

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**



VAKCÍNY PROTI KLÍŠŤATŮM

Bakalářská diplomová práce 2010

Autor: Adéla Harcubová

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

Harcubová A., 2010: Vakcíny proti klíšťatům. [Vaccines against ticks. Bc. Thesis, in Czech] – 43 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Ticks belong to the ectoparasites which are dangerous for the human beings and another species of vertebrates as well, especially, because of the transmission of bacterial, viral, and protozoan pathogens. Currently the only tick vaccine has been commercially available. The incidence of these dangerous pathogenic organisms transmitted by ticks might be reduced by the discovery of another efficacious vaccines.

The main part of the thesis is focused on the tick vaccine research and its progress. The descriptions of the vector (tick) and transmitted pathogenes are included. Also the tick salivary molecules and their functions are described - it relates to the research of the exposed antigens (salivary antigens) vaccines. Research opportunities like concealed antigens, trans-block and dual action vaccines are also mentioned.

In conclusion, all the strategies, the efficiency and acceptability concerning the production and availability of the tick vaccine are evaluated.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury a rad školitele.

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 jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis studenta

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat především svému školiteli Doc. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za odborné vedení mé práce, poskytnutí materiálů a cenné rady. Děkuji také své rodině a spolubydlícím za psychickou podporu při tvorbě této práce.

OBSAH

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE	4
2. KLÍŠTĚ	5
2.1 Klíšťata	5
2.2 Životní cyklus klíšťat.....	6
2.3 Interakce klíšťe- hostitel.....	6
2.3.1 Imunitní odpověď hostitele	7
3. SLINY KLÍŠTĚTE	8
3.1 Vliv klíšťecích slin na obranné mechanismy hostitele	8
3.2 Koagulace	8
3.2.1 Antikoagulační funkce slin	8
3.2.2 Vazodilatační látky slin.....	9
3.3 Suprese imunitního systému hostitele	9
3.3.1 T buněčné inhibitory.....	10
3.3.2 B buněčné inhibitory.....	10
3.3.3 Inhibitory komplementu.....	10
3.3.4 Inhibitory neutrofilů a makrofágů	10
3.4 Slinami aktiovaný přenos.....	11
4. PATOGENY PŘENÁŠENÉ KLÍŠŤATY	12
4.1 Borrelia a Lymeská choroba.....	12
4.2 Virus klíšťové encefalitidy	13
4.3 Babesia.....	14
4.4 Ostatní patogeny.....	15
4.4.1 Omská hemoragická horečka	15
4.4.2 Kyasanurská lesní choroba.....	15
4.4.3 Krymsko-konžská hemoragická horečka	16
4.4.4 Ehrlichia a Anaplasma	16
4.4.5 Bartonella	17
4.4.6 Theileria	17
5. VAKCÍNY	18
5.1 Vakcíny proti klíšťatům.....	18
5.1.1 Vakcína „TickGARD“	19
5.2 Exponované antigeny	20
5.2.1 Calreticulin	21
5.2.2 Protein p29	21
5.2.3 Cementový protein RIM36	22
5.2.4 Slinný protein HL 34	22
5.2.5 Imunoglobulin vázající proteiny a histamin vázající proteiny	23
5.2.7 Cementový protein 64P.....	23
5.2.8 Sialostatin L2.....	23
5.3 Skryté antigeny.....	24
5.3.1 Bm86 a jemu podobné střevní antigeny.....	25
5.3.1.1 Bm86 a Bm95	26
5.3.1.2 Bm86 a Ba86	26
5.3.2 Inhibitory serinových proteináz- serpiny	26
5.3.2.1 Serpin HLS1	27
5.3.2.2 Serpin HLS2	27
5.3.3 Protein P27/30	27

5.3.4 Chitinázový protein CHT1	28
5.3.5 Rekombinantní antigeny 4D8, 4F8 a 4E6.....	28
5.3.6 Vitellin	29
5.3.7 Voraxin.....	29
5.3.8 Ferritin 1 a ferritin 2.....	29
5.4 Duální vakcíny (Dual action vakcíny).....	30
5.4.1 Cementový protein 64P.....	30
5.5 Přenos blokuující vakcíny (trans-block vakcíny).....	31
6. DISKUSE	33
7. ZÁVĚR.....	35
8. PŘEHLED LITERATURY	36

1. ÚVOD A CÍL PRÁCE

Klíšťata patří k nebezpečným ektoparazitům jak pro člověka, tak pro další druhy obratlovců. Jejich nebezpečí spočívá hlavně v přenosu mnoha patogenů- od bakterií přes viry (především flaviviry) po parazitické červy a prvoky. Hostitelé dokážou vyvinout určitou imunitní reakci proti klíštěti, ale často nedokáží zabránit projevům infekce. Tito ektoparaziti dokáží úspěšně uniknout imunitním mechanismům. Především ve slinách klíštěte jsou obsaženy látky zabraňující srážení krve, potlačující imunitu a vytvářející vhodné podmínky pro přežití a množení parazita. Proto jsou strategie pro vývoj vakcín proti klíšťatům a jimi přenášeným patogenům v současné době stále více důležité.

V současnosti existuje jediná komerčně dostupná vakcína proti klíšťatům a to u skotu proti klíštěti *Bophilus microplus*, využívající k imunizaci skryté antigeny ze střevní stěny klíštěte. Její vývoj, úspěšné dokončení a uvedení do prodeje pro veterinární účely trval 12 let. Problémem je možný vývoj rezistence klíšťat k této vakcíně. Současný výzkum a vývoj dalších vakcín je zaměřen na zkoumání exponovaných antigenů (v klíštěcích slinách), s kterými přijde hostitel běžně do styku a skrytých antigenů (v klíštěcím střevě). Existuje snaha o vytvoření duální vakcíny, která by obsahovala antigen přítomný jak ve slinách klíštěte, tak v klíštěcím střevě nebo jinde v těle.

Cíl práce:

Cílem mé práce je popsat výzkum a vývoj v oblasti vakcín proti klíšťatům. To zahrnuje popis vektora (klíštěte) a přenášených patogenů. Důležitý je také popis klíštěcích slin a jejich funkcí, s čímž souvisí vývoj vakcíny založené na exponovaných antigenech (antigenech slin). Další možností jsou vakcíny založené na „skrytých“ antigenech, vakcíny blokující přenos patogenů (trans- block vakcíny) a dual action vakcíny.

2. KLÍŠTĚ

2.1 Klíšťata

Klíšťata jsou obligátní krevsající ektoparaziti patřící do kmene členovců (*Arthropoda*) a třídy pavoukoců (*Arachnida*). Vyskytují se po celém světě od arktických oblastí po tropické. Zahrnují 899 druhů, které parazitují na suchozemských obratlovcích (de la Fuente, Kocan, 2006). Rozdělujeme je do dvou čeledí. První čeledí jsou *Agrasidae*, do které patří „měkká“ klíšťata žijící převážně v teplejších oblastech u kterých sání probíhá rychle (hodiny). Druhou čeledí jsou *Ixodidae*.



Obr. 1 Klíště *Ixodes ricinus*

Do čeledi patří „tvrdá“ klíšťata, která žijí v chladnějších oblastech a sají pomalu (dny) (Couvreur et al., 2007). Klíšťata přenášejí řadu významných lidských a zvířecích patogenů, které způsobují choroby jako je klíšťová encefalitida, Lymská choroba, babesióza a thelerióza. Navíc samotná infestace klíšťaty snižuje ekonomickou produkci hospodářských zvířat (Nuttal et al., 2006).

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) (Obr. 1) je u nás nejhojnějším a nejvýznamnějším zástupcem, řadíme ho do řádu Ixodida, čeledi Ixodidae a podčeledi Ixodinae. Vyskytuje se v celé Evropě a můžeme ho najít také v některých oblastech Afriky. Klíšťata žijí na vlhčích loukách a pastvinách nebo v křovinách, většinou do 800 m.n.m. a jejich výskyt je vázán na přítomnost vhodných, především savčích, hostitelů. Klíště obecné přenáší dva významné patogeny. Jsou to *Borrelia burgdorferi* sensu lato způsobující Lymskou nemoc a virus klíšťové encefalitidy (TBE virus) způsobující zánět mozkových blan.

Mezi další významné druhy klíšťat patří například *Boophilus microplus* parazitující hlavně na hovězím dobytku. Dále pak *Ixodes scapularis*, *Haemaphysalis longicornis*, *Haemaphysalis concinna*, *Dermacentor reticulatus*. U nás, především na jižní Moravě, žijí piják lužní (*Dermacentor reticulans*) a klíšť lužní (*Haemaphysalis concinna*).

2.2 Životní cyklus klíšťat

Klíšťata se vyskytují ve čtyřech vývojových stádiích. Jako první stadium můžeme označit vajíčko. Další stadia jsou šestinohá larva, osminohá nymfa a dospělé klíště. Každá přeměna v další vývojové stadium předpokládá předchozí sání na hostiteli, přičemž můžeme klíšťata rozlišit na jednohostitelská (př. *B. microplus*), dvouhostitelská a trojhostitelská. Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) patří mezi klíšťata trojhostitelská, to znamená, že každé vývojové stadium saje na jiném hostiteli a různě dlouhou dobu. Většinou každé stadium potřebuje ke svému vývoji přibližně jeden rok. Larvy sají na plazech, ptácích či drobných hlodavcích 2-4 dny, velikost těla zvětší až 20krát, následně odpadne, svléká se a mění se v nymfu. Nymfa saje na středně velkých hlodavcích 3-5 dní, zvětší se až 40krát, odpadne a opět se svléká a přeměňuje v dospělého jedince, který vyhledá třetího hostitele. Dospělé samice sají pouze na velkých savcích včetně člověka 5-14 dní a v průběhu sání zvětší až 200krát svůj objem. Pro dospělá klíšťata je na hřbetní straně typický tvrdý štítek (scutum), který u samců kryje téměř celé tělo, u samic v nenasáté stavu zasahuje pouze do poloviny či třetiny jejich elastického idiosomatu a díky tomuto uspořádání může samička při sání tolik zvětšit svůj objem a získat tím dostatek potravy pro tvorbu vajíček (Volf, Horák a kol., 2007). Páření probíhá na hostiteli, což je nejpravděpodobnější místo setkání obou pohlaví, ale i mimo něj. Po opuštění hostitele samice naklade až 5000 vajíček a následně umírá.

2.3 Interakce klíště- hostitel

Přítomnost hostitele zjišťují klíšťata Hallerovým orgánem na tarzálních člancích předního páru nohou. Nejvhodnější místo k přísátí na hostitele vyhledávají pomocí senzoričkových orgánů na palpách. Ústní ústrojí s tzv. hypostomem je vybaveno koncentrickými řadami zahnutých zoubků, které udržují klíště ukotvené v tkáni hostitele. U některých klíšťat toto spojení ještě posiluje vylučovaná bílkovinná hmota zvaná cement (Volf, Horák a kol., 2007). U těchto klíšťat je první typ cementu vylučován je několik minut po ukotvení klíštěte v hostiteli. Rychle tvrdne a tvoří pevný střed. Druhý typ cementu je sekretován přibližně za 24 hodin po upevnění a jeho vylučování trvá tři až čtyři dny (Bishop et al., 2002). U „tvrdých“ klíšťat jsou charakterizovány tři fáze sání: přípravná fáze- trvá 24-36 hodin, klíště se ukotvuje v hostiteli; pomalá sací fáze- klíště začíná nasávat a trávit krevní potravu; rychlá sací fáze- přichází 12-36 hodin před úplným naplněním, kdy klíště přijímá velké množství krve a rychle roste (Tsuda et al., 2001).

Místo přisátí klíštěte v kůži je rozhraním klíště – hostitel – patogen a je výrazně upravováno farmakologicky aktivními látkami ze slin klíštěte (Nuttal, Labuda, 2004). Toto místo se stává výhodným pro přežití a množení parazita.

2.3.1 *Imunitní odpověď hostitele*

Odpověď na sání klíštěte na imunitním hostiteli charakterizujeme jako kožní bazofilní hypersenzitivní reakci, která zabraňuje sání a zamezuje svlékání. Klíště uhyne vyhladováním a vyschnutím. Primární odpověď naivního hostitele je zánětlivá reakce, která však není dostatečně rychlá, aby postihla sající klíště a zabránila dokončení sání.

Antigeny obsažené v klíštěcích slinách a v cementu jsou přítomné v kůži několik dní a jsou rozpoznávány Langerhansovými buňkami, což jsou dendritické buňky přítomné v pokožce. Následně migrují do drénujících lymfatických uzlin, kde tyto antigeny prezentují T-lymfocytům. Cytokiny produkované Th1 subpopulací T-lymfocytů, IL-2 a INF- γ , spouštějí zánětlivou a protilátkovou odpověď (Singh, Girschick, 2003). Převládajícím buněčným typem, který infiltruje místo kousnutí klíštěte, jsou bazofily (Askenase, 1977). Nejvýznamější adaptivní imunitní reakce proti klíšťatům je kožní bazofilní hypersenzitivita, forma DTH reakce (Brown & Askenase, 1983). Objevuje se také odpověď homocytotropních protilátek. Vytvářené protilátky, hlavně IgE, jsou schopné vázat se na Fc receptor na bazofilech a žírných buňkách. Po interakci s antigeny slin spustí jejich degranulaci a uvolnění několika biologicky aktivních látek (Matsuda et al., 1990). Zvláštní význam mají hlavně histamin a serotonin (Matsuda et al., 1985). Histamin způsobuje roztažení cév a je hlavním mediátorem zánětu. Dojde k otoku a zarudnutí v místě sání klíštěte. Histamin také omezuje sání a potlačuje slinění klíštěte. Zvyšuje hladinu cytokinu TNF α , který potlačuje infekci *Borrelia burgdorferi*, a aktivuje NK buňky. Degranulace může být také spuštěna navázáním anafylatoxinů, které vznikají při aktivaci komplementu alternativní cestou (Nuttal & Labuda, 2004).

