

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Biologická fakulta

Katedra obecné biologie



Vliv extraktů ze slinných žláz (SGE) a slin klíštěte  
*Ixodes ricinus* na replikaci viru klíšťové encefalitidy  
v podmínkách *in vitro*

Bakalářská práce

Hana Šťastná

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

Školitel specialista: Mgr. Daniel Růžek

České Budějovice, květen 2007

Šťastná H., 2007: Vliv extraktů ze slinných žláz (SGE) a slin klíštěte *Ixodes ricinus* na replikaci viru klíšťové encefalitidy v podmínkách *in vitro* [The influence of salivary gland extracts (SGE) and saliva of the tick *Ixodes ricinus* on the replication of tick-borne encephalitis virus under *in vitro* conditions, Bc. Thesis, in Czech]

Annotation:

We examined the influence of saliva and SGE from *Ixodes ricinus* tick, the main European TBEV vector, on the replication of TBEV under *in vitro* conditions in various mammalian cell lines (fibroblasts, macrophages, porcine kidney). In addition, the effect of tick saliva on the production of IFN  $\beta$  by fibroblast cells was studied.

Tato práce byla financována granty:

524/05/0811 Grantová agentura České republiky (GAČR)

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 6. května 2007

.....  
Hana Šťastná

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat mému školiteli doc. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za poskytování cenných rad a všestrannou podporu a zázemí. Velký dík patří mému školiteli-specialistovi Mgr. Danielu Růžkovi za přátelské vedení mé práce, za trpělivé konzultace k předkládané práci a za podhalení tajů virologie. Mé díky patří také příjemným kolektivům Laboratoře Imunologie Parazitóz a Laboratoře molekulární biologie vektorů a patogenů za to, že si vždy našli chvíli mi v něčem poradit nebo pomoci. Děkuji všem blízkým, zvláště rodičům a příteli, kteří mi vytvořili studijní zázemí a po všech směrech mě podporovali.

# OBSAH

|  |    |
|--|----|
| 1. Úvod.....   | 1  |
| <b><u>1.1. VIRUS KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY</u></b> .....                                   | 1  |
| Arboviry.....  | 1  |
| Virus klíšťové encefalitidy (VKE).....   | 2  |
| Klíště obecné ( <i>Ixodes ricinus</i> ).....   | 5  |
| Účinky klíštěcích slin.....  | 7  |
| Interferon (IFN).....  | 9  |
| <b><u>1.2. VIRUS MYŠÍ ENCEFALOMYOKARDITIDY (EMCV)</u></b> .....                        | 10 |
| 2. Cíle práce.....   | 12 |
| 3. Materiál a metody.....  | 13 |
| 3.1. Viry.....   | 13 |
| 3.2. Buněčné linie.....  | 13 |
| 3.3. Plaková titrace.....  | 14 |
| 3.4. Příprava extraktu ze slinných žláz.....   | 14 |
| 3.5. Odběr klíštěcích slin.....  | 15 |
| 3.6. Dynamika replikace viru <i>in vitro</i> .....                                     | 15 |
| 3.7. Vliv SGE a slin klíštěte <i>Ixodes ricinus</i> na replikaci studovaných virů..... | 16 |
| 3.8. ELISA na detekci myšího IFN $\beta$ .....   | 17 |
| 3.9. Stimulace produkce IFN $\beta$ v buňkách L929.....                                | 18 |
| 3.10. Vliv slin na produkci IFN $\beta$ v buněčné linii L929.....                      | 18 |
| 3.11. Vyhodnocování výsledků.....  | 19 |
| 4. Výsledky.....   | 20 |
| 4.1. Dynamika replikace viru <i>in vitro</i> .....                                     | 20 |
| 4.2. Vliv SGE a slin <i>Ixodes ricinus</i> na replikaci studovaných virů.....          | 21 |
| 4.3. Stimulace produkce IFN $\beta$ v L929.....  | 26 |
| 4.4. Vliv slin na produkci IFN $\beta$ .....   | 27 |
| 5. Diskuse.....  | 29 |
| 6. Souhrn.....   | 32 |
| 7. Literatura.....   | 33 |

# 1. Úvod

## 1.1. VIRUS KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY

### Arboviry

Virové choroby přenášené krevsajícími členovci se řadí mezi nejdůležitější nově se objevující onemocnění (angl. emerging diseases) na pokraji třetího tisíciletí. Tím, co tyto viry spojuje, je již zmíněný způsob přenosu, od něhož je také odvozen název této skupiny; z anglického **arthropod-borne viruses** - arboviry. Mezi arboviry nacházíme zástupce z celkem sedmi čeledí: *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Flaviviridae*, *Rhabdoviridae*, *Togaviridae*, *Orthomyxoviridae* a *Poxviridae* (International Catalogue of Arboviruses). Na seznamu katalogu arbovirů je více než 530 virů a přibližně 130 z nich způsobuje onemocnění u člověka (Gubler, 2001). Jde o skupinu virů ryze ekologicky vymezenou bez genetické či morfologické příbuznosti. Spektrum členovců, kteří je mohou přenášet, je široké. Jmenujme například komáry, muchničky, blechy, krevsající mouchy a klíšťata. A právě na klíšťata, jakožto virové vektory, se soustředím ve své práci.

Virový patogen vstupuje do světa obratlovčího hostitele a klíštěčího vektora a stává se součástí jejich vzájemných vztahů. Klíště se v přírodním ohnisku nakazí buď tak, že saje na hostiteli společně (angl. cofeeding) s jinými, infikovanými, klíšťaty (Jones a spol., 1987, Labuda a spol., 1993b,c) a nebo se virus do jeho těla dostane společně s viremickou krví nakaženého obratlovce. V takto nakažených jedincích se virus pomnoží a zůstává v jejich těle do konce života. Dalším způsobem dlouhodobého udržení viru v koloběhu je transstadiální a transvariální přenos. Saje-li již infikovaný členovec na neinfikovaném obratlovci, virus se dostane do těla obratlovce společně se slinami vylučovanými do rány. Člověk není stálým článkem tohoto koloběhu, k jeho infekci dochází většinou náhodně. U lidí probíhá infekce většinou bezpříznakově (Luňáčková a spol., 2003). Pokud se onemocnění projeví, arboviry vyvolávají celou škálu příznaků, avšak základní typy průběhu jsou tři: horečnatá onemocnění, encefalitidy nebo hemoragické horečky (Grešíková a Nosek, 1981).

Evropské klíšťaty přenášené (angl. tick-borne) arboviry patogenní pro člověka se řadí do šesti čeledí (kromě *Poxviridae*), osmi rodů a bylo popsáno pětatřicet druhů, přičemž k nejhojněji zastoupeným patří čeledi *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* a *Reoviridae* s rody *Flavivirus*, *Nairovirus* a *Orbivirus* (Süss a Schader, 2004).

Na území České republiky a Slovenska byly izolovány viry z čeledi *Togaviridae* - virus Sindbis (převážně komáry přenášený – k.p.) (Hubálek Z., Halouzka J., 1996), *Flaviviridae* - virus západního Nilu (k.p) (Hubálek a spol., 1998, Hubálek a Halouzka, 1999) a virus klíšťové encefalitidy (Rampas a Gallia, 1949), čeleď *Reoviridae* - viry Tribeč, Lipovník a Eyach (Süss a Schader, 2004) a z čeledi *Bunyaviridae* viry Ťahyňa (Bárdos a Danielová, 1959, Danielová, 1990), Čalovo (Bárdos a Cupková, 1962, Hubálek a spol., 1993) a Uukuniemi (Grešíková, Nosek, 1981). Největší zdravotní hrozbu pro člověka ovšem představuje virus klíšťové encefalitidy.

## **Virus klíšťové encefalitidy (VKE)**

Virus klíšťové encefalitidy (VKE) (rod *Flavivirus*, čeleď *Flaviviridae*) je původcem závažného onemocnění centrálního nervového systému – klíšťové encefalitidy (KE). Celosvětově je onemocnění zaznamenáváno každým rokem přibližně v 10 000-12 000 případech (Süss, 2003). V České republice počty kolísají mezi 400-700 diagnostikovanými onemocněními ročně, přičemž rok 2006 byl extrémní svými 1027 případy (EpiDat - databáze Státního zdravotního ústavu v Praze, <http://www.szu.cz/cem/epidat/>).

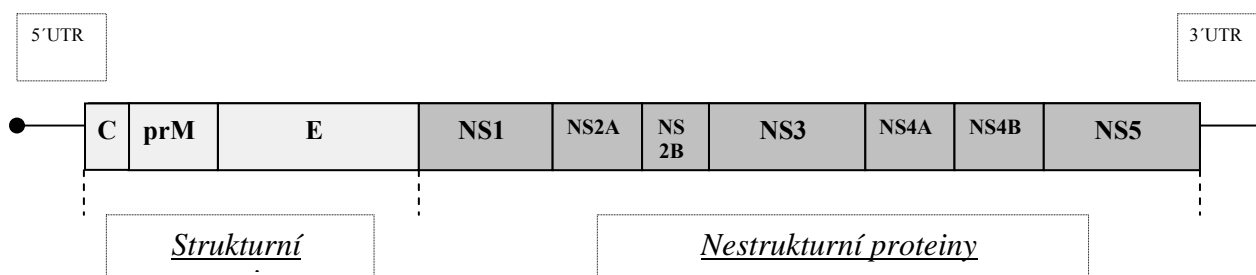
Virová částice se skládá z nukleokapsidy a vnější lipidové dvouvrstvy, ve které jsou začleněny dva virové proteiny – glykoprotein E (envelope) a protein M (membrane). Kapsida je tvořena proteinem C (capsid) a obklopuje virovou RNA. Ribonukleová kyselina VKE je pozitivní polarity a její velikost dosahuje 11 kb (schéma genomu viz Obr.1.1). Jediný čtecí rámec ORF (z angl. open reading frame) kóduje asi 3400 aminokyselin a je na obou stranách ohraničen nekódujícími oblastmi, takzvanými 3' a 5' UTR (untranslated regions). ORF je translatován na jediný polyprotein, který následně štěpí buněčné a virové proteázy na 10 proteinů, jejichž výčet a funkce jsou shrnuty v tabulce č.1.1.

Virus se dostává do těla hostitele v průběhu sání klíštěte, v našich podmínkách nejčastěji klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*), spolu se slinami vylučovanými do rány. O vzájemných interakcích jednotlivých účastníků tohoto procesu, hostitele, vektora a patogena, bude pojednáno níže. Virus se v místě vstupu do těla pomnoží a poté je zanesen buňkami imunitního systému (tento problém není ještě objasněn, nejpravděpodobněji specializovanými dendritickými buňkami - Langerhansovými buňkami kůže (Labuda a spol., 1996)) do spádových lymfatických uzlin. Z nich se po další replikaci virus dostává lymfatickou cestou do krve a dochází k infekci různých extraneurálních tkání a orgánů hostitelského organismu.

Tato primární viremická fáze je spojena s propuknutím prvních příznaků a to asi po 7-14 dnech inkubace. Příznaky první fáze onemocnění se v zásadě podobají symptomům

**Tab. 1.1** Proteiny VKE (Gritsun a spol., 2003) , ? = funkce není zcela jasná

|                 | PROTEIN | FUNKCE   |
|-----------------|---------|--|
| STRU-<br>KTURNÍ | E       | dimer, interakce s receptorem, hlavní antigen                            |
|                 | M       | začleněn do membrány   |
|                 | C       | kapsida  |
| NESTRUKTURNÍ    | NS1     | jako hexamer asociován s membránami, indukuje protektivní imunitu        |
|                 | NS2A    | ? asociován s membránami   |
|                 | NS2B    | v komplexu s NS3 serinová proteáza                                       |
|                 | NS3     | helikáza v komplexu s NS5, s NSB2B serinová proteáza                     |
|                 | NS4A    | ? orientace polyproteinu (tím pomoc proteázám a polymerázovému komplexu) |
|                 | NS4B    | ? orientace polyproteinu (tím pomoc proteázám a polymerázovému komplexu) |
|                 | NS5     | RNA dependentní RNA polymeráza   |



**Obr. 1.1** Schéma genomu čeledi *Flaviviridae*, upraveno dle Leysen (2000).

chřipkovým - horečka, vyčerpanost, bolesti hlavy, svalů a kloubů, vše trvající asi 1-5 dní. Pak přichází celkové zlepšení. Poté nastává sekundární virémie, virus je detekovatelný v krvi a překonává prozatím neznámým způsobem hematoencefalickou bariéru. V druhé fázi onemocnění virus vstupuje do mozku. To s sebou přináší charakteristické neurologické příznaky - silné bolesti hlavy, nevolnost, zvracení, světloplachost, parézy a obrny nervů. Neurologický průběh KE má několik forem: horečnatou, meningeální, meningoencefalitickou, poliomyelitickou, polyradikuloneurickou a chronickou (Gritsun a spol., 2003). Je známo, že vysoké procento případů infekce (70-98%) probíhá bezpříznakově či v tak mírné formě, že není diagnostikováno (Dumpis a spol., 1999). Prozatím na onemocnění KE neexistuje žádný účinný lék, nemocný je léčen symptomaticky, jsou mu podávány doplňky stravy a musí

zachovávat přísný klid na lůžku. Prevence je prozatím klíčem k úspěchu v boji s touto nemocí neboť inaktivovaná vakcína je spolehlivý nástroj jak zabránit propuknutí choroby (Barret a spol., 1999). Pomocí komplexního očkování obyvatelstva se kupříkladu podařilo výrazně snížit četnost případů KE v sousedním Rakousku (Süss, 2003).

V historii byly zaznamenány i případy perorální infekce a to požitím nepasterovaného mléka či mléčných výrobků (převážně kozích a ovčích). Bylo to například roku 1951 v Rožňavě kdy propukla klíšťová encefalitida s poněkud mírnějším průběhem, tzv. biphasic milk fever, u 600 lidí (Blaškovič, 1954, Grešíková a Kaluzová, 1997). Příklad z aktuálnější doby se odehrál v roce 1999 na Vsetínsku, kdy se 22 lidí nakazilo konzumací ovčího sýra (Daneš, 2000).

VKE je přizpůsoben pro vstup a přežití jak v buňkách bezobratlého klíštěte tak také v buňkách obratlovců. Pokusy Šenigla a spol. (2006) dokazují, že způsob maturace a časový průběh infekce se výrazně odlišují, odehrávají-li se v buňkách savčích a buňkách klíštěcích. V případě savčích buněk dochází v průběhu infekce ke zbytnění a roztažení endoplazmatického retikula, z něhož se v průběhu zrání virové partikule dostávají do Golgiho aparátu a opouští buňku nejspíše sekretorickou cestou. Jde o typ *trans* maturace, která je u flavivirů nejčastější a byla mimo jiné popsána u virů Japonské encefalitidy, viru Kunjin a Dengue viru typu 2 - novoguinejského kmene C (Hase a spol., 1987a, Ng, 1987, Sriurairatna a spol., 1973). Infikované buňky kompletně lyzují po několika desítkách hodin infekce. Avšak jsou-li infikovány buňky klíštěcí linie, infekce je perzistentní a buňky nelyzují. První viriony se formují po delším časovém intervalu (za 24 hodin v porovnání s 15 hodinami v obratlovcích) v cytoplazmě a lumen vakuol a odtud také vede cesta uvolňování z buňky - pučí přes plazmatickou membránu nebo membránu vakuol. Takto probíhá *cis* maturace stejně jako u viru Dengue-2 a viru západního Nilu (Hase a spol., 1987b, Ng a spol., 2001).

