

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Vliv vakcinace slinami klíštěte *Ixodes ricinus* na
přenos *Borrelia burgdorferi* a cytokinový profil
hostitele**

Diplomová práce

Bc. Eva Gregorová

Školitel: Doc. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Helena Horká

České Budějovice

2011

Gregorová, E., 2011: Vliv vakcinace slinami klíštěte *Ixodes ricinus* na přenos *Borrelia burgdorferi* a cytokinový profil hostitele. [The influence of vaccination with saliva of the tick *Ixodes ricinus* on the transmission of *Borrelia burgdorferi* and cytokine profile of the host. Mgr. Thesis, in Czech] – 75 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The tick *Ixodes ricinus* is one of the most important vectors of human pathogens like the spirochete *Borrelia burgdorferi* and TBE virus. The effect of repeated infestations with pathogen-free *I. ricinus* nymphs and the effect of vaccination with ticks saliva of the tick *I. ricinus* on the transmission *Borrelia burgdorferi* and on the production of the cytokines were studied. The draining lymph nodes of C3H/HeN mice were examined for IL-2, IFN- γ and IL-10 production by antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. Spirochete load in skin, heart and bladder was examined by real-time polymerase chain reaction.

Práce byla financována výzkumným centrem MŠMT LC06009.

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou prací vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - 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.

V Českých Budějovicích dne 27.4. 2011

.....

Eva Gregorová

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala svým školitelům Doc. RNDr. Janu Kopeckému CSc. a RNDr. Heleně Horké za výběr zajímavého tématu, odborné vedení, mnoho cenných rad a trpělivost. Dále pak děkuji všem z Laboratoře interakcí vektor-hostitel. Mé velké díky patří i моým rodičům a přátelům za podporu.

Obsah

1 Úvod	1
1.1. Klíště obecné - popis a stavba těla	1
1.2. Vývojový cyklus klíštěte obecného	2
1.3. Lymfská borelióza	3
1.3.1. Mikrobiologie	3
1.3.2. Vnější povrchové proteiny <i>B. burgdorferi</i>	4
1.3.3. Genom <i>B. burgdorferi</i>	5
1.3.4. Životní cyklus <i>B. burgdorferi</i>	6
1.3.5. Klinické projevy lymfské nemoci	6
1.3.6. Diagnostika a léčba	7
1.4. Přehled dalších onemocnění přenášených klíšťaty	8
1.5. Interakce borelie-klíště	9
1.6. Interakce borelie-hostitel	11
1.7. Interakce klíště-hostitel	13
1.7.1. Imunitní odpověď hostitele proti klíštěti	13
1.7.2. Obrana klíštěte před imunitním systémem hostitele	14
1.7.3. Imunomodulační účinky slin	15
1.7.3.1. Antikoagulanty	15
1.7.3.2. Imunosupresory	16
1.7.4. Způsob přenosu borelií	19
1.7.5. Slinami aktivovaný přenos (SAT) u <i>B. burgdorferi</i>	20
1.8. Trans-block vakcíny	22
2 Cíle práce	26
3 Materiál a metody	27
3.1. Klíšťata	27
3.2. Myši	27
3.3. Bakterie	27
3.3.1. Kultivace borelií	27
3.3.2. Stanovení počtu borelií	27
3.4. Klíštěcí sliny	28
3.4.1. Odběr slin	28
3.4.2. Stanovení koncentrace proteinu	28

3.5. Imunizace opakovaným sáním klíštěte <i>I. ricinus</i>	28
3.5.1. Imunizace myši	28
3.5.2. Infekce myši boreliemi	29
3.5.3. Izolace a zpracování orgánů	29
3.5.4. Příprava buněčné suspenze z uzlin	29
3.6. Imunizace slinami klíštěte <i>I. ricinus</i>	30
3.6.1. Imunizace myši	30
3.6.2. Infekce myši boreliemi	31
3.6.3. Izolace a zpracování orgánů	31
3.6.4. Příprava buněčné suspenze z uzlin	31
3.7. Stanovení cytokinů	31
3.8. Stanovení protilátek	32
3.9. Izolace DNA z myších orgánů	32
3.10. Real-time PCR	33
3.11. Statistika	34
4 Výsledky	35
4.1. Vakcinace myši opakovaným sáním nymf <i>I. ricinus</i>	35
4.1.1. Produkce cytokinů mízními uzlinami po vakcinaci opakovaným sáním	35
4.1.2. Vliv vakcinace opakovaným sáním na distribuci a proliferaci borelií v myších orgánech	37
4.1.2.1. Kůže	37
4.1.2.2. Srdce	38
4.1.2.3. Močový měchýř	38
4.1.3. Protilátky proti slinám přítomné v séru po vakcinaci opakovaným sáním	39
4.1.4. Vliv vakcinace opakovaným sáním na metamorfózu a mortalitu <i>I. ricinus</i>	40
4.2. Vakcinace myši slinami klíšťat <i>I. ricinus</i>	41
4.2.2. Produkce cytokinů mízními uzlinami po vakcinaci slinami	41
4.2.3. Vliv vakcinace slinami na distribuci a proliferaci borelií v myších orgánech ...	43
4.2.3.1. Kůže	43
4.2.3.2. Srdce	44
4.2.3.3. Močový měchýř	44
4.2.4. Protilátky proti slinám přítomné v séru po vakcinaci slinami	45
5 Diskuze	46
5.1. Vakcinace myši opakovaným sáním nymf <i>I. ricinus</i>	46

5.2. Vakcinace myši slinami klíšťat <i>I. ricinus</i>	48
6 Závěr	52
7 Použitá literatura	53
8 Seznam zkratek	67

1 Úvod

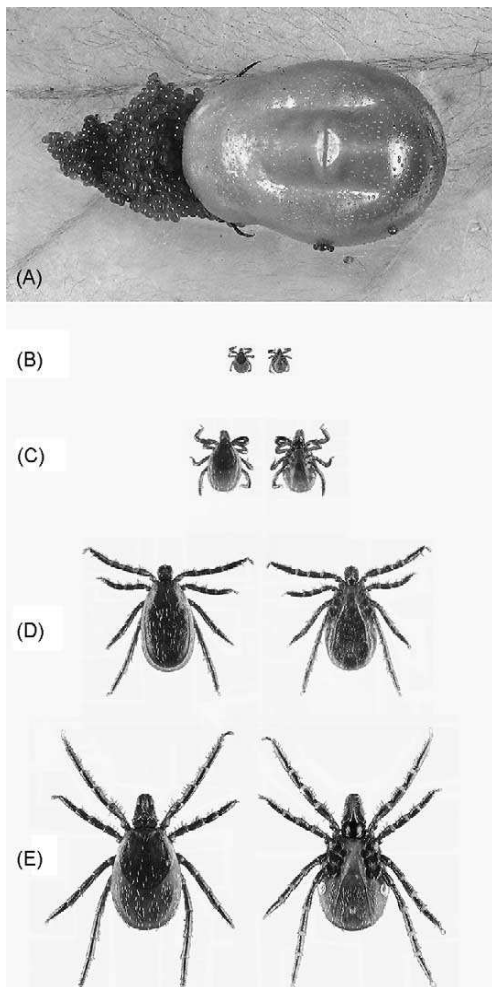
1.1. Klíště obecné - popis a stavba těla

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) je jedním z nejvýznamnějších ektoparazitů člověka a domácích i divokých zvířat. Řadíme jej do kmene členovci (*Arthropoda*), třídy pavoukovci (*Arachnida*), řádu klíšťata (*Ixodida*), čeledi klíšťatovití (*Ixodidae*) a rodu klíště (*Ixodes*) (Linnaeus, 1758). Do řádu *Ixodida* patří dvě hlavní čeledi: výše uvedená čeleď *Ixodidae* (tzv. tvrdá klíšťata, mají scutum tj. hřbetní štítek z chitinu) a čeleď *Argasidae* (tzv. měkká klíšťata, nemají scutum). Měkká klíšťata sají na hostiteli rychle (hodiny) a obvykle se nacházejí v teplejších oblastech. Naproti tomu tvrdá klíšťata sají pomaleji (dny), jsou rozšířenější a vyskytují se hlavně v subarktických oblastech (Gustafson, 1993). Obě tyto čeledi se liší tvarem těla, chováním, způsobem vývoje a přenášenými parazity (Süss, 2003, Sonnenshine, 1993).

Tělo klíštěte *Ixodes ricinus* se skládá z hlavové části (gnathosoma) a vlastního těla (idiosoma). Na hřbetní straně je štítek (scutum), jehož velikost a barva závisí na pohlaví a vývojovém stádiu. U nymf a dospělých samic kryje štítek jen přední část hřbetu (umožňuje zvětšení objemu), zatímco u dospělých samců celý hřbet. Klíště je vybaveno pro rychlé proniknutí do kůže a sání krve ústním ústrojím tvořeným dvěma čelistními makadly (palpy), chelicerami a hypostomem. Hypostom je tvořen zpětnými háčky, které znesnadňují odstranění klíštěte. K dalšímu připevnění v místě přisátí slouží rychle tvrdnoucí látka cement. V klidovém stavu je hypostom překryt makadly, která se při přisátí odklání do stran. Na prvním článku prvního páru nohou je umístěn tzv. Hallerův orgán, který umožňuje detekci CO₂, teploty, pachů, amoniaku a pohybu. Klíště *Ixodes ricinus* je slepé, a proto díky tomuto orgánu dokáže vyslédit svou oběť. Existují ale i druhy které mají jednoduché oči, umístěné na okraji scuta (Süss, 2003, Daniel, 2007). Mezi hypostomem a chelicerami jsou umístěny vývody slinných žláz. Slinné žlázy jsou důležité pro další sání klíštěte a přenos patogenů. Klíště musí během sání překonat různé bariéry hostitele jako hemostázu, zánět a přirozenou i adaptivní imunitu (Francischetti et al., 2009, Ribeiro, 1987). V klíštěcích slinách jsou proto obsaženy antikoagulační látky (enzym ixodin), lokální anestetika, toxiny a enzymy. Díky těmto látkám je přisátí klíštěte efektivní a bezbolestné a často není člověkem zaznamenáno (Brossard a Wikel, 2004).

1.2. Vývojový cyklus klíštěte obecného

Vývoj klíštěte obecného trvá v přírodních podmínkách 2-3 roky, za nepříznivých podmínek i déle (Süss, 2003, Barton et al., 1996). Každé vývojové stádium klíštěte saje na jiných obratlovcích hostitelích po dobu několika dní. Tvrdá klíšťata mají 3 vývojová stádia (1. larva, 2. nymfa, 3. dospělec) zatímco měkká klíšťata mají 5 vývojových stádií (1. larva, 2., 3., 4. nymfa, 5. dospělec) (Ryšavý et al., 1988). Po páření, které obvykle probíhá na hostiteli před sáním, naklade samička mezi 1000-5000 vajíček. Vajíčka samičky kladou na listy rostlin ve vlhkém a teplém prostředí a zanedlouho poté umírají. Z vajíček se líhnou larvy, které mají



3 páry končetin a délku 0,8 mm. Larvy sají na drobných obratlovcích (př. hlodavcích) v průměru 2-4 dny. Po úspěšném nasátí se larva svleče a přemění se na nymfu s 4 páry končetin. Nymfy sají také na menších obratlovcích 3-5 dní, jsou podobné dospělým samicím a měří 1,1 mm. Po posledním sání, které probíhá na větších obratlovcích (vysoká zvěř), se nymfa přemění na dospělé. Dospělá nenasátá samice má velikost 4×3 mm, je hnědočervená a scutum je tmavé až černé. Nasátá samice může dosahovat velikosti až 7×11 mm a je olivově šedá. Sameček nesaje krev, má velikost 2,5 × 1,5 mm a je celkově tmavý (Gustafson, 1993, Daniel, 2007, Sonnenshine, 1993). Každému vývojovému stádiu klíštěte trvá zhruba rok, než se přemění z jednoho stádia do druhého. Proto je období vývoje klíštěte dlouhé přibližně 3 roky. Tato doba může být ale proměnlivá (2-6 let) v závislosti na zeměpisném pásu, dostupnosti hostitelů a klimatických podmínkách (Süss, 2003).

Obr. 1. *I. ricinus*. (A) samička s vajíčky, (B) larva, (C) nymfa, (D) sameček, (E) samička. (Süss, 2003)

1.3. Lymská borelióza

Původce onemocnění poprvé popsal Willy Burgdorfer v roce 1982 v USA a po něm byl také pojmenován jeden z prvních objevených druhů borelií. Původcem lymské boreliózy je gramnegativní bakterie patřící do kmene *Spirochaetes*, rodu *Borrelia* a druhu *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Zástupci kmene *Spirochaetes* (zahrnuje např. *Treponema pallidum* nebo *Leptospira interrogans*) mají charakteristické znaky jako spirálovitý tvar, bičíky a šroubovitý pohyb. Celý komplex *Borrelia burgdorferi* sensu lato zahrnuje nejméně 15 druhů a to: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. andersonii*, *B. bissettii*, *B. californiensis*, *B. japonica*, *B. lusitaniae*, *B. sinica*, *B. spielmanii*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. valaisiana*. Mezi nově popsané druhy patří *B. carolinensis*, *B. americana*, *B. bavariensis*, *B. kurtenbachii*, *B. yangtze* (Chu et al., 2008, Margos et al., 2009, Rudenko et al., 2009a,b, Strube et al., 2010). Onemocnění je způsobeno patogenními bakteriemi *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. spielmani* (Burgdorfer et al., 1982). V Evropě a Asii jsou hlavními původci boreliózy *B. garinii*, *B. afzelii* a *B. spielmani*, zatímco v USA je to *B. burgdorferi* sensu stricto (van Dam, 1993). Patogenita ostatních druhů je zatím nejasná, nicméně u druhů *B. bissettii*, *B. lusitaniae* a *B. valaisiana* se předpokládá, že způsobují lymskou boreliózu (Ryffel et al., 1999, Collares-Pereira et al., 2004). V České republice jsou původcem onemocnění hlavně *B. garinii* a *B. afzelii*. Jednotlivé druhy se mezi sebou liší antigenními vlastnostmi, počtem plazmidů a různou afinitou k určitým orgánům (Bolehovská et al., 2009, Wilske, 2005).

1.3.1. Mikrobiologie

Borelie jsou mikroaerofilní gramnegativní spirálové bakterie, které mají několik bičíků ukotvených v periplazmatickém prostoru pomocí bazálních disků (Kramář, 2007, Bolehovská et al., 2009). Dále mají pevnou buněčnou stěnu o délce 10-30 μm a průměru 0,2-0,3 μm . Za pohyb je zodpovědných přibližně 7-14 bičíků, které jsou tvořené ze dvou typů bičíkových proteinů- převážně z FlaB (41 kDa) a méně z FlaA (38 kDa) (Ge et al., 1998). Typický pro ně je šroubovitý pohyb, který je výhodný v místech jejich nejčastějšího pohybu tj. ve vysoce viskózním prostředí mezibuněčné hmoty. Spirochety jsou schopny vyvinout rychlost přesahující 2 mm/minutu (Malawista a de Boisfleury Chevance, 2008). Tento způsob pohybu umožňuje překonat epiteliální i hematoencefalitickou bariéru. Složení buněčné

membrány je podobné ostatním gramnegativním bakteriím. Podstatný rozdíl je ale v nepřítomnosti lipopolysacharidu a velkém množství lipoproteinů ve vnější buněčné membráně (Fraser et al., 1997, Takayama et al., 1987). Spirochety jsou vybaveny celou řadou antigenů proteinové i neproteinové povahy. Mezi nejvýznamější patří antigeny vnější membrány OspA, OspB a OspC, bičíkový p41, cytoplazmatický p60 a řada dalších (Hulínská et al., 2003). Borelie jsou také schopné vstupovat do buněk (fibroblastů, dendritických buněk, makrofágů) a v nich nadále přežívat (Křupka et al., 2008).

Díky své nekompletní metabolické výbavě nemají borelie potřebné enzymy pro syntézu aminokyselin, mastných kyselin a nukleotidů, a proto jsou zcela závislé na svém hostiteli. Spirochety jsou adaptovány na nízké hladiny železa, jejichž aktivní snižování v tělesných tekutinách je jedním z hlavních mechanismů nespecifické protibakteriální obrany hostitele (Křupka et al., 2008). Za nepříznivých podmínek (nízké pH, nízký osmotický tlak, nedostatečná výživa) jsou buňky *Borrelia burgdorferi* schopny přeměny na nepohyblivé cystické formy. Tyto cystické formy jsou pak většinou schopny reverze v plně aktivní pohyblivou formu. Toho může být využito k překonání nepříznivých podmínek, jako je působení imunitního systému a léčba antibiotiky (Murgia et al., 2002).

1.3.2. Vnější povrchové proteiny *B. burgdorferi*

Borelie mají několik povrchových lipoproteinů Osp (**O**uter surface **p**rotein). První izolované Osp proteiny byly označeny: OspA, OspB, OspC, OspD, OspE a OspF (Li et al., 1997, Wilske et al., 1993, Norris et al., 1992, Lam et al., 1994). Tyto proteiny pravděpodobně interagují s buněčnými a intersticiálními komponentami tkání klíšťat a hostitele. Během sání klíšťat na hostiteli dochází u povrchových proteinů k snížení nebo zvýšení jejich exprese (Schwan et al., 1995, Hefty et al., 2002). Mnoho takto různě exprimovaných proteinů je kódováno na plazmidech (Hefty et al., 2002, Wallich et al., 1995). Spirochety nemají ve vnější buněčné membráně liposacharid, ale velké množství proteinů Osp. Proteiny Osp mohou proto být z části zodpovědné za zánět spojený s infekcí (Singh a Girschick, 2004).

Nejvíce studovaným proteinem *B. burgdorferi* je OspA, exprimovaný boreliemi v klíšťatech. OspA slouží k přichycení borelií ve střevě klíšťat na receptor TROSPA (**T**ick **R**eceptor for **O**sp**A**). Díky OspA jsou spirochety pravděpodobně chráněny před internalizací během trávení krve. Protilátky hostitele proti OspA mohou proto interferovat s kolonizací střeva bakteriemi (Singh a Girschick, 2004). Během sání klíšťat poté dochází ke snižování exprese OspA a to umožňuje boreliím oddělení od střeva a přechod do hemolymfy. Dále

borelie migrují do slinných žláz a během sání klíštěte se se slinami dostávají do hostitele (Schwan et al., 1995, de Silva et al., 1996, Pal et al., 2000). Během sání krve vykazuje populace spirochet velkou heterogenitu, protože exprese proteinů Osp je variabilní i v rámci druhu borelií. Po přenosu bakterií do hostitele je OspA pravděpodobně ještě přítomen v některých stádiích (Akin et al., 1999, Singh a Girschick, 2004). Další důležitý protein OspC, pravděpodobně hraje roli v přenosu borelií do hostitele. Syntéza OspC odpovídá migraci spirochet z střeva klíštěte do slinných žláz. Nenasátými klíšťaty není OspC exprimován. V průběhu sání klíšťat je ve střevě zvyšována syntéza OspC. Jakmile se ale spirochety dostanou do slinných žláz, je jeho syntéza snižována. Protilátky proti OspC blokují přechod borelií ze střeva do slinných žláz (Fingerle et al., 1995, Montgomery et al., 1996, Gilmore a Piesman, 2000, Singh a Girschick, 2004). Borelie, které vstoupí do hostitele, už dále OspC neprodukují. Malé množství bakterií ale může stále mít OspC na svém povrchu (Onishi et al., 2001, Singh a Girschick, 2004). Dále bylo zjištěno, že povrchový protein OspD je zřejmě faktor virulence (Norris et al., 1992). Proteiny Erp (OspE/F-related proteins) jsou povrchové lipoproteiny, které sdílejí sekvenční homologii s OspE a OspF. Proteiny Erp, OspE a OspF mají důležitou roli v rezistenci *B. burgdorferi* proti komplementu (Akins et al., 1999, El-Hage et al., 2001, Stevenson et al., 2002).

1.3.3. Genom *B. burgdorferi*

Organizace genomu *B. burgdorferi* (kmen B31, NC_001318) je značně neobvyklá, protože největší část tvoří lineární chromozom kódující základní proteiny nutné pro replikaci, transkripci a translaci proteinů spolu s geny kódujícími transportní bílkoviny a energetický metabolismus. Neobsahuje ale geny pro biosyntézu látek. Zbytek genomu je uspořádán v 12 lineárních a 9 cirkulárních plazmidech, jejichž geny většinou souvisejí s virulencí a infektivitou. Celý genom má velikost 910 725 párů bází a obsahuje celkem 874 genů (851 z nich kóduje určitý protein) (Fraser et al., 1997, Hyde a Johnson, 1984, Plasterk et al., 1985). Tato poměrně malá velikost genomu souvisí s tím, že borelie mají jen základní proteiny nutné pro replikaci, transkripci a energetický metabolismus. To je však kompenzováno pomocí 16 různých transmembránových transportních proteinů, které zajišťují získávání živin z okolí. Naproti tomu plazmidy obsahují 70% genů, které jsou jedinečné a nebyly nalezeny u jiných prokaryot. Neobvyklý je i velký počet genů pro povrchové proteiny Osp, kterých je více než 100 (Fraser et al., 1997).

Mnoho genů je pro borelie rodu *Borrelia burgdorferi* sensu lato společných, ale v rámci druhu i mezi druhy se mohou vyskytovat sekvenční rozdíly. Geny potřebné pro přenos nebo přetrvávání v hostiteli (např. OspC a VlsE) mohou být podstatně rozdílné na úrovni nukleotidů a aminokyselin (Glöckner et al., 2006, Tilly et al., 2008). Analýzou genomu *B. burgdorferi* bylo zjištěno, že více než 6% chromozomálních genů je spojeno s pohybem a chemotaxí. Morfologie a pohyblivost spirochet jim dovoluje se pohybovat ve vysoce vyskózním prostředí, které imobilizuje ostatní bakteriální druhy (Fraser et al., 1997, Tilly et al., 2008).

1.3.4. Životní cyklus *B. burgdorferi*

B. burgdorferi infikuje široký okruh obratlovců jako malé savce, plazy a ptáky (Anderson a Magnarelli, 1984, Clark et al., 2005). Celosvětové rozšíření lymfské boreliózy odpovídá rozšíření kompetentních rezervoárových hostitelů *B. burgdorferi* a klíštěcích vektorů. Jedinými přirozenými přenašeči, jimiž může být člověk infikován *B. burgdorferi*, jsou klíšťata rodu *Ixodes* (Steere, 2001, Lane et al., 1991). V USA jsou hlavními původci rozšíření onemocnění člověka *I. scapularis* a *I. pacificus*, v Evropě a Asii *I. ricinus* a *I. persulcatus* (Gern a Humair, 2002, Korenberg et al., 2002).

Klíšťata nejčastěji získají spirochety v jejich larválním stádiu po sání na infikovaných hlodavcích (Donahue et al., 1987, Mather et al., 1989). Po přeměně sají nymfy na širokém okruhu zvířat, jako například na hlodavcích, kteří se tak stávají novými rezervoáry v cyklu. Po přeměně nymf na dospělé, sají dospělci na větších savcích, kteří často nejsou vhodnými hostiteli pro *B. burgdorferi* (Lane et al., al, 1991). Díky změně exprese genů během infekce jsou borelie schopny přežít jak v klíštěti tak v obratlovčím hostiteli (Anguita et al., 2003).

1.3.5. Klinické projevy lymfské nemoci

Infekce *Borrelia burgdorferi* sensu lato má podobný počáteční klinický obraz v rámci celého komplexu (Müllegger, 2004). Onemocnění má tři stádia, kdy první dvě jsou akutní, tj. stádium časně lokalizace a stádium časně diseminace. Třetím stádiem je stádium pozdní diseminace, při kterém se objevují zánětlivé změny vyvolané bakteriemi i imunopatologické změny. Pro první stádium je charakteristické erythema migrans (centrální zarudnutí kůže v místě přisátí klíštěte vždy větší než 5 cm, objevuje se v přibližně týden po přisátí klíštěte)

a chřipkové příznaky (Křupka et al., 2008). V ranném diseminovaném stádiu se může erytém objevit i na jiných místech než v oblasti vstupu infekce (Hercogová et al., 2005). Vzácněji se v tomto stádiu může projevit boreliový lymfocytom (Maraskin et al., 2002). Pro třetí stádium je typickým projevem acrodermatitis chronica atrophicans, která se objevuje měsíce až roky po vstupu infekce a je častější v Evropě (Asbrink, 1985). Ostatní symptomy odpovídají typu bakterie: *B. burgdorferi sensu stricto* má afinitu ke kloubům, *B. garinii* postihuje nervovou soustavu a *B. afzelii* postihuje kůži (van Dam, 1993, SZÚ). Nejvíce postižena je kůže (65 %), muskuloskeletální aparát (17 %) a nervový systém (14 %) (Roháčová, 2006).

1.3.6. Diagnostika a léčba

Diagnostika lymeské boreliózy je poměrně snadná u jasných projevů jako př. erytema migrans. Obtížnější je u nejednoznačných forem, kdy je nutné současně posuzovat klinické symptomy a laboratorní nález. Základním diagnostickým testem je ELISA a v některých případech i test western blot (pro potvrzení specifických protilátek). Z přímých metod lze využít mikroskopické nálezy a PCR (polymerázovou řetězovou reakci), která je v současnosti nejvyužívanější. Je možná i kultivace borelií, ale je poměrně obtížná (Roháčová, 2006, Bolehovská et al., 2009).

S léčbou lymeské boreliózy je nutné začít včas, aby se zabránilo přechodu do dalších stádií. Vzhledem ke schopnosti spirochet přežít intracelulárně se volí antibiotika, která dobře pronikají do buněk a tkání. Při léčbě se podávají antibiotika, jako jsou peniciliny (doxycylin, amoxycilin), makrolidy (azithromycin, clarithromycin) a další. Při postižení nervové soustavy a srdce je nutné podávat parenterální antibiotika peniciliny a cefalosporiny 3. generace (cefotaxim, ceftriaxon) (Bolehovská et al., 2009, Glatz et al., 2006). Prevence spočívá v ochraně proti klíšťatům, protože zatím není dostupná spolehlivá vakcína. V USA byla vyvinuta vakcína Lymerix založená na aplikaci rekombinantního proteinu OspA. Tato vakcína byla později stažena kvůli nízkému prodeji a vedlejším účinkům (Křupka et al., 2008, Wormser, 2005).

