

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie



Virus klíšťové encefalitidy v urbánní oblasti Českých Budějovic

Bakalářská práce

Lenka Čapková

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

Školitel specialista: Mgr. Václav Hönig

České Budějovice, 2011

Čapková L., 2011: Virus klíšťové encefalidity v urbánnej oblasti Českých Budějovic [Tick-borne encephalitis virus in an urban area of České Budějovice (Czech Republic), Bc. Thesis, in Czech]- 39 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace:

A total of 641 *Ixodes ricinus* ticks were collected in the urban park area Stromovka in České Budějovice (Czech Republic) and tested for the presence of tick-borne encephalitis virus.

Tato práce byla financována granty:

Výzkumné centrum LC 06009 a výzkumný záměr PřF JU MSM 6007665801 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

29. dubna 2011

.....

Lenka Čapková

Poděkování

Zde bych ráda poděkovala mému školiteli - specialistovi Mgr. Václavu Hönigovi za ochotu, trpělivost a užitečné rady v průběhu celé mé práce. Také bych ráda poděkovala mému vedoucímu práce a zároveň vedoucímu laboratoře Molekulární biologie vektorů a patogenů Prof. RNDr. Liboru Grubhofferovi, CSc. za možnost pracovat právě v této laboratoři a za příjemný přístup. Chtěla bych také poděkovat kolegům a kolegyním z laboratoře za vytvoření přátelské atmosféry a za pomoc při řešení problémů.

Obsah

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Úvod..... | 1 |
| 2 | Hlavní cíle práce..... | 2 |
| 3 | Literární přehled..... | 3 |
| 3.1 | Klíšťata a klíšťáci..... | 3 |
| 3.1.1 | Klíšťáci..... | 3 |
| 3.1.1.1 | Obecná charakteristika..... | 3 |
| 3.1.1.2 | Rod <i>Argas</i> | 3 |
| 3.1.1.3 | Rod <i>Ornithodoros</i> | 4 |
| 3.1.2 | Klíšťata..... | 4 |
| 3.1.2.1 | Obecná charakteristika..... | 4 |
| 3.1.2.2 | <i>Ixodes ricinus</i> | 4 |
| 3.1.2.3 | Faktory prostředí..... | 5 |
| 3.1.2.4 | Adaptace k parazitismu..... | 6 |
| 3.2 | Nemoci přenášené klíšťaty..... | 6 |
| 3.2.1 | Bakteriální onemocnění..... | 6 |
| 3.2.2 | Protozoární nákazy..... | 8 |
| 3.2.2.1 | Babesióza..... | 8 |
| 3.2.2.2 | Theilerióza..... | 8 |
| 3.2.3 | Onemocnění virového původu..... | 8 |
| 3.3 | Klíšťová encefalitida..... | 9 |
| 3.3.1 | Taxonomické zařazení..... | 9 |
| 3.3.2 | Přenos viru klíšťové encefalidity..... | 10 |
| 3.3.3 | Cyklus viru klíšťové encefalidity v přírodě..... | 11 |
| 3.3.4 | Epidemiologie..... | 11 |
| 3.3.5 | Patogeneze..... | 12 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.3.6 | Klíšťová encefalitida na území České republiky | 13 |
| 3.3.7 | Výskyt klíšťat v periurbánní a urbánní oblasti | 15 |
| 4 | Materiál a metody..... | 17 |
| 4.1 | Vzorky klíšťat..... | 17 |
| 4.2 | Homogenizace vzorků..... | 17 |
| 4.3 | Izolace RNA | 18 |
| 4.4 | Reverzní transkripce..... | 18 |
| 4.5 | Polymerázová řetězová reakce | 19 |
| 4.6 | Separace PCR produktu gelovou elektroforézou | 20 |
| 4.7 | Extrakce z gelu | 20 |
| 4.8 | Purifikace PCR produktů | 20 |
| 4.9 | Sekvenace a zpracování sekvencí | 21 |
| 5 | Výsledky..... | 22 |
| 5.1 | Aktivita klíšťat | 22 |
| 5.2 | Detekce viru klíšťové encefalitidy | 24 |
| 6 | Diskuse | 28 |
| 7 | Závěr..... | 31 |
| 8 | Seznam použité literatury | 32 |

Seznam použitých zkratek

| | |
|--------|---|
| cDNA | „complementary deoxyribonucleic acid“ - komplementární vlákno DNA syntetizované podle RNA |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| dNTP | deoxynukleotid trifosfát |
| KE | klíšťová encefalitida |
| pb | párů bází |
| PCR | „polymerase chain reaction“ - polymerázová řetězová reakce |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| RT-PCR | reverzní transkriptázová – polymerázová řetězová reakce |
| VKE | virus klíšťové encefalitidy |

1 Úvod

Parazitismus je životní strategie jednoho organismu žijícího na úkor organismu jiného. Řada parazitů, zejména hematofágních, má i schopnost přenášet na hostitelský organismus další parazity - viry, bakterie, prvoky (Labuda, 1979).

Zoonózy jsou onemocnění, která jsou přenášena z obratlovce na člověka (Hubálek, 2003). Mezi zoonózy patří řada medicínsky velmi významných onemocnění jako mor, horečka West Nile, lymeská borelióza a další. Zoonózy jsou významným zdravotním problémem v mnoha zemích světa, včetně těch rozvinutých. Jejich rozšíření ovlivňují změny prostředí, ale také politické, sociální a kulturní faktory (změny v zemědělství, využívání půdy, trávení volného času, ...). Řada zoonóz patří mezi tzv. emergentní nákazy - nákazy, které se objevují zcela nově, v nových oblastech nebo v nových souvislostech (Kruse et al., 2004; Chomel et al., 2007).

Arboviry (z anglického „**arthropode-borne virus**“) jsou viry přenášené členovci na obratlovce. Nejčastějšími přenašeči arbovirů jsou komáři nebo klíšťata (Nuttall et al., 1994; Gritsun et al., 2003). Původce arboviróz najdeme mimo jiné mezi zástupci čeledí *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* a *Reoviridae* (WHO, 2004).

Klíšťová encefalitida (KE) je klíšťaty přenášena, emergentní zoonóza, jejímž původcem je arbovirus – virus klíšťové encefalidity. KE patří spolu s lymeskou boreliózou k nejvýznamnějším klíšťaty přenášeným onemocněním člověka (WHO, 2004).

2 Hlavní cíle práce

1. vypracování literární rešerše k tématu, se zaměřením na klíšťata, jimi přenášené nákazy a jejich výskyt v urbánních a periurbánních oblastech
2. stanovení prevalence viru klíšťové encefalitidy v klíšťatech pocházejících z českobudějovického lesoparku
3. porovnání nukleotidových sekvencí získaných z pozitivních vzorků se sekvencemi dalších kmenů z jihočeského kraje a s dostupnými sekvencemi v nukleotidových databázích
4. vyhodnocení a interpretace výsledků vzhledem k epidemiologické významnosti urbánních biotopů klíšťat

3 Literární přehled

3.1 Klíšťata a klíšťáci

Klíšťata a klíšťáci se taxonomicky řadí do kmene *Arthropoda* (členovci), podkmene *Chelicerata* (klepítkatci), třídy *Arachnida* (pavoukovci), řádu *Acari* (*Acarina*) (roztoči), podřádu *Ixodida* (klíšťata) (Sedlák, 2005). Klíšťata se dále rozlišují na tři čeledi: klíšťáci (*Argasidae*, tzv. „soft ticks“), klíšťata (*Ixodidae*, „hard ticks“) a *Nuttalliellidae* (Horak et al. 2002).

3.1.1 Klíšťáci

3.1.1.1 Obecná charakteristika

Klíšťáci (*Argasidae*) nemají výrazný chitinový štít jako klíšťata (proto anglické označení „soft ticks“) (Kimmig et al., 2003). Hlavička spolu s ústním aparátem je ukryta na břišní straně těla. Z vajíček se líhnou larvy, které sají na svém hostiteli řadu hodin až několik dnů. Po larválním stádiu následují 3-4 stádia nymfální. Všechna stádia mohou sát krev opakovaně. Mezi medicínsky a veterinárně významné rody patří zejména rody *Argas* a *Ornithodoros* (Stejskal, 1995; Volf et al., 2007). Do čeledi *Argasidae* patří i další, méně významné rody jako *Carios* nebo *Otobius* (Horak et al., 2002).

3.1.1.2 Rod *Argas*

V Evropě patří k významným zástupcům rodu *Argas* klíšťák holubí (*Argas reflexus*) (Kimmig, 2003). Ze Středomoří a Blízkého východu se rozšířil do měst střední Evropy, kde napadá holuby (*Columba livia*, *C. livia domestica*), ale může též napadnout člověka, do jehož příbytku je schopen se dostat z holubích hnízd okny, šachtami nebo ventilací (Dautel a Kahl, 1999). Sání *A. reflexus* může způsobit vážnou alergickou reakci, která může vést až k anafylaktickému šoku (Khoury a Maroli, 2004; Spiewak et al., 2006).

3.1.1.3 Rod *Ornithodoros*

Rod *Ornithodoros* je rozšířen v mnoha zemích světa (Afrika, USA, Kanada). V tropech se vyskytuje zástupce *Ornithodoros moubata*, důležitý vektor borélií způsobujících návratné horečky (Kimmig, 2003).

3.1.2 Klíšťata

3.1.2.1 Obecná charakteristika

Klíšťata čeledi *Ixodidae* mají na dorzální straně těla pevný chitinový štít (*scutum*), který slouží jako mechanická ochrana proti poškození. U samců pokrývá celé tělo, u samic přibližně polovinu těla. Ústní aparát směřuje dopředu, proto je dobře viditelný i při pohledu shora. Klíšťata procházejí třemi vývojovými stádii. Z vajíčka se vylíhne šestinohá larva, ta se po nasátí mění v osminohou nymfu, a z ní se po dalším sání vyvine pohlavně zralý jedinec. Klíšťata sají v každém stádiu pouze jednou. Čeleď *Ixodidae* zahrnuje řadu medicínsky i veterinárně významných rodů, jako například *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma* či *Hyalomma* (Kimmig, 2003).

3.1.2.2 *Ixodes ricinus*

Klíště *Ixodes ricinus* je v Evropě klíštětem nejčastěji infestujícím člověka, a proto je také významným vektorem mnoha humánních patogenů (původců klíšťové encefalitidy, lymeské boreliózy, tularémie, anaplazmózy, ...).

Klíšťata rodu *Ixodes* procházejí třemi vývojovými stádii (larva->nymfa->dospělec). Vývoj každého stádia trvá přibližně rok, takže celý vývojový cyklus klíště dokončí přibližně za tři až šest let, v závislosti na podmínkách prostředí (Volf et al., 2007; Kimmig et al., 2003). Klíšťata tohoto rodu se dají označit jako tříhostitelská. Každé stádium po nasátí opouští hostitele, svléká se a následně číhá na hostitele příštího (Volf et al., 2007; Randolph et al.,

2008). Larvy sají především na lesních hlodavcích (*Apodemus* sp., *Microtus* sp., *Myodes glareolus*, ...), jezcích, krtcích, ale i na ještěrkách (Labuda, 1979; Volf et al., 2007). Nymfy sají na podobných hostitelích jako larvy, ale vyhledávají i ptáky (*Turdus merula*, *T. philomelos*) (Matuschka et al., 1991; Dautel a Kahl, 1999; Gregoire et al., 2002; Weidmann et al., 2006; Waldenström et al., 2007). Samice sají na větších obratlovcích, jako jsou jeleni, srny, divoká prasata, skot, kozy a ovce (Labuda, 1979). Samci tohoto rodu krev nesají. Člověk může být hostitelem pro všechna vývojová stádia (Hubálek et al., 2004).

