovšem data ze začátku sezóny chybějí. Dalším faktorem (diskutovaným výše) může být snížená relativní vlhkost, která nutí nymfální stadia hledat hostitele v nižších úrovních vegetace společně s larvami (Randolph a Storey 1999). Velké

zastoupení nymf na hlodavcích je v některých studiích považováno za významné při přenosu patogenů na hlodavce. Larvy (nejsou-li nakažené transovariálně) na rozdíl od nymf mají nízkou pravděpodobnost, že přenesou patogena (Kurtenbach et al. 1998). V našem případě byl poměr mezi nymfami a larvami přibližně 1:10. V ohniscích klíšťové encefalitidy bývá pozorována i mnohem větší převaha larev nad nymfami (až 1:100) (Burri et al. 2011, Randolph a Storey 1999).

Při sledování vztahu patogena a hostitele klíšťat bylo zjištěno, že všechna klíšťata nakažená virem klíšťové encefalitidy byla nalezena pouze ve spojení s druhem *Apodemus flavicollis*. Klíšťata infikovaná boréliemi se nacházela z většiny také ve spojení s druhem *A. flavicollis* (83 %), méně pak s druhem *Myodes glareolus* (10 %). Z toho vyplývá, že *A. flavicollis* je kompetentním hostitelem pro oba patogeny (Burri et al. 2011). *M. glareolus* je díky své imunitě proti klíšťatům považován za méně kompetentní druh k přenosu VKE (Labuda et al. 1997), stejný mechanismus se nejspíše uplatňuje i v případě borélií. Zvířata s imunitou proti klíšťatům zabraňují přisátí a správnému nasátí klíšťat díky protilátkám v krvi a tak klíšťata sají neefektivně a jsou častěji usmrcena před dokončením sání nebo se na hostitele vůbec nepřisají. Tím se tedy snižuje pravděpodobnost přenosu patogenů (Tälleklint a Jaenson 1997).

## 7. Závěr

V této práci se podařilo potvrdit některé dosud publikované výsledky na vzorcích klíšťat z vlajkování a klíšťat odebraných z odchycených drobných savců. U vzorků z vlajkovaných klíšťat bylo dosaženo vyšší úspěšnosti identifikace hostitele pomocí metody RLB, než v předchozích studiích využívajících stejnou metodiku. Jednalo se o první použití metody molekulární detekce hostitele ve střední a východní Evropě. Byly také zjištěny rozdíly v úspěšnosti identifikace hostitele v závislosti na lokalitě sběru. Z výsledků vyplývá, že mezi nejčastější hostitele zkoumaných klíšťat patří drobní hlodavci a sudokopytníci. Ptáci se, coby hostitelé klíšťat významně uplatnili na lokalitě umístěné v lesoparku. Zastoupení hostitelů se lišilo zejména v případě lokality v městském lesoparku.

Klíšťata z vlajkování byla testována metodou RLB také na přítomnost DNA borélií. Prevalence borélií byla průkazně vyšší u dospělců než u nymf a rozdíly byly průkazné i mezi lokalitami. Zastoupení genospecií borélií bylo, obdobně jako v jiných studiích, s převahou *B. afzelii* a *B. garinii*. Vyskytovaly se zde také ko-infekce více druhů zároveň a to průkazně více u dospělců než u nymf. Při studování souvislostí mezi genospeciemi borélií a druhem hostitele byly potvrzeny asociace *Borelia burgdorferi* s.s. a *B. afzelii* s hlodavci a pak také *B. garinii* a *B. valaisiana* s ptáky.

Klíšťata (převážně *I. ricinus*) z odchycených drobných savců byla vysoce agregovaná na jedincích hostitelů. Na lokalitách odchytu byl prokázán výskyt *I. trianguliceps*. U obou druhů klíšťat se jednalo prakticky výhradně o larvální stadia. Odchycení jedinci hostitelů byli převážně druhu *A. flavicollis* a *M. glareolus*. Byla také potvrzena již publikovaná nižší infestace *M. glareolus*, díky jeho získané imunitě proti klíšťatům. Nepodařilo se potvrdit rozdíly v infestaci mezi samci a samicemi ani vztah hmotnosti jedinců hostitelů k intenzitě parazitace. Celková prevalence VKE i borélií v klíšťatech odebraných z hlodavců se neodchylovala od již publikovaných studií. Znovu byly pomocí metody RLB nejvíce identifikované genospecie *B. garinii* a *B. afzelii*. Při studování spojení mezi genospeciemi borélií a hostiteli byl neobvyklý výskyt *B. garinii*, v klíšťatech nasátých na hlodavcích. Tento výsledek si vysvětlujeme potenciálním (nepotvrzeným) výskytem OspA sérotypu 4 = *B. bavariensis*. Klíšťata infikovaná VKE byla nalezena pouze na druhu *A. flavicollis*, stejně tak jako většina klíšťat infikovaných boréliemi. DNA *Borrelia burgdorferi* s.l. byla prokázána i ve vzorcích *I. trianguliceps*.

Byly tedy prokázány rozdíly mezi hostiteli v kompetenci k přenosu patogenů, jejich infestaci různými stádii klíšťat a jejich asociace s různými druhy borélií. Vztahy vektor-patogen-hostitel spolu s vlivem prostředí významně ovlivňuje prevalenci patogenů v přírodních ohniscích a také riziko nákazy pro člověka.

## 8. Seznam použité literatury

**Achazi K., Nitsche A., Patel P., Radonić A., Mantke O. D., Niedrig M. 2011.** Detection and differentiation of tick-borne encephalitis virus subtypes by a reverse transcription quantitative real-time PCR and pyrosequencing. *J. Virol. Methods*. **171**:34-39.

**Alekseev A. N., Dubinina H. V., Van de Pol I., Schouls L. M. 2001.** Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia. *J. Clin. Mikrobiol.* **39**:2237–2242.

**Andreotti R., Pérez de León A. A., Dowd S.E., Guerrero F. D., Bendele K. G., Scoles G. A. 2011.** Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiol.* **11**:6.

**Baranton G., Postic D., Saint Girons I., Boerlin P., Piffaretti J. C., Assous M., Grimont P. A. 1992.** Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**:378-383.

