Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra medicínské biologie

Výskyt viru klíšťové encefalitidy v klíštěti *Ixodes ricinus* v nadmořských výškách nad 600 m n.m.

Bakalářská práce

Patrik Kilian

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.

Školitel specialista: Mgr. Václav Hönig

České Budějovice, 2008

Kilian P., 2008: Výskyt viru klíšťové encefalitidy v klíštěti *Ixodes ricinus* v nadmořských výškách nad 600 m n. m. [The occurence of the tick-borne encephalitis virus in the tick *Ixodes ricinus* in altitudes above 600 m a.s.l., Bc. Thesis, in Czech].

Annotation:
A total of 325 ticks collected in the Krkonoše National Park (Czech Republic) in altitudes above 600 m a.s.l. and 253 ticks from a periurban area of České Budějovice were investigated for the presence of tick-borne encephalitis virus.

Práce byla finančně podpořena granty:
GAČR 524106/1479, MSM 600 766 5801

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracoval samostatně jen s použitím uvedené 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 30. dubna 2008 .....

Patrik Kilian

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval především svému školiteli – specialistovi Mgr. Václavu Hönigovi za ochotu, trpělivost, cenné rady, odborné vedení a přátelský vztah v průběhu celé mé práce. Velký dík též patří mému školiteli a vedoucímu laboratoře Molekulární biologie vektorů a patogenů Prof. RNDr. Liboru Grubhofferovi, CSc. za možnost pracovat právě v této laboratoři a též velmi přátelský vztah. Můj dík patří také RNDr. Danielu Růžkovi a Mgr. Jánu Štěrbovi za vřelé přijetí do laboratoře a hodnotné rady při řešení laboratorních zapeklitostí. D. Růžkovi pak zvláště za pomoc a poskytnutí doplňujících údajů pro fylogenetický stromeček. Také bych chtěl poděkovat svým kolegům studentům a všem ostatním zaměstnancům za příjemné pracovní prostředí. Dále děkuji Mgr. Janu Maternovi, Ph.D., RNDr. Vlastě Danielové, DrSc. a RNDr. Milanu Danielovi DrSc. za poskytnutí vzorků klíšťat z Krkonošského národního parku.

Obsah

Obsah 3
Seznam použitých zkratek 4
1. Úvod 5
2. Hlavní cíle práce 6
3. Literární přehled 7
3. 1. Klíště, vektor viru klíšťové encefalitidy 7
3. 1. 1. Taxonomické zařazení a vlastnosti 7
3. 1. 1. 1. Čeleď *Argasidae* 7
3. 1. 1. 2. Čeleď *Ixodidae* 7
3. 1. 1. 3. Vývojový cyklus klíštěte *Ixodes ricinus* 7
3. 2. Virus klíšťové encefalitidy 8
3. 2. 1. Taxonomické zařazení 8
3. 2. 2. Historie klíšťové encefalitidy 11
3. 2. 3. Vlastnosti viru klíšťové encefalitidy 12
3. 2. 4. Klinický obraz onemocnění klíšťovou encefalitidou 13
3. 3. Výskyt viru klíšťové encefalitidy 14
3. 3. 1. Klíšťová encefalitida ve střední Evropě 15
3. 3. 2. Klíšťová encefalitida na našem území 16
3. 3. 3. Periurbánní a urbánní oblasti jako možný zdroj nákazy pro člověka 17
3. 3. 4. Pronikání klíšťové encefalitidy do vyšších nadmořských výšek 18
4. Materiál a metody 20
4. 1. Vzorky klíšťat 20
4. 2. Zpracování vzorků 22
4. 2. 1. Detekce viru pomocí reverzní transkriptázové polymerázové reakce (RT-PCR) 22
4. 2. 2. Detekce viru v kultuře buněk prasečí ledviny (PS buňky) 24
5. Výsledky 25
6. Diskuze 29
7. Závěr 32
8. Seznam použité literatury 33

Seznam použitých zkratek

3‘ NCR – 3‘ nekódující oblast

5‘ NCR – 5‘ nekódující oblast

cDNA – „complementary deoxyribonucleic acid“, DNA vzniklá reverzním přepisem z RNA

DNA – deoxyribonukleová kyselina

KE – klíšťová encefalitida

KEV – virus klíšťové encefalitidy

KRNAP – Krkonošský národní park

nt - nukleotid

ORF – otevřený čtecí rámec

PCR – polymerázová řetězová reakce

PS buňky – buňky prasečí ledviny (angl. porcine stable kidney)

RNA – ribonukleová kyselina

RT – reverzní transkripce

1. Úvod

Viry provázejí člověka už od nepaměti. První psaný záznam pochází z roku 3700 př. n. l., popisuje starověkého mnicha s typickými příznaky poliomyelitidy. I egyptský faraon Ramses V. podlehl podle současné studie virové infekci, tentokrát pravým neštovicím. Až v roce 1892 však Dmitrij Iwanowsky upozornil na agens schopné projít přes tehdy používané bakteriální filtry. Toto pozorování potvrdil o šest let později Martinus Willem Beijerinck a nazval jej „contagium vivum fluidum“. Ve stejném roce prokázali Loeffler a Frosch u onemocnění slintavkou a kulhavkou, že nejde o bakteriální toxin, nýbrž o částice, které se množí. Virus byl ale poprvé spatřen až v roce 1940 Helmuthem Ruskou, díky elektronovému mikroskopu.

Viry jsou submikroskopické částice, které nemají vlastní metabolismus, nerostou a ani se nepohybují a je možné získat je v krystalické formě, ty nejjednodušší z nich obsahují jen bílkovinný obal a nukleovou kyselinu (virus vřetenovitosti brambor dokonce postrádá jakýkoliv bílkovinný obal a skládá se jen z nukleové kyseliny). Právě genetická informace je hlavním článkem spojující tyto částice s živým světem. Přítomnost viru v hostitelském organismu může nabývat různých podob, od velmi vážných onemocnění až po bezpříznakové infekce. Mnoho organismů dokonce obsahuje ve své nukleové kyselině zbytky virů integrovaných do genetické informace před tisíci lety, např. až 11 % lidského genomu je složeno z retrovirům podobných retroposonů.

Stejně jako se liší struktura či biologické vlastnosti jednotlivých virů, liší se i způsob jejich přenosu mezi vnímavými organismy. Arboviry jsou ekologickou skupinou virů patřících do různých čeledí, pro které je typický přenos krevsajícími členovci a schopnost replikace jak v buňkách přenašeče tak i obratlovčího hostitele. Mezi arboviry je řazen i virus klíšťové encefalitidy.

Tento virus se od svého objevení v roce 1937 těší velkému zájmu výzkumníků po celé Evropě a ačkoli byla vyvinuta účinná vakcína zůstává i nadále v mnoha zemích vážným zdravotním problémem. V přírodě je virus vázán na tzv. přírodní ohniska, kde je přenášen klíšťaty mezi jednotlivými hostiteli. V posledních desetiletích jsou však pozorovány změny v distribuci klíšťat. Distribuce klíšťat se posunuje do oblastí vyšších nadmořských výšek, kde se klíšťata původně nevyskytovala. To má za následek nárůst zdravotních rizik spojených s klíšťaty přenášenými patogeny jak pro obyvatele těchto oblastí, tak pro turisty stále častěji vyhledávající horské prostředí. Je proto podstatné klíšťata a jimi přenášené patogeny v horských oblastech sledovat.

2. Hlavní cíle práce

1. vypracování literární rešerše zaměřené zejména na výskyt klíšťat a klíšťové encefalitidy ve vyšších nadmořských výškách
2. stanovení virofornosti klíšťat (*Ixodes ricinus)* pocházející z oblasti Krkonoš; srovnávací sběry a vyšetření klíšťat z oblasti Českých Budějovic
3. pokus o izolaci viru z klíšťat

3. Literární přehled

3. 1. Klíště, vektor viru klíšťové encefalitidy

3. 1. 1. Taxonomické zařazení a vlastnosti

Klíšťata patří do podkmene klepítkatci (*Chelicerata*), třídy pavoukovci (*Arachnida)*, podtřídy roztoči (*Acarina*) a řádu klíšťata (*Ixodida*). Lze je rozdělit do dvou hlavních čeledí: *Ixodidae* (klíšťata, „hard ticks“) a *Argasidae* (klíšťáci, „soft ticks“) (Parola a Raoult, 2001).

3. 1. 1. 1. Čeleď *Argasidae*

Klíštáci na rozdíl od klíšťat čeledi *Ixodidae* postrádají dorzální štít, jejich tělní povrch je spíše kožovitý, někdy až bradavičnatý. Většina druhů této čeledi patří mezi klíšťata nidikolní, tzn. žijící v hnízdech svých hostitelů, které jednotlivá stadia napadají opakovaně, ale sají jen po krátkou dobu, převážně v noci. Dalším významným znakem je vyšší počet nymfálních stadií (3-4) oproti klíšťatům (1), vývoj trvá asi 2-3 roky (Parola a Raoult, 2001; Volf et al., 2007).

Na našem území je nejčastějším zástupcem této čeledi klíšťák holubí (*Argas reflexus*), příležitostně sající i na lidech (Volf et al., 2007). Do této čeledi patří mimo jiné přenašeči afrických návratných horeček (*Ornithodoros moubata, O. hermsii, O. marocanus* a další) (Barbour a Hayes, 1986).

3. 1. 1. 2. Čeleď *Ixodidae*

Klíšťata této čeledi se vyznačují chitinovým dorsálním štítem (scutum) a trojhostitelským vývojovým cyklem. Klíště *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) je nejhojnějším druhem klíšťat v Evropě a také vektorem klíšťové encefalitidy, lymeské boreliózy, tularémie, anaplazmózy, babeziózy a dalších nákaz (Süss, 2003, Volf et al., 2007). Do čeledi *Ixodidae*
ovšem patří celá řada dalších medicínsky významných druhů. Jsou to zejména klíšťata rodů *Dermacentor*, *Haemaphysalis* a *Hyalomma* (Horak et al., 2002).

3. 1. 1. 3. Vývojový cyklus klíštěte *Ixodes ricinus*

Během svého životního cyklu projde klíště třemi vývojovými stadii – larva, nymfa a dospělec. Každé vývojové stadium trvá přibližně 1 rok, nicméně celková doba vývoje klíštěte závisí na klimatických podmínkách, dostupnosti vhodných hostitelů a dalších

faktorech a pohybuje se v rozmezí od 2 do 6 let. Každé vývojové stadium obvykle preferuje jiné hostitele. Sání se v každém stadiu uskutečňuje pouze jednou (výjimku tvoří dospělí samci, kteří mohou sát vícekrát nebo nemusí vůbec). Obecně platí, že larvy a nymfy sají převážně na malých obratlovcích (savci, ptáci, ještěrky), zatímco dospělé samice preferují spíše obratlovce větší (jeleni, krávy, ovce, psi). Larva saje na svém hostiteli v průměru 3 dny, nymfa 3-5 dní, samice asi 6-10 dní. Ke kopulaci dochází na hostiteli, samice poté klade 1 000-5 000 vajíček a umírá (Süss, 2003; Volf et al. 2007). Člověk může být infestován všemi třemi vývojovými stadii, nejčastěji však nymfami (Hubalek et al. 2004).

Z klimatických faktorů významně ovlivňují aktivitu, přežívání a rychlost vývoje klíšťat zejména teplota okolního prostředí, ale také relativní vzdušná vlhkost (Danielová et al., 1983). Klíšťata aktivují začátkem jara (březen, duben), kdy okolní teplota stoupne k 5-7 °C a jejich aktivita končí poklesem teploty pod tuto hodnotu v říjnu až listopadu, v letních měsících se obvykle dostavuje krátký pokles aktivity. Sezónní aktivita je téměř shodná u všech vývojových stadií *I. ricinus* (Nosek et al., 1967), zároveň je ale silně ovlivněna geografickým regionem, potažmo klimatickými podmínkami a okolním prostředím. V určitých oblastech se může dokonce objevovat i zimní vrchol (Korenberg, 2000; Süss, 2003).

Preferovaným biotopem klíšťat bývají nejčastěji smíšené či listnaté lesy s křovinným a bylinným podrostem (Süss, 2003).

Vektor východního subtypu viru KE, klíště *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930), je druh blízce příbuzný klíštěti *I. ricinus*, podobný je i jejich vývoj, jen sezónní aktivita může být u *I. persulcatus* kratší (Süss, 2003).