1.4. Přehled dalších onemocnění přenášených klíšťaty

Klíšťata patří mezi přenašeče významných infekčních chorob. Tato onemocnění mohou být způsobena různými patogeny od bakterií, virů, protozoí až po červy. Ve střední Evropě patří k významným infekcím člověka původci lymské boreliózy, virus klíšťové encefalitidy, různé druhy rickettsií, méně často *Francisella tularensis*, *Bartonella* a různé druhy prvoků rodu *Babesia* (Stanek, 2009). K infekcím s vysokým výskytem na území České republiky patří především klíšťová encefalitida a lymská borelióza, ostatní se vyskytují méně často (Roháčová, 2006). Méně časté infekce mohou často doprovázet lymskou boreliózu (Kodrick et al., 1999).

Klíšťová encefalitida (TBE)

Klíšťovou encefalitidu vyvolávají viry z čeledi *Flaviviridae* (Gaunt et al., 2001). Virus klíšťové encefalitidy je sférický RNA virus s lipidovým obalem a je složen ze tří strukturálních proteinů C (kapsidový), M (membránový) a E (obalový) (Heinz et al., 1981). Inkubační doba TBE je 1-2 týdny. Onemocnění má necharakteristické chřipkové příznaky nebo probíhá inaparentně. V ostatních případech dochází k neurologickým postižením různé manifestace (Kaiser, 1999, Roháčová, 2006).

Ehrlichioza – HGA – Lidská granulomatozní anaplasmóza

Ehrlichie jsou původci onemocnění zvířat, ale mohou napadat i člověka. Ehrlichioza je způsobena malou (0,5-1 μ m) intracelulární bakterií *Ehrlichia chaffeensis* příbuznou rickettsiím. U lidí způsobuje onemocnění lidskou monocytární ehrlichiozu, která vede k postižení monocytů. Původcem granulocytární ehrlichiozy je *Anaplasma phagocytophilum*, která napadá granulocyty (Roháčová, 2006, Woldehiwet, 2010, SZÚ).

Bartonelloza (Bacilární pelióza a bacilární angiomatóza)

Bartonelloza je onemocnění způsobené intracelulárními gramnegativními bakteriemi, které napadají hlavně erytrocyty a endoteliální buňky. U nás onemocnění vyvolává *Bartonella henselae*, která napadá hlavně imunodeficientní osoby a osoby žijící ve špatných hygienických podmínkách (Maurin et al., 1997, Kaiser et al., 2010).

Babesióza

Babesióza je vyvolána prvokem babesii, který proniká do erytrocytů a množí se v nich. Mezi původce onemocnění u lidí patří *Babesia microti*, *B. bovis*, *B. divergens* a *B. gibboni*. Onemocnění může být závažné především u imunosuprimovaných osob, často po splenektomii, u nichž může vyvolat těžké systémové postižení končící smrtí (Roháčová, 2006, Dvořáková a Dvořáčková, 2007).

Rickettsióza

Rickettsie patří mezi obligátní intracelulární parazity (kromě *Coxiella burnetii*). Jsou to aerobní gramnegativní tyčky nebo kokobacily napadající endotel cév, makrofágy, lymfocyty a granulocyty. Mezi medicínsky významné druhy přenášené klíšťaty patří *Rickettsia rickettsii* (horečka Skalistých hor) a *R. conori* a *R. africae* (horečka boutonneuse) (Raoult, 1991, Parola et al., 2005, SZÚ).

Tularémie

Původcem onemocnění je gramnegativní bakterie *Francisella tularensis*. Zdrojem onemocnění jsou zajíci nebo divocí králíci. Člověk se může nakazit při zpracování kůže nebo masa (poraněním, perorálně, vzduchem). Klíště při přenosu hraje jen okrajovou roli (Roháčová, 2006, Foley a Nieto, 2010).

1.5. Interakce borelie-klíště

Při této interakci dochází k infekci a pomnožení patogenů v klíštěti. Množení probíhá ve střevě, hemocelu a slinných žlázách. Schopnost určitého druhu klíštěte působit jako vektor závisí na tom, jestli je patogen schopen překonat několik bariér uvnitř klíštěte (Nuttall a Labuda, 2004).

Larvy klíšťat se infikují *B. burgdorferi*, když sají na infikovaných myších a spirochety jsou pak přítomné ve všech následujících stádiích tj. v nymfách a dospělcích. U infikovaných nymf je přítomno extracelulárně v lumen střeva několik set spirochet. Borelie se vyskytují u klíšťat nejčastěji v jejich střevech, kde jsou ukotveny v epiteliálních buňkách pomocí proteinu OspA a OspB (Fikrig et al., 2004, de Silva et al., 1997). Hlavní funkcí proteinu OspA je vazba glykoproteinu TROSPA, který se vyskytuje v epitelu střeva. Protein TROSPA je nutný pro kolonizaci střeva klíšťat boreliemi. Blokáda tohoto proteinu způsobuje snížení adheze

spirochet ke střevu klíštěte (Pal et al., 2004). Přibližně po 48 h sání se dostane několik spirochet přes epitel do hemocelu a invaduje slinné žlázy a poté infikuje hostitele (Ribeiro et al., 1987, Schwan a Piesman, 2002). Bylo zjištěno, že proteiny borelií jsou exprimovány jen v určitých stádiích vývojového cyklu. Například povrchové proteiny OspA a OspB jsou kódovány na bicistronickém operonu a jsou ve velkém množství exprimovány na povrchu spirochet v nenasátých nymfách. Pokud nymfa saje, většina OspA a OspB je odstraněna a místo nich je exprimován OspC, jehož tvorba pokračuje i hostiteli. Tato změna exprese je z části regulována změnou teploty, protože OspC je spirochetami produkován při 32-37°C (Schwan et al., 1995). Geny selektivně syntetizované klíštětem mohou hrát roli v biosyntéze, příjmu živin a v přenosu spirochet (de Silva a Fikrig, 1997). Během životního cyklu mění borelie expresi genů, v důsledku změn prostředí. Tyto změny exprese genů mohou být spojeny s únikem imunitní odpovědi. Proteiny, které váží klíštěcí nebo savčí proteiny, jsou různě exprimovány vektorem a rezervoárovým hostitelem (Anguita et al., 2003).

V průběhu sání infikované nymfy na hostiteli, borelie přítomné ve střevě odpovídají různými způsoby na přicházející krev a zvýšení teploty. Populace přítomných spirochet se zvětšuje a dochází ke změně syntézy proteinů. Poté bakterie migrují ze střeva do slinných žláz, což následně umožňuje jejich přenos do nového hostitele (de Silva a Fikrig, 1995, Montgomery et al., 1996, Ohnishi et al., 2001, Tilly et al., 2008). Povrchový protein OspA *B. burgdorferi* se vyskytuje hojně na povrchu bakteriích přítomných v klíšťatech, ale během sání klíšťat a přenosu borelií do hostitele dochází k jeho snižování (Schwan et al., 1995, Tilly et al., 2008). Následné studie prokázaly, že protein OspA je adhesin důležitý pro udržení borelií ve střevě klíštěte až do dalšího sání na hostiteli (de Silva et al., 1997). Dalším potenciálním adhesinem je OspB (Fikrig et al., 2004). U proteinu BptA *B. burgdorferi* bylo zjištěno, že je důležitý pro perzistenci borelií v klíšťatech a má vliv na virulenci (Revel et al., 2005). Produkt genu BB0690, který pravděpodobně spirochety chrání před oxidativním poškozením, také přispívá k přežívání borelií v klíštěti (Boylan et al., 2003, Tilly et al., 2008). Bylo zjištěno, že pro migraci borelií do slinných žláz během přenosu je nutná regulační kaskáda RpoN-RpoS. Pravděpodobně ale není nezbytná pro přežití spirochet v klíštěti (Fisher et al., 2005, Tilly et al., 2008).

V současné době probíhají studie, které mají objasnit jaké klíštěcí proteiny přispívají k přenosu infekce *B. burgdorferi*. Bylo zjištěno, že protein TROSPA ze střeva klíštěte, je receptorem pro vazbu OspA a jeho přítomnost zvyšuje kolonizaci střeva *B. burgdorferi* (Pal et al., 2004, Tilly et al., 2008). Dále byl objeven imunosupresivní protein Salp15 ze slinných žláz klíštěte. Protein Salp15 se váže k boreliím a specificky interaguje s povrchovým

proteinem OspC, čímž je chrání a usnadňuje infekci hostitele (Ramamoorthi et al., 2005, Anguita et al., 2002). V nedávné době bylo prokázáno, že klíštěcí antioxidant Salp25D, odbourává reaktivní formy kyslíku v místě sání klíštěte a tím napomáhá boreliím ve vstupu do klíštěte (Narasimhan et al., 2007a).

1.6. Interakce borelie-hostitel

Během svého vývojového cyklu se borelie musí vyrovnat s různými podmínkami okolního prostředí. Musí být schopny osídlit trávicí trakt klíštěte, po nasátí krve se přes slinné žlázy dostat do krevního oběhu hostitele, odolat imunitnímu systému hostitele a rozšířit se do cílových orgánů. To je umožněno přesnou regulací povrchových proteinů Osp (Křupka et al., 2008). Nasátou krev klíště ve svém těle zahušťuje a do těla hostitele vrací zpět přebytečnou vodu spolu s boreliemi. K jejich přenosu dochází obvykle po 48-72 hodinách od přísátí. Přítomnost spirochet v krvi je jen krátkodobá a brzy dochází k proniknutí do tkání. Borelie přežívají extracelulárně, ale mohou pronikat i do buněk, například do fibroblastů, endotelových buněk, monocytů a makrofágů (Georgilis et al., 1992, Comstock a Thomas, 1991, Montgomery et al., 1993). Intracelulárně jsou borelie do značné míry chráněny před vlivem imunity a mohou lépe odolávat i léčbě (Steere et al., 2004). Spirochety mohou pronikat i hematoencefalitickou bariérou s vazbou na nervové a gliové buňky mozku (Franz a Krause, 2003). Povrchové lipoproteiny borelií jsou zodpovědné za hostitelskou imunitní odpověď. Aktivují v buňkách NF- κ B (nuclear factor-kappaB) prostřednictvím TLR-2 receptorů a CD14 což vede k produkci protizánětlivých cytokinů. Ta probíhá v monocyto-makrofágových buňkách, fibroblastech, endotelových a žírných buňkách (Bolehovská et al., 2009, Singh a Girschick, 2006). Při poškození tkání hrají roli i zkříženě reagující protilátky (například protilátky proti flagelinu *B. burgdorferi* zkříženě reagují s proteiny CNS). Významné jsou i genetické dispozice. U postižených s revmatoidní artritidou s pozitivním HLA DR2 a HLA DR4 hraje pravděpodobně roli zkřížená reaktivita mezi OspA a vlastním antigenem (Steere, 2001, Bolehovská et al., 2009).

Povrchový protein OspC má schopnost vázat imunoregulační protein slin Salp15 a tím pomáhá boreliím přečkat imunitní reakci v počáteční fázi infekce. Při přechodu do diseminované fáze klesá exprese OspC a na povrchu spirochet se objevuje protein VlsE (Vmp-like sequence, expressed). Tento protein se vyznačuje vysokou antigenní variabilitou, která je podmíněna genovou rekombinací multidoménového VlsE genu. Expresí VlsE borelie

aktivně omezuje působení specifické imunitní odpovědi hostitele a umožňuje přechod do chronické fáze (Křupka et al., 2008, Liang et al., 1999, Zhang et al., 1997). Dále spirochety v hostiteli exprimují molekuly vážící faktor H zapojený do regulace aktivace komplementu. Tyto molekuly pomáhají uniknout mechanismům nespecifické imunity. Patří sem proteiny z rodiny Erp (**OspE/F related proteins**), které jsou sekvenčně homologní k OspE a OspF proteinům. Erp proteiny váží faktor H, brání opsonizaci a fagocytóze (Hellwage et al., 2001). Spirochety jsou schopny produkovat mnoho různých Erp proteinů a to může vysvětlovat široké množství hostitelů, ve kterých borelie přežívají (Stevenson et al., 2002). Dalšími proteiny borelií, které hrají roli v aktivaci komplementu, jsou proteiny CRASP 1-5 (**complement regulator acquiring surface proteins**). CRASP proteiny se váží ke dvěma hlavním regulátorům aktivace alternativní cesty komplementu, a to k faktoru H a FHL-1 (**factor H-like protein 1**). CRASP-1 se váže přednostně k FHL-1 a CRASP-2 k faktoru H. Tato vazba může způsobit inaktivaci vzniklého C3b. Bylo zjištěno, že každá borelie produkuje jiný typ proteinů CRASP s různou citlivostí k lidskému séru. Proteiny CRASP mohou doplňovat funkci Erp proteinů (Zipfel et al., 2002, Kraiczky et al., 2001, Singh a Girschick, 2004). Dále *B. burgdorferi* vážou plasminogen, který se na jejich povrchu přeměňuje na aktivní plasmin. Takto vybavené, mohou spirochety více pronikat do tkání (Coleman et al., 1995, Klempner et al., 1996). Mezi další molekuly exprimované boreliemi patří adhezivní molekuly vnější membrány umožňující uchycení na pojivové tkáni. Proteiny DbpA a B (**Decorin binding protein A and B**) mají schopnost vázat se ke kolagenu přes proteoglykan dekorin. Dbp proteiny mohou být zapojeny v tropismu borelií ke tkáním obsahujícím decorin (kůže a klouby), které jsou spojeny s lymfskou boreliózou (Guo et al., 1998, Cullen et al., 2004). Spirochety vykazují vysokou hemaglutinační aktivitu, za kterou je odpovědný hemaglutinin Bgp (**Borrelia glucosaminoglycans binding protein**) lokalizovaný ve vnější membráně. Glukosaminoglykany jsou exprimovány prakticky všemi eukaryotickými buňkami nesoucími jádro, proto je proteim Bgp spojován s multisystémovým projevem lymfské boreliózy (Leong et al., 1995, Kjellen a Lindahl, 1991, Cullen et al., 2004). Za adhezi v časně fázi infekce jsou pravděpodobně odpovědné β 3-chain integrin binding proteins, protože ještě nedochází ke změnám spojeným se zánětem a integriny jsou vystaveny na povrchu buněk zasažené tkáně (Cullen et al., 2004, Coburn et al., 1999). Dalším proteinem usnadňujícím adhezi je Fn-BA (**fibronectin-binding protein A**) (Cullen et al., 2004, Fischer et al., 2006).

Výsledek infekce hostitele závisí na tropismu patogena k určitým buňkám nebo tkáním, na druhu patogena a na imunitním stavu hostitele (Nuttall a Labuda, 2004). Během

infekce hostitele boreliemi dochází k expresi různých genů spirochet. Prvním izolovaným genem, který byl specifický pro hostitele je p21. V současnosti byly identifikovány další geny např. eppa, pG, bbk2.10 a bmpD. Tyto geny jsou homologní s povrchovými proteiny OspE (homolog p21) a OspF (homology bbk2.10 a pG) (Suk et al., 1995, de Silva a Fikrig, 1997). Podnětem k expresi genů bakteriemi je pravděpodobně změna teploty, složky krve, biochemické změny u nasátých a nenasátých klíšťat a imunitní odpověď hostitele (Stevenson et al., 1995, de Silva a Fikrig, 1997).

1.7. Interakce klíště-hostitel

1.7.1. Imunitní odpověď hostitele proti klíštěti

Naivní hostitel

První kontakt klíštěte s imunitním systémem začíná, když pronikne sacím ústrojím do kůže. Místní leukocyty epidermis a dermis se dostávají jako první do styku s ústním ústrojím klíštěte a slinami. Tyto buňky vylučují mediátory a chemotaktické faktory, které způsobují další příliv buněk (neutrofilů) do místa sání. Hlavní část buněk v místě sání tvoří neutrofilové, dále pak eozinofily, monocyty, makrofágy, bazofily a žírné buňky (Den Hollander a Allen, 1985a, Gill, 1986). V kůži jsou přítomny dendritické Langerhansovy buňky, které reagují s antigeny slin. Tyto buňky poté migrují do regionálních lymfatických uzlin a prezentují antigen T lymfocytům, čímž indukují vývoj adaptivní imunitní odpovědi (Banchereau a Steinman, 1998, Nithiuthai a Allen, 1985). Tato imunitní odpověď je však jen regionální a jen buňky z regionálních lymfatických uzlin jsou schopny proliferovat in vitro za přítomnosti antigenů slin. Proto není imunitní reakce vyvolaná sáním na naivním hostiteli dostatečná a klíště může na hostiteli dokončit sání (Ganapamo et al., 1995, Ganapamo et al., 1996a, Francischetti et al., 2009).

Imunní hostitel

Při opakovaném sání klíštěte tvoří hlavní část infiltrátu bazofily (50%, u myši žírné buňky) a eosinofily a dochází k degranulaci bazofilů a žírných buněk. Tato imunitní reakce je označována jako kožní bazofilní hypersenzitivita (Den Hollander a Allen, 1985a, Gill, 1986). Degranulované bazofily uvolňují histamin, který lokálně zvyšuje propustnost kapilár a umožňuje příliv eosinofilů. Degranulace bazofilů a uvolnění mediátorů v místě sání klíštěte

představuje hlavní mechanismus v rezistenci proti klíštěti. Navíc histamin způsobuje svědění v místě sání a tím může upozornit na přítomnost klíštěte. Bylo zjištěno, že při sání dospělých klíšťat na morčatech došlo k vývoji rezistence při následném sání larev (Brown a Askenase, 1983, Askenase et al., 1981, Brossard a Wikel, 1997).

1.7.2. Obrana klíštěte před imunitním systémem hostitele

Klíště potlačuje prostřednictvím látek ve slinách specifický i nespecifický imunitní systém. Tyto látky mají antikoagulační, protizánětlivý, imunosupresivní a vazodilatační účinek (Wikel a Bergman, 1997, Francischetti et al., 2009). V nespecifické složce imunitního systému dochází například k potlačení NK buněk, neutrofilů, produkce NO makrofágy, alternativní cesty komplementu a fagocytózy (Kopecký a Kuthejlová, 1998, Kýčková a Kopecký, 2006, Lawrie et al., 2005). V specifické složce imunitního systému dochází k redukci funkce T lymfocytů a snížení jejich proliferativní odpovědi po stimulaci mitogeny (Ribeiro et al., 1985, Urioste et al., 1994, Gillespie et al., 2001). Dochází také k potlačení aktivity B lymfocytů a k vazbě IgG (Wang a Nuttall, 1994, Hannier et al., 2003).

Cytokiny hrají hlavní roli v regulaci imunitní odpovědi, proto jsou vyvinuty u klíšťat mechanismy, které ovlivňují jejich produkci (Kroemer et al., 1993). Vlivem látek přítomných ve slinách dochází ke snížení produkce prozánětlivých cytokinů IL-1 a TNF- α makrofágy a IL-12, TNF- α dendritickými buňkami. Dále bylo zjištěno, že po stimulaci ConA a OVA sliny inhibovaly produkci IL-2 T lymfocyty (Ramachandra a Wikel, 1992, Cavassani et al., 2005, Sá-Nunes et al., 2007). V přítomnosti extraktu ze slinných žláz (SGE) klíštěte *D. andersoni* došlo ke snížení produkce IL-2 a IFN- γ subpopulací lymfocytů Th1 (Ramachandra a Wikel, 1992). Navíc u myši, na kterých sály nymfy *I. scapularis*, došlo po stimulaci ConA ke snížení produkce IL-2 a IFN- γ a zvýšení IL-4 a IL-10. To naznačuje, že sání klíšťat směřuje imunitní odpověď k Th2 profilu a potlačuje cytokiny Th1 subpopulace (Zeidner et al., 1997, Schoeler et al., 1999, Ferreira a Silva, 1999, Kopecký et al., 1999). Subpopulace Th1 je totiž odpovědná za aktivaci makrofágů a společně s aktivací bazofilů vede k zamezení sání klíštěte (Ferreira a Silva, 1999, Falcone et al., 2001).

1.7.3. Imunomodulační účinky slin

Ve slinách klíšťat je obsažen široký okruh fyziologicky aktivních molekul, které jsou nezbytné pro sání na hostiteli a pro přenos patogenů. Tyto látky ovlivňují procesy probíhající v hostiteli, jako například koagulaci, fibrinolýzu, imunitní pochody a angiogenezi. Jejich tvorba výrazně stoupá během sání (Brossard a Wikel, 2004, Fukomoto et al., 2006, Maritz-Olivier et al., 2007).

1.7.3.1. Antikoagulanty

Sání klíšťete je ztěžováno hemostatickou odpovědí hostitele. Proto je ve slinách klíšťat obsaženo široké spektrum molekul, které ovlivňují koagulaci, vazokonstrikci, zvyšují fibrinolýzu a inhibují shlukování destiček (Maritz-Olivier et al., 2007). Mezi regulační proteiny ze slin patří hlavně inhibitory trombinu, faktoru X a TF, tj. proteáz, které řídí proteolytickou koagulační kaskádu vedoucí k tvorbě fibrinu. Klíšťecí antikoagulanty TAP a Ixolaris způsobují inhibici koagulačního faktoru Xa (FXa), serinové proteázy katalyzující tvorbu trombinu v obou cestách koagulace (Waxman et al., 1990, Francischetti et al., 2002). Mezi specifické trombinové inhibitory patří ornithodorin, americanin, ixin a 60 kDa protein (van de Locht a Stubbs, 1996, Zhu et al., 1997, Hoffmann et al., 1991, Horn et al., 2000). Přichycení a shlukování krevních destiček je potlačováno enzymem apyrázou a dále sadou specifických proteinů, které blokují interakce krevních destiček, vyvolané kolagenem nebo fibrinogenem. Apyráza brání shlukování krevních destiček hydrolýzou ATP a ADP na AMP a monofosfát (Titus a Ribeiro, 1990, Mans et al., 2000). PGI₂ ze slin klíšťete zvyšuje koncentraci cAMP v destičkách, inhibuje sekreci ADP a shlukování destiček (Bowman et al., 1996, Pedibhotla et al., 1997). PGI₂ společně s PGE₂ jsou vazodilatátory způsobující relaxaci hladkého svalstva a zvýšení krevního toku. Další funkcí PGE₂ ve slinných žlázách klíšťat je mobilizace Ca²⁺, která je spojena se stimulací sekrece bioaktivních proteinů do slin klíšťete během sání (Bowmn et al., 1996, Qian et al., 1998, Kovář, 2004).

Další molekuly savignygrin a variabilin brání shlukování destiček zamezením navázání jiných ligandů na receptor destiček. Oba obsahují integrin-rozpoznávající motiv RGD a využívají ho k vazbě k integrinům (Mans et al., 2002, Wang et al., 1996). Disagregin a TAI postrádají motiv RGD a zabraňují shlukování destiček, tím že se naváží na fibrinogen (disagregin) a kolagen (TAI) (Karczewski et al., 1994, 1995). Mechanismus inhibice

proteinem moubatinem (brání aktivaci destiček kolagenem) z klíštěte *O. moubata* je zatím neznámý (Kovář, 2004, Waxman a Connolly, 1993).

1.7.3.2. Imunosupresory

Většina buněk, která infiltruje místo přisátí klíštěte, je inhibována klíštěcími slinami. Po kontaktu se slinami dochází například u NK buněk, neutrofilů, makrofágů a většiny T buněk ke snížení jejich aktivity (Kubeš et al., 1994, Kopecký a Kuthejlová, 1998, Ribeiro et al., 1990, Ramachandra a Wikel, 1992). PGE₂ produkovaný ve slinných žlázách klíšťat inhibuje mononukleární buňky hostitele (Inokuma et al., 1994). Produkty buněk, které infiltrují místo přisátí, jsou inhibovány klíštěcím antioxidantem Salp25D (Das et al., 2001). Navíc uvolnění chemotaktických faktorů způsobuje infiltraci místa přisátí CD4⁺ Th lymfocyty a Langerhansovými buňkami při dalším sání klíštěte (Nithiuthai a Allen, 1984, Mbow et al., 1994a). Dále bylo prokázáno, že sliny klíštěte *I. scapularis* inhibují produkci anafylatoxinů a sekretují proteiny vážící IL-8. Působením homologu MIF (macrophage migration inhibitory factor) může docházet k blokování tvorby chemoatraktantů a snížení počtu buněk infiltrujících místo přisátí (Ribeiro et al., 1990, Ribeiro a Spielman, 1986).

V adaptivní proti-klíštěcí imunitě se zdají být nejefektivnější protilátky izotypu IgE, které se váží na Fc receptor na bazofilech a žírných buňkách. Tyto buňky pak produkují histamin, který inhibuje produkci slin a sání (Den Hollander a Allen, 1985a, Wikel, 1996). Proto jsou u klíšťat vyvinuty mechanismy, díky nimž dochází k neutralizaci histaminu (protein HBP). Schopnost vázat chemokiny (protein Evasin-1) byla poprvé prokázána u klíštěte *R. sanguineus* (Frauensuh et al., 2007). Evasin-1 specificky váže CCL3, CCL4 a CCL18. Posléze byly identifikovány další Evasiny: Evasin-3 (váže CXCL8 a CXCL1) a Evasin 4 (váže CCL5 a CCL11) (Déruaz et al., 2008).

Sliny klíšťat obsahují molekuly, které specificky inhibují aktivaci komplementu. Aktivace alternativní cesty komplementu je často spojena s rezistencí proti klíštěti (Wikel, 1979, Papatheodorou a Brossard, 1987). Mezi první objevené klíštěcí antikomplementové proteiny patří protein isac, který inhibuje aktivaci komplementové kaskády tím, že reaguje s C3 konvertázou, a zabraňuje spojení faktoru B s C3b. Naproti tomu tento protein nemá žádný efekt na klasickou cestu aktivace komplementu (Lawrie et al., 1999, Guo a Ward, 2005). Mezi další objevené molekuly s antikomplementovým účinkem patří Salp20, IRAC I a IRAC II z klíštěte *I. ricinus* (Tyson et al., 2007, Schroeder et al., 2007). U měkkého klíštěte

O. moubata je přítomen inhibitor aktivace C5 (OmCI), který se váže na C5 konvertázu a tím inhibuje klasickou i alternativní cestu komplementu (Nunn et al., 2005).

Dále jsou ve slinách klíšťat přítomny inhibitory B buněk. Ve slinách klíštěte *I. ricinus* je přítomen protein BIP (**B** cell inhibitory protein), který inhibuje proliferaci myších B lymfocytů. Suprese B lymfocytů umožňuje klíšťatům překonat protilátkovou odpověď hostitele. Kromě toho nejsou B lymfocyty za přítomnosti proteinu BIP schopny reagovat na přítomnost antigenů *Borrelia burgdorferi* (Yu et al., 2006).

