

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Studium vlivu infekce *Borrelia burgdorferi* sensu lato na chování klíštěte obecného *Ixodes ricinus***

Diplomová práce

**Bc. Helena Huspeková**

Školitel: Prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

České Budějovice 2014

Huspeková, H., 2014: Studium vlivu infekce *Borrelia burgdorferi* sensu lato na chování klíštěte obecného *Ixodes ricinus*. [Study of the effect of *Borrelia burgdorferi* infection on the behaviour of *Ixodes ricinus* tick. Mgr. Thesis, in Czech.] - 46 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

The main goal of this master thesis was to determine whether or not is the infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato responsible for changes in *Ixodes ricinus* tick behaviour. We tried to investigate if *B. burgdorferi* infection changes the time required for blood feeding, tick activity, phototaxis and amount of blood which is engorged by the tick.

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

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

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli Prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc., který mi poskytl vedení, cenné rady a náměty při psaní této diplomové práce. Další důležitou osobou, která mi nemalou měrou pomohla, je Jan Erhart, jemuž jsem vděčná za jeho trpělivost, kterou se mnou měl, dále za jeho práci, kterou pro mě obětavě vykonal, a za jeho přispění při provádění pokusů. Velký dík patří i RNDr. Simoně Polákové za pomoc s překonáním mého vžitého odporu ke statistice. V neposlední řadě děkuji své rodině a příteli za vytvoření příjemného prostředí při psaní a trpělivost.

# Obsah

1	Úvod.....	1
2	Přehled literatury.....	2
2.1	Ixodidae (tvrdá klíšťata), hlavní vektor <i>B. burgdorferi</i> sensu lato.....	2
2.2	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato, výčet zástupců.....	4
2.2.1	Vybraní podstatní zástupci <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato a jejich klinické projevy při infekci.....	4
2.3	Lymeská borelióza a její projevy.....	5
2.3.1	Lymeská borelióza v České republice.....	8
2.4	Vzájemná interakce klíštěte a borelie.....	10
2.4.1	Vybrané klíčové povrchové proteiny <i>B. burgdorferi</i> .....	11
2.4.2	Slinami aktivovaný přenos – saliva activated transmission (SAT).....	11
2.5	Vakcíny proti Lymeské borelióze.....	14
2.6	Prokázaný vliv <i>B. burgdorferi</i> sensu lato na chování a fyziologii klíštěte čeledi Ixodidae.....	16
2.6.1	Zvýšené množství tuku v těle infekčních klíšťat.....	16
2.6.2	Vyšší odolnost boreliemi infikovaných klíšťat v prostředí s nízkou vlhkostí.....	17
2.6.3	Vliv infekce boreliemi na aktivitu klíšťat.....	18
2.6.4	Ovlivnění fototaxe klíšťat infikovaných boreliemi.....	19
2.7	Příklady vlivu parazitů na jejich vektory.....	19
3	Cíle práce.....	22
4	Materiál a metody.....	23
4.1	Laboratorní zvířata.....	23

4.1.1	Myši.....	23
4.1.2	Klíšťata.....	23
4.1.3	Borelie.....	23
4.1.3.1	Stanovení počtu borelií dle Magnusona.....	23
4.2	Příprava pokusných myší na sání klíšťat.....	24
4.3	Infikování larev.....	24
4.4	Analýza dat.....	25
4.5	Experimenty.....	25
4.5.1	Sledování rychlosti přísátí nymf.....	25
4.5.2	Sledování rychlosti přísátí dospělců.....	25
4.5.3	Porovnání hmotnosti plně nasátých nymf.....	25
4.5.4	Porovnání hmotnosti plně nasátých dospělců.....	26
4.5.5	Studium vlivu infekce <i>B. burgdorferi</i> na aktivitu nymf při vyhledávání hostitele.....	26
4.5.6	Studium vlivu infekce <i>B. burgdorferi</i> na aktivitu dospělců při vyhledávání hostitele.....	27
4.5.7	Vliv infekce na fototaktickou aktivitu nymf.....	27
4.5.8	Vliv infekce na fototaktickou aktivitu dospělců.....	27
4.6	Výsledky.....	28
4.6.1	Sledování rychlosti přísátí nymf.....	28
4.6.2	Sledování rychlosti přísátí dospělců.....	28
4.6.3	Porovnání hmotnosti plně nasátých nymf.....	30
4.6.4	Porovnání hmotnosti plně nasátých dospělců.....	31

4.6.5	Studium vlivu infekce <i>B. burgdorferi</i> na aktivitu nymf při vyhledávání hostitele.....	32
4.6.6	Studium vlivu infekce <i>B. burgdorferi</i> na aktivitu dospělců při vyhledávání hostitele.....	32
4.6.7	Vliv infekce na fototaktickou aktivitu nymf .....	34
4.6.8	Vliv infekce na fototaktickou aktivitu dospělců.....	35
5	Diskuze.....	36
6	Závěr.....	40
7	Použitá literatura .....	41

# 1 Úvod

Klíšťata jsou celosvětově považována za jeden z hlavních vektorů patogenů působících závažná onemocnění jak člověka, tak domestikovaných hospodářských zvířat, na nichž způsobují ve světě velmi významné škody. Takovými přenášenými patogeny mohou být bakterie, protozoa, rickettsie a v neposlední řadě i viry. Proto je na studium klíšťat a jejich interakcí s přenášenými patogeny brán v posledních letech obrovský zájem a vynakládány nemalé finanční prostředky.

V dnešní době probíhá mnoho výzkumů, jež se snaží zmapovat látky obsažené v klíštěcích slinách a jejich účinek na imunitní systém hostitele, který je více než značný. Dnes již známe mnoho z těchto látek, i když rozhodně nekompletní složení klíštěcích slin, a odhaluje se nám i často velmi sofistikovaný účinek, jistá míra „spolupráce“ s patogenem přenášeným klíštětem. Takovým typickým zástupcem je například *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Výzkum těchto látek je klíčový například pro budoucí vývoj vakcíny proti borelióze nebo přímo pro zabránění přenosu tohoto celosvětově rozšířeného a nebezpečného patogenu. Mnohem méně je však prozkoumána oblast účinku nákazy boreliemi na klíště samotné po fyzické a fyziologické stránce.

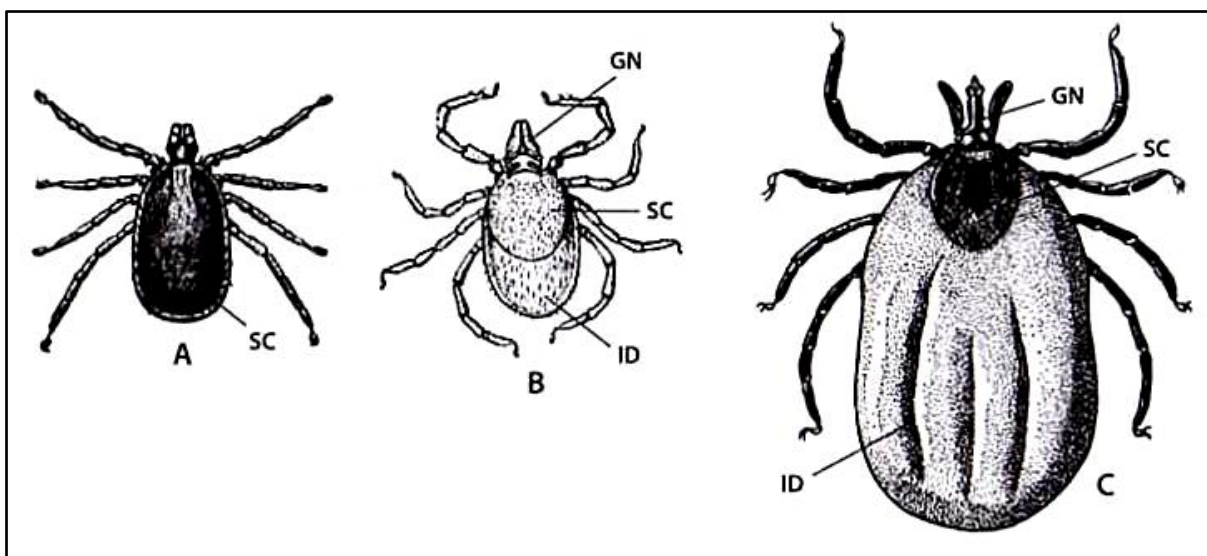
Tato diplomová práce je zaměřena na prozkoumání vlivu borelií na klíště. Cílem mé práce bylo zjistit, zda bude boreliemi infikované klíště vykazovat změny v chování, konkrétně v době, za kterou se přisaje na hostitele v podobě laboratorní myši, v množství krve, kterou nasaje, v aktivitě při vyhledávání hostitele a fototaxi oproti klíštěti bez nákazy. Ve vědeckém světě se mnoho prací na toto téma nevyskytuje, proto jsem chtěla tímto experimentem zaplnit prázdné místo v pochopení vlivu borelií na jejich vektor a otevřít tak cestu dalším navazujícím experimentům, které by do budoucna pomohly využít těchto poznatků k prevenci přenosu borelií na člověka.

## 2 Přehled literatury

### 2.1 Ixodidae (tvrdá klíšťata), hlavní vektor *B. burgdorferi sensu lato*

Čeď Ixodidae (řád: Acarina, podřád: Metastigmata), (Obr. 1) se řadí mezi klíšťata s tříhostitelským životním cyklem a typicky se vyznačují tvrdým hřbetním štítkem, který u samců pokrývá celé tělo, zatímco u samic pouze část těsně za hlavou. Tento fakt umožňuje samicím několikanásobně zvětšit vlastní objem při sání hostitelské krve. Nápadný hypostom opatřený zahnutými háčky jim umožňuje velmi pevné setrvání v místě přisátí. Sání hostitelské krve trvá většinou 4-8 dní, přičemž tato doba je dostatečně dlouhá na přenos patogenů ze slin infikovaného klíštěte na hostitele nebo obráceně, jelikož klíště samotné se infikuje právě nasátím krve z infikovaného hostitele. Skutečnost, že klíště může takto dlouho setrvat přisáté na hostiteli, způsobuje množství antikoagulačních, imunomodulačních a protizánětlivých látek obsažených ve slinách klíštěte. Plně nasáté klíště následně odpadne a vyvine se ve vyšší vývojový stupeň, tato stadia označujeme jako larvu, nymfu a dospělce. Dospělá klíšťata se obvykle páří na hostiteli, samice po plném nasátí odpadne a naklade snůšku vajíček čítající 1000 – 1500 kusů (Jongejan et al., 2004).





**Obr. 1:** Acarina, Ixodida, Ixodidae, *Ixodes ricinus* (klíště obecné).

A – dospělý samec, B – dospělá samice, C – dospělá samice (po nasátí), GN – gnathosoma,  
SC – scutum (štítek), ID – idiosoma. Převzato z: (Volf, Horák, 2007).

V České republice se klíšťata vyskytují především v listnatých a smíšených lesích s travnatým či křovinatým podrostem či kolem vodních ploch a toků. Za příznivých podmínek, kterými je teplé počasí a dostatečná vzdušná vlhkost, začíná jejich aktivita již v druhé polovině března a může trvat až do poloviny listopadu, přičemž vrcholné aktivity dosahují od května do července. V posledních letech se však klíšťata v hojném počtu objevují i v městských parcích, na travnatých plochách uprostřed měst a často se s klíšťaty setkáváme i na zahradách kolem rodinných domů. Tato skutečnost vede bezpochyby k riziku získání Lymeské boreliózy nebo klíšťové encefalitidy i ve městech, a proto by mělo být v dnešní době očkování proti klíšťové encefalitidě samozřejmostí i pro lidi, kteří volnou přírodu přece jen běžně nenavštěvují. Očkování proti Lymeské borelióze prozatím neexistuje, tudíž jsou preventivní opatření stále tou nejlepší možností, jak se nákazám vyhnout. Takovým preventivním opatřením může být použití repelentů a nošení oblečení a dlouhých kalhot z hladké světlé látky, na které budou případná klíšťata dobře patrná, přičemž hladký materiál znesnadní jejich přichycení. Prohlídka celého těla s případným

odstraněním přisátých klíšťat by měla následovat bezprostředně po návratu z přírody. Především během období, kdy je aktivita klíšťat největší, by se lidé měli vyhnout sezení a ležení v lesních a travních porostech a pokud možno se pohybovat jen po zpevněných cestách (<http://www.szu.cz/tema/prevence/jak-se-chranit-pred-napadenim-klisťaty>).

## **2.2 *Borrelia burgdorferi* sensu lato, výčet zástupců**

*Borrelia burgdorferi* náleží do vývojově velmi staré čeledi Spirochaetaceae, která zahrnuje rody *Borrelia*, *Leptospira* a *Treponema*. Čeleď Spirochaetaceae se dá charakterizovat jako čeleď extracelulárních patogenů, dnes komplex *B. burgdorferi* sensu lato zahrnuje celkem 19 druhů, z nichž šest bylo objeveno v posledních pěti letech díky molekulárně biologickým metodám (Rudenko et al., 2014). Konkrétně se jedná o druhy *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bissetti*, *B. andersonii*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. californiensis*, *B. japonica*, *B. lusitaniae*, *B. sinica*, *B. spielmani*, *B. valaisiana*. V rámci nově objevených druhů jde jmenovitě o *B. yangtze*, *B. carolinensis*, (Rudenko et al., 2009), *B. bavariensis*, *B. americana*, *B. finlandensis* a *B. kurtenbachii* (Margos et al., 2010).

### **2.2.1 Vybraní podstatní zástupci *Borrelia burgdorferi* sensu lato a jejich klinické projevy při infekci**

Spirochety *B. burgdorferi* sensu lato jsou typické gramnegativní bakterie se spirálovitě stočeným tělem, jejichž obvyklá délka se pohybuje mezi 20-30  $\mu\text{m}$  a šířka 0,2-0,5  $\mu\text{m}$ . Mezi peptidoglykanovou vrstvou a vnější membránou je ukotveno 7 až 14 periplasmatických bičíků (Ge et al., 1998). Jejich životní cyklus je spjat s hostitelem v podobě obratlovce a vektorem z řad členovců.