**Barbour A. G., Hayes S. F. 1986.** Biology of *Borrelia* species. *Microbiol. Rev.* **50**:381-400.

**Bedford G. A. H. 1931.** *Nuttalliella namaqua*, a new genus and species of tick. *Parasitology.* **23**:230–232.

**Bhide M. R., Travnicek M., Levkutova M., Curlik J., Revajova V., Levkut M. 2005.** Sensitivity of *Borrelia* genospecies to serum complement from different animals and human: a host-pathogen relationship. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **43**:165-172.

**Birula A. 1895.** *Ixodidae novi vel parum cogniti Musei Zoologici Academiae caesareae Scientiarum Petropolitanae. Izv. Imper. Akad. Nauk.* **2**:353-364.

**Bown K. J., Begon M., Bennett M., Birtles R. J., Burthe S., Lambin X., Telfer S., Woldehiwet Z., Ogden N. H. 2006.** Sympatric *Ixodes trianguliceps* and *Ixodes ricinus* ticks feeding on field voles (*Microtus agrestis*): potential for increased risk of *Anaplasma phagocytophilum* in the United Kingdom?. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **6**:404-410.

**Bown K. J., Begon M., Bennett M., Woldehiwet Z., Ogden N. H. 2003.** Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophilum* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:63-70.

**Bown K. J., Lambin X., Telford G. R., Ogden N. H., Telfer S., Woldehiwet, Birtles R. J. 2008.** Relative importance of *Ixodes ricinus* and *Ixodes trianguliceps* as vectors for *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in field vole (*Microtus agrestis*) populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:7118-7125.

- Boyard C., Vourc'h G., Barnouin J. 2008.** The relationship between *Ixodes ricinus* and small mammal species at the woodland-pasture interface. *Exp. Appl. Acarol.* **44**:61-76.
- Brunner J. L., Ostfeld R. S. 2008.** Multiple causes of variable tick burdens on small-mammals hosts. *Ecology.* **89**:2259-2272.
- Buňková L., Švec P., Halouzka J., Rudolf I., Němec M. 2008.** Ribotyping and whole-cell protein analysis of spirochetes isolated from arthropods in the Czech Republic. *Ann. Agric Environ. Med.* **15**:225-230.
- Burri C., Bastic V., Maeder G., Patalas E., Gern L. 2011.** Microclimate and the zoonotic cycle of tick-borne encephalitis virus in Switzerland. *J. Med. Entomol.* **48**:615-27.
- Canica M. M., Nato F., du Merle L., Mazie J. C., Baranton G., Postic D. 1993.** Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand. J. Infect. Dis.* **25**:441-448.
- Carpi G., Cagnacci F., Neteler M., Rizzoli A. 2008.** Tick infestation on roe deer in relation to geographic and remotely sensed climatic variables in a tick-borne encephalitis endemic area. *Epidemiol. Infect.* **136**:1416-1424.
- Casjens S. 2000.** *Borrelia* genomes in the year 2000. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**:401-410.
- Casjens S. R., Fraser-Linnett C. M., Mongodin E. F., Qiu W.-G., Dunn J. J., Luft B. J., Schutzer S. E. 2011.** Whole genome sequence of an unusual *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate. *J. Bacteriol.* **193**:1489-1490.
- Casjens S. R., Mongodin E. F., Qiu W. G., Luft B. J., Schutzer S. E., Gilcrease E. B., Huang W. M., Vujanovic M., Aron J. K., Vargas L. C., Freeman S., Radune D., Weidman J. F., Dimitrov G. I., Khouri H. M., Sosa J. E., Halpin R. A., Dunn J. J., Fraser C. M. 2012.** Genome stability of Lyme disease spirochetes: comparative genomics of *Borrelia burgdorferi* plasmids. *PLoS One* **7**:e33280.
- Comstedt P., Gergström S., Olsen B., Garpmo U., Marjavaara L., Mejlom H., Barbour A. G., Bunikis J. 2006.** Migratory passerine birds as reservoirs of Lyme borreliosis in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:1087-1095.
- Cotton M. J., Watts C. H. S. 1967.** The ecology of the tick *Ixodes trianguliceps* (Arachnida; Acarina; Ixodoidea). *Parasitology.* **57**:525-531.
- Craine N. G., Nuttall P. A., Marriott A. C., Randolph S. E. 1997.** Role of grey squirrels and pheasants in the transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the Lyme disease spirochaete, in the U.K. *Folia Parasitol.* **44**:155-160.
- Craine N. G., Randolph S. E., Nuttall P. A. 1995.** Seasonal variation in the role of grey squirrels as hosts of *Ixodes ricinus*, the tick vector of the Lyme disease spirochaete, in a British woodland. *Folia Parasitol.* **42**:73-80.
- Danielová V., Holubová J. 1991.** Transovarial transmission rate of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks. In: **Dusbánek F., Bukva V. (eds.):** Modern acarology. *Academia, Prague and SPB Academic Publishing bv, The Hague.* **2**: 7-10.