Příkladem inhibitoru aktivace T lymfocytů je protein Salp15 ze slin *I. scapularis*. Tento protein se specificky váže na CD4 molekulu na CD4+ Th lymfocytech, a to vede k zablokování T receptoru, snížení produkce IL-2 a tím i snížení proliferace T lymfocytů (Garg et al., 2006, Anguita et al., 2002). Mezi další imunopresivní proteiny se řadí inhibitory serinových proteáz, serpiny. Patří mezi ně protein Iris, u kterého bylo prokázáno, že vykazuje pleiotropní efekt, protože interferuje jak s imunitní odpovědí, tak s hemostázou hostitele. Iris působí na T buněčnou odpověď prostřednictvím inhibice IFN- γ , IL-6 a TNF- α , a dále inhibuje adhezi destiček, koagulaci a fibrinolýzu. Bylo prokázáno, že protein Iris se váže k monocytům/makrofágům a brání jim v sekreci TNF- α (Leboulle et al., 2002, Prevot et al., 2006, 2009, Chmelař, 2005). Aktivace T lymfocytů je snižována i proteinem vázajícím IL-2 (*I. scapularis*), který je T lymfocyty autokrinně produkován a je nezbytný pro jejich klonální expanzi (Gillespie et al., 2001).

V průběhu sání klíštěte se aktivuje humorální (produkce protilátek, Th2) i buněčná (zánět, Th1) složka imunitní odpovědi. Vlivem slin klíštěte dochází ke zvýšení (IL-4, IL-10) nebo snížení (IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α) produkce některých cytokinů. Snížení cytokinu IL-2 (Th1, autokrinní stimulátor T lymfocytů) odpovídá snížené proliferaci T lymfocytů (Kovář et al., 2001, 2002, Francischetti et al., 2009., Kopecký et al., 1999). Protein Iris ze slin klíštěte může být jedním z hlavních faktorů ovlivňujících produkci cytokinů a inhibici lymfocytů (Leboulle et al., 2002). Společně se Salp15 (snižuje produkci IL-2) produkují klíšťata i protein IL-2BP, který snižuje množství IL-2 v místě sání (Anguita et al., 2002). Polarizace k Th2 odpovědi je výhodná jak pro klíště samotné tak i pro jím přenášené patogeny, pravděpodobně díky schopnosti klíštěte vylučovat imunoglobuliny a přímé inhibici produkce protilátek. Klíštěcí protein IgBP váže vstřebaný hostitelský IgG, který prošel přes střevo klíštěte do hemolymfy a dostává se zpět do hostitele prostřednictvím slin (Ferreira a Silva, 1999, Ogden et al., 2002, Matsumoto et al., 2001).

Tab. 1. Přehled molekul ve slinách klíštěte (Kovář, 2004, Hovius a Fikrig, 2008).

TYP MOLEKULY	NÁZEV	ČELEĎ KLÍŠŤAT	FUNKCE	CHARAKTERISTIKA	
Antikoagulanty	TAP	<i>Argasidae</i>	inhibitor faktoru Xa	inhibitor serinových proteáz	
	Salp14	<i>Ixodidae</i>	inhibitor faktoru FXa	protein	
	inhibitor FXa (FXaI)	<i>Argasidae</i>	inhibitor faktoru FXa	podobný TAP	
	ixolaris	<i>Ixodidae</i>	inhibitor aktivace faktoru X (FX)	podobný TFPI (tissue factor pathway inhibitor)	
	penthalaris	<i>Ixodidae</i>			
	-	<i>Ixodidae</i>	pravděpodobně antikoagulant	seinová proteáza	
Inhibitory trombinu	ornithodorin	<i>Argasidae</i>	inhibitor trombinu	podobný TAP	
	americanin	<i>Ixodidae</i>	inhibitor trombinu	protein	
	ixin	<i>Ixodidae</i>	inhibitor trombinu, antitrypsinové aktivity	pravděpodobně miniprotein	
	-	<i>Ixodidae</i>	inhibitor trombinu	60-kDa protein	
	microphilin	<i>Argasidae</i>	inhibitor trombinu	1,8- kDa peptid	
	mandanin 1 a 2	<i>Ixodidae</i>	inhibitory trombinu, vnitřní i vnější cesty koagulace	7-kDa proteiny, nejsou homologní s ostatními inhibitory trombinu	
	variegin	<i>Ixodidae</i>	inhibitor trombinu	32 AK polypeptid, strukturně i funkčně podobný hirulogu	
	savignin	<i>Argasidae</i>	inhibitor trombinu	protein, sekvenční podobnost s ornithodorinem	
	Inhibitory agregace destiček	apyráza	<i>Ixodidae, Argasidae</i>	hydrolýza ATP a ADP	5'-nukleotidáza
		savignygrin	<i>Argasidae</i>	vazbou integrinů brání adhezi buněk	peptid podobný disintegrinu
variabilin		<i>Ixodidae</i>	vazbou integrinů brání adhezi buněk	peptid podobný disintegrinu	
disagregin		<i>Argasidae</i>	inhibitor adheze destiček k fibrinogenu	nemá RGD motiv	
moubatin		<i>Argasidae</i>	inhibuje aktivaci destiček kolagenem	17-kDa protein	
TAI		<i>Argasidae</i>	blokuje adhezi destiček ke kolagenu	15-kDa protein	
Prostaglandiny (PG)		PGA2/PGB2, PGD2, PGE2, PGF2, PGI2	<i>Ixodidae</i>	vazodilatace, inhibice agregace destiček, potlačení proliferace, stimulace sekrece bioaktivních proteinů klíšťaty, atd.	prostaglandiny
Inhibitory komplementu	isac	<i>Ixodidae</i>	podobný komplementovému faktoru H, inhibice alternativní cesty	odlišný od komplementového faktoru H	
	OmCI	<i>Argasidae</i>	specificky váže C5	16-kDa protein, díky lipocalinu brání interakci C5 s C5 konvertázou	
	Isac	<i>Ixodidae</i>	váže C3 konvertázu	18,5 kDa protein, reguluje aktivaci komplementu, podobný lidskému faktoru H	
	IRAC I a II	<i>Ixodidae</i>	ovlivňují alternativní cestu komplementu	proteiny	

	Salp20	<i>Ixodidae</i>	působí na C3 konvertázu	člen proteinové rodiny Isac
Imunomodulátory	Iris	<i>Ixodidae</i>	imunosuprese, imunomodulace	podobný LEI (leukocyte elastase inhibitor)
	Salp15	<i>Ixodidae</i>	inhibice produkce IL-2	podobný inhibinu A (rodina TGF- β)
	B buněčný inhibiční protein	<i>Ixodidae</i>	inhibice B lymfocytů	inhibuje proliferaci B lymfocytů po antigení stimulaci <i>B. burgdorferi</i>
	B buněčný inhibiční faktor	<i>Ixodidae</i>	inhibice B lymfocytů	inhibuje proliferaci B lymfocytů po stimulaci LPS
Vazebné proteiny	IL-2BP	<i>Ixodidae</i>	inhibuje T buňky vazbou IL-2, pravděpodobně způsobuje T buněčnou anergii	protein
	Evasin-3	<i>Ixodidae</i>	vazbou IL-8 inhibuje IL-8 indukovanou chemotaxi	protein
	HBPs	<i>Ixodidae</i>	potlačuje zánět vazbou histaminu nebo serotoninu, možná i další funkce	lipokaliny s jedním nebo dvěma vazebnými místy
	IgBP	<i>Ixodidae</i>	váže IgG, hraje roli v exkreci IgG slinnými žlázami klíštěte	pravděpodobně glykoprotein
Homology cytokinů	homolog MIF	<i>Ixodidae</i>	inhibuje migraci lidských makrofágů podobně jako lidský MIF	sekvence proteinu je ze 40% identická lidskému MIF
Ostatní	Salp25D	<i>Ixodidae</i>	antioxidant	homolog glutathion peroxidázy

1.7.4. Způsob přenosu borelií

Spirochety se mohou přenášet transstadiálně, z jednoho vývojového stádia do druhého, kdy se první vývojové stádium tj. larva nakazí sáním krve od infikovaných drobných živočichů. Infekce pak přetrvává i v dalších vývojových stádiích klíštěte, tedy v nymfách a dospělých (Havlík, 2010, Toutoungi a Gern, 1993, Sun a Xu, 2003). Bylo prokázáno, že u klíšťat je možný i transovariální přenos tj. přenos nákazy z infikované samičky na vajíčka. Nicméně tento způsob přenosu se vyskytuje jen málo (asi jen 1% vajíček může být infikováno) a je zřejmě jen okrajový při přenosu patogenů (Nefedova et al., 2004). Zvláště významný je slinami aktivovaný přenos (SAT), při kterém látky přítomné ve slinách klíšťat podporují přenos patogenů a jejich proliferaci v hostiteli (Nuttal a Labuda, 2004, Pechová et al., 2002, Horká et al., 2009, Jones et al., 1992, Jones et al., 1989).

1.7.5. Slinami aktivovaný přenos (SAT) u *B. burgdorferi*

Imunomodulační účinky slin jsou zodpovědné za jev zvaný slinami aktivovaný přenos (SAT). Tento jev byl poprvé pozorován u viru Thogoto, kdy při infekci morčat tímto virem společně s extraktem ze slinných žláz (SGE) klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus* bylo infikováno desetkrát více nymf ve srovnání s kontrolou (Jones et al., 1989, 1992). Slinami aktivovaný přenos byl prokázán pro různé druhy patogenů přenášených klíšťaty (Jones et al., 1989, Labuda et al., 1993, Kročová et al., 2003). Nepřímý důkaz SAT byl podán pro spirochety *B. burgdorferi*. Myši infikované *B. afzelii* společně s SGE klíštěte *I. ricinus* měly zvýšenou bakteriémiu ve srovnání s kontrolou, u které SGE nebyl použit. Podání SGE společně s boreliemi podstatně zvýšilo procento infikovaných nymf po sání v blízkosti místa inokulace ve srovnání s nymfami, které sály na myších infikovaných jen spirochetami. Později byl prokázán i první přímý důkaz slinami aktivovaného přenosu SGE klíštěte *I. ricinus* na infekci *B. burgdorferi*. Bylo zjištěno, že SGE zvyšuje proliferaci spirochet. První den po infekci došlo k čtyřnásobnému zvýšení spirochet v kůži a desetinásobnému zvýšení v krvi ve srovnání s kontrolou (Pechová et al., 2002). Vysvětlením tohoto časného efektu SGE na proliferaci borelií může být v místním a krátkodobém vlivu SGE na imunitní systém v kůži (Macháčková et al., 2006). Vliv SAT na přenos a proliferaci *B. burgdorferi* v hostiteli má pravděpodobně imunologický základ. Inhibiční účinek slin hraje roli v nespecifické imunitní odpovědi. Jedním z mechanismů podporujících přenos *B. burgdorferi* může být antikomplementový účinek slin (Kurtenbach et al., 1998). SGE chrání borelie před cytotoxickým účinkem komplementu, dochází k potlačení prozánětlivých cytokinů a snížení počtu T lymfocytů v místě inokulace (Kopecký, 2008, Ribeiro et al., 1987, 1990, Urioste et al., 1994). Dalším účinkem slin, který zřejmě podporuje přenos borelií, je inhibice fagocytózy a zabíjení spirochet makrofágy. Bylo zjištěno, že klíštěcí sliny nebo SGE potlačují fagocytózu borelií makrofágy a současně i jejich zabíjení ve fagocytech inhibicí produkce NO nebo superoxidu (Kuthejlová et al., 2001, Ribeiro et al., 1990). Protizánětlivý efekt slin (snížení počtu leukocytů a $\gamma\delta$ -T lymfocytů v epidermis) může přispět k přežití borelií v místě sání (Nuttall et al., 2000, Severinová et al., 2005). Tyto účinky slin nebo SGE mohou být spojeny s jejich schopností inaktivovat anafylatoxiny, vázat histamin a protilátky, inhibovat prozánětlivé cytokiny a NK buňky a inhibovat antivirové působení interferonu (Ribeiro a Spielman, 1986, Paesen et al., 1999, Ramachandra a Wikel, 1992, Pechová et al., 2004, Kubeš et al., 1994, Hajnická et al., 2000). Byl také pozorován přímý efekt SGE na růst borelií v BSK-H médiu (Rudolf a Hubálek, 2003). Podobný přímý důkaz SAT byl prokázán u viru

klíšťové encefalitidy, spirochet *Borrelia afzelii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. lusitaniae* a *Francisella tularensis* (Nuttall a Labuda, 2004, Nuttall a Paesen, 2000, Horká et al., 2009, Macháčková et al., 2006, Pechová et al., 2002, Kročová et al., 2003).

Jako první známý SAT faktor byl popsán 15 kDa protein Salp15 ze slinných žláz klíštěte *I. scapularis*. Tento protein usnadňuje infekci myši boreliemi a jeho exprese ve slinných žlázách je zvyšována přítomností spirochet v klíštěti. Salp15 se váže na povrchový protein borelií OspC a tím je chrání před účinkem protilátek. Inokulace borelií společně se Salp15 do naivních a imunizovaných myší výrazně zvýšila jejich proliferaci ve tkáních. Po potlačení proteinu Salp15 za využití RNA interference se drasticky snížila schopnost spirochet infikovat myši (Ramamoorthi et al., 2005). Díky Salp15 dochází k inhibici aktivace CD4⁺ T lymfocytů a potlačení funkce lidských dendritických buněk. Salp15 se specificky váže na molekulu CD4 na CD4⁺ T lymfocytech a to má za následek snížení produkce IL-2 a proliferace T buněk. Salp15 inhibuje TLR (Toll-like receptor) receptory a *B. burgdorferi* indukovanou produkci prozánětlivých cytokinů dendritickými buňkami tím, že interaguje s lektinovým receptorem DC-SIGN (Anguita et al., 2002, Hovius et al., 2008a,b). To naznačuje, že Salp15 může modulovat adaptivní imunitní odpověď (Hovius et al., 2008a). U klíště *I. ricinus* byl popsán protein homologní k Salp15, Salp15 Iric-1. U proteinu Salp15 Iric-1 byly zjištěny podobné vlastnosti jako u Salp15. Salp15 Iric-1 je schopný vázat OspC *B. garinii* a *B. afzelii*, ale tyto druhy borelií nebyly chráněny před protilátkami (Hovius et al., 2007, 2008c). Protein Salp15 je schopen zabránit vývoji atopického astmatu. Toho může být využito ke zmírnění atopických a autoimunitních onemocnění (Paveglio et al., 2007).

Dalším pravděpodobným SAT faktorem je sialostatin L2 z klíštěte *I. scapularis*. Po aplikaci sialostatínu L2 společně s *B. burgdorferi* myším došlo k zvýšení proliferace borelií. V místě vpichu došlo k šestinásobnému zvýšení množství spirochet. Sialostatin L2 vykazuje protizánětlivou funkci a inhibuje proliferaci cytotoxických T lymfocytů (Kotsyfakis et al., 2006). Vakcinace morčat imunosupresivním proteinem sialostatinem L2 může vést u nymf *I. scapularis* ke snížení schopnosti sání. U nymf sajících na imunizovaných zvířatech došlo ke snížení počtu přísátých nymf, prodlouženému sání a k zřejmým znakům vývoje zánětu (Kotsyfakis et al., 2008).

1.8. Trans-block vakcíny

Vakcíny blokující přenos patogenů jsou navrženy k tomu, aby zabránily přenosu jednoho nebo více patogenů nesených klíšťaty. V roce 1939 bylo pozorováno, že klíšťata po několika předchozích sáních, nejsou schopná úspěšně sát na hostiteli. Po opakovaném sání klíšťat *Dermacentor variabilis* na morčatech, došlo k úhynu klíšťat (Trager, 1939). Získaná rezistence proti klíšťatům se projevuje snížením nasátí, prodlouženou dobou sání, zabráněním přeměny do dalších stádií, sníženou produkcí vajíček a mortalitou klíšťat (Wikel et al., 2004). Dále proteiny ze slin produkované během prvních 24 hodin, kdy saje klíště na hostiteli, jsou schopné vyvolat imunitní odpověď proti klíštěti (Narashima et al., 2007b). Imunita proti klíšťatům neovlivňuje jen sání klíšťat, ale může také interferovat s přenosem patogenů (*Francisella*, *Babesia*, *Borrelia*, TBE) (Bell et al., 1979, Mishaeva, 1990, Wikel et al., 1997, Francis a Little, 1964). Opakované sání nymf nebo larev *I. scapularis* na morčatech vedlo ke snížení doby sání klíšťat, snížení váhy a jen jedno z 18 morčat bylo pozitivní na přítomnost borelií ve srovnání s kontrolou. To naznačuje, že imunita proti klíšťatům interferuje s přenosem spirochet (Nazario et al., 1998). Navíc bylo zjištěno, že u lidí dochází po opakovaném sání klíšťat k vývoji oddáleného typu přecitlivělosti a k menší pravděpodobnosti vývoje lymfské boreliózy (Burke et al., 2005). Získaná rezistence se však nevyvíjí u všech interakcí klíště-hostitel. U BALB/c a C3H/HeN myši nedochází k vývoji rezistence k nymfám nebo larvám *I. ricinus* (Mbow et al., 1994). I přesto může opakované sání stimulovat imunitní odpověď hostitele. Opakované sání nymf *I. scapularis* na myších BALB/c vyvolalo rezistenci k následnému přenosu *B. burgdorferi* B31. Podobné výsledky byly zjištěny, když bylo myším aplikováno sérum z králíků imunních proti sání klíšťat (Narashima et al., 2007). Tato pozorování značí, že klíštěcí proteiny by mohly být využity k vakcinaci proti přenosu borelií (Schuijt et al., 2010).

Základním krokem ve vývoji vakcín je identifikace vhodných antigenů. Vakcína může být namířena proti skrytým nebo exponovaným antigenům. Exponované antigeny jsou sekretovány slinami během sání klíšťat (proteiny nebo peptidy syntetizované ve slinných žlázách), zatímco skryté antigeny jsou za normálních podmínek nedostupné imunitnímu systému (antigeny střev). V současnosti byla popsána ještě další skupina antigenů, ve které se kombinují vlastnosti skrytých a exponovaných antigenů. Proti-klíštěcí efekt je charakterizován mortalitou klíšťat a vajíček, nedokončením sání, prodlouženým sáním, snížením snůšky vajíček a neschopností přeměny do dalšího stadia (Nuttall et al., 2006).

Příkladem vakcíny, využívající skryté antigeny, je vakcína proti klíštěti *Boophilus microplus*. Vakcína je založená na imunizaci imunodominantním glykoproteinem Bm86 z epiteliálních buněk střeva (Willadsen et al., 1988, 1995). Nevýhodou je, že při imunizaci skrytými antigeny nemusí dojít k zabránění přenosu patogenů. Proto se zdá být výhodnější využití exponovaných antigenů, protože bylo prokázáno, že opakované sání neinfikovaných klíšťat na zvířatech u nich vyvolává rezistenci (Mulenga et al., 2000, Nazario et al., 1998).

První vakcínou proti lymbské borelióze použitou u lidí, byla vakcína Lymerix uvedená na trh v roce 1998. Tato vakcína byla založená na rekombinantním povrchovém proteinu OspA a blokovala přenos *B. burgdorferi*. Po imunizaci tímto proteinem došlo, díky protilátkám proti OspA, ke zničení borelií ve střevě nasátých klíšťat (de Silva et al., 1996, 1997). V roce 2002 byla stažena pro vedlejší účinky a nízký prodej. U osob s genem HLA DR4 docházelo ke vzniku revmatoidní artritidy a dalším projevům podobným lymbské borelióze (Kalish et al., 1993, Parenti, 2000). V současnosti se vyvíjejí další vakcíny založené na proteinu OspA, u kterých by nemělo docházet k vedlejším účinkům (Willett et al., 2004, Koide et al., 2005).

V současnosti je ve vývoji vakcína založená na 22 kDa povrchovém lipoproteinu OspC, jehož nositelem je cirkulární plasmid přítomný v rámci celého komplexu *B. burgdorferi* sensu lato (Marconi et al., 1993, Sadziene et al., 1993). Problémem zůstává heterogenita proteinu OspC, která je pozorována i u stejných druhů borelií. Možným řešením by mohla být chimerická vakcína složená z protektivních epitopů proteinů OspC z různých fylogenetických skupin, která by vyvolávala širokou protekci (Wang et al., 1999, Earnhart et al., 2005, 2007).

Dalším kandidátem na vakcínu blokuující přenos *B. burgdorferi* je protein DbpA. Bylo prokázáno, že DbpA chránil myši proti následné infekci boreliemi (Hagman et al., 1998, Feng et al., 1998). Při dalším pokusu, kdy byly myši imunizované DbpA a sály na nich nymfy *I. scapularis* infikované spirochetami, však nedošlo k vývoji imunity proti infekci. Tento nedostatek protekce koreluje s nedostatečnou expresí DbpA boreliemi v klíšťatech. Proto DbpA není pravděpodobně vhodný jako vakcína proti lymbské borelióze (Hagman et al., 2000).

Jako slibní kandidáti na vakcínu se zdají být glykolipidy *B. burgdorferi*. U 80% pacientů v pozdním stádiu lymbské boreliózy byly zaznamenány protilátky proti glykolipidu ACGal (6-O-acylated cholesteryl beta-D-galactopyranoside). Navíc ACGal je rozšířený mezi *B. burgdorferi*, *B. afzelii* a *B. garinii*, a protilátky proti ACGal reagují s těmito druhy borelií (Stubs et al., 2009, 2010).

V poslední době bylo připraveno několik antigenů ze slin jako rekombinantní proteiny, které byly použity jako vakcíny proti klíšťatům a jimi přenášeným patogenům. Žádný z těchto rekombinantních antigenů zatím nebyl uveden na trh (u 64TRP probíhají zkoušky na dobytku). Probíhají zkoušky s rekombinantním proteinem z klíštěte *Haemaphysalis longicornis* HL 34, který v pokusech indukoval morbiditu a mortalitu u dospělců i nymf. Dále byl u toho klíštěte identifikován antigen p29 (pravděpodobně protein cementu). Imunizace králíků rekombinantním proteinem p29 vedla v 40% a 56% k úmrtí larev a nymf. Další imunodominantní protein cementu (RIM36) klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus* vyvolává silnou protilátkovou odpověď u dobytka (Mulenga et al., 1999, Bishop et al., 2002, Nuttall et al., 2006). U klíštěte *R. appendiculatus* byl objeven cementový protein 64P, který i přesto že patří mezi sekretované antigeny, může skříženě reagovat s antigeny střeva, hemolymfy a slinných žláz. Působení rekombinantního proteinu (64TRP) je založeno na indukcii humorální a DTH odpovědi, které postihují jak místo sání tak i střevo klíštěte (Trimnell et al., 2002, 2005). Imunizace rekombinantním proteinem 64TRP vedla v místě přísátí klíštěte (u morčat, králíků, křečků a dobytka) k humorální a buněčné odpovědi a oddálenému typu přecitlivělosti. Protilátky proti 64TRP reagovaly s epitopy ve střevě klíštěte a to mělo za následek protržení střeva (Trimnell et al., 2005). Myši imunizované 64TRP byly chráněny před virem klíšťové encefalitidy (TBE) přenášeným *I. ricinus* (Labuda et al., 2006).

Mezi další slibné kandidáty na proti-klíštěcí vakcínu patří feritin 2. Tento nově objevený protein je vylučován do hemolymfy klíštěte a jeho hlavní funkcí je transport železa z trávicího traktu klíštěte do jiných orgánů, zejména do slinných žláz a vaječnic. Vakcinace rekombinantním feritinem 2 vedla k tomu, že protilátky v krvi hostitele zablokovaly feritin 2 ve střevě klíštěte, došlo k omezení schopnosti klíšťat sát na hostiteli a více než polovina klíšťat během sání krve uhynula. Dále mělo narušení metabolismu železa negativní vliv na rozmnožování a další vývoj klíšťat. Navíc je feritin 2 odlišný od feritinů savčích hostitelů a proto je významným kandidátem na vakcínu, která omezí schopnost sání klíšťat a tím i sníží riziko přenosu patogenů (Hajdušek et al., 2009a,b).

Významnými kandidáty na vakcínu jsou proteiny s protizánětlivými vlastnostmi. Například imunizace sialostatinem L2 vedla ke snížení sání *I. scapularis* na morčatech (Kotsyfakis et al., 2006, 2008). Podobně byly provedeny pokusy s proteinem Iris ze slinných žláz *I. ricinus*, který má vliv na hemostázi i imunitní odpověď hostitele. Imunizace králíků tímto proteinem zhoršila sání nymf *I. ricinus*. Protein Iris inhibuje produkci prozánětlivých cytokinů (př. TNF- α), proto vakcinace Iris může vést k efektivnější imunitní odpovědi proti

B. burgdorferi tím, že se neutralizuje efekt tohoto proteinu (Prevot et al., 2006, 2007, 2009, Chmelař, 2005).

Dalšími kandidáty na vakcínu blokující přenos spirochet jsou proteiny, které přímo nebo nepřímo interagují s boreliemi. Příkladem je protein ze slinných žláz Salp15, který specificky váže OspC borelií a tím je chrání proti účinkům protilátek (Ramamoorthi et al., 2005). Specifické protilátky proti Salp15 by nejen neutralizovaly imunosupresivní efekt Salp15, ale současně by i mohly vázat borelie, jejichž povrch je obalený tímto proteinem. Tím by došlo i ke zvýšení likvidace bakterií fagocytujícími buňkami (Hovius et al., 2008b,c, Schuijt et al., 2010, Anguita et al., 2002). Bylo prokázáno, že protilátky proti Salp15 chránily myši před infekcí *B. burgdorferi* a zvyšovaly likvidaci *B. burgdorferi* fagocyty. Navíc za přítomnosti protilátek proti Salp15 došlo ke zvýšení protektivní funkce protilátek proti OspA a OspC. To naznačuje, že imunizace klíštěcími antigeny může být využita pro doplnění protektivního efektu vakcinace antigeny borelií (Dai et al., 2010, Schuijt et al., 2010). Dalším důležitým proteinem ze slinných žláz je antioxidant Salp25D z *I. scapularis*. Salp25D je důležitý pro přežití spirochet při interakci klíště-hostitel, protože chrání *B. burgdorferi* před reaktivními formami kyslíku produkovanými neutrofilů. Po imunizaci myši Salp25D a následném sání klíšťat, bylo zjištěno, že klíšťata nejsou schopná během sání získat spirochetu ve srovnání s neimunizovanou skupinou. Protein Salp16 je dalším příkladem proteinu ze slinných žláz, který umožňuje přechod patogenů z hostitele do klíštěte. Za nepřítomnosti Salp16 nemohly bakterie *A. phagocytophilum* vstoupit a přežít v klíštěti (ale neplatí pro borelie). Proteiny Salp25D a Salp16 jsou popisovány jako proteiny ze slinných žláz, mohou ale být exprimovány i ve střevě klíštěte (Sukurama et al., 2006, Schuijt et al., 2010). Ve střevě klíštěte je exprimován další významný protein TROSPA, který je nutný pro kolonizaci střeva boreliemi tím, že přímo interaguje s OspA. Při blokování tohoto proteinu došlo ke snížení kolonizace střeva *B. burgdorferi* a následnému snížení přenosu borelií během sání na hostiteli (Pal et al., 2004, Schuijt et al., 2010).