Podle vztahu k hostiteli lze zástupce rodu *Ixodes* rozdělit na specialisty jako například *I. hexagonus*, který saje téměř výhradně na jezcích, a generalisty, jako je *I. ricinus* či *I. scapularis* (Kimmig, 2003). Hostitelská specifita má významné důsledky pro cirkulaci patogenů. Klíšťata specializovaná pouze na určitý druh volně žijícího hostitele nepředstavují pro člověka přímý zdroj infekce, ale podílejí se na enzootické cirkulaci patogenu v přírodě. Na člověka je pak patogen přenesen klíšťetem, které může sát jak na hostitelích kompetentních k přenosu daného patogenu, tak na člověku. Tato klíšťata se označují jako tzv. „bridge vector“ (Oliver et al., 2003; Bown et al., 2006).

3.1.2.3 Faktory prostředí

Klíšťata jsou ovlivňována abiotickými (teplota, vlhkost) a biotickými (vegetace, dostupnost hostitelů) podmínkami prostředí. Tyto podmínky pak ovlivňují geografickou distribuci klíšťat (Gritsun et al., 2003). Rychlost vývoje závisí na teplotě, všechna klíšťata jsou vysoce citlivá vůči vlhkostnímu stresu (Perret et al., 2004; Randolph et al., 2002, 2008). Klíšťata jsou vázána zejména na prostředí listnatých a smíšených lesů, které jim poskytuje dostatečnou ochranu před vysycháním. Ze stejného důvodu jsou travní porosty klíšťaty vyhledávané méně (Boyard et al., 2008). Klimatické podmínky ovlivňují jak celkovou denzitu klíšťecích populací, tak jejich aktuální aktivitu (Gern, 2008). Sezónní aktivita klíšťat začíná na jaře, když teplota překročí hranici cca 7 °C (Süss et al., 2008). Při číhání na hostitele je klíšťe vystaveno různým klimatickým podmínkám. Zejména v letních měsících se vzdušná vlhkost dostává pod kritickou hranici. Klíšťe pak opouští místo na číhání na vrcholcích nízké vegetace a přemístí se do zóny opadu, kde dochází k rehydrataci. Se vzdušnou vlhkostí koreluje i výskyt larev na hlodavcích (Randolph a Storey, 1999; Randolph et al., 2002; Perret et al., 2004).

3.1.2.4 *Adaptace k parazitismu*

K zachycení mechanických, tepelných a chemických podnětů pro vyhledání hostitele jsou klíšťata vybavena smyslovými orgány, jako je např. Hallerův orgán, nacházející se na tarzálních člancích předních končetin (Volf et al., 2007). Přítomnost svého hostitele klíšťe pozná podle otřesů půdy, vydechovaného oxidu uhličitého a vyzařovaného tepla. Po zachycení na hostitele vyhledá klíšťe pomocí pedipalp vhodné místo k sání. Nalezení tohoto místa může trvat i celé hodiny. K proniknutí do pokožky hostitele slouží chelicery, pro následné sání chitinem vyztužený hypostom a opatřený zpětnými háčky. Klíšťe před sáním inokuluje do rány sliny obsahující molekuly s anestetickými, antikoagulačními a imunomodulačními účinky (Süss, 2003; Kimmig, 2003). U některých druhů klíšťat může být fixace v kůži hostitele posílena ještě vyloučením speciální bílkovinné hmoty, „cementu“ (Volf et al., 2007). K základním morfologickým adaptacím na ektoparazitický způsob života patří i zploštělé tělo a výše zmíněná přítomnost *scuta*.

3.2 Nemoci přenášené klíšťaty

Klíšťata se jako krev-sající ektoparazité obratlovců často uplatňují jako přenašeči/veктоři patogenů, způsobujících onemocnění lidí i zvířat.

3.2.1 Bakteriální onemocnění

Jednou skupinou bakteriálních onemocnění přenášených klíšťaty jsou rickettsiózy, tedy onemocnění způsobená bakteriemi rodu *Rickettsia*. Rickettsie jsou intracelulární gramnegativní bakterie (Parola et al., 2005). Mnoho druhů bylo nalezeno a dáváno do souvislosti s onemocněním člověka, některé druhy byly izolovány pouze z klíšťat.

Původce středozevního skvrnitého tyfu, *Rickettsia conorii*, je přenášen klíšťetem rodu *Rhipicephalus*. Původce horečky Skalistých hor, *R. rickettsii*, je přenášen zejména klíšťaty rodů *Dermacentor*, i když byl izolován i z klíšťat rodů *Amblyomma*, *Ixodes* či *Rhipicephalus* (Hassler, 2003). Rod *Dermacentor* je ve střední Evropě zastoupen zejména druhy *D.*

marginatus a *D. reticulatus*, kteří jsou vektory například *Rickettsia slovaca* (Parola a Raoult, 2001). Klíšťata rodu *Amblyomma* přenášejí v jižní Africe horečku „African tick bite fever“, jejímž původcem je *Rickettsia africae* (Parola a Raoult, 2001; Parola et al., 2005).

Původce Q-horečky, *Coxiella burnetii*, byl nalezen hned u několika druhů klíšťat. Klíšťata však zřejmě slouží hlavně jako přenašeči infekce mezi zvířaty, případně jako její rezervoáry. Na člověka se původci Q-horečky daleko častěji přenášejí inhalací infikovaného aerosolu při manipulaci s infikovanými zvířaty například na jatkách (Hassler, 2003).

Další skupinou onemocnění přenášených klíšťaty jsou ehrlichiozy. Ehrlichie jsou malé intracelulární gramnegativní bakterie. Některé žijí v granulocytech, jiné napadají monocyty. Lidská granulocytární anaplazmóza (dříve lidská granulocytární ehrlichioza) je přenášena klíšťaty rodu *Ixodes* a jejím původcem je *Anaplasma phagocytophilum*. Hlavním vektorem lidské monocytární ehrlichiozy (Hassler, 2003), způsobené bakterií *Ehrlichia chaffeensis*, jsou klíšťata rodu *Amblyomma* (Parola a Raoult, 2001; Hassler, 2003). Zástupci rodu *Rhipicephalus* jsou přenašeči *E. canis* (Dautel a Kahl, 1999).

Původcem tularémie je oblá, gramnegativní bakterie *Francisella tularensis*. Přenos tularémie na člověka může být způsoben přímým kontaktem s infikovaným zvířetem, ovšem možný je i přenos při sání klíštěte. Vektory *F. tularensis* jsou převážně klíšťata rodu *Dermacentor*, vzácněji rodu *Ixodes* (Kredba et al., 1970; Petersen et al., 2009).

Borrelie vyvolávající návratnou horečku jsou blízce příbuzné původci lymeské boreliózy. Vektory jsou zejména klíšťáci čeledi *Argasidae* (Hassler, 2003).

Vektory lymeské boreliózy jsou klíšťata rodu *Ixodes*. V Evropě *I. ricinus*, v Americe *I. scapularis* a *I. pacificus*, v Asii a východní Evropě *I. persulcatus*. Spirochéty lymeské boreliózy patří do komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Pro člověka jsou prokazatelně patogenní tři genomové druhy: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* a *B. afzelii*. Hlavními hostiteli *Borrelia burgdorferi* jsou drobní obratlovci, plazi a ptáci (Tilly et al., 2008).

3.2.2 Protozoární nákazy

3.2.2.1 Babesióza

Babesie patří mezi jednobuněčné parazity žijící uvnitř erytrocytů (protozoony). Na člověka jsou přenášeny klíšťaty rodu *Ixodes*, vektory onemocnění zvířat jsou rody *Boophilus*, *Dermacentor* a *Rhipicephalus* (Hassler, 2003).

3.2.2.2 Theilerióza

Theilerie jsou řazeny mezi parazity lymfocytů a erytrocytů obratlovců. Nejvýznamnějším zástupcem je *Theileria parva*, původce východoafrické pobřežní horečky skotu. Napadá především skot, ale i zebu a buvolu ve východní a střední Africe. Vektory onemocnění jsou klíšťata rodu *Rhipicephalus* (Volf et al., 2007).

3.2.3 Onemocnění virového původu

Klíšťata přenášejí viry patřící do několika různých čeledí (*Bunyviridae*, *Reoviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*,...) (Hassler, 2003).

Skotská klíšťová encefalitida postihuje ovce ve Velké Británii, Španělsku, Turecku a kozy v Řecku (Charrel et al., 2004; Gritsun et al., 2003). Postihuje ale i ptáky a člověka. Původcem je virus vrtivky („louping ill virus“), flavivirus blízce příbuzný viru klíšťové encefalitidy (Grard et al., 2007). Virus je přenášen výhradně klíšťaty rodu *Ixodes* (Hassler, 2003). Hlavními hostiteli jsou ovce a bělokur skotský (*Lagopus lagopus scoticus*), u kterých způsobuje smrtelnou encefalomyelitidu (Gritsun et al., 2003).

Hostitelé dalšího klíšťaty přenášeného flaviviru, viru omské hemoragické horečky, jsou většinou vodní hlodavci (ondatry, hryzci) a přenašeči klíšťata rodů *Dermacentor* a *Ixodes*. Průběh je u různých zvířat rozdílný. U myši a křečků způsobuje smrtelnou encefalitidu, cibetka nebo člověk jsou zasaženi hemoragickou horečkou (Hassler, 2003).

Hlavním vektorem flaviviru způsobujícího horečku Kjasanurského lesa je klíště *Haemaphysalis spinigera*. Onemocnění postihuje opice, člověka a drobné savce (Hassler, 2003).

Přenašeči konžsko-krymské hemoragické horečky jsou klíšťata z rodu *Hyalomma* (Hassler, 2003). Nejdůležitějšími hostiteli jsou zajíci, virus ale napadá i pštrosy, zoborožce, špačkovité ptáky, skot. Člověk se může nakazit po přisátí klíštěte, při styku s krví nebo tkání nakaženého skotu, nebo při pití tepelně neupraveného mléka nakaženého skotu (Charrel et al., 2004).

Virus způsobující coloradskou klíšťovou horečku patří do čeledi *Orbiviridae* a je přenášen klíšťaty rodů *Dermacentor* a *Haemaphysalis* (Kapikian a Shope, 1996; Hassler, 2003).

Jedním z medicínsky nejvýznamnějších klíšťaty přenášených virů je virus klíšťové encefalidity (VKE) (Gritsun et al., 2003).

3.3 Klíšťová encefalitida

Klíšťová encefalitida je jedním z nejnebezpečnějších onemocnění centrálního nervového systému v Evropě a Asii. Je způsobena virem klíšťové encefalidity, jenž byl poprvé objeven v roce 1937 během expedice do východního Ruska vedené Lvem Zilbrem, který pátral po původci akutního onemocnění spojeného s napadením klíštětem (Gritsun et al., 2003).

3.3.1 Taxonomické zařazení

Virus klíšťové encefalidity (VKE) patří do čeledi *Flaviviridae*, rodu *Flavivirus* (Gritsun et al., 2003, Robertson et al., 2009). Flaviviry se dají dělit na viry přenášené klíšťaty, viry přenášené komáry (např. viry encefalidity St. Louis, Japonské encefalidity, žluté zimnice, West Nile, Dengue) a viry s neznámým přenašečem (např. viry Yokose, Apoi, Rio Bravo) (Charrel et al., 2004; Schmaljohn a McClain, 1996).

Klíšťaty přenášené flaviviry jsou dále členěny na viry napadající převážně savce a viry napadající mořské ptáky (např. viry Kadam, Meaban, Saumarez reef, Tyuleniy) (Gaunt et al., 2001; ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4). Virus klíšťové encefalidity (VKE) patří například společně s viry skotské klíšťové encefalidity, Langat, Powassan, virem omské hemoragické horečky a virem horečky kjasanurského lesa mezi viry napadající savce (Gritsun et al., 2003).

VKE zahrnuje tři subtypy. Dálně-východní subtyp viru a sibiřský subtyp viru jsou přenášené klíštětem *Ixodes persulcatus*, evropský subtyp klíštětem *I. ricinus*. Virus klíšťové encefalidity je nejvíce geneticky příbuzný viru skotské klíšťové encefalidity. Také spolu sdílejí stejné vektory, ale liší se geografickým rozšířením, ekologií a mírou patogenity (Gritsun et al., 2003; Grard et al., 2007).