Nejvíce se vyskytujícím zástupcem v Severní Americe, který člověku způsobuje nákazu Lymeskou boreliózou, je *B. burgdorferi* sensu stricto, zatímco v Evropě jsou za většinu nálezů odpovědné druhy *B. afzelii* a *B. garinii*. Druh *B. garinii* je taktéž nejčastěji se vyskytujícím druhem v asijských zemích (Strle et al. 2009). Dnes již studii potvrzeným faktem je, že projevy onemocnění Lymeskou boreliózou se liší v závislosti na tom, jakým druhem borelie je člověk nakažen. Nejčastějším projevem nákazy *B. burgdorferi* sensu stricto je podle studie provedené v Severní Americe artritida, což dokládá fakt, že celých

60% pacientů nakažených Lymeskou boreliózou vykazovalo tento klinický projev choroby (Steere A., 1989). Pokud budeme srovnávat, zjistíme, že v Evropě, kde se vyskytuje především *B. afzelii* a *B. garinii*, je postiženo artritidou pouze 3-15% pacientů. Onemocnění způsobené druhem *B. garinii* je velmi často spojeno s neuroboreliózou, zatímco infekce *B. afzelii* přednostně způsobuje projev zvaný erythema migrans (červená okrouhlá skvrna na kůži s centrálním výbledem) a v pokročilé fázi i acrodermatitis chronica atrophicans (ACA), tedy chronické onemocnění projevující se ztenčením a atrofií kůže. Spojitost mezi ACA a infekcí *B. afzelii* byla potvrzena molekulární studií vzorků, získaných od pacientů z několika evropských zemí. Je zajímavé poznamenat, že ACA nikdy nebyla pozorována u Američanů, kteří v životě neopustili USA, což do jisté míry dokazuje, že *B. burgdorferi* sensu stricto toto onemocnění nezpůsobuje (van Dam et al., 1993).

Borelie jsou přenášeny především klíšťaty z čeledi Ixodidae, avšak jednotlivé zastoupení druhů se v rámci světových kontinentů liší. V Evropě je to nejčastěji *Ixodes ricinus*, ve východní Evropě a Asii pak *Ixodes persulcatus* a v Severní Americe je hlavním vektorem *Ixodes scapularis* a *Ixodes pacificus* (Margos et al., 2011).

### **2.3 Lymeská borelióza a její projevy**

Lymeská borelióza byla společně s jejími příznaky poprvé popsána v roce 1975 (Steere et al., 1977), avšak její původce *Borrelia burgdorferi* byl izolován až v roce 1982 Willy Burgdorferem z klíštěte získaného z endemické oblasti (Burgdorfer et al., 1982). Tento objev odstartoval novou éru ve výzkumu této nemoci a v oblasti pochopení interakcí mezi vektorem a přenášeným patogenem. V dnešní době má Lymeská borelióza status velmi významné a nebezpečné nemoci, proti níž stále není vyvinuta účinná vakcína, i když je v počáteční fázi toto onemocnění velmi dobře léčitelné běžně dostupnými antibiotiky, jakými jsou peniciliny, makrolidy, cefalosporiny nebo tetracykliny. Jedná se o multisystémové onemocnění postihující mnoho oblastí těla člověka od kůže, přes nervový systém, klouby a srdce a neléčené může přejít až do chronické fáze. Samotná spirocheta je přenášena klíšťaty rodu *Ixodes*, a to zejména během jara a léta.

Průběh Lymeské boreliózy se dá rozdělit do čtyř fází – časná lokalizovaná fáze, fáze diseminovaná, pozdní fáze a post-Lyme syndrom. První známkou onemocnění často bývá tzv. erythema migrans (Obr. 2), červená okrouhlá skvrna s centrálním výbledem, která se objeví v místě přisátí klíštěte obvykle do 14 dnů. Nicméně v některých případech se setkáváme s objevením erythema migrans až po 30 dnech od přisátí klíštěte, či s její úplnou absencí (Nadelman, 1996). Po několika dnech až týdnech se primární léze rozšíří a objeví se typické příznaky jako horečka, bolest hlavy, ztuhlost šíje, bolesti svalů a kloubů a v neposlední řadě únava a malátnost. Později se mohou v případě neléčené nemoci objevit závažné neurologické potíže, mezi něž patří kranální neuropatie, tedy obrna lícního nervu, která může být i oboustranná a Bannwarthův syndrom, vyznačující se velmi bolestivým zánětem míšních kořenů (Marques A. R., 2010).

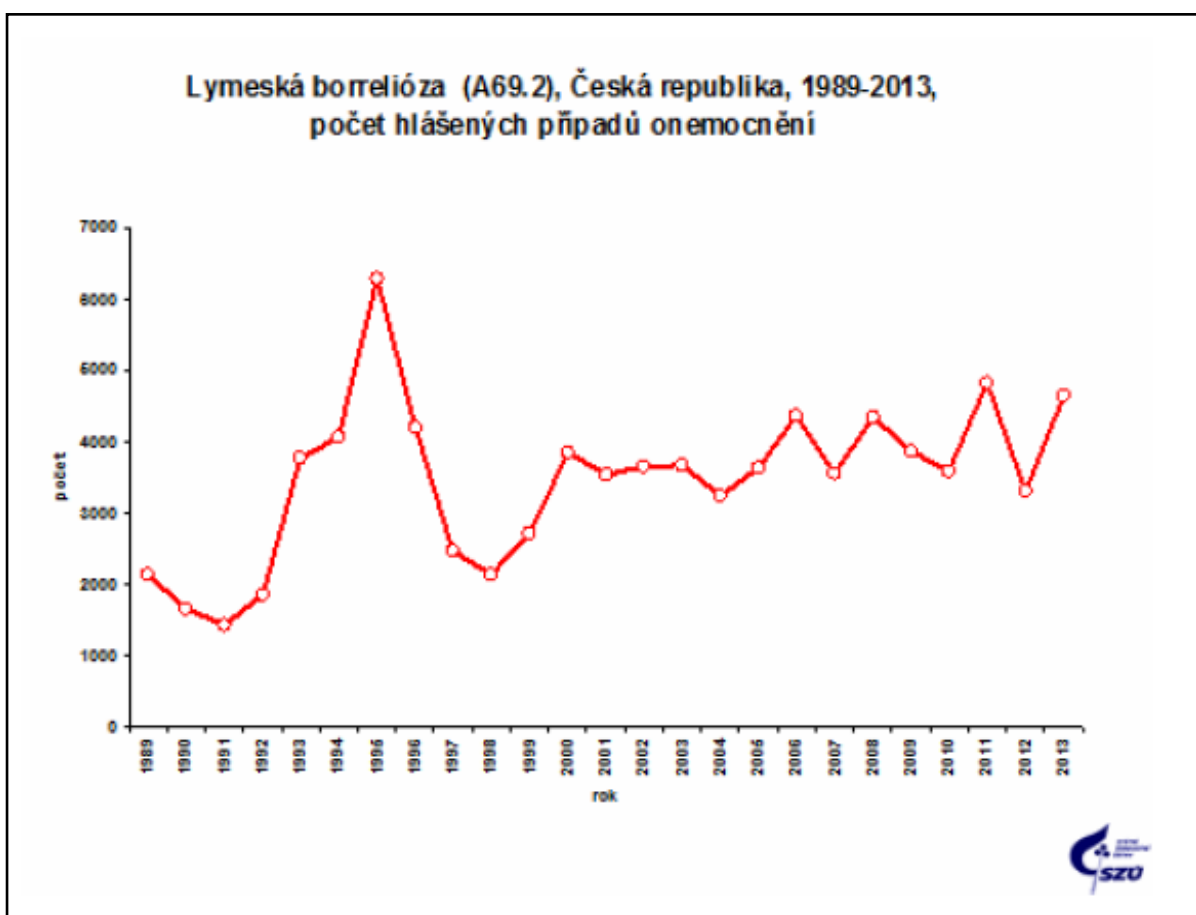


Obr. 2: Erythema migrans. (převzato z: Marques A. R., 2010)

Většina pacientů, která prodělala boreliózu a podrobila se obvyklé léčbě, nevykazuje žádné přervávající obtíže a jejich zdravotní stav je nadále uspokojivý. Část pacientů však uvádí, že se u nich objevily symptomy, s nimiž se před proděláním boreliózy nijak významně nesetkávali. Tyto příznaky jim ale nadále výrazně ovlivňují kvalitu života negativním způsobem. Příkladem těchto obtíží mohou být zvýšená únava, poruchy spánku, bolesti hlavy, poruchy soustředění a i po opakovaném přeléčení antibiotiky přetrvávající bolesti svalů a kloubů. Obecně tyto symptomy označujeme jako post-Lyme syndrom a jejich příčina prozatím nebyla přesně odhalena (Marques A. R., 2010).

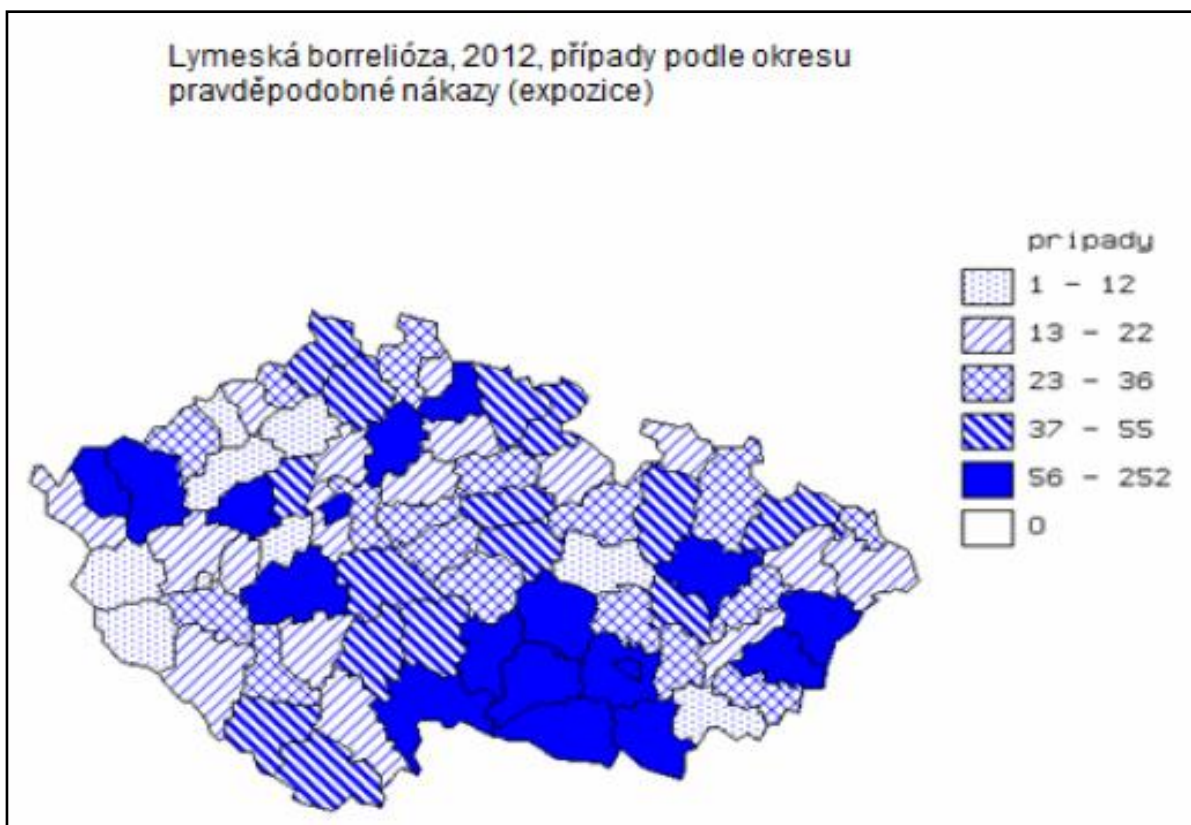
### 2.3.1 Lymeská borelióza v České republice

Počet případů výskytu Lymeské boreliózy v České republice stoupal až do roku 1995, kdy dosáhl svého vrcholu. Tento trend se potvrdil i u výskytu nákazy virem klíšťové encefalidity. V roce 2012 došlo ke snížení počtu nálezů Lymeskou boreliózou na 3304 případů, avšak v roce 2013 počet onemocnění stoupl na 4646 hlášených případů (Obr. 3). Nejvíce případů onemocnění bylo v roce 2013 nahlášeno v červenci, což je z dlouhodobého hlediska nejvíce postižený měsíc. ([http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Lymeska\\_borrelioza/Lymeska\\_borrelioza\\_za\\_rok\\_2013.pdf](http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Lymeska_borrelioza/Lymeska_borrelioza_za_rok_2013.pdf))



Obr. 3: Počet hlášených případů Lymeské boreliózy v ČR v letech 1989-2013. (převzato z: [http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Lymeska\\_borrelioza/Lymeska\\_borrelioza\\_za\\_rok\\_2013.pdf](http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Lymeska_borrelioza/Lymeska_borrelioza_za_rok_2013.pdf))

Na následujícím kartogramu (Obr. 4) jsou vyobrazeny počty nakažených osob v rámci bývalých okresů v roce 2012. V posledních letech se výrazně zvýšil počet nahlášených infekcí Lymeské boreliózy v oblasti Českomoravské vrchoviny (podobný trend zaznamenáváme i u klíšťové encefalitidy), což se připisuje důsledku klimatických změn. ([http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Lymeska\\_borrelioza/Lymeska\\_borrelioza\\_za\\_rok\\_2013.pdf](http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Lymeska_borrelioza/Lymeska_borrelioza_za_rok_2013.pdf))



Obr. 4: Počet nákaz Lymeskou boreliózou v rámci okresů ČR v roce 2012. (převzato z: [http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Lymeska\\_borrelioza/Lymeska\\_borrelioza\\_za\\_rok\\_2013.pdf](http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Lymeska_borrelioza/Lymeska_borrelioza_za_rok_2013.pdf))

Lehce vzrůstající tendence počtu nákaz Lymeskou boreliózou je patrná i v celorepublikovém počtu nahlášených infekcí. V porovnání s výskytem klíšťové encefalitidy je však Lymeská borelióza stále hlavním a nejčastějším onemocněním přenášeným klíšťaty na našem území. Celkové počty nákaz klíšťovou encefalitidou jsou za rok podstatně nižší, což můžeme přičítat již určité míře proočkovanosti obyvatelstva České republiky (Tab. I), (<http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2003-2012-absolutne>).