2 Cíle práce

- Vakcinace myši slinami klíšťat *Ixodes ricinus*
- Vakcinace myši opakovaným sáním nymf *Ixodes ricinus*
- Monitorování slinami aktivovaného přenosu spirochet *Borrelia burgdorferi* a jeho ovlivnění předchozí vakcinací
- Vliv vakcinace na imunitní odpověď hostitele během sání

3 Materiál a metody

3.1. Klíšťata

V pokusech byly použity pro odběr slin samice *I. ricinus*, které byly získány sběrem z okolí Českých Budějovic. Samice sály na neimunizovaném morčeti. Dále pro pokusy imunizace opakovaným sáním a imunizace slinami byly použity nymfy *I. ricinus* pocházející z chovu PAÚ, jejichž předchozí dvě generace sály na morčeti imunizovaném směsným boreliovým antigenem.

3.2. Myši

Pro pokusy byl použit inbrední kmen myší C3H/HeN (Charles River Laboratories, Německo), samice, 8 týdnů staré. Myši byly chovány ve zvěřinci PAÚ za standardních podmínek a krmeny standardní směsí pro hlodavce.

3.3. Bakterie

3.3.1. Kultivace borelií

V pokusech byl použit druh *Borrelia burgdorferi* sensu stricto CB53. Borelie byly kultivovány v BSK-H médiu (Sigma) obohaceném 6 % králíčího séra za přítomnosti antibiotik pro borelie (Sigma) v termostatu při 33°C 4-6 dní.

3.3.2. Stanovení počtu borelií

Z kultury borelií bylo odebráno 3,5 µl na podložní sklo a přikryto krycím sklem o velikosti 18×18 mm. Preparát byl prohlížen v temném poli při zvětšení 400×. Spočítáno bylo 20 zorných polí a výsledný počet bakterií v 1 ml suspenze byl stanoven podle Magnusona (Magnuson et al., 1948):

$$\frac{\text{Průměr z 20ti polí}}{3,5} \times 3724 \times \frac{1}{\text{ředění}} \times 1000 = \text{počet borelií v 1 ml}$$

Takto zjištěné množství borelií bylo naředěno BSK-H (Sigma) médiem na požadovanou koncentraci a použito k infekci myší v následujících pokusech.

3.4. Klíštěcí sliny

3.4.1. Odběr slin

Pro odběr slin byly použity částečně nasáté (7 dní) samice *I. ricinus* z přírodních sběrů. Klíšťata byla přichycena oboustrannou lepicí páskou na podložní sklo a fixována další páskou přes hřbetní část. Na hypostom jim byla pod binolupou nasazena skleněná mikrokapilára o objemu 10 μ l. Následně byl připraven 5% roztok pilocarpinu (Sigma) v 96% etanolu. Pilocarpin je alkaloid odvozený od histidinu pocházející z listů mrštnoplodu malolistého (*Pilocarpus microphyllus*), který působí dráždivě na parasympatikus a tím podporuje produkci slin. Na hřbetní stranu klíšťat byly aplikovány 2 μ l pilocarpinu a klíšťata byla uložena do vlhké komůrky do termostatu s 37°C. Po každých 30 minutách byla klíšťata kontrolována. Přibližně po 2 hodinách byly ze všech kapilár odsáty sliny a přefiltrovány pomocí bakteriálního filtru o velikosti pórů 0,22 μ m. Sliny byly uloženy pro pozdější použití při teplotě -80°C.

3.4.2. Stanovení koncentrace proteinu

Pro stanovení koncentrace proteinu ve slinách byl použit mikrotitrační panel, kde byla do jamek nanášena kalibrační řada bovinního sérového albuminu (BSA, Sigma) po 5 μ l v rozmezí koncentrací 0-600 μ g/ml a 5 μ l slin. Následně bylo přidáno do všech jamek 100 μ l Bradfordové činidla (Bradford, 1976). Absorbance byla změřena vertikálním spektrofotometrem (Multiskan MCC/340) při vlnové délce 595 nm. Z naměřených údajů z řady albuminů byla v programu MS Excel sestrojena kalibrační křivka a vypočítána koncentrace proteinu ve slinách.

3.5. Imunizace opakovaným sáním klíštěte *I. ricinus*

3.5.1. Imunizace myši

Na imunizovaných skupinách myši proběhly postupně tři sání neinfikovaných nymf *I. ricinus*. Při posledním tj. třetím sání byly myši současně infikovány kulturou borelií. Mezi jednotlivými sáními proběhly 14 denní pauzy, kdy myši nebyly vystaveny nymfám. Během prvního a druhého sání bylo aplikováno 10 nymf/myš, při třetím 8 nymf/myš. V průběhu každého sání byl zaznamenán počet sajících a nasátých nymf, poté počet nymf přeměněných do dospělců a množství samců a samic. Bylo vytvořeno 5 skupin po čtyřech myších:

- 1) 3 sání nymf
- 2) 2 sání nymf
- 3) 1 sání nymf
- 4) kontrolní infikovaná skupina
- 5) kontrolní neinfikovaná skupina

3.5.2 Infekce myši boreliemi

Myši byly uspány 75 μ l anestetika a na hřbetě jim byla ostříhána srst. Do tohoto místa jim byla aplikována intradermálně infekční dávka 5×10^3 borelií ve 20 μ l BSK-H média. Dále byla na hřbet myši připevněna komůrka s uzávěrem, kam byly nasypány nymfy. V kontrolní skupině byla myšim také připevněna komůrka, aby se dosáhlo u všech stejných podmínek. Nymfy sály na myších až do odpadnutí tj. 4 dny a poté byly myši usmrceny. Rozdělení skupin bylo:

- 1) 5×10^3 borelií + 8 nymf \rightarrow 3 sání
- 2) 5×10^3 borelií + 10 nymf \rightarrow 2 sání
- 3) 5×10^3 borelií + 10 nymf \rightarrow 1 sání
- 4) 5×10^3 borelií
- 5) kontrolní neinfikovaná skupina

3.5.3. Izolace a zpracování orgánů

Čtvrtý den po infekci byla myšim ze skupiny 1, 2, 3 odebrána krev, kůže, močový měchýř, srdce a uzliny. Ze skupiny č. 4 byla odebrána jen krev a uzliny. Před odběrem orgánů byla myš krátce uspána éterem a posléze jí byla odebrána krev z krkavice. Poté byla myš usmrcena zlomením vazů a odebrána kůže v oblasti vpichu borelií, hrot srdeční, močový měchýř. Do RPMI média (PAA) byly odebrány tři páry auxiliárních uzlin. Během pitvy byly všechny orgány uchovávány na ledu. Poté byly orgány zváženy na analytických vahách s přesností na desetiny miligramu a zamraženy pro následnou izolaci DNA.

3.5.4. Příprava buněčné suspenze z uzlin

Do 24 jamkového panelu (TPP) s RPMI médiem byly přeneseny uzliny a poté byly nůžkami nastříhány. Následovalo přidání kolagenázy (Roche) v účinné koncentraci 2 ng/ml do každé jamky a panel se nechal třepat 30 minut v termostatu. Po skončení třepání byly uzliny i s médiem přeneseny do centrifugačních zkumavek, kde byly uzliny protlačeny přes

sítka a tím získána buněčná suspenze. Následně byly zkumavky centrifugovány 10 minut, při 300 g a teplotě 10°C. Po centrifugaci bylo médium slito a byl přidán 1 ml kultivačního média (10% fetální bovinní sérum + RPMI médium + 1% antibiotika + 1% glutamin + 0,1% merkaptoetanol). Počet buněk byl stanoven počítáním v Bürkerově komůrce po obarvení trypanovou modří. Zjištěné údaje byly přepočítány na počet buněk/ml suspenze a buňky byly naředěny do mikrozskumavek tak, aby na každou jamku 96 jamkového panelu (IWAKI) připadlo 200 000 buněk. Do jamek 96 jamkového panelu bylo přidáno 180 µl naředěné suspenze buněk a 20 µl stimulantu. Pro každý stimulant byla od jednotlivých vzorků vytvořena duplikace. Jako stimulanty byly použity konkanavalin A (ConA, 500 ng/ml, Sigma), lipopolisacharid (LPS, 500 ng/ml, Sigma) a fytohemaglutinin (PHA, 500 ng/ml, Sigma) + forbol-myristát-acetát (PMA, 100 ng/ml, Sigma) a kontrolou byly nestimulované buňky. Panel byl uložen do termostatu a byl inkubován 48 hodin. Po inkubaci se z každé jamky odebrala většina supernatantu, který byl posléze zamražen při -80°C pro pozdější použití.

3.6. Imunizace slinami klíštěte *I. ricinus*

3.6.1. Imunizace myši

V pokusu bylo použito 14 myši kmene C3H/HeN. Byly provedeny 3 imunizace vždy po 14 dnech. Po třetí imunizační dávce BSA (bovine serum albumin) však došlo k úhynu 5 myši, proto není přítomna skupina imunizovaná jen BSA. Imunizační dávka 90 µl byla podána subkutánně do boku myši. Při první imunizační dávce bylo použito kompletní Freundovo adjuvans (Sigma), ve zbývajících dvou dávkách pak nekompletní. Myši byly předem uspány intraperitoneálně podaným anestetikem (4 ml 10% Narketan (Vétoquinol) + 2 ml 2% Rometar (Spofa) + 14 ml PBS) v dávce 75 µl/myš. Myši byly rozděleny do čtyř skupin:

- 1) 10 µg BSA + Freundovo adjuvans (3 myši)
- 2) 10 µg slin + Freundovo adjuvans (4 myši)
- 3) 10 µg slin + Freundovo adjuvans (4 myši)
- 4) kontrolní neinfikovaná skupina (3 myši)

3.6.2. Infekce myši boreliemi

14 dní po třetí imunizační dávce byla provedena infekce myši kulturou borelií. Myši byly předem uspány subkutáně podanými 75 μ l anestetika. Na hřbetě (mezi hrudníkem a bedry) jim byla ostříhána srst. Poté bylo myším do této oblasti aplikováno intradermálně 20 μ l infekční dávky spirochet (5×10^3 borelií v BSK-H médiu). Následně byly skupině 1 a 3 aplikovány nymfy *I. ricinus*, tak že byly nasypány do komůrky s uzávěrem, která byla připevněna na hřbet myši v místě vpichu. Nymfy sály na myších 4 dny. Rozdělení jednotlivých skupin bylo:

- 1) BSA: 5×10^3 borelií + 10 nymf (3 myši)
- 2) sliny: 5×10^3 borelií (4 myši)
- 3) sliny: 5×10^3 borelií + 10 nymf (4 myši)
- 4) kontrolní neinfikovaná skupina (3 myši)

3.6.3. Izolace a zpracování orgánů

Izolace, odběr i zpracování orgánů proběhlo obdobně jako je uvedeno v kapitole 3.5.3.

3.6.4. Příprava buněčné suspenze z uzlin

Postup proběhl stejně jako v kapitole 3.5.4.

3.7. Stanovení cytokinů

Byl použit ELISA kit (eBioscience) a postupovalo se dle návodu. Touto metodou bylo měřeno množství IL-2, IL-10 a IFN- γ v supernatantech z obou výše popsáných pokusů. Do jamek 96 jamkového mikrotitračního panelu (Maxisorp, NUNC) bylo přidáno 50 μ l vazebné protilátky ředěné 250 \times ve vazebném pufru a inkubováno ve vlhké komůrce přes noc při 4°C. Druhý den byl panel 5 \times promyt roztokem PBS+Tween (0,05%), vyblokován 200 μ l 1 \times koncentrovaného ředícího roztoku (inkubace při laboratorní teplotě 1 hodinu). Poté byl panel 5 \times promyt a pro získání kalibrační křivky bylo přidáno 50 μ l standardů zředěných dvojkovou řadou (IL-2 1 ng/ml, IL-10 4 ng/ml a IFN- γ 1 ng/ml). Dále bylo přidáno 50 μ l vzorků do odpovídajících jamek a panel inkubován ve vlhké komůrce přes noc při 4°C. Další den byl panel 5 \times promyt, bylo přidáno 50 μ l detekční biotinylované protilátky (250 \times ředěné v ředícím roztoku) a panel byl inkubován 1 hodinu při laboratorní teplotě. Následovalo 5 \times promytí, přidání 50 μ l avidinu (250 \times ředěný ředícím roztokem) a panel byl inkubován při

laboratorní teplotě 30 minut. Panel byl 7× promyt, do každé jamky bylo přidáno 50 µl substrátového roztoku a byl inkubován ve tmě, než se objevila barevná reakce (přibližně 15 minut). Reakce byla zastavena 50 µl 2M H₂SO₄ a při vlnové délce 450 nm byla na spektrofotometru (Multiskan MCC/340, Labsystem) změřena absorbance.

3.8. Stanovení protilátek

Množství protilátek proti antigenům slin v séru z obou pokusů bylo stanoveno metodou ELISA. Na 96 jamkový titrační panel bylo navázáno 50 µl extraktu ze slinných žláz (SGE) o koncentraci 10 µg/ml proteinu na každou jamku. SGE byl použit místo slin, protože bylo v provedeném pokusu zjištěno, že mezi navázáním SGE a slin není rozdíl. SGE byl naředěn na příslušnou koncentraci roztokem uhličitanového pufru o pH 9,6. Poté byl panel inkubován 24 hodin při 4°C ve vlhké komůrce. Další den byl panel vysušen poklepem a nespecifické vazby byly vyblokovány 5% PTS v PBS v množství 200 µl na jamku po dobu 45 minut při 37°C ve vlhké komůrce. Panel byl 3× promyt promývacím roztokem PBS+Tween (0,05%), do odpovídajících jamek byla nanesena testovaná myší séra v triplicacích ředěná 1:100 v ředícím roztoku 5% PTS v PBS a panel byl inkubován 45 minut při teplotě 37°C ve vlhké komůrce. Následně byl panel 3× promyt, do každé jamky bylo přidáno 100 µl antimyší protilátky značené peroxidázou (SwAM/Px) ředěné v ředícím pufru 1:1000 a panel byl inkubován 45 minut při 37°C. Panel byl 3× promyt a enzymová reakce byla vyvolána 100 µl substrátového roztoku (5 ml fosfocitrátový pufr, 2 mg OPD, 2 µl 30% H₂O₂). Podle intenzity zbarvení negativní kontroly byla reakce zastavena po cca 10 minutách 100 µl 2M H₂SO₄. Absorbance byla změřena na spektrofotometru (Multiskan MCC/340, Labsystem) při vlnové délce 490 nm.

3.9. Izolace DNA z myších orgánů

Na izolaci byl použit High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) dle návodu. DNA byla izolována z kůže, močového měchýře a srdce. Odebráno bylo 10-35 mg tkáně, která byla v případě kůže nastříhávána, v případě srdce nakrájena skalpelem. K odebranému množství bylo přidáno 200 µl T1 pufru (Tissue Lysis Buffer) a 40 µl proteinázy K. Vzorky byly inkubovány při 55°C v termobloku 4 hodiny. Poté bylo ke vzorkům přidáno 200 µl T2 pufru (Binding buffer) a byly inkubovány 10 minut při 70°C. Následně bylo přidáno 100

μl isopropanolu a vzorky byly přendány do kolony na jímací zkumavce a centrifugovány 1 minutu při 8000 g. Dále bylo přidáno 500 μl Tx pufru (Inhibitor Removal Buffer) a centrifugováno 1 minutu při 8000 g. Následujícím krokem, který byl opakován dvakrát, bylo přidání 500 μl T3 pufru (Wash Buffer) a centrifugace 1 minutu při 8000 g. Filtrát byl vylit a vzorky byly centrifugovány 10 s při 7500 g. DNA z kolony byla eluována přidáním 60 μl Elution Buffer předem vytemperovaného na 70°C a inkubována 4 minuty. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány 1 minutu při 8000 g. Pro větší výtěžnost bylo přidáno 60 μl Elution Buffer ještě jednou. Získaná DNA byla zamrazena pro pozdější použití.

3.10. Real-time PCR

Metoda kvantitativní real-time PCR umožňuje rychlou, citlivou a spolehlivou detekci a kvantifikaci specifického úseku DNA nebo RNA. Během kvantitativní PCR byl amplifikován gen *FliD* (flagellar hook-associated protein II), který je přítomen v genomu *B. burgdorferi* v jediné kopii (počet jeho kopií= počet borelií). Pro vytvoření 180-bp produktu genu *FliD* byly použity primer R (5'- CCT TCC ACT TTT CTC TCT CTA TCT T-3') (Macháčková et al., 2006), primer F (5'- TGG TGA CAG AGT GTA TGA TAA TGG AA - 3') (Zeidner et al., 2002) a dvojitě značená sonda (5'- TGC TAA AAT GCT AGG AGA TTG TCT GTC GCC – 3', barvivo 6-karboxylofluorescein) (Generi-Biotech). Dále směs na kvantitativní PCR obsahovala Taq pufr, deionizovanou vodu, nukleotidy, Taq polymerázu a templátovou DNA v množství uvedeném v tabulce (**Tab. 2**).

Tab. 2. Složení reakční směsi pro real-time PCR.

	c	V [μl]
Deionizovaná voda		11,4
Taq pufr (TaKaRa)	10× koncentrovaný	2,0
Směs nukleotidů (TaKaRa)	10 mM (2,5mM každý)	1,6
RT Zeid F primer (Generi-Biotech)	0,1 mM	0,4
MN qpcr R primer (Generi-Biotech)	0,1 mM	0,4
Dvojitě značená sonda (Generi-Biotech)	0,1 mM	0,1

Hot star Taq polymeráza (TaKaRa)	5 U/ μ l	0,1
Templátová DNA		4,0
Celkem		20,0

Amplifikace a detekce probíhala na přístroji Rotor Gene 3000 thermocycler, kdy program zahrnoval: počáteční denaturaci 10 minut při 95°C a 45 cyklů denaturace (15 sekund při 95°C) a syntézy (1 minuta při 60°C). Všechny vzorky byly v triplikaci. Postupným desetinasobným ředěním DNA o známé koncentraci získané z kultury borelií byla vytvořena kalibrační křivka, aby bylo možné přesně určit množství kopií cílového genu. Výsledná měření byla zpracována v programu Rotor Gene 5.0.

3.11. Statistika

Z naměřených dat byla v programu Statistica 9.0. vypracována statistická analýza. Pro analýzu byl použit t-test. Statisticky signifikantní rozdíl na 5% hladině významnosti je v grafech označen hvězdičkou.

4 Výsledky

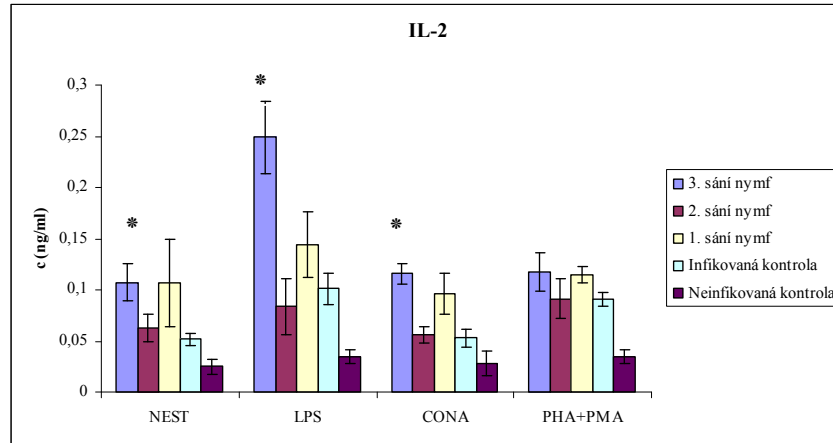
4.1. Vakcinace myši opakovaným sáním nymf *I. ricinus*

4.1.1. Produkce cytokinů mízními uzlinami po vakcinaci opakovaným sáním

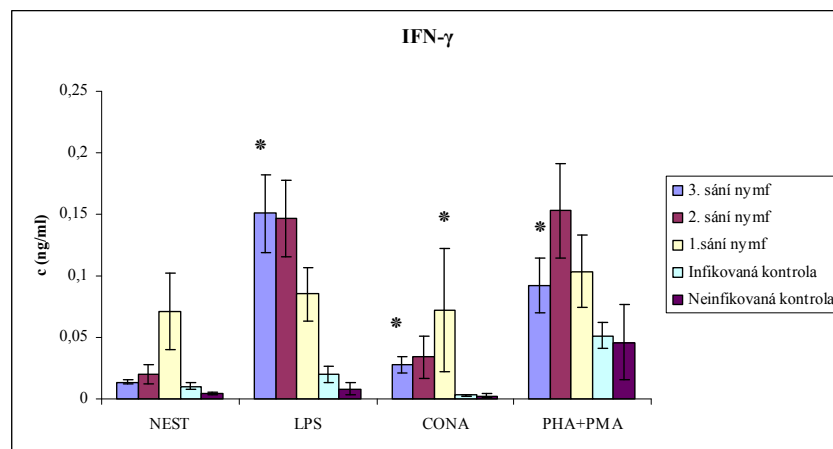
Sání nymf na myších C3H/HeN vedlo ve spádových lymfatických uzlinách k nárůstu Th1 i Th2 cytokinů ve srovnání s kontrolní neinfikovanou skupinou. Tento efekt byl nejvýraznější u Th2 cytokinu IL-10 (<2 ng/ml) (**Graf 1c**), zatímco množství Th1 cytokinů IL-2 (<0,25 ng/ml) a IFN- γ (<0,15 ng/ml) bylo velmi nízké (**Graf 1a, 1b**). Po prvním sání nymf *I. ricinus* a současné infekci *B. burgdorferi* došlo u všech cytokinů k nárůstu oproti kontrolní neinfikované skupině. Během druhého sání byl zaznamenán pokles v produkci IL-2 a IL-10, zatímco u IFN- γ došlo k nárůstu ve srovnání s prvním sáním. Při třetím sání, kdy došlo současně k infekci *B. burgdorferi*, byl zaznamenán nárůst IL-2 nebo hodnota IL-2 byla na úrovni prvního sání. U IFN- γ došlo k poklesu oproti prvnímu sání s výjimkou jeho vzestupu po stimulaci LPS. Trend v produkci cytokinů byl nejednoznačný. Množství IL-2 po třetím sání a současné inokulaci *B. burgdorferi* bylo srovnatelné nebo zvýšené ve srovnání s prvním sáním (**Graf 1a**), zatímco množství IFN- γ bylo proti prvnímu sání snižené (**Graf 1b**). U IL-10 došlo po třetím sání k poklesu proti prvnímu sání, s výjimkou stimulace PHA+PMA (**Graf 1c**). Celkově byla produkce IL-10 vyšší než IL-2 a IFN- γ , z čehož je patrná polarizace imunitní odpovědi k Th2.

Po imunizaci opakovaným sáním byl znatelný vliv SAT efektu slin na produkci cytokinů spádovými lymfatickými uzlinami, kdy došlo k celkovému snížení cytokinů Th1 (**Graf 1a, 1b**) a zvýšení Th2 (**Graf 1c**), k čemuž pravděpodobně došlo vlivem SAT faktorů přítomných ve slinách.

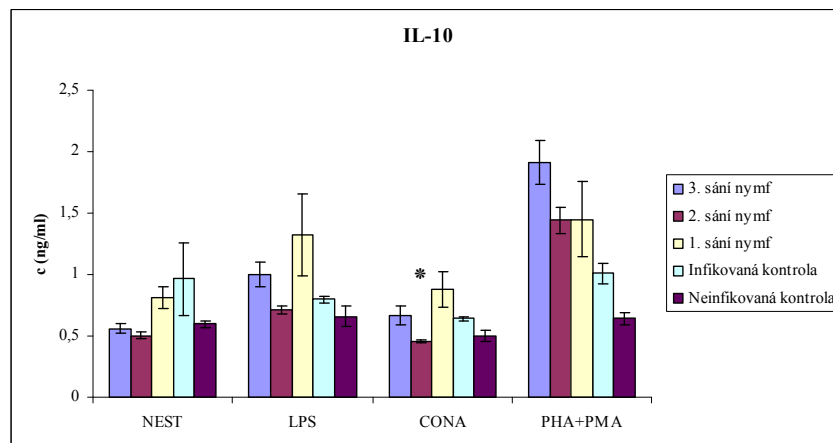
1a)



1b)



1c)

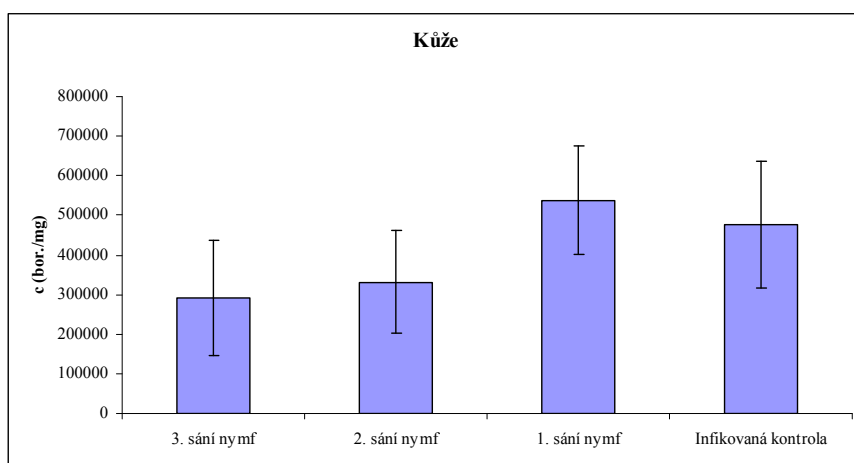


Graf 1a, 1b, 1c: Množství cytokinů IL-2 (1a), IFN- γ (1b) a IL-10 (1c) v mízních uzlinách po opakovaném sání nymf *I. ricinus* 4 dpi (dny po infekci). **3. sání nymf:** 2 sání nymf + infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* a současně 3. sání nymf; **2. sání nymf:** 1 sání nymf + infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* a současně 2. sání nymf; **1. sání nymf:** infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* a současně 1. sání nymf; **Infikovaná kontrola:** jen infekce *B. burgdorferi*; **Neinfikovaná kontrola:** neinfikovaná skupina. Byly použity buňky z 3 párů auxiliárních uzlin, které buď nebyly stimulovány, nebo byla provedena stimulace LPS, ConA a PHA+PMA. Hodnoty jsou vyneseny jako množství cytokinu v ng na 1 ml a \pm střední chyba průměru; (*): statisticky signifikantní rozdíl ($p < 0,05$) ve srovnání s infikovanou kontrolou.