RNA viry se všeobecně vyznačují vysokou mutační frekvencí (Domingo, 1996), ale dosavadní údaje naznačují, že VKE je v přírodě pozoruhodně stabilní - selekční tlak v průběhu evoluce vedl spíše k zakonzervování E proteinové sekvence (Heinz a Kunz, 1981, 1982). Ecker a spol. (1999) na základě srovnávacích analýz sekvencí 16 různých izolátů VKE navrhli rozdělení rodu do tří subtypů. Tento návrh byl následující rok uznán a TBEV se tak člení na subtyp Evropský, jehož hlavním přenašečem je klíště obecné (*Ixodes ricinus*), subtyp Sibiřský a Dálný východ, oba přenášené převážně klíštětem tajgovým (*Ixodes persulcatus*) (Ecker a spol., 1999, Heinz a spol., 2000). S jednotlivými subtypy je spojen odlišný průběh onemocnění KE. Nejzávažnější je v případě infekcí způsobených kmeny náležícími do subtypu Dálný východ, kdy propukají těžké meningoencefalitidy či polyencefalitidy končící

fatálně v 20-60% případů (Gritsun a spol., 2003). U Sibiřského subtypu akutní fáze probíhá mírněji, spíše jako neparalytická horečnatá forma. Infekce způsobené zástupci sibiřského subtypu má za následek smrt pacienta v 6-8% případů (Gritsun a spol., 2003). Průběh infekce Evropským subtypem je obvykle dvoufázový (2. fáze může chybět), mírný, velmi často bez následků. Onemocnění končí smrtí pouze v 0,5-2% (Dumpis a spol., 1999) či 1-5% případů (Grešíková a Kaluzová, 1997). Výskyt jednotlivých subtypů není striktně ohraničen a byly zaznamenány případy současného výskytu dvou a dokonce i tří subtypů současně na jednom území. Kocirkulace všech tří subtypů byla zaznamenána v Baltských státech (Golovjova a spol., 2004, Lundkvist a spol., 2001), Evropský a Sibiřský subtyp se současně vyskytují v sousedních zemích, jako je Finsko (Jääskeläinen a spol., 2006). Vzhledem k rozličnému průběhu onemocnění jednotlivými subtypy je důležité znát původce právě v konkrétním daném případě a být schopni predikovat průběh onemocnění. Proto byla vyvinuta metoda multiplex RT-PCR díky níž je možné rychle a snadno odlišit jednotlivé subtypy a i případné koinfekce jak v patientských vzorcích, tak i v klíšťatech (Růžek a spol., 2007).

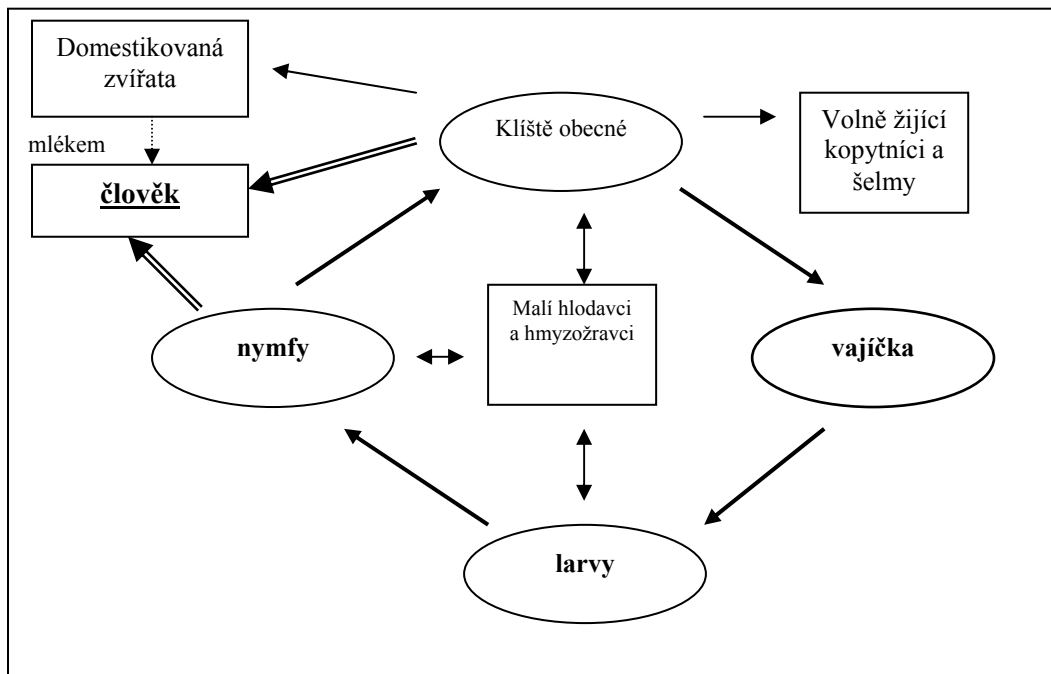
V přírodě cirkulující kmeny VKE se vyznačují různou mírou virulence (Nawrocka E., 1975). V jižních Čechách byly na počátku 90. let izolovány čtyři termosenzitivní (ts) kmeny VKE (ts263, ts274, ts280, ts282). Po extraneurální inokulaci nejsou virulentní, jsou-li však inokovány do mozku, působí smrtelnou infekci. Vyznačují se také odlišnou morfologií plaků. Plaky které tvoří jsou v porovnání s běžnými kmeny drobné, s difusním okrajem (Kopecký a spol., 1991).

### **Klíště obecné (*Ixodes ricinus*)**

Klíště obecné *Ixodes ricinus* se řadí do kmene členovci *Arthropoda*, podkmene klepítkatci *Chelicerata*, třída pavoukovci *Arachnida*, řád roztoči *Acarina* nadčeledi *Ixodoidea* čeledi *Ixodidae* (klíšťatovití). Tento ektoparazitický roztoč je hlavním přenašečem evropského subtypu VKE, čímž se stává důležitým objektem vědecké pozornosti. Obrázek 1.2 ilustruje koloběh viru klíšťové encefalitidy v přírodě. Vedlejší, zanedbatelnou roli při cirkulaci tohoto viru hrají i jiní zástupci čeledi *Ixodidae*, např. *Ixodes trianfuliceps*, *I. hexagonus*, *I. arboricola*, *Haemohysalis inermis* (Grešíková a Kaluzová, 1997) *Dermacentor reticulatus*, *D. marginatus* (Labuda a spol., 1993a). Incidence onemocnění u lidí má v průběhu roku dvě hlavní maxima, která úzce souvisí s aktivitami sání jednotlivých stádií v přírodě (Korenberg, 2000). Tato maxima spadají na květen-červen a září-říjen (Gritsun a spol., 2003).



Výskyt klíštěte obecného v přírodě je typický svou ohniskovostí, klíšťata lze nalézt převážně v podrostu lesa, v mikroklimatich s dostatečnou vlhkostí. Vyskytují se nejčastěji do výšky 600 m n.m. Za posledních několik desetiletí se ovšem výskyt klíšťat rozšířil – a to až do nadmořských výšek – 1100-1200 m n.m. (Daniel a spol., 2004)



**Obr. 1.2** Cirkulace evropského subtypu VKE v přírodě. Upraveno dle Grešíkové a Kaluzové (1997).

V životním cyklu tohoto členovce se vyskytuje několik stádií – larva, nymfa, dospělec a vajíčko. Každé stádium saje nepřetržitě po dobu několika dní na jiném hostiteli, jedná se tedy o trojhostitelský druh. Přeměna jednoho stádía v jiné trvá zhruba rok a celý životní cyklus se odehraje v rozmezí 2-6 let (Süss, 2003). Z vajíček se línou nepatrné šestinohé larvy (0,6-1mm), které sají na drobných hlodavcích, ptácích a ještěrkách. Po nasátí a ekdysi (svlékání) se přeměňují na nymfy, které mají již osm nohou a jsou veliké 1-2 mm. Okruh jejich hostitelů je obdobný jako u larválního stádía, avšak bývají větší velikost; po nasátí nymfa metamorfuje v dospělce. Dospělí samci a samice klíštěte obecného jsou pohlavně dimorfiční. Samci (2,5mm) s tmavým až černým lesklým štítkem vyhledávají samici na hostiteli a kopulují s ní těsně před přísátím. Samice mají štítek zabarven do červena a jako svou „kořist“ vyhledávají velké savce. Nenasáté jsou velké 3,5-4,5 mm, po nasátí se mnohonásobně zvětší až na 1 cm (Rosický a spol., 1979). Několik týdnů potravu tráví a pak kladou snůšku 1000-5000 vajíček. Po vykladení hynou.

Jedinci číhají na vegetaci a pomocí citlivých Halerových orgánů snímají potenciální kořist. Roztoči se hbitě uchytili v srsti případně na oděvu procházejícího hostitele a poté co si

najdou nerušené místo na těle, se začnou provrtávat kůží pomocí hypostomu. Pro pevné zafixování v ráně jim slouží cement (Bishop a spol., 2002). Na člověku mohou sát všechna tři stádia, larvy a nymfy bývají díky své velikosti snadno přehlédnuty. Na těle vyhledávají ty části, kde je kůže tenčí, kde je vlhko a kde nebudou při sání příliš rušeny. U dětí nejčastěji v oblasti hlavy. Z hlediska lidského zdraví jsou významné i jiné patogeny, které tento roztoč přenáší. Velmi závažným je bakterie *Borrelia burgdorferi* s.l., původce lymeské boreliózy. Proti této nemoci neexistuje očkování a problematičtější bývá tím, že příznaky manifestující se u nakažených jsou velmi variabilní, často individuální, tudíž se nemoc obtížně diagnostikuje. Kromě Evropy a Asie je nejvíce sužována lymeskou boreliózou Severní Amerika. K dalším bakteriím přenosným na člověka patří např. *Francisella tularensis*, způsobující tularémii, *Coxiella burnetti*, původce Q-horečky, *Rickettsia slovaca* způsobující tzv. TIBOLU (tick-borne lymphadenopathy), *Babesia divergens* prvok vyvolávající lidskou babesiózu, *Ehrlichia microti* a *Anaplasma phagocytophila*, původce granulocytické ehrlichiozy (Süss, 2003).

## Účinky klíštěcích slin

Klíštěcí sliny mají pro klíště zásadní úlohu v zprostředkování sání, při němž jsou sliny vylučovány do rány a mají zajistit správný průběh získávání potravy. Je v nich obsažena řada farmakologicky aktivních molekul, které mají širokou škálu působnosti; potlačují například koagulaci, narušují hostitelskou homeostázu. Další jejich hlavní funkcí je odvrátit imunitní útok hostitele; proto modulují či inaktivují některé složky jeho obrany v místě sání a to jak z nespecifické (vrozené) složky imunity, tak i ze specifické (získané) (Merji a spol., 2002). Bez těchto imunomodulačních účinků slin by dokončení sání na hostiteli bylo problematické. Hostitelská imunitní odpověď může způsobit redukci hmotnosti sajícího klíštěte, prodloužení doby sání, má vliv na životaschopnost vajíček, ovlivňuje svlékání a může dokonce zapříčinit smrt klíštěte (Wikel, 1999). Sliny proto působí protisrážlivě (ixolaris, americanin, ixin, ornithodorin) a inhibují shlukování krevních destiček (prostaglandiny, apyráza, savignygrin, variabilin, disagregin, moutabin) (Kovář, 2004, Brossard a Wikel, 2004). Způsobují roztahování cév (prostaglandiny), váží histamin - klíčový mediátor zánětu (histamine binding proteins - HBPs), jsou schopny inhibovat aktivaci komplementu jak klasickou, tak i alternativní cestou (Ribeiro, 1987, Lawrie a spol., 2005, Nunn a spol., 2005). Část proteinů z hostitelovy plazmy je schopná proniknout přes střevní stěnu sajícího klíštěte, včetně specifických protilátek; ze strany klíštěte následuje obrana, kterou je produkce proteinů

vázících imunoglobuliny (immunoglobulin G binding proteins - IGBPs) (Wang a Nuttall, 1999).

Klíštěcí sliny v místě sání ovlivňují také hostitelskou signalizaci pomocí cytokinů, chemických modulátorů zánětu a imunity. Ovlivňují nejen aktivitu cytokinů, ale také jejich expresi buňkami (Nuttall a Labuda, 2004). Klíštěcí sliny jsou schopny suprimovat produkci IFN  $\gamma$  myšimi splenocyty (Kopecký a spol., 1999) či snížit protivirový účinek IFN  $\alpha/\beta$  (Hajnická a spol., 2000). Byly popsány schopnosti proteinů ve slinách cytokiny vázat. Váží kupříkladu IL-2, čímž suprimují proliferaci T-buněk (Gillespie a spol., 2001), IL-8, což způsobuje inhibici chemotaxe neutrofilů (Hajnická, 2001) či TNF  $\alpha$ , což jí klíčová molekula pro spuštění zánětlivé reakce (Koník a spol., 2006). Sání klíšťat způsobuje polarizaci imunitních mechanismů směrem k Th2 odpovědi (Kovář a spol., 2002, Kopecký a spol., 1999). Klíštěcí sliny ovlivňují také NK buňky (natural killer), jejichž hlavní úlohou je zabíjení virem infikovaných, případně nádorových buněk (Kubes a spol., 1994, Kopecký a Kuthejlová, 1998), makrofágy (Ramachandra a Wikel, 1992) či B buňky (Hannier a spol., 2003)

Toto je jen stručný výčet několika příkladů, avšak klíštěcí sliny jsou zásobárnou nepřehledného množství proteinů, z nichž drtivá většina je pro nás velkou neznámou, čímž se otevírá široké pole pro možnosti dalších výzkumů. Složení proteinů vylučovaných do slin se odlišuje jak druh od druhu, je také vnitrodruhově heterogenní, liší se dokonce u jednotlivých vývojových stádií (Wang a spol., 1999) a navíc je složení odlišné i v časovém průběhu jednotlivého sání (Sanders a spol., 1996).

Účinky slin využívá ke svému prospěchu řada patogenů. Není to tak, že by klíště nějak „úmyslně“ pomáhalo patogenům, které přenáší. Jde spíše o dlouhodobou společnou evoluci, během níž se pro patogeny ukázalo být výhodné využít lokální imunosuprese v místě sání pro efektivnější nákazu hostitele.

Jev, kdy sliny přenašeče způsobí zvýšení přenosu patogena, se nazývá slinami aktivovaný přenos (*saliva activated transmission*) – SAT efekt. Termín SAT efekt byl poprvé použit roku 1991 (Nuttall a Jones) pro popsání efektu SGE (extraktu ze sliných žláz, angl. *salivary gland extract*) na přenos viru Thogoto. Byl-li SGE připravené ze slinných žláz klíšťat (*Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyoma variegatum*), injikováno společně s virem, nakazilo se desetkrát více sajících nymf, než byl-li injikován pouze virus. SAT efekt byl následně zjištěn u řady dalších patogenů, kupříkladu *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* s.s., *Franciscella tularensis*, *Leishmania* spp. a viru vesikulární stomatitidy (Nuttall a Labuda, 2004). SAT efekt byl popsán také u viru klíšťové encefalitidy (Alekseev a Chunikhin, 1990, Labuda a spol., 1993a). Je velmi pravděpodobné, že SAT faktor se liší pro

různé patogeny a druhy přenašečů a možná i pro hostitelské druhy (Nuttall a Labuda, 2004). Může se jednat o jedinou molekulu či o jejich soubor. Jediným doposud odhaleným SAT faktorem je protein Salp15 z klíštěte *Ixodes scapularis*. Ramamoorthi a spol.(2005) zjistili, že spirochéta *Borrelia burgdorferi* zvyšuje expresi proteinu Salp15 v klíštěcích slinných žlázách a specificky si tento protein váže na svůj povrch. Tato záležitost borélii velmi usnadňuje infekci hostitele. Setkal-li se hostitel s boreliemi již dříve, chrání Salp 15 spirochety před účinky specifických protilátek a komplementu, u naivního hostitele se uplatňuje jeho imunosuprimující efekt.