Tab. I: Nahlášené počty nálezů v ČR Lymeskou boreliózou a klíšťovou encefalitidou v letech 2004 – 2013. (převzato z: <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2003-2012-absolute>)

Rok	Lymeská borelióza	Klíšťová encefalitida
2004	3243	507
2005	3647	643
2006	4370	1029
2007	3558	546
2008	4350	631
2009	3863	816
2010	3597	589
2011	4834	861
2012	3304	573
2013	4646	625

## 2.4 Vzájemná interakce klíštěte a borelie

*Borrelia burgdorferi*, jakožto snad nejznámější klíšťaty přenášený patogen, si musela vyvinout velice důmyslný mechanismus, jakým přežít jak v samotném klíštěti, tak následně i v hostiteli, do kterého se dostane ze slin krev sajícího klíštěte. Její úspěch závisí především na schopnosti kolonizovat různé tkáně a potlačit imunitní mechanismy hostitele. Schopnost skrývat se před imunitním systémem hostitele jí umožňuje častá změna povrchových proteinů, jejichž exprese se liší v závislosti na prostředí, v němž se borelie právě nachází. Tato častá změna je umožněna tím, že borelie oproti jiným bakteriím věnuje velkou část svého genomu právě kódování lipoproteinů (Casjens et al., 2000). Je jisté, že prozatím neznáme kompletní složení klíštěcích slin a jejich přesný vliv na borelie či jejich přenos, ale



již několik látek můžeme označit za látky nápomocné boreliím v úspěšném přenosu na hostitele a v jejich následném rozšíření.

#### **2.4.1 Vybrané klíčové povrchové proteiny *B. burgdorferi***

V okamžiku, kdy se borelie dostanou společně s krví hostitele do střeva klíštěte, začnou na svém povrchu exprimovat povrchový protein OspA (outer surface protein A), (Schwan et al., 1995), díky kterému se navážou na protein TROSPA (tick receptor for OspA), jenž se nachází ve střevě klíštěte a funguje zde pro borelie v podstatě jako kotevní místo až do okamžiku jeho dalšího sání. Tato protein-proteinová interakce pomáhá boreliím setrvat ve střevě, aniž by je ohrozily trávicí pochody a obranné mechanismy klíštěte. V okamžiku dalšího sání klíštěte sníží borelie produkci OspA, klíště zároveň sníží produkci TROSPA a borelie se začnou přesouvat ze střeva přes hemolymfu až do slinných žláz, odtud se společně se slinami dostanou do těla hostitele. Toto společné snížení produkce klíčových proteinů umožní boreliím snadné opuštění klíštěcího střeva právě ve chvíli, kdy klíště samotné další sání započne (Pal et al., 2004). Dále dochází ke změně produkce i jiných povrchových proteinů, konkrétně se sníží exprese OspB (outer surface protein B), naopak výrazně se zvýší produkce OspC (outer surface protein C) a následně i celá řada dalších povrchových proteinů, například BBK32, DbpA a DbpB (Fikrig et al., 2000). A právě protein OspC je klíčový pro zdárný přesun borelií do slinných žláz klíštěte a dále jejich úspěšné rozšíření v hostiteli (Pal et al., 2004).

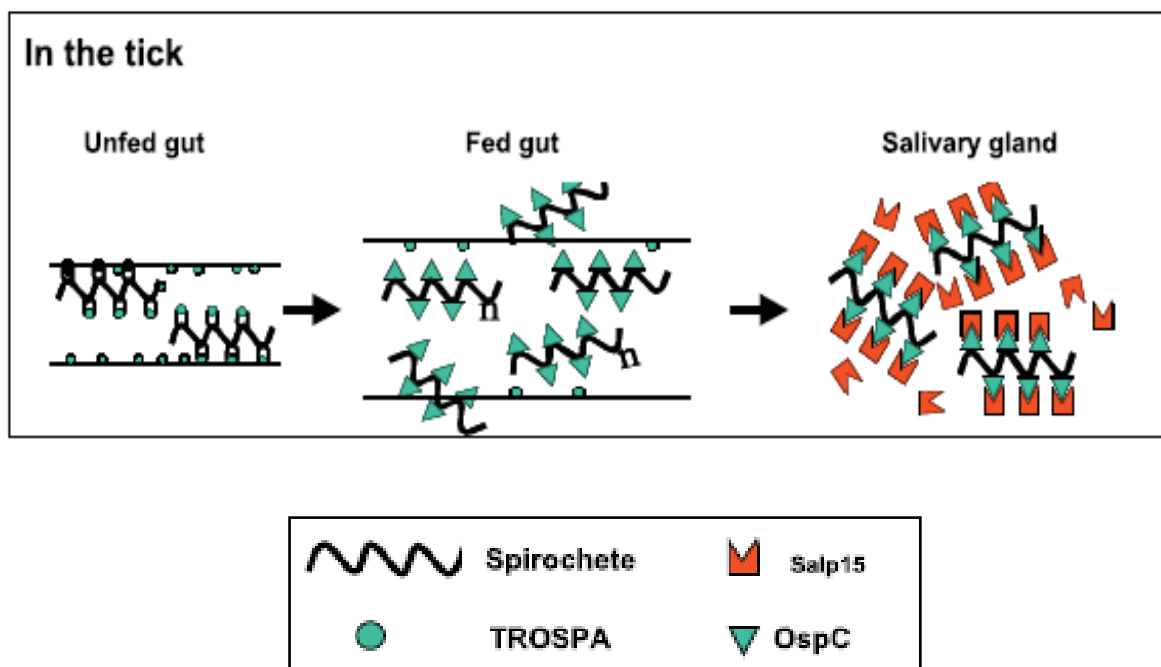
#### **2.4.2 Slinami aktivovaný přenos – saliva activated transmission (SAT)**

S přibývajícím počtem výzkumů v oblasti slinami aktivovaného přenosu vystává na povrch stále více důkazů o tom, že za úspěšným rozšířením *B. burgdorferi*, a nejspíše i jiných klíšťatých přenášených patogenů v hostiteli, stojí jejich schopnost využít farmakologicky aktivní a imunomodulační látky ze slin klíštěte. Samotný slinami aktivovaný přenos je v případě klíšťat a jimi přenášených patogenů charakterizován jako podpora přenosu patogenu na hostitele za pomoci účinku látek obsažených v klíštěcích slinách. Prvně byl termín SAT použit v případě přenosu viru Thogoto u klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus*, avšak do dnešní doby byl popsán nejen u *B. burgdorferi*, ale i u viru klíšťové encefalitidy. SAT byl zjištěn i u zcela jiných vektorů a jimi přenášených patogenů,

jakými jsou například *Leishmania spp.*, jejímž vektorem je *Phlebotomus* a *Lutzomyia*, nebo u komárů rodu *Aedes* a *Culex* a jimi přenášených virů (Nuttall, Labuda, 2004).

Protein Salp15 byl původně popsán jako imunomodulační protein obsažený ve slinách klíštěte, potlačující aktivaci a proliferaci CD4+ T lymfocytů (Anguita et al., 2002). Následně byl však klíčový pro potvrzení teorie o slinami aktivovaném přenosu, jelikož se nám zde dokazuje jistá spolupráce mezi klíštětem a boreliemi. Tento protein obsažený ve slinách klíšťat umožňuje boreliím nepozorované proniknutí do těla hostitele a následně jim tak zjednodušuje jejich rozšíření.

Ramamoorthi et al. přišel ve své studii s důkazem, že borelie opouštějící slinné žlázy klíštěte *Ixodes scapularis* mají na svém povrchu navázaný specifický slinný protein Salp15 (Obr. 5). Zajímavostí však je, že tento protein byl na povrch borelií navázán díky interakci s jedním z povrchových proteinů borelií, konkrétně s OspC, což staví Salp15 do role prvního a zcela nového ligandu pro OspC. Množství Salp15 ve slinách klíštěte bylo zvýšeno, jestliže klíště bylo infikováno boreliemi oproti klíštěti neinfekčnímu. Je však pozoruhodné, že produkce Salp15 je spjata přímo s *B. burgdorferi*, jelikož množství Salp15 ve slinách klíštěte zůstalo nezměněno v případě, že bylo infikováno jiným klíšťatým přenášeným patogenem, kterým v tomto případě byla bakterie *Anaplasma phagocytophilum*. Následnými pokusy bylo dokázáno, že Salp15 je klíčový i pro efektivnější a rychlejší rozšíření borelií v hostiteli, a co je podstatné, borelie jsou díky Salp15 prokazatelně chráněny před účinkem hostitelských protilátek. Specifický kmen myši C3H byl infikován boreliemi, avšak borelie byly do těla myši vpraveny společně se Salp15. U těchto myši bylo množství borelií v kloubech, kůži a močovém měchýři po 25 dnech několikanásobně vyšší než u kontrolní skupiny, které byly vpraveny pouze samotné borelie (Ramamoorthi et al., 2005).



Obr. 5: Ve střevě nenasátého klíštěte dochází k interakci povrchového proteinu borelií OspA s proteinem klíštěcího střeva TROSPA. Poté co dojde k sání klíštěte, sníží se produkce OspA, naopak se zvýší produkce OspC a dojde k migraci *B. burgdorferi* do slinných žláz klíštěte. Zde se na povrchový protein borelií OspC naváže slinný protein Salp15, který následně usnadní boreliím jejich rozšíření v hostiteli. (Fikrig, Narasimhan, 2006)

Slinný protein klíšťat Salp15 je pozoruhodný i další svou vlastností, konkrétně tím, že je schopný potlačit aktivaci  $CD4^+$  T lymfocytů. Efekt proteinu Salp15 se projeví již během časných aktivačních procesů, což je období, kdy T lymfocyty ještě nejsou schopny vyprodukovat IL-2. IL-2 funguje dále jako stimulující prvek proliferace T lymfocytů, a tedy jeho absencí se následná produkce T lymfocytů značně sníží. Samotná inhibice proliferace T lymfocytů je způsobena vazbou Salp15 na proteinové komponenty na povrchu T lymfocytů, čímž následně potlačí tok vápenatých iontů (Anguita et al., 2002). Protein Salp15 se váže na CD4 receptor na povrchu Th lymfocytů skrz svou C-terminální část, což způsobí přerušování přenosu aktivačního signálu a zamezí tak proliferaci T buněk (Garg et al., 2006).

Hovius et al. ve své studii z roku 2008 přišel s důkazem, že protein Salp15 má jistý vliv i na dendritické buňky (Hovius et al., 2008). Dendritické buňky jsou totiž klíčové pro nastolení imunitní odpovědi, jelikož rozpoznávají antigen pomocí vazby na Toll-like receptor, rozpoznaný antigen následně transportují do lymfatických uzlin, kde je prezentován T lymfocytům. Dendritické buňky poté začnou produkovat cytokiny klíčové pro zahájení imunitní odpovědi (Banchereau, Steinman, 1998). Účinek proteinu Salp15 je na povrchu dendritických buněk zacílen na tzv. C-type lektin nazývaný DC-SIGN, což ve výsledku inhibuje vznik prozánětlivých cytokinů, kterými jsou IL-12p70, IL-6 a TNF- $\alpha$ . Tyto změny navíc vedou k potlačení jedné ze základních funkcí dendritických buněk, konkrétně k potlačení stimulace T lymfocytů (Hovius et al., 2008).

Protein Salp15 byl studiem zkoumán i jako látka použitelná pro vakcinaci. Dai et al. v r. 2009 provedl studii založenou na podání Salp15 antiséra myším, což vedlo k prokazatelné ochraně před infekcí boreliemi. Zajímavostí je, že toto antisérum zvýšilo i protektivní schopnosti protilátek proti OspA a OspC antigenům. Vakcinace molekulami vektoru, které jsou podstatné pro přenos a úspěšné rozšíření přenášeného patogenu v hostiteli, se zdá být jednou z možných variant vakcinace, která by mohla být v budoucnu použita i proti dalším podobně přenášeným patogenům (Dai et al., 2009).

## **2.5 Vakcíny proti Lymeské borelióze**

Očkování je bezpochyby ten nejefektivnější způsob, jak zabránit přenosu vysoce infekčních onemocnění v populaci, a to jak nemocí přenosných z člověka na člověka, tak těch, které jsou na člověka přenášeny některými vektory. Klíšťata jsou považována po komárech za druhý nejnebezpečnější vektor přenášející závažná lidská onemocnění a působící nemalé škody na skotu a ostatních domestikovaných zvířatech. Avšak navzdory faktu, že jsme velmi pokročili v oblasti objevů látek obsažených ve slinách klíšťat a jejich účinku, stále jsme ještě nenalezli spolehlivý způsob, jak těchto látek využít a najít proti Lymeské borelióze funkční a pro člověka bezpečné očkování. Tato skutečnost je o to více alarmující, že v posledních letech rapidně přibývá osob nakažených nemocemi přenášenými klíšťaty. Je vskutku zážehující, že i v přítomnosti komerčně prodávané a bezpečné vakcíny proti klíšťové encefalitidě, je počet případů nakažení touto závažnou nemocí v porovnání

s jinými zeměmi stále vysoký. V historii se již některé pokusy o vývoj vakcíny proti Lymeské borelióze uskutečnily, přičemž jedna z vakcín založená na povrchovém proteinu borelií OspA se dokonce objevila na trhu, avšak díky zdravotním komplikacím, které způsobovala očkovaným osobám, byla z trhu stažena.

Strategii vývoje vakcíny proti klíšťatům můžeme v dnešní době zacílit na tři skupiny antigenů. První takovou skupinou jsou exponované antigeny, tedy antigeny, které jsou uvolňovány ze slinných žláz klíštěte a spolu se slinami se dostávají do rány v místě jeho přísátí. Zde interagují s imunitním systémem hostitele a vyvolávají příslušnou imunitní odpověď, konkrétně dendritické buňky dopraví tyto antigeny do lymfatických uzlin a zde je prezentují T lymfocytům. Výhodou takovýchto vakcín je fakt, že každé další sání klíštěte by způsobilo opakovanou imunizaci jedince, u kterého by se takto titer protilátek v krvi jednoduše obnovil či zvýšil (Larregina, Falo, 2005).