4.1.2. Vliv vakcinace opakovaným sáním na distribuci a proliferaci borelií v myších orgánech

4.1.2.1. Kůže

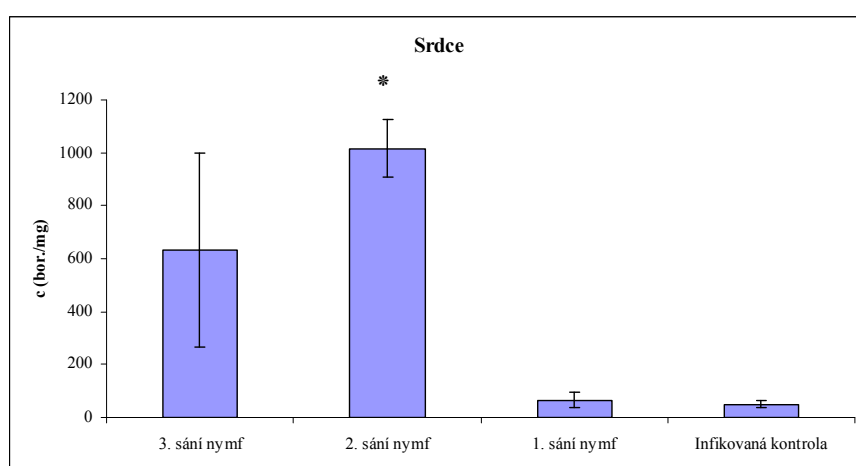
Kůže v oblasti inokulace spirochet byla vyšetřována na přítomnost *B. burgdorferi*. Borelie se vyskytovaly v kůži všech skupin ve značném množství. Při prvním sání nymf, kdy byla současně inokulována kultura *B. burgdorferi*, byly spirochety přítomny v největší míře. Množství spirochet po prvním sání převyšovalo hodnoty kontroly infikované boreliemi. Postupně byl trend v počtu borelií od prvního sání k třetímu klesající (**Graf 2**).



Graf 2: Množství *B. burgdorferi sensu stricto* CB53 v kůži po imunizaci opakovaným sáním nymf *I. ricinus* 4 dpi. **3. sání nymf:** 2 sání nymf + infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* a současně 3. sání nymf; **2. sání nymf:** 1 sání nymf + infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* a současně 2. sání nymf; **1. sání nymf:** infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* a současně 1. sání nymf; **Infikovaná kontrola:** jen infekce *B. burgdorferi*. Hodnoty jsou vyneseny jako průměrný počet borelií na 1 mg tkáně \pm střední chyba průměru.

4.1.2.2. Srdce

Přítomnost borelií byla vyšetřována v hrotu srdečním. Množství spirochet se u jednotlivých skupin značně odlišovalo a bylo výrazně nižší než v kůži. Po prvním sání nymf *I. ricinus* bylo množství bakterií v srdci srovnatelné s kontrolní skupinou, která byla pouze infikována boreliemi. V průběhu druhého sání byl zaznamenán podstatný nárůst množství borelií. Při třetím sání došlo k poklesu proti druhému sání, hodnoty však byly stále vyšší než při prvním sání. Druhé a třetí sání tedy vedlo k rozšíření bakterií do srdce, i když po třetím sání nymf je patrný pokles množství *B. burgdorferi* (**Graf 3**).



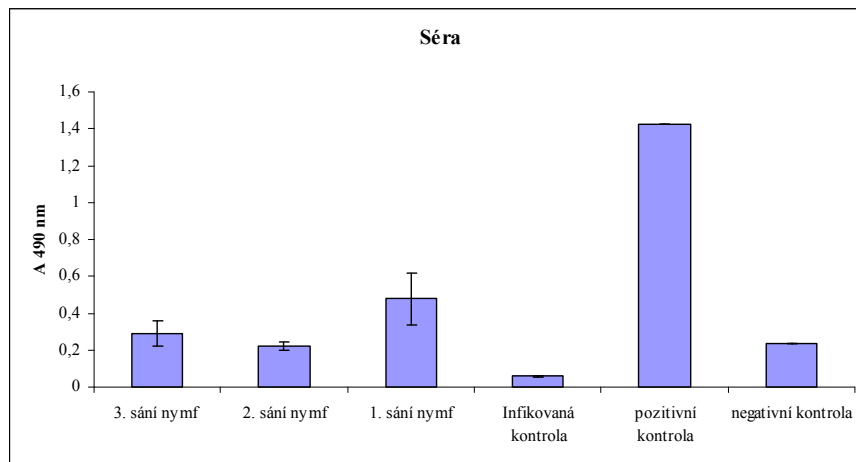
Graf 3: Množství *B. burgdorferi sensu stricto* CB53 v srdci po imunizaci opakovaným sáním nymf *I. ricinus* 4 dpi. **3. sání nymf:** 2 sání nymf + infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* a současně 3. sání nymf; **2. sání nymf:** 1 sání nymf + infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* a současně 2. sání nymf; **1. sání nymf:** infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* a současně 1. sání nymf; **Infikovaná kontrola:** jen infekce *B. burgdorferi*. Hodnoty jsou vyneseny jako průměrný počet borelií na 1 mg tkáně a \pm střední chyba průměru; (*): statisticky signifikantní rozdíl ($p < 0,05$) ve srovnání s infikovanou kontrolou.

4.1.2.3. Močový měchýř

V žádné skupině myši nebyla v močovém měchýři zjištěna přítomnost *B. burgdorferi*.

4.1.3. Protilátky proti slinám přítomné v séru po vakcinaci opakovaným sáním

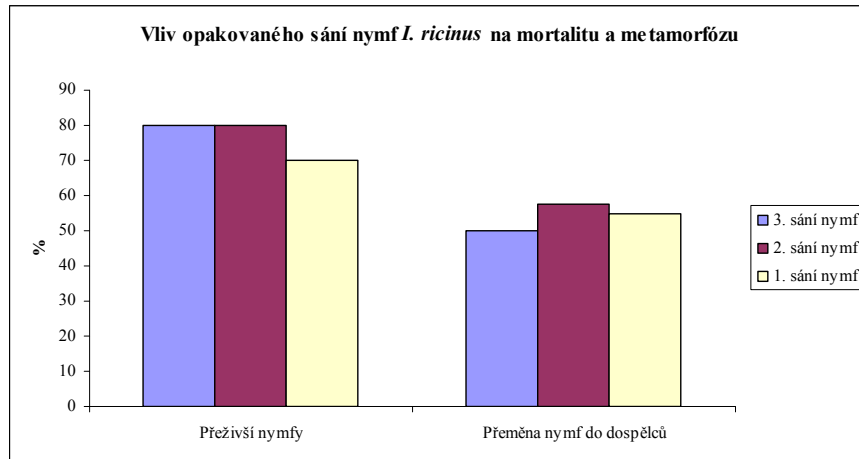
Množství protilátek proti antigenům slin bylo po imunizaci opakovaným sáním nízké. Největší hodnoty protilátek byly zaznamenány po prvním sání, druhé sání nymf ale vyvolalo pokles na úroveň negativní kontroly. Třetí sání nymf vedlo k nepatrnému zvýšení. Celkově byl trend v produkci protilátek více méně klesající (**Graf 4**).



Graf 4: Množství protilátek proti slinám v séru po imunizaci opakovaným sáním 4 dpi. **3. sání nymf:** 2 sání nymf + infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* a současně 3. sání nymf; **2. sání nymf:** 1 sání nymf + infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* a současně 2. sání nymf; **1. sání nymf:** infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* a současně 1. sání nymf; **Infikovaná kontrola:** jen infekce *B. burgdorferi*; **Pozitivní kontrola:** pozitivní myší sérum; **Negativní kontrola:** negativní myší sérum. Hodnoty jsou vyneseny jako průměrná absorbance při 490 nm a \pm střední chyba průměru.

4.1.4. Vliv vakcinace opakovaným sáním na metamorfózu a mortalitu *I. ricinus*

Opakované sání *I. ricinus* neovlivnilo přeměnu nymf do dospělců, ani nedošlo ke zvýšené mortalitě nymf. Po třetím sání bylo z imunizovaných myší získáno 80% živých nymf a u poloviny došlo k přeměně do dospělců. Hodnoty po třetím sání jsou srovnatelné s hodnotami po druhém a prvním sáním nymf (**Graf 5**).



Graf 5: Vliv opakovaného sání nymf *I. ricinus* na mortalitu a metamorfózu. **3. sání nymf:** 2 sání nymf + infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* a současné 3. sání nymf; **2. sání nymf:** 1 sání nymf + infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* a současné 2. sání nymf; **1. sání nymf:** infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* a současné 1. sání nymf. Hodnoty jsou vyneseny jako průměrné procentuální zastoupení přeživších nymf a metamorfovaných dospělců.

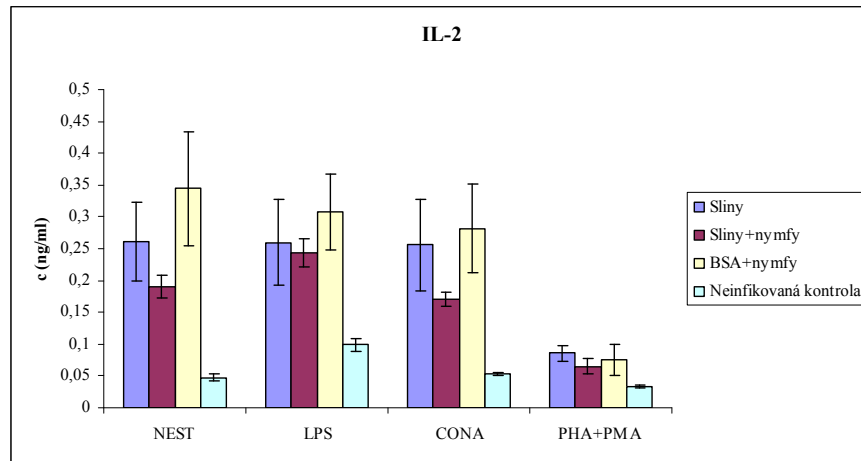
4.2. Vakcinace myši slinami klíšťat *I. ricinus*

4.2.2. Produkce cytokinů mízními uzlinami po vakcinaci slinami

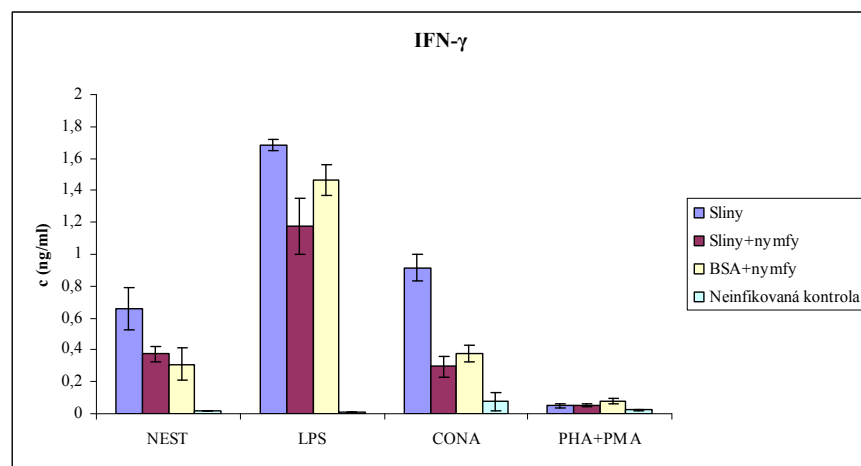
Imunizace myši C3H/HeN slinami vedla ve spádových lymfatických uzlinách k nárůstu Th1 i Th2 cytokinů ve srovnání s kontrolní neinfikovanou skupinou. Byla naměřena nízká hladina IL-2 (<0,25 ng/ml) (**Graf 6a**) a vyšší hladina IFN- γ (<1,6 ng/ml) a IL-10 (<2 ng/ml) (**Graf 6b, 6c**). Po imunizaci slinami *I. ricinus* nebyla zjištěna jasná polarizace imunitní odpovědi k Th1 nebo k Th2. U obou skupin imunizovaných slinami došlo ke snížení IL-2 ve srovnání se skupinou imunizovanou BSA+nymfy (**Graf 6a**). Mezi skupinou imunizovanou slinami a slinami+nymfy byly zjištěny rozdíly v produkci IL-2, kdy sání nymf vyvolalo snížení tohoto cytokinu. Nepřítomnost získané rezistence po imunizaci slinami je patrná ve snížení IL-2 u skupiny imunizované slinami+nymfy ve srovnání se skupinou imunizovanou kontrolním proteinem BSA+nymfy (**Graf 6a**). Naproti tomu množství dalšího vyšetřovaného Th1 cytokinu, IFN- γ , bylo ve srovnání s IL-2 zvýšené (**Graf 6b**). Byl zjištěn nárůst v produkci IFN- γ u skupiny imunizované slinami proti skupině imunizované BSA+nymfy. U skupin imunizovaných slinami se projevil vliv sání nymf, který vyvolal snížení IFN- γ . S výjimkou nestimulovaných buněk, byla produkce IFN- γ po imunizaci slinami+nymfy vždy nižší než po imunizaci BSA+nymfy (**Graf 6b**). Byl zaznamenán výrazný nárůst v produkci IL-10 skupiny imunizované BSA+ nymfy. Po imunizaci slinami a slinami+nymfy bylo u těchto skupin množství IL-10 sníženo, naproti tomu po imunizaci BSA+nymfy byl zaznamenán značný nárůst IL-10. Vlivem sání nymf po imunizaci slinami bylo množství IL-10 srovnatelné nebo vyšší než u skupiny imunizované jen slinami (**Graf 6c**). Celkově vyšší hladiny IL-10 ukazují na polarizaci směrem k Th2.

Po imunizaci slinami došlo podobně jako po imunizaci opakovaným sáním k projevu SAT faktorů ve slinách. U skupin imunizovaných slinami byl po aplikaci nymf zaznamenán buď pokles, nebo nárůst v produkci cytokinů. Vlivem sání nymf došlo k snížení produkce Th1 cytokinů IL-2 a IFN- γ (**Graf 6a,6b**) a k nárůstu Th2 cytokinu IL-10 (**Graf 6c**).

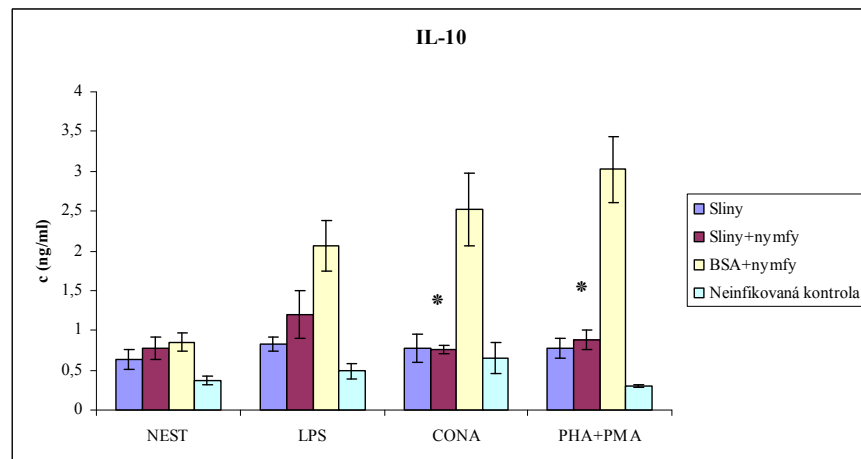
6a)



6b)



6c)



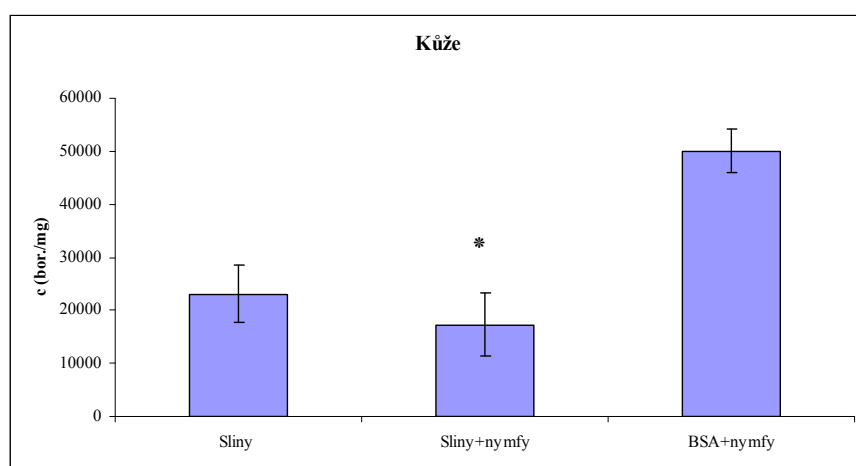
Graf 6a, 6b, 6c: Množství cytokinů IL-2 (6a), IFN- γ (6b) a IL-10 (6c) v mízních uzlinách 4 dpi. **Sliny:** imunizace 3 dávkami 10 μg slin + infekce 5×10^3 *B. burgdorferi*; **Sliny + nymfy:** imunizace 3 dávkami 10 μg slin + infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* společně se sáním nymf; **BSA + nymfy:** imunizace 3 dávkami 10 μg BSA + infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* společně se sáním nymf; **Neinfikovaná kontrola:** neinfikovaná skupina. Byly použity buňky z 3 párů auxiliárních uzlin, které buď nebyly stimulovány, nebo byla provedena stimulace LPS, ConA a PHA+PMA. Hodnoty jsou vyneseny jako množství cytokinu v ng na 1 ml a \pm střední chyba průměru; (*): statisticky signifikantní rozdíl ($p < 0,05$) ve srovnání s kontrolou BSA+nymfy.

4.2.3. Vliv vakcinace slinami na distribuci a proliferaci borelií v myších orgánech

4.2.3.1. Kůže

Přítomnost *B. burgdorferi* v místě inokulace borelií se u jednotlivých skupin značně odlišovala. Vlivem imunizace slinami došlo ke snížení množství spirochet v kůži ve srovnání se skupinou imunizovanou BSA+nymfy. Signifikantní rozdíl byl mezi skupinami BSA+nymfy a Sliny+nymfy, kdy se pravděpodobně projevil efekt imunizace. Navíc po imunizaci slinami a následném sání nymf došlo ještě k dalšímu potlačení borelií ve srovnání se skupinou imunizovanou jen slinami (**Graf 7**).

Po imunizaci slinami došlo v kůži také k projevu slinami aktivovaného přenosu. U myši imunizovaných BSA a na nichž sály nymfy došlo v kůži k výraznému nárůstu počtu borelií ve srovnání se skupinami imunizovanými slinami a slinami+nymfy (**Graf 7**).



Graf 7: Množství *B. burgdorferi* sensu stricto CB53 v kůži po imunizaci slinami a BSA. **Sliny:** imunizace 3 dávkami 10 µg slin + infekce 5×10^3 *B. burgdorferi*; **Sliny + nymfy:** imunizace 3 dávkami 10 µg slin + infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* společně se sáním nymf. **BSA + nymfy:** imunizace 3 dávkami 10 µg BSA + infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* společně se sáním nymf. Hodnoty jsou vyneseny jako průměrný počet borelií na 1 mg tkáně a ± střední chyba průměru. (*): statisticky signifikantní rozdíl ($p < 0,05$) ve srovnání s kontrolou BSA+nymfy.

4.2.3.2. Srdce

U žádné skupiny myši nebyla v srdci prokázána přítomnost *B. burgdorferi*.

4.2.3.3. Močový měchýř

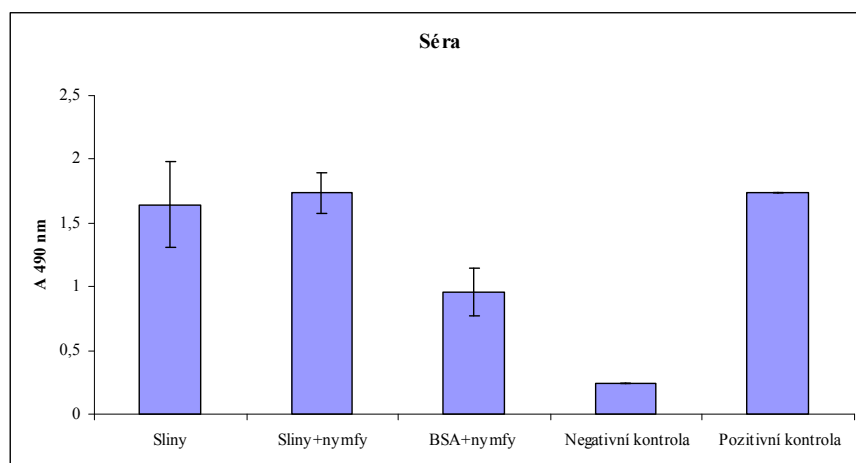
Množství borelií v močovém měchýři bylo nízké u všech imunizovaných skupin. Hodnoty po imunizaci slinami jsou srovnatelné s imunizací BSA (**Graf 8**).



Graf 8: Množství *B. burgdorferi sensu stricto* CB53 v močovém měchýři po imunizaci slinami a BSA 4 dpi. **Sliny:** imunizace 3 dávkami 10 μg slin + infekce 5×10^3 *B. burgdorferi*; **Sliny + nymfy:** imunizace 3 dávkami 10 μg slin + infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* společně se sáním nymf; **BSA + nymfy:** imunizace 3 dávkami 10 μg BSA + infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* společně se sáním nymf. Hodnoty jsou vyneseny jako průměrný počet borelií na 1 mg tkáně a \pm střední chyba průměru.

4.2.4. Protilátky proti slinám přítomné v séru po vakcinaci slinami

Z odebrané krve bylo získáno sérum, ve kterém bylo následně stanovováno množství protilátek proti antigenům slin. Po imunizaci slinami došlo k tvorbě protilátek, jejichž množství je srovnatelné s pozitivní kontrolou. Nymfy u skupiny imunizované slinami vyvolaly nepatrné zvýšení protilátek. Imunizace BSA a aplikace nymf vyvolala také tvorbu protilátek, která však byla nižší než po imunizaci slinami (**Graf 9**).



Graf 9: Množství protilátek proti slinám v séru po imunizaci slinami a BSA 4 dpi. **Sliny:** imunizace 3 dávkami 10 µg slin + infekce 5×10^3 *B. burgdorferi*; **Sliny + nymfy:** imunizace 3 dávkami 10 µg slin + infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* společně se sáním nymf; **BSA + nymfy:** imunizace 3 dávkami 10 µg BSA + infekce 5×10^3 *B. burgdorferi* společně se sáním nymf; **Negativní kontrola:** negativní myší sérum; **Pozitivní kontrola:** pozitivní myší sérum. Hodnoty jsou vyneseny jako průměrná absorbance při 490 nm a \pm střední chyba průměru.

5 Diskuze

5.1. Vakcinace myši opakovaným sáním nymf *I. ricinus*

Sání klíšťat stimuluje imunitní systém hostitele zahrnující antigen-prezentující buňky, T a B lymfocyty, cytokiny, homocytotropní a cirkulující protilátky, komplement, granulocyty a další imunologicky aktivní látky (Wikel, 1999, Brossard a Wikel, 1997, 2004). Výsledkem těchto interakcí je, že mnoho vztahů hostitel-klíště je charakterizováno vývojem rezistence proti sajícím klíšťatům (Brossard a Wikel, 1997). Získaná rezistence proti klíšťatům se projevuje snížením nasátí, prodlouženou dobou sání, zabráněním přeměny do dalších stádií, sníženou produkcí vajíček a mortalitou klíšťat (Wikel et al., 2004). Z výsledků pokusu imunizace opakovaným sáním vyplývá, že po opakovaném sání neinfikovaných nymf *I. ricinus* na C3H/HeN myších nedošlo k vývoji získané rezistence. V provedeném pokusu nedošlo k ovlivnění přežívání klíšťat ani k narušení přeměny do dalších stádií. Tyto výsledky jsou shodné s předchozími pokusy, kdy byly myši opakovaně vystaveny sání klíšťat (Mbow et al., 1994a, Wikel et al., 1997, Christe et al., 1998, Schoeler et al., 1999). Imunizace opakovaným sáním nymf *I. scapularis* na BALB/c a C3H/HeN myších a sání nymf *I. ricinus* na BALB/c myších nevedlo k vývoji získané rezistence (Schoeler et al., 1999, Mbow et al., 1994a). Vývoj získané rezistence je ovlivněn druhem hostitele (Ribeiro, 1989). Imunita proti klíšťatům byla popsána u morčat, králíků, dobytka a některých druhů myši (Allen, 1982, Brossard a Fivaz, 1982, Hewetson, 1972, den Hollander a Allen, 1985, Das et al., 1998, Wikel et al., 1997). Naproti tomu u myši C3H/HeN nedochází k vývoji získané rezistence, což potvrzují i výsledky z mého pokusu. U myši BALB/c také nedochází k vývoji získané rezistence proti klíšťatům jako takovým, přesto bylo zjištěno, že opakované sání klíšťat vyvolává rezistenci k přenosu *B. burgdorferi* (Wikel et al., 1997). To pravděpodobně souvisí s tím, že myši C3H/HeN jsou citlivé k infekci *B. burgdorferi* zatímco BALB/c jsou rezistentní (den Hollander a Allen, 1985, Barthold et al., 1990).

Zjištěná produkce cytokinů *in vitro* a malé rozdíly mezi nestimulovanými a stimulovanými buňkami dále podporují to, že nedošlo k vývoji získané rezistence. V pokusu byly použity buňky z auxiliárních uzlin, které byly stimulovány konkanavalinem (ConA), lipopolysacharidem (LPS) a forbol-myristát-acetátem s fytohemaglutininem (PMA+PHA). Po stimulaci byl pozorovatelný jen malý rozdíl mezi stimulovanými a nestimulovanými buňkami. V produkci IL-2 byla nestimulovaná skupina srovnatelná s ConA a PHA+PMA.