Imunoučinky slin také souvisí s takzvaným neviremickým přenosem (non-viraemic transmission). Dříve panovala představa, že přenašeč se může při sání nakazit jen v případě, probíhá-li právě v hostitelově těle virémie resp. bakterémie. Od roku 1987 (Jones a spol., 1987), kdy byl neviremický přenos poprvé popsán u viru Thogoto, se tento názor změnil. Zdá se, že většina členovčích přenašečů se nakazí, sají-li na hostiteli společně s infikovaným přenašečem. Neviremický přenos byl popsán také např. u viru klíšťové encefalitidy (Alekseev a Chunikhin, 1990, Labuda a spol., 1993b,c), viru Bhanja, virus Krymsko-Konžské hemoragické horečky, viru vrtivky (Louping-ill), viru západního Nilu, u bakterie *Borrelia burgdorferi* s.l. (Nuttall a Labuda, 2004). K přenosu při sousání dochází i jde-li o imunního hostitele (Labuda a spol., 1997).

V neposlední řadě je možné účinky klíštěcích slin pozorovat v *in vitro* studiích. Prvním publikovaným případem takové efektu u virů byla zvýšená virová replikace viru vesikulární stomatitidy (komáry přenášený arbovirus) po oštření buněk klíštěcím SGE (Hajnická a spol., 1998).

## **Interferon (IFN)**

Nejčasnější imunitní odpověď hostitele na virovou infekci je nespecifická a zahrnuje, kromě jiných cytokinů, indukci produkce interferonů (Lobigs a spol., 2003). Jde o multifunkční sekretované proteiny, které na základě rozdílné antigenní struktury, buněk které je produkují a aktivit dělíme na interferony prvního typu (I) a interferony typu druhého (II). Oba typy interferonů nemají žádnou strukturní homologii, avšak jsou si funkčně podobné. V buňkách navozují tzv. protivirový stav, kdy po navázání na typově specifické receptory spouští kaskádu signalizačních drah (Jak/STAT), které následně ústí v transkripci cílových genů. Oba typy IFN ovlivňují či blokuji virovou replikaci, zpomalují růst cílových buněk a činí je více náchylné k apoptóze a také svými imunomodulačními účinky stimulují specifickou imunitní odpověď (Goodbourn a spol., 2000). Typy genů, které mohou být

v reakci na interferon obou typů spuštěny (indukovány) se do značné míry překrývají (Stark a spol., 1998).

Interferony prvního typu zahrnují dva sérologicky odlišné typy proteinů, každý typ kódovaný samostatnými geny. První je IFN $\alpha$  kódovaný 18-ti geny a syntetizovaný mononukleárními fagocyty. Druhou skupinu tvoří IFN  $\beta$ , pro který existuje jen jeden gen a je syntetizován převážně fibroblasty. Obě uvedené skupiny IFN typu I se ovšem váží na společný receptor (složený ze dvou řetězců) a ve výsledku vyvolávají transkripci stejné skupiny genů (Goodbourn a spol., 2000). Jejich efekt na buňky se projevuje v několika oblastech. Nejzásadnější je všeobecná inhibice replikace jak RNA tak DNA virů (enzym 2-5 oligoadenylát syntáza). Produkce interferonů infikovanou buňkou chrání okolní, neinfikované buňky, proti infekci. Dalšími účinky jsou inhibice proliferace buněk, stimulace aktivity NK buněk a zvýšení exprese MHC I molekul (MHC= major histocompatibility complex), zatímco exprese MHC II inhibují. (Buc, 2001).

Interferon  $\gamma$  patří k interferonům typu II. Hlavními producenty jsou T lymfocyty a NK buňky (angl. natural killer) poté co rozpoznají infikovanou buňku (Lobigs a spol., 2003). Receptor se skládá ze dvou řetězců a ( $\alpha$  a  $\beta$ ) a liší se od receptoru pro interferony typu I (Buc, 2001). Aktivuje odlišnou signální dráhu a transkripci odlišných genů. IFN  $\gamma$  ovlivňuje především funkci makrofágů, NK buněk a T lymfocytů, zvyšuje exprese jak molekul MHC I, tak i MHC II a aktivuje endotelové buňky cév pro snazší adhezi lymfocytů k cévní stěně (Buc, 2001).

## **1.2. VIRUS MYŠÍ ENCEFALOMYOKARDITIDY (EMCV)**

Na tomto místě bych chtěla pojednat o viru myší encefalomyokarditidy (EMCV). V průběhu experimentálních prací jsem tento virus používala jako experimentální model. Ačkoliv se nejedná o arbovirus, rozhodla jsem se věnovat několik řádek také tomuto viru.

EMCV je řazen do rodu *Cardiovirus* čeledi *Picornaviridae* (Fauquet a spol., 2005). V přírodě jsou hostiteli viru převážně hlodavci, u kterých infekce probíhá perzistentně, většinou bez propuknutí choroby (Koenen a kol, 1994). Virus byl izolován ze širokého okruhu hostitelů od bezobratlých (komáři, klíšťata), přes sudokopytníky, lichokopytníky, vačnatce, primáty až po člověka (Laurie, 1991). U lidí probíhá nákaza buď bezpříznakově, kupříkladu byly zjištěny protilátky u lidí ošetřujících nakaženou zvěř (Wells a Gutter, 1989), anebo propukne klinicky manifestativní nákaza. Ta může mít dvojí možný průběh - jako mírné

horečnaté onemocnění se ztuhlostí krku, otupělostí, blouzněním, bolestmi hlavy a zvracením (Murnane, 1981) či jako závažná encefalomyokarditida (Gajdusek, 1955). Největší význam má ovšem jako patogen domestikovaných prasat, která jsou k viru nejcitlivější (Billinis a spol., 1999), a zvířat chovaných v zoologických zahradách (Reddacliff et al., 1997). U domestikovaných prasat způsobuje akutní myokarditidy, reprodukční selhání (Christianson, 1990 a 1992, Joo et al., 1988), po transplacentárním přenosu způsobuje potraty, rození mrtvých selat (Joo, 1999) či jejich náhlá úmrtí (Gainer, 1967).

Zástupci čeledi *Picornaviridae* patří k jedněm z nejmenších ve světě virů. Neobalená ikosahedrální kapsida EMCV o průměru 30 nm obsahuje genetickou informaci ve formě jednovláknové molekuly RNA pozitivní polaritity o délce 7,8 kb. Na jejím 5'konci je kovalentně navázán protein VPg, který slouží jednak jako primer pro RNA polymerázu při iniciaci syntézy RNA a za druhé napomáhá procesu enkapsidace. Na 3'konci je RNA polyadenylována. Virové proteiny jsou kódovány jediným čtecím rámcem (open reading frame, ORF) a vznikající polyprotein je štěpen proteázami na 11 funkčních produktů (Pastorek, 1998).

## 2. Cíle práce

- Studium replikační kinetiky viru klíšťové encefalitidy v různých buněčných liniích.
- Studium vlivu extraktu ze slinných žláz a slin klíštěte *Ixodes ricinus* na replikaci viru ve vybraných buněčných liniích.
- Stimulace produkce IFN  $\beta$  v myší fibroblastové linii (L929) a její ovlivnění klíštěcími slinami.
- Interpretace zjištěných poznatků s důrazem na úlohu klíštěcích slin při ekologii viru KE a patogenезi onemocnění klíšťovou encefalitidou.

### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Viry

Český prototypový kmen viru klíšťové encefalitidy **Hypr** [přístupové číslo databáze GenBank: X75286] byl izolován z krve dítěte s klíšťovou encefalitidou v Brně roku 1953 (Pospíšil a spol., 1954) a byl uchováván ve formě 20% mozkové suspenze. Virus byl mnohonásobně pasážován v mozcích sajících myšek, přičemž přesný počet pasáží není znám.

Termosenzitivní mutanta viru klíšťové encefalitidy **ts263** [GenBank: U27491] byla získána izolací z klíštěte *Ixodes ricinus* roku 1989 (Kopecký a spol., 1991). Pokusy byly prováděny s virem po třetí mozkové pasáži, uchovávané ve formě 20% mozkové suspenze.

Kmen VKE **166** [GenBank: EF113079] byl izolován z 30 samic klíštěte *Ixodes hexagonus* přisátých na ježkovi (*Erinaceus europaeus*) odchyceném na okraji Českých Budějovic roku 1986 (Křivanec a spol., 1988). Virus byl uchováván ve formě 20% mozkové suspenze a prošel jednou pasáží.

Virus myší encefalomyokarditidy **EMCV** byl pasážován na buňkách VERO E6 (opičí ledvina).

Všechny použité viry byly uchovávány při -70 °C.

#### 3.2. Buněčné linie

Buněčná linie **PS** (angl. porcine kidney stable; prasečí ledvina) (Inoue a spol., 1962) byly kultivovány v médiu L15 (Leibowitz) (Sigma) s přidavkem 3% prekolostálního telecího séra (PTS), 1% antibiotik a antimykotik (ATB) (Sigma; penicilin, streptomycin, amphotericin B) a 1% glutaminu při 37°C. Pasáž byla prováděna suchou trypsinizací.

**L929** (myší fibroblasty) je buněčná linie odvozená z původního kmene L po ošetření 3-methylcholanthrenem a následném klonování. Původní kmen L byl získán Earlem (1943) z pojivové a podkožní tkáně 100 dní starého samce myši C3H. Buňky byly pěstovány v médiu MEM (Sigma) s 5% PTS, 1% ATB, 1% glutaminem. Kultivace a pasážování shodné s předchozí buněčnou linií.

Buněčná linie neadherujících peritoneálních makrofágů **PMJ2-R** byla získána pomocí retroviru J2 z myši C57BL/6J (Adami a spol., 1993). Ke kultivaci bylo použito médium D-MEM (Sigma) s přidavkem 5% fetálního bovinního séra (BOFES), 1% ATB a 1% glutaminu.



### 3.3. Plaková titrace

Titry virů vyjádřené v plakových jednotkách (PFU, angl. Plaque forming units) byly stanovovány metodou plakové titrace (de Madrid and Porterfield, 1969). Testované vzorky byly naředěny desítkově v 24 jamkovém panelu (TPP, Švýcarsko) v kultivačním médiu. Poté bylo do každé jamky přidáno 300  $\mu$ l buněčné suspenze v množství 1,2-1,5 x 10<sup>5</sup> buněk na jamku (koncentrace 4-5 x 10<sup>5</sup> buněk/ml) (viz Tab. 3.1) a obsah panelu byl řádně promíchán. Buňky byly inkubovány při 37 °C v atmosféře 0,5 % CO<sub>2</sub>. Po 4-6 hodinách v závislosti na viru, který byl titrován, byly buňky převrstveny 400  $\mu$ l přelivu, což je roztok CMC (1,5% karboxymethylcelulóza) a 2x koncentrované kultivační médium v poměru 1:1. Vše bylo inkubováno po dobu 3-6 dní (viz Tab. 3.1) za teploty 37 °C v prostředí 0,5% CO<sub>2</sub>. Vzniklé plaky byly vizualizovány barvením, kdy byly panely nejprve promyty ve fyziologickém roztoku a živé buňky byly obarveny roztokem naftalenové černě (1 g naftalenové černě, 60 ml ledové kyseliny octové, 13,6 g octanu sodného, doplněno do 1 l H<sub>2</sub>O).

Postup se mírně lišil u jednotlivých virů.

**Tab. 3.1** Rozdíly v plakové titraci u viru KE a EMCV

|                                  | <b>Virus klíšťové encefalitidy</b> | <b>Virus myší encefalomyokarditidy</b> |
|----------------------------------|------------------------------------|--|
| <b>Buněčná linie</b>             | PS                                 | L929                                   |
| <b>Médium</b>                    | L15                                | MEM                                    |
| <b>Množství buněčné suspenze</b> | 1,2 x 10 <sup>5</sup> buněk/jamku  | 1,5 x 10 <sup>5</sup> buněk/jamku      |
| <b>Přeliv přidán po</b>          | 4 hodinách                         | 6 hodinách                             |
| <b>Barveno za</b>                | 5-6 dní                            | 3-4 dní                                |

### 3.4. Příprava extraktu ze slinných žláz

Extrakt ze slinných žláz (SGE) byl získáván ze samic klíšťete *Ixodes ricinus*, které byly ponechány sát na morčeti po dobu 5-6 dní. Nasátým klíšťatům byly vypreparovány slinné žlázy, které byly následně 3x promyty v roztoku PBS (angl. phosphate buffered saline, fosfáty pufovaný fyziologický roztok). Slinné žlázy byly homogenizovány sonikací, homogenát byl centrifugován (10 min, 10000 G, 4 °C). Koncentrace proteinů byla určena pomocí soupravy BioRad (Bradford, 1976). SGE byl uchováván při teplotě -70°C.

### 3.5. Odběr klíštěcích slin

Klíštěcí sliny byly získávány modifikovanou metodou podle Valenzuela a spol. (2000). Klíšťata *Ixodes ricinus* byla ponechána sát na morčeti po dobu 5-6ti dní. Po sejmutí z pokusného zvířete byla přilepena oboustrannou lepící páskou k podložnímu sklíčku, na hypostom a jednu z palp jim byla nasazena a zafixována skleněná kapilára. Na tělo jim byly kápnuty 2  $\mu$ l 5% roztoku pilokarpinu (pilocarpine hydrochloride, Sigma) v 95% ethanolu. Klíšťata byla umístěna do vlhké komůrky v níž byla následně inkubována po dobu 2-4 hodin při 37°C a 3,5% CO<sub>2</sub>, kdy docházelo k vylučování slin do kapilár. Jednotlivá klíšťata se velmi lišila v množství vyprodukovaných slin, rozsah byl zhruba mezi 0,5-15  $\mu$ l. Získané sliny byly přeneseny do 10  $\mu$ l PBS a uchovávány při teplotě -70°C. Obsah proteinů ve slinách se pohyboval v rozmezí 200-300  $\mu$ g proteinů/ml a byl stanovován pomocí soupravy BioRad (Bradford, 1976).

Klíšťata používaná pro přípravu extraktu ze slinných žláz či odběr slin pocházela z chovu Parazitologického ústavu AVČR nebo z volné přírody (odchyt metodou vlnkování) z míst nacházejících se mimo ohniska výskytu spirochét Lymské boreliózy a viru klíšťové encefalitidy. V každém pokusu byla provedeno zjištění, zda není VKE přítomen v použitých slinách a nebo slinných extraktech.

### 3.6. Dynamika replikace viru *in vitro*

#### Virus klíšťové encefalitidy:

Byla zjišťována dynamika replikace VKE v jednotlivých buněčných liniích jak neadherujících PMJ2-R (**A**), tak i adherujících L929 a PS (**B**).

Nejprve byla připravena suspenze buněk (viz Tab. 3.2.) a napipetována do 96-ti jamkového panelu (TPP, Švýcarsko) po 200  $\mu$ l na jamku. Ve všech následujících pokusech byly použity buněčné suspenze o stejné koncentraci u příslušných buněčných linií. Buňky byly kultivovány při 37°C v atmosféře 0,5% CO<sub>2</sub>. Následující den byly buňky infikovány virem klíšťové encefalitidy, kmenem Hypr. Infekční dávky jsou uvedeny v tabulce č.3.2. Způsob infekce se lišil u adherujících a neadherujících buněk

**A)** V případě buněčné linie PMJ2-R bylo malé množství virové suspenze (10-20  $\mu$ l) přidáno do kultivačního média.

**B)** Jednalo-li se o adherující buňky, kultivační médium bylo opatrně odsáto a v zápětí byla provedena infekce (50  $\mu$ l virové suspenze). Virus byl ponechán adsorbovat po dobu jedné hodiny, poté bylo k buňkám přidáno 200  $\mu$ l média.

**Tab. 3.2** Koncentrace buněčné suspenze a multiplicita infekce u jednotlivých buněčných linií.

|  | <b>PMJ2-R</b>      | <b>L929</b>          | <b>PS</b>            |
|--|--------------------|----------------------|----------------------|
| <b>množství buněčné suspenze</b> [buněk/jamku] | $5 \times 10^5$    | $6 \times 10^4$      | $6 \times 10^4$      |
| <b>infekční dávka</b> [PFU/buňku]              | $4 \times 10^{-3}$ | $3,3 \times 10^{-4}$ | $3,3 \times 10^{-4}$ |

Vzorky byly odebírány v časových intervalech 24, 48, 72 hodin po infekci (p.i.), pro každou skupinu v triplicaci.