Druhou skupinou jsou antigeny skryté, které s hostitelským imunitním systémem prakticky nepřijdou do styku. Typickým příkladem skrytých antigenů jsou antigeny obsažené v klíštěcím střevě, které se dostávají do styku s imunoglobuliny z nasáté hostitelské krve. V podstatě jakýkoliv antigen klíštěte, který není prezentován imunitnímu systému hostitele, zato se setkává s imunoglobuliny hostitele a zajišťuje některou z vitálních funkcí klíštěte, je potenciálním kandidátem pro vývoj vakcíny založené na skrytém antigenu. V praxi by to ale znamenalo vytvořit vakcínu, která bude obsahovat extrakt z příslušné tkáně klíštěte, což by v hostiteli následně vyvolalo tvorbu specifických imunoglobulinů zacílených na konkrétní klíštěcí tkáň. Ty by byly nasáty klíštětem při sání hostitelské krve, došlo by k interakci těchto imunoglobulinů a skrytých antigenů, což by následně vedlo k poškození vitálních funkcí klíštěte. Avšak díky tomu, že skryté antigeny nepřijdou při sání klíštěte do styku s imunitním systémem hostitele, musela by nejspíše po určité době probíhat u očkovaných jedinců revakcinace (Nuttall et al., 2006).

Třetí skupinou jsou tzv. duální vakcíny, tedy vakcíny využívající kombinaci exponovaných a skrytých antigenů. Tato kombinace spojuje výhody a vlastnosti obou skupin, tedy opakovanou imunizaci při každém dalším sání klíštěte a zkříženou reakci s vnitřním prostředím klíštěte, která způsobí jeho fatální poškození. Do budoucna se duální vakcíny jeví jako nejvíce perspektivní. Ideálním výsledkem použití vakcíny zacílené jak na

exponované, tak i skryté antigeny klíštěte by měla být jejich zvýšená úmrtnost, snížení šance na přenos patogenů, snížení množství nasáté krve a tím i zmenšení snůšky vajec (Nuttall et al., 2006).

Specifickým druhem vakcín je vývoj tzv. trans-block vakcín, které by zabránily přenosu patogenu z vektoru na hostitele. V případě úspěšného vyvinutí takové vakcíny by bylo nejspíše možné zabránit přenosu více klíšťaty přenášených patogenů pouze tímto jedním typem vakcinace (Merino et al., 2011).

## **2.6 Prokázaný vliv *B. burgdorferi sensu lato* na chování a fyziologii klíštěte čeledi Ixodidae**

Zkoumat vliv parazitů na jejich vektor je do budoucna velice užitečné z hlediska využití takto získaných poznatků na poli boje proti přenosu těchto patogenů na koncového hostitele. Nejinak je tomu i v případě klíšťat, zejména proto, že na Lymeskou boreliózu stále nemáme spolehlivou a funkční vakcínu, čímž se prevence přisátí klíštěte stává stále tou nejlepší obranou, jak se nákaze Lymeskou boreliózou vyhnout. Právě z tohoto důvodu se stává zkoumání účinku borelií na chování klíštěte velmi podstatným. Ačkoliv je oblast vlivu parazitů na fyziologii a chování klíšťat jen velmi málo prozkoumána, několik výzkumů zabývajících se touto tematikou bylo již přece jen provedeno.

### **2.6.1 Zvýšené množství tuku v těle infekčních klíšťat**

Jedním z pozoruhodných zjištění je fakt, že nymfy klíštěte *I. ricinus* infikované boreliemi měly větší velikost těla, oproti nymfám neinfikovaným a zároveň měly infekční nymfy v průměru o 12.1% větší obsah tuku v těle. To může být způsobeno pozměněním některých interakcí mezi vektorem, hostitelem a patogenem. Jako možné příčiny se mohou jevit například vliv borelií na sání klíšťat, možné změny v jejich trávení, v genové expresi infekčních klíšťat nebo také díky vlivu borelií na klíštěcí chování. Díky tomu, že klíšťata infikovaná boreliemi mají prokazatelně větší tělo, ztrácejí tak méně vody než menší a tedy neinfekční jedinci, infekční klíště tak může strávit delší dobu hledáním hostitele a nepřímo si zvyšuje svou šanci na přisátí. Menší klíště s větším odparem vody se musí častěji vracet do vlhkého podrostu k rehydrataci, čímž je pak následně znevýhodněno (Herrmann et al., 2013).

Všeobecně se tedy předpokládá, že klíšťata infikovaná boreliemi mají větší podíl tělního tuku, následkem čehož jsou méně aktivní, na rozdíl od neinfekčních jedinců. Z toho vyplývá, že infekce boreliemi zapříčiní nižší aktivitu klíšťat a tím šetří jejich tukové zásoby, které jsou pak logicky vyšší než u neinfekčních jedinců. Zajímavou poznámkou může být i fakt, že zvýšené množství tuku v těle klíšťat by mohlo mít původ také v teorii, že borelie ovlivňují kvalitu klíštětem přijímané potravy, tedy krve. Konkrétně tak, že přítomnost borelií by mohla zvyšovat koncentraci glukosy v přijímané krvi a tím i zvyšovat její výživovou hodnotu pro klíště. Tato teorie však zatím nebyla potvrzena žádnou dosud zveřejněnou studií (Herrmann et al., 2013). Dalším možným vysvětlením by mohl být i vliv borelií na genovou expresi klíštěte, která by zvýšila ukládání tuku v těle. Tato teorie se opírá o studii provedenou na klíštěti *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, které parazituje především na hospodářských zvířatech. U tohoto klíštěte se potvrdil vliv přenášených patogenů na expresi genů spojených s metabolismem tuků, což se projevilo jeho zvýšeným ukládáním v těle klíšťat (Angelo et al., 2010).

### **2.6.2 Vyšší odolnost boreliemi infikovaných klíšťat v prostředí s nízkou vlhkostí**

Pro klíšťata, stejně tak jako pro jiné suchozemské členovce, je jednou z největších obtíží udržet si optimální množství vody v těle v relativně suchém prostředí, v němž žijí. Optimální vzdušná vlhkost pro klíště *I. ricinus* se zdá být kolem 70-80%, tato úroveň vlhkosti jim zajišťuje dostatečnou aktivitu při vyhledávání hostitele a standardní délku života (MacLeod, 1935). Zvýšená hladina vlhkosti ovlivňuje přežití *I. ricinus* pozitivně, zatímco zvýšení okolní teploty ovlivňuje přežití negativně. Kombinace těchto dvou faktorů má na přežití klíšťat daleko větší negativní dopad, než jednotlivé faktory zvlášť. Jedním zajímavým, avšak možná předvídatelným poznatkem je, že laboratorně odchované nymfy přežívají až nebývale dobře v podmínkách s nepříznivými teplotními a vlhkostními podmínkami ve srovnání s nymfami odchycenými v přírodě. Důvodem může být vyšší obsah tělního tuku u nymf odchovaných v konstantních laboratorních podmínkách a s tím spojená absence jakéhokoliv stresu během jejich života (Herrmann, Gern, 2010).

Studie provedené v nedávné době přinášejí překvapivé zjištění, konkrétně takové, že klíšťata infikovaná boreliemi jsou více tolerantní k suchému prostředí, a dokonce v těchto pro ně nevhodných podmínkách déle přežívají, v porovnání s klíšťaty neinfekčními. Tento

fakt je klíčový zejména pro klíšťata ze skupiny *Ixodes*, která jsou velmi citlivá na nízkou úroveň vlhkosti, přičemž konkrétně *I. ricinus* je na tyto k životu nevhodné podmínky citlivé nejvíce. Přežívání infikovaných klíšťat v nepříznivých teplotních a vlhkostních podmínkách se liší v závislosti na jejich vývojovém stadiu a míře infekce. Infekční nymfy přežívají velmi dobře a míra infekce na ně nemá naprosto žádný vliv. Dospělci jsou ale pozitivně ovlivněni infekcí *B. burgdorferi* jen do okamžiku, kdy je množství borelií cca 160 000 spirochet na jedno klíště. To se zdá být hraniční hodnotou borelií, při jejímž překročení začíná mít infekce boreliemi negativní vliv na dospělé klíště. Důvodem se zdá být fakt, že toto množství borelií již negativně ovlivňuje imunitní systém klíštěte, a to má za následek úbytek energetických rezerv. Dospělé klíště již následně není schopno čelit zhoršeným teplotním a vlhkostním podmínkám. Rozdíl účinku borelií na nymfy a dospělé je nejspíše způsoben tím, že nymfy nedosáhnou nebo jen velmi vzácně dosáhnou takového množství borelií v těle. (Herrmann, Gern, 2010).

### **2.6.3 Vliv infekce boreliemi na aktivitu klíšťat**

Jak bylo již dříve poukázáno, borelie ovlivňují svůj vektor v mnoha směrech, avšak klíště je podle zjištěných informací ovlivněno i co se aktivity týče. Studie provedená Lefcort a Durden v roce 1996 upozorňuje na fakt, že infekce *B. burgdorferi* prokazatelně pozměňuje chování klíštěte *I. scapularis*, což bylo prokázáno sérií pokusů zkoumajících jejich aktivitu. U dospělců se tato změna projevila mnohem výrazněji než u nymf. Infekční dospělci byli prokazatelně méně aktivní, velmi neochotně překonávali překážky a vyhýbali se setrvání a lezení po povrchu ve vertikální poloze. Navíc dle dostupných informací, klíšťata infikovaná *B. burgdorferi* vyhledávají své hostitele v menších výškách než klíšťata neinfikovaná (Lefcort, Durden, 1996). Podle dostupných výzkumů, můžeme prokazatelně tvrdit, že dospělá klíšťata ve volné přírodě vyhledávají své hostitele v prostředí vysoké vegetace (63.8% dospělých samic), na rozdíl od nymf, které se zdržují v převážné většině (82.2%) při zemi (Dantas-Torres, Otranto, 2013).

U nymf očividně působí infekce poněkud odlišně než u dospělců. Infikované nymfy naopak preferují stanoviště ve vertikální poloze a vyšších výškách. S ne zcela absolutní jistotou můžeme prohlásit, že oproti neinfekčním nymfám překonávají překážky lépe, nicméně tato skutečnost nebyla s jistotou prokázána (Lefcort, Durden, 1996). Další příklady



pokusů zkoumajících změny v aktivitě a chování klíšťat infikovaných *B. burgdorferi* jsou předmětem mé diplomové práce.

#### **2.6.4 Ovlivnění fototaxe klíšťat infikovaných boreliemi**

Jak již bylo řečeno, klíšťata jsou velmi citlivá na nevyhovující okolní podmínky a špatně přežívají v prostředí, které plně nevyhovuje jejich nárokům. Citlivá jsou zejména na nízkou úroveň vlhkosti ve spojení s vysokými teplotami. Zdá se, že boreliová infekce ovlivňuje fototaxi klíšťat. Infekční nymfy vykazovaly větší tendence k pobytu na slunném stanovišti, zatímco u dospělců se rozdíl v preferování světla či stínu nepotvrdil (Lefcort, Durden, 1996). Tento experiment jsem se rozhodla díky neurčitým výsledkům v případě dospělců zopakovat v rámci mé diplomové práce.

### **2.7 Příklady vlivu parazitů na jejich vektory**

Tak jako mají parazité prokazatelný vliv na člověka, zejména s výsledkem zhoršení zdravotního stavu, mají parazité vliv i na svého hostitele z řad členovců či měkkýšů. V tomto případě však máme mnoho důkazů přímo o manipulaci hostitele parazitem. Přenos samotný je klíčovým faktorem zvyšujícím fitness parazita, díky tomu nacházíme mnoho příkladů změn chování hostitele způsobených přenášeným patogenem, které ve výsledku zvyšují jeho šanci pro přenos. Tento děj můžeme demonstrovat mnoha důkazy, kupříkladu mravenci napadení houbou *Cordyceps* vystoupají těsně před svou smrtí na výše posazené listy rostlin proto, aby bylo následné rozšíření spór této houby co nejefektivnější (Evans H. C, 1982). Jinou a možná i známější ukázkou může být příklad manipulace krabů *Carcinus maenas*. Tito krabi bývají napadáni a následně i vykastrováni kořenohlavcem *Sacculina carcini*, který na jejich povrchu vytvoří externu (jeho vnější část), tu pak krab chrání a stará se o ni jako o své vlastní potomstvo (Rasmussen, 1956).

Dalším z příkladů je interakce mezi mořským plžem *Cerithidea californica* a jeho parazity z třídy motolic. Bylo prokázáno, že v populaci plžů vysoce infikované motolicemi plži dospívají mnohem dříve než v populaci bez výskytu nebo jen s velmi nízkým výskytem motolic. Tento výsledek indikuje vznik genetických změn v napadené populaci plžů (Lafferty, 1993).

Pokud se budeme držet skupiny krev sajících členovců, nalezneme i zde několik důkazů o manipulaci vektoru svým patogenem. Malárie je především v Afrických zemích velkou hrozbou a díky cestování se s ní potýká i daleko více lidí, kteří by s ní za normálních okolností nepřišli do styku. Zajímavé ovšem je, že za jejím šířením nestojí jen samotný komár, ale jistý vliv na vlastní přenos této choroby mají přímo plasmodia. Oocysta je nepřenositelné stadium plasmodií, které musí setrvat po několik dní ve střevě komára, dokud nedojde k uvolnění sporozoitů, tedy stadia, které je již přenosné na obratlovce. Bylo zjištěno, že komáři rodu *Anopheles* mající ve svém střevě nepřenositelné oocysty snižují frekvenci, se kterou sají krev na hostiteli. Naopak ve chvíli, kdy nesou již k přenosu připravené sporozoity, se jejich frekvence sání krve zvyšuje. Tyto významné změny v chování komárů způsobené parazitickou infekcí mají tedy zásadní vliv na epidemiologii malárie (Anderson R. A., 1999).

Encefalitida způsobená La Cross virem (*Bunyaviridae*) je nejčastější a v podstatě i nejběžnější komáry přenášené onemocnění v USA. Nejohroženější skupinou jsou pak zejména děti, u kterých je výskyt této nemoci nejčastější (Rust et al., 1999). Studie provedená na komáru *Aedes triseriatus* potvrdila, že infekce La Coss virem u transovariálně infikovaných jedinců způsobuje jejich dřívější inseminaci, a dokonce i vyšší frekvenci páření oproti komárům neinfekčním. Skutečnost, že infekční samice mají větší šanci na spáření, může být v epidemiologii La Cross viru velmi podstatná, jelikož je zde mnohem více příležitostí pro transovariální a venerický přenos viru (Reese et al., 1999).