U IL-10 a IFN- γ se stimulace neprojevila v případě ConA. Klíšťaty vyvolaná suprese imunitní odpovědi hostitele je charakterizována sníženou schopností myších lymfocytů proliferovat v přítomnosti ConA a PHA (mitogenní pro T lymfocyty) (Kovář et al., 2001, Need et al., 1992). Snížení proliferativní odpovědi v přítomnosti LPS (mitogen B lymfocytů) nebylo tak patrné, především u IFN- γ . Podobný jev byl zaznamenán u BALB/c myši, kdy se zvýšila reaktivita B lymfocytů po stimulaci LPS (Ganapamo et al., 1995). Neschopnost reagovat na mitogeny T lymfocytů naznačuje, že látky přítomné ve slinách mají na tyto buňky immunosupresivní efekt (Hünig et al., 1983). Množství Th1 (IL-2 a IFN- γ) i Th2 (IL-10) cytokinů bylo po všech třech sáních větší než u kontrolních myši. Byla zjištěna velmi nízká hladina cytokinů IL-2 (<0,25 ng/ml) a IFN- γ (<0,15 ng/ml), oproti IL-10 (<2 ng/ml). To naznačuje, že dochází k polarizaci k Th2. Naproti tomu ale nedošlo ke snížení IL-2 ani IFN- γ ve srovnání s kontrolou. Rozdílné výsledky byly získány v pokusu s opakovaným sáním *I. scapularis* na BALB/c a C3H/HeN myších, kdy IL-2 a IFN- γ byly výrazně nižší a IL-10 výrazně vyšší než kontrolní skupina (Schoeler et al., 1999). Ve zmiňovaném pokusu byly použity buňky sleziny. V mém experimentu byly použity buňky z regionálních lymfatických uzlin, což může být vysvětlením rozdílné produkce cytokinů. Podobný jev byl pozorován i v dalších pokusech, kdy byly použity buňky z lymfatických uzlin (Mbow et al., 1994c, Ganapamo et al., 1995). Za zvýšení schopnosti lymfatických uzlin produkovat IL-2 po opakovaném sání může být odpovědná populace Th1 buněk, která specificky reaguje s klíšťecími antigeny a infiltruje místo sání. Je pravděpodobné, že tyto buňky produkují IFN- γ a IL-2 (Ganapamo et al., 1995, 1996). Zvýšené hladiny IL-2 a IFN- γ v regionálních lymfatických uzlinách a dále prokázaná (Mbow et al., 1994b) silná exprese IFN- γ a IL-2 mRNA v kůži mohou korelovat s tím, že v kůži myši, na nichž opakovaně sála klíšťata, byla pozorována přítomnost oddáleného typu přecitlivělosti (DTH) (Mbow et al., 1994a,b). S tím může pravděpodobně souviset i to, že opakované sání *I. ricinus* na BALB/c vyvolává částečnou rezistenci k následnému přenosu *B. burgdorferi* *I. scapularis*. K této rezistenci dochází současně při absenci získané imunity (Wikel et al., 1997).

Pomocí kvantitativní real-time PCR bylo zjištěno, že se spirochety nejvíce vyskytovaly v kůži, méně pak v srdci. V močovém měchýři borelie prokázány nebyly. V kůži bylo množství borelií největší po prvním sání nymf. Od prvního sání až ke třetímu byl trend počtu spirochet klesající. Toto snížení by mohlo souviset s výše uvedeným pozorováním, že opakované sání *I. ricinus* vyvolává částečnou rezistenci k přenosu borelii při absenci získané imunity (Wikel et al., 1997). Naproti tomu v mém pokusu jsem zjistila opačné výsledky v srdci ve srovnání s kůží. V srdci byly borelie nejvíce přítomny po druhém a v menší míře po

třetím sání. Tyto výsledky odpovídají zjištění Horké et al., kdy se SAT efekt klíštěcích slin projevil snížením množství borelií v srdci. Vysvětlením tohoto jevu by mohla být zvýšená exprese DbpA na povrchu spirochet, která by mohla snížit kolonizaci srdce (Horká et al., 2009). Získání částečné rezistence po 2. a 3. sání by se pak projevilo paradoxně zvýšeným počtem spirochet v srdci. Přítomnost borelií v kůži a srdci naznačuje, že opakované sání nymf *I. ricinus* na C3H/HeN myších pravděpodobně nevyvolává výraznější rezistenci k přenosu *B. burgdorferi*. Tyto odlišné výsledky od prokázané částečné rezistence k přenosu *B. burgdorferi* po opakovaném sání *I. scapularis* (Wikel et al., 1997) mohou souviset s tím, že myši C3H/HeN a BALB/c odpovídají různě na infekci *B. burgdorferi*. Myši BALB/c jsou více rezistentní k vývoji klinických příznaků než myši C3H/HeN, u kterých se vyvíjí vážná artritida (Schoeler et al., 1999, Barthold et al., 1990). Dále po opakovaném sání nymf *I. ricinus* byly zjištěny jen nízké hodnoty protilátek proti slinám, což naznačuje, že nedochází k vývoji rezistence k sání nymf *I. ricinus*.

V trendu produkce cytokinů byly zjištěny značné nepravidelnosti. Množství IL-2 bylo po třetím sání srovnatelné nebo vyšší než při prvním sání. U cytokinů IL-10 a IFN- γ byl zaznamenán pokles proti prvnímu sání. U všech cytokinů se vždy lišilo druhé sání od prvního a třetího v tom, že u IL-2 a IL-10 došlo k poklesu, a u IFN- γ naopak k nárůstu. Při imunizaci opakovaným sáním BALB/c a C3H/HeN myší, byla podobně zaznamenána variabilita v produkci cytokinů od prvního ke třetímu sání (Schoeler et al., 1999). Příčina v rozdílech trendu produkce cytokinů by mohla být v různé úspěšnosti sání aplikovaných nymf. Dále mohly sání klíšťat ovlivnit sezónní vlivy (Balashov, 1972). Na intenzitě produkce cytokinů během sání klíšťat se může projevit jejich fyziologie a variabilita spojená s biologickým systémem (Schoeler et al., 1999). I přes to, že byla zaznamenána variabilita v trendu produkce jednotlivých cytokinů během všech třech sání, celkové snížení množství Th1 a zvýšení Th2 cytokinů naznačuje polarizaci k Th2.

5.2. Vakcinace myší slinami klíšťat *I. ricinus*

Ve slinách klíšťat jsou obsaženy antikoagulační, protizánětlivé, imunosupresivní a vazodilatační látky, které usnadňují jejich sání na hostiteli a napomáhají přenosu patogenů (Wikel a Bergman, 1997, Francischetti et al., 2009). V regulaci imunitní odpovědi hrají důležitou roli cytokiny, a proto jsou u klíšťat vyvinuty mechanismy, které ovlivňují jejich produkci (Kroemer et al., 1993). Sliny klíšťat potlačují produkci Th1 (IL-2, IFN- γ) a zvyšují

tvorbu Th2 (IL-10) cytokinů (Zeidner et al., 1997, Schoeler et al., 1999, Ferreira a Silva, 1999, Kopecký et al., 1999). Po třech imunizačních dávkách slin a BSA byla měřena hladina prozánětlivých Th1 (IL-2, IFN- γ) a protizánětlivých Th2 (IL-10) cytokinů, u nichž dochází k ovlivnění působením klíštěcích slin. Všechny cytokiny byly zvýšeny oproti kontrolní neimunizované skupině, rozdíly byly zaznamenány mezi skupinou imunizovanou slinami a skupinou imunizovanou kontrolním proteinem BSA. Zvýšení Th1 i Th2 cytokinů proti kontrolní neimunizované skupině je zřejmě způsobeno tím, že byly použity buňky z regionálních lymfatických uzlin (Ganapamo et al., 1995). Po 2. imunizační dávce došlo ve skupině BSA k úhynu 5 myší, pravděpodobně následkem anafylaktického šoku, proto je v experimentálním schématu zahrnuta jen skupina BSA+klíšťata. Nebyly zaznamenány rozdíly mezi nestimulovanými a stimulovanými buňkami, s výjimkou IFN- γ , kdy došlo k výraznému vzestupu po stimulaci LPS. Byl zaznamenán znatelný rozdíl mezi imunizovanými skupinami a kontrolou po stimulaci LPS. Podobný nárůst byl zjištěn u BALB/c myší, kdy se zvýšila reaktivita B lymfocytů po stimulaci LPS ve srovnání s kontrolou (Ganapamo et al., 1995). Neschopnost lymfocytů proliferovat v přítomnosti mitogenů byla zřejmě způsobena vlivem slin klíšťat (Kovář et al., 2001, Need et al., 1992). Po třetí imunizační dávce slin byla zjištěna jen částečná polarizace k Th2 cytokinům. Byla naměřena vyšší hladina IL-10 (<2 ng/ml) i IFN- γ (<1,6 ng/ml) než IL-2 (<0,25 ng/ml). Po imunizaci slinami došlo ke snížení IL-2 ve srovnání se skupinou imunizovanou BSA+nymfy. Podobně jako v pokusu imunizace opakovaným sáním, by za zvýšení množství IL-2 a IFN- γ ve srovnání s kontrolou mohla být odpovědná populace Th1 lymfocytů, která specificky reaguje s klíštěcími antigeny a infiltruje místo sání (Ganapamo et al., 1995, 1996). Přímá role IL-2 v specifické proti-klíštěcí imunitě není zatím zcela jasná, ačkoliv u králíků, kterým byl podáván lidský rekombinantní IL-2, se zvýšila schopnost vývoje získané rezistence proti *I. ricinus* (Schorderet a Brossard, 1994). Látky přítomné ve slinách modulují produkci cytokinů hostitelem a způsobují polarizaci k Th2 cytokinům (Kopecký et al. 1999, Schoeler et al., 1999). T lymfocyty jsou důležitými regulátorovými a efektorovými buňkami v imunitní odpovědi hostitele proti klíštěti. Suprese Th1 a zvýšení Th2 cytokinů během sání klíšťat může ovlivnit vývoj získané rezistence u hostitele (Wikel et al., 1996b). Zjištěné množství IL-2 proto přispívá k tomu, že pravděpodobně nedošlo k vývoji rezistence ke slinám. Naproti tomu byl však zjištěn statisticky významný pokles IL-10 po imunizaci slinami+nymfy proti skupině imunizované BSA+nymfy. Zvýšené množství Th2 cytokinu IL-10 může přispívat k supresi diferenciaci a růstu Th1 subpopulace lymfocytů (O'Farrell et al., 1998, O'Garra, 1998). U IFN- γ je patrné zvýšení skupiny imunizované slinami proti skupině imunizované

BSA+nymfy. Zvýšení IFN- γ a snížení IL-10 by mohlo naznačovat, že došlo k vývoji určité imunity proti slinám. IL-10 společně s IL-4 inhibují aktivaci makrofágů a produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů. Bylo prokázáno, že IL-10 přímo reguluje proliferaci makrofágů (O'Farrell et al., 1998, O'Garra, 1998). Navíc IL-10 snižuje makrofágy regulovanou prozánětlivou odpověď a jejich schopnost prezentovat antigen T lymfocytům. Vysoká hladina IL-10 může ovlivnit Langerhansovy buňky, které jsou důležité pro vývoj získané rezistence proti sání klíšťat (Nithiuthai a Allen, 1985). Snížení množství IL-10 po imunizaci slinami zřejmě mohlo mít vliv na zvýšení IFN- γ . IFN- γ je aktivátor makrofágů a zvyšuje jejich antimikrobiální aktivitu tím, že indukuje produkci NO. Vzhledem k tomu, že antigen-prezentující buňky, jako makrofágy a dendritické buňky, reagují s *B. burgdorferi*, jejich snížení je klíčové v počátečním rozšíření spirochet (Green a Nacy, 1994, Filgueira et al., 1996, Peterson et al., 1984, Zeidner et al., 1997). V mé práci bylo pozorováno zvýšení produkce IFN- γ a tím mohlo dojít k zvýšení aktivace makrofágů (Wikel et al., 1996a). IFN- γ je klíčový stimulátor migrace lymfocytů do kůže a hlavní mediátor přesunu lymfocytů do místa DTH (Issekutz et al., 1988). Jak dříve prokázala Mbow et al., DTH reakce v kůži může souviset s rezistencí k přenosu *B. burgdorferi* (Mbow et al., 1994a,b).

Zvýšení IFN- γ a snížení IL-10 po imunizaci slinami tedy mohlo mít vliv na rozšíření spirochet ve vyšetřovaných orgánech tj. kůži, srdci a močovém měchýři. Přítomnost borelií nebyla zaznamenána v srdci. V močovém měchýři byly borelie přítomné v malém množství u skupin imunizovaných slinami i BSA. Podstatný rozdíl byl zaznamenán v přítomnosti spirochet v kůži. Po imunizaci slinami bylo v kůži přítomno výrazně méně spirochet než ve skupině imunizované BSA+klíšťata, toto snížení je statisticky signifikantní. Srovnáním skupin imunizovaných BSA a slinami, na nichž sály nymfy (za 14 dní od poslední dávky slin) *I. ricinus*, je u BSA znatelný vliv SAT efektu po sání nymf, zatímco u skupiny imunizované slinami je SAT efekt znatelně potlačen. Imunizace slinami zřejmě měla vliv na množení borelií, což naznačují nízké hodnoty po imunizaci slinami a vysoké po imunizaci BSA. Naproti tomu k potlačení SAT efektu, prokazaného v kůži, nedošlo v produkci cytokinů. Bylo prokázáno, že skupina imunizovaná slinami po aplikaci nymf vždy vykazovala u Th1 cytokinů nižší hodnoty než skupina bez nymf. U IL-10 byl průběh opačný, kdy přítomnost nymf způsobovala zvýšení množství IL-10. Tyto výsledky naznačují, že imunizace slinami neovlivnila SAT efekt v produkci cytokinů. SAT efekt spočívá v tom, že imunomodulační látky ve slinách blokují imunitní odpověď hostitele a tím umožňují přenos a množení patogenů. Molekuly účastníci se SAT mají různé protizánětlivé, imunomodulační a antihemostatické účinky (Nuttal a Labuda, 2004, Pechová et al., 2002, Severinová et al.,

2005, Kuthejlová et al., 2001, Horká et al., 2008). Pokles IL-2 a IFN- γ a zvýšení IL-10 po sání nymf *I. ricinus* na myších imunizovaných slinami potvrzuje SAT efekt.

Imunizace slinami měla vliv na produkci protilátek proti slinám. U skupin imunizovaných slinami byl zaznamenán nárůst protilátek srovnatelný s pozitivní kontrolou. Bylo prokázáno, že u C3H/HeN i BALB/c nedochází k vývoji rezistence k opakovanému sání klíšťat a imunitní odpovědi je polarizována k Th2 cytokinům (Wikel et al., 1997, Schoeler et al., 1999, Mbow 1994a,b). Při opakovaném sání ale klíšťata sají několik dní a sliny jsou do myši vpravovány postupně a v menší dávce (Schoeler et al., 1999). Naproti tomu v mém pokusu imunizace slinami byla použita jednorázová velká dávka slin (10 μ g) společně s Freundovým adjuvans. To by mohlo být možným vysvětlením zvýšení množství IFN- γ a pokles IL-10 a zvýšení množství protilátek u skupin imunizovaných slinami, kdy mohly být částečně potlačeny účinky slin vlivem imunizace. Dále, v důsledku imunizace, mohlo dojít k snížení množství borelií v kůži. Imunizace slinami se pravděpodobně projevila i na SAT efektu slin, který byl po imunizaci slinami v kůži potlačen. Ačkoliv byla navržena řada kandidátů na SAT faktor, doposud byl identifikován jako SAT faktor pouze jediný protein klíštěcích slin Salp 15, který usnadňuje infekci hostitele boreliemi (Ramamoorthi et al., 2005, Hovius et al., 2007, 2008c). Podobně jako Salp15 se mohl uplatnit sialostatin L2, který je dalším kandidátem na SAT faktor. Sialostatin L2 vykazuje protizánětlivou funkci a inhibuje proliferaci cytotoxických T lymfocytů (Kotsyfakis et al., 2006). Je možné, že tyto proteiny se mohly uplatnit v imunizaci slinami a mohly ovlivnit množství spirochet v kůži.

Vakcinace slinami může u hostitele vyvolat imunitní odpověď, která neutralizuje klíštěcí imunosupresivní molekuly a tím se může zvýšit rezistence k infekci *B. burgdorferi* (Wikel et al., 1997). I přesto však imunizace nevedla k úplnému potlačení *B. burgdorferi*, vzhledem k jejich výskytu v kůži i močovém měchýři. Polarizace cytokinů k Th1 se projevila jen částečně. Vysvětlením může být to, že druh myši C3H/HeN je citlivý k infekci *B. burgdorferi* (Barthold et al., 1990).

6 Závěr

- Imunizace opakovaným sáním nymf *I. ricinus* na C3H/HeN myších nevedla k vývoji získané rezistence. V provedeném pokusu nedošlo k ovlivnění přežívání klíšťat ani k narušení přeměny do dalších stádií.
- Nepřítomnost získané rezistence po imunizaci opakovaným sáním potvrzuje nízká hladina IL-2 a IFN- γ cytokinů a vysoká IL-10 cytokinu, dále pak malé rozdíly mezi nestimulovanými a stimulovanými buňkami.
- Přítomnost borelií v kůži a srdci a nízké hodnoty protilátek v séru naznačují, že opakované sání nymf *I. ricinus* na C3H/HeN myších pravděpodobně nevyvolává výraznější rezistenci k přenosu *B. burgdorferi*.
- V trendu produkce jednotlivých cytokinů byla zaznamenána variabilita během všech třech sání, celková úroveň Th1 a Th2 cytokinů však naznačuje polarizaci k Th2.
- U obou provedených pokusů, bylo zjištěno, že nedochází k snížení produkce cytokinů buňkami auxiliárních uzlin pod úroveň kontrolní neimunizované skupiny.
- Imunizace slinami vedla jen k částečné polarizaci k Th2 cytokinům. Byla naměřena vyšší hladina IL-10 i IFN- γ než IL-2. Zvýšení IFN- γ a snížení IL-10 oproti skupině imunizované BSA+nymfy by mohlo naznačovat, že došlo k vývoji určité imunity proti slinám.
- Imunizace slinami se pravděpodobně projevila na SAT efektu slin, který byl po imunizaci slinami v kůži výrazně potlačen. Po imunizaci slinami bylo v kůži přítomno výrazně méně spirochet než ve skupině imunizované BSA+nymfy.
- Imunizace slinami vedla k produkci protilátek proti slinám. U skupin imunizovaných slinami byl zaznamenán nárůst protilátek srovnatelný s pozitivní kontrolou.

7 Použitá literatura

- AKIN E., McHUGH G.L., FLAVELL R.A., FIKRIG E., STEERE A.C. (1999): The immunoglobulin (IgG) antibody response to OspA and OspB correlates with severe and prolonged Lyme arthritis and the IgG response to P35 correlates with mild and brief arthritis. *Infect. Immun.* 67: 173-181.
- ALLEN J.R. (1982): Observations on the behavior of *Dermacentor andersoni* larvae infesting normal and tick resistant guinea pigs. *Parasitology.* 84: 195-204.
- ANDERSON J.F., MAGNARELLI L.A. (1984): Avian and mammalian hosts for spirochete-infected ticks and insects in a Lyme disease focus in Connecticut. *Yale J. Biol. Med.* 57: 627-641.
- ANGUITA J., RAMAMOORTHY N., HOVIUS J.W., DAS S., THOMAS V., PERSINSKI R. et al. (2002): Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD(+) T cell activation. *Immunity.* 16: 849-859.
- ANGUITA J., HEDRICK M.N., FIKRIG E. (2003): Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the tick and the mammalian host. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 493-504.
- ASBRINK E. (1985): Erythema chronicum migrans Afzelius and acrodermatitis chronica atrophicans. Early and late manifestations of *Ixodes ricinus*-borne *Borrelia* spirochetes. *Acta. Derm. Venerol.* 118: 1-63.
- ASKENASE P.W., DEBERNARDO R., TAUBEN D., KASHGARIAN M. (1978): Cutaneous basophil anaphylaxis. Immediate vasopermeability increases and anaphylactic degranulation of basophils at delayed hypersensitivity reactions challenged with additional antigen. *Immunology.* 35: 741-755.
- ASKENAZE P.W., BAGNALL B.G., WORMS M.J. (1981): Cutaneous basophil-associated resistance to ectoparasites (ticks). I. Transfer with immune serum or immune cells. *Immunology.* 45: 501-511.
- BANCHEREAU J., STEINMAN R.M. (1998): Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392: 245-252.
- BARTHOLD S.W., BECK D.S., HANSE G.M., TERWILLIGER G.A., MOODY K.D. (1990): Lyme borreliosis in selected strains and ages of laboratory mice. *Journal of Infectious Diseases.* 162: 133-138.
- BARTON T.R., HARTUS M.P., WANLESS S., ELSTON D.A. (1996): The activity periods and life-cycle of the tick *Ixodes uriae* (Acari: Ixodidae) in relation to host breeding strategie. *Parasitology.* 6: 571-580.
- BELL J.F., STEWART J., WIKEL S.K. (1979): Resistance to tickborne *Francisella tularensis* by tick-sensitized rabbits: allergic kendency. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28: 876-880.
- BERGMAN D.K., RAMACHANDRA R.N., WIKEL S.K. (1995): *Dermacentor andersoni*: salivary gland proteins suppressing T-lymphocyte responses to concavalin A in vitro. *Exp. Parasitol.* 81: 262-271.
- BISHOP R., LAMBSON B., WELLS C., PANDIT P., OSASO J., NKONGE C., MORZARIA S. et al. (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. *Int. J. Parasitol.* 32: 833-842.
- BOLEHOVSKÁ R., PLÍŠEK S., PLÍŠKOVÁ L., ČERMÁKOVÁ Z., PALIČKA V. (2009): Lymeská borelióza. *Klin. Biochem. Metab.* 17: 24-28.
- BOWMAN A.S., DILLWITH J.W., SAUER J.R. (1996): Tick salivary prostaglandins: presence, origin and significance. *Parasitol. Today.* 12: 388-396.
- BRADFORD M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of mikrogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-54.
- BROSSARD M., FIVAZ V. (1982): *Ixodes ricinus*: mast cells, basophils and eosinophils in the sequence of cellular events in the skin of infested or reinfested rabbits. *Parasitology.* 85: 583-592.
- BROSSARD M., WIKEL S.K. (1997): Immunology of interactions between ticks and hosts. *Med. Vet. Entomol.* 11: 270-276.
- BROSSARD M., WIKEL S.K. (2004): Tick immunobiology. *Parasitology.* 129: 161-176.

- BROWN S.J., AAKENASE P.W. (1983): Immune rejection of ectoparasites (ticks) by T cell and IgG1 antibody recruitment of basophils and eosinophils. *Fed. Proc.* 42: 1744-1749.
- BURGDORFER W., BARBOUR A.G., HAYES S.F., BENACH J.L., GRUNWALDT E., DAVIS J.P. (1982): Lyme disease- a tick-borne spirochetosis? *Science.* 216: 1317-19.
- BURKE G., WIKEL S.K., SPIELMAN A., TELFORD S.R., MCKAY K., KRAUSE P.J. (2005): Hypersensitivity to ticks and Lyme disease risk. *Emerg. Infect. Dis.* 11:36-41.
- CAVASSANI K.A., ALIBERTI J.C., DIAS A.R., SILVA J.S., FERREIRA B.R. (2005): Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. *Immunology.* 114: 235-245.
- CLARK K., HENDRIKS A., BURGE D. (2005): Molecular identification and analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lizards in the southeastern United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2616-2625.
- COBURN J., CHEGE W., MAGOUN L., BODARY S.C., LEONG J.M. (1999): Characterization of a candidate *Borrelia burgdorferi* beta3-chain integrin ligand identified using a phage display library. *Mol. Microbiol.* 34: 926-940.
- COLLARES-PEREIRA M., COUCEIRO S., FRANCA I., KURTENBACH K., SCHAFFER S.M. et al. (2004): First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1316-1318.
- COMSTOCK L.E., THOMAS D.D. (1991): Characterization of *Borrelia burgdorferi* invasion of cultured endothelial cells. *Microb. Pathog.* 10: 137-148.
- CULLEN P.A., HAAKE D.A., ADLER B. (2004): Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiol. Rev.* 28: 291-318.
- DAI J., WANG P., ADUSUMILLI S., BOOTH C.J., NARASIMHAN S., ANGUITA J., FIKRIG E. (2009): Antibodies against a tick protein, Salp15, protect mice from the Lyme disease agent. *Cell Host Microbe.* 6: 482-492.
- DANIEL M. (2007): Nové poznatky o klíčátech a jimi přenášených nákazách. Kurz 294014. Škola veřejného zdravotnictví, IPVZ, Praha.
- DAS S., DEPONTE K., MARCANTONIO N.L., IJDO J.W., HODZIC E., KATAVOLOS P. et al. (1998): Granulocytic ehrlichiosis in tick-immune guinea pigs. *Infection and Immunity.* 66: 1803-1805.
- DAS S., BANERJEE G., DEPONTE K., MARCANTONIO N., KANTOR F.S., FIKRIG E. (2001): Salp25D, an *Ixodes scapularis* antioxidant, is 1 of 14 immunodominant antigens in engorged tick salivary glands. *J. Infect. Dis.* 184: 1056-1064.
- DEN HOLLANDER N., ALLEN J.R. (1985a): *Dermacentor variabilis*: acquired resistance to ticks in BALB/c mice. *Exp. Parasitol.* 59: 118-129.
- DEN HOLLANDER N., ALLEN J.R. (1985b): *Dermacentor variabilis*: resistance to ticks acquired by mast cell-deficient and other strains of mice. *Exp. Parasitol.* 59: 169-179.
- DÉRUAZ M., FRAUENSCHUH A., ALESSANDRI A.L., DIAS J.M., COELHO F.M., RUSSO R.C. et al. (2008): Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *J. Exp. Med.* 205: 2019-2031.
- DE SILVA A.M., FIKRIG E. (1995): Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks during blood feeding. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53: 397-404.
- DE SILVA A.M., TELFORD S.R., BRUNET L.R., BARTHOLD S.W., FIKRIG E. (1996): *Borrelia burgdorferi* OspA is an arthropod-specific transmission-blocking Lyme disease vaccine. *J. Exp. Med.* 183: 271-275.
- DE SILVA A.M., FIKRIG E. (1997): Arthropod- and host-specific gene expression by *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Invest.* 99: 377-379.
- DE SILVA A.M., FISH D., BURKOT T.R., ZHANG Y., FIKRIG E. (1997): OspA antibodies inhibit the acquisition of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes* ticks. *Infect. Immun.* 65: 3146-3150.
- DONAHUE J.G., PIESMAN J., SPIELMAN A. (1987): Reservoir competence of white-footed mice for Lyme disease spirochetes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36: 92-96.
- DVOŘÁKOVÁ H.M., DVOŘÁČKOVÁ M. (2007): Babesiosis, a little known zoonosis. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 56: 176-180.
- EARNHART C.G., BUCKLES E.L., DUMLER J.S., MARCONI R.T. (2005): Demonstration of OspC type diversity in invasive human Lyme disease isolates and identification of previously