Klíšťata musí těmto hostitelským mechanismům čelit. Vyvinula proto mnoho opatření, které inaktivují molekuly hostitele a brzdí rozvoj obranných reakcí.

3. SLINY KLÍŠTĚTE

3.1 Vliv klíštěcích slin na obranné mechanismy hostitele

Krevsající ektoparazité, včetně klíšťat, vyvinuli mechanismy ovlivňující vývoj obranné imunitní a zánětlivé odpovědi hostitele, srážení krve a vasokonstrikci. To vše umožňují farmakologicky aktivní látky obsažené ve slinách klíštěte, které jsou uvolňovány během sání (Mans et al., 2008).

Klíštěcí sliny obsahují řadu bioaktivních proteinových a lipidových molekul, které mají různé farmakologické účinky na obranné mechanismy hostitele. Důležité jsou inhibitory koagulace, které zabraňují srážení krve, aby klíště mohlo bez problémů sát potravu, kterou potřebuje ke svému vývinu, k produkci vajíček a pro přežití (Singh, Girschick, 2003). Sekret ze slinných žláz obsahuje také řadu imunosupresivních látek, které potlačují odpověď imunitního systému hostitele působením na různé složky imunity.

3.2 Koagulace

Každý hostitel se přirozeně brání ztrátám krve. Touto obranou je zúžení cév neboli vasokonstrikce, adheze a agregace trombocytů vytvářejících zátky v poškozeném místě a koagulační kaskáda. Zátky vytvořené z krevních destiček v místě poškození cévní stěny poskytují plochu pro následující koagulační procesy. Koagulační kaskáda je aktivována vnější a vnitřní cestou, zahrnuje 12 koagulačních faktorů, které jsou postupně aktivovány během koagulace. Obě cesty směřují k aktivaci faktoru X a přeměně protrombinu na trombin. Aktivovaný trombin rozštěpí plazmatický protein fibrinogen, čímž vznikají fragmenty, které se shlukují a vytvářejí fibrinové sraženiny (Singh, Girschick, 2003). Koagulaci koordinují proteolytické enzymy, jejichž funkce je regulována serpiny (inhibitory serinových proteináz). Funkce serpinů je koordinována serinovými proteinázami (Mulenga et al., 2001). Klíště se snaží těmito reakcím zabránit. Je toho schopno díky molekulám přítomným ve slinách během sání. Tyto látky inhibují některé koagulační faktory, rozšiřují cévy a celkově brání správnému průběhu koagulace (Titus et al., 2006).

3.2.1 Antikoagulační funkce slin

Ve slinách klíštěte kromě biochemických faktorů inhibujících koagulaci nacházíme také látky potlačující agregaci krevních destiček a stimulatory fibrinolýzy. Mnoho antikoagulantů

se zaměřuje na koagulační faktor Xa a trombin. Inhibitory obou těchto faktorů byly objeveny např. u klíštěte *Ornithodoros savignyi*. Vliv na trombin byl prokázán tím, že extrakt slinných žláz (SGE) tohoto klíštěte prodlužoval aktivovaný parciální tromboplastinový čas (APTT) a protrombinový čas (PT) (Gaspar et al., 1995). Z klíštěte *Amblyomma americanum* byl izolován inhibitor trombinu, který však neinhibuje žádné další proteázy včetně faktoru Xa (Zhu et al., 1997). Podobné inhibitory trombinu byly prokázány také u nymf klíštěte *Hyalomma dromedarii*, které parazitují převážně na velbloudech (Ibrahim et al., 2001). Dalšími antikoagulačními látkami využívanými klíšťaty jsou serpiny, analyzovány byly například u klíštěte *Ixodes scapularis* (Mulenga et al., 2009).

3.2.2 Vazodilatační látky slin

Klíšťata potřebují stálý přívod krve cévami do místa sání, aby se mohlo úspěšně živit na hostiteli. V jejich slinách jsou proto obsaženy prostaglandiny (PG), které brání stažení cévní stěny a naopak cévy roztahují, uvolňují hladké svalstvo a zvyšují přítok krve cévami. Prostaglandin E₂ (PGE₂) je také inhibitorem agregace krevních destiček (Singh, Girschick, 2003) a také inhibuje dozrávání dendritických buněk (Guo, Booth et al., 2009).

3.3 Suprese imunitního systému hostitele

Bylo prokázáno, že složky slinného sekretu klíštěte ovlivňují jednotlivé funkce imunitního systému hostitele. Zabraňují aktivaci komplementu alternativní cestou (Ribeiro, 1987), potlačují fagocytózu patogenů a produkci zánětlivých cytokinů makrofágy (Ramachandra & Wikel, 1992). Dále potlačují aktivitu NK buněk (Kubeš et al., 2002) a proliferaci T lymfocytů (Urioste et al., 1994) i B lymfocytů (Hannier et al., 2003). Mají histamin vázající (Paesen et al., 1999) a imunoglobulin vázající vlastnosti (Wang & Nuttall, 1999). Histamin vázající proteiny se nazývají histacaliny, váží se přímo na histamin a brání vzniku histaminem zprostředkované zánětlivé reakci (Nuttall & Labuda, 2004). Slinný sekret má také potlačující účinek na Th1 a stimulační účinek na Th2 imunitní odpověď (Kovář a spol., 2001). Tyto rozmanité mechanismy obcházení zánětlivé a imunitní odpovědi byly nejspíš vyvinuty proto, aby mohla být klíšťata přítomná na hostiteli po dostatečně dlouhou dobu, kterou potřebují k sání (3-10 dní).

3.3.1 T buněčné inhibitory

Existuje několik prokázaných T buněčných inhibitorů: p36, Iris, Salp15 (Titus et al., 2005). Protein Salp15 získaný ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus* byl prvním identifikovaným antigenem zodpovědným za zamezení aktivace a funkce CD4⁺ T buněk, je také zodpovědný za přímé omezení produkce IL-2 během imunitní odpovědi (Juncadella et al., 2007; Pavaglio et al., 2007). Salp15 se váže výhradně na CD4 koreceptor savčích T buněk, po tomto navázání inhibuje funkci T buněk potlačením T funkce buněčného receptoru (TCR) (Garg, Juncadella et al., 2006). Bylo také prokázáno, že Salp15 zabraňuje produkci zánětlivých cytokinů lidskými dendritickými buňkami navázáním na lektinový receptor DC-SIGN a tím ovlivňuje adaptivní imunitu člověka (Hovius et al., 2008).

Dalším možným inhibitorem T buněčné aktivity je rozpustný IL-2 vázající protein, jehož přítomnost byla prokázána ve slinách *Ixodes scapularis*. Tato schopnost je jednoduchý mechanismus suprese proliferace a aktivity T buněk, které jsou závislé na stimulaci IL-2 (Gillespie et al., 2001).

3.3.2 B buněčné inhibitory

U myši byl objeven B buněčný inhibitorový protein (BIP), který je přítomný ve slinách klíštěte a potlačuje proliferaci B buněk po jejich stimulaci lipopolysacharidem (LPS)- složkou buněčné stěny gramnegativních bakterií (př. *Borrelia*) (Hovius et al., 2008). Zabraňuje produkci IL-10 a TNF- α (Hannier et al., 2004). Výhodou pro klíště je, že dojde k omezení produkce specifických protiklíštěcích protilátek.

3.3.3 Inhibitory komplementu

Jednou z hlavních linií obrany proti invazi klíšťat je aktivace komplementu alternativní cestou. U některých druhů klíšťat byly objeveny proteiny, sloužící jako inhibitory této komplementové cesty. U klíštěte *Ixodes ricinus* došlo k odhalení několika proteinů a jejich mechanismu inhibice komplementu. Tyto proteiny se specificky váží na properdin, sérový kontrolní protein komplementu, což vede k inhibici C3 konvertázy a alternativní cesty aktivace komplementu (Couvreux et al., 2007).

3.3.4 Inhibitory neutrofilů a makrofágů

Neutrofilů, jinak také polymorfonukleární leukocyty, jsou prvními buňkami, které migrují do místa sání klíštěte. Bylo zjištěno, že sliny obsahují proteiny které zabraňují neutrofilům správně fungovat- fagocytovat a produkovat oxidanty - tím, že snižují expresi

integrinů, membránových receptorů, v tomto případě β_2 integrinů. Integriny zprostředkovávají migraci a adhezi buněk k podkladu a jsou důležité pro aktivace vrozené imunitní odpovědi (Guo, Booth et al., 2009).

Imunosupresivní protein Iris objevený u *Ixodes ricinus* blokuje produkci cytokinů makrofágy, tím ovlivňuje T buněčnou imunitní odpověď. Má také antikoagulační účinky (Hovius et al., 2008). Klíštěcí sliny také potlačují produkci oxidu dusnatého aktivovanými makrofágy (Urioste et al., 1994).

3.4 Slinami aktiovaný přenos

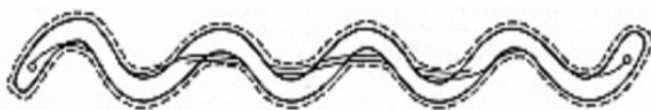
Klíčový jev úspěšného přenosu patogenů na hostitele pomocí aktivity složek slin byl nazván jako slinami aktivovaný přenos (SAT). Je to schopnost patogenů zneužívat farmakologické vlastnosti klíštěcích slin. Tento jev byl identifikován nejenom u klíšťat, ale i u jiných patogenů a jejich hmyzích přenašečů, např. *Leishmania* a přenašeč *Phlebotomus*. Poprvé byl popsán u Thogoto viru, který přenáší *Rhipicephalus appendiculatus*. Pokusy byly prováděny na morčatech a staly se prvním přímým důkazem toho, že extrakt ze slinných žláz (SGE) klíštěte může přispívat k přenosu tohoto viru (Nuttall & Labuda, 2004). V přírodě se na hostiteli živí jak infikovaná, tak neinfikovaná klíšťata a infekce se přenáší na další klíště právě při sání na infikovaném hostiteli. Toho bylo využito v pokusu s virem Thogoto. SGE a virus byly vstříknuty do stejného místa klíšťaty napadených morčat. Nejdříve ve stejný čas a následně s časovým rozdílem, kdy byl virus vstříknut po několika dnech. Ukázalo se, že počet infikovaných larev vzrostl oproti kontrolním výsledkům, kdy byl použit samotný virus bez SGE. S kontrolními výsledky se shodoval i pokus, kdy byl SGE vstříknut do jiného místa než virus (Jones, Hodgson, Nuttall, 1989).

SAT faktory jsou přítomny pouze ve slinách několik dní sajícího klíštěte. Liší se podle druhu přenašeče, patogena i hostitele a pravděpodobně to nejsou antikoagulační, protizánětlivé ani antikomplementové faktory slin (Nuttall & Labuda, 2004).

4. PATOGENY PŘENÁŠENÉ KLÍŠŤATY

4.1 *Borrelia* a Lymeská choroba

Borrelia spp. (Obr. 2) je gram-negativní bakterie patřící do skupiny spirochet. Je přenášena členovci, především klíšťaty, ale také blechami, komáry a roztoči. Migruje mezi vektorem a obratlovčím hostitelem a způsobuje lymeskou nemoc.



Obr. 2 Schematické zobrazení *Borrelie*

Borrelia má vnější membránu tvořenou specifickými povrchovými proteinů (Osp). Předpokládá se, že tyto proteiny hrají důležitou roli ve virulenci této bakterie (Todar, 2008). Jako první byla objevena a popsána *Borrelia burgdorferi* (*Bb*). Existuje mnoho dalších druhů, které také způsobují lymeskou nemoc, nebo jí podobná onemocnění. Celá skupina těchto bakterií byla nazvána *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Do této skupiny řadíme druhy- *Bb sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. andersonii*, *B. lonestari* a některé další (Taylor, 2004). Jsou přenášeny larvami i dospělci klíšťat rodu *Ixodes*, např. *Ixodes ricinus* a *Ixodes scapularis*. Zdá se, že za přenos těchto bakterií u lidí jsou většinou zodpovědné nymfy, jejichž vrchol aktivity na jaře a v létě se shoduje s výskytem borreliózy (Gray, 1998).

Průběh lymeské borreliózy můžeme rozdělit do tří fází. Po inkubační době, která se pohybuje mezi 3 až 32 dny, nastává první fáze, kdy bakterie přítomné v pokožce vyvolávají imunitní reakci. Ta je charakterizována jako kožní léze prstencového tvaru zvaná erytém v místě kousnutí klíštěte. Mohou se vyskytnout i sekundární léze na stehnech, v podpaží a v třísech. Často je tato fáze spojena s bolestmi hlavy, horečkou, bolestmi kloubů a nevolností. Následně bakterie z pokožky migrují do lymfatických uzlin nebo se rozšiřují do srdce a mozku. Druhá fáze, které nastává v průměru za měsíc po kožních příznacích, se projevuje srdečními a neurologickými poruchami. Objevují se mdloby, zrychlený tep a dušnost, meningitida a neuritida. Ve třetí fázi, po několika měsících až dvou letech, jsou

postiženy klouby. Třetí fáze je tedy charakterizována zánětlivým onemocněním kloubů neboli artritidou.