S La Cross virem je spojen i vliv na potravní chování komára *Aedes albopictus* a již zmíněného *Aedes triseriatus*. Oba druhy komárů sály mnohem menší množství hostitelské krve v případě, kdy byly infikovány La Cross virem. Odlišné množství přijímané krve nijak nesouviselo s velikostí těla komárů, tato teorie byla s jistotou po průběžném přeměrování velikosti těl komárů vyvrácena. Takto pozměněné přijímání potravy vede k častějšímu sání na jiných hostitelích, což následně způsobí zvýšení šance horizontálního přenosu La Cross viru na další hostitele. Pochopení mechanismu, jakým virus ovlivňuje chování komárů, vedoucí k jeho lepšímu a snazšímu přenosu, může v budoucnu napomoci k vývoji nových strategií, jak přenos viru kontrolovat (Jackson et al., 2012). Prozkoumání vlivu borelií na potravní chování klíšťat, a to jak nymf, tak dospělců, byl jeden z experimentů, kterým jsem se zabývala ve své diplomové práci.

### 3 Cíle práce

- Zmapování a zhodnocení vlivu infekce *Borrelia afzelii* na dobu potřebnou pro přisátí, délku sání, potravní chování, celkovou aktivitu při vyhledávání hostitele a fototaxi nymf a dospělců klíštěte *Ixodes ricinus*.
- Zhodnocení možnosti využití výsledků experimentů a zjištěných informací o chování klíšťat pro prevenci přisátí klíštěte v jeho přirozených podmínkách.
- Zhodnocení možnosti využití zjištěných výsledků pro prevenci před získáním Lymeské boreliózy.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Laboratorní zvířata

#### 4.1.1 Myši

Pro experimenty byly použity SPF samice myši kmene C3H, které byly zakoupeny od firmy AnLab, s.r.o (dodavatel Charles River). Myši byly chovány ve specific-patogen free prostorách parazitologického ústavu, Biologického Centra AV ČR při konstantních podmínkách 22°C a relativní vlhkosti 65%. Chov myši byl prováděn v plastových boxech na podestýlce ve formě dřevěných pilin, kde měly nepřetržitý a neomezený přístup ke kompletní potravě v podobě suchých pelet a pitné vody.

#### 4.1.2 Klíšťata

Klíšťata *Ixodes ricinus* použitá pro experiment byla odchována na pracovišti Parazitologického ústavu BC AV ČR, původně však byla získána ze samic z volné přírody. Zde jsme vycházeli z předpokladu, že borelie nejsou transovariálně přenosné, nicméně tento předpoklad byl následně ověřen otestováním nymf na přítomnost borelií. Klíšťata byla chována ve 24°C při 96% relativní vlhkosti. Fotoperioda je v chovech klíšťat nastavena na 15 hodin světla a 9 hodin tmy.

#### 4.1.3 Borelie

V experimentech byly použity bakterie *Borrelia afzelii* kmene CB-43. Borelie byly kultivovány v Barbour-Stoenner-Kelly-H (BSK-H) mediu (Sigma) s přidavkem 6% králíčího séra v termostatu při konstantní teplotě 33°C.

##### 4.1.3.1 Stanovení počtu borelií dle Magnusona

Na podložní sklo bylo nanášeno 3,5 µl kultury borelií a přikryto krycím sklíčkem o velikosti 18 x 18 mm. Takto připravený preparát byl prohlížen v temném poli optického mikroskopu při 400 násobném zvětšení, přičemž se počítalo množství borelií ve 20 zorných

polích. Výsledný počet borelií se zprůměroval a dosadil se do vzorce podle Magnusona (Magnuson et al., 1948):

$$\text{počet borelií/3,5} = a * 7,7 * 10^5$$

**a** reprezentuje průměr borelií z 20 pozorovaných zorných polí

Výsledné množství borelií bylo naředěno BSK-H mediem na požadovanou koncentraci a následně použito pro infikování laboratorních myší. Celkem pěti myším bylo subkutánně podáno 100  $\mu$ l media s boreliemi. Myši byly pro přesnost následných experimentů cca 1 měsíc po infikování otestovány na přítomnost borelií pomocí metody PCR. Tato doba byla dostatečně dlouhá na to, aby se infekce patřičně rozvinula.

## **4.2 Příprava pokusných myší na sání klíšťat**

Pokusným myším byl oholen hřbet a pro vyhraničení oblasti sání klíšťat byl na oholenou oblast nasazen speciálně vyrobený „klobouček“, který se následně zajistil zdravotnickou fixační náplastí. To myším znemožnilo manipulaci s kloboučkou a zabránilo jejich případnému zranění. Útěku nasazených klíšťat zamezily zátky z perforovaného plastu, kterými se kloboučky zavíčkovaly, což dále zajistilo i dostatečné proudění vzduchu k sajícím klíšťatům.

## **4.3 Infikování larev**

Pro experimenty jsme potřebovali dvě skupiny klíšťat, jednu kontrolní a druhou infikovanou boreliemi. Skupina larev, která měla být infikována, byla nasazena na infikované myši a ponechána sát. Kontrolní skupina larev byla nasazena na neinfekční skupinu myší. Tyto kontrolní a sáním infikované larvy vytvořily dostatečně velkou skupinu klíšťat, kterou jsme používali pro všechny následující experimenty. Plně nasáté larvy byly postupně odebírány, shromážděny a ponechány jeden měsíc ve vhodných podmínkách, kde došlo k přeměně na vyšší instar, tedy nymfy. Reprezentativní vzorek nymf sajících na boreliemi infikovaných myších byl pro přesnost následujících pokusů otestován pomocí metody PCR na přítomnost borelií. Všechny nymfy byly boreliemi prokazatelně a dostatečně infikovány.

## **4.4 Analýza dat**

Veškerá data byla zpracována pomocí programu STATISTICA 12 a tento program byl použit i pro vytvoření následných grafů. Ze statistických testů byla používána jednocestná ANOVA, ANOVA pro opakované měření, hierarchická ANOVA a dvouvýběrový Studentův t-test.

## **4.5 Experimenty**

### **4.5.1 Sledování rychlosti přísátí nymf**

Během tohoto pokusu jsme se snažili zjistit, zda infekce zapříčiněná boreliemi ovlivní rychlost, jakou se nymfy přísají na hostitele. Způsobem zmíněným výše byly na myši nasazeny nymfy klíšťat, kontrolní a infikovanou skupinu tvořilo celkem 100 nymf v každé skupině. Nymfy byly nasazovány v počtu 10 nymf na jednu myš. Toto množství nymf na jednu myš se jeví jako vhodné, jelikož celková ztráta krve, kterou nymfy nasají, nezpůsobí myši žádné zdravotní komplikace. Nymfy byly kontrolovány v intervalech 2, 4 a následně 24 hodin od nasazení, během kontrol byl zaznamenáván počet přísátých nymf v daný okamžik.

### **4.5.2 Sledování rychlosti přísátí dospělců**

Struktura pokusu byla naprosto totožná jako v případě nymf. Na jednu myš však bylo nasazeno pouze jedno dospělé klíště, jelikož větší ztráta krve by již mohla mít pro myš fatální následky. V kontrolní i infikované skupině bylo vždy po 20 dospělých klíšťatech. Kontrola přísátí dospělců probíhala v intervalech 1, 3, 20 a 44 hodin od nasazení na myš a každé přísátí bylo zaznamenáno.

### **4.5.3 Porovnání hmotnosti plně nasátých nymf**

Jedním ze stěžejních pokusů této diplomové práce bylo zhodnotit rozdíly v množství krve a tedy i výsledné hmotnosti po nasátí, které infikované a neinfikované nymfy dosáhnou. Na každou myš bylo nasazeno 10 nymf, jež byly ponechány k plnému nasátí, a zároveň docházelo k jejich kontrole v pravidelných intervalech. Zhruba po dvou dnech se nymfy

začaly postupně samovolně pouštět, což je známka jejich plného nasátí. Poslední nymfy se pustily až cca pátý den po nasazení. Jednotlivé plně nasáté nymfy byly bezprostředně po puštění váženy na analytických vahách (Denver Instrument, SI – 64A, Germany) a jejich váha byla zaznamenána k pozdějšímu porovnání a statistickému zhodnocení.

#### **4.5.4 Porovnání hmotnosti plně nasátých dospělců**

Struktura pokusu byla stejná jako u pokusu s nymfami, pouze s tím rozdílem, že na jednu myš bylo nasazeno pouze jedno dospělé klíště. V kontrolní a infikované skupině bylo po 20 klíšťatech. Klíšťata byla opět ponechána k jejich plnému nasátí, bezprostředně po puštění byla zvážena na analytických vahách (Denver Instrument, SI – 64A, Germany) a jejich váhy byly poté porovnány a statisticky vyhodnoceny.

#### **4.5.5 Studium vlivu infekce *B. burgdorferi* na aktivitu nymf při vyhledávání hostitele**

Tento experiment probíhal v uzavřené aréně rozdělené pevnou průhlednou přepážkou na dvě poloviny, přičemž jedna polovina sloužila pro pokusy s infikovanými a druhá s neinfikovanými klíšťaty. V aréně byla téměř stálá teplota 25°C a díky vlhké podložce byla zajištěna a udržována relativní vlhkost v rozmezí 70 – 80%, což je vlhkost, při které jsou klíšťata nejlépe schopná vyhledávání hostitele (MacLeod, 1935). Standardně se nám podařilo udržovat relativní vlhkost kolem hodnoty 72%. Nymfy byly nuceny lézt po předem připravené 16 cm dlouhé dřevěné tyčce, na níž byla pro lepší orientaci po centimetru naznačena její délka. Do horní části arény byla umístěna myš jako atraktant. To se ukázalo jako velice vhodné řešení, jelikož jak infekční tak neinfekční klíšťata odmítala bez přítomnosti atraktantu lézt. Nymfy byly umístěny na start dráhy a zaznamenával se jejich výsledný čas při dosažení vrcholu tyčky. Pokus byl proveden celkem s 20 nymfami infekčními a 20 nymfami kontrolními.



#### **4.5.6 Studium vlivu infekce *B. burgdorferi* na aktivitu dospělců při vyhledávání hostitele**

Struktura experimentu s dospělými klíšťaty byla naprosto totožná jako v případě studia aktivity nymf. Počet klíšťat byl také stejný, tedy 20 dospělců infekčních a 20 dospělců neinfekčních.

#### **4.5.7 Vliv infekce na fototaktickou aktivitu nymf**

V tomto experimentu jsme vycházeli ze studie provedené Lefcort a Durden v roce 1996, kde se krom jiného snažili dokázat vliv infekce *Borrelia burgdorferi* na fototaktickou aktivitu nymf a dospělců (Lefcort, Durden, 1996). Tento pokus jsme se rozhodli díky neprůkazným výsledkům u dospělců zopakovat a zjistit, zda dojdeme v případě nymf k podobným výsledkům. Do uzavřené arény, ve které byla opět udržována relativní vlhkost v rozmezí 70-80% a teplota cca 25°C, byly umístěny Petriho misky o průměru 10 cm tak, aby v aréně umístěná neprůsvitná přepážka vytvářela nad polovinou Petriho misek stín a druhá polovina tak zůstala vystavena světlu. Nad arénu byl umístěn zdroj světla v podobě klasické 60 W žárovky. Vrchní okraje misek byly potřeny silnou vrstvou vazelíny, která zabraňovala úniku klíšťat z misky. Do každé misky bylo umístěno 10 nymf přesně na pomezí světla a stínu, přičemž infikované a kontrolní nymfy byly odděleny díky vnitřnímu rozdělení arény. Nymfy byly ponechány v těchto podmínkách přesně jednu hodinu, poté došlo k zaznamenání počtu nymf nacházejících se na stinné a osvětlené polovině. Celkem bylo takto otestováno 50 nymf infekčních a 50 nymf kontrolních.

#### **4.5.8 Vliv infekce na fototaktickou aktivitu dospělců**

Struktura pokusu byla opět stejná jako v případě nymf, pouze s tím rozdílem, že do každé Petriho misky bylo umístěno jen 5 dospělých klíšťat. Klíšťata byla opět umístěna na pomezí světla a stínu a po jedné hodině byl zaznamenán výsledek. Celkem bylo otestováno 30 dospělců infekčních a 30 kontrolních.

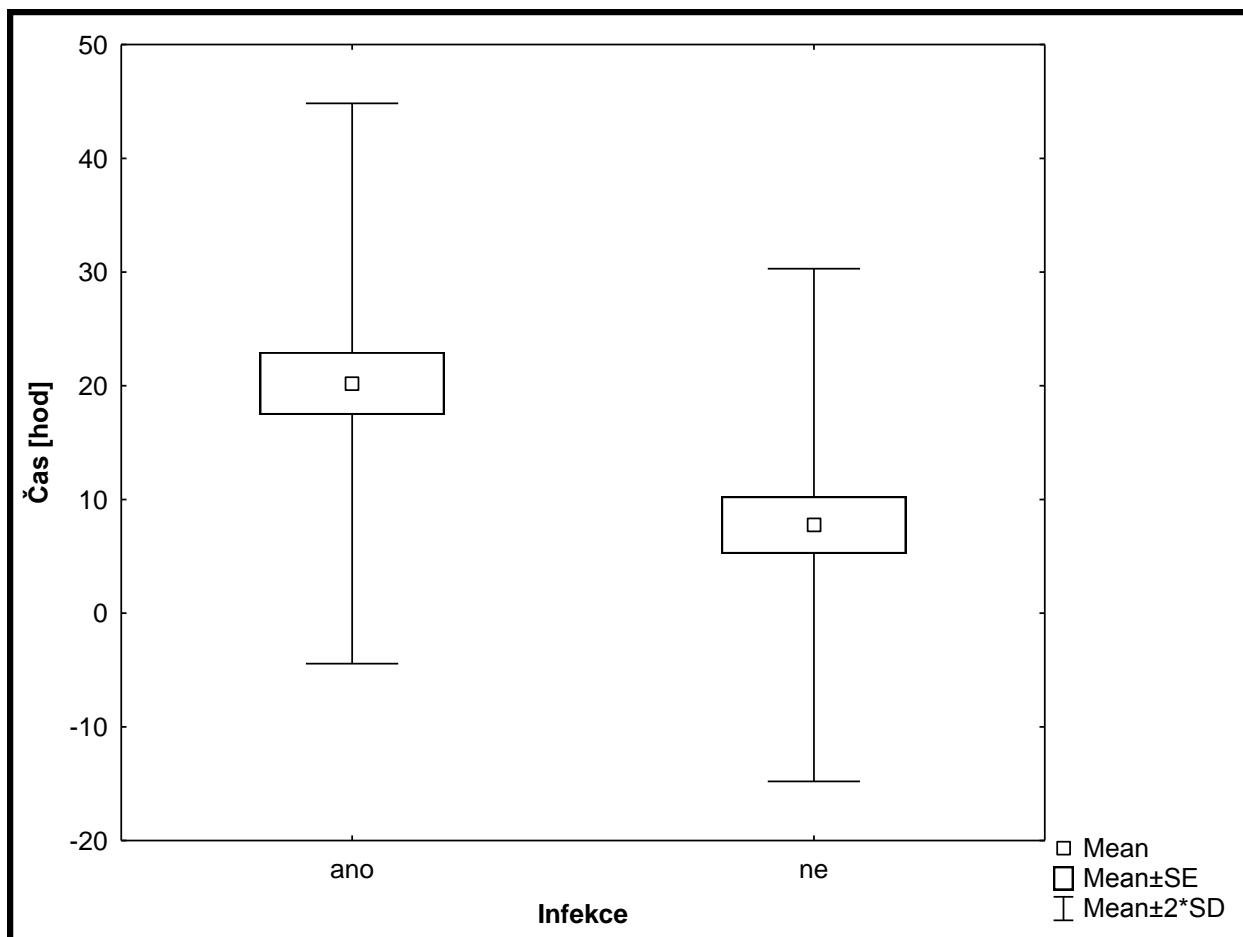
## **4.6 Výsledky**

### **4.6.1 Sledování rychlosti přisátí nymf**

Výsledky tohoto pokusu jsou po vyhodnocení neprůkazné, kontrolní i infikovaná skupina nymf se přisála téměř srovnatelnou rychlostí. Příčinou se nejspíše jeví krátká doba, po kterou jsou klíšťata infikována, a infekce se tedy nemohla patřičně rozvinout. Množství borelií v těle nymf je nejspíše natolik malé, že k žádnému vlivu na agresi nymf nedochází.