- uncharacterized epitopes that define the specificity of the OspC murine antibody response. *Infect. Immun.* 73: 7869-7877.
- EARNHART C.G., BUCKLES E.L., MARCONI R.T. (2007): Development of an OspC-based tetravalent, recombinant, chimeric vaccinogen that elicits bactericidal antibody against diverse Lyme disease spirochete strains. *Vaccine.* 25: 466-480.
- EL-HAGE N., BABB K., CARROLL J.A., LINDSTROM N., FISCHER E.R., MILLER J.C., GILMORE R.D. et al. (2001): Surface exposure and protease insensitivity of *Borrelia burgdorferi* Erp (OspEF-related) lipoproteins. *Microbiology.* 147: 821-830.
- FALCONE F.H., PRITCHARD D.I., GIBBS B.F. (2001): Do basophils play a role in immunity against parasites? *Trends Parasitol.* 17: 126-129.
- FENG S., HODZIC E., STEVENSON B., BARTHOLD S.W. (1998): Humoral immunity to *Borrelia burgdorferi* N40 decorin binding proteins during infection of laboratory mice. *Infect. Immun.* 66: 2827-2835.
- FERREIRA B.R., SILVA J.S. (1999): Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. *Immunology.* 96: 434-439.
- FIKRIG E., PAL U., CHEN M. (2004): OspB antibody prevents *Borrelia burgdorferi* colonization of *Ixodes scapularis*. *Infect. Immun.* 72: 1755-1759.
- FILGUEIRA L., NESTLE F.O., RITTIG M., JOLLER H.I., GROSCURTH P. (1996): Human dendritic cells phagocytose and process *Borrelia burgdorferi*. *J. Immunol.* 157: 2998-3005.
- FINGERLE V., HAUSER U., LIEGL G., PETKO B., PREAC-MURSIC V., WILSKA B. (1995): Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1867-1869.
- FISHER M.A., GRIMM D., HENION A.K., ELIAS A.F., STEWART P.E., ROSA P.A., GHERARDINI F.C. (2005): *Borrelia burgdorferi* sigma54 is required for mammalian infection and vector transmission but not for tick colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 5162-5167.
- FISCHER J.R., LEBLANC K.T., LEONG J.M. (2006): Fibronectin binding protein BBK32 of the Lyme disease spirochete promotes bacterial attachment to glycosaminoglycans. *Infect. Immun.* 74: 435-441.
- FOLEY J.E., NIETO N.C. (2010): Tularemia. *Vet. Microbiol.* 140: 332-338.
- FRANCIS J., LITTLE D.A. (1964): Resistance of Droughtmaster cattle to tick infestation and babesiosis. *Aust. Vet. J.* 40: 247-253.
- FRANCISCHETTI I.M., VALENZUELA J.G., ANDERSEN J.F., MATHER T.N., RIBEIRO J.M.C. (2002): Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood.* 99: 3602-3612.
- FRANCISCHETTI I.M., SÁ-NUNES A., MANS B.J., SANTOS I.M., RIBEIRO J.M. (2009): The role of saliva in tick feeding. *Front. Biosci.* 14: 2051-2088.
- FRANZ J.K., KRAUSE A. (2003): Lyme disease (Lyme borreliosis). *Best. Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 17: 241-264.
- FRASER C.M., CASJENS S., HUANG W.M., SUTTON G.G., CLAYTON R., LATHIGRA R. et al. (1997): Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature.* 390: 580-586.
- FRAUENSCHUH A., POWER C.A., DERUAZ M., FERREIRA B.R., DA SILVA J.M., TEIXEIRA M.M. et al. (2007): Molecular cloning and characterization of a highly selective chemokine binding protein from the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *J. Biol. Chem.* 282: 27250-27258.
- FUKOMOTO S., SAKAGUCHI T., YOU M., XUAN X., FUJISAKI K. (2006): Tick troponin I-like molecule is a potent inhibitor for angiogenesis. *Microvasc. Res.* 71: 218-221.
- GANAPAMO F., RUTTI B., BROSSARD M. (1995): In vitro production of interleukin-4 and interferon-gamma by lymph node cells from BALB/c mice infested with nymphal *Ixodes ricinus* ticks. *Immunology.* 85: 120-124.
- GANAPAMO F., RUTTI B., BROSSARD M. (1996a): Immunosuppression and cytokine production in mice infested with *Ixodes ricinus* ticks: a possible role of laminin and interleukin-10 on the in vitro responsiveness of lymphocytes to mitogens. *Immunology.* 87: 259-263.

- GANAPAMO F., RUTTI B., BROSSARD M. (1996b): Cytokine production by Lymph node cells from mice infested with *Ixodes ricinus* ticks and the effect of tick salivary gland extracts on IL-2 production. *Scand. J. Immunol.* 44: 388-393.
- GARG R., JUNCADELLA I.J., RAMAMOORTHI N., ASHISH, ANANTHANARAYANAN S.K. et al. (2006): Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *J. Immunol.* 177: 6579-6583.
- GAUNT M.W., SALL A.A., 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: 1867-76.
- GE Y., LI C., CORUM L., SLAUGHTER C.A., CHARON N.W. (1998): Structure and expression of the FlaA periplasmic flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*. *J. Bacteriol.* 180: 2418-2425.
- GEORGILIS K., PEACOCKE M., KLEMPNER M.S. (1992): Fibroblasts protect the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, from ceftriaxone in vitro. *J. Infect. Dis.* 166: 440-444.
- GERN L., HUMAIR P.F. (2002): Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. *International Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control.* p. 149-174.
- GILL H.S. (1986): Kinetics of mast cell, basophil and eosinophil populations at *Hyalomma anatolicum anatolicum* feeding sites on cattle and the acquisition of resistance. *Parasitology.* 93: 305-315.
- 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*. *J. Immunol.* 166: 4319-4326.
- GILMORE R.D., PIESMAN J. (2000): Inhibition of *Borrelia burgdorferi* migration from the midgut to the salivary glands following feeding by ticks on OspC immunized mice. *Infect. Immun.* 68: 411-414.
- GLATZ M., GOLESTANI M., KERL H., MÜLLEGGER R.R. (2006): Clinical relevance of different IgG and IgM serum antibody responses to *Borrelia burgdorferi* after antibiotic therapy for erythema migrans: long-term follow-up study of 113 patients. *Arch. Dermatol.* 142: 862-868.
- GLÖCKNER G., SCHULTE-SPECHTEL U., SCHILHABEL M., FELDER M., SÜHNEL J., WILSKE B., PLATZER M. (2006): Comparative genome analysis: selection pressure on the *Borrelia* vls cassettes is essential for infectivity. *BMC Genomics.* 7: 211-220.
- GREEN S.J., NACY C.A. (1994): L-Arginine-derived nitric oxide is an antimicrobial effector molecule. *ASM News.* 60: 83-85.
- GRINGHUIS S.I., GEIJTENBEEK T.B. (2008): Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *PLoS Pathog.* 4: e31.
- GUO B.P., NORRIS S.J., ROSENBERG L.C., HOOK M. (1995): Adherence of *Borrelia burgdorferi* to the proteoglycan decorin. *Infect. Immun.* 63: 3467-3472.
- GUO B.P., BROWN E.L., DORWARD D.W., ROSENBERG L.C., HOOK M. (1998): Decorin-binding adhesins from *Borrelia burgdorferi*. *Mol. Microbiol.* 30: 711-723.
- GUO R.F., WARD P.A. (2005): Role of C5a in inflammatory responses. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 821-852.
- GUSTAFSON R. (1993): Epidemiological studie of Lyme Borreliosis and Tick-born encephalitis. Stockholm. 92: 1-63.
- HAGMAN K.E., LAHDENNE P., POPOVA T.G., PORCELLA S.F., ATKINS D.R., RADOLF J.D., NORGARD M.V. (1998): Decorin-binding protein of *Borrelia burgdorferi* is encoded within a two-gene operon and is protective in the murine model of Lyme borreliosis. *Infect. Immun.* 66: 2674-2683.
- HAGMAN K.E., YANG X., WIKEL S.K., SCHOELER G.B., CAIMANO M.J., RADOLF J.D., NORGARD M.V. (2000): Decorin-binding protein A (DbpA) of *Borrelia burgdorferi* is not protective when immunized mice are challenged via tick infestation and correlates with the lack of DbpA expression by *B. burgdorferi* in ticks. *Infect. Immun.* 68: 4759-4764.
- HAJDUŠEK O., ALMAZAN C., LOOSOVÁ G., VILLAR M., CANALE M., GRUBHOFFER L., KOPÁČEK P., DE LA FUENTE J. (2009a): Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestation. *Vaccine.* 28: 2993-2998.

- HAJDUŠEK O., SOJKA D., KOPÁČEK P., BUREŠOVÁ V., FRANTA Z., ŠAUMAN I., WINZERLING J., GRUBHOFFER L. (2009b): Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 106: 1033-1038.
- HAJNICKÁ V., KOCÁKOVÁ P., SLOVÁK M., LABUDA M., FUCHSBERGER N., NUTTALL P.A. (2000): Inhibition of the antiviral action of interferon by tick salivary gland extract. *Parasite Immunol.* 22: 201-206.
- 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 hyporesponsiveness in B lymphocytes. *Parasite Immunol.* 25: 27-37.
- HAVLÍK J. (2010): Proč je vhodné očkování proti klíšťové meningoencefalitidě? *Klin. Farmakol. Farm.* 24: 34-37.
- HEFTY P.S., JOLLIFF S.E., CAIMANO M.J., WIKEL S.K., AKINS D.R. (2002): Changes in temporal and spatial patterns of outer surface lipoprotein expression generate population heterogeneity and antigenic diversity in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 70: 3468-3478.
- HEWETSON R.W. (1972): The inheritance of resistance by cattle to cattle tick. *Aust. Vet. J.* 48: 299-303.
- HEINZ F.X., TUMA W., KUNZ C. (1981): Antigenic and immunogenic properties of defined physical forms of tick-borne encephalitis virus structural proteins. *Infect. Immun.* 33: 250-257.
- HEINZ F.X. (2003): Molecular aspects of TBE virus research. *Vaccine.* 21: 3-10.
- HELLWAGE J., MERI T., HEIKKILA T., ALITALO A., PANELIUS J., LAHDENNE P., SEPPALA I.J., MERI S. (2001): The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *J. Biol. Chem.* 276: 8427-8435.
- HERCOGOVÁ J., DOBRÁ N., VAŇOUSOVÁ D. (2005): Lymeská borelióza. *Čes-slov. Derm.* 80: 309-320.
- HOFFMANN A., WALSMANN P., RIESENER G., PAINTZ M., MARKWARDT F. (1991): Isolation and characterization of a thrombin inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*. *Pharmazie.* 46: 209-212.
- HORN F., DOS SANTOS P.C., TERMIGNONI C. (2000): *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. *Arch. Biochem. Biophys.* 384: 68-73.
- HORKÁ H., ČERNÁ-KÝČKOVÁ K., SKALLOVÁ A., KOPECKÝ J. (2009): Tick saliva affects both proliferation and distribution of *Borrelia burgdorferi* spirochetes in mouse organs and increases transmission of spirochetes to ticks. *Int. J. Med. Microbiol.* 299: 373-380.
- HOVIUS J.W., RAMAMOORTHY N., VAN'T VEER C., DE GROOT K.A., NIJHOF A.M., JONGEJAN F. et al. (2007): Identification of Salp15 homologues in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7: 296-303.
- HOVIUS J.W., Fikrig E. (2008a): Salivating for knowledge: potential pharmacological agents in tick saliva. *PLoS. Med.* 5: e43.
- HOVIUS J.W., DE JONG M.A., DEN DUNNEN J., LITJENS M., FIKRIG E., VAN DER POLL T. et al. (2008b): Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *PLoS. Pathog.* 4: e31.
- HOVIUS J.W., SCHUIJT T.J., DE GROOT K.A., OEI G.A., MARQUART J.A., DE BEER R. et al. (2008c): Preferential protection of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by a Salp15 homologue in *Ixodes ricinus* saliva. *J. Infect. Dis.* 15: 1189-1197.
- HULÍNSKÁ D., VOTÝPKA J., PLCH J., BOJAR M., HONEGR K., ŠNELEROVÁ M. (2003): Identifikace *Borrelia* a *Ehrlichia* spp. sekvenční analýzou a LightCycler polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství.* 5: 253-258.
- HÜNIG T., LOOS M., SCHIMPL A. (1983): The role of accessory cells in polyclonal T cell activation I. Both induction of interleukin 2 production and of interleukin 2 responsiveness by concanavalin A are accessory cell dependent. *Eur. J. Immunol.* 13: 1.
- HYDE F.W., JOHNSON R.C. (1984): Genetic relationship of Lyme disease spirochetes to *Borrelia*, *Treponema*, and *Leptospira*. *J. Clin. Microbiol.* 20: 151-154.

- CHMELARĚ J. (2005): Identifikace imunomodulačních molekul ze slin klíštěte *Ixodes ricinus*. Magisterská diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 60 str.
- CHMELÍK V. (2007): Klíčová meningoencefalitida-aktuální situace v ČR, onemocnění a očkování. *Remedia*. 17: 75-81.
- CHU C.Y., LIU W., JIANG B.G., WANG D.M., JIANG W.J., ZHAO Q.M., ZHANG P.H., WANG Z.X. et al. (2008): Novel genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks in southwestern China. *J. Clin. Microbiol.* 46: 3130-3133.
- INOKUMA H., KEMP D.H., WILLADSEN P. (1994): Prostaglandin E2 production by the cattle tick (*Boophilus microplus*) into feeding sites and its effect on the response of bovine mononuclear cells to mitogen. *Vet. Parasitol.* 53: 293-299.
- ISSEKUTZ T.B., STOLTZ J.M., MEIDE P.V.D. (1988): Lymphocyte recruitment in delayed-type hypersensitivity. The role of IFN- γ . *J. Immunol.* 140: 2989.
- JONES L.D., HODGSON E., NUTTALL P.A. (1989): Enhancement of virus transmission by tick salivary glands. *J. Gen. Virol.* 70: 1895-1898.
- JONES L.D., HODGSON E., WILLIAMS T., HIGGS S., NUTTALL P.A. (1992): Saliva activated transmission (SAT) of Thogoto virus: relationship with vector potential of different haematophagous arthropods. *Med. Vet. Entomol.* 6: 261-265.
- KALINOVÁ Z., CISLÁKOVÁ L., HALÁMOVÁ M. (2009): Ehrlichiosis/Anaplasmosis. *Klin. Mikrobiol. Infekc. Lek.* 15: 210-213.
- KALISH R.A., LEONG J.M., STEERE A.C. (1993): Association of treatment resistant chronic Lyme arthritis with HLA-DR4 and antibody reactivity to OspA and OspB of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 61: 2774-2779.
- KAISER R. (1999): The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994-98: a prospective study of 656 patients. *Brain.* 122: 2067-2078.
- KAISER P.O., RIESS T., O'ROURKE F., LINKE D., KEMPF V.A. (2010): *Bartonella* spp.: Throwing light on uncommon human infections. *Int. J. Med. Microbiol.* 301: 7-15.
- KARCZEWSKI J., ENDRIS R.G., CONNOLLY T.M. (1994): Disagregin is a fibrinogen receptor antagonist lacking the Arg-Gly-Asp sequence from the tick, *Ornithodoros moubata*. *J. Biol. Chem.* 269: 6702-6708.
- KARCZEWSKI J., WAXMAN L., ENDRIS R.G., CONNOLLY T.M. (1995): An inhibitor from the argasid tick *Ornithodoros moubata* of cell adhesion to collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208: 532-541.
- KJELLEN L., LINDAHL U. (1991): Proteoglycans: structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 443-475.
- KLEMPNER M.S., NORING R., EPSTEIN M.P., McCLOUD B., ROGERS R.A. (1996): Binding of human urokinase type plasminogen activator and plasminogen to *Borrelia* species. *J. Infect. Dis.* 174: 97-104.
- KODRICK S.K., BREITSCHWERDT E.B., HEGARTY B.C., SOUTHWICK K.L., COLITZ C.M. et al. (1999): Coinfection with multiple tick-borne pathogens in a Walker Hound Kennel in North Carolina. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2631-2638.
- KOIDE S., YANG X., HUANG X., DUNN J.J., LUFT B.J. (2005): Structure-based design of a second-generation Lyme disease vaccine based on a C-terminal fragment of *Borrelia burgdorferi* OspA. *J. Mol. Biol.* 350: 290-299.
- KOPECKÝ J., KUTHEJLOVÁ M. (1998): Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanisms of natural immunity *in vitro*. *Parasite Immunol.* 20: 169-174.
- KOPECKÝ J., KUTHEJLOVÁ M., PECHOVÁ J. (1999): Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon- γ by the upregulation of interleukin-10. *Parasite Immunol.* 21: 351-356.
- KOPECKÝ J. (2008): Klíštěcí sliny a přenos patogenů. Epidemiologie vybraných parazitárních nákaz. Sborník. Semináře v Lékařském domě v Praze.
- KOTSYFAKIS M., SÁ-NUNES A., FRANCISCHETTI I.M., MATHER T.N., ANDERSEN J.F., RIBEIRO J.M. (2006): Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.* 281: 26298-26307.

- KOTSYFAKIS M., ANDERSON J.M., ANDERSEN J.F., CALVO E., FRANCISCHETTI I.M. et al. (2008): Cutting edge: Immunity against a “silent” salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. *J. Immunol.* 181: 5209-5212.
- KOTSYFAKIS M., HORKÁ H., SALÁT J., ANDERSEN J.F. (2010): The crystal structures of two salivary cystatins from tick *Ixodes scapularis* and the effect of these inhibitors on the establishment of *Borrelia burgdorferi* infection in a murine model. *Mol. Microbiol.* 77: 456-470.
- 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. *J. Parasitol.* 87: 1342-1348.
- KOVÁŘ L., KOPECKÝ J., ŘÍHOVÁ B. (2002): Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick modulates the host immune response towards the TH2 cytokine profile. *Parasitol. Res.* 88: 1066-1072.
- KOVÁŘ L. (2004): Tick saliva in anti-tick immunity and pathogen transmission. *Folia Microbiol.* 49: 327-336.
- KORENBERG E.I. GORELOVA N.B., KOVALEVSKII Y.V. (2002): Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia. *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control.* p. 175-200.
- KRAICZY P., SKERKA C., KIRSCHFINK M., ZIPFEL P.F., BRADE V. (2001): Mechanism of complement resistance of pathogenic *Borrelia burgdorferi* isolates. *Int. Immunopharmacol.* 1: 393-401.
- KRAMÁŘ R. (2007): Lékařská mikrobiologie. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta. 73 str.
- KROČOVÁ Z., MACELA A., HERNYCHOVÁ L., KROCA M., PECHOVÁ J., KOPECKÝ J. (2003): Tick salivary gland extract accelerates proliferation of *Francisella tularensis* in the host. *J. Parasitol.* 89: 14-20.
- KROEMER G., MORENO DE ALBORÁN I., GONZALO J.A., MARTÍNEZ C. (1993): Immunoregulation by cytokines. *Crit. Rev. Immunol.* 13: 163-191.
- KŘUPKA M., RAŠKA M., BĚLÁKOVÁ J., HORYNOVÁ M., NOVOTNÝ R., WEIGL E. (2007): Biological aspects of Lyme disease spirochetes: Unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech Repub.* 151: 175-186.
- KŘUPKA M., RAŠKA M., WEIGL E. (2008): Lymfská borelióza- biologie, patogeneze, diagnostika a léčba. *Dermatol. praxi.* 2: 236-239.
- KUBEŠ M., FUCHSBERGER N., LABUDA M., ŽUFFOVÁ E., NUTTALL P.A. (1994): Salivary gland extracts of partially fed *Dermacentor reticulatus* ticks decrease natural killer cell activity *in vitro*. *Immunology.* 82: 113-116.
- KURTENBACH K., SEWELL H., OGDEN N., RANDOLPH S.E., NUTTALL P.A. (1998): Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. *Infect. Immun.* 66: 1248-1251.
- KUTHEJLOVÁ M., KOPECKÝ J., ŠTĚPÁNOVÁ G., MACELA A. (2001): Tick salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelii* spirochetes by mouse macrophages. *Infect. Immun.* 69: 575-578.
- KÝČKOVÁ K., KOPECKÝ J. (2006): Effect of tick saliva on mechanisms of innate immune responses against *Borrelia afzelii*. *J. Med. Entomol.* 43: 1208-1214.
- LABUDA M., TRIMMELL A.R., LICKOVÁ M., KAZIMÍROVÁ M., DAVIES G.M., LISSINA O., HAILS R.S., NUTTALL P.A. (2006): An antivektor vaccine protects against a lethal vector-borne pathogen. *PLoS Pathog.* 2: e27.
- LAM T.T., NGUYEN T.P., MONTGOMERY R.R., KANTOR F.S., FIKRIG E., FLAVELL R.A. (1994): Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *Infect. Immun.* 62: 290-298.
- LANE R.S., PIESMAN J., BURGDORFER W. (1991): Lyme borreliosis: relation of its causative agent to its vectors and hosts in North America and Europe. *Annu. Rev. Entomol.* 36: 587-609.
- LAWRIE C.H., RANDOLPH S.E., NUTTALL P.A. (1999): *Ixodes* ticks: serum species sensitivity of anticomplement activity. *Exp. Parasitol.* 93: 207-214.
- LAWRIE C.H., SIM R.B., NUTTALL P.A. (2005): Investigation of the mechanism of anti-complement activity in *Ixodes ricinus* ticks. *Mol. Immunol.* 42: 31-38.

- LEBOULLE G., CRIPPA M., DECREM Y., MEJRI N., BROSSARD M., BOLLEN A., GODFROID E. (2002) Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *J. Biol. Chem.* 277: 10083-10089.
- LEONG J.M., MORRISSEY P.E., ORTEGA-BARRIA E., PEREIRA M.E., COBURN J. (1995): Hemagglutination and proteoglycan binding by the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 63: 874-883.
- LI H., DUNN J.J., LUFT B.J., LAWSON C.L. (1997): Crystal structure of Lyme disease antigen outer surface protein A complexed with an Fab. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3584-3589.
- LIANG F.T., ALVAREZ A.L., GU Y., NOWLING J.M., RAMAMOORTHY R., PHILIPP M.T. (1999): An immunodominant conserved region within the variable domain of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi*. *J. Immunol.* 163: 5566-5573.
- MAGNARELLI L.A., ANDERSON J.F., FISH D. (1987): Transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae). *J. Infect. Dis.* 156: 234-236.
- MAGNUSON H.J., CAPEL HILL N.C., EAGLE H., FLEISCHMAN R. (1948) The minimal infectious inoculum of *Spirochaeta pallia* (Nichols strain) and a consideration of its rate of multiplication in vivo. *Am. J. Syph. Gonorrhoea Vener Dis.* 32: 1-18
- MACHÁČKOVÁ M., OBORNÍK M., KOPECKÝ J. (2006): Effect of salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks on proliferation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* in vivo. *Folia Parasitol.* 53: 153-158.
- MALAWISTA S.E., DE BOISFLEUR CHEVANCE A. (2008): Clocking the Lyme spirochete. *PLoS One.* 3: e1633.
- MANS B.J., COETZEE J., LOUW A.I., GASPAR A.R., NEITZ A.W. (2000): Disaggregation of aggregated platelets by apyrase from the tick, *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp. Appl. Acarol.* 24: 271-282.
- MANS B.J., LOUW A.I., NEITZ A.W. (2002): Savignygrin, a platelet aggregation inhibitor from the soft tick *Ornithodoros savignyi*, presents the RGD integrin recognition motif on the Kunitz-BPTI fold. *J. Biol. Chem.* 277: 21371-21378.
- MARASPIN V., CIMPERMAN J., LOTRIC-FURLAN S., RUŽIĆ-SABLJIĆ E., JURCA T., PICKEN R.N., STRLE F. (2002): Solitary borrelial lymphocytoma in adult patients. *Wien. Klin. Wochenschr.* 114: 515-523.
- MARCONI R.T., SAMUELS D.S., GARCON CF. (1993): Transcriptional analyses and mapping of the ospC gene in Lyme disease spirochetes. *J. Bacteriol.* 175: 926-932.
- MARGOS G., VOLLMER S.A., CORNET M., GARNIER M., FINGERLE V., WILSKE B., BORMANE A. et al. (2009): A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Exp. Appl. Acarol.* 75: 5410-5416.
- MARITZ-OLIVIER C., STUTZER C., JONGEJAN F., NEITZ A.W., GASPAR A.R. (2007): Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. *Trends Parasitol.* 23: 397-407.
- MATHER T.N., WILSON M.L., MOORE S.I., RIBEIRO J.M., SPIELMAN A. (1989): Comparing the relative potential of rodents as reservoirs of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*). *Am. J. Epidemiol.* 130: 143-150.
- MATSUMOTO K., INOKUMA H., OHNO K., ONISHI T. (2001): Effects of salivary gland extract from *Rhipicephalus sanguineus* on immunoglobulin class productivity of canine peripheral blood lymphocytes. *J. Vet. Med. Sci.* 63: 325-328.
- MAURIN M., BIRTLES R., RAOULT D. (1997): Current knowledge of *Bartonella* species. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16: 487-506.
- MBOW M.L., RUTTI B., BROSSARD M. (1994a): Infiltration of CD4+ CD8+ T cells, and expression of ICAM-1, Ia antigens, IL-1 α and TNF- α in the skin lesion of BALB/c mice undergoing repeated infestations with nymphal *Ixodes ricinus* ticks. *Immunology.* 82: 596-602.
- MBOW M.L., CHRISTE M., RUTTI B., BROSSARD M. (1994b): Absence of acquired resistance to nymphal *Ixodes ricinus* ticks in BALB/c mice developing cutaneous reactions. *J. Parasitol.* 80: 81-87.
- MBOW M.L., RUTTI B., BROSSARD M. (1994c): IFN-gamma, IL-2 and IL-4 mRNA expression in the skin and draining lymph nodes of BALB/c mice repeatedly infested with nymphal *Ixodes ricinus* ticks. *Cell Immunol.* 156: 254-261.