3.3.2 Přenos viru klíšťové encefalidity

Virus klíšťové encefalidity je arbovirus, což znamená, že je přenášen členovci (v tomto případě klíšťaty rodu *Ixodes*), v nichž se i množí. Virus se do těla klíštěte dostane nasáním krve infikovaného obratlovce.

V první fázi se VKE dostává do střeva klíštěte, kde infikuje střevní buňky, poté proniká do slinných žláz. Obratlovce infikuje klíště prostřednictvím viru inokulovaného spolu se slinami. Zároveň může dojít i k infekci dalších klíšťat sajících na stejném hostiteli mechanismem tzv. „co-feedingu“ (Labuda et al., 1996; Nuttall et al., 1994). Tento způsob přenosu je umožněn tím, že se VKE ihned po vstupu do kůže obratlovce replikuje v místě sání klíštěte a díky migraci infikovaných leukocytů se nakazí i další klíšťata sající v blízkém okolí. Tato cesta přenosu se označuje jako přenos neviremický (Labuda et al., 1996). Klasickou cestou horizontálního přenosu je nasátí viru s krví hostitele ve viremické fázi. K infekci klíštěte virem může dojít i vertikálně, prostřednictvím transovariálního přenosu (Danielová a Holubová, 1991), kdy jsou patogeny přeneseny ze samice na vyvíjející se vajíčka. Klíště nakažené v kterémkoli stádiu zůstává infikované po celý život. Přežívání viru v klíštěti během metamorfózy se někdy označuje jako přenos transstadiální (Allan et al., 2010).

3.3.3 Cyklus viru klíšťové encefalidity v přírodě

V přírodě cirkuluje virus klíšťové encefalidity v přírodních ohniscích infekce, jejichž velikost může dosahovat od několika čtverečních metrů až po mnoho kilometrů (Süss, 2003).

Cirkulace se odehrává v tzv. „parazitickém trojúhelníku“ interakcí mezi virem, vektorem a obratlovčím hostitelem (Nuttall, 1999). Hlavními vektory viru klíšťové encefalidity (VKE) jsou klíšťata rodu *Ixodes*, ve kterých dochází k množení viru, a která jsou infikována perzistentně (Süss, 2003).

Süss (2003) rozděluje potenciální obratlovčí hostitele VKE do tří skupin. Na rezervoárové hostitele, kteří umožňují rychlé pomnožení viru, infekce u nich probíhá typicky bezpříznakově a sami se rychle množí. Příkladem jsou drobní hlodavci: myšice křovinná (*Apodemus sylvaticus*), myšice lesní (*A. flavicollis*), hraboš polní (*Microtus arvalis*), případně normík rudý (*Myodes glareolus*) a hmyzožravci: rejsek obecný (*Sorex araneus*), bělozubka tmavá (*Crocidura russula*), ježek západní (*Erinaceus europaeus*), krtek obecný (*Talpa europea*) (Boyard et al., 2008; Süss, 2003).

Indikátoroví hostitelé působí na cirkulaci viru nepřímo tím, že poskytují zdroj potravy pro populace klíšťat, ovšem jejich podíl na samotné cirkulaci viru je vzhledem ke krátké virémii a nízkému titru minimální. Příkladem indikátorových hostitelů mohou být v případě VKE srnec, jeleni, daňci, lišky nebo netopýři (Süss, 2003).

Náhodní hostitelé mohou být nakaženi, může se u nich rozvinout virémie, ale neúčastní se cirkulace viru a ani nejsou významným zdrojem potravy pro klíšťata (Süss, 2003).

3.3.4 Epidemiologie

První klinický popis průběhu klíšťové encefalidity (KE) pochází od rakouského lékaře H. Schneidera z roku 1931 (Banzhoff et al., 2008).

Výskyt klinických případů KE se od roku 1970 zvýšil ve většině dlouhodobých ohnisek výskytu a byla také zaznamenána ohniska nová. V letech 1990-2000 bylo

zaznamenáno výrazné zvýšení počtu pacientů infikovaných KE zejména v Německu a Pobaltských zemích (Banzhoff et al., 2008).

Vzestup počtu případů klíšťaty přenášených onemocnění v oblastech severní polokoule je dáván do souvislosti se změnami klimatickými i socioekonomickými. Například změny ve využívání půdy (zalesňování, fragmentace krajiny) přispěly ke zvýšení početních stavů populací vysoké zvěře, přirozených hostitelů klíšťat (Boyard et al., 2008).

Sezónní maximum počtu případů KE se shoduje se sezónním vrcholem aktivity klíšťat, který nastává u *I. ricinus* mezi květnem a červnem a mezi zářím a říjnem (Grešíková a Kaluzová, 1997). *I. persulcatus* má jen jeden vrchol sezónní aktivity, a to mezi květnem a červnem (Gritsun et al., 2003). Člověk se může nakazit přímo od přisátého klíštěte nebo vzácněji požitím tepelně nezpracovaného kravského nebo kozího mléka nakažených zvířat (Kříž et al., 2009).

Očkováním lze infekci klíšťovou encefalitidou účinně předcházet. Očkování je určeno pro lidi žijící v endemických oblastech nebo tyto oblasti navštěvující. Distribuce ohnisek výskytu onemocnění je mozaikovitá a podléhá meziročním i sezónním změnám (Süss, 2003).

3.3.5 Patogeneze

Virus klíšťové encefalitidy se do těla hostitele dostane typicky během sání klíštěte (Braun, 2003). Následuje 7-14 dní inkubační doby onemocnění, během níž se již mohou vyskytovat časná symptomy, jako je bolest šíje, ramen a beder. KE je dvojfázové onemocnění. První fáze je typická chřipce podobnými příznaky (zvýšená teplota, pocit na zvracení, bolest svalů) a trvá 1-2 týdny. Po první fázi se u 20-30 % pacientů rozvine fáze druhá, která se obecně projevuje jako onemocnění centrálního nervového systému s projevy od slabé meningitidy až po těžkou encefalitidu s myelitidou a parézami (Gritsun et al., 2003). Úmrtnost v Evropě činí < 1 % (Charrel et al., 2004).

Po inokulaci klíštětem napadá virus endotelové buňky cév a Langerhansovy buňky. Dále se pak lymfatickým systémem šíří do mízních uzlin, kde se dále množí. Po pomnožení napadá další orgány, především játra, slezinu a kostní dřeň. V tomto stádiu koluje virus krevním řečištěm a nakonec proniká přes hematoencefalickou bariéru i do centrální nervové

soustavy, kde může způsobovat rozsáhlé léze na šedé hmotě prodloužené míchy, mozkovém kmeni, mozečku a míše (Braun, 2003; Haglund a Günther, 2003).

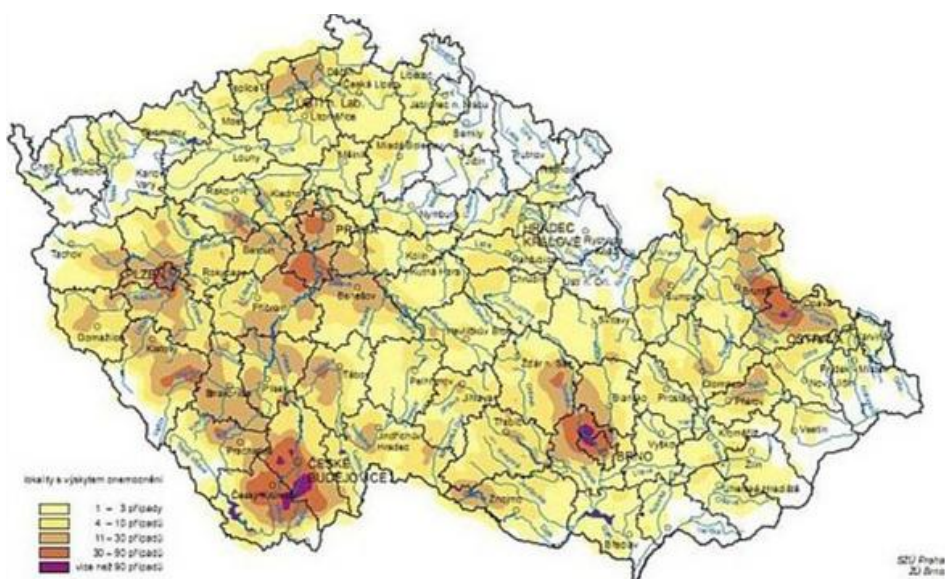
Onemocnění KE může mít řadu forem. Horečnatá forma nemá neurologické příznaky a také u ní zřejmě nedochází k poškození centrální nervové soustavy. Meningeální forma je nejvíce rozšířená. Projevuje se úpornými bolestmi hlavy, pocitem na zvracení, častým zvracením a také bolestí očí. Meningo-encefalitická forma poškozuje centrální nervovou soustavu, pacienti jsou unavení, ospalí a někdy mohou upadat do bezvědomí. Symptomy zahrnují stahy svalů, zpomalenou srdeční činnost, malátnost, svalový třes, případně krvácení žaludku. Polymyelitická forma je dvoufázová, první fáze trvá 3-7 dní a je provázána bolestmi hlavy, zvýšenou teplotou, zvracením a bolestí svalů. Při druhé fázi se zvyšuje teplota, dochází k poškození nervové soustavy, ale zotavení je stále možné. Chronická forma byla popsána u pacientů v Rusku zejména v oblasti Sibíře a bývá spojována se sibiřským subtypem viru. Symptomy u této formy onemocnění mohou trvat měsíce až roky (Gritsun et al., 2003).

3.3.6 Klíšťová encefalitida na území České republiky

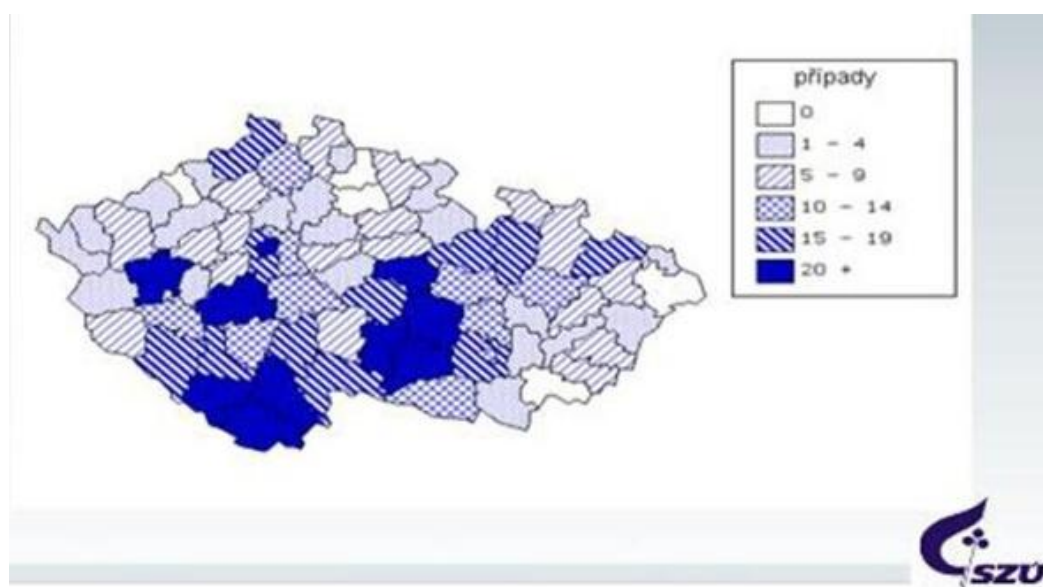
V jarních měsících roku 1948 lékaři F. Gallia a J. Rampas izolovali neznámý virus z krve a mozku pacientů, u kterých byly zaznamenány urputné bolesti hlavy, a kteří následně neznámé infekci podlehli. Později bylo zjištěno, že neznámý patogen je virus příbuzný viru klíšťové encefalitidy a že přenašečem je klíště *Ixodes ricinus* (Labuda, 1979). Jednalo se o první izolaci viru klíšťové encefalitidy ve střední Evropě (Kříž a Beneš, 2007).