3. 2. Virus klíšťové encefalitidy

3. 2. 1. Taxonomické zařazení

Virus klíšťové encefalitidy (KEV) je arbovirus (virus přenášený členovci), patří do čeledi *Flaviviridae* a rodu *Flavivirus*. Čeleď *Flaviviridae* zahrnuje rody *Flavivirus, Pestivirus, Hepacivirus* a další, dosud nezařazené viry. Všech asi 70 virů této čeledi obsahuje jednovláknovou nukleovou kyselinu typu RNA pozitivní polarity (Lindenbach et al., 2005).

Viry rodu *Flavivirus* (za prototypový druh rodu je považován virus žluté zimnice, „flavus“ = žlutý) mohou být děleny podle preferovaného vektora:

1) **Klíšťaty přenášené viry**:
   a) Horečky Kyasanurského lesa
   b) Omské hemoragické horečky
   c) Powassan
   d) Langat
   e) Louping ill (virus vrtivky ovcí) (podle některých autorů další subtyp virů klíšťové encefalitidy (Hubalek et al., 1995; Grard et al., 2007)
   f) Klíšťové encefalitidy
   g) Royal Farm
   h) Španělské encefalitidy ovcí
   i) Turecké encefalitidy ovcí
   j) Karshi
   k) Tyuleniy
   l) Sumarez Reef
   m) Meaban

2) Komáry přenášené viry
   a) Dengue
   b) Japonské encefalitidy
   c) Žluté zimnice
   d) Aroa
   e) St. Louiské encefalitidy
   f) Encefalitidy Murray Valley
   g) Horečky West Nile
   h) Izraelské meningoencefalitidy krůt

3) Viry bez známého přenašeče
   a) Montanské leukoencefalitidy netopýrů
   b) Rio Bravo
   c) Modoc

a další z hlediska humánní medicíny méně významné viry.

(Index of Viruses - Flaviviridae (2006). In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C (Ed), Columbia University, New York, USA. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_index.htm; Gaunt et al., 2001)

Na základě zkříženě neutralizačního testu mohou být tyto viry děleny do 8 antigenních komplexů:

1) **komplex klíšťové encefalitidy** – viry klíšťové encefalitidy, Omské hemoragické horečky, Louping ill, horečky Kyasanurského lesa, Langat, Powassan a další
2) **komplex Japonské encefalitidy** – viry Japonské encefalitidy, encefalitidy Murray Valley a St. Louis, horečky West Nile a další
3) **komplex dengue** – DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4
4) **komplex Rio Bravo** – viry Rio Bravo, Saboya, Apoi a další
5) **komplex Modoc** – viry Modoc, San Perlita a další
6) **komplex Ntaya** – viry Izraelské encefalitidy krůt, Ntaya a další
7) **komplex Uganda S** – viry Uganda S, Banzi, Bouboui, Edge Hill
8) **komplex Tyuleniy** – viry Tyuleniy, Saumarez Reef, Meaban
9) **viry nezařazené do komplexu** – viry Žluté zimnice, Aroa, Jugra a další

(Calisher, 1988; Calisher et al., 1989)

Podle nukleotidové a následně i aminokyselinové sekvence obalového proteinu E byly rozlišeny tři subtypy viru klíšťové encefalitidy:

a) **Evropský subtyp** – zahrnuje prototypový kmen Neudoerfl a další kmeny (Ljubljana, Hypr, 263) z Rakouska, Německa, České Republiky, Slovenska, Slovinska a dalších států Evropy až po pobaltské republiky a evropskou část Ruska

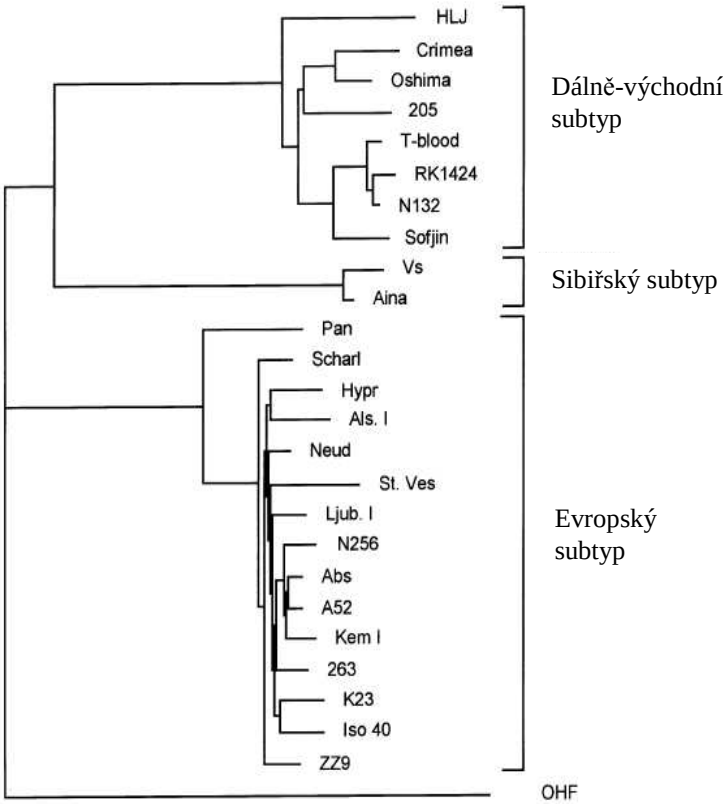
b) **Dálně-východní subtyp** – za prototypový je považován kmen Sofjin, dále obsahuje kmeny (Oshima, 205) z východního Ruska, Číny, Japonska, ale též z Litvy, Ukrajiny a evropské části Ruska

c) **Sibiřský subtyp** – je více příbuzný subtypu dálně-východnímu než evropskému zahrnuje centrální sibiřské kmeny Aina a Vasilchenko (Obr. 1).

Stupeň variability mezi jednotlivými kmeny v rámci subtypů je nízký, dosahuje maximálně 2,2 % v odvozeném aminokyselinovém složení E proteinu. Variabilita mezi jednotlivými subtypy je asi 5,6 % v aminokyselinovém složení (Ecker et al., 1999).

V Pobaltí, kde se vyskytují jak *Ixodes ricinus*, tak *I. persulcatus*, byla zaznamenána cirkulace všech tří subtypů viru klíšťové encefalitidy (Golovljova et al., 2004; Lundkvist et al., 2001).

Přítomnost několika kmenů, patřících k subtypu sibiřskému byla též potvrzena ve Finsku (Jääskeläinen et al., 2006).



Obr. 1. Fylogenetický strom konstruovaný na základě příbuznosti oblasti kódující obalový E protein (Ecker, 1999).

3. 2. 2. Historie klíšťové encefalitidy

První zmínka o klíšťaty přenášené encefalitidě je známa z 18. století. Ovšem první oficiální lékařská zpráva o této nemoci pochází až z roku 1931, kdy rakouský lékař

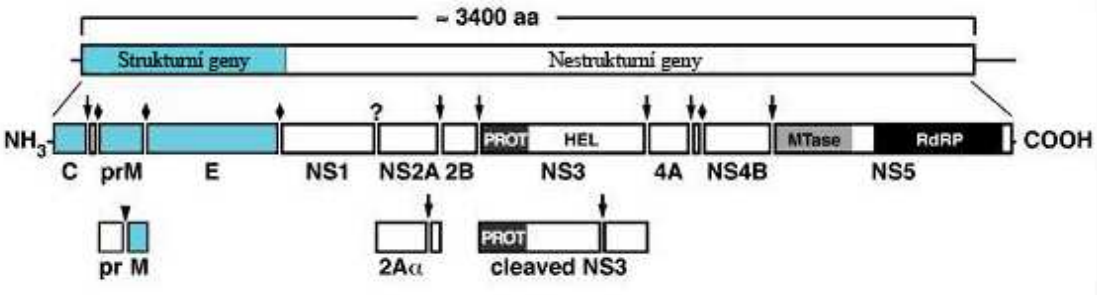
Schneider pozoroval u dospělých lidí v oblasti Neunkirchenu, jižně od Vídně, sezónní výskyt onemocnění tehdy označovaného jako „Epidemische akute meningitis serosa“. Klíště, jako hlavní přenašeč tohoto onemocnění, v té době ještě odhaleno nebylo (Dumpis et al., 1999).

Poté v roce 1937 expedice na Dálném východě vedená Zilberem izolovala virus z lidí, hlodavců a klíšťat v oblasti, kde bylo každoročně registrováno velké množství případů meningoencefalitidy. Následně byl demonstrován přenos viru klíštětem *Ixodes persulcatus* (Dumpis et al., 1999).

Na území dnešní České republiky byl virus poprvé izolován F. Galliou v roce 1948 z pacientů hospitalizovaných s encefalitidou. Jednalo se zároveň o první izolaci viru KE v Evropě (Gallia et al., 1949). Nezanedbatelným přínosem je také izolace tohoto viru při epidemii na Vyškovsku J. Krejčím v tomtéž roce (Krejci, 1949). V roce 1949 byl opět F. Galliou a J. Rampasem izolován virus z klíšťat *I. ricinus* a konečně prokázána role tohoto klíštěte jako vektora viru KE (Rampas a Gallia, 1949).

3. 2. 3. Vlastnosti viru klíšťové encefalitidy

Virion viru klíšťové encefalitidy je obalená, sférická částice, o průměru asi 40-55 nm (Slavik et al., 1970). Kapsida obsahuje jednovláknovou pozitivní RNA o délce přibližně 11 kb. Genom obsahuje jediný čtecí rámec (ORF) dlouhý asi 10 233 nukleotidů ohraničený na 5‘ i 3‘ konci nekódujícími sekvencemi. Tento ORF kóduje jediný polyprotein o přibližně 3400 aminokyselinách (Chambers et al., 1990). Polyprotein je štěpen na 3 proteiny strukturní: kapsidový C, membránový M (respektive premembránový prM protein následně štěpený na membránový protein M), velký obalový glykoprotein E a dále na 7 proteinů nestrukturních (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Wallner et al., 1996; Lindenbach a Rice, 2003) (Obr. 2).



Obr. 2. Znázornění ORF s vyznačenými sestřihovými místy (upraveno dle: Lindenbach et al., 2005)

Virion kompletovaný v endoplazmatickém retikulu, také označovaný jako nezralý virion, obsahuje proteiny C, E a prM. Tyto nezralé částice jsou následně transportovány sekreční drahou hostitelské buňky. Premembránový protein M je štěpen těsně před uvolněním z buňky v trans-Golgiho aparátu furinem nebo podobným enzymem (Stadler et al., 1997; Heinz, 2003).

Terminální 5‘ nekódující oblast (5‘ NCR) je 95-132 nt dlouhá, tvoří sekundární struktury a ovlivňuje tím translaci a replikaci genomu (Lindenbach a Rice, 2005). Ve struktuře 3‘ nekódující oblasti (3‘ NCR) lze rozeznat jak vysoce konzervovanou část nacházející se na konci molekuly, tak oblast vykazující při srovnání jednotlivých kmenů viru vysokou variabilitu. Hlavním rozdílem bývá přítomnost různě dlouhých delecí v blízkosti stop kodonu ORF. Je zajímavé, že většina kmenů, vyjma kmenů Neudoerfl, 263 a 132, postrádá polyA oblast na 3‘ NCR (Wallner et al., 1995).

K nejdůležitějším funkcím obalového proteinu E patří zprostředkování vazby viru na buněčný receptor a fúze virového obalu s membránou endosomu za nízkého pH (Heinz, 2003). Tento protein také zřejmě ovlivňuje tkáňový tropismus a neurovirulenci viru klíšťové encefalitidy (Pletnev et al., 1992) a je hlavním virovým antigenem indukujícím tvorbu protilátek (Mandl et al., 1989).

Funkce nestrukturního proteinu NS1 není zcela jasná, pravděpodobně se účastní replikace RNA. Tento protein (dříve nazývaný rozpustný antigen) také indukuje imunitní odpověď proti viru. Funkce malého, hydrofóbního proteinu NS2A také není zcela objasněna, určitým způsobem se však účastní na sestavování virové částice. Protein NS2B vytváří spolu s dalším proteinem NS3 tzv. serinovou proteázu, odpovědnou za štěpení nově syntetizovaných virových polyproteinů. Nestrukturní proteiny NS4A a NS4B zřejmě napomáhají správné orientaci virového polyproteinu a tím usnadňují funkci proteázám. NS5 je veliký, konzervovaný protein s funkcí RNA dependentní RNA polymerázy (Gritsun et al., 2003; Lindenbach a Rice, 2003; Lindenbach et al., 2005).