Při léčbě je důležité časné rozpoznání choroby. Ve fázi erytému jsou účinná tetracyklinová antibiotika. Také penicilin nebo erytromycin. V pokročilejší fázi, při neurologických potížích, jsou podávána cefalosporinová antibiotika. Artritida je léčena vysokými dávkami benzylpenicilinu (Nathwani et al., 1990).

4.2 Virus klíšťové encefalitidy

Virus klíšťové encefalitidy (TBEV) (obr. 3) patří mezi *Flaviviry*. Vyskytuje se především v Evropě a Asii a způsobuje infekční onemocnění savců včetně člověka, které postihuje centrální nervový systém a může vést až ke smrti.

Zralý virion je složen z izometrické kapsidy, která je obklopena lipidovým obalem. Ten obsahuje dva s membránou spojené proteiny- obalový glykoprotein E a malý membránový protein M. Protein E je zodpovědný za indukci protektivní imunitní odpovědi a také určuje virulenci viru (Heinz, Mandl, 1993). Byly popsány tři podtypy tohoto viru- evropský, neboli západní TBEV, sibiřský TBEV a východní TBEV. V přírodě je přenášen klíštětem *Ixodes ricinus* v Evropě a v Asii *Ixodes persulcatus* nebo *Haemaphysalis concinna* (Carrel et al., 2004). Virus je přirozeně udržován v cyklech mezi klíšťaty a savčími hostiteli. Malí savci, hlavně hlodavci, udržují trvalou infekci přes rok a hrají důležitou roli v přenosu viru mezi klíšťaty (Mansfield et al., 2009).



Obr. 3 Virus klíšťové encefalitidy

Klíšťová encefalitida je dvoufázová infekce. Inkubační doba je 7-14 dní. Počáteční fáze je krátká, horečnatá. Objevuje se únava, bolest hlavy, zad a bolest v krku. Vše je doprovázeno vysokou horečkou a zvracením. Poté následuje asymptomatické období trvající 2-10 dní. Pokud nemoc postupuje dál, dojde k druhé fázi, k tzv. akutní fázi. Ta zahrnuje postižení centrální nervové soustavy (CNS). Jedná se zánět mozkových blan (meningitida), mozkového parenchymu (encefalitida), míchy (myelitida) a nervů (radiculitida).

Vakcinace proti infekci TBEV je neúčinnější metodou prevence. V současné době jsou dostupné čtyři vakcíny, jak pro dospělé, tak pro děti. Vakcínou je inaktivovaný TBEV. Při propuknutí onemocnění neexistuje žádná specifická léčba, jako podpůrné látky se používají nesteroidní protizánětlivé léky jako jsou například paracetamol nebo aspirin (Mansfield et al., 2009).

4.3 Babesia

Babesia spp. je intracelulární parazitický prvok patřící do kmene *Apicomplexa* (Výtrusovci) a řádu *Piroplasmida*, kam řadíme i dalšího parazitického prvoky přenášeného klíšťaty- *Theilerie*. Vyskytuje se téměř po celém světě a postihuje mnoho druhů savců (Krause, 2004). U *Babesia canis* nebo *Babesia gibsoni* jsou hlavními hostiteli psi. Přenášeny jsou klíšťaty *Rhipicephalus sanguineus* a *Dermacentor variabilis* (Cleveland et al., 2002). Patogenem hovězího dobytka je *Babesia divergens* a *Babesia bovis*, způsobují veliké ztráty v oblasti zemědělství a chovu dobytka, přenášeny jsou klíštětem *Boophilus microplus*. Lidskou babesiózu způsobuje *Babesia microti*, přenášena je například klíšťaty *Ixodes scapularis* a *Ixodes ricinus*.

Tento prvok napadá erythrocyty a u svých hostitelů způsobuje hlavně hemolytickou anémii. Mnoho projevů onemocnění je spojeno s asexuálním reprodukčním obdobím patogena v erythrocytech a s následnou lýzou těchto buněk. Příznaky jsou často podobné malárii- malátnost, vyčerpanost, zimnice, bolest svalů, anémie a vysoká horečka. Pokročilejší infekce bývá spojena s nevolností, zvracením, ztrátami váhy a hematurií. Objevuje se také hepatomegalie a splenomegalie (Homer et al., 2000).

Většina případů infekce *Babesia microti* má mírný průběh a dochází k samovyléčení. V jiných případech se podává clindamycin a quinine. U některých pacientů, u kterých tato léčba není účinná, musí dojít ke krevní transfuzi. Vakcína proti babesiózám zatím není vyvinuta, ale provádí se pokusy na skotu a jiných zvířatech. Atenuovaná vakcína proti *B. bovis* byla použita a byla úspěšná. Použití atenuovaných vakcín je však spojeno s mnoha problémy, např. s neúplnou atenuací parazita. Proto se výzkum zabývá vývojem rekombinantních vakcín z povrchových antigenů parazita (Krause, 2003).

4.4 Ostatní patogeny

Virus klíšťové encefalitidy není jediným virem přenášeným klíšťaty. Do rodu *Flavivirus* řadíme také virus omské hemoragické horečky, virus kyasanurské lesní choroby a Powassan virus. Virus krymsko-konžské hemoragické horečky patří mezi *Nairoviry* a Eyach virus mezi *Coltiviry* (Charrel et al., 2004; Gritsun et al., 2003).

Mezi bakterie přenášené klíšťaty kromě *borrelií* řadíme také *ehrlichie* a *anaplasmy*. Patří do čeledi Rickettsiaceae, jsou to obligátní intracelulární parazité, jejichž stěna strukturou připomíná gram-negativní bakterie (Ganguly & Mukhopadhyay, 2008). Dalšími přenášenými bakteriemi jsou *Rickettsia* a *Bartonella*.

Dalším intracelulárním protozoálním patogenem je *Theileria*, která patří do stejné čeledi jako *Babesia*, ale namísto červených krvinek postihuje bílou řadu krevních buněk (Siegel et al., 2006).

Klíšťata slouží také jako přenašeči některých druhů parazitických červů filarií, patřících mezi Nematoda, které napadají lymfatický systém hostitele (Bain & Babayan, 2003).

4.4.1 Omská hemoragická horečka

Hlavními přirozenými přenašeči viru omské hemoragické horečky (Omsk haemorrhagic fever virus, OHFV) jsou klíšťata *Dermacentor reticulatus* a *D. marginatus*. Objevuje se v oblasti kolem Omsku a Novosibirsku a také v západní části Sibíře. Tyto regiony zahrnují zalesněné oblasti i otevřené mokřady. Největší výskyt této nemoci byl zaznamenán po druhé světové válce. Hlavním hostitelem OHFV jsou ondatry.

Onemocnění způsobuje poruchy cév a cirkulace, poškození kapilár je zodpovědné za krvácivé projevy. Inkubační doba nemoci je obvykle 3-7 dní. Počátek nemoci je náhlý, objevuje se horečka trvající 5-12 dní, bolest hlavy, bolest svalů, kašel a trávicí obtíže. Asi u poloviny postižených se objevují dvě horečnaté fáze. Zotavení obvykle probíhá pomalu. Bylo prokázáno, že existuje zkřížená ochrana mezi TBEV a OHFV, je tedy pravděpodobné, že vakcína proti TBEV může být účinná i proti infekci OHFV (Charrel et al., 2004).

4.4.2 Kyasanurská lesní choroba

Virus kyasanurské lesní choroby (Kyasanur forest disease virus, KFDV) je vysoce patogenní virus přenášený klíštětem *Haemaphysalis spinigera*. Poprvé byl objeven v Indii v oblasti Karnataka. Běžně infikuje větší savce, hlavně makaky (př. *Macaca radiate*) a hulmany (př. *Presbytis entellus*). U lidí způsobuje hemoragickou chorobu.

Inkubační doba se pohybuje mezi 3-8 dny. Poté se během 1-2 týdnů rozvíjí meningoencefalitida doprovázená horečkou. Objevuje se také bradykardie a zánět spojivky. Jen u malého množství pacientů se objeví bronchopneumonie nebo kóma, které vedou ke smrti. Akutní fáze trvá kolem 2 týdnů, k rekonvalescenci dochází asi za 4 týdny. Proti KDFV existuje atenuovaná vakcína (Pattnaik, 2006).

4.4.3 Krymsko-konžská hemoragická horečka

Virus krymsko-konžské hemoragické horečky (Crimean-Congo haemorrhagic fever virus, CCHFV) patří mezi *Nairoviry* a vyskytuje se hlavně v Africe, na Blízkém východě a v jihozápadní části Asie. Je přenášen několika druhy klíšťat, avšak nejvhodnějšími přenašeči v přírodě jsou klíšťata rodu *Hyalomma*, hostiteli jsou malí i velcí obratlovci včetně člověka.

Inkubační doba choroby je 2-7 dní, počátek nemoci je spojen s horečkou, zimnicí, závratěmi, bolestmi hlavy, krku a svalů. Často se objevují také zažívací obtíže jako je nevolnost, zvracení, průjemy a bolest břicha. Po několika dnech se vyskytnou krvácivé projevy. Úmrtí nastává po 6-10 dnech a je častější než u OHFV. Je to následek mohutného krvácení, pneumonie a poruchy kardiovaskulárního systému. K léčbě by mohl být využíván ribavirin, který potlačuje růst viru *in vitro*, ale zatím byl jen experimentálně studován (Charrel et al., 2004).

4.4.4 Ehrlichia a Anaplasma

Ehrlichie spp. jsou obligátní intracelulární bakterie, patří do čeledi *Rickettsiaceae*. Ke svému životnímu cyklu potřebují jednoho nebo několik hostitelů. *Ehrlichia chaffeensis* způsobuje lidskou monocytickou ehrlichiózu (HME). Dalším známým druhem je *Ehrlichia ewingii*, která způsobuje granulocytickou ehrlichiózu u psů.

E. chaffeensis je přenášena především klíštětem *Amblyomma americanum*. U obratlovcích hostitelů napadá mononukleární fagocytické buňky, hlavně monocyty. Po jednom až dvou týdnech se u postiženého jedince objevuje malátnost, bolest zad, trávicí problémy a náhlá vysoká horečka. Příznaky HME jsou horečka, nevolnost, bolest hlavy a svalů. Pokud se nemoc dále vyvíjí, pak je to kašel, zánět hltanu, průjem, zvracení a bolest břicha. K léčbě se využívají tetracykliny a jejich deriváty (Ganguly & Mukhopadhyay, 2008).

Mezi *Ehrlichie* patří také *Anaplasma phagocytophilum*. Je přenášena například klíšťaty *Ixodes pacificus* ve USA, *Ixodes ricinus* v Evropě a *Ixodes persulcatus* a *Dermacentor silvarum* v Asii. Hostitelem této bakterie jsou koně, psi a lidé. Způsobuje blízce si podobná onemocnění, u lidí se nemoc způsobená touto bakterií nazývá lidská granulocytární

ehrlichioza (HGE). *Anaplasma* infikuje neutrofilny, přeživá v nich a blokuje jejich funkci, např. fagocytózu. Onemocnění se projevuje bolestí svalů a hlavy, malátností, zimnicí, nevolností a někdy kašlem. Ve většině případů je průběh mírný a dochází k samovyléčení (Carrade et al., 2009).

4.4.5 *Bartonella*

Bartonella spp. je fakultativní intracelulární gram-negativní bakterie způsobující onemocnění zvířat i člověka. Napadá především erythrocyty a endoteliální buňky. Uvnitř těchto buněk lépe přeživá v krevních cévách. *Bartonella henselae* způsobuje hlavně onemocnění koček, zvláště oční infekce a zánět endokardu. Může být přenesena i na člověka. Bylo prokázáno že kromě kočičích blech je přenášena také klíštětem *Ixodes ricinus* (Cotté et al., 2008). Bakterie tohoto rodu, které způsobují nemoci člověka, jsou například *Bartonella bacilliformis* nebo *Bartonella quintana* (Hammoud et al., 2008). Lidská bartonelloza způsobená *B. bacilliformis* je charakterizována horečnatou fází, nazývá se oroyská horečka (Oroya fever). Po ní následuje fáze s vyrážkou, známá jako verrunga peruana (Spach, 1996).

4.4.6 *Theileria*

Theileria spp. je intracelulární parazitický prvok z kmene *Apicomplexa* (Výtrusovci), je úzce příbuzný plasmodiím. Hlavním hostitelem tohoto prvoka je dobytek. Dva hlavní druhy jsou *Theileria parva*, přenášena klíštětem *Rhipicephalus appendiculatus* a *Theileria annulata*, přenášena klíšťaty rodu *Hyalomma*. *Theileria parva* se vyskytuje především v Africe a způsobuje onemocnění dobytka zvané východopobřežní horečka (East Coast fever, ECF) (Morzaria, 1988).

Po vstupu do hostitele prvoci napadají lymfocyty, po několika dnech se ve stadiu schizontů začínají množit v lymfatických uzlinách a mění se na merozoity. Merozoity můžeme najít v cytoplazmě lymfocytů, retikulárních buněk a makrofágů. Následně napadají erythrocyty, které jsou znovu nasáty klíšťaty (Katzner et al., 2007).