V současné době patří v České republice mezi regiony s dlouhodobě nejvyšším výskytem klíšťové encefalitidy (KE) jižní a západní Čechy, střední Čechy, Brněnsko, Znojensko a Ostravsko (Obr. 1, 2) (Kříž a Beneš, 2007).

V roce 2006 byl v České republice zaznamenán rekordní počet případů KE – 1029. Tento extrémně vysoký výskyt nákazy je vysvětlován klimatickými podmínkami panujícími v letech 2005-2006, které byly příznivé pro vývoj a přežívání klíšťat. Dalším důvodem byla nastupující změna v životním stylu. Lidé začali více podnikat výlety do přírody, provozovat jiné outdoorové aktivity, a tak byli více vystaveni infikovaným klíšťatům (Kříž et al., 2009).



Obr. 1: Incidence klíšťové encefalidity u obyvatel České republiky za období 1971-2007 (Státní zdravotní ústav Praha)



Obr. 2: Klíšťová encefalitida podle okresu pravděpodobné infekce v roce 2009, zdroj dat: EPIDAT (Státní zdravotní ústav Praha)

3.3.7 Výskyt klíšťat v periurbánní a urbánní oblasti

Urbanizace dramaticky pozměňuje ráz krajiny, často významně pozměňuje druhové složení fauny a flóry, mění mezidruhové vztahy. Tyto změny se týkají i druhů patogenních, případně potenciálně patogenních pro člověka. Urbanizace vede typicky ke snížení diverzity původních, volně žijících druhů a nárůstu abundance druhů nejlépe adaptovaných na prostředí pozměněné urbanizačními procesy. Mezi typické mechanismy, které stojí za změnami v druhové diverzitě, jsou absence sezónních rytmů, celkově teplejší klima, vysoká dostupnost potravy apod. Změny v druhovém složení mohou mít dalekosáhlé následky pro dynamiku přenosu zoonotických patogenů (Bradley a Altizer, 2006). Riziko infekce člověka závisí na míře jeho kontaktu s infekčním agens (Randolph et al., 2002). Z podstaty věci je v urbánních a periurbánních oblastech vysoká frekvence pohybu člověka, pokud se v těchto oblastech vyskytují i patogenní organismy, je riziko infekce vysoké. To platí i pro klíšťaty a jinými vektory přenášené nákazy.

Schopnost klíšťat přežívat v urbánních a periurbánních oblastech je ovlivněna zejména dostupností hostitelů pro všechna vývojová stádia klíšťat a zachováním základních požadavků na mikroklimatické podmínky (teplota, vlhkost). Tyto podmínky bývají splněny ve formě drobných fragmentů městské zeleně – parků, hřbitovů, domovních zahrádek (Dautel a Kahl 1999; Uspensky, 2008). Agregovaný ostrůvkovitý výskyt má, mimo jiné, za následek zvýšení kontaktu mezi hostiteli a klíšťaty (Bradley a Altizer, 2006). Typicky vyšší teplota a vlhkost zase umožňují významné prodloužení sezónní aktivity klíšťat (Lindgren a Gustaffson, 2001; Dautel et al., 2008).

Hned několik druhů klíšťat s různorodými ekologickými nároky bylo schopno osídlit rozdílné lokality v urbánních oblastech centrální Evropy. Přítomnost *Argas reflexus*, *A. polonicus* a *A. vulgaris* je založena na vazbě klíšťat na jejich přirozené hostitele, zejména holuba skalního a jeho domestikované formy. Není důkaz o tom, že by tyto druhy ve střední Evropě přenášely patogeny člověka (Dautel a Kahl, 1999).

Klíště *Rhipicephalus sanguineus* se vyskytuje převážně v jižní Evropě, severní Africe a na Blízkém východě, odkud ovšem může být importováno (zejména na psech) i do střední a západní Evropy, kde pak může díky adaptaci na sušší teplé podnebí relativně dlouhodobě přežívat v domácnostech (Dautel a Kahl, 1999).

Dalším klíštětem, které lze nalézt v městských oblastech je *Ixodes hexagonus*. Jeho hlavními hostiteli jsou ježci, kteří se ve městech vyskytují v poměrně vysokých populačních denzitách. *I. hexagonus* bývá nacházen i na lasicovitých šelmách a liškách (Dautel a Kahl 1999). *I. hexagonus* byl prokázán coby přenašeč viru klíšťové encefalitidy a *Borrelia burgdorferi* s.l. (Křivanec et al., 1988; Gern et al., 1991).

Klíště *Ixodes ricinus* má poměrně vysoké nároky jak na teplotu a vlhkost, tak na hostitele. Vyskytuje se v oblastech městské zeleně, kde bývá i dostatek hostitelů pro nedospělá stádia klíšťat (ptáci, drobní hlodavci). Naopak velcí obratlovci, kteří bývají typickými hostiteli dospělých stádií klíšťat, se v centrech velkých měst vyskytují zřídka. Důležitou roli hrají pravděpodobně ježci nebo lišky (Dautel a Kahl, 1999). Jak bylo zmíněno výše, drobní hlodavci jsou důležitými hostiteli viru klíšťové encefalitidy. Existují i hypotézy o přenosu viru ptáky (Süss, 2003).

4 Materiál a metody

4.1 Vzorky klíšťat

Vzorky klíšťat byly sbírány pracovníky laboratoře v lesoparku Stromovka v Českých Budějovicích (GPS: 48°58'19.17"N, 14°27'13.57"E). Jedná se o rozsáhlý park (68 ha) s pravidelně sekanými trávníky a ostrůvkovitě roztroušenými keřovými a stromovými porosty. Park je ze tří stran obklopen městskou zástavbou, na západní stranu parku volně navazuje pole. Ve stromovém patře jsou zastoupeny zejména: lípa malolistá (*Tilia cordata*), dub letní (*Quercus robur*), buk lesní (*Fagus sylvatica*), javor klen (*Acer pseudoplatanus*), javor mléč (*A. platanoides*), břiza bělokorá (*Betula pendula*), borovice černá (*Pinus nigra*).

Z typických hostitelů klíšťat byli v oblasti zachyceni: veverka obecná (*Sciurus vulgaris*), ježek západní (*Erinaceus europaeus*), velké množství ptáků (*Turdus merula*, *Parus major*, *Phasianus colchicus*, ...). Ojedinele se do prostoru lesoparku dostávají srnci (*Capreolus capreolus*). Předpokládáme výskyt drobných hlodavců a hmyzožravců.

Klíšťata byla sbírána standardní metodou vlajkování (smýkání „vlajky“ z bílého flanelu po vegetaci). Sběry probíhaly opakovaně přibližně v měsíčních intervalech od dubna do srpna v letech 2009 a 2010, každý sběr trval 1 hodinu. Byla sbírána klíšťata *Ixodes ricinus* ve stadiu nymfy a dospělé. Aktivita jednotlivých stádií klíšťat byla vyjádřena jako počet jedinců za hodinu sběru (N/hod.). Nasbíraná klíšťata byla okamžitě transportována do laboratoře a uložena při -70 °C.

4.2 Homogenizace vzorků

V boxu s laminárním prouděním vzduchu (Telstar-Bioultra, třída II.) bylo do 1,5 ml mikrozkrumavek napipetováno po 400 µl 10% suspenze Chelex 100 Resin [10 g Chelex® 100 Resin (BioRad Laboratories, USA) + 200 ml pufru TE (10 ml 1M Tris + 2 ml 0,5 M EDTA do 1 l destilované vody)], přidáno jedno klíště a ocelová kulička. Homogenizace proběhla pomocí přístroje Tissue Lyzer® II (Qiagen) 2 minuty při frekvenci 30 Hz. Po vortexování a krátkém zcentrifugování bylo z jednotlivých vzorků odebráno po 10 µl a byly vytvořeny směsné vzorky (pooly) vždy po 20 vzorcích z jednotlivých klíšťat. Vzorky byly dále skladovány při -70°C.

4.3 Izolace RNA

RNA byla izolována pomocí kitu QIAamp® Viral RNA (Qiagen) podle protokolu dodaného výrobcem. V kádince byl podle počtu vzorků připraven příslušný objem směsi pufru AVL a nosičové RNA v pufru AVL. 560 µl této směsi bylo přepipetováno do 1,5 ml mikrozkupek. Následně bylo přidáno 140 µl testovaného vzorku. Vzorek byl po 10 min. inkubaci při pokojové teplotě centrifugován (Eppendorf Mini Spin plus) 1 minutu, při 13 000 x g. Následně bylo přidáno 560 µl 98% ethanolu následovalo vortexování a centrifugace (1 min., 13 000 x g). Vzorek byl přenesen do izolační kolonky a centrifugován (1 min., 13 000 x g). Poté byla membrána promývána 500 µl pufru AW1 (centrifugace 1 min., 13 000 x g), následně 500 µl AW2 (centrifugace 3 min., 13000 x g) a zbavena zbytků etanolu další centrifugací 1 min., 13 000 x g. Pak bylo přidáno 120 µl pufru AVE. Po inkubaci při laboratorní teplotě 1 min., byl eluát zcentrifugován (1 min., 13 000 x g) do 1,5 ml mikrozkupek a skladován při -70°C.

4.4 Reverzní transkripce

Do 0,2 ml mikrozkupek bylo napipetováno po 2 µl příslušného „reverse“ primeru (E_R pro detekci, 1F nebo 2B pro sekvenování) (přehled použitých primerů uveden v Tab. 1) a po 8 µl izolované RNA. Do pozitivní kontroly bylo použito 2 µl RNA izolovaná z mozkové suspenze VKE kmene Hypr a 6 µl DEPC H₂O a do negativní kontroly pouze 8 µl DEPC H₂O.

Tab. 1: Přehled primerů používaných pro reverzní transkripci

| | sekvence (5' - 3') | pozice v genomu* |
|-------|-------------------------------|------------------|
| E_R | CCG TTG GAA GGT GTT CCA CT | 1 607 - 1 587 |
| 1F | AGC GGG TGT TTT TCC GAG TC | 11 141 - 11 122 |
| 2B | TTC GTT CCG TGT CCA CAG CGC A | 2 491 - 2 470 |

* číslování dle sekvence kmene Hypr (U39292)

Následovala denaturace 10 min. při 70°C. Mezitím byl připraven mastermix pro příslušný počet reakcí (rozpis pro jednu reakci: 5 µl 5x reakční pufr (Promega); 1,25 µl dNTP 10mM (Promega); 0,7 µl SUPERase-IN (20 U/µl); 1 µl M-MuLV reverzní transkriptáza (200 U/µl) (Promega); 7 µl DEPC H₂O (Fermentas)). Po denuraci bylo do každé mikrozkušavky napipetováno po 15 µl mastermixu. Syntéza cDNA probíhala v termálním cyklu (BIO-ER) při 37°C jednu hodinu, následovala inaktivace transkriptázy inkubací 10 min. při 70°C, poté byla teplota udržována na 14°C, dokud nebyly vzorky vyjmuty z cyklu. Syntetizovaná cDNA byla skladována při -70°C.

4.5 Polymerázová řetězová reakce

Pomocí polymerázové řetězové reakce byly amplifikovány fragmenty genu kódujícího virový protein E. Byl připraven mastermix pro daný počet reakcí. Konečné koncentrace v PCR reakci: PPP premix (75 mM Tris-HCl; pH 8,8; 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,01% Tween20; 2,5 mM MgCl₂; 200 µM, dATP; 200 µM CTP; 200 µM DTP; 200 µM dTTP; 2,5 U Taq purple DNA polymerázy); primer E_R (1A, 2A) (0,4 µM), primer E_F (1B,2B) (0,4 µM). Přehled použitých primerů uveden v Tab. 2. Celkový objem byl doplněn do 21 µl PCR H₂O. K mastermixu bylo přidáno po 4 µl cDNA. Pro detekci VKE byla použita cDNA připravená pomocí primeru E_R. Pro vlastní amplifikaci byl použit pár primerů E_R/E_F. Páry primerů 1A/1B a 2A/2B byly použity pro potvrzení pozitivních vzorků a přípravu templátu pro sekvenování.