### **4.6.2 Sledování rychlosti přisátí dospělců**

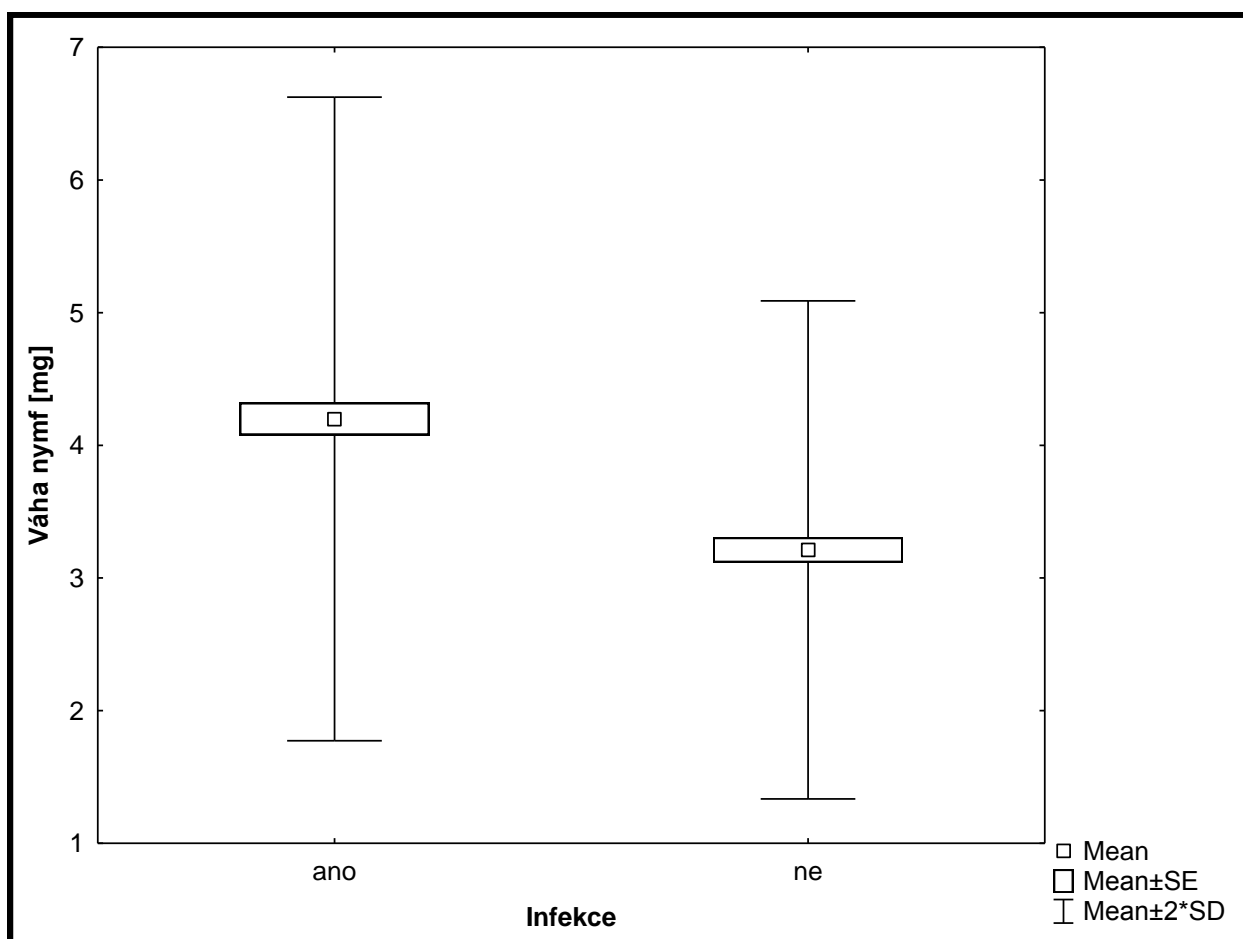
Tento pokus vyšel statisticky průkazně ( $p=0,002$ ;  $DF=1$ ;  $F=11,12$ ). Boreliemi infikovaná dospělá klíšťata se přisála v delším časovém horizontu (v průměru za 20,2 hodin) v porovnání s klíšťaty neinfekčními (v průměru za 7,75 hodin). To může mít souvislost již s pokročilou fází infekce, která klíště ovlivňuje negativním směrem. Na Obr. 6 je znázorněna průměrná doba v hodinách potřebná pro infikovanou a neinfikovanou skupinu klíšťat k přisátí na hostitele.



Obr. 6: Průměrná doba potřebná pro přisátí infikovaných a neinfikovaných dospělých klíšťat na hostitele.

#### 4.6.3 Porovnání hmotnosti plně nasátých nymf

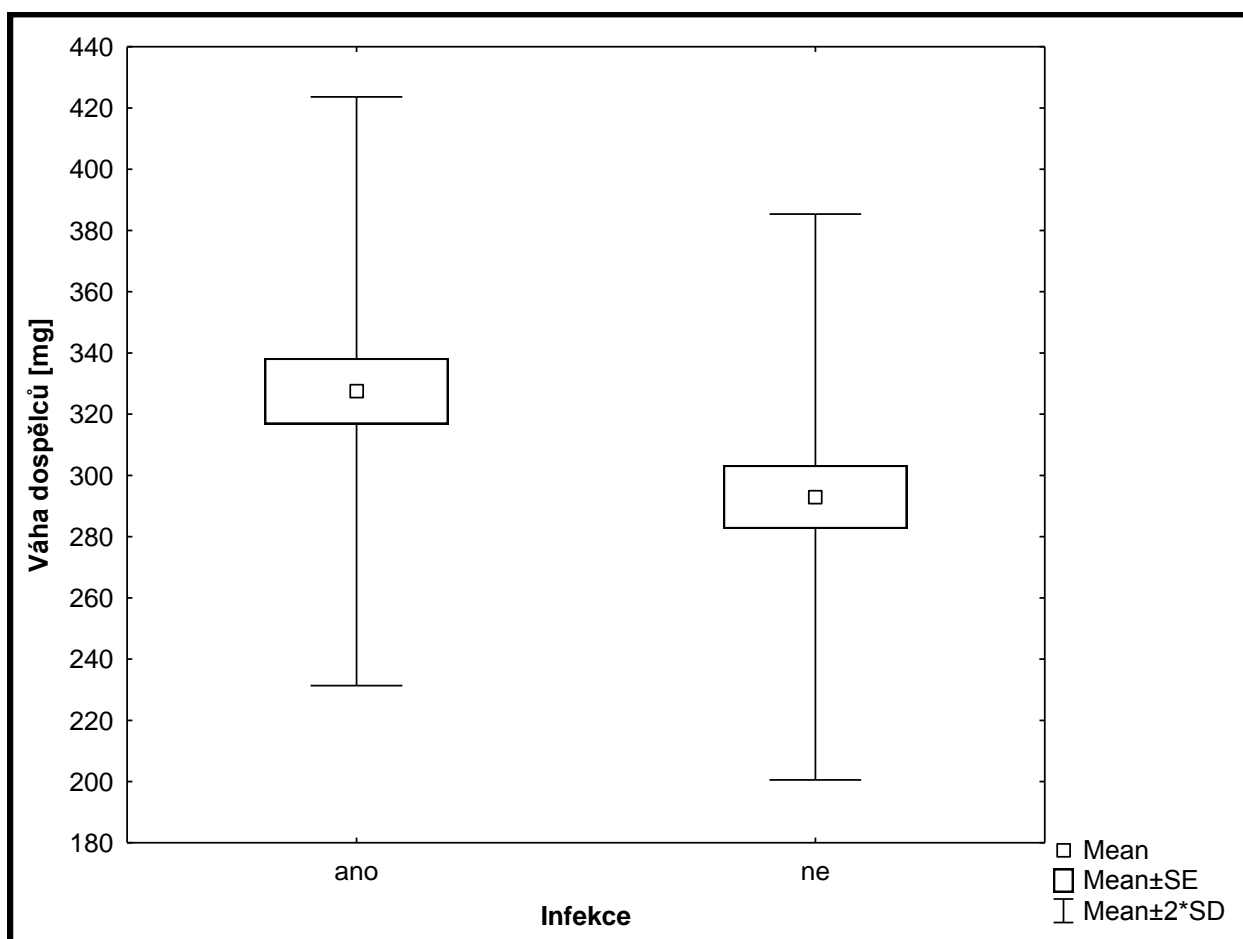
Porovnání hmotností plně nasátých boreliemi infikovaných a neinfikovaných nymf ukázalo, že infikované nymfy dosahují větších hmotností (v průměru 4,199 mg) a tedy nasávají větší množství krve v porovnání s nymfami neinfekčními (v průměru 3,212 mg), ( $p < 0,001$ ;  $DF=1$ ;  $F=30,19$ ), (Obr. 7). Doba sání však zůstala nezměněna a je u obou skupin srovnatelná. Nemůžeme tedy tvrdit, že by důvodem větších hmotností infekčních nymf bylo jejich delší sání na hostiteli oproti nymfám neinfekčním.



Obr. 7: Znázornění průměrné váhy infikovaných a neinfikovaných nymf při plném nasátí.

#### 4.6.4 Porovnání hmotnosti plně nasátých dospělců

Obdobný trend se potvrdil i v případě sání dospělých klíšťat, i když rozdíl již nebyl tak výrazný jako v případě nymf, stále zůstal statisticky významný (Obr. 8). Infikovaná skupina klíšťat sála větší množství krve a dosahovala tak větších hmotností ( $p=0,025$ ;  $DF=1$ ;  $F=5,37$ ). Infikovaní jedinci dosahovali průměrné hmotnosti 327,51 mg, neinfikovaní 292,95 mg. Doba, po kterou klíšťata sála, však zůstala bez rozdílu mezi infikovanou a kontrolní skupinou, což potvrzuje teorii, že boreliemi infikovaná klíšťata sají více krve než klíšťata neinfikovaná.



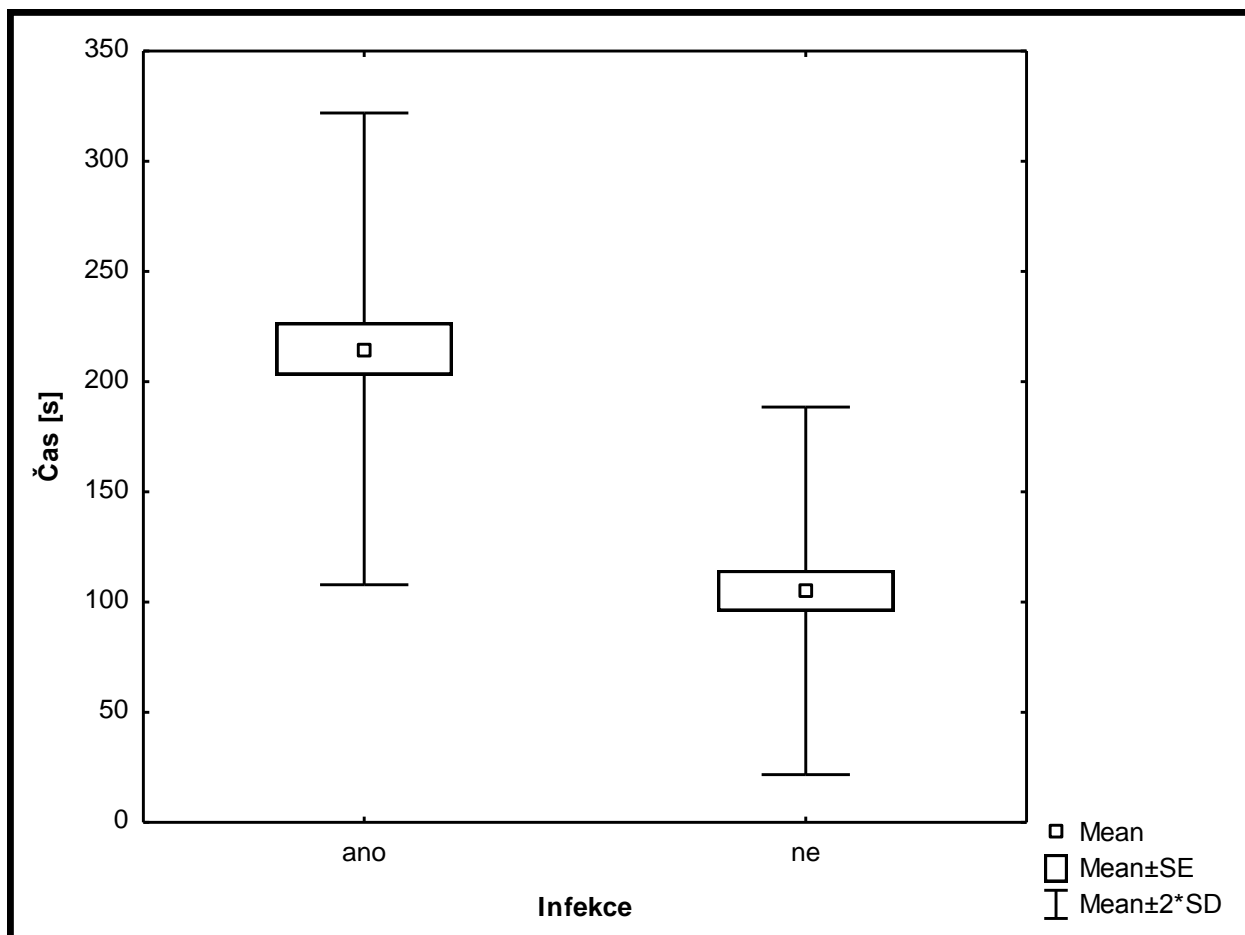
Obr. 8: Znázornění průměrné váhy infikovaných a neinfikovaných dospělých klíšťat při plném nasátí.