3. 2. 4. Klinický obraz onemocnění klíšťovou encefalitidou

Onemocnění klíšťovou encefalitidou způsobené evropským subtypem viru má ve většině případů průběh mírný. Inkubační doba po přenosu infekce klíštětem se pohybuje kolem 7 dní. Průběh může být jednofázový či dvoufázový. První fáze se vyznačuje spíše nespecifickými „chřipkovými“ příznaky, tj. zvýšenou teplotou, bolestí hlavy či únavou

trvající asi 2-7 dní. U některých pacientů tato fáze chybí. Následuje 2-10 dní trvající asymptomatické období, které asi u jedné třetiny pacientů přejde do druhé fáze s typickými příznaky meningo-encefalitidy, meningitidy či encefalomyelitidy (prudké bolesti hlavy, dočasné ochrnutí končetin, vysoká horečka, zvracení, zrakové a sluchové halucinace, atd.). Úmrtí pacienta bývá zaznamenáno asi v 0,5-2 %, trvalá paralýza potom v 2-10 % případů. Rekonvalescence bývá dlouhá (Krejci, 1949; Gresikova a Kaluzova, 1997; Dumpis et al., 1999).

Naproti tomu onemocnění způsobené východním subtypem viru probíhá často jednofázově s delší inkubační dobou (10-14 dní). Příznaky bývají podobné jako u evropského subtypu, trvalá paralýza se ovšem vyskytuje v 5-30 %, úmrtí pak asi v 5-20 % případů, tyto údaje se ovšem v literatuře různí (Gresikova a Kaluzova, 1997; Dumpis et al.,1999; Gritsun et al., 2003).

Sibiřský subtyp způsobuje mírnější infekce než subtyp dálně východní, s úmrtností asi 6-8 %. Vyznačuje se ovšem tendencí vyvolávat chronické infekce, kdy se klinické příznaky mohou dostavit i po několik let dlouhé inkubační době (Ilienko et al., 1974; Gritsun et al., 2003).

Vyšší úmrtnost pacientů infikovaných východními subtypy viru KE může být ovšem způsobena nejen vyšší virulencí kmenů viru, ale také rozdíly v diagnostice onemocnění, definicích klinických případů či léčebných postupech (Mandl, 2005).

3. 3. Výskyt viru klíšťové encefalitidy

Klíšťová encefalitida je zoonóza (onemocnění zvířat přenosné na člověka, které je z člověka na člověka typicky nepřenosné) vyskytující se v přírodě v takzvaných přírodních ohniscích či endemických oblastech. Toto jsou prostorově více či méně ohraničené oblasti s určitými biotickými, abiotickými a geografickými vlastnostmi v nichž virus cirkuluje mezi vektory a hostitely. Velikost takové oblasti se pohybuje v rozmezí od několika čtverečních metrů až po mnoho čtverečních kilometrů. K nákaze člověka dochází spíše náhodně a jako hostitel nemá na cirkulaci viru v ohnisku žádný vliv (Süss, 2003). Přírodní ohniska nákazy mohou být stabilní po desítky let, může však docházet i k jejich dočasné nebo úplné inaktivaci či vzniku ohniska nového (Danielova, 2002; Süss et al., 2004).

Hostitelem viru KE jsou obratlovci od drobných savců (hlodavců, hmyzožravců) až po savce velké (ovce, kozy, jeleny). Riziko nákazy je kromě jiného ovlivňováno populační dynamikou a vzájemnými interakcemi hostitelů a vektorů (Süss, 2003).

Zdrojem nákazy pro člověka bývá v Evropě převážně klíště *Ixodes ricinus*, v Rusku a na Dálném východě hlavně *I. persulcatus* (Labuda et al., 1991). Ovšem přenos je možný také klíšťaty rodu *Haemaphysalis* (Nosek et al., 1967), *Dermacentor* (Kozuch a Nosek, 1971), *I. hexagonus* (Krivanec et al., 1988) či *I. arboricola* (Lichard a Kozuch, 1967). Tato klíšťata se však podílejí spíše na cirkulaci viru v rámci ohniska, člověka napadají méně často či vůbec. V pobaltských státech (Estonsko, Lotyšsko, Litva) se vyskytují současně populace jak *I. ricinus* tak *I. persulcatus* (Golovljova et al., 2004), přičemž *I. ricinus* slouží jako vektor evropského subtypu KE, *I. persulcatus* přenáší subtyp dálně-východní a sibiřský (Dumpis et al., 1999).

K přenosu viru mezi klíšťaty může docházet viremickou cestou, při které virus cirkuluje v krvi hostitele, nebo cestou neviremickou a to buď vertikálním přenosem - transovariálně (přenos z matky na potomstvo) a transstadiálně (z larvy na nymfu a z nymfy na dospělce), nebo přenosem horizontálním - při tzv. „co-feedingu“ (sousání). Podstatou „co-feedingu“ je přenos viru při sání infikovaného klíštěte v blízkosti klíštěte neinfikovaného, kdy dochází k lokalizovánému přenosu i bez dosažení virémie (Nuttall a Jones, 1991). Při tomto způsobu přenosu se významně uplatní farmakologické a imunomodulační funkce klíštěcích slin - tzv. slinami aktivovaný přenos (Labuda et al., 1993). Přenos viru touto cestou probíhá i na imunním hostiteli (Labuda et al., 1997). Z hlediska cirkulace viru v přírodě je významný zejména přenos „co-feedingem“ z nymf na larvy (Randolph a Rogers, 2000).

Zatímco úspěšnost transovariálního přenosu je nízká a zřejmě má význam pro udržování viru v přírodním ohnisku jen za podmínek pro cirkulaci viru nepříznivých (Danielova a Holubova, 1991; Danielova, 2002), co-feeding (známý např. i u komárů infikovaných virem horečky West Nile) je díky tendenci různých vývojových stadií klíšťat sát agregovaně pravděpodobně velmi častý (Kuno a Chang, 2005; Higgs et al., 2005). Viremický přenos viru je omezen určitou minimální hladinou viremie v krvi hostitele, ale také jeho imunitní odpovědí (Kozuch et al., 1970; Kuno a Chang, 2005). Velmi důležitým faktorem je rovněž krátké trvání viremie u přirozených hostitelů – tedy poměrně nízká pravděpodobnost, že bude klíště sát právě na viremickém hostiteli (Radda et al. 1969).

3. 3. 1. Klíšťová encefalitida ve střední Evropě

Incidence klíšťové encefalitidy je v posledních několika desetiletích v České republice na vzestupu. Mezi lety 2000-2006 bylo na našem území zaznamenáno průměrně

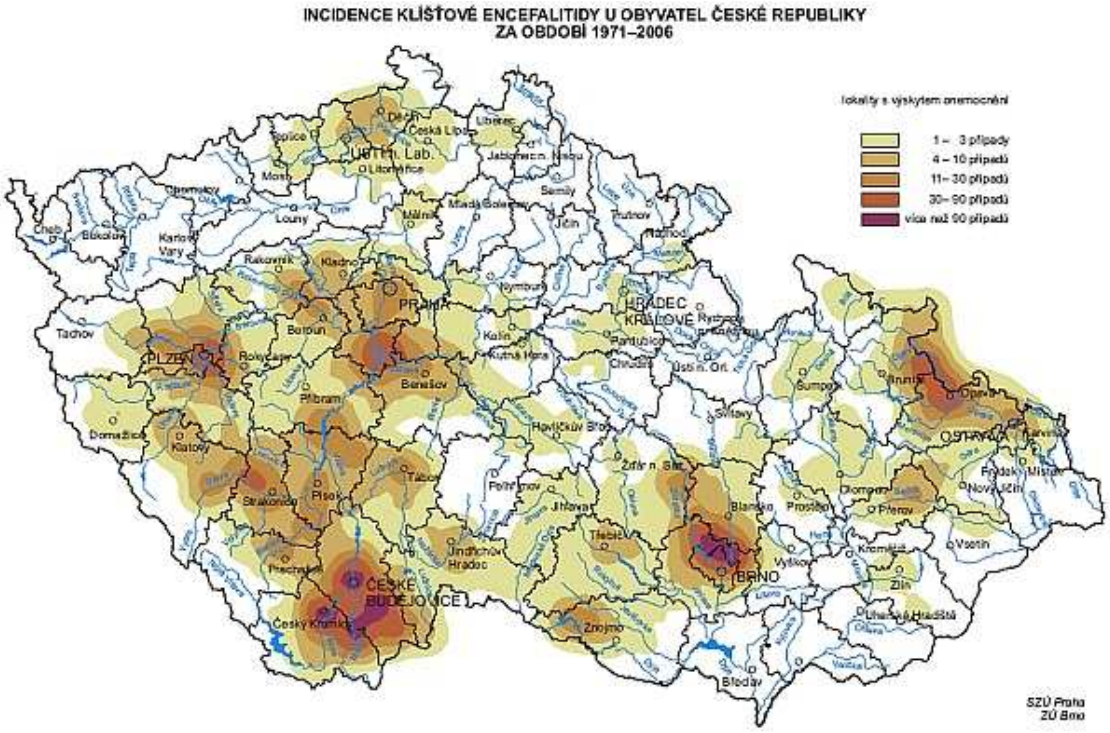
689 případů tohoto onemocnění, což je oproti 80. létům téměř trojnásobný vzestup. Obdobná situace je i ve většině dalších evropských zemí (World Health Organization, http://data.euro.who.int/cisid). Naproti tomu v Rakousku bylo do spuštění masivní vakcinační kampaně v roce 1981 registrováno asi 600 případů ročně (Süss, 2003). Od zavedení vakcinace však poklesl počet zaznamenaných klinických případů na 59 v roce 2005 a 51 v roce 2006 (World Health Organization, http://data.euro.who.int/cisid).

V oblasti Pobaltí bývá vysoká incidence klinických případů onemocnění tradiční, Lotyšsko je dokonce považováno za zemi s nejvyšší incidencí vůbec (průměrně 26,9/100 000 obyvatel). Důvodem může být jednak současná přítomnost klíšťat *Ixodes ricinus* a *I. persulcatus*, ale také změny v chování lidí (Süss, 2003).

3. 3. 2. Klíšťová encefalitida na našem území

Onemocnění klíšťovou encefalitidou se vyskytuje v tzv. sezónních vlnách s pomalým vzestupem počtu klinických případů od dubna, typickým vrcholem v červenci (jaro-letní vrchol) a následným výrazným poklesem (Beran, 2004). Za určitých podmínek se však může objevit i druhý (podzimní) vrchol incidence (Kriz a Benes, 2007). V roce 2006 byl evidován markantní vzestup počtu případů, s více než 10 případy na sto tisíc obyvatel. V tomto roce dosáhl svého dosavadního maxima také podzimní vrchol. Tato druhá vlna onemocnění počtem případů dokonce překonala vlnu první. To bylo zřejmě způsobeno vhodnými klimatickými podmínkami pro přežití a vývoj klíšťat v průběhu let 2005-2006, které zároveň umožňovali široké rekreační a sportovní aktivity lidí (Kriz a Benes, 2007).

Jak ukazuje obr. 3, mezi místa s tradičně vysokou incidencí tohoto onemocnění patří jižní, střední a částečně i západní Čechy, jižní a severní Morava. Od roku 2006 byl také zaznamenám veliký vzestup počtu klinických případů v regionech s vyšší nadmořskou výškou. Například incidence na Vysočině (20,5 příp./100 000 obyvatel) dosáhla hned po jižních Čechách (24,8 příp./100 000) nejvyšší hodnoty vůbec (Kriz a Benes, 2007).



Obr. 3. Incidence klíšťové encefalitidy na našem území za posledních 35 let (http://www.szu.cz/tema/prevence/klistova-encefalitida-epidemiologicka-data).