Inkubační doba nemoci je 7-25 dní. Počáteční příznaky jsou nechutenství, horečka a zvětšení drénujících lymfatických uzlin. Později dochází k celkové lymfadenopatii a ztrátám tělesné kondice. Další příznaky, které se mohou objevit, jsou slzení, ucpaní nosu, průjem a dušnost. Onemocnění ve většině případů končí smrtí, nebo se vyvine chronická choroba (Siegel et al., 2006).

5. VAKCÍNY

5.1 Vakcíny proti klíšťatům

Vývoj účinných vakcín proti klíšťatům je důležitý zvláště proto, že může omezit výskyt a přenos zmiňovaných klíšťaty přenášených patogenů a jimi způsobovaných chorob jak na člověka, tak na zvířata. Veliký dopad má tento problém na průmysl s hospodářskými zvířaty a zemědělství. Zde kvůli těmto chorobám dochází k velkým ekonomickým ztrátám (Mulenga et al., 2001). Nyní vyžaduje prevence proti těmto patogenům mnoho rozdílných vakcín, které jsou zaměřeny přímo proti jednomu určitému patogenu (Nuttal et al., 2006; de Castro, 1997). V současné době se výskyt klíšťat reguluje pouze použitím různých repelentů, pesticidů a akaricidů, např. organofosfátů, karbamátů nebo amidinů. To je spojeno s několika nevýhodami a problémy: vývoj rezistence parazitů k těmto látkám, vysoká cena, kontaminace potravin, znečištění ovzduší a dopad na zdraví lidstva (Ghosh et al., 2007). Vakcinací by se daly obejít všechny tyto nevýhody a navíc by tato regulace výskytu klíšťat a jimi přenášených patogenů byla méně finančně náročná než zmíněné chemikálie (Canales et al., 2009). Vývoj vakcíny zahrnuje nejprve charakterizaci vhodných ochranných antigenů, dále produkci těchto proteinů, účinných rekombinantních antigenů a nakonec stanovení toho, že jsou tyto antigeny schopné poskytnout trvalou a odpovídající imunitní ochranu (Willadsen, 2001).

První vakcína proti ektoparazitům byla vytvořena v Austrálii, následně také na Kubě, proti klíštěti *Boophilus microplus* u hovězího dobytka. Na trh byla uvedena v roce 1994 pod názvem „TickGARD“ a „TickGARD“ plus (středoamerická verze pod názvem „Gavac“). Dodnes je jedinou dostupnou vakcínou proti klíšťatům. Výzkum od prvních pokusů identifikovat antigen po uvedení vakcíny na trh trval třináct let (Willadsen et al., 1995; Willadsen, 1997).

Vakcinace může být namířena proti složkám slin, které napomáhají přenosu patogenů a zvyšují nakažlivost. Také proti antigenům ze střeva nebo jiných tělních tkání vektora. Nejedná se pouze o klíšťata, takovéto vakcíny byly vytvořeny například u hmyzu rodu *Phlebotomus* (Titus et al., 2006). Hlavním limitujícím problémem při vývoji nových vakcín je identifikace těch antigenů, které by mohly být účinně použity k imunizaci lidí či zvířat. Molekula antigenu je následně klonována a produkována *in vitro* například pomocí bakterie *Escherichia coli*. Účinná vakcína vyžaduje kombinaci několika antigenů, které by fungovaly buď nezávisle na sobě nebo společně (Myung-Jo, 2005). Bylo prokázáno, že imunita vyvolaná kombinací více antigenů je účinnější. Příkladem jsou například pokusy

s rekombinantními antigeny Bm86 a Bm91 klíštěte *Boophilus microplus* na hovězím dobytku. Po přidání Bm91 byla vakcína účinnější než samotný Bm86 (Willadsen et al., 1996). Také by vakcína zahrnující více antigenů chránila před širokou škálou klíštěcích druhů (de la Fuente & Kocan, 2006). Techniky, které pomáhají s hledáním a identifikací cílových antigenů jsou např. RNAi (RNA interference) a ELI (expression library immunisation) v kombinaci s EST (analysis of expressed sequence tags). ELI je technika, která v kombinaci se sekvenční analýzou nabízí alternativní způsob identifikace potenciálních kandidátů na vakcínu. Je založena na rychlém vyšetření genů z cDNA knihoven bez předchozích znalostí o antigenu. Poprvé byla použita pro *Mycoplasmu pulmonis* a od té doby je využívána pro jednobuněčné a mnohobuněčné parazity a viry (Almazán et al., 2003). Se současným rozvojem molekulárních technik, které dovolují charakterizovat genomy klíšťat a identifikovat použitelné antigeny, šance na úspěch při vytváření vakcín stoupá (Ghosh et al., 2007).

5.1.1 Vakcína „TickGARD“

Vakcína je založena na skrytém antigenu ze střevní stěny klíštěte *Boophilus microplus*, přenašeče babesiózy u skotu (*Babesia bovis*). Tento 89 kDa glykoprotein byl nazvaný Bm86. Protein Bm86 byl vyroben rekombinantní ve formě fúzního proteinu, který byl přítomný v nerozpustné frakci extraktu z *Escherichia coli* jako inkluzní tělíska (Rand et al., 1989, Ghosh et al., 2007, Willadsen et al. 1992). Skot imunizovaný tímto glykoproteinem produkuje protilátky, které rozpoznávají Bm86 na střevních trávicích buňkách. Klíště tyto protilátky nasaje s krví a ty společně s dalšími složkami imunitního systému způsobují lýzu epiteliálních buněk střeva a protržení střevní stěny. To vede ke smrti klíštěte. Klíšťata která přežijí mají sníženou schopnost růstu, kladení vajíček a rozmnožování se, mají charakteristickou tmavočervenou barvu (Nuttal et al., 2006, Rand et al., 1989). Červené zbarvení je způsobeno pronikáním červených krevních buněk do hemolymfy v důsledku poškození střeva (Tsuda et al., 2001). Účinnost vakcíny závisí na množství a perzistenci protilátek proti tomuto antigenu, které se vytvářejí v odpovědi na očkování. Imunita není zesilována sáním klíšťat. Vakcinace proto musí být opakována (Willadsen & Jongejan, 1999). Nejprve tři dávky v krátkém časovém rozmezí. Množství protilátek se zvyšuje po postupných dávkách a dosahuje vrcholu zhruba dva týdny po třetí dávce. Pak se toto množství v průběhu šesti měsíců snižuje. Další dávka by tedy měla přijít po půl roce (Canales et al., 2009). Není tu žádný efekt, který by podporoval imunitní odpověď hostitele při sání klíštěte (De Rose et al., 1999).

Imunizace Bm86 způsobuje poškození hlavně dospělých stadií, k poškození larev nedochází, je pouze prodloužena doba za kterou se přemění v nymfy (Tellam et al., 1992,

Myung-Jo, 2005). Pravděpodobně je to spojeno s největším příjmem krve jako potravy u dospělých stadií (Willadsen et al., 1992). Vakcína osahující Bm86 není účinná pouze proti *B. microplus*, ale také proti druhům *B. annulatus* a částečně u *B. decoloratus* (Canales et al., 2009). Částečnou ochranu prokázaly i výsledky s klíšťaty *Hyalomma anatolicum anatolicum*, *Rhipicephalus appendiculatus* a *R. sanguineus* (de la Fuente et al., 2006).

Antigen Bm86 byl identifikován v roce 1986 a výzkumy a snahy vedoucí ke komercializaci trvaly devět let, na trh byla vakcína uvedena v roce 1994 v Austrálii (Willadsen et al., 1995). Vakcína omezila používání akaricidů a jejich nepříznivé dopady v oblasti Austrálie a Latinské Ameriky (de la Fuente et al., 1999).

5.2 Exponované antigeny

Exponované antigeny (Tab. 1) jsou molekuly, které jsou přítomny ve slinném sekretu nebo v cementu klíštěte během sání. Většinou jsou to proteiny nebo peptidy syntetizované ve slinných žlázách. Jsou sekretovány slinnými žlázami během sání na hostiteli. Často to jsou imunopresivní nebo antihemostatické látky. Zachycují se v kůži hostitele, kde jsou vychytávány dendritickými Langerhansovými buňkami, které je prezentují imunitnímu systému. Je proti nim tedy namířena imunitní odpověď (Nuttall et al., 2006). Vyvolávají imunitu, která dokáže zabránit sání a přenosu patogenů. Získaná imunita je zvyšována opakovaným sáním klíšťat (Mulenga et al., 1999).

Tab.1: Exponované antigeny

Antigen	Druh klíštěte
Calreticulin	<i>Amblyomma americanum</i> <i>Dermacentor variabilis</i> <i>Boophilus microplus</i>
p29	<i>Haemaphysalis longicornis</i>
RIM36	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>
HL 34	<i>Haemaphysalis longicornis</i>
Imunoglobulin-vázající proteiny	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>
Histamin-vázající proteiny	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>
64P	<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>
Sialostatin L2	<i>Ixodes scapularis</i>

Mnoho z nich bylo identifikováno, ale ne podrobně prozkoumáno a charakterizováno. Konkrétní funkci těchto molekul při sání klíštěte je těžké zjistit kvůli malému množství klíštěcích slin. Molekuly musí být identifikovány, klonovány a produkovány v bakteriálních expresních systémech (Jaworski et al., 1995).

5.2.1 *Calreticulin*

Calreticulin je hlavní vápník vázající protein endoplazmatického retikula. Byl získán a klonován ze slinných žláz nasátých samic klíštěte *Amblyomma americanum*. Přítomný je i ve slinách *Dermacentor variabilis* a *B. microplus*. Bylo zjištěno, že calreticulin je přítomný ve slinných žlázách samic hlavně během sání. U nesajících samic jen v malém množství. Zdá se, že je to multifunkční protein, který se vyskytuje i v dalších buňkách klíštěte. Při procesu sání je vápník důležitý při aktivaci enzymů, které narušují funkci krevních destiček. Samotný calreticulin má protitrombotickou funkci. Jeho přítomnost ve slinách slouží ke zvýšení obsahu oxidu dusnatého, to vede k větší propustnosti cév.

S calreticulinem byl proveden pokus s imunizací králíků protilátkami proti calreticulinu. Když klíšťata sála na imunizovaných zvířatech, místo sání bylo nekrotické a krvácivé. To je velmi rozdílná reakce oproti neimunizovaným hostitelům a dokazuje, že je calreticulin opravdu sekretován do hostitele během sání. Zdá se, že protilátky váží calreticulin a tím zahajují lokální imunitní reakci. Tato imunitní reakce naruší sání (Jaworski et al., 1995).

Později byl calreticulin identifikován a klonován také z klíštěte *Boophilus microplus*. Ale při pokusech se skotem vykázal jen nízkou imunogenitu (Ferreira et al., 2002).

5.2.2 *Protein p29*

Pomocí cDNA knihovny a polyklonálního králíčího séra namířeného proti molekulám klíštěcích slin dospělých i nedospělých stádií byl charakterizován p29. Tento 29 kDa protein je produkován ve slinných žlázách sajících i nesajících klíšťat *Haemaphysalis longicornis*. Svou strukturou je podobný kolagenu. Jeho produkce je nejspíše spojená s tvorbou cementu a je vytvářen jak dospělými tak nedospělými stádii klíštěte.

Rekombinantní p29 produkováný v *E. coli* podněcoval specifickou protektivní imunitní odpověď. Klíšťata sála na králících imunizovaných tímto proteinem. Došlo ke snížení hmotnosti nasátých klíšťat u dospělých jedinců a k vysoké úmrtnosti larev a nymf. To dokazuje, že přírodní p29 může být zahrnutý v některých klíčových fyziologických funkcích klíštěte. Citlivost jednotlivých stádií na imunitní odpověď vyvolanou touto molekulou je

rozdílná, vakcína by tedy měla jiné účinky na dospělé a jiné na nedospělé jedince (Mulenga et al., 1999). U larev byla úmrtnost 40% a u nymf 56 %. V laboratorních podmínkách jsou to značné účinky, ale pro použití v praxi v přirozených podmínkách by byla potřeba větší účinnost takovéto vakcíny (Mulenga et al., 2001).

5.2.3 Cementový protein RIM36

36 kDa protein RIM36 byl objeven a klonován z klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus*. Jeho aminokyselinová sekvence obsahuje velké množství glycinu, serinu a prolinu. Je přítomný ve slinných žlázách a v cementu. Byl lokalizován především v sekrečních granulech e buněk lalůčku slinných žláz III. typu, kde bývají umístěny sporozoity *Theileria parva*. Produkce zralých sporozoitů je největší třetí až čtvrtý den sání klíštěte. RIM36 a sporozoiti jsou nejspíše společně vylučovány do hostitele.

Na prolin bohatá doména C-konce RIM36 byla vytvořena rekombinantní a reagovala s antisérem hovězího dobytka druhu *Bos indicus*, který byl předtím vystaven infestaci klíšťaty. V Asii a Africe je tento druh dobytka velmi často hostitelem klíštěte *R. appendiculatus*. Pokus ukázal, že tato na glycin chudá oblast proteinu RIM36 vyvolala silnou protilátkovou odpověď. Molekula je tedy velmi imunogenní, ale není jasné, zda je tato odpověď dostatečně protektivní (Bishop et al., 2002, Nuttall et al., 2006).