- Danielová V., Holubová J., Daniel M. 2002a.** Tick-borne encephalitis virus prevalence in *Ixodes ricinus* ticks collected in high risk habitats of the south-Bohemian region of the Czech Republic. *Exp. Appl. Acarol.* **26**:145-151.
- Danielová V., Holubová J., Pejcoch M., Daniel M. 2002b.** Potential significance of transovarial transmission in the circulation of tick-borne encephalitis virus. *Folia Parasitol.* **49**:323-325.
- Delilhas N. 2009.** Intergenic regions of *Borrelia* plasmids contain phylogenetically conserved RNA secondary structure motifs. *BMC Genomics.* **10**:101.
- Dizij A., Kurtenbach K. 1995.** *Clethrionomys glareolus*, but not *Apodemus flavicollis*, acquires resistance to *Ixodes ricinus* L., the main European vector of *Borrelia burgdorferi*. *Parasite Immunol.* **17**:177-183.
- 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**:179-185.
- Elias A., Bono J. L., Tilly K., Rosa P. 1998.** Growth of infectious and non-infectious *B. Burgdorferi* at different salt concentrations. *Wien Klin Wochenschr.* **110**:863-865.
- Esch G. W., Gibbons J. W., Bourque J. E. 1975.** An analysis of the relationship between stress and parasitism. *Amer. Mid. Nat.* **93**:339-353.
- Estrada-Peña A., Martínez J. M., Sanchez Acedo C., Quilez J., Del Cacho E. 2004.** Phenology of the tick, *Ixodes ricinus*, in its southern distribution range (central Spain). *Med. Vet. Entomol.* **18**:387-397.
- Estrada-Peña A., Osácar J. J., Pichon B., Gray J. S. 2005.** Hosts and pathogen detection for immature stages of *Ixodes ricinus* (Acari:Ixodidae) in North-central Spain. *Exp. Appl. Acarol.* **37**:257-268.
- Fraser C. M., Casjens S., Huang W. M., Sutton G. G., Clayton R., Lathigra R., White O., Ketchum K. A., Dodson R., Hickey E. K., Gwinn M., Dougherty B., Tomb J.-F., Fleischmann R. D., Richardson D., Peterson J., Kerlavage A. R., Quackenbush J., Salzberg S., Hanson M., van Vugt R., Palmer N., Adams M. D., Gocayne J., Weidman J., Utterback T., Wathley L., McDonald L., Artiach P., Bowman C., Garland S., Fujii C., Cotton M. D., Horst K., Roberts K., Hatch B., Smith H. O., Venter J. C. 1997.** Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature.* **390**:580-686.
- Fukunaga M., Hamase A., Okada K., Inoue H., Tsuruta Y., Miyamoto K., Nakao M. 1996.** Characterization of spirochetes isolated from ticks (*Ixodes tanuki*, *Ixodes turdus*, and *Ixodes columnae*) and comparison of the sequences with those of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2338-2344.
- Garrity G. M., Bell J. A., Lilburn T. G. 2004.** Taxonomic outline of the prokaryotes release 5.0 Bergey's Manual<sup>©</sup> of systematic bacteriology second edition. *Bergey's manual trust.*

- Gern L., Douet V., López Z., Rais O., Morán Cadenas F. 2010.** Diversity of *Borrelia* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in a Lyme borreliosis endemic area in Switzerland identified by using new probes for reverse line blotting. *Ticks Tick Borne Dis.* **1**:23–29.
- Gern L., Estrada-Peña A., Frandsen F., Gray J. S., Jaenson T. G. T., Jongejan F., Kahl O., Korenberg E., Mehl R., Nuttall P. A. 1998.** European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zent. Bl. Bakteriolog.* **287**:196-204.
- Gern L. a Rais O. 1996.** Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* **33**:189-192.
- Gern L., Rouvinez E., Toutoungi L. N., Godfroid E. 1997.** Transmission cycles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato involving *Ixodes ricinus* and/or *I. hexagonus* ticks and the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*, in suburban and urban areas in Switzerland. *Folia Parasitol.* **44**:309-314.
- Gern L., Siegenthaler M., Hu C. M., Leuba-Garcia S., Humair P. F., Moret J. 1994** *Borrelia burgdorferi* in rodents (*Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus*): duration and enhancement of infectivity for *Ixodes ricinus* ticks. *Eur. J. Epidemiol.* **10**:75-80.
- Gil H., Barral M., Escudero R., García-Peréz A. L., Anda P. 2005.** Identification of a new *Borrelia* species among small mammals in area of northern Spain where Lyme disease is endemic. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:1336-1345.
- Gilbert M. A., Morton E. A., Bundle S. F., Samuels D. S. 2007.** Artificial regulation of ospC expression in *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* **63**:1259-1273.
- Gorelova N. B., Korenberg E. I., Kovalevski I. V., Postic D., Baranton G. 1996.** The isolation of *Borrelia* from the tick *Ixodes trianguliceps* (Ixodidae) and the possible significance of this species in the epizootiology of ixodid tick-borne borrelioses. *Parazitologija.* **30**:13-18.
- Gould E. A., Solomon T. 2008.** Pathogenic flaviviruses. *Lancet.* **371**:500-509.
- Grard G., Moureau G., Charrel R. N., Lemasson J.-J., Gonzales J.-P., Gallian P., Gritsun T. S., Holmes E. C., Gould E. A., de Lamballerie X. 2007.** Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: New insights into evolution pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology.* **361**:80-92.
- Gray J. S., Kirstein F., Robertson J. N., Stein J., Kahl O. 1999.** *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and rodents in a recreational park in south-western Ireland. *Exp. Appl. Acarol.* **23**:717-729.
- Gritsun T. S., Gould E. A. 2007.** Origin and evolution of flavivirus 5'UTRs and panhandles: trans-terminal duplications? *Virology.* **366**:8-15.
- Grešíková M., Kaluzová M. 1997.** Biology of tick-borne encephalitis virus. *Acta Virol.* **41**:115-124.
- Haglund M., Günther G. 2003.** Tick-borne encephalitis – pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine.* **21**:11-18.