Tab. 2: Přehled primerů používaných pro PCR

| | Polarita | sekvence (5' - 3') | Teplota nasedání | pozice v genomu* | velikost produktu |
|-------|---------------|-----------------------------------|------------------|------------------|-------------------|
| 1A | sense (F) | TGT CTA CGC TTC GCG TTG CAC ACA | 55 °C | 963-986 | 824 bp |
| 1B | antisense (R) | GGA ACC CCA GCG AGA GCC TTC AGT A | 55 °C | 1787-1763 | |
| 2A | sense (F) | CGT GTT GAA TTT GGG GCT CCT CAC G | 55 °C | 1693-1717 | 798 bp |
| 2B | antisense (R) | TTC GTT CCG TGT CCA CAG CGC A | 55 °C | 2491-2470 | |
| E (F) | sense (F) | GGG GAC YAC GAG GGT YAC CT | 55 °C | 1020-1040 | 587 bp |
| E (R) | antisense (R) | CCG TTG GAA GGT GTT CCA CT | 55 °C | 1607-1587 | |

* číslování dle sekvence kmene Hypr (U39292)

Amplifikace probíhala v termálním cykleru (BIO-ER) podle následujícího schématu:

1. denaturace 95°C/5min.
2. 30 opakovacích cyklů: a) denaturace 94°C/30 sec
b) nasedání primerů 55°C/30 sec
c) elongace 72°C/1 min.
3. konečná elongace 72°C/5 min.
4. udržovací teplota 14°C

4.6 Separace PCR produktu gelovou elektroforézou

K produktu PCR bylo přidáno po 4 µl nanášecího pufru (Fermentas) s 5x barvivem Sybr Green I (Amresco). Vzorky byly nanášeny na 1% případně na 1,7% agarózový-1x TAE gel s 10 µl 1 kb velikostního standardu (Fermentas). Elektroforetická separace probíhala 55 minut, při 110 V v prostředí pufru 1x TAE. Produkt byl vizualizován pod UV světlem.

4.7 Extrakce z gelu

Pro sekvenování elektroforézou separovaných PCR produktů byly proužky o odpovídající velikosti vyřezány z gelu čistým skalpelem a následně purifikovány pomocí komerčních kitů : GFX™ PCR DNA and gel band purification kit (GE Healthcare) nebo GEL EXTRACTION KIT QIAquick® (QIAGEN) přesně podle instrukcí výrobce.

4.8 Purifikace PCR produktů

Pro sekvenování byly použity i purifikované PCR produkty. Před purifikací byla provedena kontrola přítomnosti specifického amplifikovaného fragmentu elektroforézou (15 µl PCR produktu). Zbytek produktu (10 µl) byl purifikován pomocí QIAquick PCR Purification Kit® (QIAGEN) přesně podle instrukcí výrobce.

4.9 Sekvence a zpracování sekvencí

Fragmenty izolované z gelu případně purifikované PCR produkty byly analyzovány přímou sekvenční analýzou prováděnou na přístroji *ABI PRISM 3130xl* (Applied Biosystems) v Laboratoři genomiky, která je společnou laboratoří Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity a Biologického centra Akademie věd České republiky. Pro sekvenaci byly použity stejné primery jako pro syntézu PCR produktů. PCR produkty byly sekvenovány z obou stran, získané sekvence byly manuálně zkontrolovány v programu Sequence Scanner 1.0 (Applied Biosystems). Pomocí programu ContigExpress (Vector NTI Suite 5.5, Informax) byly fragmenty sekvencí spojeny. Následně byly pomocí Clustal W vytvořeny alignmenty se sekvencemi z databáze GenBank a provedena základní fylogenetická analýza v programu Mega 5.0 (Tamura et al., 2011).

5 Výsledky

5.1 Aktivita klíšťat

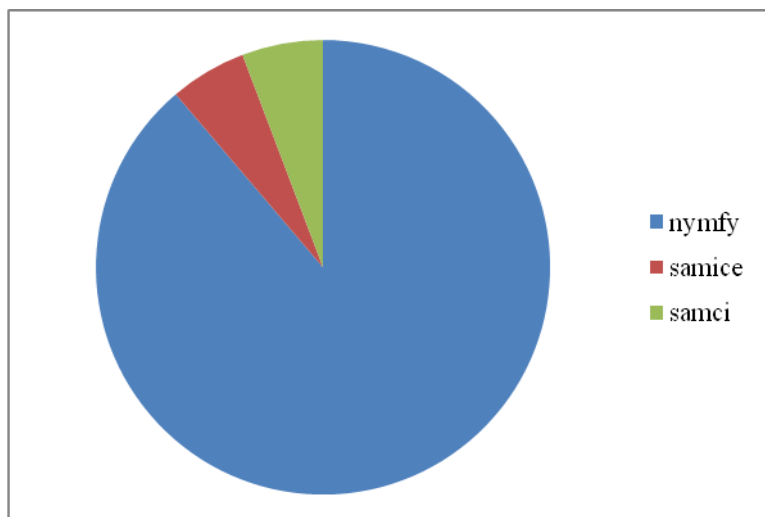
Celkově bylo nasbíráno 641 klíšťat (569 nymf, 35 samic a 37 samců), 361 v roce 2009 a 280 v roce 2010. Podrobné údaje jsou uvedeny v Tab. 3. V rámci sběru byla zachycena i larvální stádia *I. ricinus*. Počet larev nebyl vzhledem k jejich agregovanému výskytu stanovován.

Ve všech sběrech početně převažovaly nymfy nad dospělci, samci a samice byli zastoupeni přibližně stejně (Obr. 3). Nejvyšší aktivita *I. ricinus* byla zaznamenána v ostrůvkovitých porostech listnatých i jehličnatých stromů, naopak téměř nulová aktivita klíšťat byla zaznamenána na otevřené ploše udržovaných trávníků.

Tab. 3: Populační aktivita klíšťat (počet klíšťat za hodinu sběru)

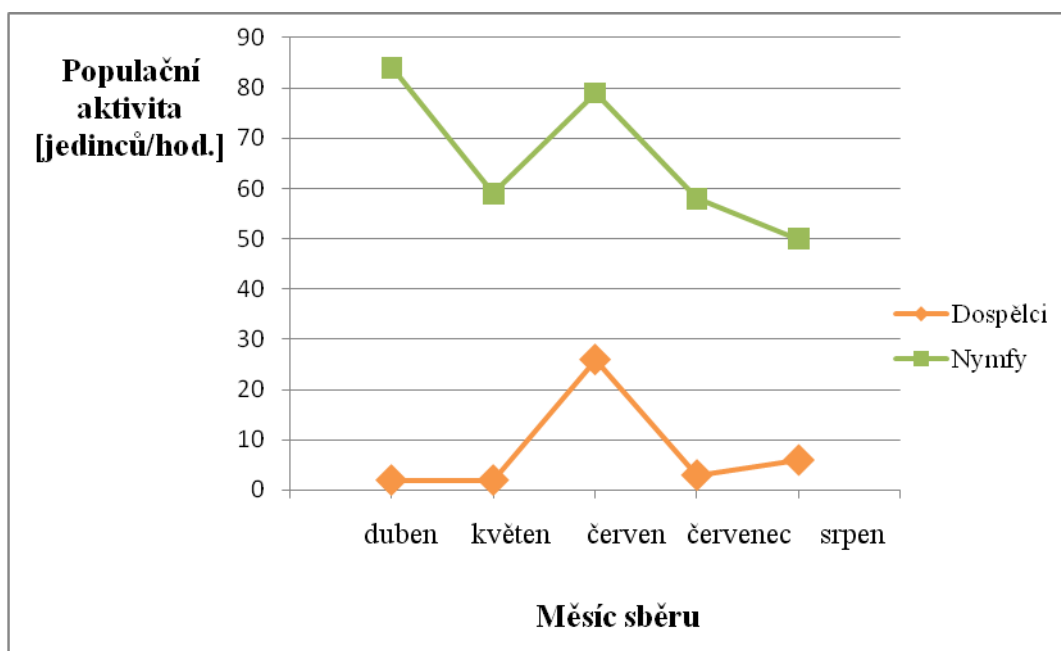
| | 2009 | | 2010 | |
|---------------|-----------|------------|-----------|------------|
| | dospělci | nymfy | dospělci | nymfy |
| duben | 2 | 84 | 7 | 41 |
| květen | 2 | 59 | 17 | 75 |
| červen | 26 | 79 | 3 | 60 |
| červenec | 3 | 58 | 1 | 37 |
| srpen | 6 | 50 | 5 | 44 |
| celkem | 39 | 322 | 33 | 247 |

* počet jedinců na 1 hodinu sběru

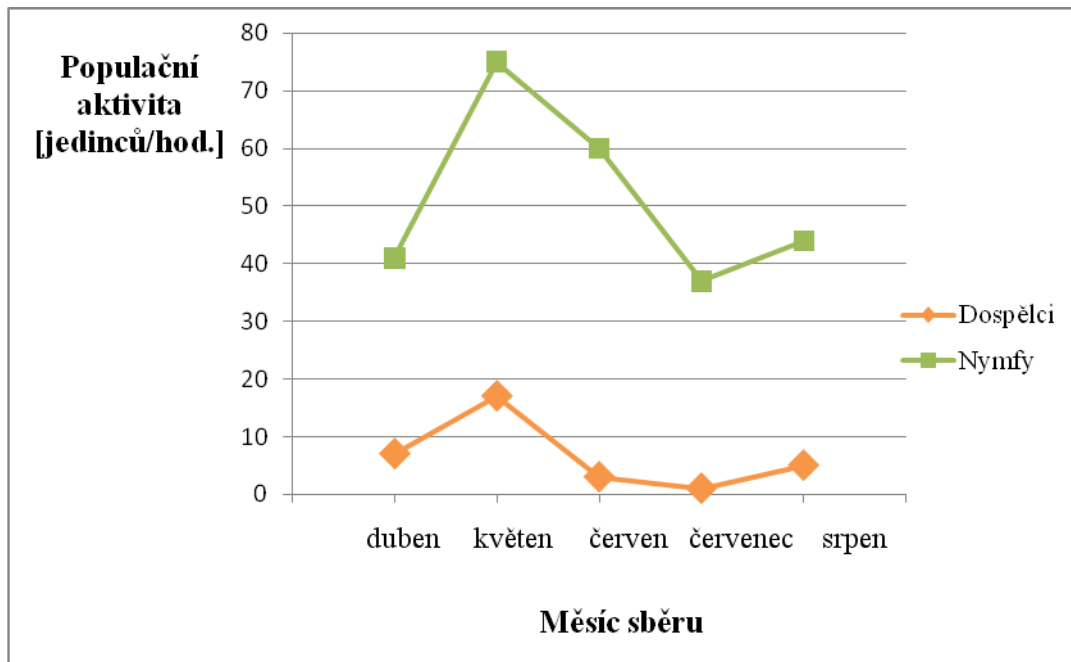


Obr. 3: Zastoupení vývojových stádií z celkově nasbíraných klíšťat

Maximální aktivita v roce 2009 byla u nymf zachycena hned v dubnu u dospělců až v květnu (Obr. 4). V roce 2010 dosáhla aktivita nymf i dospělců vrcholu v květnu (Obr. 5).