5.2.4 Slinný protein HL 34

Antigen HL 34 byl získán ze slinných žláz klíštěte *H. longicornis*. Je produkován dospělými i nedospělými stadii. Odhaduje se, že je úzce spojený se sáním klíštěte. Geny tohoto proteinu byly objeveny i v jiných orgánech. HL 34 je charakteristický dvěma doménami- jednou bohatou na tyrosin a druhou bohatou na prolin. Takovéto opakující se domény jsou charakteristické pro adhezivní proteiny, z kterých je složený cement. Proto existuje nepotvrzená domněnka, že HL 34 může být spojený se sekrecí a funkcí cementu.

Rekombinantním HL 34 byli imunizováni králíci. Imunita vyvolaná rHL 34 postihuje nymfy i dospělé, což se projevilo jejich zvýšenou úmrtností při sání na imunizovaných zvířatech. Pozorován byl také pokles v kladení vajíček. Červené zbarvení dospělců a snížené vyměšování poukazuje na patologii střeva a poruchu trávení. To není běžná reakce, která se vyvíjí proti antigenům slin. HL 34 je tedy přítomný i v jiných orgánech. To by mohlo být důležité pro vytvoření účinné vakcíny (Tsuda et al., 2001).

5.2.5 Imunoglobulin vázající proteiny a histamin vázající proteiny

Imunoglobulin vázající molekuly (IGBPs) byly objeveny u klíštěte *R. appendiculatus*. Díky těmto molekulám, které jsou přítomny v hemolymfě a slinných žlázách, dochází k vylučování hostitelského IgG sliněním během sání klíštěte. Protilátky prostupující ze střeva do hemolymfy reagují s těmito proteiny, které je transportují do slinných žláz. Proteiny ve slinných žlázách je vylučují zpět do místa sání. Tímto mechanismem se zbavují hostitelských protilátek a zmírňují tak jimi způsobená poškození. Samci klíštěte *R. appendiculatus* sekretují specifický protein IGBPMC do místa sání samice. Brání nejenom sebe před účinky protilátkové imunity, ale také pomáhají samicím úspěšně dokončit sání a produkovat potomstvo.

Pokud by došlo k zablokování funkce těchto molekul, zvýšila by se koncentrace protilátek v těle klíštěte. Poškození klíšťat by bylo účinnější. Zjištění efektivního mechanismu k vytvoření takové vakcíny vyžaduje podrobnější prozkoumání IGBPs (Wang & Nuttall, 1999).

Histamin vázající molekuly potlačují zánětlivou odpověď hostitele na sání klíštěte tím, že mohou blokovat vazbu histaminu na receptory. Objeveny byly ve slinách klíštěte *R. appendiculatus*. Vakcína zahrnující tyto proteiny by mohla být založená na stejném principu jako u IGBPs. Omezila by se schopnost těchto proteinů vázat histamin. Zánětlivá reakce by se mohla plně rozvinout (Paesen et al., 1999).

5.2.7 Cementový protein 64P

64P je protein obsažený v cementu klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus*. Byl vyroben rekombinantní a při pokusech s morčaty, bylo zjištěno, že zkříženě reaguje s epitopy proteinů ve slinách, hemolymfě a střevě. Je tudíž velká pravděpodobnost, že by mohl být použit při vývoji duální vakcíny (Trimnel et al., 2002). Vakcína založená na 64P by také mohla být širokospektrá, co se týká klíštěcích druhů. 64TRP totiž vykazuje zkříženou antigenní reaktivitu s dalšími druhy klíšťat. Jsou to *R. sanguineus*, *I. ricinus*, *Amblyomma variegatum* and *B. microplus*. Je ale nutné tento protein ještě více prozkoumat a provést výzkum účinnosti u skotu, což je klíčový hostitel *R. appendiculatus* (Trimnel et al., 2005).

5.2.8 Sialostatin L2

Sialostatin L2 je antigen ze slin klíštěte *Ixodes scapularis*. Zajímavé na tomto antigenu je, že ačkoli je sekretován slinami do místa sání klíštěte, imunita se proti němu po sání klíšťat

nevytváří. Byl pro něj použit termín „tichý“ antigen. Sialostatin L2 je cystatin, jehož funkcí je inhibice katepsinů L a S, což jsou klíčové enzymy v imunitě obratlovců.

Pokud se ale použije jako vakcína, potlačuje sání klíšťat. Vakcinace morčat tímto sekretovaným antigenem měla za následek snížení schopnosti sání u nymf *I. scapularis*. U očkovaných zvířat se objevily zjevné příznaky zánětu, docházelo ke zvýšenému odmítnutí sajících klíšťat. U kontrolních morčat po opakované infestaci k imunitní odpovědi nedošlo. Pouze u vakcinovaných zvířat, u kterých bylo vytvořenými protilátkami neutralizováno působení sialostatínu L2 (Kotsyfakis et al., 2008).

5.3 Skryté antigeny

Tab. 2: Skryté antigeny

Antigen	Druh klíštěte
Bm86, Bm91, BMA7	<i>Boophilus microplus</i>
Bm95	<i>Boophilus microplus</i> kmen A
Ba86	<i>Boophilus annulatus</i>
Serpiny- HLS1, HLS2	<i>Haemaphysalis longicornis</i>
P27/30	<i>Haemaphysalis longicornis</i>
CHT1	<i>Haemaphysalis longicornis</i>
4D8, 4F8, 4E6	<i>Ixodes scapularis</i>
Vitellin	<i>Boophilus microplus</i>
Voraxin	<i>Amblyomma hebraeum</i>
Ferritin 1, ferritin 2	<i>Ixodes ricinus</i>

Skryté antigeny (Tab. 2) jsou schované před imunitními mechanismy hostitele, čili nestimulují imunitní odpověď hostitele při sání klíštěte. Získávají se z různých tělních tkání klíštěte, nejčastěji ze střevní stěny, dále pak z vajíčkového žlutku nebo z tuku samiček. Aby mohly být potenciálními kandidáty na vytvoření vakcíny, měly by být spojeny s některými fyziologickými funkcemi klíšťat (Nuttall et al., 2006). Tyto antigeny vyvolávají imunitu, která snižuje schopnost rozmnožování, ale nemá vliv na zamezení sání klíšťat (Mulenga et al., 1999). Pokud zvíře imunizujeme těmito antigeny, jsou rozpoznány složkami imunitního

systemu. Krev následně přijatá parazitem s sebou nese protilátky, komplement a některé buňky imunitního systému. Reakce protilátek s vnitřním antigenem vede k poškození klíštěte. Některá klíšťata umírají, ta co přežijí mají sníženou schopnost sání a reprodukce (McKenna et al., 2007, Willadsen et al., 1993). Nevýhodou je, že nedochází ke stimulaci imunitní odpovědi na tyto antigeny a není vyvolána imunitní paměť. Záleží hlavně na množství vytvořených protilátek a imunizace musí být často opakována (Nuttall et al., 2006).

5.3.1 *Bm86 a jemu podobné střevní antigeny*

Antigen Bm86 byl získán ze střeva částečně nasátých samic klíštěte *Boophilus microplus*. Jak již bylo zmíněno, je to jediný antigen, který je opravdu využíván k výrobě vakcíny. Rekombinantní protein tohoto genu byl připraven v *E. coli* (vakcína „TickGARD“) (Rand et al. 1989) a také v kvasince *Pichia pastoris* (vakcína „Gavac“). Vakcína redukuje počet nasátých samic, jejich váhu a reprodukční aktivitu. Největším důsledkem je snížení počtu larev následující generace až o 90% (Canales et al., 2009, Willadsen & Jongejan, 1999). Zkušenosti s vakcínou Gavac v Latinské Americe jsou příznivé. Došlo k redukcí přenosu patogenů, např. babesiózy a anaplasmózy. Také se snížilo používání akaricidů, zmírnily se tedy dopady těchto látek na životní prostředí a na samotná zvířata a jejich produkci (de la Fuente et al., 1999).

Pokusy s Bm 86 byly prováděny také u ovcí, jednalo se o potenciální DNA vakcinaci. Gen Bm86 byl vložen do plasmidu. Ovce byly imunizovány tímto plasmidem samotným a nebo v kombinaci s plasmidem nesoucím gen pro cytokin IL-1 β nebo GM-CSF (granulocyty a makrofágy stimulující faktor). Tato strategie měla stimulovat protektivní imunitní odpověď hostitele a zvýšit účinnost vakcinace. Ale rozdíly mezi imunizací samotným proteinem nebo společně s plasmidem nebyly velké. Stimulace imunitní odpovědi byla nízká nebo žádná (De Rose et al., 1999).

Další skrytý antigen identifikovaný u klíštěte *B. microplus* byl pojmenován Bm91. Nalezen byl ve střevě i ve slinách (de la Fuente et al. 2006). Třetím skrytým antigenem izolovaným z částečně nasátých samic klíštěte *B. microplus* je BMA7. S oběma byly prováděny pokusy se skotem. Zvířata byla imunizována jednotlivými antigeny Bm86 a Bm91 nebo BMA7 a následně také oběma najednou. Poté byla vystavena klíštěcí infestaci. Účinnost byla dána třemi parametry- počtem dospělých sajících samic za den, jejich váhou a schopností klást vajíčka. Samotný Bm91 nebo BMA7 poskytl určitou ochranu, ale ani u jednoho nebyla větší než u samotného Bm86. Lepších výsledků bylo dosaženo vždy v kombinaci s Bm86. Přítomnost Bm91 ve vakcíně nijak neovlivňovala nebo dokonce

nesnižovala odpověď na Bm86. Také se neprokázal vzájemný vztah mezi protilátkovou odpovědí zvířat na Bm86 a Bm91, antigeny nevykazovaly žádnou spolupráci. Celkově byla účinnost vakcinace oběma antigeny spolu s Bm86 vyšší. Proto by Bm91 nebo BMA7 mohly být vhodnými kandidáty na vytvoření vakcíny se dvěma antigeny, ve spojení s Bm86 (Willadsen et al., 1996; McKenna et al., 2007).

5.3.1.1 Bm86 a Bm95

Gen pro antigen Bm95 byl izolován z argentinského klíštěte *B. microplus* kmene A. Byl klonován a produkován v kvasince *Pichia pastoris*. Tento kmen *B. microplus* vykazuje velmi nízkou citlivost k vakcíně z antigenu Bm86. V pokusech s telaty byla jedna skupina imunizována Bm86 a jedna skupina Bm95. Na těchto zvířatech následně sála klíšťata *B. microplus* kmene A a kmene Camcord, který je k Bm86 citlivý. Klíšťata sající na imunizovaných zvířatech byla evidentně poškozena, měla nižší hmotnost a sníženou schopnost reprodukce. Účinnost Bm86 ke kmenu Camcord byla 84%, ale ke kmenu A byla nulová. U Bm95 to bylo 89% a 54%. Zdá se, že antigen Bm95 je schopný chránit skot před kmeny *B. microplus*, které jsou rezistentní k vakcíně založené na Bm86. U kmenů citlivých k Bm86 je účinnost velice podobná u obou antigenů (Garía-García et al., 2000). Bm95 je tedy univerzálnější antigen v ochraně proti kmenům *B. microplus* z různých zeměpisných oblastí (de la Fuente et al., 2006).

5.3.1.2 Bm86 a Ba86

Ba 86 je obdoba proteinu Bm 86 u klíštěte *B. annulatus*. Při pokusech s oběma antigeny na skotu s klíšťaty *B. annulatus* a *B. microplus* bylo zjištěno, že jejich efekt je z 90% stejný. Ale ukázalo se, že účinnost obou proteinů je vyšší pro *B. annulatus* než pro *B. microplus*. *B. annulatus* je tedy citlivější k vakcinaci, což může být spojeno s rozdíly ve fyziologických procesech u těchto druhů, např. množství přijaté potravy (krve) a její trávení (Canales et al., 2009).

5.3.2 *Inhibitory serinových proteináz- serpiny*

Serinové proteinázy a jejich inhibitory regulují důležité procesy jako je koagulační kaskáda, fibrinolýza, trávení, zánětlivá a imunitní reakce. Byly identifikovány u široké škály organismů, hlavně u savců, včetně člověka. Při nerovnováze nebo nedostatku těchto molekul dochází k různým onemocněním.

Sepriny jsou antikoagulační molekuly, které byly objeveny i u klíšťat. Ta je využívají k narušení koagulačních procesů hostitele. Díky svým funkcím v mnoha fyziologických procesech jsou zajímavými kandidáty pro vývoj vakcíny (Mulenga et al., 2001, Sugino et al., 2002). Zatím byly získány a klonovány z klíšťat *Ixodes ricinus*, *Ixodes scapularis*, *Rhipicephalus appendiculatus* a *Haemaphysalis longicornis* (Mulenga et al., 2009).

5.3.2.1 Serpin HLS1

Serpin získaný z klíštěte *H. longicornis* byl nazván serpin-1 (HLS1). Jeho molekulová hmotnost je 41 kDa a prokázal částečnou homologii se serpiny z *I. ricinus* a *R. appendiculatus*. Transkript tohoto serpinu byl nalezen ve střevě částečně nasátých klíšťat a rekombinantní HLS1 produkovaný v *E. coli* nereagoval s protiklíštěcím sérem ze slin. Proto byl zařazen mezi skryté antigeny. Byly prováděny pokusy s imunizovanými králíky. Nedošlo ke změnám v průběhu sání nebo k rozdílům v hmotnosti nasátých jedinců mezi klíšťaty sajícími na imunizovaných nebo kontrolních zvířatech. Nicméně došlo ke zvýšení mortality, 43,9 % u nymf a 11,2% u dospělců. Účinnost není zdaleka 100% a nepostihuje proces sání, ale HLS1 by mohl být součástí koktejlu antigenů použitých ve vakcíně proti klíšťatům (Sugino et al. 2003).