3. 3. 3. Periurbánní a urbánní oblasti jako možný zdroj nákazy pro člověka

Urbánní a periurbánní oblasti se vyznačují mozaikovitým uspořádáním s více či méně fragmentovanými částmi a s různým stupněm zásahu člověka (Dautel a Kahl, 1999). Markantní také bývá úbytek živočišných druhů a celková ztráta biodiverzity. Z hlediska vektory přenášených onemocnění může mít ztráta diverzity takový důsledek, že se v těchto oblastech méně uplatní tzv. diluční efekt. Tento jev byl pozorován například na původci lymeské boreliózy, spirochétě *Borrelia burgdorferi* sensu lato, kdy s menším počtem živočišných druhů v příměstských částech výrazně stoupla prevalence této bakterie v klíšťatech. Důvodem je zřejmě úbytek určitých, pro přenos borelií nekompetentních druhů zvířat spolu s masivním rozšířením druhů dobře adaptovaných na městské či příměstské podmínky, které jsou shodou okolností kompetentními hostiteli *B. burgdorferi* s.l. (LoGuidice et al., 2003; Bradley a Altizer, 2007). Tento mechanizmus se v případě viru klíšťové encefalitidy, který nemá tak vyhraněnou hostitelskou specifitu zřejmě neuplatní. Dalším důvodem rozšíření onemocnění do urbánních oblastí je vyšší průměrná teplota v zimních měsících, výhodná pro přežití jeho vektorů. Limitujícím biotickým faktorem bývá dostupnost hostitelů vhodných pro dospělá klíšťata (středně velcí a velcí savci).

Nicméně například v zahradách rodinných domů, ve vnitřních částech města, je pro vytvoření nezávislé populace klíšťat za příznivých abiotických podmínek (především dostatečná vzdušná vlhkost) dostačující i jediný dostupný druh hostitele (v těchto případech nejčastěji ježek) (Dautel a Kahl 1999).

Zejména zahrady, hřbitovy, městské parky či příměstské lesy, které umožňují úspěšné dokončení vývoje klíšťat mohou představovat nezanedbatelný zdroj nákazy člověka. Z dosud provedených studií je zřejmá nejen relativně vysoká denzita klíšťat v těchto oblastech, ale také vysoká prevalence různých patogenů jako *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* či *Babesia microti* (Hubalek et al.,1993; Basta et al., 1999; Maetzel et al., 2005; Stanczak, 2004; Pejchalova et al., 2007; Zakovska et al., 2007).

3. 3. 4. Pronikání klíšťové encefalitidy do vyšších nadmořských výšek

Klimatické změny probíhající na naší planetě mají široké důsledky v mnoha oblastech. Za jeden z těchto důsledků je považováno zvýšení horní hranice výskytu klíšťat a s tím spojené zvýšené riziko nákazy člověka jimi přenášenými patogeny ve vyšších nadmořských výškách.

Výšková hranice rozšíření klíštěte *Ixodes ricinus* je závislá na zeměpisné šířce. S klesající zeměpisnou šířkou tato hranice stoupá a dosahuje na jihu Evropy až k 2000 m n.m., naopak v severských zemích (jih Skandinávie, Finsko) je hranice rozšíření blízká úrovni moře (Daniel et al., 2004).

Ve střední Evropě byla za horní hranici výskytu klíštěte *I. ricinus* považována výška 700-800 m n.m. (Cerny et al., 1965). V letech 1981-1983 byla tato hranice potvrzena dlouhodobým terénním experimentem v Krkonoších, kde klíšťata nebyla schopná ve vyšších nadmořských výškách dokončit svůj vývoj. Tato hranice se shodovala i s incidencí klinických případů onemocnění KE (Daniel et al., 2003; Danielova et al., 2006).

V 90. letech bylo také na našem území pozorováno větší množství klíšťat ve výškách kolem 700 m n.m., kde byla doposud rozšířena jen sporadicky nebo vůbec (Daniel et al., 2003). Z tohoto důvodu byla od dubna do října roku 2001 provedena v Národním parku Šumava studie zaměřená na přítomnost klíšťat ve vyšších nadmořských výškách. V tomto období bylo nasbíráno přes 400 klíšťat *I. ricinus* (nymfy i dospělci) ze psů pravidelně se pohybujících ve výškách 1000-1100 m n.m. Psi pohybující se nad touto hranicí infestováni nebyli. V následujícím roce byla prokázána existence lokální populace klíšťat až do výšky

1 100 m n.m. Ve dvou případech bylo zdokumentováno onemocnění KE u obyvatel Šumavy z oblasti Borové Lady po přisátí klíštěte ve výšce cca 900 m n.m. (Daniel et al., 2003). Přítomnost viru KE byla prokázána i v případě 2 nymf pocházejících z nadmořské výšky 620-720 m n.m. z Krkonošského národního parku (Danielova et al., 2006). Odtud také pochází 5 ověřených případů napadení nymfou *I. ricinus* až do výšky 1500 m n.m v letech 2002-2003 (Materna et al., 2005). Ve srovnání s historickými daty je změna rozšíření klíšťat směrem do vyšších nadmořských výšek evidentní (Zeman a Benes, 2004).

Zprávy o posunu klíšťat a jimi přenášených onemocnění do vyšších nadmořských výšek a zeměpisných šířek byly doprovázeny rozsáhlými debatami o vlivu změny klimatu. V současné době existuje pro změny v rozšíření několik vysvětlení. Míra vlivu globálního oteplování, potažmo mírnější a kratší zimy jsou diskutovány různými autory (Lindgren et al, 2000; Daniel et al., 2003; Zeman a Benes, 2004; Sumilo et al., 2007). Klimatické změny dovolují klíšťatům dokončit svůj vývoj v oblastech s původně nepříznivým prostředím a vytvořit zde samostatnou populaci. A právě populační denzita klíšťat je také jedním z hlavních faktorů ovlivňujících pravděpodobnost nákazy člověka.

Změny klimatu se podílejí nejen na posunu klíšťat do vyšších nadmořských výšek, ale také do vyšších zeměpisných šířek. V roce 1990 bylo ve Švédsku zjištěno rozšíření klíšťat do oblastí, kde klíšťata do té doby zaregistrována nebyla. Tento posun byl zřejmě způsoben mírnějšími zimními měsíci spolu s delšími jarními a podzimními sezónami (Lindgren et al., 2000). V roce 1997 byly diagnostikovány první případy onemocnění KE v další severské zemi – Norsku (Skarpaas et al., 2004). V roce 2002 bylo registrováno několik případů KE z oblasti Kokkola Archipelago ve Finsku, ležící asi 300 km jižně od polárního kruhu. Tato oblast je považována za nejsevernější endemickou oblast výskytu KE (Jääskeläinen et al., 2006).

Kromě klimatických změn je dalším, tentokrát biotickým faktorem ovlivňujícím rozšíření klíšťat markantní vzestup v populaci vysoké zvěře, hlavním hostiteli dospělých klíšťat, pozorovaný napříč celou Evropou včetně skandinávských zemí. Jeleni, kteří přečkávají zimu spíše v podhůří a na jaře migrující zpět do horských oblastí, mohou být potencionálními zdroji klíšťat ve vyšších nadmořských výškách (Materna et al., 2005).

Mírnější klimatické podmínky mohou mít za následek také nárůst populací hlodavců, hlavních hostitelů larev případně nymf. Jejich přímý vliv na posun klíšťové encefalitidy do vyšších nadmořských výšek ale nebyl jasně prokázán (Zeman a Benes, 2004).

4. Materiál a metody

4. 1. Vzorky klíšťat

Klíšťata byla sbírána v červnu, červenci a září roku 2006 ve vytipovaných oblastech Krkonošského národního parku (KRNAP) (Mgr. J. Maternou, Ph.D., RNDr. V. Danielovou, DrSc. a RNDr. Milanem Danielem, DrSc., v rámci projektu: Experimentální ověření změn ve výškovém rozšíření klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) a rizika začleňování jím přenášených nákaz do horských ekosystémů. Grant: GA ČR 310/06/1546) a v říjnu a listopadu 2007 a v dubnu 2008 v příměstské části Českých Budějovic standardní metodou „vlajkování" a skladována při -20 °C. Podrobnosti o sběrech jsou uvedeny v tab. 1 a 2.

Tab. 1. Charakteristika sběrů klíšťat KRNAP

Lokalita	Biotop	Datum sběru	Nadmořská výška	Počet		Denzita klíšťat	Teplota vzduch v době sběru
				N	F		
Údolí Zlatého potoka, 2,5 km východně od Svobody nad Úpou	okraj smíšeného lesa (jasan, javor, buk,dub, smrk) s řídkou bylinou vegetací, v sousedství je louka	9. června 2006	600 – 620 m	155	4	106	13℃
Údolí Zlatého potoka, 2,5 km východně od Svobody nad Úpou	okraj smíšeného lesa (jasan, javor, buk,dub, smrk) s řídkou bylinou vegetací, v sousedství je louka	10. července 2006	600 – 620 m	75	1	38	17℃
Údolí Zlatého potoka, 2,5 km východně od Svobody nad Úpou	okraj smíšeného lesa (jasan, javor, buk,dub, smrk) s řídkou bylinou vegetací, v sousedství je louka	14. července 2006	620 m	42	1	43	9℃
V končinách, 2,5 km severo-východně od Vrchlabí	okraj smíšeného lesa, les sousedí s loukou	13. září 2006	600 – 620 m	44	0	44	8℃

N = nymfa, F = samice, samci nebyli zastoupeni; populační denzita klíšťat vyjádřena jako počet jedinců na hodinu vlajkování a pracovníka

Tab. 2. Charakteristika sběrů klíšťat – periurbánní oblast Českých Budějovic

Lokalita	Biotop	Datum sběru	Počet			Denzita klíšťat	Teplota vzduchu v době sběru
			N	F	M		
periurbánní oblast Českých Budějovic (Zavadilka)	heterogenní převážně listnatý les, tvořený zejména duby a břízami s příměsí smrků a borovic	30. října 2007	54	3	0	15	10°C
periurbánní oblast Českých Budějovic (Zavadilka)	heterogenní převážně listnatý les, tvořený zejména duby a břízami s příměsí smrků a borovic	2. listopadu 2007	60	2	0	31	10°C
periurbánní oblast Českých Budějovic (Zavadilka)	heterogenní převážně listnatý les, tvořený zejména duby a břízami s příměsí smrků a borovic	1. dubna 2008	122	9	3	134	14°C

N = nymfa, F = samice, M = samec; populační denzita klíšťat vyjádřena jako počet jedinců na hodinu vlajkování a pracovníka

4. 2. Zpracování vzorků

4. 2. 1. Detekce viru pomocí reverzní transkriptázové polymerázové reakce (RT-PCR)

Homogenizace klíšťat

Klíšťata byla homogenizována v boxu s laminárním prouděním vzduchu (Telstar – Bioultra, třída II.) skalpelem (plamenem sterilizovaným a následně ochlazeným) pod hladinou 5 % suspenze Chelex® [10 g Chelex® 100 Resin (BioRad Laboraties, USA) + 200 ml TE pufru (10 ml 1M Tris + 2 ml 0,5 M EDTA do 1 l destilované vody)]. Nymfy byly homogenizovány ve směsích po pěti jedincích, dospělci potom po jednom jedinci v 200 µl chelexové suspenze v 1,5 ml mikrozkumavkách. Takto připravené vzorky byly inkubovány přes noc při 56 °C (Labnet, AccuBlock™ Digital Dry Bath). Následující den po krátkém vortexování (Ika® MS3 basic) inkubovány při 70 °C 15 minut. Následně byly vzorky centrifugovány (Eppendorf miniSpin plus) a supernatant přenesen do nové sterilní 1,5 ml mikrozkumavky. Takto připravené vzorky jsou pro krátkodobé skladování stabilní při 4 °C, pro delší skladování byly vzorky uloženy při -70 °C (Cihlarova, 2002).

Reverzní transkripce

Získaný supernatant byl použit přímo pro přípravu cDNA, kitem pro reverzní transkriptázovou reakci (RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas, Kanada), podle postupu doporučeného výrobcem. Do každé reakce bylo odebráno po 2 µl vzorku z pěti směsí (celkem 8 µl). Pro syntézu cDNA byl použit primer 1F (Generi Biotech, ČR), který nasedá na 3’ konec virového genomu (viz. tab.3).

Polymerázová řetězová reakce

Připravená cDNA posloužila jako templát pro následnou PCR reakci (Eppendorf mastercycler gradient) s primery E(F), E(R) (Generi Biotech, ČR). V pozitivním případě byl výsledek potvrzen pomocí primerů TBE1, TBE2 (viz tab.3) a přesně určena původní pozitivní směs 5 nymf.