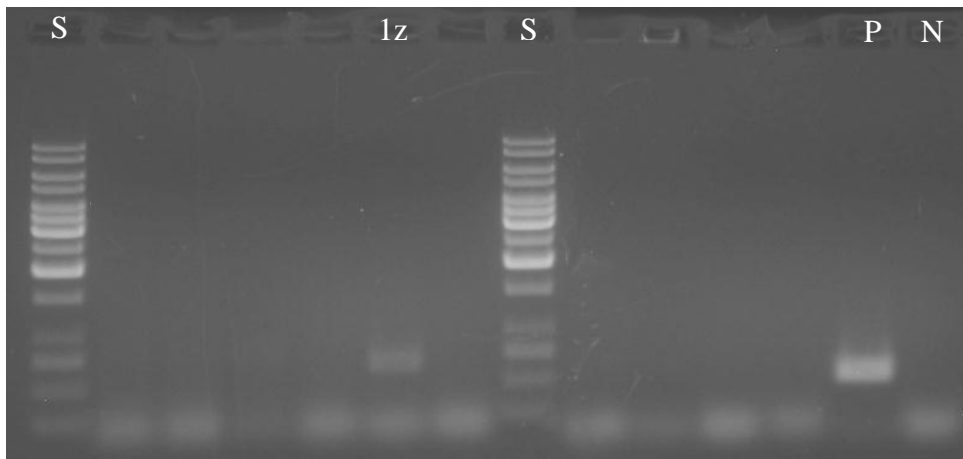
Obr. 4: Populační aktivita klíšťat v roce 2009



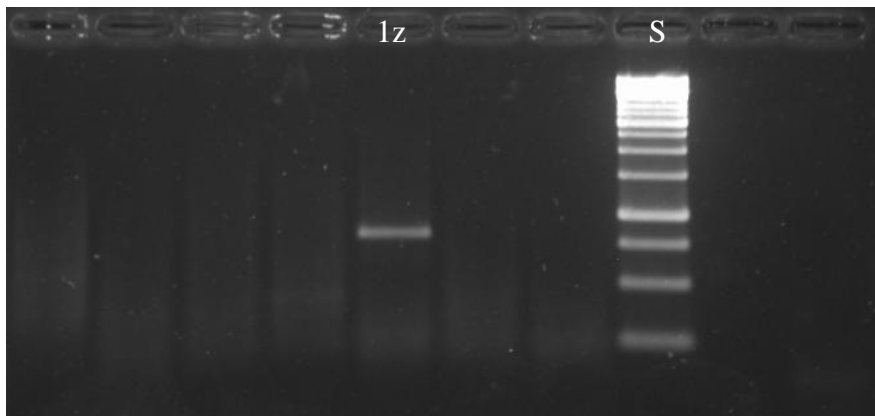
Obr. 5: Populační aktivita klíšťat v roce 2010

5.2 Detekce viru klíšťové encefalitidy

Na přítomnost viru klíšťové encefalitidy (VKE) bylo pomocí RT-PCR vyšetřeno celkem 641 klíšťat. Pozitivní byly tři směsné vzorky (1z, 13z a 22) (Obr. 6). Pozitivní výsledek byl u všech tří vzorků následně potvrzen PCR se dvěma dalšími dvojicemi primerů (1A/1B a 2A/2B) (Obr. 7). Minimální infikovanost tak dosáhla hodnoty 0,47 % (3 pozitivní z celkových 641 vyšetřených). Jednotlivé vzorky byly tvořeny směsí z 20 klíšťat. Vzorek 1z byl směsí 9 nymf, 8 samic a 3 samců, pocházejících z červnového sběru roku 2009. Na vzorek 13z bylo použito 20 nymf z července roku 2009 a vzorek 22 byl tvořen 20 nymfami sbíranými v květnu roku 2010.



Obr. 6: Příklad detekce viru klíšťové encefalidity pomocí PCR, vzorek 1z (primery Er/Ef); (S- standard 1kb; P-pozitivní kontrola; N-negativní kontrola; 1z-pozitivní vzorek)



Obr. 7: Příklad detekce viru klíšťové encefalidity pomocí PCR, vzorek 1z (primery 1A/1B); (S-standard; A2-126-pozitivní vzorek)

Ani jeden z pozitivních vzorků z parku Stromovka však nebyl přes opakované pokusy s různými koncentracemi templátu úspěšně osekvenován. Podařilo se však získat nukleotidovou sekvenci (1353 pb) části genu kódujícího protein E ze vzorku A2-126 (Obr. 8) pocházejícího z klíštěte z oblasti nedaleko Netolic. Tento vzorek měl původně sloužit ke srovnání sekvence s našimi pozitivními vzorky.

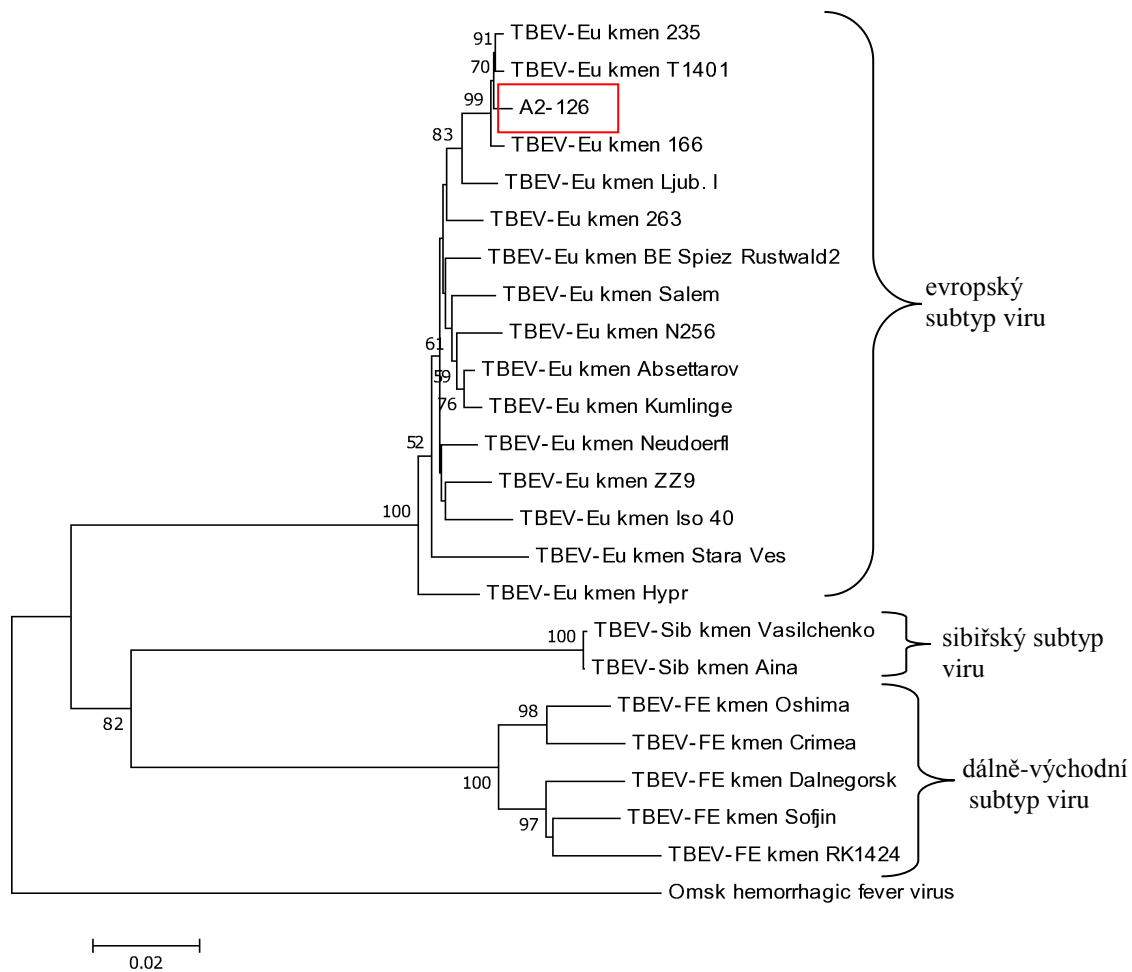
968

|
ACGCTTCGCGTTGCACACACTTGGAAAACAGGGACTTTGTGACTGGTACTCAGGG
GACCACGAGAGTCACCTTGGTGCTGGAACCTGGGTGGATGTGTTACTATAACAGCT
GAGGGGAAGCCTTCAATGGATGTGTGGCTTGACGCCATTTACCAGGAGAGCCCTG
CCAAGACACGTGAGTACTGCTTGCACGCCAAGTTGTCCGACACTAAGGTTGCAGC
CAGATGCCCAACGATGGGACCAGCTACTTTGGCTGAAGAACACCAGGGTGGCAC
AGTGTGTAAGAGAGATCAGAGTGATCGAGGCTGGGGCAACCACTGTGGACTGTT
TGAAAGGGTAGCATTGTGGCCTGTGTCAAGGCGGCTTGTGAGGCCAAAAAAGAA
AGCCACAGGACATGTGTACGACGCCAACAAAATAGTGTACACGGTCAAAGTCGA
ACCACACACGGGAGACTATGTTGCCGCAAACGAGACACATAGTGGGAGGAAGAC
GGCATCCTTCACAGTCTCTTCAGAGAAAACCATTCTGACTATGGGTGAGTATGGA
GATGTGTCCTTGTGTGCAGGGTTGCTAGTGGCGTTGACTTGGCCCAAACCTGTCAT
TCTTGAGCTTGACAAGACAGTGGAACACCTTCCAACGGCTTGGCAGGTCCACAGG
GACTGGTTCAATGATCTGGCTCTGCCGTGGAAACATGAGGGGAGCGCAAAACTGG
AATAACGCAGAAAGACTGGTTGAATTTGGGGCTCCTCACGCTGTCAAGATGGACG
TGTACAACCTCGGAGACCAGACTGGAGTGTTACTGAAGGCTCTCGCTGGGGTTCC
TGTGGCACACATTGAGGGAACCAAGTACCACCTGAAGAGTGGCCATGTGACCTG
CGAAGTGGGACTGGAAAAACTGAAGATGAAAGGTCTCACGTACACAATGTGTGA
CAAAACAAAGTTCACATGGAAGAGAGCTCCAACAGATAGTGGGCATGATACAGT
GGTCATGGAAGTCACATTCTCTGGAACAAAGCCCTGTAGGATCCCAGTCAGGGCA
GTGGCACATGGATCTCCAGATGTGAACGTGGCCACGCTGATAACGCCAAACCCA
ACAATTGAAAACAATGGAGGTGGCTTCATAGAGATGCAGCTGCCCCAGGGGAC
AACATCATCTATGTTGGGGAACCTGAGTCATCAATGGTTCCAAAAGGGGAGCAGC
ATCGGAAGGGTTTTTCAAAGACCAAGAAAGGCATAGAAAGACTGACAGTGATA
GGAGAGCACGCCTGGGACTTCGGTTCTGCTGGAGGCTTTCTGAGTTCAATTGGGA
AGGCGGTGCACACGGTCCTTGGTGGTGCTTTCAACAGCATCTTCG

|
2322

Obr. 8: Nukleotidová sekvence části genu kódujícího protein E u vzorku A2-126 (celkem 1353 pb, pozice 968-2321 (číslování dle kmene Hypr)

Sekvence byla porovnána s dostupnými sekvencemi v databázi NCBI GenBank, byl vytvořen mnohonásobný alignment, vypočítány evoluční vzdálenosti metodou „Maximum Composite Likelihood“ a zkonstruován fylogenetický strom pomocí metody „Neighbor Joining“ (Obr. 9). Podpora jednotlivých větvení („bootstrap test“, 1000 opakování) je uvedena pro hodnoty vyšší než 50. Vzorek A2-126 byl podle očekávání zařazen do skupiny kmenů VKE evropského subtypu.