- Haitham E., Gimenez G., Sokhna C., Bilcha K. D., Ali J., Barker S. C., Cutler S. J., Raoult D., Drancourt M. 2012.** Multispacer sequence typing relapsing fever borreliae in Africa. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**:e1652.
- Hanincová K., Taragelová V., Koci J., Schäfer S. M., Hails R., Ullmann A. J., Piesman J., Labuda M., Kurtenbach K. 2003.** Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2825-2830.
- Hart B. L. 2000.** Role of grooming in biological control of ticks. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **916**:565-569.
- Hartemink N. A., Randolph S. E., Davis S. A., Heesterbeek J. A. P. 2008.** The basic reproduction number for complex disease systems: Defining R0 for tick-borne infections. *Am. Nat.* **171**:743-754.
- Hayasaka D., Suzuki Y., Kariwa H., Ivanov L., Volkov V., Demenev V., Mizutani T., Gojobori T., Takashima I. 1999.** Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and far-Eastern Russia. *J. Gen. Virol.* **80**:3127-3135.
- Heinz F. X., Collett M. S., Purcell R. H., Gould E. A., Howard C. R., Houghton M., Moormann R. J. M., Rice C. M., Thiel H. J. 2000.** Family *Flaviviridae*. *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 859-878.
- Heroldová M., Němec M., Hubálek Z. 1998.** Growth parameters of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto at various temperatures. *Zentralbl. Bakteriol.* **288**:451-455.
- Holzmann H., Aberle S. W., Stiastry K., Werner P., Mischak A., Zainer B., Netzer M., Koppi S., Bechter E., Heinz F. X. 2009.** Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria. *Emerg. Infect. Dis.* **15**:1671-1673.
- Holzmann H., Vorobyova M. S., Ladyzhenskaya I. P., Ferenczi E., Kundi M., Kunz C., Heinz F. X. 1992.** Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: cross-protection between European and Far Eastern subtypes. *Vaccine.* **10**:345-349.
- Horak I. G., Camicas J.-L., Keirans J. E. 2002.** The *Argasidae*, *Ixodidae* and *Nuttalliellidae* (*Acari: Ixodida*): a world list of valid tick names. *Exp Appl Acarol.* **28**:27-54.
- Horká H., Černá-Kýčová K., Skallová A., Kopecký J. 2009.** Tick saliva affects both proliferation and distribution of *Borrelia burgdorferi* spirochetes in mouse organs and increases transmission of spirochetes to ticks. *Int. J. Med. Microbiol.* **299**:373-380.
- Hovius J. W., Schuijt T. J., de Groot K. A., Roelofs J. J., Oei G. A., Marquart J. A., de Beer R., van't Veer C., van der Poll T., Ramamoorthi N., Fikrig E., van Dam A. P. 2008.** Preferential protection of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by a Salp15 homologue in *Ixodes ricinus* saliva. *J. Infect. Dis.* **198**:1189-1197.
- Hovius J. W., van Dam A. P., Fikrig E. 2007.** Tick-host-pathogen interactions in *Lyme borreliosis*. *Trends Parasitol.* **23**:434-438.
- Hubálek Z., Halouzka J. 1997.** Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur. J. Epidemiol.* **13**:951-957.

- Hubálek Z., Halouzka J., Juřicová Z. 2003.** Host-seeking activity of ixodid ticks in relation to weather variables. *J. Vector. Ecol.* **28**:159-165.
- Hubálek Z., Halouzka J., Juřicová Z. 2004.** Borreliæ in *Ixodes ricinus* ticks feeding on humans. *Med. Vet. Entomol.* **18**:228-231.
- Humair P.-F., Douet V., Morán Cadenas F., Schouls L. M., Van de Pol I., Gern L. 2007.** Molecular identification of bloodmeal source in *Ixodes ricinus* ticks using 12S rDNA as a genetic marker. *J. Med. Entomol.* **44**:869-880.
- Humair P., Gern L. 2000.** The wild hidden face of Lyme borreliosis in Europe. *Microbes Infect.* **2**:915-922.
- Humair P. F., Gern L. 1998.** Relationship between *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. *Acta Trop.* **69**:213-227.
- Humair P. F., Postic D., Wallisch R., Gern L. 1998.** An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochates. *Zentralbl. Bacteriol.* **287**:521-538.
- Humair P. F., Rais O., Gern L. 1999.** Transmission of *Borrelia afzelii* from *Apodemus* mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission pattern and overwintering maintenance. *Parasitology.* **118**:33-42.
- Charon N. W., Goldstein S. F., Marko M., Hsieh C., Gebhardt L. L., Motaleb M. A., Wolgemuth C. W., Limberger R. J., Rowe N. 2009.** The flat-ribbon configuration of the periplasmic flagella of *Borrelia burgdorferi* and its relationship to motility and morphology. *J. Bacteriol.* **191**:600-607.
- Chu C. Y., Liu W., Jiang B. G., Wang D. M., Jiang W. J., Zhao Q. M., Zhang P. H., Wang Z. X., Tang G. P., Yang H., Cao W. C. 2008.** Novel *genospecies* of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks in southwestern China. *J. Clin. Microbiol.* **46**:3130-3133.
- James M.C., Fumess R. W., Bowman A. S., Forbes K. J., Gilbert L. 2011.** The importance of passerine birds as tick hosts and in the transmission of *Borrelia burgdorferi* the agent of Lyme disease: a case study from Scotland. *Ibis.* **153**:293-302.
- Johnson P. T. J., Preston D. L., Hoverman J. T., Henderson J. S., Paull S. H., Richgels K. L. D., Redmond M. D. 2012.** Species diversity reduces parasite infection through cross-generational effects on host abundance. *Ecology.* **93**:56-64.
- Kahl O., Gern L., Eisen L., Lane R. S. 2002.** Ecological research on *Borrelia burgdorferi* sensu lato: Terminology and some methodological pitfalls.: **Gray J. S., Kahl O., Lane R. S., Stanek G. (eds.)** Lyme boreliosis-Biology, epidemiology and kontrol. *CABI Publishing New York.* **2002.** ISBN 0 85199 632 9.
- Kawabata H., Masuzawa T., Yanagihara Y. 1993.** Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol. Immunol.* **37**:843-848.
- Kershenbaum A., Stone L., Ostfeld R. S., Blaustein L. 2012.** Modelling transmission of vector-borne pathogens shows complex dynamics when vector feeding sites are limited. *PLoS One.* **7**:e36730.