Reakční směs: 12,5 µl PPP Master Mix (TopBio, ČR)
8,5 µl vody pro PCR (TopBio, ČR)
po 1 µl každého z primerů
2 µl templátové cDNA

Konečné koncentrace ve směsi:

1x konc. PPP Master Mix: 75 mM Tris-HCl, pH 8,8; 20 mM $(NH_4)_2SO_4$; 0,01 % TWEEN 20; 2,5 mM $MgCl_2$; 200 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 2,5 U Taq purple DNA polymeráza

primer: 0,4 µM

Podmínky PCR:

1) denaturace 95°C/5 minut
2) 30 cyklů:
   1) denaturace 95°C/30 vteřin
   2) nasedání primerů 50°C/30 vteřin
   3) elongace 72°C/1 minutu
3) finální elongace 72°C/3 minuty
4) udržovací teplota 14°C

Separace na agarózovém gelu

K PCR produktu bylo přidáno 5 µl nanášecího pufru (6X Orange DNA Loading Dye, Fermentas, Kanada) s 5x koncentrovaným barvivem SYBR Green (SYBR Green I, nucleic acid stain, Amresco, USA). Produkt byl následně rozdělen elektroforetickou separací (BioRad SubCell® GT + PowerPac HC™) v 1 % (případně 1,7 %) agarózovém gelu a vizualizován pomocí UV transiluminátoru (Visi-blue™ Transilluminator; Biometra Ti 3)

Fotografie byly získány digitálním fotoaparátem Olympus C5060Z, zpracovány programem Alpha Ease® RT Software, verze 4.1.0. (Alpha Innotech Corporation).

Vzorky pro sekvenování byly extrahovány z gelu pomocí kitu MinElute Gel extraction kit (Qiagen, SRN) podle instrukcí výrobce a následně sekvenovány ve společné laboratoři genomiky Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity a Biologického centra AVČR pomocí sekvenátoru ABI Prism 3130 xL (Applied Biosystems). Pro sekvenování byly použity primery 1A, 1B a 2A, 2B (viz. Tab. 3) umožňující získání kompletní sekvence genu pro protein E.

Tab. 3. Charakteristika použitých primerů

Primer	Sekvence	Velikost produktu	Teplota nasedání
1F	5'- AGC GGG TGT TTT TCC GAG TC - 3'		45 ℃
E(F) -sense	5' - GGG GAC YAC GAG GGT YAC CT - 3'	587 nt	50 ℃
E(R) -antisense	5' - CCG TTG GAA GGT GTT CCA CT - 3'		
TBE2 - sense	5' - GCG TTT GCT YCG GA - 3'	175 nt	56 ℃
TBE1 - antisense	5' - CTC TTT CGA CAC TCG TCG AGG - 3'		
1A - sense	5‘ - TGT CTA CGC TTC GCG TTG CAC ACA - 3‘	801 nt	55 ℃
1B - antisense	5‘ - GGA ACC CCA GCG AGA GCC TTC AGT A - 3‘		
2A - sense	5‘ - CGT GTT GAA TTT GGG GCT CCT CAC G - 3‘	798 nt	54 ℃
2B - antisense	5‘ - TTC GTT CCG TGT CCA CAG CGC A - 3‘		

Fylogenetická analýza

Fylogenetický strom kmene z KRNAP byl sestaven na základě podobnosti genu pro obalový protein E metodou „Neighbor-Joining“ programem MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 4.0 [http://www.megasoftware.net]). Podpora pro jednotlivá větvení byla vyjádřena bootstrapovou analýzou (1 000 opakování). Sekvence jednotlivých kmenů byly získány z databáze NCBI GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

4. 2. 2. Detekce viru v kultuře buněk prasečí ledviny (PS buňky)

Klíšťata byla homogenizována v boxu s laminárním prouděním vzduchu (Telstar – Bioultra, třída II.) po pěti jedincích v třecí misce s 900 µl média L15 (Leibovitz) (Sigma). Homogenát byl přenesen do sterilní 1,5 ml mikrozkumavky a následně cetrifugován při 10 000 ot./min. 5 minut (Eppendorf miniSpin plus). Supernatant byl poté přenesen na předem narostlou kulturu PS buněk v 64 jamkovém panelu (TPP, Švýcarsko) a to po 200 µl supernatantu na jamku.

Pozitivní kontrola byla provedena s 5, 10, 15 a 20 µl suspenze viru (kmen Hypr) v 200 µl média na jamku.

Po inkubaci v termálním boxu (Jouan EG115IR) při 37 °C a 3,5 % atmosféře CO_2 24 hod. bylo přidáno 100 µl média L15. Za následující tři dny byly výsledky špatně reprodukovatelné, objevila se i kontaminace některých jamek. Médium z jamek bylo proto přepipetováno na nově narostlou kulturu PS buněk. Po 14 dnech byla provedena RT-PCR reakce z média jamek reprezentující jednotlivé směsi klíšťat.

5. Výsledky

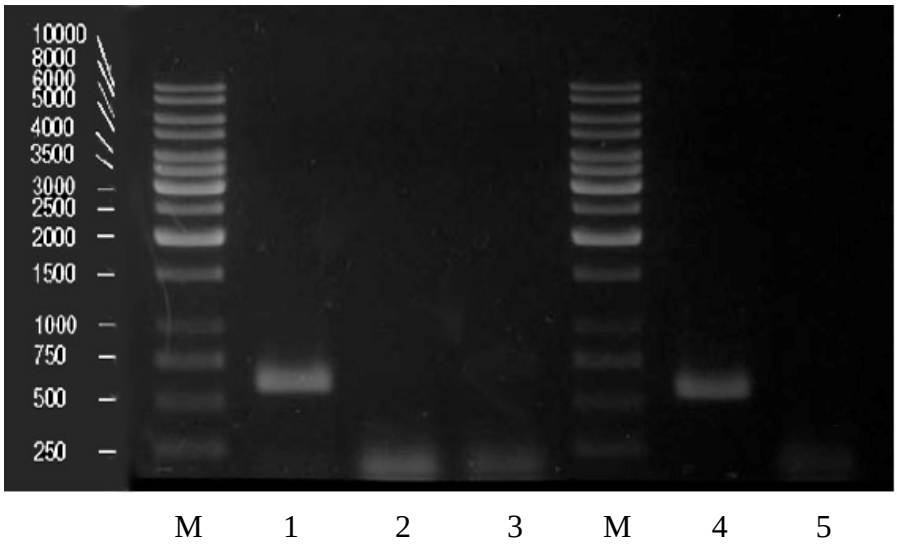
Celkem bylo vyšetřeno 316 nymf a 9 dospělců (samic) pocházejících z Krkonošského národního parku. Z periurbánní oblasti Českých Budějovic (oblast Zavadilky) bylo vyšetřeno 114 nymf a 5 samic nasbíraných v říjnu a listopadu roku 2007 a 122 nymf, 9 samic a 3 samci sbíraných na jaře roku 2008 ve stejné oblasti.

Oproti očekávání nebyly mezi lokalitami zjištěny výraznější rozdíly v denzitě klíšťat. Z časových důvodů se bohužel nepodařilo nasbírat dostatek dat pro odpovídající statistickou analýzu. Sběry byly navíc prováděny v různých obdobích sezóny klíšťat.

Z oblasti Krkonoš bylo vyšetřeno celkem 74 směsí klíšťat, přičemž jedna byla pozitivní na přítomnost viru klíšťové encefalitidy. Jednalo se o směs pěti nymf. Celkově 1,3 % pozitivních směsí což odpovídá minimální infikovanosti 0,3 % pozitivních jedinců z celkového počtu vyšetřených.

Celkem 253 klíšťat nasbíraných v periurbánní oblasti bylo vyšetřeno v 64 směsích. Pozitivní byly 2 směsi nymf, obě pocházející z podzimního sběru, tj. 3,1 % pozitivních směsí, což odpovídá minimální infikovanosti 0,8 % infikovaných jedinců.

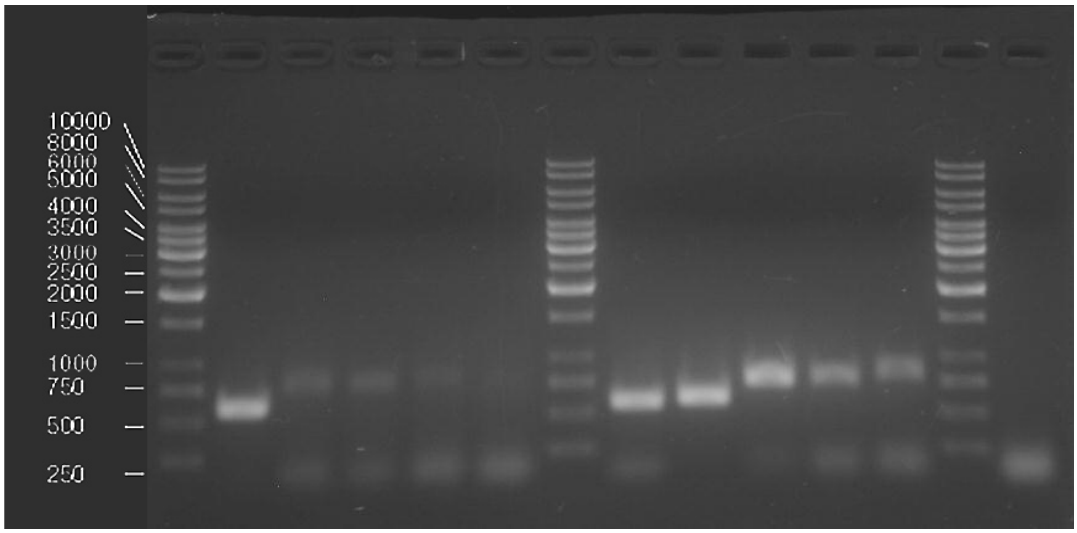
Všechny pozitivní výsledky byly potvrzeny nejméně dvakrát opakovanou PCR reakcí s různými páry primerů (Obr. 4), následnou sekvenční analýzou a porovnáním získaných sekvencí s daty dostupnými v databázi GenBank.



Obr. 4. Příklad pozitivního výsledku pomocí PCR reakce s primery E(F)-E(R). M- velikostní standard O'GeneRuler™ 1 kb DNA ladder; 1- pozitivní směs nymf; 2,3- negativní směs nymf; 4- pozitivní kontrola (kmen Hypr); 5- negativní kontrola.

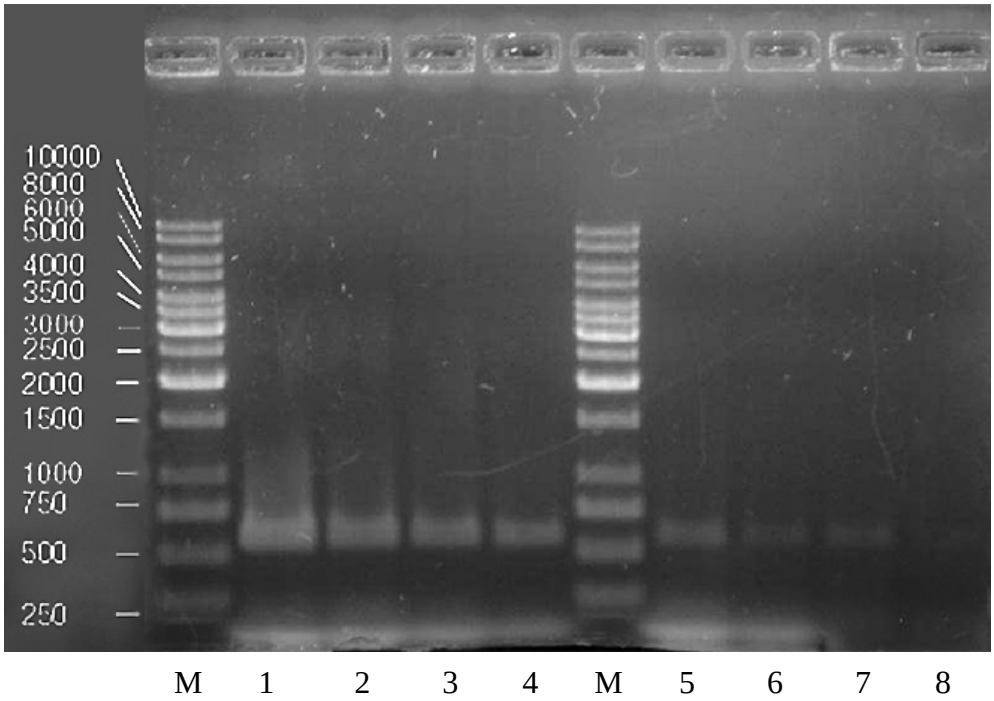
V případě pozitivní směsi klíšťat pocházející z KRNAP byla získána kompletní sekvence úseku kódující obalový E protein. Pokusy o získání této sekvence u ostatních pozitivních vzorků nebyly úspěšné.