Obr. 9: Fylogenetický strom sestavený na základě porovnání 1348 pb dlouhého úseku kódujícího virový protein E. Vzorku A2-126 označen červeným obdélníkem

6 Diskuse

Cílem této práce bylo stanovení prevalence původce klíšťové encefalitidy v klíšťatech z českobudějovického lesoparku. Klíšťová encefalitida je jedním z nejnebezpečnějších vektorů přenášených nemocnění člověka v Evropě a v mnoha částech Asie (Gritsun et al., 2003). Jedná se o nákazu typicky přírodně ohniskovou, cirkulující v přírodě mezi vektory a hostiteli. Člověk je náhodný hostitel, který se nakazí při vstupu do ohniska. Dále platí, že riziko nákazy člověka je závislé na míře jeho kontaktu s infikovanými vektory, tedy na aktivitě klíštěte, prevalenci patogenů v klíšťatech a aktivitě člověka v dané oblasti (Randolph 2001; Süss, 2003). V městských oblastech je aktivita člověka přirozeně vysoká, proto jsme se rozhodli zjistit, zda se v potenciálně vhodném městském biotopu vyskytují klíšťata a zda mohou být zdrojem nákazy člověka.

Z českobudějovického lesoparku Stromovka bylo získáno během dvou let 641 klíšťat nymfálních a dospělých stádií. Potvrzen byl i výskyt velkého množství larev. Výskyt nymf a dospělců by mohl být způsoben zanesením (larev nebo nymf) na hostitelích, ale výskyt larev potvrzuje, že se klíšťata v konkrétní oblasti množí a dlouhodobě přežívají - jedná se o stabilní místní populaci.

Nymfy byly zastoupeny přibližně 8 krát více než dospělci. Tento rozdíl vyplývá z přirozené mortality jednotlivých stádií, ale může se na něm podílet i složení hostitelské fauny. Každé stádium totiž preferuje jiného hostitele. Larvy preferují malé obratlovce (Matuschka et al., 1991; Weidmann et al., 2006), případně ptáky (Gregoire et al., 2002; Waldenström et al., 2007), kterých je v městském parku dostatek, zatímco nymfy a dospělci dávají přednost středním až velkým obratlovcům (Gern et al., 1997; Kiffner et al., 2011), kterých v parku není mnoho. Výskyt larev svědčí o tom, že hostitelé umožňující sání samic a případnou kopulaci, se v parku alespoň přechodně vyskytují.

Podstatně více klíšťat bylo sesbíráno ze zalesněných oblastí nebo s ostrůvky stromů. Obdobné výsledky byly získány v městských oblastech Bonnu (Maetzel et al., 2005). Výskyt klíšťat v urbánních oblastech je přímo spjatý s výskytem parků a lesoparků, kde jsou klíšťata zastoupena ve větších počtech než v centrech měst nebo sídlišť. Je to dáno tím, že v parcích, lesoparcích nebo zalesněných oblastech může klíště realizovat celý svůj životní cyklus (Pejchalová et al., 2007; Gäumann et al., 2010).

Přítomnost viru klíšťové encefalitidy byla pomocí RT-PCR zjištěna u tří směsných vzorků. Bohužel se žádný z pozitivních vzorků nepodařilo osekvenovat. Pozitivní výsledek byl ovšem potvrzen s dalšími dvěma nezávislými páry primerů, přičemž byly opět získány produkty o očekávané velikosti. Proto nepředpokládáme, že by se jednalo o nespecifickou amplifikaci. Byly použity různé metody pro přečištění PCR produktu a byly testovány i různé koncentrace templátu v sekvenační reakci. Příčinou byla nejspíše degradace nebo nízká kvalita templátové RNA. Možným řešením by bylo použít komerčně dostupné přípravky pro uchování izolované RNA.

V případě vzorku A2-126 byla získána 1348 pb dlouhá sekvence genu kódujícího virový protein E. Na základě fylogenetické analýzy byl tento vzorek zařazen podle očekávání mezi kmeny evropského subtypu, do blízkosti kmenů 235 a 166 pocházejících taktéž z oblasti jižních Čech (Křivanec et al., 1988; Růžek et al., 2006).

Minimální infikovanost klíšťat virem klíšťové encefalitidy dosáhla hodnoty 0,47 %. Minimální infikovanost (MIR - z anglického „minimum infection rate“) je výsledek vyšetření směsných vzorků více jedinců. Směsných vzorků se běžně používá v případech, kdy prevalence dosahuje tak nízkých hodnot, že pravděpodobnost výskytu více než jednoho pozitivního jedince ve vzorku je dostatečně nízká (Venette et al., 2002; Süss et al., 2004; Gäumann et al., 2010). MIR je tedy hodnota prevalenci blízká. Prevalence VKE v *Ixodes ricinus* se pohybuje mezi 0.2 až 3,4%. Proto je pravděpodobnost toho, že v pozitivním poolu je víc jak jedno klíště infikované, minimální.

Virus byl v klíšťatech detekován pomocí RT-PCR, která se běžně pro tyto účely používá (např. Kreil et al., 1997; Morozova et al., 2002; Rudenko et al., 2004). Výhodou této metody je rychlost, nízký detekční limit a ekonomičnost, nevýhodou je, že prokazuje pouze výskyt nukleové kyseliny. Nedostáváme tedy informaci o tom, zda byl virus živý, v jakém množství se v klíštěti vyskytoval nebo jak byl virulentní. Dalšími metodami pro detekci viru klíšťové encefalitidy jsou „real-time“ PCR (např. Schwaiger a Cassinoti, 2003), umožňující kvantifikaci viru ve vzorku, izolace na sajících myškách (např. Hayasaka et al., 1999) či detekce viru na buněčných kulturách (např. Danielová et al., 2002). Velkou výhodou dvou posledně jmenovaných metod je, že je získán živý izolát, který může být podroben následným testům virulence apod. Nevýhodou mohou být etické otázky, technická a finanční náročnost, vysoká pravděpodobnost kontaminace buněčných kultur bakteriemi a plísněmi (Grešíková a Kaluzová, 1997; Gäumann et al., 2010).

Pravděpodobným zdrojem infekce VKE v lesoparku Stromovka jsou malí hlodavci a ježci, kteří jsou kompetentní pro přenos viru a jsou hostiteli obrovských množství zejména larválních a nymfálních stádií klíšťat (Křivanec et al., 1988; Weidmann et al., 2006). Nekompetentní hostitelé pro přenos patogenů jsou velcí savci, kteří se v parku vyskytují jen náhodně. Na cirkulaci patogenů se může v urbánních oblastech podílet i *I. hexagonus* (Křivanec et al., 1988; Gern et al., 1997).

Do městského parku chodí velká část obyvatel trávit svůj volný čas. Provozuje se zde in-line bruslení, běhání, míčové hry, ale také studium nebo čtení knih, sportovní rybaření. Většina těchto aktivit je spojena s rizikem nákazy klíšťovou encefalitidou. Specifickou aktivitou je venčení psů, kteří bývají častými hostiteli klíšťat a mohou teoreticky transportovat klíšťata z venkovního prostředí do domácností. Určité riziko představuje i samotné odstraňování klíšťat z domácích mazlíčků, kdy hrozí při poškození klíštěte přenos patogenů přes drobné oděrky v kůži, či sliznice. Byly zaznamenány i případy rozkousnutí nasátého klíštěte ze psa dítětem.

V souvislosti s výskytem klíšťat v urbánních oblastech bylo popsáno, že obecně vyšší teplota v těchto místech umožňuje klíšťatům aktivitu i v zimním období. Například ve studii Dautela et al. (2008) byla v berlínském lese zaznamenána aktivní klíšťata i během prosince, ledna a února.

V klíšťatech pocházejících z urbánních oblastí byla detekována řada dalších patogenů člověka: původci lymeské boreliózy (*Borrelia burgdorferi* s.l.), lidské granulocytární anaplazmózy (*Anaplasma phagocytophilum*) a babesiózy (*Babesia microti*) (Stańczak et al., 2004; Pichon et al., 2006; Bašta et al., 1999; Silaghi et al., 2008). Stejná klíšťata, která byla v této práci testována na přítomnost viru klíšťové encefalitidy, byla testována kolegyní Zuzanou Vavruškovou na přítomnost *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Celková prevalence tohoto patogenu dosáhla 7,1 % (Vavrušková, 2010).

Infekci klíšťovou encefalitidou lze předcházet očkováním, používáním repelentů a dodržování základních pravidel při manipulaci s klíšťaty.

7 Závěr

Byla vypracována rešerše k zadanému tématu výskytu viru klíšťové encefalitidy v urbánní oblasti Českých Budějovic. Byla vyšetřena klíšťata z lesoparku Stromovka. Tři vzorky byly prokázány jako pozitivní na výskyt viru klíšťové encefalitidy. U pozitivních vzorků se nepodařilo získat sekvence v dostatečné kvalitě, ovšem byla získána nukleotidová sekvence části genu kódujícího protein E u vzorku klíštěte pocházejícího z nedalekých Netolic.

8 Seznam použité literatury

Allan B. F., Goessling L. S., Storch G. A., Thach R. E. (2010): Blood meal analysis to identify reservoir hosts for *Amblyomma americanum* ticks, *Emerg Infect Dis.* 16(3): 433-40

Banzhoff A., Bröker M., Zent O. (2008): Protection against tick-borne encephalitis (TBE) for people living in and travelling to TBE-endemic areas, *Travel Med and Infect Dis.* 6: 331-341

Bašta J., Plch J., Hulínská D., Daniel M. (1999): Incidence of *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* Ticks in an urban environment, Prague, Czech Republic, Between 1995 and 1998, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 18: 515-517

Bown K. J., Begon M., Bennett M., Birtles R. J., Burthe S., Lambin X., Telfer S., Woldehiwet Z., Ogden N. H. (2006): Sympatric *Ixodes trianguliceps* and *Ixodes ricinus* ticks feeding on field voles (*Microtus agrestis*): potential for increased risk of *Anaplasma phagocytophilum* in the United Kingdom?, *Vector Borne Zoonotic Dis.* 6(4): 404 -410

Boyard Ch., Vourc'h G., Barnouin J. (2008): The relationships between *Ixodes ricinus* and small mammal species at the woodland- pasture interface, *Exp Appl Acarol.* 44: 61-76

Bradley C. A., Altizer S. (2006): Urbanization and the ecology of wildlife diseases, *Trends Ecol Evol.* 22(2): 95-102

Danielová V., Holubová J. (1991): Transovarial transmission rate of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks. V: Dusbánek F., Bukva V. (ed.): *Modern acarology.* Academia, Prague and SPB Academic Publishing bv, The Hague, 2: 7-10

Danielová V., Holubová J., Daniel M. (2002): Tick-borne encephalitis virus prevalence in *Ixodes ricinus* ticks collected in high risk habitats of the south-Bohemian region of the Czech Republic, *Exp Appl Acarol.* 26(1-2): 145-151

Dautel H., Kahl O. (1999): Ticks (*Acari: Ixodoidea*) and their medical importance in the urban environment, V: Robinson H., Rettich F., Rambo G. W. (ed.): *Proceeding of the 3rd international Conference on Urban Pests, Praha, Česká republika*

Dautel H., Dippel C., Kämmer D., Werkhausen A., Kahl O. (2008): Winter activity of *Ixodes ricinus* in a Berlin forest, *Int. J Med Microbiol.* 298: 50-54

Gaunt M.W., Sall A.A., de Lamballerie X., Falconar A.K.I., Dzhivanian T.I., Gould E. A. (2001): Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography, *J Gen Virol.* 82: 1867-1876

Gäumann R., Mühlemann K., Strasser M., Beuret C. M. (2010): High-throughput procedure for tick surveys of tick-borne encephalitis virus and its application in a national surveillance study in Switzerland, *Appl Environ Microbiol.* 76(13): 4241-4249

Gern L., Toutoungi L. N., Hu C. M., Aeschlimann A. (1991): *Ixodes (Pholeoixodes) hexagonus*, an efficient vector of *Borrelia burgdorferi* in the laboratory, *Med Vet Entomol.* 5(4): 432-435

Gern L., Rouvinez E., Toutoungi L. N., Godfroid E. (1997): Transmission cycles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato involving *Ixodes ricinus* and/or *I. hexagonus* ticks and the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*, in suburban and urban areas in Switzerland, *Folia Parasitol* 44(4): 309-314

Gern L. (2008): *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the agent of Lyme borreliosis: Life in the wild, *Parasite* 15: 244-247.