5.3.2.2 Serpin HLS2

Další serpin identifikovaný později u klíštěte *H. longicornis* byl pojmenovaný serpin-2 HLS2. Je přítomný v hemolymfě sajících klíšťat. Prokázal 75% homologii s dalšími serpiny klíšťat *B. microplus* a *R. appendiculatus*. S rekombinantním HLS2 byly opět prováděny pokusy s imunizací králíků. Výsledkem bylo prodloužení doby sání u dospělců i nymf a nasátá klíšťata měla menší hmotnost oproti kontrolní skupině. Došlo také k poklesu kladení vajíček. Míra úmrtnosti klíšťat sajících na imunizovaných zvířatech byla 43% u dospělců a 44,6% u nymf. Tyto výsledky nejsou dostatečné k poskytnutí imunity a zamezení přenosu patogenů, ale opět se jedná o možnou součást multiantigenní vakcíny (Imamura et al., 2004).

5.3.3 Protein P27/30

P27/30 je 27 kDa a 30 kDa protein podobný troponinu I. Troponin I se nachází ve svalové tkáni, váže se na aktin a inhibuje interakce aktin-myosin. Hraje tedy důležitou roli v procesech probíhajících v příčně pruhovaném svalstvu. P27/30 byl izolován a klonován z klíštěte *Haemaphysalis longicornis*. K produkci tohoto proteinu byla použita *Escherichia coli* a protein byl testován v pokusech s imunizací myši. U imunizovaných myši P27/30

stimuloval specifickou protektivní protiklíštěcí imunitní odpověď. To bylo prokázáno tím, že došlo k prodloužení doby ukotvování dospělých klíšťat v hostiteli. Prodloužila se také doba sání jak u dospělých jedinců, tak u larev a přichycených larev bylo méně než u kontrolních myší. Delší byla také doba svlékání. Výrazné rozdíly se objevily ve váze nasátých klíšťat z imunizovaných a z kontrolních myší. Na váhu kladených vajíček byl vliv pouze malý. Protein P27/30 tedy podmiňuje imunitní odpověď hostitele na sání klíštěte *H. longicornis*, může tedy být potencionálním antigenním kandidátem pro vývoje vakcíny (Myung-Jo, 2005).

5.3.4 Chitinázový protein CHT1

Dalším antigenem získaným z klíštěte *H. longicornis* je 113 kDa chitinázový protein CHT1. Funkce chitinázy je podněcována ekdysteroidy v období svlékání při zbavování se starého chitinu. Její přítomnost byla objevena i ve střevě, kde má trávicí funkci a rozkládá chitin přítomný ve střevě. Rekombinantním proteinem CHR1 byly imunizovány myši. Tyto myši získaly podstatnou odolnost proti infestaci klíšťaty *H. longicornis*. Došlo k prodloužení doby sání u larev oproti larvám sajícím na kontrolních myších. Významné rozdíly se objevily ve váze vajíček a fáze svlékání se také prodloužila. To dokazuje, že CHT1 stimuluje u myší rozvoj specifické protektivní imunity proti klíšťatům (Myung-Jo & Fujisaki, 2008).

5.3.5 Rekombinantní antigeny 4D8, 4F8 a 4E6

Pomocí cDNA ELI a EST byly identifikovány antigeny z klíštěte *Ixodes scapularis*. Následně byly ještě potvrzeny RNAi. Tři z nich byly nazvány 4D8, 4F8 a 4E6. Nejprve byly s těmito třemi rekombinantními proteiny prováděny pokusy s nedospělými stadii tohoto trojhostitelského klíštěte. Na myších byl prokázán účinek těchto antigenů proti larvám, proti nymfám byl protektivní účinek prokázán na králičím modelu. Tyto výsledky vedly k tomu, že se pokusy prováděly i pro dospělá klíšťata.

Imunizovány byly ovce, jelikož patří mezi hostitele dospělých klíšťat *I. scapularis*. Poté byly vystaveny infestaci dospělých jedinců tohoto klíštěte. Vakcinovány byly jednotlivými rekombinantními 4D8, 4F8 a 4E6 a pak také kombinací všech tří proteinů. Vliv na hmotnost nasátých klíšťat nebyl žádný a hmotnost kladených vajíček byla statisticky nižší u klíšťat sajících na imunizovaných zvířatech. Došlo ale k potlačení infestace a k omezení kladení vajíček. Celková účinnost vakcinace se pohybovala mezi 33-71%. Největší účinek byl zaznamenán u 4D8, což bylo 71%. Tyto výsledky ukazují, že rekombinantní protein 4D8 by měl být dále zkoumán jako významný kandidát pro vytvoření vakcíny (Almazán et al., 2005).

5.3.6 Vitellin

Vitellin je protein hojně přítomný ve vajíčkách klíštěte *B. microplus*. Vitellin na sebe váže hem. Klíšťata, jako všichni krevsající paraziti, eliminují hem z přijaté potravy. Je silným katalyzátorem tvorby kyslíkových radikálů, které mohou způsobit oxidativní poškození různých biologicky důležitých molekul. Tuto úlohu má tedy u klíšťat vitellin.

Společně s proteinem GP80, který byl získán z larev stejného klíštěte, byly provedeny pokusy s vakcinací ovcí. Protilátky vytvořené proti oběma proteinům rozpoznávají stejný 200 kDa polypeptid v hemolymfě dospělých samic. To může dokazovat, že GP80 je součástí vitellinu. Ovce imunizované vitellinem nebo GP80 vyvinuly protilátkovou imunitní odpověď, která byla škodlivá pro sající klíšťata. Došlo až k 68% redukci larev v následující generaci. Výsledky byly pozorovány u přírodního vitellinu. Rekombinantní vitellin musí být ještě blíže prozkoumán, musí být identifikovány protektivní epitopy přírodního vitellinu (Tellam et al., 2002).

5.3.7 Voraxin

Faktor sání (EF), který je předán samici během páření, zřejmě stimuluje sání. Tento faktor byl nazván voraxin. Extrakt obsahující voraxin byl získán ze samčích pohlavních žláz klíštěte *Amblyomma hebraeum*. Protein byl vyroben rekombinantní a vstříknut do hemocoelu „panenských“ samin. U samic po páření je obsažen v hemolymfě, kam se dostává z pohlavního ústrojí. Bylo prokázáno, že tento faktor stimuluje degeneraci slinných žláz a částečný vývoj vaječnicků. Vakcína založená na voraxinu by tedy redukovala slinění a tím zamezovala sání klíšťat, čímž by bránila přenosu patogenů. Také by docházelo k redukci vývoje oocytů (Weiss & Kaufman, 2004).

5.3.8 Ferritin 1 a ferritin 2

Ferritin 1 a ferritin 2 byly charakterizovány u klíštěte *Ixodes ricinus*. Jsou zahrnuty v metabolismu železa. Příjem krve klíštěte doprovází produkce ferritinu 1 ve slinných žlázách a ováriích. Funkce ferritinu 2 je transport železa mezi střevem a periferními tkáněmi.

Bylo prokázáno, že pokud dojde k vypnutí genů pro fer1 a fer2, klíšťata mají problém s reprodukcí. Zásoby železa jsou nejspíš důležité pro správný vývoj embrya. Pokud se zásoby nevytváří, nedojde k vylíhnutí z vajíčka. Chybějící fer2 také snižuje počet plně nasycených dospělých samic. Nedochozí totiž k zpracování a odstraňování železa ze střeva do hemolymfy.

Rekombinantní fer2 byl využit k imunizaci hostitelského organismu. Výhodou pro využití fer2 je podstatný rozdíl v aminokyselinové sekvenci oproti savčímu ferritinu. To snižuje riziko možných vedlejších účinků imunizace. Proti fer2 se ve vakcinovaném hostiteli vytvoří protilátky. Následkem je zablokování funkce fer2, nedochází tedy k transportu železa ze střeva do periferních tkání. Klíšťaťata nemohou úspěšně dokončit sání a umírají přímo na hostiteli vyschnutím (Kopacek & Hajdusek, 2009).

5.4 Duální vakcíny (Dual action vakcíny)

Relativně novou strategií jsou duální vakcíny. Jedná se o identifikaci takových antigenů, které cílí jak sekretované, tak skryté antigenní epitopy (Nuttall et al., 2006). Takové antigeny by stimulovaly specifickou protektivní imunitní odpověď hostitele a udržovaly by vysoký stupeň imunity, což by eliminovalo potřebu opakované vakcinace. Zároveň by docházelo k produkci protilátek, které by reagovaly se skrytými střevními antigeny (Trimnell et al. 2002).

5.4.1 Cementový protein 64P

Antigenem vhodným pro takovou duální vakcínu je nejspíš protein 64P. Ten byl získán z dospělých samic klíšťete *Rhipicephalus appendiculatus*. Je součástí cementu, který obsahuje mnoho proteinů, které infiltrují epidermální a dermální vrstvy pokožky hostitele. Některé z nich jsou imunogenní a imunoprotektivní. Kompozice 64P je podobná některým savčím kožním proteinům, zejména keratinu a kolagenu. Tato stavba zabraňuje jeho odmítnutí hostitelským imunitním systémem během sání klíšťete, usnadňuje vztah mezi cementem a kožní tkání hostitele. Jeho N-koncové peptidy jsou bohaté na glyciny, což je znak proteinů obratlovců, nacházejících se v extracelulární matrix a kožní tkáni. I další proteiny získané ze slinných žláz *R. appendiculatus* obsahují hodně glycinu. (Havlíková et al., 2009).

Byl vytvořen rekombinantní 64TRP. Expres probíhala v *E. coli*. Produkovaný byl zkrácené úseky N-konce a C-konce rozpustného proteinu 64TRP a celý protein 64TRP, rozpustný nebo denaturovaný. U všech došlo k fúzi s GTS (glutathion S-transferáza). Těmito klony genu 64P byla imunizována morčata. Následně byla vystavena infestaci dospělých samic a nymf klíšťete *R. appendiculatus*. Produkci zkrácených úseků 64P došlo k odhalení epitopů, které indukovaly protilátkovou i zánětlivou imunitní odpověď hostitele. Kožní zánětlivá reakce hostitele charakterizuje získanou odolnost proti klíšťatům, zahrnuje bazofily, eosinofily, lymfocyty, makrofágy dendritické buňky. Imunita je zvyšována přirozenou klíšťecí infestací (Trimnell et al., 2005). U imunizovaných morčat se zvýšil titer protilátek

před infestací a rostl i po infestaci, u kontrolních zvířat ale k růstu nedocházelo. To dokazuje, že sání klíšťat na imunizovaných zvířatech stimuluje anamnestickou odpověď. Bylo zjištěno, že protilátky vytvořené proti 64TRP zkříženě reagovaly s epitopy proteinů ve slinných žlázách, cementu, hemolymfě a také ve střevě dospělých klíšťat *R. appendiculatus*. Reakcí epitopů ve střevě s protilátkami přijatými s potravou dochází k porušení střeva a smrti klíšťete, k fatálním postižením docházelo i u nymf. Zkříženě reagující protein ve slinných žlázách by mohl být GST, který byl dříve klonován z klíštěte *B. microplus*. Imunoprotektivní epitopy se nachází zřejmě hlavně v N-koncové oblasti proteinu 64P, tyto výsledky totiž byly prokázány u zvířat, která obdržela vakcíny, které obsahovaly tento úsek (Trimnell et al., 2002). Bylo zjištěno, že složení slin se může u jednotlivých klíšťat lišit. Proteiny, včetně 64P, se mohou objevovat v několika variantách a příbuzných formách. Na to bude muset být brán zřetel v případě přípravy vakcíny (Havlíková et al., 2009).

5.5 Přenos blokující vakcíny (trans-block vakcíny)

Dalším přístupem pro vytvoření vakcíny proti klíšťatům jsou tzv. trans-block vakcíny. Taková vakcína by měla blokovat přenos patogena z vektora na hostitele. Jak již bylo zmíněno, ve slinách klíšťat jsou obsaženy faktory napomáhající přenosu- tento jev byl nazván slinami aktivovaný přenos. U některých zvířat s imunitou proti klíšťatům bylo pozorováno snížení přenosu, ale ne u všech. Nyní je potřeba identifikovat antigeny, které nejenže vyvolají protektivní imunitní odpověď, ale zároveň zabrání přenosu patogenů (Nuttall et al., 2006).

Jedním z těchto antigenů by mohl být opět 64TRP (Trimnell et al., 2005). Účinek tohoto antigenu byl testována na myších, na kterých sála klíšťata *Ixodes ricinus* infikovaná virem klíšťové encefalitidy (TBEV). Jedna dávka 64TRP ukázala stejný účinek jako jedna dávka TBEV vakcíny. Odpověď myši imunizované 64TRP na sání klíštěte nezablokovala kompletně přenos viru, ale spíše dovolila dostatečně vystavit virus účinkům protektivní imunity. Podobný pokus byl proveden s vakcínou založenou na Bm86. Pozorovaný účinek na přenos patogena byl srovnatelný s 64TRP, ale na rozdíl od 64TRP nedokázala komerční vakcína zabránit smrtelné infekci TBEV ani po použití třech dávek. Vakcína Bm86 tedy není vhodným kandidátem na trans-block vakcínu. Univerzálními antigeny využitelnými v trans-block vakcínách se zdají být cukerné epitopy. Nalezeny byly ve střevě mnoha parazitů, včetně klíštěte *Dermacentor variabilis* (Nuttall et al., 2006).