V průběhu práce bylo zjištěno, že u některých pozitivních výsledků se separované fragmenty na agarózovém gelu jevily cca o 200 nt delší než pozitivní kontrola. Ve všech případech se jednalo o slabé proužky, indikující nižší koncentraci PCR produktu. Použitím jiného páru primerů bylo dosaženo obdobného efektu, nejednalo se tedy o nespecifickou amplifikaci. V kontrolním pokusu s ředěnou pozitivní kontrolou se proužky u více naředěných vzorků také jevily delší (Obr. 5).



Obr. 5. Ukázka vlivu barviva Sybr Green I na mobilitu PCR produktů a inhibice reakce v ředící řadě. Barveno před separací. M- velikostní standard O'GeneRuler™ 1 kb DNA ladder; jamky 1 - 5: desítkové ředění v homogenátu klíšťat (1 - 10^{-4} - 10^{-8}); 6 - 10: desítkové ředění ve vodě (10^{-4} - 10^{-8}); 11 - negativní kontrola

Tento efekt byl tedy zřejmě způsoben změnou mobility fragmentů po amplifikaci – pravděpodobně použitím barviva Sybr Green I před elektroforetickou separací. Tato hypotéza byla potvrzena obarvením celého gelu po separaci, kdy byly získány fragmenty odpovídajících velikostí (Obr. 6).

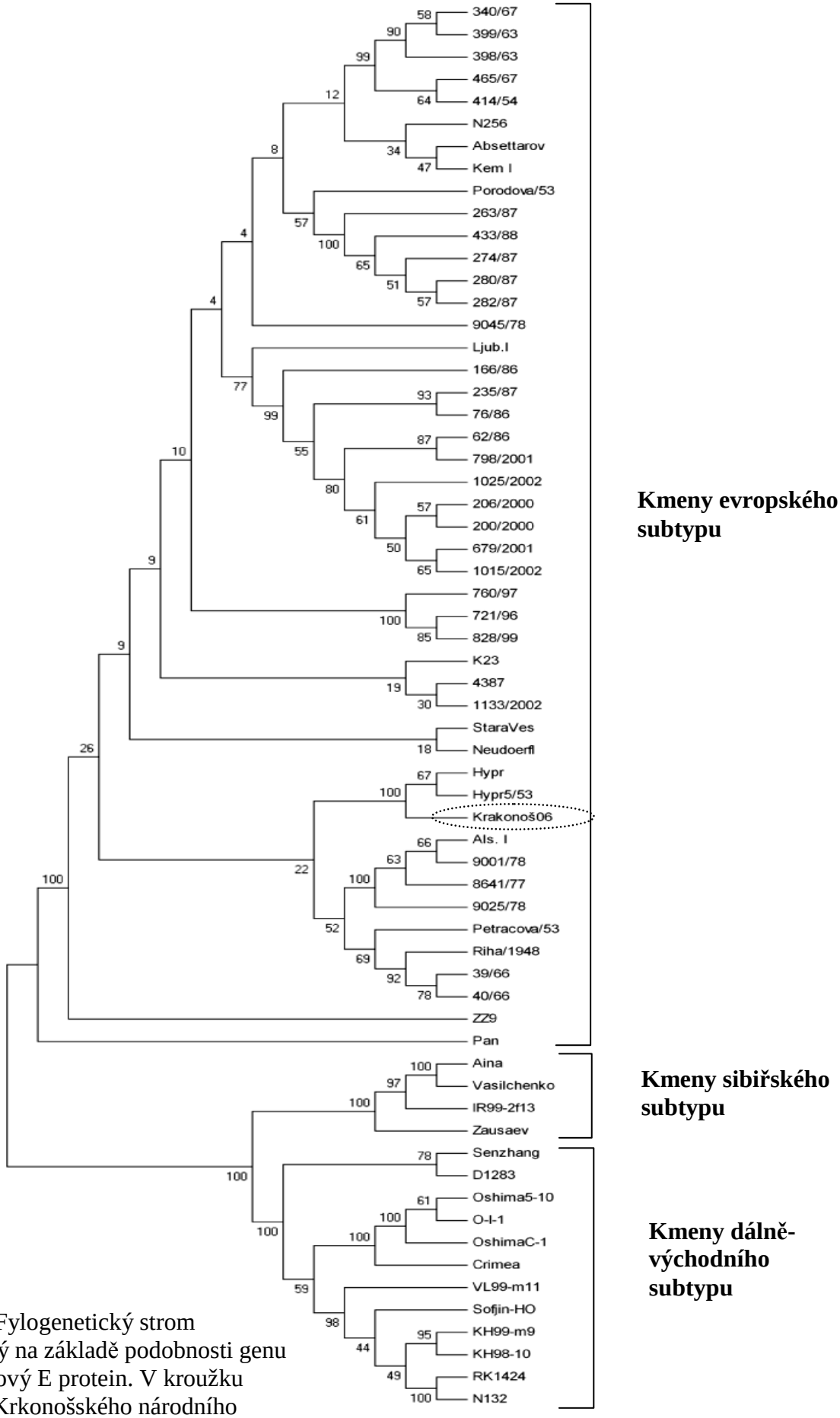


Obr. 6. Ukázka inhibice reakce v ředící řadě. Barveno po separaci. M- velikostní standard O'GeneRuler™ 1 kb DNA ladder; 1 - 4: desítkové ředění ve vodě (10^{-5} - 10^{-8}); 5 - 8: desítkové ředění v homogenátu klíšťat (10^{-5} - 10^{-8}).

Při vyšetření vzorků RNA ředěné v homogenátech z klíšťat byla zjištěna nižší citlivost než u vzorků ředěných ve vodě (Obr. 5).

Při průkazu viru na kultuře PS buněk se v některých případech dal rozpoznat jistý cytopatický efekt, pravděpodobně byl ale způsoben kontaminací kultury, protože detekce virové RNA v médiu z podezřelých jamek metodou RT-PCR byla negativní.

Fylogenickou analýzou byla zjištěna podobnost kmene z KRNAP (Krakonoš06) s kmenem Hypr. Sekvence námi získaného kmene byla poměrně překvapivě zařazena do větve kmenů izolovaných v 50. a 60. letech (Obr. 7).



Obr. 7. Fylogenetický strom sestavený na základě podobnosti genu pro obalový E protein. V kroužku kmen z Krkonošského národního parku (Krakonoš06).

6. Diskuze

Cílem této bakalářské práce bylo detekovat virus klíšťové encefalitidy ve vzorcích z klíšťat. Část klíšťat pocházela z nadmořské výšky nad 600 m n.m., druhá část pak z periurbánní oblasti Českých Budějovic.

Pro detekci bylo použito techniky RT-PCR, běžně používané pro stanovení prevalence viru KE v klíšťatech (Ramelow et al., 1993). Alternativními technikami může být izolace viru z homogenátu klíšťat pomocí novorozených myšek nebo tkáňových kultur s následnou identifikací viru (např. imunofluorescenčním testem, nebo opět RT-PCR reakcí) (Hudson et al., 2001; Danielova et al., 2002). Obě izolační techniky umožňují zjištění biologických vlastností viru a jsou relativně citlivé. Nevýhodou však může být detekce pouze neinaktivováného viru či několik dní trvající inkubace, v případě sajících myšek i finanční náročnost i etická otázka. Proto je v současné době snaha nahradit tyto postupy molekulárně biologickými metodami.

Vzorky byly opracovány roztokem Chelex® 100 resin (BioRad Laboratories, USA). Tento roztok má schopnost vázat všechny možné inhibitory reverzní transkripce a polymerázové řetězové reakce, které bývají často hlavním omezujícím faktorem všech amplifikačních reakcí (Arnal et al., 1999). Supernatant z takto ošetřených vzorků je možné použít přímo pro další zpracování molekulárně biologickými metodami založenými na in vitro amplifikaci specifických fragmentů nukleových kyselin. Chelex® má všeobecně široké uplatnění v aplikacích vyžadujících účinnou extrakci genetického materiálu ze vzorků, u kterých se standardní izolační metody dají použít jen obtížně (např. extrakce z parafínových bločků (Coombs et al., 1999) nebo vzorků konzervovaných etanolem (Aranishi a Okimoto, 2006)). Výhodou této metody je také minimální ztráta genetického materiálu, která se může vyskytovat u některých RNA či DNA purifikačních metod (de Kok et al., 1998), což by mohlo při nízkém titru viru v klíštěti udávat falešně negativní výsledek. Ošetřením suspenzí Chelex® 100 resin je možné dosáhnout citlivosti detekce 14 fg virové RNA, což odpovídá asi 2260 molekulám RNA viru KE (Rudenko et al., 2004). Tento postup dovoluje zpracování velkého množství vzorků v relativně krátkém čase a nemalou výhodou je také nižší finanční náročnost oproti purifikačním metodám využívajícím komerčních kitů. V určitých případech se použití suspenze Chelex® neosvědčilo, důvodem však může být nedostatečná optimalizace metody pro dané použití (Arnal et al., 1999). Z tohoto důvodu je nutné před každou novou aplikací tuto metodu vhodně upravit (např. koncentrace roztoku, doba inkubace apod.).

Pokus o detekci viru v homogenátech klíšťat pomocí kultury buněk prasečí ledviny (PS buňky), se ukázal jako nevhodný a to hlavně kvůli častým kontaminacím buněčné kultury. Důvodem těchto kontaminací je už samotná podstata vyšetřovaného biologického materiálu, kdy v homogenátech klíšťat jen obtížně dosáhneme potřebné čistoty při úplném zachování virulence viru KE, důležité pro úspěšnou infekci a amplifikaci viru v buňkách. Alespoň povrchovou dekontaminaci klíšťat lze provést ošetřením klíšťat před homogenizací 70 % etanolem (Sparagano et al., 1999). Relativně dlouhá kultivace, která má kromě jiného za následek rozklad antibiotik v médiu, zřejmě ještě podpořila růst bakteriálních kontaminací. Následná detekce viru mohla být inhibována sérem přítomným v médiu.

Mnohem praktičtější se z hlediska ekologického a epidemiologického zdají být právě molekulárně biologické metody založené na detekci virové RNA, které zároveň umožňují rychlejší a přesnější identifikaci viru KE. To může být důležité především v oblastech cirkulace více subtypů viru a to jak pro analýzu epidemiologické situace tak pro rychlou diagnostiku onemocnění s následnou úpravou léčebného režimu pacienta (Ruzek et al., 2007). Techniky umožňující analýzu genomových sekvencí mají zřejmý význam i z pohledu molekulárně-ekologických studií pro charakterizaci kmenů viru cirkulujících v přírodních ohniscích. Oproti detekci na buněčných kulturách je také možné detekovat i virus inaktivovaný během zpracování vzorku (Kreil et al., 1997). Úspěšná detekce inaktivovaného viru, případně malého množství viru může být paradoxně i nevýhodou - inaktivace nebo nízký titr viru snižují pravděpodobnost úspěšného přenosu - takto získaná data tedy příliš nevypovídají o skutečném riziku přenosu nákazy. Možnou nevýhodou těchto metod může být inhibice PCR nebo reverzní transkripce, pokud množství hostitelské DNA či RNA (například z krve nasátého klíštěte) ve vzorku přesáhne kritickou hranici, jak bylo prokázáno při detekci DNA *Borrelia burgdorferi* (Cogswell et al., 1996). I naše výsledky jasně ukazují snížení citlivosti detekční metody v homogenátech klíšťat, kdy v ředění 10^{-8} prakticky nebylo možné virus detekovat. Důvodem může být přítomnost různých enzymů (RNAázy, DNAázy,...) či jiných látek obsažených v homogenátech klíšťat a může se objevovat buď v reverzní transkripci nebo v následné PCR reakci.