- MISHAEVA N.P. (1990): Protection of vertebrates from experimental tickborne encephalitis in active and passive immunization against *Ixodes* antigens. *Vop. Virusol.* 8: 93-98.
- MONTGOMERY R.R., NATHANSON M.H., MALAWISTA S.E. (1993): The fate of *Borrelia burgdorferi*, the agent for Lyme disease, in mouse macrophages. Destruction, survival, recovery. *The Journal of Immunology.* 150: 909-915.
- MONTGOMERY R.R., MALAWISTA S.E., FEEN K.J., BOCKENSTEDT K.L. (1996): Direct demonstration of antigenic substitution of *Borrelia burgdorferi* ex vivo: exploration of the paradox of the early immune response to outer surface proteins A and C in Lyme disease. *J. Exp. Med.* 183: 261-269.
- MULENGA A., SUGIMOTO C., 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. *Infect. Immun.* 67: 1652-1658.
- MULENGA A., SUGIMOTO C., ONUMA M. (2000): Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes Infect.* 2: 1353-1361.
- MURGIA R., PIAZZETTA C., CINCO M. (2002): Cystic forms of *Borrelia burgdorferi sensu lato*: induction, development, and the role of RpoS. *Wien. Klin. Wochenschr.* 114: 574-579.
- MÜLLEGGER R.R. (2004): Dermatological manifestations of Lyme borreliosis. *Eur. J. Dermatol.* 14: 296-309.
- NARASIMHAN S., SUKUMARAN B., BOZDOGAN J., THOMAS V., LIANG X., DEPONTE K. et al. (2007a): A tick antioxidant facilitates the Lyme disease agent's successful migration from the mammalian host to the arthropod vector. *Cell Host Microbe.* 2: 7-18.
- NARASIMHAN S., DEPONTE K., MARCANTONIO N., LIANG X., ROYCE T.E., NELSON F. et al. (2007b): Immunity against *Ixodes scapularis* salivary proteins expressed within 24 hours of attachment thwarts tick feeding and impairs *Borrelia* transmission. *PLoS One.* 2: e451.
- NEED J.T., BUTLER J.F., PECK A.B. (1992): Cellular responses of laboratory mice to feeding of *Ornithodoros talaje* (Acari: Argasidae) larvae. *J. Med. Entomol.* 29: 423-429.
- NEFEDOVA V.V., KORENGER E.I., GORELOVA N.B., KOVALEVSKII Y.V. (2004): Studies on the transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in the taiga tick *Ixodes persulcatus*. *Folia Parasitologica.* 51: 67-71.
- NITHIUTHAI S., ALLEN J.R. (1984): Significant changes in epidermal Langerhans cells of guinea-pigs infested with ticks (*Dermacentor andersoni*). *Immunology.* 51: 133-141.
- NITHIUTHAI S., ALLEN J.R. (1985): Langerhans cells present tick antigens to lymph node cells from ticksensitized guinea-pigs. *Immunology.* 55: 157-163.
- NORRIS S.J., CARTER C.J., HOWELL J.K., BARBOUR A.G. (1992): Lowpassage- associated proteins of *Borrelia burgdorferi* B31: characterization and molecular cloning of OspD, a surface-exposed, plasmid-encoded lipoprotein. *Infect. Immun.* 60: 4662-4672.
- NUNN M.A., SHARMA A., PAESEN G.C., ADAMSON S., LISSINA O., WILLIS A.C., NUTTALL P.A. (2005): Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *J. Immunol.* 174: 2084-2091.
- NUTTALL P.A., PAESEN C.H., WANG L., WANG H. (2000): Vector-host interaction in disease transmission. *J. Mol. Microbiol.* 2: 381-386.
- NUTTALL P.A., LABUDA M. (2004): Tick-host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology.* 129: 177-189.
- NUTTALL P.A., TRIMNELL A.R., KAZIMIROVÁ M., LABUDA M. (2006): Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunology.* 28: 155-163.
- O'GARRA A. (1998): Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity.* 8: 275-283.
- OGDEN N.H., CASE A.N., LAWRIE C.H., FRENCH N.P., WOLDEHWET Z., CARTER S.D. (2002): IgG responses to salivary gland extract of *Ixodes ricinus* ticks vary inversely with resistance in naturally exposed sheep. *Med. Vet. Entomol.* 16: 186-192.

- O'FARRELL A., LIU Y., MOORE K.W., MUI A.L.F. (1998): IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: Evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. *The EMBO Journal*. 17: 1006-1018.
- OHNISHI J., PIESMAN J., DE SILVA A.M. (2001): Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 670-675.
- PAESEN G.C., ADAMS P.L., HARLOS K., NUTTALL P.A., STUART D.I. (1999): Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and threedimensional structure. *Mol. Cell*. 3: 661-671.
- PAL U., DE SILVA A.M., MONTGOMERY R.R., FISH D., ANGUITA J., ANDERSON J.F., et al. (2000): Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. *J. Clin. Invest.* 106: 561-569.
- PAL U., LI X., WANG T., MONTGOMERY R.R., RAMAMOORTHY N., DE SILVA A.M., BAO F. et al. (2004): TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell*. 119: 457-468.
- PAPATHEODOROU V., BROSSARD M. (1987): C3 levels in the sera of rabbits infested and re-infested with *Ixodes ricinus* L. and in midguts of fed ticks. *Exp. Appl. Acarol.* 3: 53-59.
- PARETI D.L. (2000): Outer surface protein A and arthritis in hamster. *Infect. Immun.* 68: 7212-7213.
- PAROLA P., PADDOCK C.D., RAOULT D. (2005): Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 719-756.
- 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. *J. Immunol.* 178: 7064-7071.
- PEDIBHOTLA V.K., SAUER J.R., STANLEY-SAMUELSON D.W. (1997): Prostaglandin biosynthesis by salivary glands isolated from the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 255-261.
- PECHOVÁ J., ŠTĚPÁNOVÁ G., KOVÁŘ L., KOPECKÝ J. (2002): Tick salivary gland extract-activated transmission of *Borrelia afzelii* spirochaetes. *Folia Parasitologica*. 49: 153-159.
- PECHOVÁ J., KOPECKÝ J., SALÁT J. (2004): Effect of tick salivary gland extract on the cytokine production by mouse epidermal cells. *Folia Parasitol.* 51: 367-372.
- PETERSON P.K., CLAWSON C.C., LEE D.A., GARLICH D.J., QUIE P.G., JOHNSON R.C. (1984): Human phagocyte interactions with the Lyme disease spirochete. *Infect. Immun.* 46: 608-611.
- PLASTERK R.H.A., SIMON M.I., BARBOUR A.G. (1985): Transposition of structural genes to an expression sequence on a linear plastid cause antigenic variation in the bacterium *Borrelia hermsii*. *Nature*. 318: 257-263.
- PREVOT P.P., ADAM B., BOUDJELTIA K.Z., BROSSARD M., LINS L., CAUCHIE P., BRASSEUR R. et al. (2006): Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *J. Biol.Chem.* 281: 26361-26369.
- PREVOT P.P., COUVREUR B., Denis V., BROSSARD M., VANHAMME L., GODFROID E. (2007): Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin. *Vaccine*. 25: 3284-3292.
- PREVOT P.P., BESCHIN A., LINS L., BEAUFAYS J., GROSJEAN A., BRUYS L., ADAM B. et al. (2009): Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *FEBS J.* 276: 3235-3246.
- QIAN Y., YUAN J., ESSENBERG R.C., BOWMAN A.S., SHOOK A.L., DILLWITH J.W., SAUER J.R. (1998): Prostaglandin E2 in the salivary glands of the female tick, *Amblyomma americanum* (L.): calcium mobilization and exocytosis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 221-228.
- 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. *J. Med. Entomol.* 29: 818-826.
- RAMAMOORTHY N., NARASIMHAN S., PAL U., BAO F., YANG X.F., FISH D., ANGUITA J. et al. (2005): The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature*. 436: 573-577.
- RAOULT D. (1991): Antibiotic treatment of rickettsiosis, recent advances and current concepts. *Eur. J. Epidemiol.* 7: 276-281.

- REVEL A.T., BLENVINS J.S., ALMAZÁN C., NEIL L., KOCAN K.M., DE LA FUENTE et al. (2005): *bptA* (*bbe16*) is essential for the persistence of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, in its natural tick vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 6972-6977.
- RIBEIRO J.M., MAKOUL G.T., LEVINE J., ROBINSON D.R., SPIELMAN A. (1985): Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *J. Exp. Med.* 161: 332-344.
- RIBEIRO J.M., SPIELMAN A. (1986): *Ixodes dammini*: salivary anaphylatoxin inactivating activity. *Exp. Parasitol.* 62: 292-297.
- RIBEIRO J.M. (1987): Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annual Review of Entomology.* 32: 463-478.
- RIBEIRO J.M., MATHER T.N., PIESMAN J., SPIELMAN A. (1987): Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (*Acarini: Ixodidae*). *J. Med. Entomol.* 24: 201-205.
- RIBEIRO J.M. (1989): Role of saliva in tick-host interaction. *Experimental and Applied Acarology.* 7: 15-20.
- RIBEIRO J.M., WEIS J.J., TELFORD S.R. (1990): Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Exp. Parasitol.* 70: 382-388.
- ROHÁČOVÁ H. (2006): Onemocnění přenášená klíšťaty. *Interní Med.* 6: 280-283.
- RUDENKO N., GOLOVCHENKO M., GRUBHOFFER L., OLIVER J.H. Jr. (2009a): *Borrelia caroliensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex from the southeastern region of the United States. *J. Clin. Microbiol.* 47: 134-141.
- RUDENKO N., GOLOVCHENKO M., LIN T., GAO L., GRUBHOFFER L., OLIVER J.H. Jr. (2009b): Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex, *Borrelia americana* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* 47: 3875-3880.
- RÜDIGER H., GABIUS H.J. (2001): Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconj. J.* 18: 589-613.
- RYFFEL k., PETER O., RUTTI B., SUARD A., DAYER E. (1999): Scored antibody reactivity determined by immunoblotting shows an association between clinical manifestation and presence of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, and *B. valaisiana* in humans. *J. Clin. Microbiol.* 37: 4086-4092.
- RYŠAVÝ B., ČERNÁ Ž., CHALUPSKÝ J., ORSZÁGH I., VOJTEK J. (1988): *Základy parazitologie*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha. 215 str.
- SADZIENE A., WILSKA B., FERDOWS M.S., BARBOUR A.G. (1993): The cryptic *ospC* gene of *Borrelia burgdorferi* B31 is located on a circular plasmid. *Infect. Immun.* 61: 2192-2195.
- SÁ-NUNES A., BAFICA A., LUCAS D.A., CONRADS T.P., VEENSTRA T.D., ANDERSEN J.F. et al. (2007): Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. *J. Immunol.* 179: 1497-1505.
- SEVERINOVÁ J., SALÁT J., KROČOVÁ Z., ŘEZNÍČKOVÁ J., DEMOVÁ H., HORKÁ H., KOPECKÝ J. (2005): Co-inoculation of *Borrelia afzelii* with tick salivary gland extract influences distribution of immunocompetent cells in the skin and lymph nodes of mice. *Folia Microbiol.* 50: 457-463.
- SCHOELER G.B., MANWEILER S.A., WIKEL S.K. (1999): *Ixodes scapularis*: effects of repeated infestations with pathogen-free nymphs on macrophage and T lymphocyte cytokine responses of BALB/c and C3H/HeN mice. *Exp. Parasitol.* 92: 239-248.
- SCHORDERET S., BROSSARD M. (1994): Effects of human recombinant interleukin-2 on the resistance, and on the humoral and cellular response of rabbits infested with adult *Ixodes ricinus* ticks. *Vet. Parasit.* 54: 375-387.
- SCHROEDER H., DAIX V., GILLET L., RENAULD J.C., VANDERPLASSCHEN A. (2007): The paralogous salivary anticomplement proteins IRAC I and IRAC II encoded by *Ixodes ricinus* ticks have broad and complementary inhibitory activities against the complement of different host species. *Microbes Infect.* 9: 247-250.
- SCHUIJT T.J., HOVIUS J.W., VAN DER POLL T., VAN DAM A.P., FIKRIG E. (2010): Lyme borreliosis vaccination: the facts, the challenge and the future. *Trends Parasitol.* 27: 40-47.

- SCHWAN T.G.,PIESMAN J.,GOLDE W.T., DOLAN M.C., ROSA P.A. (1995): Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53: 397-404.
- SCHWAN T.G.,PIESMAN J. (2002): Vector interaction and molecular adaptations of Lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 115-121.
- SINGH S.K., GIRSCHICK H.J. (2004): Molecular survival strategies of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Lancet Infect. Dis.* 4: 575-583.
- SINGH S.K., GIRSCHICK H.J. (2006): Toll-like receptors in *Borrelia burgdorferi*-induced inflammation. *Clin. Microbiol. Infect.* 12: 705-717.
- SNOWDEN J., STOVALL S. (2010): Tularemia: Retrospective review of 10 years experience in Arkansas. *Clin. Pediatr. (Phila)*.
- SONENSHINE D.E. (1993): Biology of ticks. New York: *Oxford Univ. Press*.
- STANEK G. (2009): Büchse der Pandora: Krankheitserreger in *Ixodes ricinus*-Zecken in Mitteleuropa. *Wien. Klin. Wochenschr.* 121: 673-683.
- STEERE A.C. (2001): Lyme disease. *N Engl Med.* 345: 115-125.
- STEEVES E. B., ALLEN J. R. (1991): Tick resistance in mast cell-deficient mice: histological studies. *International Journal for Parasitology.* 21: 265-268.
- STEVENSON B., SCHWAN T.G., ROSA P. (1995): Temperature-related differential expression of antigens in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 63: 4535-4539.
- STEVENSON B., EL-HAGE N., HINES M.A., MILLER J.C., BABB K. (2002): Differential binding of host complement inhibitor factor H by *Borrelia burgdorferi* Erp surface proteins: a possible mechanism underlying the expansive host range of Lyme disease spirochetes. *Infect. Immun.* 70: 491-497.
- STRUBE C., MONTEREGRO V.M., EPE C., ECKELT E., SCHNIEDER T. (2010): Establishment of a minor groove binder-probe based quantitative real time PCR to detect *Borrelia burgdorferi sensu lato* and differentiation of *Borrelia spielmanii* by ospA-specific conventional PCR. *Parasit. Vectors.* 3: 69.
- STUBS G., FINGERLE V., WILSKE B., GÖBEL U.B., ZÄHRINGER U., SCHUMANN R.R., SCHRÖDER N.W. (2009): Acylated cholesteryl galactosides are specific antigens of *Borrelia* causing lyme disease and frequently induce antibodies in late stages of disease. *J. Biol.Chem.* 284: 13326-13334.
- STUBS G., RUPP B., SCHUMANN R.R., SCHRÖDER N.W., RADEMANN J. (2010): Chemoenzymatic synthesis of a glycolipid library and elucidation of the antigenic epitope for construction of a vaccine against Lyme disease. *Chemistry.* 16: 3536-3544.
- SUK K., DAS S., SUN W., JWANG B., BARTHOLD S.W., FLAVELL R.A., FIKRIG E. (1995): *Borrelia burgdorferi* genes selectively expressed in the infected host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4269-4273.
- SUN Y., XU R. (2003): Ability of *Ixodes persulcatus*, *Haemaphysalis coccinea* and *Dermacentor silvarum* ticks to acquire and transstadially transmit *Borrelia garinii*. *Exp. Appl. Acarol.* 31: 151-160.
- SÜSS J. (2003): Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine.* 21: 19-35.
- SZU, <http://www.szu.cz/tema/prevence/onemocneni-prenasena-klistaty-v-ceske-republice>
- TAKAYAMA K., ROTHENBERG R.J., BARBOUR A.G. (1987): Absence of lipopolysaccharide in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 55: 2311-2313.
- TÄRNVIK A., CHU M.C. (2007): New approaches to diagnosis and therapy of tularemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1105: 378-404.
- TILLY K., ROSA P.A., STEWART P.E. (2008): Biology of infection with *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 22: 217-234.
- TITUS R.G., RIBEIRO J.M. (1990): The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. *Parasitol. Today.* 6: 157-160.
- TOUTOUNGI L.N., GERN L. (1993): Ability of transovarially and subsequent transstadially infected *Ixodes hexagonu* ticks to maintain and transit *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. *Exp. Appl. Acarol.* 17: 581-586.

- TRAGER W. (1939): Acquired immunity to ticks. *J. Parasitol.* 25: 57-81.
- TRIMNELL A.R., HAILS R.S., NUTTALL P.A. (2002): Dual-action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. *Vaccine.* 20: 3560-3568.
- TRIMNELL A.R., DAVIES G.M., LISSINA O., HAILS R.S., NUTTALL P.A. (2005): A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine.* 23: 4329-4341.
- TYSON K., ELKINS C., PATTERSON H., FIKRIG E., DE SILVA A. (2007): Biochemical and functional characterization of Salp20, an *Ixodes scapularis* tick salivary protein that inhibits the complement pathway. *Insect. Mol. Biol.* 16: 469-479.
- 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. *J. Exp. Med.* 180: 1077-1085.
- VAN DAM A.P., KUIPER H., VOS K., WIDJOJOKUSUMO A., DE JONGH B.M., SPANJAARD L. et al. (1993): Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestation of Lyme borreliosis. *Clin. Infect. Dis.* 17: 708-717.
- VAN DE LOCHT A., STUBBS M.T., BODE W., FRIEDRICH T., BOLLSCHWEILER C., HÖFFKE W., HUBER R. (1996): The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma? *Embo. J.* 15: 6011-6017.
- VANNIER E., GEWURZ B.E., KRAUSE P.J. (2008): Human babesiosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 22: 469-488.
- WALLICH R., BRENNER C., KRAMER M.D., SIMON M.M. (1995): Molecular cloning and immunological characterization of a novel linear-plasmid-encoded gene, pG, of *Borrelia burgdorferi* expressed only in vivo. *Infect. Immun.* 63: 3327-3335.
- WANG I.N., DYKHUIZEN D.E., QIU W., DUNN J.J., BOSLER E.M., LUFT B.J. (1999): Genetic diversity of OspC in a local population of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *Genetics.* 151: 15-30.
- WANG H., NUTTALL P.A. (1994): Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology.* 109: 525-530.
- WANG X., COONS L.B., TAYLOR D.B., STEVENS S.E. Jr., GARTNER T.K. (1996): Variabilin, a novel RGD-containing antagonist of GPIIb-IIIa and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*. *J. Biol. Chem.* 271: 17785-17790.
- WAXMAN L., SMITH D.E., ARCURI K.E., VLASUK G.P. (1990): Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Science.* 248: 593-596.
- WAXMAN L., CONNOLLY T.M. (1993): Isolation of an inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *J. Biol. Chem.* 268: 5445-5449.
- WIKEL S.K. (1979): Acquired resistance to ticks: expression of resistance by C4-deficient guinea pigs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28: 586-590.
- WIKEL S.K. (1982): Influence of *Dermacentor andersoni* infestation on lymphocyte responsiveness to mitogens. *Ann. Trop. Parasitol.* 76: 627-632.
- WIKEL S.K., RAMACHANDRA R.N., BERGMAN D.K. (1994): Tick-induced modulation of the host immune response. *Int. J. Parasitol.* 24: 59-66.
- WIKEL S.K. (1996): Host immunity to ticks. *Ann. Rev. Entomol.* 41: 1-22.
- WIKEL S.K., BERGMAN D.K. (1997): Tick host immunology: significant advances and challenging opportunities. *Parasitol. Today.* 13: 383-389.
- WIKEL S. (1999): Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *Int. J. Parasitol.* 29: 851-859.
- WIKEL S.K., RAMACHANDRA R.N., BERGMAN D.K., BURKOT T.R., PIESMAN J. (1997): Infestation with pathogen-free nymphs of the tick *Ixodes scapularis* induces host resistance to transmission of *Borrelia burgdorferi* by ticks. *Infect. Immun.* 65: 335-338.
- WILLADSEN P., MCKENNA R.V., RIDING G.A. (1988): Isolation from the cattle tick, *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. *Int. J. Parasitol.* 18: 183-189.
- WILLADSEN P., BIRD P., COBON G.S., HUNGERFORD J. (1995): Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology.* 110: 43-50.

- WILLETT T.A., MEYER A.L., BROWN E.L., HUBER B.T. (2004): An effective second-generation outer surface protein A-derived Lyme vaccine that eliminates a potentially autoreactive T cell epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 1303-1308.
- WILSKE B., PREAC-MURSIC V., JAURIS S., HOFMANN A., PRADEL I., SOUTSCHEK E. et al. (1993): Immunological and molecular polymorphisms of OspC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 61: 2182-2911.
- WILSKE B. (2005): Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis. *Ann. Med.* 37: 568-579.
- WOLDEHIWET Z. (2010): The Natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet. Parasitol.* 167: 108-122.
- WORMSER G.P. (2005): Prevention of Lyme borreliosis. *Wien. Klin. Wochenschr.* 117: 385-391.
- YU D., LIANG J., YU H., WU H., XU C., LIU J., LAI R. (2006): A tick B-cell inhibitory protein from salivary glands of the hard tick, *Hyalomma asiaticum asiaticum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343: 585-590.
- ZEIDNER N., MBOW M.L., DOLAN M., MASSUNG R., BACA E., PIESMAN J. (1997): Effects of *Ixodes scapularis* and *Borrelia burgdorferi* on modulation of the host immune response: induction of a TH2 cytokine response in Lyme disease-susceptible (C3H/HeJ) mice but not in disease-resistant (BALB/c) mice. *Infect. Immun.* 65: 3100-3106.
- ZEIDNER N.S., SCHNEIDER B.S., NUNCIO M.S., GERN L., PIESMAN J. (2002) Co-inoculation *Borrelia spp.* with tick salivary gland lysate enhances spirochaete load in mice and is tick species-specific. *J.Parasitol.* 88: 1276-78.
- ZHANG J.R., HARDHAM J.M., BARBOUR A.G., NORRIS S.J. (1997): Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. *Cell.* 89: 275-285.
- ZHU K., BOWMAN A.S., BRIGHAM D.L., ESSENBERG R.C., DILLWITH J.W., SAUER J.R. (1997): Isolation and characterization of americanin, a specific inhibitor of thrombin, from the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.). *Exp.Parasitol.* 87: 30-38.
- ZIPFEL P.F., SKERKA C., HELLWAGE J., JOKIRANTA S.T., MERI S., BRADE V., KRAICZY P. et al. (2002): Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 971-978.

8 Seznam zkratek

ADP	Adenosindifosfát
AMP	Adenosinmonofosfát
ATP	Adenosintrifosfát
AV ČR	Akademie věd České republiky
BALB/c	Označení kmene myši
Bgp	<i>Borrelia</i> glucosaminoglycans binding protein
BIP	B cell inhibitory protein
Bm86	<i>Boophilus microplus</i> 86
bmpD	Basic membrane protein D
BptA	Borrelial persistence in ticks-gene
BSA	Bovine serum albumin (hovězí sérový albumin)
BSK-H	Barbour-Stoenner-Kelly-H médium
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CB53	Označení kmene <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto
CCL	Chemokine (C-C motif) ligand
CD	Cluster of differentiation, označení povrchových znaků
C3H/HeN	Označení kmene myši
ConA	Konkanavalin A
CRASP 1-5	Complement regulator acquiring surface proteins 1-5
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand
C5, C3, C3b	Složky komplementu
DbpA a B	Decorin binding protein A and B (proteiny A a B vázající decorin)
DNA	Deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
dpi	Dny po infekci
DTH	Delayed type hypersensitivity (přecitlivělost opožděného typu)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay, serologická metoda
eppa	Exported plasmid protein A
Erp	OspE/F-related proteins (proteiny vnější buněčné membrány homologní k OspE a OspF)
FHL-1	factor H-like protein 1
FlaA, B	Flagelin A, B, bičíkový protein

FliD	Flagellin D
Fn-BA	Fibronectin-binding protein A (protein A vázající fibronektin)
FXa	Faktor Xa
HBP	Histamine-binding protein (protein vázající histamin)
HGA	Human granulocytic anaplasmosis (lidská granulomatozní anaplasmoza)
HLA DR2,4	Human leukocyte antigens DR2,4 (lidské leukocytární antigeny DR2,4)
IFN	Interferon
IgG,IgE	Imunoglobulin G, E
IGBP	Immunoglobulin-binding protein (protein vázající IgG)
IL	Interleukin
IL-2BP	Interleukin 2 binding protein (protein vázající IL-2)
IRAC I, II	<i>Ixodes ricinus</i> anti-complement proteins I, II (anti-komplementové proteiny <i>I. ricinus</i> I,II)
IRIS	<i>Ixodes ricinus</i> immunosuppressant
Isac	<i>Ixodes scapularis</i> anti-complement protein (antikomplementový protein <i>I. scapularis</i>)
kDa	Kilodalton, jednotka velikosti proteinu
LPS	Lipopolisacharid
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
NF-κB	Nuclear factor-kappaB
NK	Natural killer (přirozený zabíječ)
OmCI	<i>Ornithodoros moubata</i> complement inhibitor
OPD	O-phenyldiamin dihydrochlorid
OspA-F	Outer surface protein A-F (proteiny vnější buněčné membrány A-F)
PAÚ	Parazitologický ústav
PBS	Phosphate-buffered saline (fosfátem pufovaný fyziologický roztok)
PCR	Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PGE ₂	Prostaglandin E2
PGI ₂	Prostacyklin I2
PHA	Fytohemaglutinin
PMA	Forbol-myristát-acetát

RNA	Ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
Salp	Salivary protein (protein slinných žláz)
SAT	Saliva-activated transmission (slinami aktivovaný přenos)
SGE	Salivary gland extract (extrakt ze slinných žláz)
TAI	Tick adhesion inhibitor (klíštěcí protein bránící adhezi destiček ke kolagenu)
TAP	Tick anticoagulant peptide (klíštěcí antikoagulační peptid)
TBE	Tick-borne encephalitis (klíšťová encefalitida)
TF	Tkáňový faktor
Th1	Označení imunitní odpovědi pomocných lymfocytů typu 1
Th2	Označení imunitní odpovědi pomocných lymfocytů typu 2
TLR	Toll-like receptor (receptor podobný genu Toll)
TNF- α	Tumor necrosis factor alfa (tumory nekrotizující faktor alfa)
TROSPA	Tick receptor for OspA (Klíštěcí receptor pro OspA)
64-TRP	Tick recombinant protein 64
VlsE	Vmp-like sequence, expressed (protein vnější buněčné membrány)