**A)** U neadherující buněčné linie (PMJ2-R) byl odebrán celý obsah jamky, včetně buněk. Tyto vzorky byly poté 3x zamrazeny a rozmrazeny, aby došlo k rozrušení buněk. Vzorky byly poté centrifugovány (10min., 4500 G , 4°C) a byla odebrán supernatant.

**B)** V případě adherujících buněčných linií (PS, L929) byl odebrán supernatant. Titr viru byl zjišťován metodou plakové titrace.

#### Virus myší encefalomyokarditidy:

Pro pokusy s virem myší encefalomyokarditidy byla používána buněčná linie L929, která je citlivá k infekci tímto virem a ten se v ní replikuje do vysokých titrů.

Byla připravena buněčná suspenze buněk L929 (viz Tab. 3.2). Buňky byly inkubovány při 37°C s 0,5% CO<sub>2</sub> do následujícího dne. Kultivační médium bylo odsáto a byla provedena infekce suspenzí EMCV; multiplicita infekce  $3,3 \times 10^{-2}$ ;  $3,3 \times 10^{-3}$  a  $3,3 \times 10^{-4}$  PFU/buňku (10000, 1000, 100 PFU/ml). Adsorpce virionů probíhala po dobu 1 hodiny. Následně bylo médium odsáto a nahrazeno 200 µl kultivačního média. Supernatant obsahující virus byl odebírán v časových intervalech 12, 24, 48 a 72 hodin p.i., pro každou skupinu v triplicaci.

### **3.7. Vliv SGE a slin klíštěte *Ixodes ricinus* na replikaci studovaných virů**

Připravená buněčná suspenze (viz. Tab.3.2.) byla rozpipertována do 96 j. panelu. Buňky byly inkubovány při 37°C s 0,5% CO<sub>2</sub> přes noc. Následujícího dne byly buňky ošetřeny roztokem slin či SGE o výsledné koncentraci v rozmezí 5-40 µg/ml v závislosti na prováděném pokusu a inkubovány po dobu 2 hodin (37 °C, 0,5% CO<sub>2</sub>).

Kontrola SGE - Do jamek sloužících jako kontrolních bylo namísto roztoku SGE přidáno pouze kultivační médium.

Kontrola sliny - Do kontrolních jamek byl přidán 50mM roztok pilokarpinu (Ribeiro a spol., 2004) ( $C_{11}H_{16}N_2O_2 \cdot HCl$ , pilocarpinum hydrochloridum) v kultivačním médiu v množství shodném s množstvím přidávaných slin.

Následně byla provedena infekce přidáním roztoku viru do jednotlivých jamek (odlišnosti u adherujících a neadherujících buněčných linií viz body **A** a **B** odstavce 3.6). Byly vyzkoušeny dva alternativní postupy a to 1) po infekci ponechat virus adsorbovat 1 hodinu a poté provést výměnu za čerstvé kultivační médium; 2) po infekci infekční médium ponechat až do okamžiku odběru vzorku. Infekční dávky jsou shrnuty v tabulce č.3.3.

Vzorky (viz body **A** a **B** odstavce 3.6) byly odebírány v rozmezí 12-72 hodin po infekci, pro každou skupinu minimálně v triplikaci.

**Tab. 3.3** Infekční dávky virů VKE a EMCV v jednotlivých buněčných liniích vyjádřené v multiplicitě infekce [PFU/buňku].

|     | Multiplicita infekce [PFU/buňku] | PS                   | L929                 | PMJ2-R                |
|-----|----------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| VKE | <b>Hypr</b>                      | $6,7 \times 10^{-5}$ | $6,7 \times 10^{-5}$ | $1,25 \times 10^{-2}$ |
|     | <b>166</b>                       | $1,3 \times 10^{-5}$ | ---                  | ---                   |
|     | <b>EMCV</b>                      | ---                  | $3,3 \times 10^{-3}$ | ---                   |

### 3.8. ELISA na detekci myšího IFN $\beta$

Množství vyprodukovaného IFN  $\beta$  buňkami L929 bylo měřeno pomocí Mouse interferon beta ELISA kit, v.1.4 (RD Systems, USA), sendvičovou ELISA metodou. Všechny procedury byly prováděny dle přiloženého návodu. V každém pokusu byly přítomny negativní kontroly samotného ředícího roztoku a samotných nestimulovaných buněk.

Byla připravena dvojková ředící řada (od 1000 po 15,6 pg/ml) standardu myšího IFN  $\beta$  v ředícím roztoku obsaženém v kitu. Ta byla společně s testovanými vzorky napipetována do jamek mikrotitrační destičky (již s navázanou protilátkou) v množství 100 $\mu$ l na jamku. Obsah destičky byl následně inkubován po dobu 60 minut při laboratorní teplotě. Panel byl poté 3 $\times$  promyt promývacím pufrem a vysušen. Do jamek bylo přidáno 100 $\mu$ l roztoku protilátky proti myšímu IFN  $\beta$ , s nímž byly jamky inkubovány po dobu 60 minut při laboratorní teplotě. Následovalo promytí (3 $\times$ ) promývacím pufrem a vysušení. Poté bylo do jamek přidáno 100 $\mu$ l sekundárních protilátek konjugovaných s enzymem - křenovou peroxidázou, vše bylo inkubováno za laboratorní teploty po dobu 60-ti minut. Panel byl opět 3 $\times$  promyt. V dalším kroku bylo přidáno 100 $\mu$ l substrátu, kterým byl roztok tetramethyl-benzidinu, látky, která po

štěpení peroxidázou mění svou barvu. Panel byl přemístěn do temna a byl inkubován po dobu 15 minut, poté bylo přidáno 100 $\mu$ l stopovacího roztoku.

Výsledky byly odečítány pomocí spektrofotometru (Multiscan Med/340, Labsystems) (450 nm). Výsledné množství interferonu bylo odečítáno z kalibrační křivky získané vyhodnocením ředící řady standardu IFN  $\beta$ .

### 3.9. Stimulace produkce IFN $\beta$ v buňkách L929

Z předchozí práce (Pechová, 1996) vyplývá, že v buňkách L929 není interferonová odpověď typu I stimulována ani poly I:C, ani ds RNA a ani virem VKE Hypr. Proto jsme vyzkoušeli „přirozenou virovou infekcí“, která by měla tuto odpověď stimulovat. Jednalo se o viry KE přírodní izolát 166 a termosenzitivní mutantu ts263 a také o EMCV.

K suspenzi buněk L929 (inkubace přes noc, 37 °C, 3,5% CO<sub>2</sub>) (množství viz. Tab. 3.2.) byl přidán induktor, infekční dávky jsou uvedeny v tabulce č.3.4. Virus byl v jamkách ponechán až do doby odběru vzorků. V časových intervalech 8, 16 a 24 hodin byly odebírány vzorky média (uchovávány při -70 °C), pro každou skupinu v duplikaci. Obsah IFN  $\beta$  byl stanovován metodou ELISA (viz. 3.8.).

**Tab. 3.4** Multiplicita infekce použitých induktorů.

|                            | <b>ts263</b> | <b>166</b>          | <b>EMCV</b>           |
|----------------------------|--------------|---------------------|-----------------------|
| infekční dávka [PFU/buňku] | 5            | 3 x10 <sup>-3</sup> | 6,6 x10 <sup>-2</sup> |

### 3.10. Vliv slin na produkci IFN $\beta$ v buněčné linii L929

Nejprve byla připravena a do 96-ti jamkových panelů napipetována buněčná suspenze (viz Tab. 3.2). Buňky byly inkubovány při 37°C s 3,5% CO<sub>2</sub> přes noc. Následujícího dne bylo odebráno kultivační médium a buňky ošetřeny roztokem slin o výsledné koncentraci 20  $\mu$ g/ml (inkubace 37°C; 3,5% CO<sub>2</sub>). Za 2 hodiny byl přidán induktor - virus ts263, multiplicita infekce 33 PFU/buňku. Vzorky (pro každou skupinu v triplicaci) byly odebrány a zamraženy za 8 hodin po infekci. Obsah IFN  $\beta$  byl stanovován metodou ELISA (viz. 3.8.).

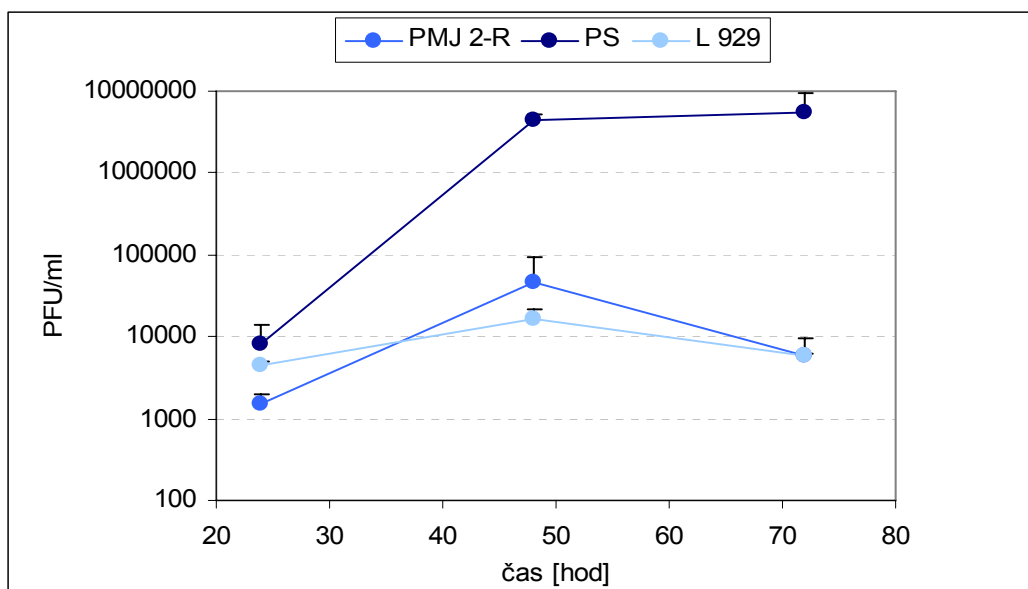
### **3.11. Vyhodnocování výsledků**

Statistická významnost výsledků byla vyhodnocována programem Statistica, verze 7. pomocí nezávislé analýzy podle skupin (Studentův T-test). Výsledky jejichž hladina významnosti **p** je menší než 5% byly považovány za signifikantní a jsou v následující kapitole označeny hvězdičkou.

## 4. Výsledky

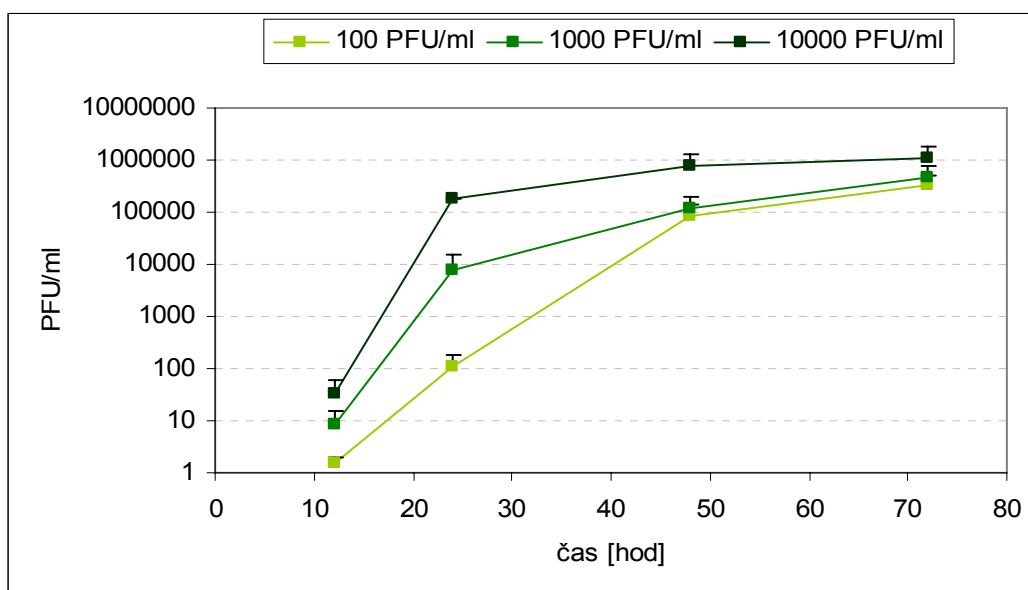
### 4.1. Dynamika replikace viru *in vitro*

Na úplném počátku bylo zapotřebí ověřit, zda se prototypový kmen Hypr viru KE množí v buněčných liniích, které byly vybrány pro další experimenty. Byla zjišťována dynamika replikace viru (Obr. 4.1) v různých časových intervalech po infekci (p.i.). Ukázalo se, že buňky všech zvolených linií byly k infekci virem citlivé, přičemž maximální množství bylo ve všech studovaných buněčných liniích detekováno shodně, 48 hodin p.i., u buněčné linie PS ještě i za 72 hodin p.i. Replikace viru probíhala nejintenzivněji v buněčné linii PS a to až k téměř  $10^7$  PFU/ml. U zbylých dvou skupin vrchol představoval  $10^4$ - $10^5$  PFU/ml viru. V časovém intervalu 72 hodin byl pozorován v kulturách buněk L929 a PMJ2-R pokles titru viru, zřejmě následkem odumření velkého množství infikovaných buněk. Většina jich totiž byla lyzována již 48 hodin p.i.



**Obr. 4.1** Replikační křivky viru Hypr v buněčných liniích PMJ2-R, PS, L929. Multiplicita infekce  $4 \times 10^{-3}$ ,  $3,3 \times 10^{-4}$ ,  $3,3 \times 10^{-4}$  PFU/buňku.

V průběhu pokusů byl jako model pro ověření správnosti metodického přístupu používán EMCV. Virus se replikoval v buněčné linii L929 (Obr. 4.2) velmi intenzivně. Maximální titer byl zjištěn 72 hodin p.i. a největší nárůst množství viru byl zjištěn mezi prvním a druhým intervalem odběru, tedy mezi 12 a 24 hodinami p.i.