- Khanakah G., Kocianová E., Vyrosteková V., Řeháček J., Kundi M., Stanek G. 2006.** Seasonal variations in detecting *Borrelia burgdorferi* sensu lato in rodents from north eastern Austria. *Wiener Klin. Wochenschr.* **118**:754-758.
- Kiffner C., Lödige C., Alings M., Vor T., Rühle F. 2011.** Attachment site selection of ticks on roe deer, *Capreolus capreolus*. *Exp. Appl. Acarol.* **53**:79-94.
- Kiffner C., Lödige C., Alings M., Vor T., Rühle F. 2010.** Abundance estimation of *Ixodes* ticks (Acari:Ixodidae) on roe deer (*Capreolus capreolus*). *Exp. Appl. Acarol.* **52**:73-84.
- Kiffner C., Vor T., Hagedorn P., Niedrig M., Rühle F. 2011.** Factors affecting patterns of tick parasitism on forest rodents in tick-borne encephalitis risk areas, Germany. *Parasitol. Res.* **108**:323-335.
- Kimura K., Isogai E., Isogai H., Kamewaka Y., Nishikawa T., Ishii N., Fujii N. 1995.** Detection of Lyme disease spirochetes in the skin of naturally infected wild sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1641-1642.
- Kirstein F., Gray J. S. 1996.** A molecular marker for the identification of the zoonotic reservoirs of Lyme borreliosis by analysis of the bloodmeal in its European vector *Ixodes ricinus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4060-4065.
- Kitron U., Jones C. J., Bouseman J. K. 1991.** Spatial and temporal dispersion of immature *Ixodes dammini* on *Peromyscus leucopus* in northwestern Illinois. *J. Parasitol.* **77**:945-949.
- Konnai S., Yamada S., Imamura S., Nishikado H., Githaka N., Ito T., Takano A., Kawabata H., Murata S., Ohashi K. 2012.** Identification of TROSPA homologue in *Ixodes persulcatus* Schultze, the specific vector of human Lyme borreliosis in Japan. *Ticks Tick Borne Dis.* **3**:75-77.
- Kosik-Bogacka D., Kuźna-Grygiel W., Bukowska K. 2004.** The prevalence of spirochete *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks *Ixodes ricinus* and mosquitoes *Aedes* spp. within a selected recreational area in the city of Szczecin. *Ann. Agric. Environ. Med.* **11**:105-108.
- Krasnov B. R., Stanko M., Morand S. 2007.** Host community structure and infestation by ixodid ticks: repeatability, dilution effect and ecological specialization. *Oecologia.* **154**:185-194.
- Kurtenbach K., Kampen H., Dizij A., Arndt S., Seitz H. M., Schaible U. E., Simon M. M. 1995.** Infestation of rodents with larval *Ixodes ricinus* (Acari:Ixodidae) is an important factor in the transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* s.l. in German woodlands. *J. Med. Entomol.* **32**:807-817.
- Kurtebach K., De Michelis S., Sewell H-S., Etti S., Schäfer S. M., Hails R., Collares-Pereira M., Santos-Reis M., Hanincová K., Labuda M., Bormane A., Donaghy M. 2001.** Distinct combination of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies found in individual questing ticks from Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4926-4929.
- Kurtenbach K., De Michelis S., Etti S., Schäfer S. M., Sewell H. S., Brade V., Kraiczky P. 2002.** Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-the key role of host complement. *Trends Microbiol.* **10**:74-79.

- Kurtenbach K., Kampen H., Dizij A., Arndt S., Seitz H. M., Schaible U. E., Simon M. M. 1995.** Infestation of rodents with larval *Ixodes ricinus* (Acari:Ixodidae) is an important factor in the transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* s.l. in German woodlands. *J. Med. Entomol.* **32**:807-817.
- Kurtenbach K., Peacey M., Rijpkema S. G. T., Hoodless A. N., Nuttall P. A., Randolph S. E. 1998.** Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1169-1174.
- Labuda M., Austyn J. M., Zuffova E., Kožuch O., Fuchsberger N., Lysý J., Nuttall P. A. 1996.** Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology.* **219**: 357-66.
- Labuda M., Elecková E., Licková M., Sabó A. 2002.** Tick-borne encephalitis virus foci in Slovakia. *Int. J. Med. Microbiol.* **33**:43-47.
- Labuda M., Jones L. D., Williams T., Danielova V., Nuttall P. A. 1993a.** Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks. *J. Med. Entomol.* **30**:295-299.
- Labuda M., Kožuch O., Zuffová E., Elecková E., Hails R. S., Nuttall P. A. 1997.** Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology.* **235**: 138-43.
- Labuda M., Nuttall P. A., Kozuch O., Elecková E., Williams T. Zuffová E. Sabó A. 1993b.** Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature. *Experientia.* **49**:802-805.
- Labuda M., Randolph S. E. 1999.** Survival strategy of tick-borne encephalitis virus: cellular basis and environmental determinants. *Zentralbl Bakteriol.* **289**: 513-524.
- Lane R. S., Mun J., Eisen L., Eisen R. J. 2006.** Refractoriness of the western fence lizard (*Sceloporus occidentalis*) to the Lyme disease group spirochete *Borrelia bissettii*. *J. Parasitol.* **92**:691-696.
- Lane R. S., Mun J., Peribanez M. A., Fedorova N. 2010.** Differences in prevalence of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma* spp. infection among host-seeking *Dermacentor occidentalis*, *Ixodes pacificus*, and *Ornithodoros coriaceus* ticks in northwestern California. *Ticks Tick Borne Dis.* **1**:159-167.
- Lane R. S., Quistad G. B. 1998.** Borreliacidal factor in the blood of the western fence lizard (*Sceloporus occidentalis*). *J. Parasitol.* **84**:29-34.
- Le Fleche A., Postic D., Girardet K., Peter O., Baranton G. 1997.** Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:921-925.
- Lin T., Gao L., Edmondson D. G., Jacobs M. B., Philipp M. T., Norris S. J. 2009.** Central role of the Holliday junction helicase RuvAB in vlsE recombination and infectivity of *Borrelia burgdorferi*. *PLoS Pathog.* **5**:e1000679.
- Lindenbach B. D., Thiel J.-H., Rice Ch. M. Flaviviridae: The viruses and their replication, 5th edition. Eds. Lippincott-Raven Publishers Philadelphia. 2007. ISBN 0-78-176060-7.**