Možné problémy mohou nastat také při elekroforetické separaci produktů PCR reakce barvených pomocí Sybr Green I, kdy velikost fragmentů pozitivních vzorků se jeví být oproti očekávání mírně větší (asi 150 – 200 nt). Tento efekt byl pozorovaný již dříve (Rudenko et al., 2004). Po provedení PCR reakce s cDNA ředěnou desítkovou řadou se

ukázalo, že se s klesající koncentrací produktu velikost fragmentu zdánlivě prodlužuje. Důvodem je příprava vzorku pro separaci na agarózovém gelu, konkrétně barvení pomocí SYBR Green I. Tato látka po navázání do velkého žlábku dvouřetězcové formy DNA a ozáření UV světlem zeleně fluoreskuje a tím umožňuje pozorování příslušných fragmentů. Při překročení určité hranice poměru jednotek barviva na počet párů bází nukleové kyseliny je však SYBR schopen vázat se na molekulu DNA i povrchově, tímto měnit její pohyblivost v gelu, což vyvolává zmíněný efekt zdánlivě větší velikosti PCR produktů (Zipper et al., 2004). Vyhnout se tomuto efektu je možné barvením produktů až po vlastní separaci na gelu. Nejednoznačné délky fragmentů jsou také důvodem pro potvrzení pozitivního výsledku jinými technikami, jako sekvenční analýzou amplifikovaného úseku (Morozova et al., 2002) či metodou Southern blot (Sparagano et al., 1999). V našem případě byly při sekvenaci získány fragmenty o očekávaných velikostech.

V jednom případě (kmen z KRNAP) se podařilo získat kompletní sekvenci genu pro E protein, u dalších dvou pozitivních vzorků se nepodařilo získat PCR produkt v dostatečném množství a kvalitě. Příčinou je zřejmě nižší citlivost primerů používaných pro sekvenování v porovnání s primery pro detekci. Z fylogenetické analýzy vyplývá, že námi získaná sekvence genu pro obalový protein je nápadně podobná kmenům izolovaným mezi lety 1948-1968 a tedy naznačuje podobnost se starými izoláty KE. To může být způsobeno pomalejším či omezenějším evolučním vývojem v této oblasti, z důvodu nízké populační denzity klíšťat umožňující pouze vertikální přenos s nízkou frekvencí přenosu mezi hostiteli (D. Růžek, osobní sdělení) nebo novou reaktivací původně inaktivovaného ohniska.

I přes poměrně malou velikost souboru vyšetřených klíšťat se námi zjištěná prevalence viru KE v klíšťatech (0,3 %) pocházejících z nadmořských výšek nad 600 m n.m. víceméně shoduje s dříve získanými daty - 0,4 % (Danielová et al., 2006). Protože pravděpodobnost přítomnosti více infikovaných klíšťat v jedné směsi je vzhledem k prevalenci KEV v klíšťatech (0 - 3,4 % (Süss et al., 2004)) extrémně nízká, lze při dané velikosti směsí (5 jedinců) hodnoty stanovené jako minimální infikovanost (MIR) (tj. pouze jedno klíště ve směsi bylo infikované virem KE) považovat za blízké prevalenci reálné.

Studie provedená mezi lety 1986 – 1990 (Krivanec a Vlcek, 1990) v jižních Čechách v okolí Kaplice dokládá prevalenci viru 0,69 %. S touto hodnotou se v podstatě shoduje i námi zjištěná MIR (0,8 %) v periurbánní oblasti Českých Budějovic. Podobná

prevalence viru byla zjištěna i Danielovou et al. (2002) v příměstských oblastech Borovan, Kaplice a Českých Budějovic.

V Evropě se prevalence pohybuje mezi 0 – 3,4 % (Süss et al., 2004), tradičně vyšší je pak v oblasti Pobaltí 5,5 %.

Navzdory velmi podobným hodnotám mohou být naše výsledky zatíženy relativně velkou chybou z důvodu celkově malého souboru vyšetřených klíšťat a nemohou být brány jako směrodatné ve vztahu k celkové prevalenci viru KE v daných oblastech.

Velmi důležitým zdrojem nákazy se jeví městské parky, příměstské lesy či zahrady. Denzita klíšťat v těchto místech může dosahovat poměrně vysokých hodnot, což dokazují i úspěšné sběry klíšťat v městském lesoparku Stromovka v Českých Budějovicích na jaře roku 2008 (nepublikovaná data).

Ačkoli tato práce nemá zjevný význam pro zjištění prevalence viru ve vyšších nadmořských výškách a periurbánních oblastech, může být brána jako základní úvod pro další studie v této oblasti a potvrzení výskytu klíšťat a klíšťaty přenášených patogenů v těchto regionech.

7. Závěr

Byla vypracována literární rešerše na téma výskyt klíšťat a klíšťové encefalitidy ve vyšších nadmořských výškách. Byla vyšetřena klíšťata z Krkonošského národního parku a periurbánní oblasti Českých Budějovic. Virus byl detekován v případě jedné směsi z KRNAP a 2 směsí z oblasti Českých Budějovic. Byla získána kompletní sekvence genu pro E protein z jednoho z pozitivních vzorků a porovnána se sekvencemi známých kmenů viru KE. Byl proveden i pokus o detekci viru na tkáňových kulturách. Izolaci viru KE na sajících myškách nebylo možné z technických důvodů provést. Vyšetřovací metoda byla úspěšně optimalizována na naše laboratorní podmínky.

8. Seznam použité literatury

Aranishi, F.; T. Okimoto. 2006. A simple and reliable method for DNA extraction from bivalve mantle. J Appl Genet. **47**:251-4.

Arnal, C.; V. Ferre-Aubineau; B. Besse; B. Mignotte; L. Schwartzbrod; S. Billaudel. 1999. Comparison of seven RNA extraction methods on stool and shellfish samples prior to hepatitis A virus amplification. J Virol Methods. **77**:17-26.

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

Basta, J.; J. Plch; D. Hulinska; M. Daniel. 1999. Incidence of *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks in an urban environment, Prague, Czech Republic, between 1995 and 1998. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **18**: 515–7.

Beran, J. 2004. Tickborne enchalitis in Europe: Czech Republic, Lithuania and Latvia. Eurosurveillance Weekly **6**: 040624.
http://www.eurosurveillance.org/ew/2004/040624.asp#3

Bradley, C. A. a S. Altizer. 2007. Urbanization and the ecology of wildlife diseases. Trends Ecol Evol. **22**:95-102.

Calisher, C. H. 1988. Antigenic classification and taxonomy of flaviviruses (family Flaviviridae) emphasizing a universal system for the taxonomy of viruses causing tick-borne encephalitis. Acta Virol. **32**:469-78.

Calisher, C. H.; N. Karabatsos; J. M. Dalrymple; R. E. Shope; J. S. Porterfield; E. G. Westaway; W. E. Brandt. 1989 Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. J Gen Virol. **70**:37-43.

Cerny, V.; B. Rosicky; J. Asmera; K. Kadlcik; V. Kobik; E. Kratochvilova; P. Lauterer; D. Novak; E. Pauleova; Z. Sebek; J. Svec; K. Temin. 1965. Výsledky sledování fenologie klíštěte obecného *Ixodes ricinus* (L.) v Českých zemích v letech 1960-1962. Česk. Parasitol. **2**:125-31.

Cihlarova, V. 2002. Identifikace viru klíšťové encefalitidy v klíšťatech metodou RT-PCR. Bakalářská práce. Bilogická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Cogswell, F. B.; C. E. Bantar; T. G. Hughes; Y. Gu; M. T. Philipp. 1996. Host DNA can interfere with detection of *Borrelia burgdorferi* in skin biopsy specimens by PCR. J Clin Microbiol. **34**:980-2.

Coombs, N. J.; A. C. Gough; J. N. Primrose. 1999. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. Nucleic Acids Res. **27**:e12.

Daniel, M.; V. Danielova; B. Kriz; A. Jirsa; J. Nozicka. 2003. Shift of the tick *Ixodes ricinus* and tick-borne encephalitis to higher altitudes in central Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. **22**:327-8.

Daniel, M; B. Kriz; V. Danielova; J. Materna; N. Rudenko; J. Holubova; L. Schwarzova; M. Golovcenko. 2004. Výskyt viru klíšťové encefalitidy a klíšťat infikovaných borreliemi v horách. Zprávy CEM (SZÚ, Praha) **13**:517-19.

Danielova, V.; M. Daniel; J. Holubova; Z. Hajkova; V. Albrecht; J. Karhoul; V. Simonova. 1983. Influence of microclimatic factors on the development and infection rate of ticks *Ixodes ricinus* (L.) under experimental conditions. Folia Parasitol (Praha). **30**:153-61.

Danielova, V. a J. Holubova. 1991. Transovarial transmission rate of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks. In: Dusbábek F., V .Bukva (Eds.): Modern Acarology. Academia, Prague and SPB Academic Publishing bv. The Hague, Vol. 2, str.7-10.

Danielova, V.; J. Holubova; M. Daniel. 2002. 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**:145-51.

Danielova, V.; J. Holubova; M. Pejcoch; M. Daniel. 2002. Potential significance of transovarial transmission in the circulation of tick-borne encephalitis virus. Folia Parasitol (Praha). **49**:323-5.

Danielova, V. 2002. Natural foci of tick-borne encephalitis and prerequisites for their existence. Int J Med Microbiol. **291** Suppl 33:183-6.

Danielova, V.; N. Rudenko; M. Daniel; J. Holubova; J. Materna; M. Golovchenko; L. Schwarzova. 2006. Extension of *Ixodes ricinus* ticks and agents of tick-borne diseases to mountain areas in the Czech Republic. Int J Med Microbiol. 296 Suppl **40**:48-53

Dautel, H. a O. Kahl. 1999. Ticks (*acari: ixodoidea*) and their medical importance in the urban environment. V: Robinson W.H., Rettich F., Rambo G.W. (ed.): Proceeding of the 3rd international conference on urban pests. Prague, str. 73-82.

de Kok, J. B.; J. C. Hendriks; W. W. van Solinge; H. L. Willems; E. J. Mensink; D. W. Swinkels. 1998. Use of real-time quantitative PCR to compare DNA isolation methods. Clin Chem. **44**:2201-4.

Dumpis, U.; D. Crook; J. Oksi. 1999. Tick-borne encephalitis. Clin Infect Dis. **28**:882-90.

Ecker, M.; S. L. Allison; T. Meixner; F. X. Heinz. 1999. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. J Gen Virol. **80**:179-85.

Gallia, F.; J. Rampas; L. Hollender. 1949. Laboratorní infekce encefalickým virem. Časopis lékařů českých. **88:**224-9.

Gaunt, M. W.; A. A. Sall; X. de Lamballerie; A. K. Falconar; T. I. Dzhivanian; E. A. Gould. 2001. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. J Gen Virol. **82**:1867-76.

Golovljova, I.; S. Vene; K. B. Sjölander; V. Vasilenko; A. Plyusnin; A. Lundkvist. 2004. Characterization of tick-borne encephalitis virus from Estonia. J Med Virol. **74**:580-8.

Grard, G.; G. Moureau; R. N. Charrel; J. J. Lemasson; J. P. Gonzalez; P. Gallian; T. S. Gritsun; E. C. Holmes; E. A. Gould; X. de Lamballerie. 2007. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. Virology. **361**:80-92.

Gresikova, M. a M. Kaluzova. 1997. Biology of tick-borne encephalitis virus. Acta Virol. **41**:115-24.

Gritsun, T. S.; V. A. Lashkevich; E. A. Gould. 2003. Tick-borne encephalitis. Antiviral Res. **57**:129-46.

Gritsun, T. S.; T. V. Dropova; A. I. Zhankov; M. Armesto; S. L. Turner; M. P. Dropova; V. V. Pogodina; V. A. Lashkevich; E. A. Gould. 2003. Characterization of a siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. J Virol. **77**:25-36.

Higgs, S.; B. S. Schneider; D. L. Vanlandingham; K. A. Klinger; E. A. Gould. 2005. Nonviremic transmission of West Nile virus. Proc Natl Acad Sci U S A. **102**:8871-4.

Heinz, F. X. 2003. Molecular aspects of TBE virus research. Vaccine. **21** Suppl. 1:3-10.