**Obr. 4.2** Replikační křivky EMCV v buněčné linii L929. Multiplicita infekce  $3,3 \times 10^{-4}$ ,  $3,3 \times 10^{-3}$  a  $3,3 \times 10^{-2}$  PFU/buňku

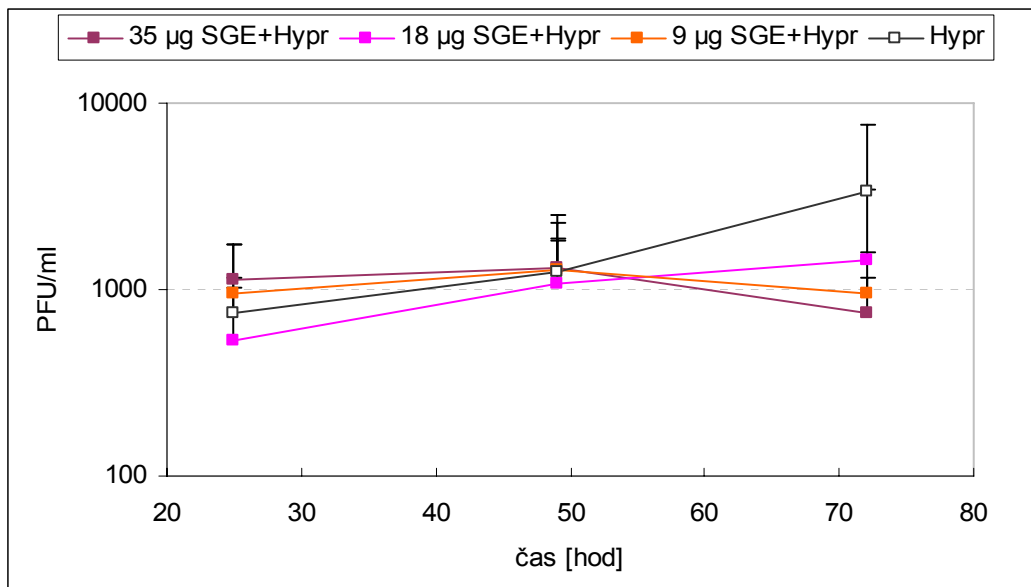
## 4.2. Vliv SGE a slin *Ixodes ricinus* na replikaci studovaných virů

### Ovlivnění replikace studovaných virů extraktem ze slinných žláz

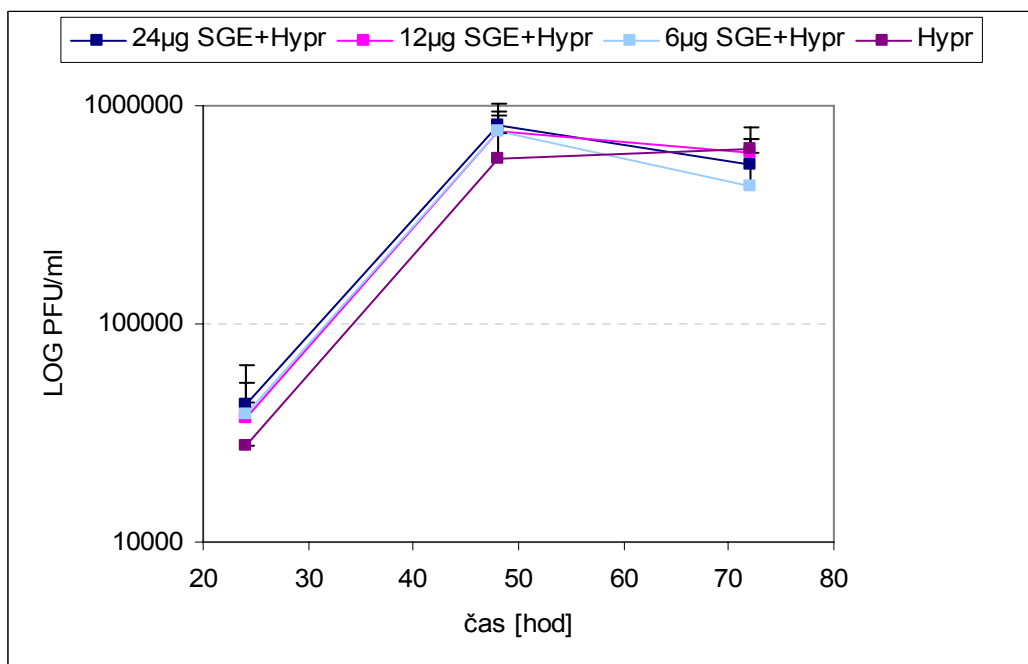
Pokusy zaměřené na studium vlivu SGE (respektive slin) klíštěte *Ixodes ricinus* na replikaci studovaných virů byly prováděny v řadě modifikací. Byl zkoumán vliv různých koncentrací proteinů v použitém extraktu slin (1-40  $\mu\text{g/ml}$ ) (Obr. 4.3, Obr. 4.4), tyto koncentrace se od sebe v účinku prokazatelně nelišily. Pro další pokusy byla vybrána koncentrace proteinů 20  $\mu\text{g/ml}$ , která byla ověřena již v jiných experimentech, kde v této koncentraci sliny/SGE dosahovaly maximálního možného účinku (např. nejvyšší inhibiční efekt na přirozenou imunitu, aktivitu NK buněk - Kopecký a Kuthejlová, 1998; inhibice TNF  $\alpha$  aktivity - Koník a spol., 2006). Byly také vyzkoušeny dva alternativní postupy infekce a to jednak po infekci ponechat virus adsorbovat 1 hodinu a poté roztok v jamce nahradit čerstvým kultivačním médiem (Obr. 4.5a), či po infekci infekční médium ponechat až do okamžiku odběru vzorku (Obr. 4.5b). Vhodnější se ukázal být první z postupů a proto byl také dále používán (Pozn. z pokusů, jejichž výsledky zde nejsou zobrazeny, vyplynulo, že adsorbce viru, jakož i jeho penetrace do buněk probíhá velmi rychle, za 1 hodinu p.i. bylo již značné množství viru lokalizováno intracelulárně. Na základě toho odpadla potřeba inokulum v jamkách ponechávat). Byla-li zaznamenána potenciace replikace některého z virů působením SGE, šlo o první časový interval 24 hodin (Obr. 4.6). Tento jev ovšem buď nebyl statisticky průkazný či se se tento efekt nepotvrdil při následných opakováních.



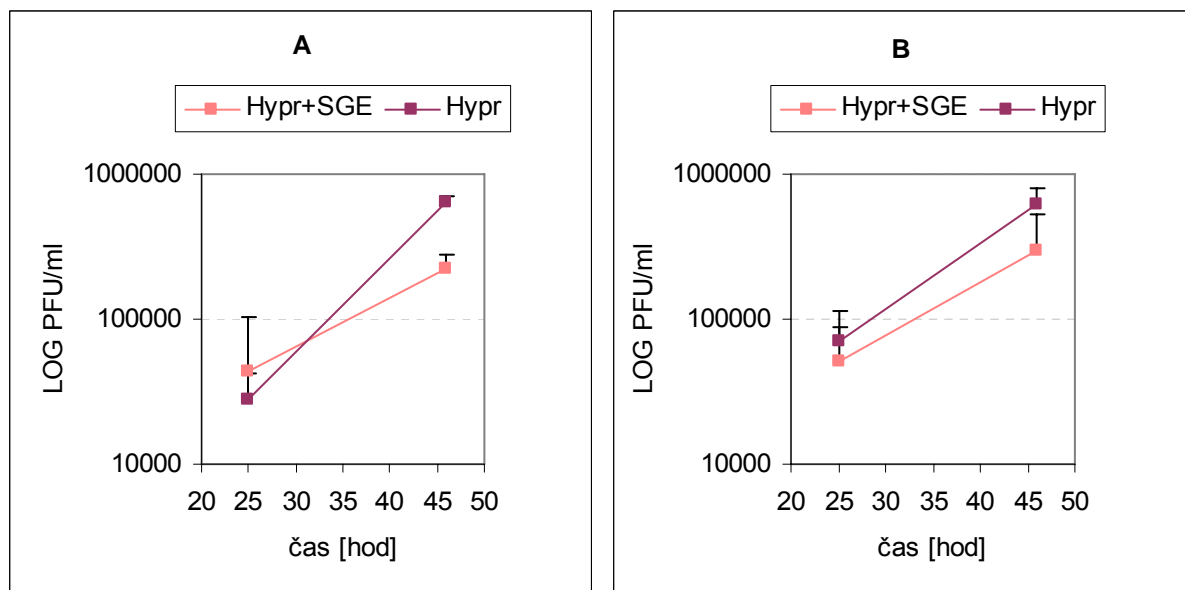
SGE neměl prokazatelný účinek ani na replikaci viru myší encefalomyokarditidy v buňkách L929 (Obr. 4.7).



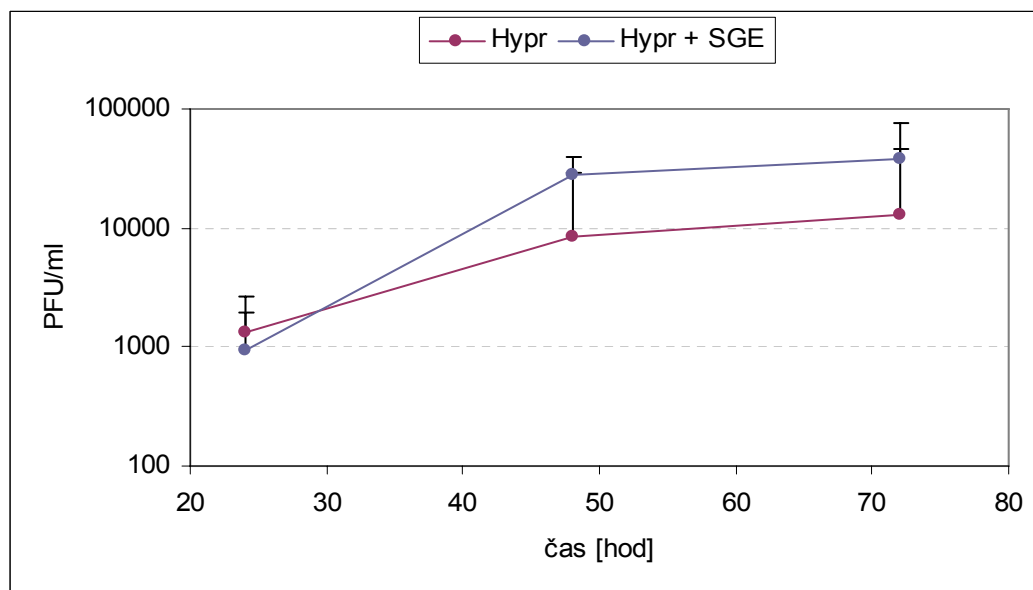
**Obr. 4.3** Vliv různých koncentrací SGE na replikaci viru Hypr v buňkách PMJ2-R. Multiplicita infekce  $1,25 \times 10^{-2}$  PFU/buňku. Koncentrace proteinů roztoku SGE 35, 18 a 9 µg/ml.



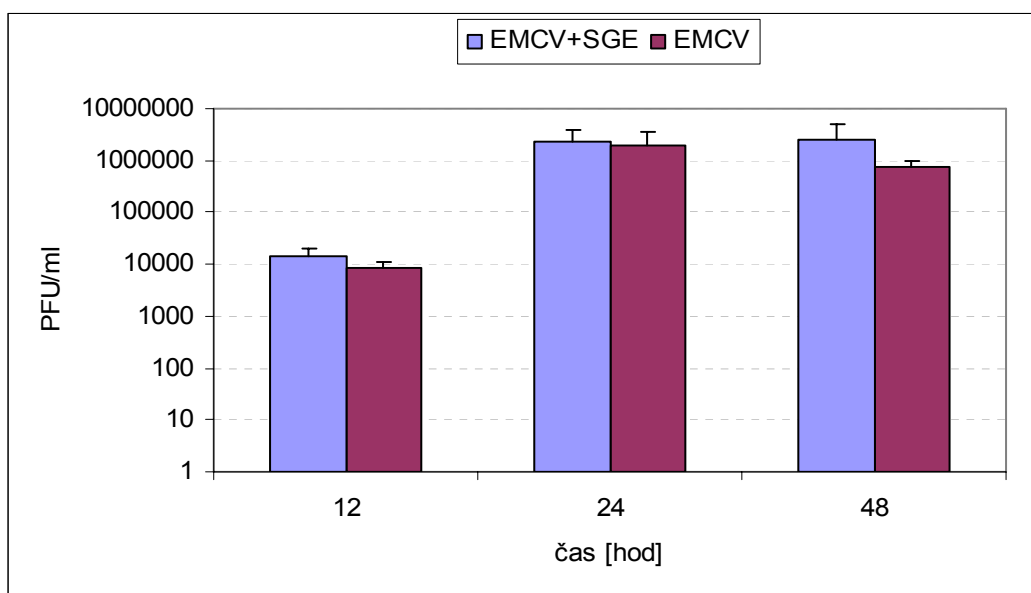
**Obr. 4.4** Vliv různých koncentrací SGE na replikaci viru Hypr v buňkách L929. Multiplicita infekce  $6,7 \times 10^{-5}$  PFU/buňku. Koncentrace proteinů roztoku SGE 24, 12 a 6 µg/ml.



**Obr 4.5** Vliv SGE na replikace viru Hypr v buňkách L929. výsledky na základě provedení dvou experimentálních přístupů infekce; **(a)** roztok viru po 1 hod adsorpce nahrazen čerstvým médiem, **(b)** virus ponechán v jamkách až do doby odběru vzorků. Multiplicita infekce  $6,7 \times 10^{-5}$  PFU/buňku, koncentrace SGE  $20\mu\text{g}$  proteinů/ml.



**Obr. 4.6** Vliv SGE na replikaci viru Hypr v buňkách L929. Multiplicita infekce  $6,7 \times 10^{-5}$  PFU/buňku, koncentrace SGE  $20\mu\text{g}$  proteinů/ml.



**Obr. 4.7** Vliv SGE na replikaci EMCV v buňkách L929. Multiplicita infekce  $3,3 \times 10^{-3}$  PFU/buňku, koncentrace SGE 20 $\mu$ g proteinů/ml.

#### Ovlivnění replikace studovaných klíštěcími slinami

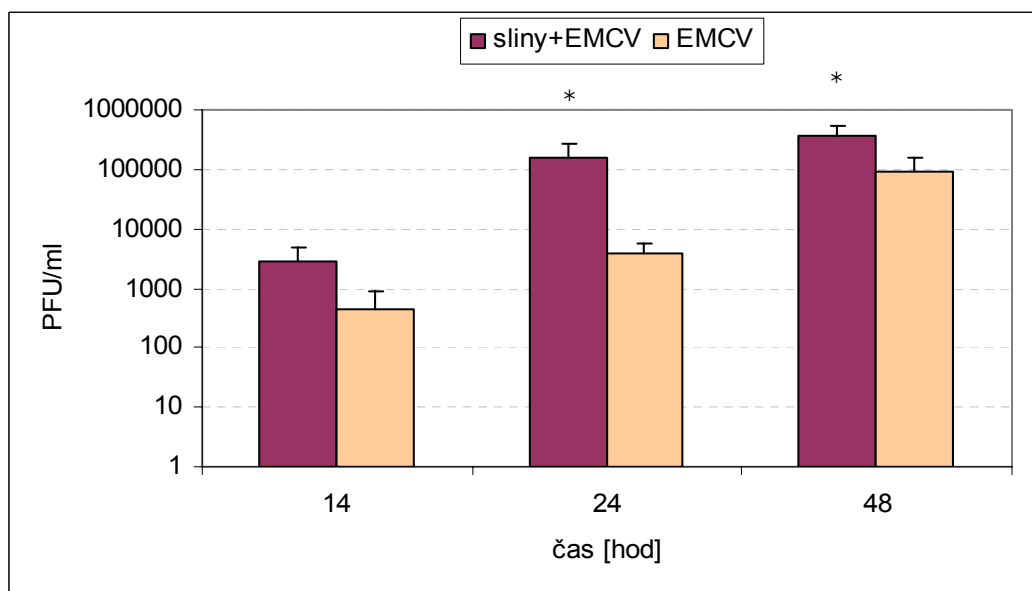
Z důvodů nízké reprodukovatelnosti pokusů v extraktem ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus* byly v další fázi experimentů používány klíštěcí sliny. Titr virů byl stanovován v časových intervalech 12-16 hodin, 24 a 48 hodin p.i.; v pozdějším časovém intervalu (72 h p.i.) již jamky obsahovaly značné množství buněčných debris, proto nebyly vzorky odebrané v tuto dobu již dále analyzovány.

Správnost experimentálního přístupu byla ověřena použitím viru EMCV, jehož replikace byla signifikantně zvýšena v buňkách L929 po ošetření slinami v časových intervalech 24 a 48 hodin (Obr. 4.8). Nejvýraznější zvýšení replikace EMCV bylo zaznamenáno 24 hodin p.i., titr viru byl vyšší ve skupině ošetřené slinami o zhruba 1,5 log<sub>10</sub> PFU/ml.