#### **4.6.5 Studium vlivu infekce *B. burgdorferi* na aktivitu nymf při vyhledávání hostitele**

Žádný specifický vliv infekce na aktivitu nymf se v rámci tohoto experimentu nepotvrdil. Jak infikované, tak neinfikované nymfy zdolávaly připravenou dráhu v aréně v průměru stejnou rychlostí. Statistická významnost v rozdílu jejich rychlostí se v tomto pokusu neprojevila.

#### **4.6.6 Studium vlivu infekce *B. burgdorferi* na aktivitu dospělců při vyhledávání hostitele**

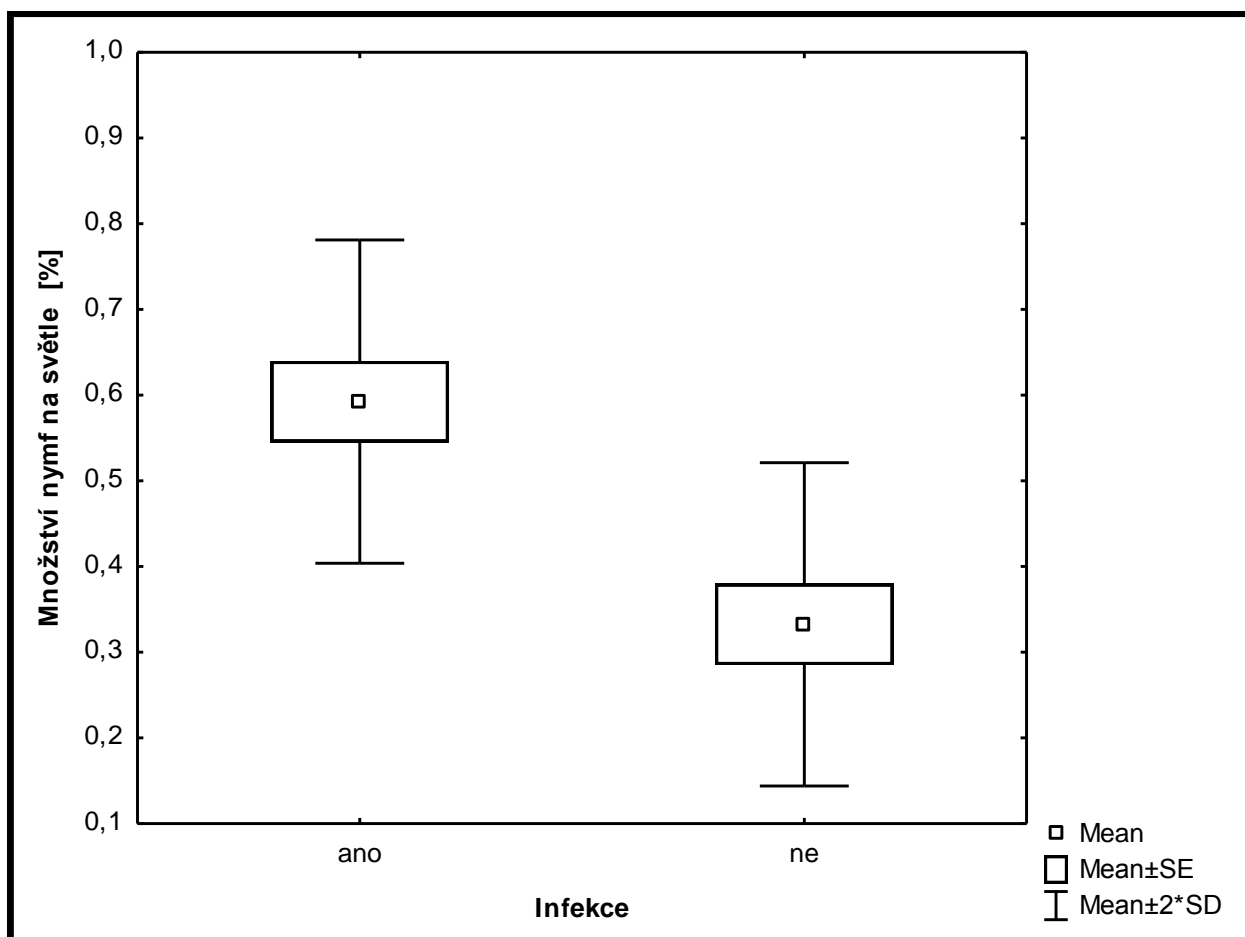
U dospělců byl však již vliv infekce na jejich aktivitu více než patrný. Infikovaná dospělá klíšťata zdolávala testovací dráhu v aréně mnohem pomaleji než klíšťata kontrolní (Obr. 9). Tento pokus přinesl statisticky významný rozdíl mezi oběma skupinami ( $p < 0,001$ ;  $DF=1$ ,  $F=52,37$ ). Průměrný čas infikovaných dospělců byl 214,9 sekund, zatímco kontrolní skupina dosáhla průměrného času 105,1 sekund. U dospělců se tak infekce boreliemi prokazatelně projevuje negativním vlivem na jejich celkovou aktivitu.



Obr. 9: Vliv infekce boreliemi na aktivitu dospělých klíšťat při vyhledávání hostitele.  
Znázornění času potřebného pro zdolání testovací dráhy.

#### 4.6.7 Vliv infekce na fototaktickou aktivitu nymf

Podle námi zjištěných výsledků se zdá, že infekce boreliemi zapříčiňuje u nymf tendenci setrvávat na světlém stanovišti (Obr. 10). Námi naměřené výsledky jsou statisticky průkazné a dokazují, že v průměru 59,3% infikovaných nymf se po jedné hodině nacházelo na osvětlené straně Petriho misky, zatímco neinfikovaných nymf se na osvětlené straně nacházelo pouze 33,3% ( $p=0,008$ ,  $DF=6$ ,  $t=3,89$ ).

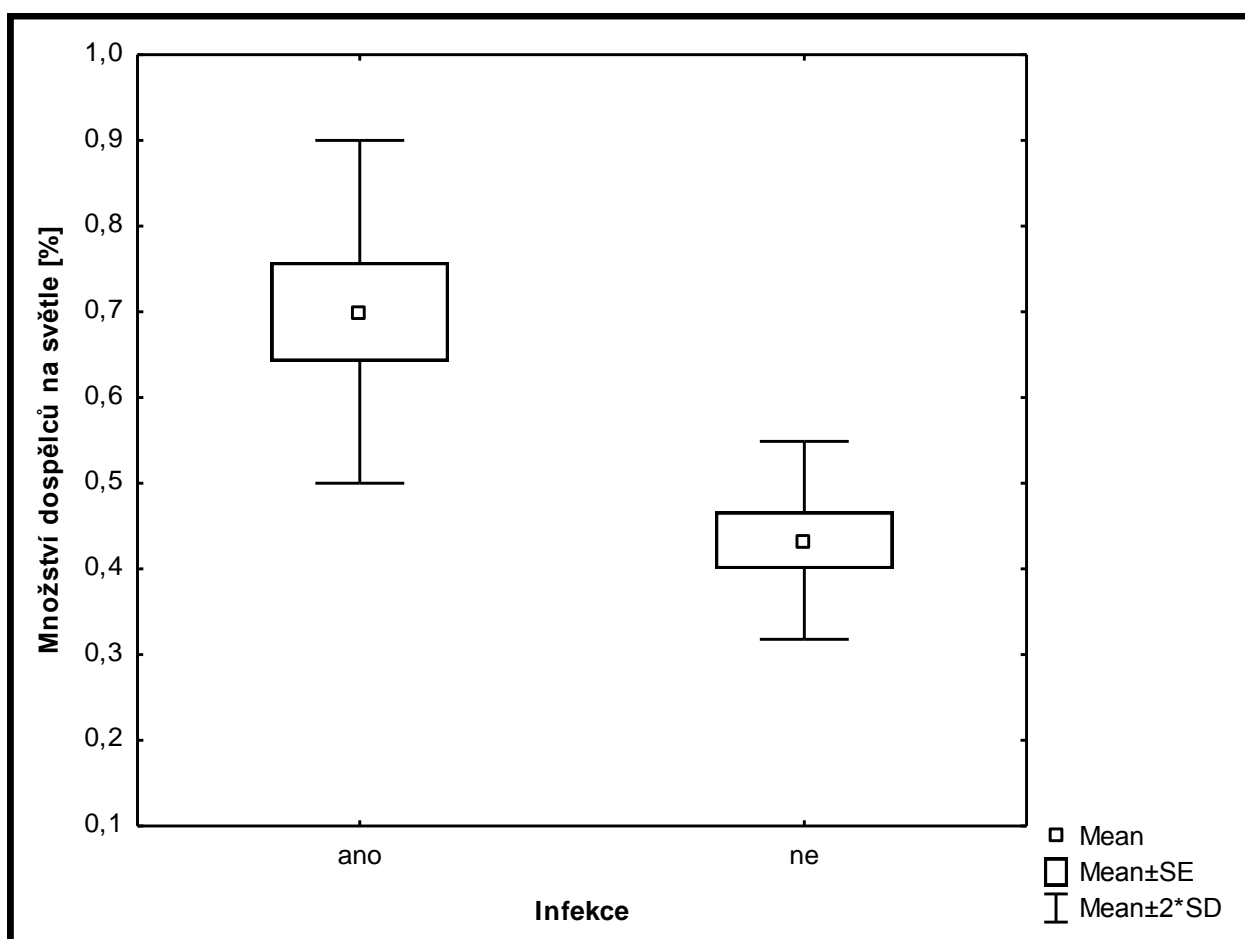


Obr. 10: Procento infekčních a kontrolních nymf preferujících osvětlenou část arény.



#### 4.6.8 Vliv infekce na fototaktickou aktivitu dospělců

U dospělých klíšťat jsme dosáhli zcela odlišných výsledků oproti studii Lefcort a Durden z roku 1996. V této studii nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl mezi preferencí světlého či stinného stanoviště u infikovaných dospělců. Naše výsledky však ukázaly, že stejně jako u nymf, tak i u infekčních dospělců dochází k upřednostňování světlého stanoviště ( $p=0,02$ ;  $DF=4$ ;  $t=4$ ), (Obr. 11). 70% infekčních dospělců se po jedné hodině nacházelo na osvětlené straně Petriho misky, zatímco neinfekčních dospělců pouze 43,3%.



Obr. 11: Procento infekčních a kontrolních dospělců preferujících osvětlenou část arény.

## 5 Diskuze

Lymeská borelióza je celosvětově rozšířené onemocnění přenášené klíšťaty z čeledi Ixodidae. Člověku způsobuje závažné zdravotní komplikace, avšak zcela funkční lidská vakcína proti tomuto onemocnění prozatím neexistuje. Jedinou ochranou, i když ne zcela spolehlivou, je tedy pouze prevence. Mezi základní opatření, která nás mohou před napadením klíšťaty ochránit, se řadí užívání repelentů, nošení světlého oblečení z hladkých materiálů, které zakrývá celé tělo, a nošení pevné obuvi. Hladkost materiálu znesnadní klíštěti přichycení a díky světlé barvě budou případná klíšťata lépe patrná. Vyhýbání se křovinatým podrostům a loukám, alespoň v hlavní sezóně výskytu klíšťat, a pečlivé prohlédnutí celého těla po návratu domů by mělo být samozřejmostí, jelikož nákazu Lymeskou boreliózou přenášejí i nymfy, které jsou velmi malé a tedy snadno přehlédnutelné.

Tato diplomová práce by měla vést k lepšímu poznání chování klíšťat a ke zjištění, zda se chování boreliemi infikovaných jedinců něčím v zásadě liší od klíšťat neinfekčních. Tyto informace nám doplňují znalosti o vlivu infekce *Borrelia burgdorferi* na chování samotných klíšťat, jelikož tato oblast nebyla prozatím nijak zvlášť prozkoumána. Zároveň by se tyto informace daly využít k rozšíření zásad o preventivním chování, které bychom měli při pohybu v přírodě respektovat.

Do této doby bylo provedenými experimenty prokázáno, že infekce boreliemi má skutečně vliv na chování klíšťat, která jsou pro *Borrelia burgdorferi* hlavním vektorem. V řadě studií byl zkoumán vliv na jejich aktivitu, v nichž se prokázalo, že infekce má negativní dopad na aktivitu dospělců. Ovlivnění aktivity se neprokázalo u nymf, nicméně tento jev se dá vysvětlit krátkou dobou, po kterou jsou nymfy infikovány, a tedy množství borelií v jejich těle není tak velké, aby byla jejich aktivita taktéž negativně ovlivněna. Jedna ze zveřejněných studií uvádí, že hraniční hodnota, od které začínají být klíšťata negativně ovlivňována je cca 160 000 spirochet (Herrmann, Gern, 2010). Nymfy nejspíše nedosáhnou této hraniční hodnoty, a proto zůstává jejich aktivita nezměněna.