Dalším antigenem pro vytvoření trans-block vakcíny by mohl být protein ze slin klíštěte *Ixodes ricinus* Salp15. Tento protein se váže povrchový receptor OspC *Borrelie burgdorferi*.

Tato interakce usnadňuje přenos infekce z vektora na hostitele, chrání bakterii před účinky protilátek a komplementu. Na myším modelu bylo prokázáno, že imunizace tímto slinným proteinem výrazně chrání myši před infekcí a zvyšuje protektivní účinky protilátek proti antienuům *Borrelia*, např. proteinům OspA nebo OspC. In vitro pokusy ukázaly mechanismus účinku: *Borrelia* navázané na Salp15 jsou v antiséru odstraňovány fagocyty. Vakcinace molekulou, kterou patogen vyžaduje k přenosu je tedy další strategií pro vývoj vakcíny proti klíšťaty přenášeným mikrobům (Dai et al., 2009).

6. DISKUSE

Současná kontrola infestace klíšťat je obstarávána pouze jedinou vakcínou. Vakcína „TickGARD“ je namířena proti klíšťeti *Boophilus microplus*, které parazituje hlavně na hovězím dobytku. Zkušenosti s používáním vakcíny jsou příznivé. Omezil se výskyt patogenů přenášených tímto klíštětem, jedná se hlavně o *Babesii bovis*. Vakcína je využívána hlavně v tropických oblastech. Pozitivní je, že v těchto oblastech jsou používány akaricidy v menší míře, čímž se snížily dopady těchto chemikálií na životní prostředí a produkci zvířat. Zbytek světa je stále odkázán na pesticidy a akaricidy nebo na vakcíny proti jednotlivým patogenům. Objev nové vakcíny proti klíšťatům by situaci ulehčil.

Vhodný by byl vývoj vakcíny proti jiným druhům klíšťat a pro další živočišné druhy. Je potřeba charakterizovat genovou variabilitu klíštěcích druhů, identifikovat a zkoumat další vhodné antigeny, pochopit jejich biologickou funkci. S tím souvisí také charakterizace imunitní odpovědi hostitele na tyto antigeny. Důležitým předpokladem je úplná znalost genomu nebo alespoň silalomu (transkriptom slinných žláz) významných druhů klíšťat jako základu pro identifikaci kandidátních proteinů vakcín nebo SAT faktorů metodami reversní genetiky (Ribeiro et al., 2006)

Exponovaných antigenů bylo objeveno a charakterizováno mnoho (Tab. 1), ale nebyly dostatečně prozkoumány. Pokusy s těmito proteiny zatím neukázaly u žádného antigenu potřebnou účinnost. Každá tato molekula má u klíštěte jinou funkci- např. calreticulin je spojen s přítomností vápníku, p29 s tvorbou cementu, imunoglobulin vázající proteiny a histamin vázající proteiny brání projevům imunitní odpovědi hostitele. Princip každé vakcíny by byl jiný. Problém s malou účinností jednotlivých antigenů by mohl být vyřešen tím, že by byla vytvořena vakcína obsahující více antigenů, v ní by mohly být obsaženy i skryté antigeny.

U skrytých antigenů (Tab. 2) se objevovala vyšší úspěšnost, především u těch, které byly izolovány z klíštěte *B. microplus* (Bm91 a BMA7), stejně jako Bm86 použitý ve vakcíně „TickGARD“. Mohly by být tedy využity k vylepšení této stávající vakcíny. Je zde také mnoho kandidátů pro vytvoření koktejlu antigenů pro vývoj vakcíny, např. serpiny, které jsou zahrnuty v regulaci koagulace, ale také již zmíněné antigeny z *B. microplus*. Imunita proti těmto proteinům není dlouhodobá a není zesilována infestací klíšťat. Množství vytvořených protilátek v imunizovaném hostiteli klesá a vakcinace musí být často opakována, aby bylo

dosáženo požadovaného účinku. Tento problém by u multiantigenní vakcíny mohl být vyřešen přítomností některých exponovaných antigenů.

Problémem trans-block vakcín, jejichž účinnost proti přenášeným patogenům je založena na blokování imunosupresivních molekul ve slinách, je komplikována tím, že potenciálních SAT faktorů je řada a většina z nich dosud nebyla identifikována. Je velmi pravděpodobné, že vyřazení jednoho z faktorů díky vakcinaci by vedlo k jeho „nahrazení“ jiným, který by nebyl vakcinací ovlivněn. Výjimku tvoří Salp15, který se váže na povrchový lipoprotein borelií OspC a chrání je proti účinkům protilátek a komplementu (Dai et al., 2009).

Doposud nejvhodnějším objeveným antigenem se zdá být 64P. Je kandidátem pro vytvoření duální vakcíny nebo i trans-block vakcíny. Tento antigen je přítomný ve slinných žlázách, ale protilátky proti němu vytvořené zkříženě reagovaly s epitopy proteinů přítomných i v dalších tělních tkáních klíštěte, včetně střeva. Docházelo by tedy ke stimulaci protilátkové i zánětlivé odpovědi. Hostitel by produkoval protilátky, které by poškozovaly střevo a jiné tkáně klíšťat, které jsou úzce spojené s důležitými fyziologickými procesy. Zvyšovala by se úmrtnost a snižovala reprodukční schopnost klíšťat. Zánětlivá odpověď by zároveň zabraňovala úspěšnému průběhu sání. Také docházelo k zesilování získané imunity v průběhu infestace. Duální vakcína se zdá být nejvhodnější strategií pro vytvoření nové vakcíny proti klíšťtům.

7. ZÁVĚR

V oblasti výzkumu vakcín proti klíšťatům je potřeba charakterizovat genomy různých druhů klíšťat. To by mohlo vést k objevení dalších antigenů. Získané antigeny by měly být jako rekombinantní proteiny podrobně prozkoumány k pochopení jejich biologické funkce. Na základě toho je pak možné je vhodně použít jako vakcínu. Ideální vakcína by měla chránit proti co nejširšímu spektru klíštěcích druhů a měla by redukovat výskyt nebezpečných patogenů.

8. PŘEHLED LITERATURY

Almazán C., Kocan K.M., Bergman D.K., García-García J.C., Blouin E.F., de la Fuente J. 2003: Identification of Protective Antigens for the Control of *Ixodes scapularis* Infestation Using cDNA Expression Library Immunization. *Vaccine* 21: 1492-1501.

Almazán C., Kocan K.M., Blouin E.F., de la Fuente J. 2005: Vaccination with Recombinant Tick Antigens for the Control of *Ixodes scapularis* Adult Infestations. *Vaccine* 23: 5294-5298.

Askenase P.W. 1977: Role of Basophils, Mast Cells, and Vasoamines in Hypersensitivity Reactions with a Delayed Time Course. *Prog Allergy* 23: 199-320.

Bain O., Babayan S. 2003: Behaviour of Filariae: Morphological and Anatomical Signatures of Their Life Style within the Arthropod and Vertebrate Hosts. *Filaria Journal* 2: 16.

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 of Parasitology* 32: 833-842.

Brown S.J., Askenase P.W. 1983: Immune Rejection of Ectoparasites (Ticks) by T Cell and IgG1 Antibody Recruitment of Basophils and Eosinophils. *Fed Proc* 42: 1744-1749.

Canales M., Almazán C., Naranjo V., Jongejan F., de la Fuente J. 2009: Vaccination with Recombinant *Boophilus annulatus* Bm86 Ortholog Protein, Ba86, Protects Cattle against *B. annulatus* and *B. microplus* Infestation. *BMC Biotechnology* 9: 29.

Carrade D.D., Foley J.E., Borjesson D.L., Sykes J.E. 2009: Canine Granulocytic Anaplasmosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23(6): 1129-1141.

Cleveland C.W., Peterson D.S., Latimer K.S. 2002: An Overview of Canine Babesiosis. *Veterinary Clinical Pathology Clerkship Program*.

Cotté V., Bonnet S., Le Rhun D., Le Naour E., Chauvin A., Boulouis H.J., Lecuelle B., Lilin T., Vayssier-Taussat M. 2008: Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerging Infectious Diseases* 14: 1074-1080.

Couvreur B., Beaufays J., Charon C., Lahaye K., Gensale F., Denis V., Charloteaux B., Decrem Y., Prévot P.P., Brossard M., Vanhamme L., Gonfroid E. 2008: Variability and Action Mechanism of a Family of Anticomplement Proteins in *Ixodes ricinus*. *PLoS ONE* 3: e1400.

Dai J., Wanq P., Adusumili S., Booth C.J., Narasimhan S., Anquita J., Fikriq E. 2009: Antibodies Against a Tick Protein, Salp15, Protect Mice from the Lyme Disease Agent. *Cell Host and Microbe* 6: 482-92.

De Castro J.J. 1997: Sustainable Tick and Tickborne Disease Control in Livestock Improvement in Developing Countries. *Veterinary Parasitology* 71: 77-97.

De la Fuente J., Kocan K.M. 2006: Strategies for Development of Vaccines for Control of Ixodid Tick Species. *Parasite Immunology* 28: 275-283.

De la Fuente J., Rodriguez M., García-García J.C. 2006: Immunological Control of Ticks through Vaccination with *Boophilus microplus* Gut Antigens. *Annals of the New York Academy of Sciences* 916: 617-621.

De la Fuente J., Rodriguez M., Montero C., Redondo M., García-García J.C., Méndez L., Serrano E., Valde M., Enríquez A., Canales M., Ramos E., Boue O., Machado H., Leonart R. 1999: Vaccination against Ticks (*Boophilus* spp.): the Experience with the Bm86-based Vaccine Gavac. *Genetic Analysis- biomolecular Engineering* 15: 143-148.

De Rose R., McKenna R.V., Cobon G., Tennent J., Zakrzewski H., Gale K., Wood P.R., Scheerlinck J.P.Y., Willadsen P. 1999: Bm86 Antigen Induces a Protective Immune Response against *Boophilus microplus* Following DNA and Protein Vaccination in Sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 71: 151-160.

Ferreira C.A.S., Silva Vaz I.D., Silva da Silva S., Hag K.L., Valenzuela J.G., Masuda A. 2002: Cloning and Partial Characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Calreticulin. *Experimental Parasitology* 101: 25-34.

Ganguly S., Mukhopadhyay S.K. 2008: Tick-borne Ehrlichiosis Infection in Human Beings. *Journal of Vector Borne Diseases* 45: 273-280.

García-García J.C., Montero C., Redondo M., Varga M., Canales M., Boue O., Rodríguez M., Joglar M., Machado H., González I.L., Valdés M., Méndez L., de la Fuente J. 2000: Control of Ticks Resistant to Immunization with Bm86 in Cattle Vaccinated with Recombinant Antigen Bm95 Isolated from the Cattle Tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine* 18: 2275-2287.

Garg R., Juncadella I.J., Ramamoorthi N., Ashish, Ananthanarayanan S.K., Thomas V., Rincón M., Krueger J.K., Fikrig E., Yengo Ch.M., Anquita J. 2006: CD4 is the Receptor for the Tick Saliva Immunosuppressor, Salp15. *The Journal of Immunology* 177: 6579-6583.

Gaspar A.R., Crause J.C., Neitz A.W. 1995: Identification of Anticoagulant Activities in the Salivary Glands of the Soft Tick, *Ornithodoros savignyi*. *Experimental and Applied Acarology* 19: 117-27.

- Ghosh S., Azhahianambi P., Yadav M.P. 2007:** Upcoming and Future Strategies of Tick Control: a Review. *Journal of Vector Borne Diseases* 44: 79-89.
- 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*. *The Journal of Immunology* 166: 4319-4326.
- Gray J.S. 1998:** The Ecology of Ticks Transmitting Lyme Borreliosis. *Experimental & Applied Acarology* 22: 294-258.
- Gritsun T.S., Nuttall P.A., Gould E.A. 2003:** Tick-borne Flaviviruses. *Advances in Virus Research* 61: 317-71.
- Guo X., Booth C.J., Paley M.A., DePonte K., Fikrig E., Narasimhan S., Montgomery R.R. 2009:** Inhibition of Neutrophil Function by Two Tick Salivary Proteins. *Infection and Immunity* 77: 2320-9.
- Hajdusek O., Sojka D., Kopacek P., Buresova V., Franta Z., Sauman I., Winzerling J., Grubhoffer L. 2009:** Knockdown of Proteins Involved in Iron Metabolism Limits Tick Reproduction and Development. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 106: 1033-1038.
- Hammoud K.A., Hinthorn D., Edwards B. 2008:** Bartonellosis. *eMedicine*.
- Hannier S., Liversidge J., Sternberg J.M., Bowman A.S. 2003:** *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.
- Hannier S., Liversidge J., Sternberg J.M., Bowman A.S. 2004:** Characterization of the B-cell Inhibitory Protein Factor in *Ixodes ricinus* Tick Saliva: a Potential Role in Enhanced *Borrelia burgdorferi* Transmission. *Immunology* 113: 401-408.
- Havlíková S., Roller L., Kočí J., Trimmell A.R., Kazimírová M., Klempa B., Nuttall P.A. 2009:** Functional Role of 64P, the Candidate Transmission-blocking Vaccine Antigen from the Tick *Rhipicephalus appendiculatus*. *International Journal of Parasitology* 39: 1485- 1494.
- Heinz F.X., Mandl C.W. 1993:** The Molecular Biology of Tick-borne Encephalitis Virus. *Apmis* 101: 735-45.
- Homer M.J., Aquilar-Delfin I., Telford S.R., Krause P.J., Persing D.H. 2000:** Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews* 13: 451-469.
- Hovius W.R., Levi M., Fikrig E. 2008:** Salivating for Knowledge: Potential Pharmacological Agents in Tick Saliva. *PloS Medicine* 5: e43.