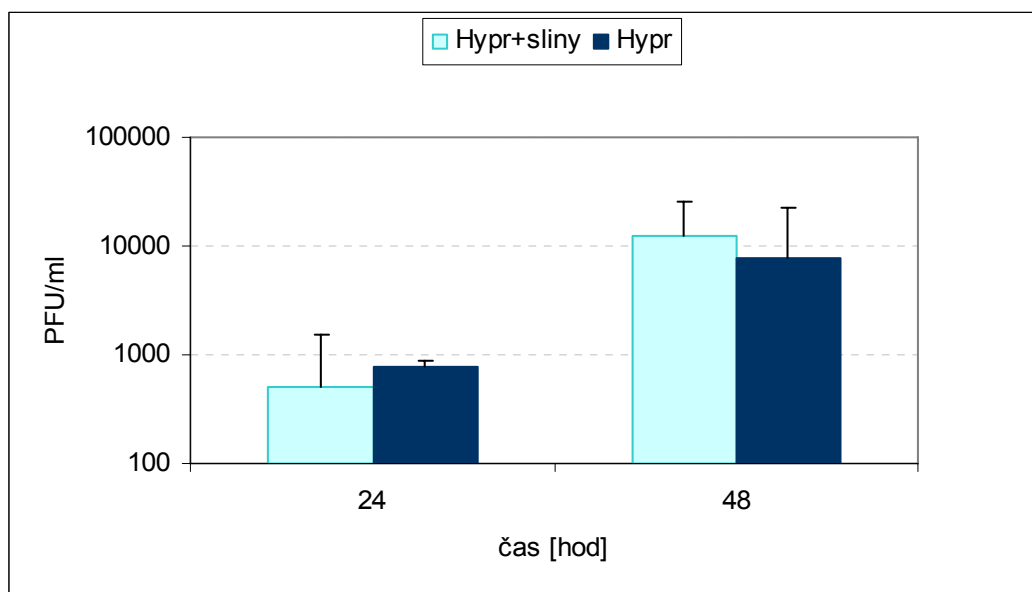
V experimentech s virem klíšťové encefalitidy, kmenem Hypr, bylo dosaženo podobných výsledků ve srovnání s experimenty, kde byly buňky ošetřeny SGE. V žádné buněčné linii nebyl pozorován průkazný rozdíl v titru viru bylo-li porovnáno množení v buňkách ošetřených roztokem slin a buňkami kontrolními, ošetřenými roztokem pilokarpinu (viz 3.7) (Obr. 4.9). Kmen Hypr se sice v některých experimentech replikoval intenzivněji po ošetření slinami v buněčné linii PS, avšak tento rozdíl nebyl statisticky průkazný. Statistické signifikance nebylo dosaženo ani v případě analýzy většího množství paralelně odebraných vzorků (Obr. 4.10). Byl-li ovšem v analogickém pokusu s buňkami PS použit VKE kmen 166, titr viru byl signifikantně vyšší v prvním časovém intervalu, 16 hodin p.i. (Obr. 4.11)

V buňkách ošetřených roztokem slin byl zaznamenán tít viru vyšší o přibližně 1 log<sub>10</sub> PFU/ml. V pozdějším časovém intervalu již nebyly rozdíly mezi skupinami patrné.

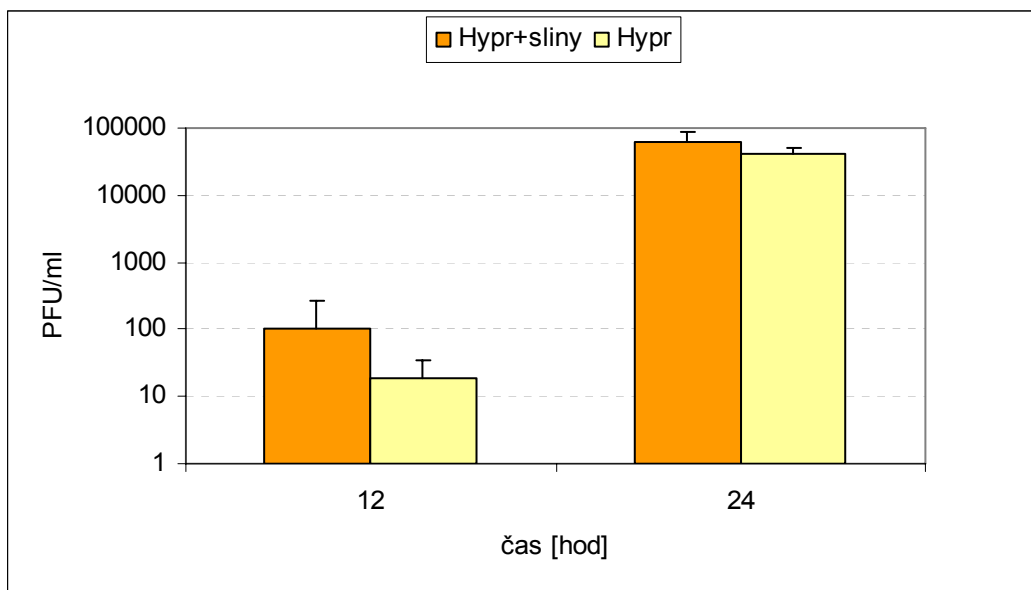
Sliny klíštěte *Ixodes ricinus* nemají statisticky průkazný vliv na replikaci VKE v buněčné kultuře, konkrétně kmene Hypr, avšak významně zvyšují replikaci přírodního izolátu VKE 166, jak bylo pozorováno v intervalu 16 hodin p.i. v kultuře PS buněk.



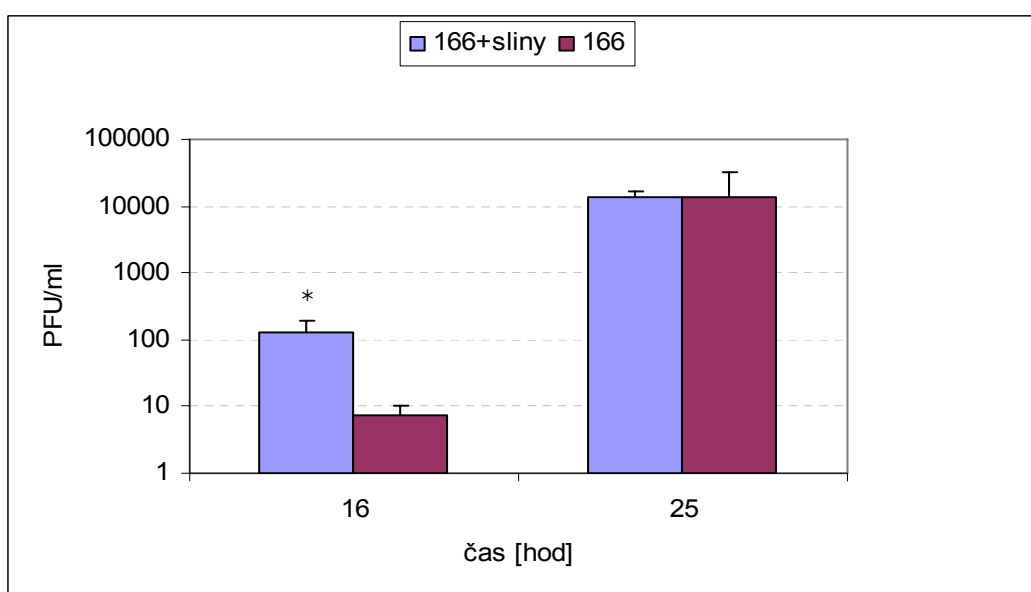
**Obr. 4.8** Vliv slin na replikaci viru EMCV v kultuře buněk L929. Multiplicita infekce  $3,3 \times 10^{-3}$  PFU/buňku, koncentrace slin 20µg proteinů/ml. \*.... P < 5%.



**Obr. 4.9** Vliv slin na replikaci viru Hypr v kultuře buněk L929. Multiplicita infekce  $6,7 \times 10^{-5}$  PFU/buňku, koncentrace slin 20µg proteinů/ml.



**Obr. 4.10** Vliv slin na replikaci kmene Hypr v kultuře buněk PS. Multiplicita infekce  $6,7 \times 10^{-5}$  PFU/buňku, koncentrace slin  $20 \mu\text{g}$  proteinů/ml.



**Obr. 4.11** Vliv slin na replikaci kmene viru KE 166 v kultuře buněk PS. Multiplicita infekce  $1,3 \times 10^{-5}$  PFU/buňku, koncentrace slin  $20 \mu\text{g}$  proteinů/ml. \*....  $P < 5\%$

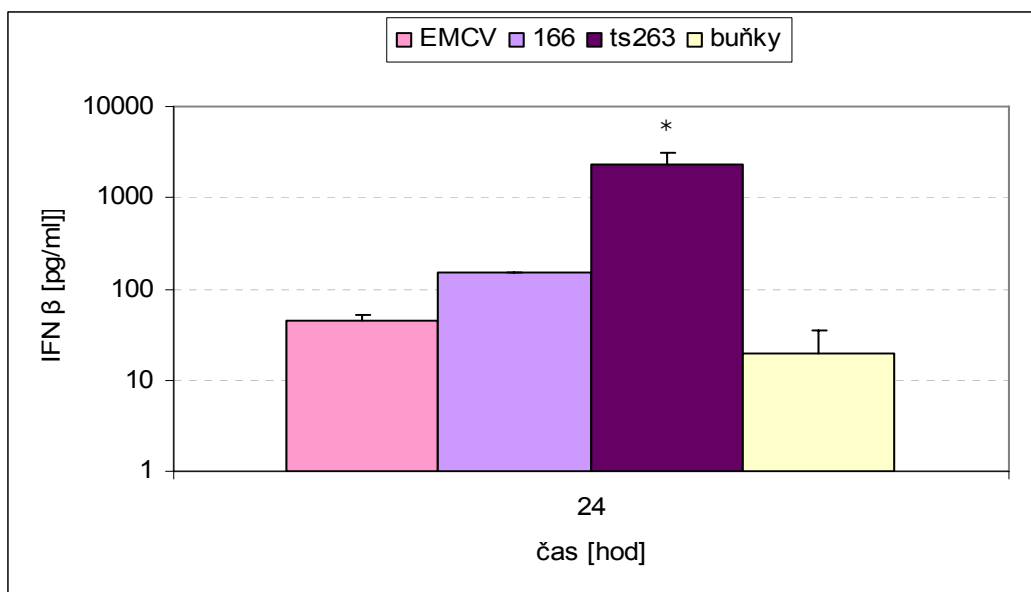
### 4.3. Stimulace produkce IFN $\beta$ v L929

Produkcí IFN  $\beta$  se podařilo nastimulovat pouze jediným virem a to termosenzitivní mutantou VKE ts263. Po infekci virem 166 a EMCV nebyla produkce IFN  $\beta$  prokazatelně

zvýšena oproti kontrolní skupině samotných buněk (Obr. 4.12). Byly-li buňky stimulovány virem ts263, největší množství interferonu bylo detekováno 8 hodin po stimulaci a to 14000 pg/ml. V pozdějších časových intervalech se množství proteinu mírně snižovalo (Obr. 4.13). Množství vyprodukovaného cytokinu se pohybovalo v rozmezí 700-14 000 pg/ml.

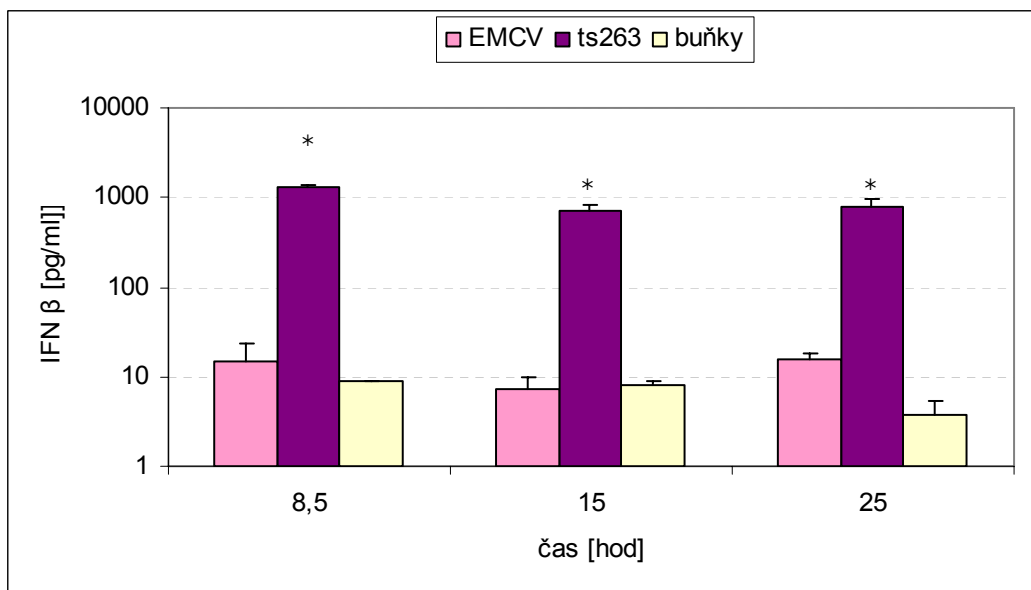
#### 4.4. Vliv slin na produkci IFN $\beta$

Ošetření buněk L929 roztokem slin nemělo prokazatelný vliv na produkci IFN  $\beta$  v porovnání s buňkami ošetřenými kontrolním roztokem pilokarpinu (Obr. 4.14). v experimentu byly použity sliny, které měly pozitivní účinek na replikaci viru v jiných pokusech, v koncentraci 20  $\mu\text{g/ml}$ . Při mikroskopickém pozorování byly zaznamenány po aplikaci slin morfologické změny buněk, zejména jejich zakulacení. Na základě zjištěných výsledků je možno konstatovat, že sliny klíštěte *Ixodes ricinus* nemají vliv na produkci IFN  $\beta$  v buněčné linii L929.

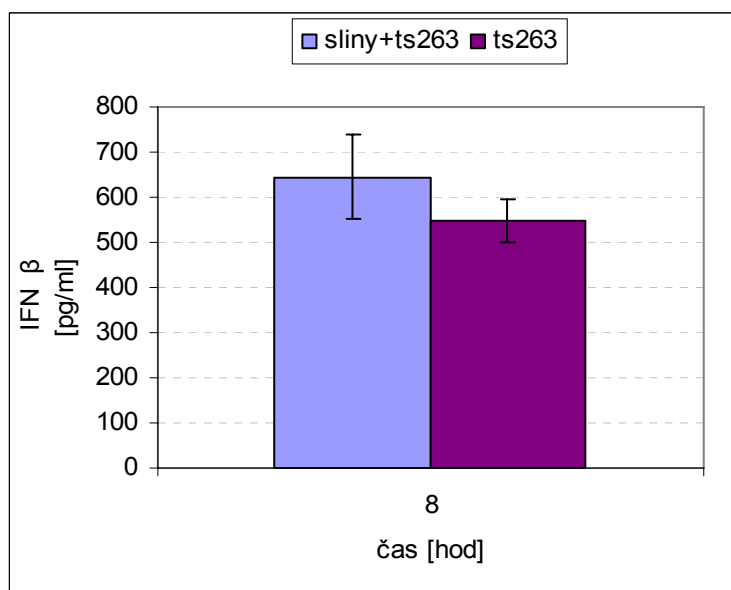


**Obr. 4.12** Produkce IFN  $\beta$  v buňkách L929 po stimulaci viry EMCV, 166, ts263.

Multiplicita infekce  $6,6 \times 10^{-2}$ ,  $3 \times 10^{-3}$  a 5 PFU/ buňku. \*... P <5%.



**Obr. 4.13** Dynamika produkce IFN β v buňkách L929. Multiplicita infekce EMCV  $6,6 \times 10^{-2}$ , ts263 5 PFU/buňku. \*....  $P < 5\%$ .



**Obr 4.14** Vliv slin na produkci IFN β v kultuře buněk L929. Koncentrace slin 20 μg proteinu/ml. Multiplicita infekce 1 PFU/buňku. Pro každou skupinu byly vyhodnoceny 3 vzorky, obrázek reprezentuje výsledek ze 2 opakování.