- Lindgren E., Jaenson T. G. T. 2006.** Lyme borreliosis in Europe: Influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. *World Health Organization*. ISBN 92-890-2291-4.
- Liu J., Lin T., Botkin D. J., McCrum E., Winkler H., Norris S. J. 2009.** Intact flagellar motor of *Borrelia burgdorferi* revealed by Cryo-electron tomography: evidence for stator ring curvature and rotor/C-ring assembly flexion. *J. Bacteriol.* **191**:5026-5036.
- Mackay I. M. 2004.** Real time PCR in the mikrobiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**:190-212.
- Mannelli A., Bertolotti L., Gern L., Gray J. 2011.** Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe: transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change. *FEMS Microbiol. Rev.* 1-25.
- Mans B. J., de Klerk D., Pienaar R., Latif A. A. 2011.** *Nuttalliella namaqua*: A living fossil and closest relative to the ancestral tick lineage: Implications for the evolution of blood-feeding in ticks. *PLoS ONE.* **6**:1-11.
- Marconi R. T., Liveris D., Schwartz I. 1995.** Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *Clin. Microbiol.* **33**:2427-2434.
- Margolis L., Esch G. W., Holmes J.C., Kuris A.M., Schad G.A. 1982.** The use of ecological terms in parasitology (report of an Ad Hoc Committee of the American Society of Parasitologists). *J. Parasitol.* **68**:131-133.
- Margos G., Hojgaard A., Lane R. S., Cornet M., Fingerle V., Rudenko N., Ogden N., Aanensen D. M., Fish D., Piesman J. 2010** Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissettii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. *Ticks Tick Borne Dis.* **1**:151-158.
- Margos G., Vollmer S. A., Cornet M., Garnier M., Fingerle V., Wilske B., Bormane A., Vitorino L., Collares-Pereira M., Drancourt M., Kurtenbach K. 2009.** A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:5410-5416.
- Maruskova M., Esteve-Gassent M. D., Sexton V. L., Seshu J. 2008.** Role of the BBA64 locus of *Borrelia burgdorferi* in early stages of infectivity in a murine model of Lyme disease. *Infect. Immun.* **76**:391-402.
- Masuzawa T., Takada N., Kudeken M., Fukui T., Yano Y., Ishiguro F., Kawamura Y., Imai Y., Ezaki T. 2001.** *Borrelia sinica* sp. nov., a lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1817-1824.
- Mejlon H.A., Jaenson T.G.T. 1997.** Questing behaviour of host-seeking *Ixodes ricinus* (Acarina: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* **21**: 747-754.
- Menardi G., Floris R., Mignozzi K., Boemo B., Altobelli A., Cinco M. 2008.** Detection and genotyping of *Borrelia burgdorferi* in the trans-border area between Italy and Slovenia

and evaluation of co-infection with *Anaplasma phagocytophilum* in ticks. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**:121-124.

**Michel H., Wilske B., Hettche G., Göttner G., Heimerl C., Reischl U., Schulte-Spechtel U., Fingerle V. 2003.** An ospA-polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism-based method for sensitive detection and reliable differentiation of all European *Borrelia burgdorferi* sensu lato species and OspA types. *Med. Microbiol. Immunol.* **193**:219–226.

**Morán-Cadenas F., Rais O., Humair P.-F., Douet V., Moret J., Gern L. 2007.** Identification of host bloodmeal source and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in field-collected *Ixodes ricinus* ticks in Chaumont (Switzerland). *J. Med. Entomol.* **44**:1109-1117.

**Neelakanta G., Li X., Pal U., Liu X., Beck D. S., DePonte K., Fish D. Kantor F. S. Fikrig E. 2007.** Outer surface protein B is critical for *Borrelia burgdorferi* adherence and survival within *Ixodes* ticks. *PLoS Pathog.* **3**:e33.

**Nefedova V. V., Korenberg E. I., Gorelova N. B., Kovalevskii Z. V. 2004.** Studies on the transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the taiga tick *Ixodes persulcatus*. *Folia Parasitol.* **51**:67-71.

**Nefedova V. V., Korenberg E. I., Fadeeva I. A., Gorelova N. B. 2005.** Genetic characteristics of human pathogenic *Borrelia* isolated from *Ixodes trianguliceps* Bir. and *Ixodes pavlovskyi* Pom. *Med Parazitol.* **2**:9-12.

**Nejedlá P., Norek A., Vostal K., Žáková A. 2009.** What is the percentage of pathogenic borreliae in spirochaetal findings of mosquito larvae. *Ann. Agric. Environ. Med.* **16**:273-276.

**Nosek J., Lichard M., Sztankay M. 1967.** The ecology of ticks in Tribeč and Hronský Inovec mountains. *Bull. Org. Mond. Santé. Bull. Wld. Hlth. Org.* **36**:49-59.

**Norris D. E., Johnson B. J., Piesman J., Maupin G. O., Clark J. L., Black W. C. 4th. 1997.** Culturing selects for specific genotypes of *Borrelia burgdorferi* in an enzootic cycle in Colorado. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2359-2364.

**Norte A.C., de Carvalho I. L., Ramos J. A., Goncalves M., Gern L., Nuncio M. S. 2012.** Diversity and seasonal patterns of ticks parasitizing wild birds in western Portugal. *Exp. Appl. Acarol.* DOI:10.1007/s10493-012-9583-4.

**Nuttall P. A. 1999.** Pathogen-tick-host interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE virus. *Zent. Bl. Bakteriol.* **289**:492-505.

**Nuttall P. A., Labuda M. 2004.** Tick-host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology.* **129**:177-189.

**Nuttall P. A., Paesen G. C., Lawrie C. H., Wang H. 2000.** Vector-host interactions in disease transmission. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**:381-386.

**Ogden N. H., Hailes R. S., Nuttall P. A. 1998.** Interstadial variation in the attachment sites of *Ixodes ricinus* ticks on sheep. *Exp. Appl. Acarol.* **22**:227-232.

**Ogden N. H., Nuttall P. A., Randolph S. E. 1997.** Natural Lyme disease cycles maintained via sheep by co-feeding ticks. *Parasitology.* **115**:591-599.