Charrel R.N., Attoui H., Butenko A.M., Clegg J.C., Deubel V., Frolova T.V., Gould E.A., Gritsun T.S., Heinz F.X., Labuda M., Lashkevich V.A., Loktev V., Lundkvist A., Lvov D.V., Mandl G.W., Niedrig M., Papa A., Petrov V.S., Plyusnin A., Randolph S., Süss J., Zlobin V.I., de Lamballerie X. 2004: Tick-borne Virus Diseases of Human Interest in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 10: 1040-1055.

Ibrahim M.A., Ghazy A.M., Maharem T.M., Khalil M.I. 2001: Faktor Xa (Fxa) Inhibitor from the Nymphs of the Camel Tick *Hyalomma dromedarii*. *Biochemistry and Molecular biology* 130: 501-512.

Imamura S., de Silva Vaz I. Junior, Sugino M., Ohashi K., Onuma M. 2004: A Serine Protease Inhibitor (Serpine) from *Haemaphysalis longicornis* as an Anti-tick Vaccine. *Vaccine* 23: 1301-1311.

Jaworski D.C., Simmen F.A., Lamoreaux W., Coons L.B., Muller M.T., Needham G.R. 1995: A Secreted Calreticulin Protein in Ixodid Tick (*Amblyomma americanum*) Saliva. *Journal of Insect Physiology* 41: 369-375.

Juncadella I.J., Garg R., Ananthnarayanan S.K., Yengo Ch.M., Anguita J. 2007: T-cell Signaling Pathways Inhibited by the Tick Saliva Immunosuppressor, Salp15. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 49: 433-438.

Katzer F., Ngugi D., Schnier Ch., Walker A.R., McKeever D.J. 2007: Influence of Host Immunity on Parasite Diversity in *Theileria parva*. *American Society for Microbiology*.

Kopacek P., Hajdusek O. 2009: Ferritin 2 for the Host Immunization Against Ticks. *World Intellectual Property Organization*.

Kotsyfakis M., Anderson J.M., Andersen J.F., Calvo E., Francischetti I.M., Mather T.N., Valenzuela J.G., Ribeiro J.M. 2008: Cutting edge: Immunity against a “Silent” Salivary Antigen of the Lyme Vector *Ixodes Scapularis* Impairs Its Ability to Feed. *Journal of Immunology* 181: 5209-12.

Kovář L., Kopecký J., Říhová B. 2001: Salivary Gland Extract from *Ixodes ricinus* Tick Polarizes the Cytokine Profile Toward Th2 and Suppresses Proliferation of T Lymphocytes in Human PbmC Culture. *Parasitology* 87: 1342-1348.

Krause P.J. 2003: Babesiosis Diagnosis and Treatment. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 3: 45-51.

Kubeš M., Kocáková P., Slovák M., Sláviková M., Fuchsberger N., Nuttall P.A. 2002: Heterogeneity in the Effect of Different Ixodid Tick Species on Human Natural Killer Cell Activity. *Parasite Immunology* 24: 23-28.

Labuda M., Trimmell A.R., Ličková M., Kazimírová M., Davies G.M., Lissina O., Hails R.S., Nuttall P.A. 2006: An Antivector Vaccine Protects Against a Lethal Vector-borne Pathogen. *PloS Pathogens* 2: e27.

Mans B.J., Andersen J.F., Francischetti I.M.B., Valenzuela J.G., Schwan T.G., Phan V.M., Garfield M.K., Hammer C.H., Ribeiro M.C. 2008: Comparative Sialomics Between Hard and Soft Ticks: Implications for the Evolution of Blood-feeding Behavior. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38: 42-58.

Mansfield K.L., Johnson N., Phipps L.P., Stephenson J.R., Fooks A.R., Solomon T. 2009: Tick-borne Encephalitis Virus- a Review of an Emerging Zoonosis. *Journal of General Virology* 90: 1781-1794.

Matsuda H., Fukui K., Kiso Y., Kitamura Y. 1985: Inability of Genetically Mast Cell-deficient W/W^v Mice to Acquire Resistance against Larval *Haemaphysalis longicornis* Ticks. *Journal of Parasitology* 71: 443-448.

Matsuda H., Watanabe N., Kiso Y., Hirota S., Ushio H., Kannam Y., Azuma M., Koyama H., Kitamura Y. 1999: Necessity of IgE Antibodies and Mast Cells for Manifestation of Resistance against Larval *Haemaphysalis longicornis* Tick in Mice. *Journal of Immunology* 144: 259-262.

McKenna R.V., Riding G.A., Jarney J.M., Pearson R.D., Willadsen P. 2007: Vaccination of Cattle against *Boophilus microplus* Using a Mucin-like Membrane Glycoprotein. *Parasite Immunology* 20: 325-336.

Morzaria S.P. 1988: Identification of Theileria Species and Characterization of Theileria Parva Stocks. FAO Corporate Document Repository.

Mulenga A., Khumthong R., Chalaire K.C. 2009: *Ixodes scapularis* Tick Serine Proteinase Inhibitor (Serpin) Gene Family; Annotation and Transcriptional Analysis. *BMC Genomics* 10: 217.

Mulenga A., Sugimoto Ch., Sako Y., Ohashi K., Musoke A., Shubash M., Onuma M. 1999: Molecular Characterization of a *Haemaphysalis longicornis* Tick Salivary Gland-associated 29-kilodalton Protein and its Effect as a Vaccine Against Tick Infestation in Rabbits. *Infection and Immunity* 67: 1652-1658.

Mulenga A., Sugino M., Nakajima M., Sugimoto Ch., Onuma M. 2001: Tick-encoded Serine Proteinase Inhibitors (Serpins); Potential Target Antigens for Tick Vaccine Development. *Journal of Veterinary Medical Science* 63: 1063-1069.

- Myung-Jo Y. 2005:** Immunization of Mice with Recombinant P27/30 Protein Confers Protection against Hard Tick *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae) Infestation. *Journal of Veterinary Science* 6: 47-51.
- Myung-Jo Y., Fujisaki K. 2008:** Vaccination Effects of Recombinant Chitinase Protein from the Hard Tick *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Veterinary Medical Science* 71: 709-12.
- Nathwani D., Hamlet N., Walker E. 1990:** Lyme Disease: a Review. *British Journal of General Practitioners* 40: 72-74.
- Nuttall P.A., Trimmell A.R., Kazimírová M., Labuda M. 2006:** Exposed and Concealed Antigens as Vaccine Targets for Controlling Ticks and Tick-borne Diseases. *Parasite Immunology* 28: 155-163.
- Nuttall P.A., Labuda M. 2004:** Tick-host Interactions: Saliva-activated Transmission. *Parasitology* 129: 177-189.
- Paesen G.C., Adams P.L., Harlos K., Nuttall P.A., Stuart D.I. 1999:** Tick histamine-binding Proteins: Isolation, Cloning, and Three-dimensional Structure. *Molecular Cell* 3: 661-671.
- Pattnaik P. 2006:** Kyasanut Forest Disease: an Epidemiological View in India. *Reviews in Medical Virology* 16: 151-165.
- Paveglio S.A., Allard J., Mayette J., Whittaker L.A., Juncadella I., Anguita J., Poynter M.E. 2007:** The Tick Salivary Protein, Salp15, Inhibits the Development of Experimental Asthma. *The Journal of Immunology* 187: 7064-7071.
- 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.
- Rand K.N., Moore T., Sriskantha A., Spring K., Tellam R., Willadsen P., Cobon G.S. 1989:** Cloning and Expression of a Protective Antigen from the Cattle Tick *Boophilus microplus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 9657-9661.
- Ribeiro J.M.C. 1987:** *Ixodes dammini*: Salivary Anti-complement Activity. *Experimental Parasitology* 64: 347-353.
- Ribeiro J.M., Alarcon-Chaidez F., Francischetti I.M., Mans B.J., Mather T.N., Valenzuela J.G., Wikel S.K. 2006:** An Annotated Catalog of Salivary Gland Transcripts from *Ixodes scapularis* Ticks. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 111-29.
- Siegel S., Howerth E., LeRoy B.E. 2006:** East Coast Fever (*Theileria parva*). University of Georgia.

- Singh S.K., Girschick H.J. 2003:** Tick-host Interactions and Their Immunological Implications in Tick-borne Diseases. *Current Science* 85: 1284-1298.
- Spach D.H. 2010:** Bartonellosis: Oroya fever and Verruga Peruana. Up to Date Website- For Patients.
- Sugino M., Imamura S., Mulenga A., Nakajima M., Tsuda A., Ohashi K., Onuma M. 2003:** A Serine Proteinase Inhibitor (Serpin) From Ixodid Tick *Haemaphysalis longicornis*; Cloning and Preliminary Assessment of Its Suitability as a Candidate for a Tick Vaccine. *Vaccine* 21: 2844-2851.
- Taylor S. 2004:** Lyme Disease (Borreliosis)- A Plague of Ignorance Regarding the Ignorance of a Plague.
- Tellam R.L., Kemp D., Riding G., Briscoe S., Smith D., Sharp P., Irving D., Willadsen P. 2002:** Reduced Oviposition of *Boophilus microplus* Feeding on Sheep Vaccinated with Vitellin. *Veterinary Parasitology* 103: 141-156.
- Tellam R.L., Smith D., Kemp D.H., Willadsen P. 1992:** Vaccination Against Ticks. *Animal Parasite Control Utilizing Biotechnology* 12: 303-332.
- Titus R.G., Bishop J.V., Mejia J.S. 2006:** The Immunomodulatory Factors of Arthropod Saliva and the Potential for These Factors to Serve as Vaccine Targets to Prevent Pathogen Transmission. *Parasite Immunology* 28: 131-141.
- Todar K. 2008:** *Borrelia burgdorferi* and Lyme disease.
- Trimnell A.R., Davies G.M., Lissina O., Hails R.S., Nuttall P.A. 2005:** A Cross-reactive Tick Cement is a Candidate Broad-spectrum Tick Vaccine. *Vaccine* 23: 4329-4341.
- Trimnell A.R., Hails R.S., Nuttall P.A. 2002:** Dual Action Ectoparasite Vaccine Targeting 'Exposed' and 'Concealed' Antigens. *Vaccine* 20: 3560-3568.
- Tsuda A., Mulenga A., Sugimoto Ch., Nakajima M., Ohashi K., Onuma M. 2001:** cDNA Cloning, Characterization and Vaccine Effect Analysis of *Haemaphysalis longicornis* Tick Saliva Proteins. *Vaccine* 19: 4287-4296.
- Urioste S., Hall L.R., Telford S.R., Titus R.G. 1994:** Saliva of the Lyme Disease Vector, *Ixodes dammini*, Blocks Cell Activation by a Nonprostaglandin E₂-dependent Mechanism. *The Journal of Experimental Medicine* 180: 1077-85.
- Volf P., Horák P. a kol. 2007:** Paraziti a jejich biologie: 260-264.
- Wang H., Nuttall P.A. 1999:** Immunoglobulin-binding Proteins in Tick: New Target for Vaccine Development against a Blood-feeding Parasite. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56: 286-295.

- Weiss B.L., Kaufman W.R. 2004:** Two Feeding-induced Proteins from the Male Gonad Trigger Engorgement of the Female Tick *Amblyomma hebraeum*. Proceedings of the National Academy of Sciences 101: 5874-5879.
- Willadsen P. 1997:** Novel Vaccines for Ectoparasites. Veterinary Parasitology 71: 202-222.
- Willadsen P. 2001:** The Molecular Revolution in the Development of Vaccines against Ectoparasites. Veterinary Parasitology 101: 353-367.
- Willadsen P., Bird P., Cobon G.S., Hungerford J. 1995:** Commercialisation of a Recombinant Vaccine Against *Boophilus microplus*. Parasitology 110: S43-S50.
- Willadsen P., Eisemann C.H., Tellam R.L. 1993:** ‘Concealed’ Antigens: Expanding the Range of Immunological Targets. Parasitology Today 9: 132-135.
- Willadsen P., Jongejan F. 1999:** Immunology of the Tick-host Interaction and the Control of Tick and Tick-borne Diseases. Parasitology Today 15: 258-262.
- Willadsen P., Kemp D.H., Cobon G.S., Wright I.G. 1992:** Successful Vaccination against *Boophilus microplus* and *Babesia bovis* Using Recombinant Antigens. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (87): 289-294.
- Willadsen P., Smith D., Gobon G., McKenna R.V. 1996:** Comparative Vaccination of Cattle against *Boophilus microplus* with Recombinant Antigen Bm86 Alone or in Combination with Recombinant Bm91. Parasite Immunology 18: 241-246.
- Zhu K., Sauer J.R., Bowman A.S., Dillwith J.W. 1997:** Identification and Characterization of Anticoagulant Activities in Saliva of the Lone Star Tick, *Amblyomma americanum*. Parasitology 83: 38-43.