## 5. Diskuse

Vliv klíštěcích slin, včetně slin klíštěte *Ixodes ricinus*, na přenos viru klíšťové encefalitidy byl *in vivo* nejednou dokumentován. Byl zjištěn jak nepřímý vliv slin, tzv. slinami aktivovaný přenos (Labuda a spol., 1993b, Labuda a spol., 1993c, Alekseev a Chunikhin, 1990), tak i přímé ovlivnění přenosu VKE slinami (SGE) (Labuda a spol., 1993a). Došlo k výraznému zvýšení procenta nakažených klíšťat (nymf) v případě, byl-li virus inokulován do hostitele společně se slinami. V *in vitro* podmínkách je vliv slin členovce (klíštěte/komára) na virovou replikaci zaznamenáván méně často, avšak i takové případy existují. Jedná se např. o virus vesikulární stomatitidy (VSV), komáry přenášený arbovirus, jehož replikační kinetika byla zvýšena po ošetření buněk homogenátem komářích slinných žláz (Limesand a spol., 2003). Obdobný efekt na replikaci VSV byl překvapivě zaznamenán také po ošetření buněk klíštěcím slinným extraktem, ačkoliv tento virus klíšťaty přenášen není (Hajnická a spol., 1998).

Studium přímého efektu klíštěcích slin na replikaci VKE v *in vitro* podmínkách se ukázalo být problematickým. U českého prototypového kmene Hypr nebylo pozorováno ovlivnění replikační kinetiky v buněčné kultuře slinami ani SGE klíštěte *Ixodes ricinus*. Podporuje to všeobecně panující názor, že potenciace virové infekce v hostiteli je spíše o souhrou dějů, které se v místě klíštěcího sání odehrávají. Dochází k mobilizaci hostitelské imunitní odpovědi a do místa sání migruje řada buněk imunitního systému; proteiny ve slinách obsažené tak v místě sání ovlivňují širokou škálu hostitelských mechanismů a buněčných druhů. Není proto tak překvapivé, že *in vitro* efekt slin nebyl pozorován.

Potenciační účinek slin na replikaci viru 166 ve srovnání s neprůkaznými výsledky u českého prototypového kmene Hypr je možné vysvětlit tím, že kmen Hypr byl již od padesátých let minulého století laboratorně využíván, tudíž prošel nesčetným množstvím pasáží v mozku sajících myšek. Je pravděpodobné, že tím došlo ke ztrátě určitých biologických vlastností, které jsou vlastní kmenům KE cirkulujícím v přírodě. Bylo kupříkladu zjištěno, že v průběhu pasážování jak v mozcích sajících myšek, tak také v buněčné linii dochází ke spontánním delecím v genomu (3'UTR) viru klíšťové encefalitidy (Mandl a spol., 1998). V tomto ohledu je kmen KE 166 reprezentativnější, svými vlastnostmi bližší kmenům vyskytujícím se v přírodě, neboť prošel pouze jednou mozkovou pasáží.

Potenciace infekce virem 166 v prvním studovaném intervalu, kdy v neošetřených buňkách bylo množství viru na hranici detekovatelnosti, v druhé skupině, ovlivněné slinami titr přesahoval 100 PFU/ml (Obr 4.11). Naznačuje to, že v buňkách ovlivněných slinami jsou



viry schopné replikovat se rychleji. V případě viru vesikulární stomatitidy (VSV), bylo možno v buňkách ošetřených extraktem ze slinných žláz virus detekovat už po 12 hodinách, zatímco v neošetřených až za 18 hodin (Limesad a spol., 2003). Urychlený proces replikace ve slinami ovlivněných buňkách podporují i výsledky Hajnické spol. (1998), kdy byl pozorován časnější výskyt nukleokapsidového proteinu VSV v cytoplasmě buněk ošetřených klišťecími slinami v porovnání s kontrolou.

Nižší stimulační účinek SGE ve srovnání se slinami při replikaci viru EMCV je možno vysvětlit obsahem řady balastních proteinů, které se v průběhu přípravy - homogenizace celých slinných žláz - logicky do extraktu dostávají. Tyto balastní proteiny mohou např. stimulovat ty složky imunitní odpovědi, které sliny samotné potlačují či inaktivovat některé z enzymů ve slinách obsažených.

Ve slinách tyto balastní proteiny obsaženy nejsou, avšak problémem jejich použití je induktor jejich produkce - pilokarpin. Je známo, že určité množství pilokarpinu přechází do slin v průběhu jejich získávání a má řadu biologických vlastností (stahuje hladké svalstvo, ovlivňuje krevní tlak, inhibuje funkce lymfocytů (Ribeiro a spol., 2004), které by mohly získané výsledky ovlivnit. Tomu jsme předešli tím, že jsme do kontrolních jamek přidávali roztok pilokarpinu v koncentraci navržené Ribeirem a spol. (2004).

Atraktivní hypotézou je, že potenciace arbovirové infekce v obratlovčím hostiteli slinami by mohla být podmíněna modulací hostitelské IFN  $\alpha/\beta$  odpovědi. Tato hypotéza se částečně potvrdila v případě VSV. Jedná se o virus velmi citlivý k IFN odpovědi a zatímco v L929 buněčné linii bylo množství viru zvýšeno po použití komářího slinného homogenátu, tento jev se nevyskytoval, byly-li VSV infikovány buňky VERO, známé tím, že jsou deficientní v IFN  $\alpha/\beta$  odpovědi (Limesand a spol., 2003).

Proto nás zajímalo, jestli klišťecí sliny nějakým způsobem neovlivňují právě produkci IFN  $\beta$  ( $\beta$  kvůli tomu, že pokusné buňky byly z fibroblastové linie).

Nejprve bylo zapotřebí stimulaci produkce tohoto cytokinu v buňkách navodit.

Virus EMCV se neukázal být dobrým induktorem produkce IFN  $\beta$  v buňkách L929. Je to v souladu s poznatkem, že EMCV snižuje aktivitu protivirových enzymů, jejichž syntézu IFN v buňkách indukuje. Konkrétně snižuje aktivitu RNázy L, která je ve virem infikovaných buňkách zodpovědná za inhibici proteosyntézy a translace a nejspíše i za náslenou programovanou buněčnou smrt (Martinand a spol., 1998). Takto je EMCV schopen z provozu vyřadit hostitelskou IFN odpověď. Na druhou stranu je EMCV k interferonu velmi citlivý. Této citlivosti EMCV jak k IFN  $\alpha/\beta$ , tak i k IFN  $\gamma$  se využívá v testech, kdy se množství

interferonu stanovuje inhibicí cytopatického efektu EMCV způsobeným (Dahl a Degre, 1972). EMCV je tedy schopen produkci IFN blokovat, ale je-li IFN přidán z vnějšku, tak se tato schopnost ztrácí a je k IFN citlivý.

Arboviry všeobecně nejsou dobrými induktory IFN  $\alpha/\beta$  a existuje jen málo studií zkoumajících indukci interferonu při arbovirové infekci (Nuttall a Labuda, 2004). Oba typy IFN odpovědi (I i II) inhibují infekci flaviviry jak v buněčných liniích, tak také ve zvířeti. Typ I IFN blokuje flavivirovou infekci zamezením translace a replikace infekční virové RNA. (toto se odehrává alespoň částečně díky RNáze L, MX1 a na proteinkináze nezávislým mechanismem)(Diamond, 2003). Proto není divu, že se u řady flavivirů vyvinula schopnost tuto odpověď potlačit. Z flavivirů, které tuto vlastnost mají jmenujme kupříkladu virus Langat (Best a spol., 2005), virus západního Nilu, virus Kunjin, virus Dengue a virus žluté zimnice (Best a spol., 2005). Fakt, že VKE běžně nestimuluje produkci IFN jsme demonstrovali na příkladu VKE kmene 166 a dříve to bylo již demonstrováno u kmene Hypr (Pechová, 1996). Proto je zářející, že právě kmen ts263 stimuloval produkci IFN  $\beta$  tak výrazně. Je možné, že některá ze dvou unikátních záměn v genomu tohoto viru v nestrukturních proteinech NS2B a NS3, potenciálních determinant virulence (Růžek a spol., 2006), by mohla zaptřičinit tuto fenotypovou změnu. Tato místa mohla být původně klíčová ve virové inhibici hostitelské IFN odpovědi a mutacemi se tato schopnost ztratila.

Maximum produkce IFN  $\beta$  buňkami L929 po stimulaci virem ts263 jsme zaznamenali 8 hodin po stimulaci VKE ts263. Ve srovnání s jinými pracemi jde o velmi časná maximum. Např. po infekci virem newcastleské choroby bylo nejvyšší množství IFN  $\alpha/\beta$  zaznamenáno 15 hodin po infekci (Hoss-Homfeld, 1989) a po infekci virem vesikulární stomatitidy byla maximální produkce IFN  $\alpha$  zaznamenána 18 hodin p.i. (Limesand a spol., 2003). Námi zjištěná data ovšem neodporují zjištění, že geny IFN  $\alpha/\beta$  začínají být v L buňkách transkribovány 6 hodin po infekci virem vesikulární stomatitidy a v médiu je možné IFN detekovat 8 hodin p.i. (Nishiyama a spol., 1979).

Při zkoumání, zda klíštěcí sliny ovlivňují virem ts263 nastimulovanou produkci IFN  $\beta$ , jsme nepozorovali statisticky průkazné ovlivnění. To podporuje hypotézu vyslovenou Hajnickou a spol. (2000), že spíše než na produkce INF  $\alpha/\beta$  mají klíštěcí sliny vliv na protivirový účinek interferonu a to nejspíše blokováním receptoru na který se tyto cytokiny váží.

## 6. Souhrn

- Virus klíšťové encefalitidy se replikuje ve všech studovaných buněčných liniích. maximální titr v linii PS se blížil  $10^7$  PFU/ml 48 a 72 hodin p.i., v buněčných liniích L929 a PMJ2-R dosahoval nejvýše  $10^4$ - $10^5$  PFU/ml 48 hodin p.i.
- Extrakt ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus* nemá vliv na replikaci viru klíšťové encefalitidy kmene Hypr v buněčných liniích PS, L929 a PMJ2-R a na virus myší encefalomyokarditidy v buněčné linii L929.
- Sliny klíštěte *Ixodes ricinus* nemají prokazatelný vliv na replikaci VKE kmene Hypr v buněčných liniích PS, L929 a PMJ2-R.
- Sliny klíštěte *Ixodes ricinus* prokazatelně zvyšují replikaci VKE kmene 166 v buňkách PS 16 hodin p.i. o více než  $1 \log_{10}$  PFU/ml.
- Sliny klíštěte *Ixodes ricinus* prokazatelně zvyšují replikaci viru myší encefalomyokarditidy v buňkách L929 v časových intervalech 24 a 48 hodin p.i.
- Produkce IFN  $\beta$  v buňkách L929 je indukována virem KE kmenem ts263. Maximum cytokinu je produkováno 8 hodin po stimulaci a to 14000 pg/ml proteinu.
- Klíštěcí sliny nemají vliv na produkci IFN  $\beta$  v buňkách L929.

## 7. Literatura

- Adami D., Brunka M.J., Palleroni A.V., 1993.** *In vivo* immortalization of murine peritoneal macrophages: a new rapid and efficient method for obtaining macrophage cell lines. *Journal of Leukocyte Biology* 53: 475-478.
- Alekseev A.N., Chunikhin S.P., 1990.** The exchange of the tick-borne encephalitis virus between ixodid ticks feeding jointly on animals with a subthreshold level of viremia. *Medical Parasitology and Parasitological Disease* 2: 48-50.
- Bárdos V., Cupková E., 1962.** The Calovo virus - the second virus isolated from mosquitoes in Czechoslovakia. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology* 6: 186-192.
- Bárdos V., Danielová V., 1959.** The Tahyna virus - a virus isolated from mosquitoes in Czechoslovakia. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology* 3: 264-276.
- Barrett P.M., Dorner F., Plotkin S.A., 1999.** Tick-borne encephalitis vaccine. In: Plotkin S.A., Orenstein W.A. (Eds.), *Vaccines*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, A Division of Harcourt Brace and Company, Chapter 32, pp 767-780.
- Best S.M., Morris K.L., Shannon J.G., Robertson S.J, Mitzel D.N., Park G.S., Boer E., Wolfenbarger J.B., Bloom M.E., 2005.** Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. *Journal of Virology* 79: 12828-12839.
- Billinis C., Paschaleri-Papadopoulou E., Psychas V., Vlemmas J., Leontides S., Koumbati M., Kyriakis S. C., Papadopoulos O., 1999.** Persistence of encephalomyocarditis virus (EMCV) infection in piglets. *Veterinary Microbiology* 70: 171-177.
- Bishop R., Lambson B., Wells C., Pandit P., Osaso J., Nkonge C., Morzaria S., Musoke A., Nene V., 2002.** A cement protein of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* located in the secretory e cell granules of the type III salivary gland acini, induces strong antibody responses in cattle. *International Journal for Parasitology* 32: 833-842.
- Blaškovič D., 1954.** The epidemic of encephalitis in the Rožňava natural focus of infection. *Slovak Academy of Science, Bratislava*, p 265.

- Bradford M.M., 1976.** Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brossard M., Wikel S.K., 2004.** Tick immunobiology. *Parasitology* 129: S 161-176.
- Buc M., 2001.** *Imunológia*. Veda. Bratislava
- Dahl H., Degre M., 1972.** A micro assay for mouse and human interferon. *Acta pathologica and microbiologica Scandinavica, section B: microbiology and immunology* 80: 863-870.
- Daneš L., 2000.** Nákaza člověka virem klíšťové encefalitidy. *Medicína* 3: 16.
- Daniel M., Kříž B., Danielová V., Materna J., Rudenko N., Holubová J., Schwarzová L., Golovčenko M., 2004.** Výskyt viru klíšťové encefalitidy a klíšťat infikovaných borreliemi v horách. *Zprávy CEM* 13: 517-519.
- Danielová V., 1990.** Dissemination of arboviruses transmitted by mosquitoes in Czechoslovakia and epidemiologic consequences. *Československá epidemiologie, mikrobiologie, imunologie* 39: 353-358.
- Diamond M.S., 2003.** Evasion of innate and adaptive immunity by flaviviruses. *Immunology and Cell Biology* 81: 196-206.
- Domingo E., Escarmis C., Sevilla N., Moya A., Elena S.F., Quer J., Novella I.S., Holland J.J., 1996.** Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB Journal* 10: 859-864.
- Dumpis U., Crook D., Oksi J., 1999.** Tick-borne encephalitis. *Clinical Infectious Diseases* 28: 882-890.
- Earle W. R., 1943.** Production of malignancy *in vitro*. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells, *Journal of National Cancer Institute* 4: 165.
- 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. *Journal of General Virology* 80: 179-185.
- Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (Eds.), 2005.** *Virus taxonomy 8th report of its international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier-Academic press. Amsterdam.
- Gainer, J. H. 1967.** Encephalomyocarditis virus infections in Florida. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 151:421-424.
- Gajdusek, C. (1955).** Encephalomyocarditis infection in childhood. *Pediatrics* 16:819.