- Ogden N. H., Tsao J. I. 2009.** Biodiversity and Lyme disease: Dilution or Amplification? *Epidemics*. **1**:196-206.
- Oliver J. H. Jr. 1989.** Biology and systematics of ticks (*Acari:Ixodida*). *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **20**:397-430.
- Ostfeld R. S., Keesing F. 2000.** The function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases. *Can. J. Zool.* **78**:2061-2078.
- Ostfeld R. S., Miller M. C., Hazler K. R. 1996.** Causes and consequences of tick (*Ixodes scapularis*) burdens on white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *J. Mammal.* **77**:266-273.
- Parola P., Raoult D. 2001.** Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin. Infect. Dis.* **32**:897-928.
- Pal U., Li X., Montgomery R. R., Ramamoorthi N., Desilva A. M., Bao F., Yang X., Papaer M., Pradhan D., Kantor F. S., Telford S., Anderson J. F., Fikrig E. 2004.** TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell.* **12**:457-468.
- Paulauskas A., Radzijeuskaja J., Ambrasiene D., Rosef O. 2008.** Detection of tick-borne pathogens by molecular methods. *Biologija.* **54**:192-197.
- Perkins S. E., Cattadori I. M., Tagliapietra V., Rizzoli A. P., Hudson P. J. 2003.** Empirical evidence for key hosts in persistence of a tick-borne disease. *Int. J. Parasitol.* **33**:909-17.
- Pichon B., Egan D., Rogers M., Gray J. 2003.** Detection and identification of pathogens and host DNA in unfed host-seeking *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* **40**:723-731.
- Pichon B., Gilot B., Pérez-Eid C. 2000.** Detection of spirochaetes of *Borrelia burgdorferi* complexe in the skin of cervids by PCR and culture. *Eur. J. Epidemiol.* **16**:869-873.
- Pichon B., Rogers M., Egan D., Gray J. 2005.** Blood-meal analysis for the identification of reservoir hosts of tick-borne pathogens in Ireland. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **5**:172-180.
- Postic D., Garnier M., Baraton G. 2007.** Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates – Description of *B. californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. *Int. J. Med. Microbiol.* **297**:263-271.
- Postic D., Korenberg E., Gorelova N., Kovalevski Y. V., Bellenger E., Baranton G. 1997.** *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia and neighbouring countries: high incidence of mixed isolates. *Res. Microbiol.* **148**:691-702.
- Postic D., Ras N. M., Lane R. S., Henderson M., Baranton G. 1998.** Expanded diversity among Californian borrelia isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *J. Clin. Microbiol.* **36**:3497-3504.
- Poupon M.-A., Lommano E., Humair P.-F., Douet V., Rais O., Schaad M., Jenni L., Gern L. 2006.** Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *App. Environ. Microbiol.* **72**:976-979.

- Randolph S. E. 1975.** Seasonal dynamics of a host-parasite system: *Ixodes trianguliceps* (Acarina: Ixodidae) and its small mammal hosts. *J. Anim. Ecol.* **44**:425-449.
- Randolph S. E., Green R. M., Hoodless A. N., Peacey M. F. 2002.** An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. *Int. J. Parasitol.* **32**:979-989.
- Randolph S. E., Miklisova D., Lysy J., Rogers D. J., Labuda M. 1999.** Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate transmission of tick borne encephalitis virus. *Parasitology.* **118**:177-186.
- Randolph S. E., Storey K. 1999.** Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari:Ixodidae): implications for parasite transmission. *J. Med. Entomol.* **36**:741-748.
- Rauter C., Hartung T. 2005.** Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* Tick in Europe: a metaanalysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:7203-7216.
- Revel A. T., Talaat A. M., Norgard M. V. 2002.** DNA microarray analysis of differential gene expression in *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**:1562-1567.
- Richter D., Allgöwer R., Matuschka F.-R. 2002.** Co-feeding transmission and its contribution to the perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia afzelii*. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:1421-1425.
- Richter D., Matuschka F. R. 2010.** Elimination of lyme disease spirochaetes from ticks feeding on domestic ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:7650-7652.
- Richter D., Postic D., Sertour N., Livey I., Matuschka F. R., Baranton G. 2006.** Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:873-881.
- Richter D., Schlee D. B., Matuschka F.-R. 2011.** Reservoir Competence of Various Rodents for the Lyme Disease Spirochete *Borrelia spielmanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**:3565–3570.
- Rijpkema S. G. T., Molkenboer M. J. C. H., Schouls L. M., Jongejan F., Schellekens J. F. P. 1995.** Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* **33**:3091–3095.
- Rudenko N, Golovchenko M, Cihlářova V, Grubhoffer L. 2004.** Tick-borne encephalitis virus-specific RT-PCR-a rapid test for detection of the pathogen without viral RNA purification. *Acta Virol.* **48**:167-71.
- Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L., Oliver J. H. Jr. 2009a.** *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato complex from the southeastern region of the United States. *J. Clin. Microbiol.* **47**:134-141.



- Rudenko N., Golovchenko M., Lin T., Gao L., Grubhoffer L., Oliver J. H. Jr. 2009b.** Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Complex, *Borrelia americana* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* **47**:3875-3880.
- Rudenko N., Golovchenko M., Němec J., Volkaert J., Mallatova N., Grubhoffer L. 2005.** Improved method of detection and molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in clinical samples by polymerase chain reaction without DNA purification. *Folia microbiologica.* **50**:31-39.
- Rudenko N., Golovchenko M., Růžek D., Piskunova N., Mallátová N., Grubhoffer L. 2009c.** Molecular detection of *Borrelia bissetti* DNA in serum samples from patients in the Czech Republic with suspected borreliosis. *FEMS Microbiol. Lett.* **292**:274-281.
- Sal M. S., Li C., Motalab M. A., Shibata S., Aizawa S., Charon N. W. 2008.** *Borrelia burgdorferi* uniquely regulates its motility genes and has an intricate flagellar hook-basal body structure. *J. Bacteriol.* **190**:1912-1921.
- Scott M.C. Harmon J. R. Tsao J. I., Jones C. J., Hickling G. J. 2012.** Reverse line blot probe design and polymerase chain reaction optimization for bloodmeal analysis of ticks from the Eastern United States. *J. Med. Entomol.* **49**:697-709.
- Sedlák E.** Zoologie bezobratlých. *Masarykova Universita Brno.* **2005.** ISBN 80-210-2892-0.
- Shaw M. T., Keesing F., McGrail R., Ostfeld R. S. 2003.** Factors influencing the distribution of larval blacklegged ticks on rodent hosts. *AM. J. Trop. Med. Hyg.* **68**:447-452.
- Shi Y., Xu Q., Seemanapli S. V., McShan K., Liang F. T. 2008.** Common and unique contributions of decorin-binding proteins A and B to the overall virulence of *Borrelia burgdorferi*. *PLoS One.* **3**:e3340.
- Schmidt O., Dautel H., Newton J., Gray J. S. 2011.** Natural isotope signatures of host blood are replicated in moulted ticks. *Tick Tick Borne Dis.* **2**:225-227.
- Schwaiger M., Cassinotti, P. 2003.** Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J. Clin. Virol.* **27**:136-145.
- Schwaiger M., Peter O., Cassinotti P. 2001.** Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) infections using a real time PCR assay. *Clin. Microbiol. Inf.* **7**:461-469.
- Siński E., Pawełczyk A., Bajer A., Behnke J. M. 2006.** Abundance of wild rodents, ticks and environmental risk of Lyme borreliosis: A longitudinal study in an area of Mazury lakes district of Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* **13**:295–300.
- Smetanová K., Burri C., Pérez D., Gern L., Kocianová E. 2007.** Detection and identification of *Borrelia burgdorferi sensu lato* genospecies in tick from three different regions in Slovakia. *Wien Klin Wochenschr.* **119**:534-537.
- Sonenshine D. E.** Biology of ticks Volume 1. *Oxford university press New York.* **1991.** ISBN 0-19-505910-7.
- Stafford K. C. 1994.** Survival of immature *Ixodes scapularis* (Acari:Ixodidae) at different relative humidities. *J. Med. Entomol.* **31**:310-314.