Horak, I. G.; J. L. Camicas; J. E. Keirans. 2002. The *Argasidae*, *Ixodidae* and *Nuttalliellidae* (*Acari*: *Ixodida*): a world list of valid tick names. Exp Appl Acarol. **28**:27-54.

Hubalek, Z.; J. Halouzka; Z. Juricova. 1993. Prevalence of borreliae in *Ixodes ricinus* ticks from urban parks. Folia Parasitol. **40**:236

Hubalek, Z.; I. Pow; H. W. Reid; M. H Hussain. 1995. Antigenic similarity of central European encephalitis and louping-ill viruses. Acta Virol. **39**:251-6.

Hubalek Z.; J. Halouzka; Z. Juricova. 2004. *Borreliae* in *Ixodes ricinus* ticks feeding on humans. Med Vet Entomol. **18**: 228-31.

Hudson, P. J.; A. Rizzoli; R. Rosa; C. Chemini; L. D. Jones; E. A. Gould. 2001. Tick-borne encephalitis virus in northern Italy: molecular analysis, relationships with density and seasonal dynamics of *Ixodes ricinus*. Med Vet Entomol. **15**:304-13.

Chambers, T. J.; C. S. Hahn; R. Galler; C. M. Rice. 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. Annu. Rev. Microbiol. **44:**649-688.

Index of Viruses - Flaviviridae (2006). In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C (Ed), Columbia University, New York, USA. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_index.htm

Ilienko, V.; N. I. Komandenko; V. G. Platonov; I. N. Prozorova; A. G. Panov. 1974. Pathogenic study on chronic forms of tick-borne encephalitis. Acta Virol. **18**:341-6.

Jääskeläinen, A. E.; T. Tikkakoski; N. Y. Uzcatequi; A. N. Alekseev; A. Vaheri; O. Vapalahti. 2006. Siberian subtype tickborne encephalitis virus, Finland. Emerg Infect Dis. **12**:1568-71.

Korenberg, E. T. 2000. Seasonal population dynamics of ixodes ticks and tick-borne encephalitis virus. Exp Appl Acarol. **24**:665-81.

Kozuch, O.; V. Mayer; J. Nosek. 1970. Quantitative study of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks. Acta Virol. **14**:53-8

Kozuch, O. a J. Nosek. 1971. Transmission of tick-borne encephalitis (TBE) virus by *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks. Acta Virol. **15**:334.

Kreil, T. R.; K. Zimmermann; I. Burger; E. Attakpah; J. W. Mannhalter; M. M. Eibl. 1997. Detection of tick-borne encephalitis virus by sample transfer, plaque assay and strand-specific reverse transcriptase polymerase chain reaction: what do we detect? J Virol Methods. **68**:1-8.

Krejci, J. 1949. Epidemie virusových encefalitid na Vyškovsku. Lék. Listy (Brno) **4:**73-75, 112-16, 132-34.

Krivanec, K.; J. Kopecky; E. Tomkova; L. Grubhoffer. 1988. Isolation of TBE virus from the tick *Ixodes hexagonus*. Folia Parasitol (Praha). **35**:273-6.

Krivanec, K. a M. Vlcek. 1990. Studium mikrostruktury lesního ohniska klíšťové encefalitidy v povodí Malše u Kaplice (jižní Čechy). V: Kopecký, J.; L. Grubhoffer; K. Krivanec; E. Tomkova; J. Veres. Studium biologie a ekologie viru klíšťové encefalitidy. Závěrečná zpráva. České Budějovice, Parazitologický ústav AVČR.

Kriz, B. a C. Benes. 2007. Extrémní vzestup incidence klíšťové encefalitidy v České republice v roce 2006. Zprávy CEM (SZÚ, Praha) **16**:269-74

Kuno, G. a G. J. Chang. 2005. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. Clin Microbiol Rev. **18**:608-37

Labuda, M.; J. Lysy; O. Kozuch. 1991. On virus-vector-host relationship in the central European tick-borne encephalitis foci (west slovakia). In: Dusbábek F., V. Bukva (Eds.): Modern Acarology. Academia, Prague and SPB Academic Publishing bv. The Hague, Vol. 2, str. 29 – 33.

Labuda M.; L. D. Jones; T. Williams; P. A. Nuttall. 1993. Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extract. Med Vet Entomol. **7**:193-6.

Labuda, M.; O. Kozuch; E. Zuffova; E. Elekova; R. S. Hails; P. A. Nuttall. 1997. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts. Virology. **18**:138-43.

Lichard, M. a O. Kozuch. 1967. Persistence of tick-borne encephalitis virus in nymphs and adults of *Ixodes arboricola* and its transmission to white mice. Acta Virol**. 11**:480.

Lindenbach, B. D. a C. M. Rice. 2003. Molecular biology of flaviviruses. Adv Virus Res. **59**:23-61.

Lindenbach, B. D.; H. J. Thiel; C. M. Rice. 2005. Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe, D. M. a Howley P. M. (ed.) Fields Virology, 5th Edition. str. 1101-1112.

Lindgren, E.; L. Tälleklint; T. Polfeldt. 2000. Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. Environ Health Perspect. **108**:119-23.

LoGiudice, K.; R. S. Ostfeld; K. A. Schmidt; F. Keesing. 2003. The ecology of infectious disease: effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. Proc Natl Acad Sci U S A. **100**:567-71.

Lundkvist, A.; S. Vene; I. Golovljova; V. Mavtchoutko; M. Forsgren; V. Kalnina; A. Plyusnin. 2001. Characterization of Tick-Borne encephalitis virus from Latvia: Evidence for Co-circulation of three distinct subtypes. J Med Virol. **65**:730-735.

Maetzel, D.; W. A. Maier; H. Kampen. 2005. Borrelia burgdorferi infection prevalences in questing Ixodes ricinus ticks (Acari: Ixodidae) in urban and suburban Bonn, western Germany. Parasitol Res. **95**:5-12.

Mandl, C. W.; F. Guirakhoo; H. Holzmann; F. X. Heinz; C. Kunz. 1989. Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model. J Virol. **63**:564-71.

Mandl, C. W. 2005. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. Virus Res. **11**:161-174.

Materna, J.; M. Daniel; V. Danielova. 2005. Altitudinal distribution limit of the tick *Ixodes ricinus* shifted considerably towards higher altitudes in central Europe: results of three years monitoring in the Krkonose Mts. (Czech Republic). Cent Eur J Public Health. **13**:24-8.

Morozova, O. V.; A. K. Dobrotvorsky; N. N. Livanova; S. E. Tkachev; V. N. Bakhvalova; A. B. Beklamishev; F. C. Cabello. 2002. PCR detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, tick-borne encephalitis virus, and the human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes persulcatus* ticks from Western Siberia, Russia. J Clin Microbiol. **40**:3802-4.

Nosek, J.; O. Kozuch; M. Lichard. 1967. Persistence of tick-borne encephalitis virus in, and its transmission by *Haemaphysalis spinigera* and *H. turturis* ticks. Acta Virol. **11**:479.

Nosek, J.; M. Lichard; M. Sztankay. 1967. The ecology of ticks in the Tribec and Hronský Inovec Mountains**.** Bull World Health Organ. **36**:Suppl 1:49-59.

Nuttall, P. A. a L. D. Jones. 1991. Non-viraemic tick-borne virus transmission mechanism and significance. In: Dusbábek F., V. Bukva (Eds.): Modern Acarology. Academia, Prague and SPB Academic Publishing bv. The Hague, Vol. 2, str.3-6.

Parola, P. a D. Raoult. 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. Clin Infect Dis. **32**:897-928.

Pejchalova, K.; A. Zakovska; M. Mejzlikova; J. Halouzka; M. Dendis. 2007. Isolation, cultivation and identification of *Borrelia burgdorferi* genospecies from *Ixodes ricinus* ticks from the city of Brno, Czech Republic. Ann Agric Environ Med.**14**:75-9.

Pletnev, A. G.; M. Bray; J. Huggins; C. J. Lai. 1992. Construction and characterization of chimeric tick-borne encephalitis/dengue type 4 viruses**.** Proc Natl Acad Sci U S A. **89**:10532-6.

Radda, A.; H. Hofmann; G. Pretzmann. 1969. Threshold of viraemia in *Apodemus flavicollis* for infection of *Ixodes ricinus* with tick-borne encephalitis virus. Acta Virol. **13**:74-7.

Ramelow, C.; J. Süss; D. Berndt; M. Roggerdorf; E. Schreier. 1993. Detection of tick-borne encephalitis virus RNA in ticks (*Ixodes ricinus*) by the polymerase chain reaction. J Virol Methods. **45**:115-9.

Rampas, J. a F. Gallia. 1949. Isolace viru encefalitidy z klíšťat *Ixodes ricinus.* Časopis lékařů českých. **88:**1179-80.

Randolph, S. E. a D. J. Rogers. 2000. Fragile transmission cycles of tick-borne encephalitis virus may be disrupted by predicted climate change. Proc Biol Sci. **267**:1741-4.

Rudenko, N.; M. Golovchenko; V. Cihlarova; L. Grubhoffer. 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.

Ruzek, D.; H. Stastna; J. Kopecky; I. Golovljova; L. Grubhoffer. 2007. Rapid subtyping of tick-borne encephalitis virus isolates using multiplex RT-PCR. J Virol Methods. **144**:133-7.

Skarpaas, T.; U. Ljøstad; A. Sundøy. 2004. First human cases of tickborne encephalitis, Norway. Emerg Infect Dis. **10**:2241-3.

Slavik I.; E. Mrena; V. Mayer. 1970. Studies on Tick-borne encephalitis virus. II. Virus morphology and some data on virus structure. Acta Virol. **14**:8-16.

Sparagano, O. A.; M. T. Allsopp; R. A. Mank; S. G. Rijpkema; J. V. Figueroa; F. Jongeian. 1999. Molecular detection of pathogen DNA in ticks (*Acari: Ixodidae*): a review. Exp Appl Acarol. **23**:929-60.

Stadler, K.; S. L. Allison; J. Schalich; F. X. Heinz. 1997. Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. J. Virol. **71**:8475-81.

Stanczak, J.; R. M. Gabre; W. Kruminis- Łozowska; M. Racewicz; B. Kubica-Biernat. 2004. *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests**.** Ann Agric Environ Med. **11**:109-14.

Státní zdravotní ústav Praha. http://www.szu.cz/

Sumilo, D.; L. Asokliene; A. Bormane; V. Vasilenko; I. Golovljova; S. E. Randolph. 2007. Climate change cannot explain the upsurge of tick-borne encephalitis in the Baltics. PLoS ONE. **2**:e500

Süss, J. 2003. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. Vaccine. **21** Suppl. 1:19-35.

Süss, J.; C. Schrader; U. Falk; N. Wohanka. 2004. Tick-borne encephalitis (TBE) in Germany--epidemiological data, development of risk areas and virus prevalence in field-collected ticks and in ticks removed from humans. Int J Med Microbiol. **293** Suppl 37:69-79.

Volf, P.; P. Horak a kol. 2007. Paraziti a jejich biologie. Nakladatelství Triton, Praha. ISBN 978-80-7387-008-9. str. 258-63.

Wallner, G.; C. W. Mandl; C. Kunz; F. X. Heinz. 1995. The flavivirus 3'-noncoding region: extensive size heterogeneity independent of evolutionary relationships among strains of tick-borne encephalitis virus. Virology. **213**:169-78.

Wallner, G.; C. W. Mandl; M. Ecker; H. Holzmann; K. Stiasny; C. Kunz; F. X. Heinz. 1996. Characterization and complete genome sequences of high- and low-virulence variants of tick-borne encephalitis virus. J Gen Virol. **77**:1035-42.

World Health Organization Regional Office for Europe. Centralized Information System for Infectious Diseases. http://data.euro.who.int/cisid/

Zakovska, A.; J. Netusil; H. Martinkova. 2007. Influence of environmental factors on the occurrence of *Ixodes ricinus* ticks in the urban locality of Brno - Pisárky, Czech Republic. J Vector Ecol. **32**:29-33.

Zeman, P. a C. Benes. 2004. A tick-borne encephalitis ceiling in Central Europe has moved upwards during the last 30 years: possible impact of global warming? Int J Med Microbiol. **293** Suppl 37:48-54.

Zipper, H.; H. Brunner; J. Bernhagen; F. Vitzthum. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. Nucleic Acids Res. **32**:e103.