- Gillespie R.D., Dolan M.C., Piesman J., Titus R.G., 2001.** Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. *Journal of Immunology* 166: 4319-4326.
- Golovljova I., Vene S., Sjölander, K.B., Vasilenko V., Plyusnin A., Lundkvist A., 2004.** Characterization of tick-borne encephalitis virus from Estonia. *Journal of Medical Virology* 74: 580-588.
- Goodbourn S., Didcock L., Randall R.E., 2000.** Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology* 81: 2341-2364.
- Grešíková M., Kaluzová M., 1997.** Biology of tick-borne encephalitis virus. *Acta virologica* 41: 115-124.
- Grešíková M., Nosek J., 1981.** Arbovírusy v Československu. Veda, Bratislava. 132 s, 5.
- Gritsun T.S., Lashkevich V. A., Gould E. A., 2003.** Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research* 50: 129-146.
- Gubler D.J., 2001.** Human arbovirus infections worldwide. *Annals of the New York Academy of Sciences* 951:13-24.
- Hajnická V., Fuchsberger N., Slovak M., Kocakova P., Labuda M., Nuttall P.A., 1998.** Tick salivary gland extracts promote virus growth in vitro. *Parasitology* 116: 533-538.
- Hajnická V., Kocíková P., Sláviková M., Slovák M., Gašperík J., Fuchsberger N., Nuttall P.A., 2001.** Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. *Parasite Immunology* 23: 483-489.
- Hajnická V., Kocáková P., Slovák M., Labuda M., Fuchsberger N., Nuttall P.A., 2000.** Inhibition of the antiviral action of interferon by tick salivary gland extract. *Parasite Immunology* 22: 201-206.
- Hannier S., Liversidge J., Sternberg J.M., Bowman A.S., 1993.** *Ixodes ricinus* tick salivary gland extract inhibits IL-10 secretion and CD69 expression by mitogen-stimulated murine splenocytes and induces hyporesponsiveness in B lymphocytes. *Parasite Immunology* 25: 27-37.
- Hase T., Summers P.L., Eckels K.H., Baze W.B., 1987a.** Maturation process of Japanese encephalitis virus in cultured mosquito cells *in vitro* and mouse brain cells *in vivo*. *Archives of Virology* 96: 135-151.
- Hase T., Summers P.L., Eckels K.H., Punak J.R., 1987b.** An electron and immunoelectron microscopic study of dengue-2 virus infection of cultured mosquito cells: maturation event. *Archives of Virology* 92: 273-291.

- Heinz F.X., Collett M.S., Purcell R.H., Gould E.A., Howard C.R., Houghton M., Moormann R.J.M., Rice D.M., Theil H.J., 2000.** Family *Flaviviridae*. In: van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E., Estes M.K., Lemon S., Maniloff J., Mayo M.A., McGeogch D., Pringle C.R., Wickner R.B. (Eds.), Virus taxonomy. In: Proceedings of the 7th International Committee for the Taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego, California, 859-878.
- Heinz F.X., Kunz Ch., 1981.** Homogeneity of the structural glycoprotein from European isolates of tick-borne encephalitis virus: comparison with other Flaviviruses. *Journal of General Virology* 57: 263-274.
- Heinz F.X., Kunz Ch., 1982.** Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus: peptide mapping of large non-structural proteins of European isolates and comparison with other Flaviviruses. *Journal of General Virology* 62: 271-285.
- Hoss-Homfeld A., Zwarthoff E.C., Zawatsky R., 1989.** Cell type specific expression and regulation of murine interferon  $\alpha$  and  $\beta$  genes. *Virology* 173: 539-550.
- Hubálek Z., Juřicová Z., Svobodová S., Halouzka J., 1993.** Z. A serologic survey for some bacterial and viral zoonoses in game animals in the Czech Republic. *Journal of Wildlife Diseases* 29: 604-607.
- Hubálek Z., Halouzka J., 1996.** Arthropod-borne viruses of vertebrates in Europe. *Acta scientiarum naturalium Academiae scientiarum bohemoslovacae Brno, Brno.* 95 s.
- Hubálek Z., Halouzka J., 1999.** West Nile Fever-a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerging Infectious Diseases* 5: 643-650.
- Hubálek Z., Halouzka J., Juricová Z., Šebesta O., 1998.** First isolation of mosquito-borne West Nile virus in the Czech Republic. *Acta virologica* 42: 119-120.
- Christianson W.T., Kim H.S., Joo H.S., Barnes D.M., 1990.** Reproductive and neonatal losses associated with possible encephalomyocarditis virus infections in pigs. *The Veterinary Record* 126: 54-57.
- Christianson W.T., Kim H.S., Yoon I.J., Joo H.S. 1992.** Transplacental infection of porcine fetuses following experimental challenge inoculation with encephalomyocarditis virus. *American Journal of Veterinary Research* 53: 44-47.
- Inoue Y., K., Ogura R., 1962.** Studies on Japanese B encephalitis virus. 3. Propagation and assay of Japanese B encephalitis virus in a stable line of porcine kidney cells. *Virology* 16: 205-207.

- Jääskeläinen A.E., Tikkakoski T., Uzcátegui N.Y., Vaheri A., Vapalahti O., 2006.** Focus of Siberian subtype TBEV in Kokkola Archipelago, Western Finland. *Journal of Clinical Virology* 36: S48-S49.
- Jones L.D., Davies C.R., Steele G.M., Nuttall P.A., 1987.** A novel mode of arbovirus transmission involving a nonviraemic host. *Science* 237: 775-777.
- Joo, H. S. 1999.** Encephalomyocarditis virus. In: Straw B.E., D'Allaire S., Mengeling W.L., Taylor D.J. (Eds.), *Diseases of swine*, 8th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 139–144.
- Joo, H.S., Kim, H.S., Leman, A.D., 1988.** Detection of antibody to encephalomyocarditis virus in mummified or stillborn pigs. *Archives of Virology* 100: 131-134.
- Koenen F., De Clercq K., Lefebvre J., Strobbe R., 1994.** Reproductive failure in sows following experimental infection with a Belgian EMCV isolate. *Veterinary Microbiology* 39: 111-116.
- Koník P., Slavíková V., Salát J., Řezníčková J., Dvorožňáková E., Kopecký J., 2006.** Anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  activity in *Ixodes ricinus* saliva. *Parasite Immunology* 28: 649-656.
- Kopecký J., Křivanec K., Tomková E., 1991.** Attenuated temperature - sensitive mutants of tick-borne encephalitis (TBE) virus isolated from natural focus. In: Dusbábek F., Bukva V. (Eds.). *Modern Acarology*. Academia, Prague and SPB Academic Publishing bv, The Hague. Vol. 2, pp. 11-19.
- Kopecký J., Kuthejlová M., 1998.** Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanisms of natural immunity *in vitro*. *Parasite Immunology* 20: 169-174.
- Kopecký J., Kuthejlová M., Pechová J., 1999.** Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon- $\gamma$  by upregulating of interleukin-10. *Parasite Immunology* 21: 351-356.
- Korenberg E.I., 2000.** Seasonal population dynamics of *Ixodes* ticks and tick-borne encephalitis virus. *Experimental and Applied Acarology* 24: 665-681.
- Kovář L., 2004.** Tick saliva in anti-tick immunity and pathogen transmission. *Folia microbiologica* 49: 327-336.
- Kovář L., Kopecký J., Říhová B., 2002.** Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick modulates the host immune response towards the Th2 cytokine profile. *Parasitology Research* 88: 1066-1072.



- Kubes M., Fuchsberger N., Labuda M., Zuffová E., Nuttall P.A., 1994.** Salivary gland extracts of partially fed *Dermacentor reticulatus* ticks decrease natural killer cell activity *in vitro*. *Immunology* 82: 113-116.
- Křivanec K., Kopecký J., Tomková E., Grubhoffer L., 1988.** Isolation of TBE virus from the tick *Ixodes hexagonus*. *Folia parasitologica* 35: 273-276.
- Labuda M., Austyn J.M., Zuffova E., Kozuch O., Fuchsberger N., Lysy J., Nuttall P.A., 1996.** Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology* 219: 357-366.
- Labuda M., Jones L.D., Williams T., Nuttall P.A., 1993a.** Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts. *Medical and Veterinary Entomology* 7: 193-196.
- Labuda M., Jones L.D., Williams T., Danielova D., Nuttall P.A., 1993b.** Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between co-feeding ticks. *Journal of Medical Entomology* 30: 295-299.
- Labuda M., Kozuch O., Zuffova E., Eleckova E., Hails R.S., Nuttall P.A., 1997.** Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks co-feeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology* 235: 138-143.
- Labuda M., Nuttall P.A., Kozuch O., Elecková E., Williams T., Zuffova E., Sabo A., 1993c.** Non-viremic transmission of tick-borne encephalitis virus. A mechanism for arborvirus survival in nature. *Experientia* 49: 802-805.
- Laurie B.A., Lwamba H.L.C., Murtaugh M.P., Palmenberg A.C et al., 2001.** Porcine Encephalomyocarditis virus persists in pig myocardium and infects human myocardial cells. *Journal of Virology* 75: 11621-11329.
- Lawrie C.H., Sim R.B., Nuttall P.A., 2005.** Investigation of the mechanisms of anti-complement activity in *Ixodes* ticks. *Molecular Immunology* 42: 31-38.
- Leyssen P., De Clercq E., Neyts J., 2000.** Perspectives for the treatment of infections with *Flaviviridae*. *Microbiology Reviews* 13: 67-82.
- Limesand K.H., Higgs S., Pearson L.D., Beaty B.J., 2003.** Effect of mosquito salivary gland treatment on vesicular stomatitis New Jersey virus replication and interferon  $\alpha/\beta$  expression *in vitro*. *Journal of Medical Entomology* 40: 199-205.
- Lobings M., Müllbacher A., Wang Y., Pavy M., Lee E., 2003.** Role of type I and II interferon responses in recovery from infection with an encephalitic flavivirus. *Journal of General Virology* 84: 567-572.

- Lundkvist A., Vene S., Golovljova I., Mavtchuotko V., Forsgren M., Kalnina V., Plyusnin A., 2001.** Characterization of tick-borne encephalitis virus from Latvia: Evidence for co-circulation of three distinct subtypes. *Journal of Medical Virology* 65: 730-735.
- Luňáčková J., Chmelík V., Šípová I., Žampachová E., Bečvářová J., 2003.** Epidemiologic monitoring of tick-borne encephalitis in Rimov in Southern Bohemia. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie* 52: 51-58.
- de Madrid and Porterfield, 1969:** A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bulletin of the World Health Organization* 40: 113 - 121.
- Mandl C.W., Holzmann H., Meixner T., Rauscher S., Stadler P.F., Allison S.L., Heinz F.X., 1998.** Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of a flavivirus. *Journal of Virology* 72: 2132-2140.
- Martinand C., Salehzada T., Silhol M., Lebleu B., Bisbal C., 1998.** RNase L inhibitor (RLI) antisense constructions block partially the down regulation of the 2-5A/RNase L pathway in encephalomyocarditis virus-(EMCV)-infected cells. *European Journal of Biochemistry* 254: 248-255.
- Merji N., Rutti B., Brossard M., 2002.** Immunosuppressive effects of *Ixodes ricinus* tick saliva or salivary gland extracts in innate and acquired immune response of BAB/C mice. *Parasitology research* 88: 192-197.
- Murnane T.G., 1981.** Encephalomyocarditis. In: Beran G.W. (Ed.), *CRC handbook series in zoonoses, section B, Viral Zoonoses*. CRC Press, Boca Raton, Fla., Vol. 2., pp. 137-147.
- Nawrocka E., 1975.** Characteristics of tick-borne encephalitis circulating in Poland. *Acta microbiologica polonica. Series A: Microbiologia generalis* 7: 273-245.
- Ng M.L., 1987.** Ultrastructural studies of Kunjin virus-infected *Aedes albopictus* cells. *Journal of General Virology* 68: 103-120.
- Ng M.L., Tan S.H., Chu J.J.H., 2001.** Transport and budding at two distinct sites of visible nucleocapsids of West Nile (Sarafend) virus. *Journal of medical virology* 65: 758-764.
- Nishiyama Y., Ito Y., Shimokata K., Kimura Y., 1979.** The induction of interferon by vesicular stomatitis virus in mouse L cells. *Microbiology and Immunology* 23: 233-247.
- Nunn M.S., Sharma A., Paesen G.C., Adamson S., Willis a.C., Nuttall P.A., 2005.** Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Journal of Immunology* 174: 2084–2091.

- Nuttall P.A., Jones, L.D., 1991.** Non-viraemic tick-borne transmission: mechanism and significance. In: Modern Acarology (Ed. Dusbabek F., Bukva V.), pp 3-6. Prague and the Hague, Academia and SPB Academic Publishing bv.
- Nuttall P.A., Labuda M., 2004.** Tick-host interactions: saliva-activated transmission. Parasitology 129: S177-S189.
- Pastorek J., 1998.** Pikornavírusy (čelad' Picornaviridae). In: Žemla J., Čiampor F., Labuda M.(Eds.). Špeciálna virológia. Slovak Academic Press. 116-120.
- Pechová J., 1996.** Vliv extraktů ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus* na indukci interferonu a replikaci viru klíšťové encefalitidy. Bakalářská práce. Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. 18s .
- Pospíšil L., Jandásek L., Pešek J., 1954.** Isolace nových kmenů virusu meningoencefalitidy v brněnském kraji za letní období 1953. Lékařské listy 9: 3-5.
- Ramachandra R.N., Wikel S.K., 1992.** Modulation of host-immune responses by ticks (*Acari: Ixodidae*): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. Journal of Medical Entomology 29: 818-826.
- Ramamoorthi N., Narasimhan S., Pal U., Bao F., Yang X.F. et al., 2005.** The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. Nature 436: 573-577.
- Rampas J., Gallia F., 1949.** Isolace virusu encefalitidy z klíšťat *Ixodes ricinus*. Časopis lékařů českých 88: 1179-1181.
- Reddacliff L. A., Kirland P. D., Hartley W. J., Reece R. L., 1997.** Encephalomyocarditis virus infections in an Australian zoo. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 28:153-157.
- Ribeiro J.M.C., 1987.** *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity. Experimental Parasitology 64: 347-353.
- Ribeiro J.M.C, Zeidner N.S., Ledin K., Dolan M.C., 2004.** How much pilocarpine contaminates pilocarpine-induced tick saliva?. Medical and Veterinary Entomology 18: 20-24.
- Rosický B., Černý V., Daniel M., Dusbábek F., 1979.** Roztoči a klíšťata škodící zdraví člověka. Academia, Praha. 208s.
- Růžek D., Kopecký J., Štěrba J., Golovchenko M., Rudenko N., Grubhoffer L., 2006.** Non-virulent strains of TBE virus circulating in the Czech Republic. Journal of Clinical Virology 36: S41.
- Růžek D., Šťastná H., Kopecký J., Golovljova I., Grubhoffer L., 2007.** Rapid subtyping of tick-borne encephalitis virus-isolates using multiplex RT-PCR. Journal of Virological Methods. *In press.*

- Sanders M.L., Scott A.L., Glass G.E., Schwartz B.S., 1996.** Salivary gland changes and host antibody responses associated with feeding of male lone star ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 33: 628-634.
- Sriurairatna S., Bhamarapravati N., Phalavadhtana O., 1973.** Dengue virus infection of mice: morphology and morphogenesis of dengue type-2 virus in suckling mouse neurons. *Infection and Immunity* 8: 1017-1028.
- Stark G.R., Kerr I.M., Williams B.R.G., Silverman R.H., Schreiber R.D., 1998.** How cells respond to interferons. *Annual Review of Biochemistry* 67: 227-264.
- Süss J., 2003.** Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine* 21: S1/19-S1/35.
- Süss J., Schrader C., 2004.** Durch Zecken übertragene humanpathogene und bisher als apathogen geltende Mikroorganismen in Europa. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* 47: 392-404.
- Šenigl F., Grubhoffer L., Kopecký J., 2006.** Differences in maturation of tick-borne encephalitis virus in mammalian and tick cell line. *Intervirology* 49: 239-248.
- Valenzuela J.G., Charlab R., Mather T.N., Ribeiro J.M.C., 2000.** Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry* 275: 18717-18723.
- Wang H., Kaufman W.R., Nuttall P.A., 1999.** Molecular individuality: polymorphism of salivary gland proteins in three species of Ixodid tick. *Experimental and Applied Acarology* 23: 969-975.
- Wang H., Nuttall, P.A., 1999.** Immunoglobulin binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56: 286-295.
- Wells S. K., Gutter A. E., 1989.** Encephalomyocarditis virus: epizootic in a zoological collection. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 20: 291-296.
- Wikel S.K., 1999.** Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *International Journal for Parasitology* 29: 851-859.

**Internetové zdroje:**

EpiDat - databáze Státního zdravotního ústavu v Praze: <http://www.szu.cz/cem/epidat/>  
 databáze GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>