- Stanek G., Reiter M. 2011.** The expanding Lyme Borrelia complex - clinical significance of genomic species? *Clin. Microbiol. Infect.* **17**:487-93.
- Stanko M., Krasnov B. R., Morand S. 2006.** Relationship between host abundance and parasite distribution: inferring regulating mechanisms from census data. *J. Anim. Ecol.* **75**:575-583.
- Steere A. C., Coburn J., Glickstein L. 2004.** The emergence of Lyme disease. *J. Clin. Invest.* **113**:1093-1101.
- Subak S. 2003.** Effects of climate on variability in Lyme disease incidence in the Northeastern United States. *Am. J. Epidemiol.* **157**:531-538.
- Süss J. 2011.** Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia - An overview. *Ticks Tick Borne Dis.* **2**:2-15.
- Swanson S. J., Neitzel D., Reed K. D., Belongia E. A. 2006.** Coinfections acquired from *Ixodes* ticks. *Clinical microbiology reviews* **19**:708.
- Šejdra J., Šmerhovský Z., Göpfertová D. 2005.** Výkladový slovník epidemiologické terminologie. *Grada Publishing. a.s. Praha.* ISBN 80-247-1068-4.
- Tälleklint L., Jaenson G. T. 1997.** Infestation of mammals by *Ixodes ricinus* ticks (Acari:Ixodidae) in south-central Sweden. *Exp. Appl. Acarol.* **21**:755-771.
- Tilly K., Rosa P. A., Stewart P. E. 2008.** Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **22**:217-234.
- Tsao J. I. 2009.** Reviewing molecular adaptations of Lyme borreliosis spirochetes in the context of reproductive fitness in natural transmission cycles. *Vet. Res.* **40**:1-42.
- van Burgel N. D., Kraiczy P., Schuijt T. J., Zipfel P. F., van Dam A. P. 2010.** Identification and functional characterisation of Complement Regulator Acquiring Surface Protein-1 of serum resistant *Borrelia garinii* OspA serotype 4. *BMC Microbiol.* **10**:43.
- Volf P., Votýpka J. 2007.** Parazitické členovci (lékařská entomologie). In: **Volf P., Horák P. (eds.).** Paraziti a jejich biologie. *TRITON.* ISBN 978-80-7387-008-9.
- Vor T., Kiffner C., Hagedorn P., Niedrig M., Rühle F. 2010.** Tick burden on European roe deer (*Capreolus capreolus*). *Exp. Appl. Acarol.* **51**:405-417.
- Waldenström J., Lundkvist A., Falk K. I., Garpmo U., Bergström S., Lindegren G., Sjöstedt A., Mejlom H., Fransson T., Haemig P. D., Olsen B. 2007.** Migrating Birds and Tickborne Encephalitis Virus. *Emerg. Infect. Dis.* **13**:1215-1218.
- Walker A. R. 2001.** Age structure of a population of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in relation to its seasonal questing. *Bull. Entomol. Res.* **91**:69-78.
- Walker A. R., Alberdi M. P., Urquhart K. A. 2001.** Risk factors in habitats of the tick *Ixodes ricinus* influencing human exposure to *Ehrlichia phagocytophila* bacteria. *Med. Vet. Entomol.* **15**:40-49.

- Walsh P. S., Metzger D. A., Higuchi R. 1991.** Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*. **10**:506-513.
- Wang G., van Dam A. P., Le Fleche A., Postic D., Peter O., Baranton G., de Boer R., Spanjaard L., Dankert J. 1997.** Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (Borrelia genomic groups VS116 and M19). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:926-932.
- Wang H., Hensbest P. J., Nuttall P. A. 1999.** Successful interrupted feeding of adult *Rhipicephalus appendiculatus* (Ixodidae) is accompanied by reprogramming of salivary gland protein expression. *Parasitology*. **119**:143-149.
- Wang G., Iyer R., Bittker S., Cooper D., Small J., Wormser G. P., Schwartz I. 2004.** Variations in Barbour-Stoenner-Kelly culture medium modulate infectivity and pathogenicity of *Borrelia burgdorferi* clinical isolates. *Infect. Immun.* **72**:6702-6706.
- Wang H., Nuttall P. A. 2001.** Intra-stadial tick-borne Thogoto virus (Orthomyxoviridae) transmission: accelerated arbovirus transmission triggered by host death. *Parasitology*. **122**:439-446.
- Zeidner N., Mbow M. L., Dolan M., Massung R., Baca E., Piesman J. 1997.** Effects of *Ixodes scapularis* and *Borrelia burgdorferi* on modulation of the host immune response: induction of a TH2 cytokine response in Lyme disease-susceptible (C3H/HeJ) mice but not in disease-resistant (BALB/c) mice. *Infect. Immun.* **65**:3100-3106.