Grard G., Moureau G., Charrel R. N., Lemasson J. J., Gonzalez J. P., Gallian P., Gritsun T. S., Holmes E. C., Gould E. A., de Lamballerie X. (2007): Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy, *Virology* 361(1): 80-91

Gregoire A., Faivre B., Heeb P., Cezilly F. (2002): A comparison of infestation patterns by *Ixodes* ticks in urban and rural populations of the Common Blackbird *Turdus merula*, *Ibis* 144: 640-645

Grešiková M., Kaluzová M. (1997): Biology of tick-borne encephalitis virus, *Acta Virol.* 41: 115-124

Gritsun T. S., Lashkevich V. A., Gould E. A. (2003): Tick-borne encephalitis, *Antiviral Res.* 57: 129-146

Haglund M., Günther G. (2003): Tick-borne encephalitis – pathogenesis, clinical course and long-term follow-up, *Vaccine* 1: 11-18

- Hayasaka D., Suzuki Y., Kariwa H., Ivanov L., Volkov V., Demenev V., Mizutani T., Gojobori T., Takashima I. (1999):** Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and far-Eastern Russia, *J Gen Virol.* 80: 3127-3135
- Horak I. G., Camicas J. -L., Keirans J. E. (2002):** The *Argasidae*, *Ixodidae* and *Nuttalliellidae* (*Acari: Ixodida*): a world list of valid tick names, *Exp Appl Acarol.* 28: 27-54
- Hubálek Z. (2003):** Emerging human infectious diseases: anthroponoses, zoonoses, and sapronoses, *Emerg Infect Dis.* 9: 403 -404
- Hubálek Z., Halouzka J., Juřicová Z. (2004):** Borreliæ in *Ixodes ricinus* ticks feeding on humans, *Med Vet Entomol.* 18(3): 228 -231
- Charrel R. N., et al. (2004):** Tick-borne virus diseases of human interest in Europe, *Clin Microbiol Infect.* 10: 1040-1055
- Chomel B., Belotto A., Meslin F. -X. (2007):** Wildlife, exotic pets and emerging zoonoses, *Emerg Infect Dis.* 13(1): 6-11.
- Kapikian A. Z., Shope R. E. (1996):** *Rotaviruses, Reoviruses, Coltiviruses* and *Orbiviruses*, In: Baron S, editor, *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, kapitola 64
- Khouri C., Maroli M. (2004):** The pigeon tick, *Argas reflexus*, and hazard for human health, *Ann Ist Super Sanita* 40(4): 427-432
- Kiffner C., Lödige C., Alings M., Vor T., Rühle F. (2011):** Attachment site selection of ticks on roe deer, *Capreolus capreolus*, *Exp Appl Acarol.* 53(1): 79-94
- Kimmig P., Hassler D., Braun R. (2003):** Klíšťata: Nepatrné kousnutí s neblahými následky, PRAGMA, Praha, 114 s.
- Kredba V., Ondráček, Sedlák J. (1970):** Infekční nemoci, AVICENUM, Praha, 291 s.
- Kreil T. R., Zimmermann K., Burger I., Attakpah E., Mannhalter J. W., Eibl M. M. (1997):** Detection of tick-borne encephalitis virus by sample transfer, plaque assay and strand-specific reverse transcriptase polymerase chain reaction: what do we detect?, *J Virol Methods* 68(1): 1-8

- Kruse H., Kirkemo A. M., Handeland K. (2004):** Wildlife as source of zoonotic infections, *Emerg Infect Dis.* 10 (12): 2067-2072
- Křivanec K., Kopecký J., Tomková E., Grubhoffer L. (1988):** Isolation of TBE virus from the tick *Ixodes hexagonus*, *Folia Parasitol.* 35: 273-276
- Kříž B., Beneš Č. (2007):** Extrémní vzestup incidence klíšťové encefalitidy v České republice v roce 2006, *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)* 16(6): 269-274
- Kříž B., Beneš Č., Daniel M. (2009):** Alimentary transmission of tick-borne encephalitis in the Czech Republic (1997-2008), *Epidemiol Microbiol Immunol.* 58: 98-103
- Labuda M. (1979):** Živí proti živým, ALBATROS, Praha, 153 s.
- Labuda M., Austyn J. M., Zuffova E., Kozuch O., Fuchsberger N., Lysy J., Nuttall P. A. (1996):** Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission, *Virology* 219: 357-66
- Lindgren E., Gustafson R. (2001):** Tick-borne encephalitis in Sweden and climate change, *Lancet.* 358: 16-18.
- Maetzel D., Maier W. A., Kampen H. (2005):** *Borrelia burgdorferi* infection prevalences in questing *Ixodes ricinus* ticks (*Acari: Ixodidae*) in urban and suburban Bonn, western Germany, *Parasitol Res.* 95(1): 5-12
- Matuschka F. – R., Fischer P., Musgrave K., Richter D., Spielman A. (1991):** Host on which nymphal *Ixodes ricinus* most abundantly feed, *Am J Trop Med Hyg* 44(1): 100-107
- Morozova O. V., Dobrotvorsky A. K., Livanova N. N., Tkachev S. E., Bakhvalova V. N., Beklemishev A. B., Cabello F. C. (2002):** PCR detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, tick-borne encephalitis virus, and the human granulocytic ehrlichiosis agent in *Ixodes persulcatus* ticks from Western Siberia, Russia, *J Clin Microbiol.* 40(10): 3802-3804
- Nuttall P. A., Jones L. D., Labuda M., Kaufman W. R. (1994):** Adaptations of arboviruses to ticks, *J Med Entomol.* 31(1): 1-9
- Nuttall P. A. (1999):** Pathogen-tick-host interaction: *Borrelia burgdorferi* and TBE virus, *Zentralbl Bakteriol.* 289 (5-7): 492-505

- Oliver Jr. J. H., Lin T., Gao L., Clark K. L., Banks C. W., Durden L.A., James A.M., Chandler Jr. F. W. (2003):** An enzootic transmission cycle of Lyme borreliosis spirochetes in the southeastern United States, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 11642-11645.
- Parola P., Raoult D. (2001):** Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe, 2001, Clin Microbiol Infect. 7: 80-83
- Parola P., Paddock Ch. D., Raoult D. (2005):** Tick-borne rickettsioses around the world: Emerging diseases challenging old concepts, Clin Microbiol Rev. 18: 719-756
- Pejchalová K., Žáková A., Mejzlíková M., Halouzka J., Dendis M. (2007):** Isolation, cultivation and identification of *Borrelia burgdorferi* genospecies from *Ixodes ricinus* ticks from the city of Brno, Czech Republic, Ann Agric Environ Med. 14(1): 75-79
- Perret J. - L., Rais O., Gern L. (2004):** Influence of climate on the proportion *Ixodes ricinus* nymphs and adults questing in a tick population, J Med Entomol. 41: 361- 365
- Petersen J., Mead P. S., Schriefer M. E. (2009):** *Francisella tularensis*: an arthropod-borne pathogen, Vet. Res. 40:07
- Pichon B., Kahl O., Hammer B., Gray J. S. (2006):** Pathogens and host DNA in *Ixodes ricinus* nymphal ticks from a German forest, Vector Borne Zoonotic Dis. 6(4): 382-387
- Randolph S. E., Storey K. (1999):** Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (*Acari: Ixodidae*): implications for parasite transmission, J Med Entomol. 36(6): 741-748
- Randolph S.E. (2001):** The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 356: 1045-1056
- Randolph S. E., Green R. M., Hoodless A. N., Peacey M. F. (2002):** An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*, Int J Parasitol. 32: 979- 989
- Randolph S. E., Asokliene L., Avsic-Zupanac T. et al. (2008):** Variable spikes in tick-borne encephalitis incidence in 2006 independent of variable tick abundance but related to weather, Parasit Vectors 1:44

Robertson S. J., Mitzel D. N., Taylor R. T., Best S. M., Bloom M. E. (2009): Tick-borne flaviviruses: dissecting host immune responses and virus countermeasures, *Immunol. Res.* 43(1-3): 172-186

Rudenko N., Golovchenko M., Cihlářová V., Grubhoffer L. (2004): Tick-borne encephalitis virus-specific RT-PCR—a rapid test for detection of the pathogen without viral RNA purification, *Acta Virol.* 48(3): 167-171

Růžek D., Kopecký J., Štěřba J., Golovchenko M., Rudenko N., Grubhoffer L. (2006): Non-virulent strains of TBE virus circulating in the Czech Republic. *J Clin Virol.* 36: S41

Sedlák E. (2005): Zoologie bezobratlých, MASARYKOVA UNIVERZITA BRNO, Brno, 337s.

Schmaljohn A. L., McClain D. (1996): *Alphaviruses (Togaviridae) and Flaviviruses (Flaviviridae)*, In: Baron S, editor, *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, kapitola 54

Schwaiger M., Cassinotti P. (2003): Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA, *J Clin Virol.* 27(2): 136-145

Silaghi C., Gilles J., Höhle M., Fingerle V., Just F. T., Pfister K. (2008): *Anaplasma phagocytophilum* infection in *Ixodes ricinus*, Bavaria, Germany, *Emerg Infect Dis.* 14(6): 972-974

Spiewak R., Lundberg M., Johansson G., Buczek A. (2006): Allergy to pigeon tick (*Argas reflexus*) in Upper Silesia, Poland, *Ann Agric Environ Med.* 13(1): 107-112

Stańczak J., Gabre R. M., Kruminis- Łozowska W., Racewicz M., Kubica-Biernat B. (2004): *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests, *Ann Agric Environ Med.* 11(1): 109-114

Stejskal V. (1995): Klíšťata, komáři, blechy, vosy a jiní bodaví škůdci ohrožující zdraví, SCRIPTUM, Praha, 64 s.

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

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

Süss J., Klaus C., Gerstengarbe F. W., Werner P. C. (2008): What makes ticks tick? Climate change, ticks, and tick-borne diseases, *J Travel Med.* 15(1): 39-45

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011): MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, *Molecular Biology and Evolution* (in press)

Tilly K., Rosa P. A., Stewart P. E. (2008): Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*, *Infect Dis Clin North Am.* 22(2): 217-234.

Uspensky I. (2008): Ticks (*Acari: Ixodoidea*) as urban pests and vectors with special emphasis on ticks outside their geographical range, V: Robinson W. M., Bajomi D. (ed.) *Proceedings of the Sixth International Conference on Urban Pests, Budapešť, Maďarsko*

Vavrušková Z. (2010): Výskyt klišťat a jimi přenášených patogenů v městském parku v Českých Budějovicích, bakalářská práce na PřF JČU v Českých Budějovicích, 38 s.

Venette R. C., Moon R. D., Hutchison W. D. (2002): Strategies and statistics of sampling for rare individuals, *Ann Rev Entomol.* 44: 143-174

Volf P., Horák P. a kol. (2007): Paraziti a jejich biologie, TRITON, Praha, 318 s.

Waldenström J., Lundkvist A., Falk K. L., Garpmo U., Bergström S., Lindegren G., Sjöstedt A., Mejlom H., Fransson T., Haemig P. D., Olsen B. (2007): Migrating birds and tickborne encephalitis virus, *Emerg Infect Dis.* 13(8): 1215-1218

Weidmann M., Schmidt P., Hufert F. T., Křivanec K., Meyer H. (2006): Tick-borne encephalitis virus in *Clethrionomys glareolus* in the Czech Republic, *Vector Borne Zoonotic Dis.* 6(4): 379-381

World Health Organization (Regional office for Europe) (2004): The vector-borne human infections of Europe: their distribution and burden on public health, Kodaň, Dánsko, 144 s.

internetové zdroje:

Státní zdravotní ústav Praha, [<http://www.szu.cz/>] (20.4.2011)

ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4.,
[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>] (20.4.2011)