V naší sérii pokusů jsme se snažili rozšířit znalosti o vlivu infekce *Borrelia burgdorferi* na nymfy a dospělá klíšťata. Prvním pokusem jsme chtěli zjistit, zda bude díky infekci ovlivněna doba, za kterou se klíšťata přisají na svého hostitele, jímž byla v našem případě myš kmene C3H. Výsledky experimentu ukazují, že jak infekční, tak neinfekční nymfy se přisávají za srovnatelně stejnou dobu. Zde může být příčinou již zmíněná krátká doba, po kterou jsou nymfy infikovány, neboť míra borelií v jejich těle je natolik nízká, že k žádnému zásadnímu vlivu nedochází. Změnu nacházíme u dospělců, kde se teorie o negativním dopadu infekce na dospělé potvrzuje. Infikovaní dospělci se přisáli v průměru za 20,2 hodin a neinfekční dospělci v průměru za 7,75 hodin. Tento výsledek však vyvolává diskuzi, zda k podobně velké časové prodlevě u infekčních dospělců dochází i v jejich přirozených podmínkách, nebo zda bude ve skutečnosti o něco kratší. V našem pokusu byly totiž myši chovány v plastových boxech, kde je jejich pohyb omezen, a klíšťata byla držena v uzavřeném prostoru „kloboučku“ na zádech myši a jakýkoliv zásah hostitele byl tedy vyloučen.

Stěžejním experimentem v oblasti zkoumání vlivu infekce boreliemi na klíště bylo porovnání hmotností plně nasátých nymf a dospělců, kde jsme chtěli dokázat náš předpoklad o vlivu infekce na sání. Jak u nymf, tak dospělců se náš předpoklad, že infikovaní jedinci sají větší množství krve, potvrdil. Infikovaní jedinci nasáli větší množství krve a dosahovali tak po plném nasátí větších hmotností. Průměrná doba sání však zůstala nezměněna. Z toho vyplývá, že za stejné časové období nasaje boreliemi infikované klíště větší množství krve než klíště neinfikované. Pozoruhodné však je, že u nymf byl rozdíl hmotností patrnější nežli u dospělců, ačkoliv i zde byl rozdíl statisticky průkazný. Infikované nymfy dosahovaly průměrné hmotnosti 4,199 mg, zatímco neinfikované 3,212 mg. Dospělá infikovaná klíšťata dosahovala průměrné hmotnosti 327,51 mg, neinfikovaná 292,95 mg. Vysvětlením našich výsledků by mohly být změny ve složení klíštěcích slin, které nastávají v případě, že je klíště infikováno boreliemi. Klíštěcí sliny totiž obsahují řadu imunomodulačních a protizánětlivých látek, přičemž produkce některých z nich je u klíšťat infikovaných boreliemi zvýšena. Dai et al. ve studii z r. 2010 přišel se zjištěním, že u boreliemi infikovaných klíšťat je zvýšen jeden ze slinných faktorů, tzv. histamine release faktor (t-HRF), jenž se váže na basofily hostitele a stimuluje je tak k produkci histaminu. Protein t-HRF je klíštětem produkován až v pozdní fázi sání, kdy se jeho účinkem zvýší sekrece histaminu a tím se zlepší tok krve do

místa sání klíštěte (Dai et al., 2010). Boreliemi infikované klíště je tak nejspíše schopno dosáhnout většího příjmu krve a tím i větší výsledné hmotnosti. Dalším slinným proteinem, jehož množství je u boreliemi infikovaných klíšťat několikanásobně zvýšeno, je Salp15 (Ramamoorthi et al., 2005). Imunosupresivní a protizánětlivý účinek tohoto proteinu může taktéž klíštěti usnadnit sání.

Experiment zkoumající rozdíl v aktivitě infikovaných a neinfikovaných klíšťat je ve vědeckých pracích zabývajících se touto tematikou jeden z nejčastějších. Většinou se však jedná o studium vlivu infekce boreliemi na celkovou aktivitu klíšťat, či jejich schopnost překonávat překážky. Náš pokus je unikátní v tom, že jsme do arény, ve které pokus probíhal, přidali atraktant v podobě myši a simulovali jsme tak podmínky při vyhledávání hostitele. Klíšťata své hostitele vyhledávají pomocí vysoce citlivého Hallerova orgánu umístěného na tarzálních člancích prvního páru končetin. Pomocí tohoto orgánu vnímají tepelné změny a zejména změnu koncentrace CO<sub>2</sub> a chemických sloučenin ve vzduchu. Klíšťata byla nucena zdolat dráhu po dřevěné tyčce ve vertikální poloze. Nad ní byla umístěna myš jako atraktant. Výsledné časy infekčních a neinfekčních nymf se v zásadě nelišily, což opět potvrzuje teorii, že infekce u nymf není rozvinuta do té míry, aby jejich aktivita byla jakkoliv negativně ovlivněna. Dospělá klíšťata jsou ale infekcí negativně ovlivněna prokazatelným způsobem. Infikovaná skupina zdolávala připravenou dráhu v průměru ve dvakrát tak dlouhém čase oproti jedincům bez infekce. V reálných podmínkách může tato skutečnost infikovaným jedincům zásadně snižovat šance na vyhledání hostitele. Zajímavou poznámkou může být fakt, že jsme u několika jedinců zkusili zopakovat experiment bez přítomnosti myši jako atraktantu. Zde jsme se však setkali s neúspěchem, jelikož bez přítomnosti potenciálního hostitele odmítala jak infekční tak neinfekční klíšťata překážku zdolat.

Jednou z možných příčin změn v chování klíšťat by mohl být i vliv infekce boreliemi na jejich přirozené endosymbionty. Ve studii provedené na komárovi *Aedes albopictus* byl prokázán vliv komáry přenášeného chikungunya viru na změny v dynamice bakteriální populace, která se běžně u komárů vyskytuje. Určité skupiny bakterií jsou v přítomnosti chikungunya viru potlačeny a jiné naopak značně převládají. Tyto dramatické změny se odehrávají přímo v těle komára, což může mít vliv na jeho chování (Zouache et al., 2012).

V souvislosti s těmito zjištěními je zde velká pravděpodobnost, že se podobné mechanismy mohou odehrávat i v případě boreliemi infikovaných klíšťat a projevit se právě ve změně jejich chování.

Experiment zkoumající vliv infekce boreliemi na fototaxi nymf a dospělců jsme provedli po vzoru studie provedené Lefcort a Durden v roce 1996. Tento pokus jsme se rozhodli zopakovat zejména proto, že v dané studii se potvrdil vliv infekce na fototaxi nymf, ne však již na fototaxi dospělců. Námi provedené experimenty na nymfách prokázaly stejný výsledek jako ve studii, ze které jsme vycházeli, tedy že infikované nymfy preferují spíše světlá stanoviště. Na světle se po patřičně dlouhé době aklimatizace nacházelo 59,3% boreliemi infikovaných nymf, zatímco neinfikovaných pouze 33,3%. Zásadního a oproti výše uvedené studii naprosto odlišného výsledku jsme však dosáhli při pokusech s dospělci. Po aklimatizaci se na osvětleném stanovišti nacházelo 70% infikovaných dospělců a 43,3% dospělců neinfekčních. V širších souvislostech by tento fakt mohl souviset s větším množstvím tělního tuku, který se má podle studie Herrmann et al. z roku 2013 u infikovaných klíšťat vytvářet. Díky vyššímu podílu tělního tuku mohou boreliemi infikovaná klíšťata setrvat delší dobu na osvětleném a tedy i teplejším stanovišti bez rizika vyschnutí, na něž jsou klíšťata *Ixodes ricinus* obzvláště citlivá.

Zjištěné informace o upřednostňování osvětlených stanovišť infekčními klíšťaty by se daly zapracovat a doplnit do preventivních opatření, kterými se máme zejména v sezóně klíšťat v přírodě řídit. Podle naší studie můžeme tvrdit, že v oblastech výskytu klíšťat se budou boreliemi infikovaní jedinci vyskytovat převážně v místech osvětlených sluncem.

Tato diplomová práce přinesla nové poznatky z oblasti vlivu infekce *Borrelia burgdorferi* na klíště jakožto svůj hlavní vektor. Zároveň přispěla dalšími informacemi, které by se daly v případě člověka využít tak, aby bylo riziko napadení infikovaným klíštětem co nejmenší.

## 6 Závěr

- Chování klíštěte *Ixodes ricinus* je prokazatelně v několika rovinách ovlivněno infekcí *Borrelia burgdorferi* sensu lato.
- Infekce boreliemi ovlivňuje dobu, za kterou je dospělé klíště schopno se přisát na svého hostitele. Infikovaní dospělci se přisáli za delší časové období v porovnání s dospělci neinfekčními. Doba přisátí infikovaných nymf zůstala nezměněna a přisátí proběhlo v průměru za stejné časové období jako u neinfekčních nymf.
- Klíšťata infikovaná *B. burgdorferi* dosahují po plném nasátí větších hmotností než klíšťata neinfikovaná. Délka sání však zůstala nezměněna a trvala stejně dlouhou dobu jak u infikovaných, tak u neinfikovaných klíšťat. Tento fakt je důkazem, že infikovaní jedinci nasají za stejné časové období více hostitelské krve. Tento trend se projevil jak u nymf, tak u dospělců.
- Aktivita klíšťat při vyhledávání hostitele zůstala nezměněna pouze v případě nymf. Jak infikované, tak neinfikované nymfy zdolávaly testovací dráhu srovnatelnou rychlostí. V případě infikovaných dospělců je již aktivita výrazně utlumena, což se ve výsledku projevilo pomalejším zdoláváním testovací dráhy při vyhledávání hostitele.
- Infekce způsobená *B. burgdorferi* prokazatelně ovlivňuje fototaxi klíšťat. Jak infikované nymfy, tak infikovaní dospělci preferují osvětlená stanoviště, zatímco neinfikovaní jedinci zůstávají spíše na stinných stanovištích.

## 7 Použitá literatura

**Anderson R. A., Koella J. C., Hurd H.** (1999). The effect of *Plasmodium yoelii nigeriensis* infection on the feeding persistence of *Anopheles stephensi* Liston throughout the sporogonic cycle. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 266: 1729–1733.

**Angelo I. C., Gôlo P. S., Camargo M. G., Kluck G. E., Folly E., Bittencourt V. R.** (2010). Haemolymph protein and lipid profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infected by fungi. *Transboundary and Emerging Diseases*, 57: 79-83.

**Anguita J., Ramamoorthi N., Hovius J. W. R., Das S., Thomas V., Persinski R., Conze D., Askenase P. W., Rincón M., Kantor F. S., Fikrig E.** (2002). Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4+ T cell activation. *Immunity*, 16: 849–859.

**Banchereau J., Steinman R. M.** (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392: 245-252.

**Burgdorfer W., Barbour A. G., Hayes S. F., Benach J. L., Grunwaldt E., Davis J. P.** (1982). Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science*, 216:1317-1319.

**Casjens S., Palmer N., van Vugt R., Huang W. M., Stevenson B., Rosa P., Lathigra R., Sutton G., Peterson J., Dodson R. J., Haft D., Hickey E., Gwinn M., White O., Fraser C. M.** (2000). A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology*, 35: 490-516.

**Dai J., Narasimhan S., Zhang L., Liu L., Wang P., Fikrig E.** (2010). Tick histamine release factor is critical for *Ixodes scapularis* engorgement and transmission of the Lyme disease agent. *PLoS Pathogens*, 6: 1-10.

**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.

**Dantas-Torres F., Otranto D.** (2013). Seasonal dynamics of *Ixodes ricinus* on ground level and higher vegetation in a preserved wooded area in southern Europe. *Veterinary Parasitology*, 192: 253-258.

**Evans H. C.** (1982). Entomogenous fungi in tropical forest ecosystems: an appraisal. *Ecological Entomology*, 7: 47-60.

**Fikrig E., Feng W., Barthold S. W., Telford S. R., Flavell R. A.** (2000). Arthropod- and host-specific *Borrelia burgdorferi* bbk32 expression and the inhibition of spirochete transmission. *The Journal of Immunology*, 164: 5344-5351.

**Garg R., Juncadella I. J., Ramamoorthi N., Ashish, Ananthanarayanan S. K., Thomas V., Rinco'n M., Krueger J. K., Fikrig E., Yengo Ch. M., Anguita J.** (2006). Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *The Journal of Immunology*, 177: 6579-6583.

**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*. *Journal of Bacteriology*, 180: 2418–2425.

**Herrmann C., Gern L.** (2010). Survival of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) under challenging conditions of temperature and humidity is influenced by *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection. *Journal of Medical Entomology*, 47: 1196-204.

**Herrmann C., Voordouw M. J., Gern L.** (2013). *Ixodes ricinus* ticks infected with the causative agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, have higher energy reserves. *International Journal for Parasitology*, 43: 477-483.

**Hovius J. W. R., Jong M. A. W. P., Dunnen J., Litjens M., Fikrig E., Poll T., Gringhuis S. I., Geijtenbeek T. B. H.** (2008). Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *PLoS Pathogens*, 4: 1-14.



- Jackson B. T., Brewster C. C., Paulson S. L.** (2012). La Crosse virus infection alters blood feeding behavior in *Aedes triseriatus* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 49: 1424-1429.
- Jongejan F., Uilenberg. G.** (2004). The global importance of ticks. *Parasitology*, 129: 3-13.
- Lafferty K. D.,** (1993). Effects of parasitic castration on growth reproduction and population dynamics of the marine snail *Cerithidea californica*. *Marine Ecology Progress Series*, 96: 229-237.
- Larregina A. T., Falo Jr. L. D.** (2005). Changing paradigms in cutaneous immunology: Adapting with dendritic cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 124: 1-12.
- Lefcort H., Durden L. A.** (1996). The effect of infection with Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) on the phototaxis, activity, and questing height of the tick vector *Ixodes scapularis*. *Parasitology*, 113: 97-103.
- Magnuson H. J., Eagle H., Fleischman R.** (1948). The minimal infectious inoculum of *Spirochaeta pallida* (Nichols strain) and a consideration of its rate of multiplication *in vivo*. *American Journal of Syphilis, Gonorrhoea and Venereal Diseases*, 32: 1-18.
- Margos G., Hojgaardb A., Lanec R. S., Cornetd M., Fingerlee V., Rudenko N., Ogdeng N., Aanensenh D. M., Fish D., Piesman J.** (2010). Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissettii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 1: 151-158.
- Margos G., Vollmer S. A., Ogden N. H., Fish D.** (2011). Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infection, Genetics and Evolution*, 11: 1545-1563.
- Marques A. R.** (2010). Lyme Disease: A Review. *Current Allergy and Asthma Reports*, 10:13–20.

**Merino O., Almazán C., Canales M., Villar M., Moreno-Cid J. A., Galindo R. C., de la Fuente J.** (2011). Targeting the tick protective antigen subolesin reduces vector infestations and pathogen infection by *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina*. *Vaccine*, 29: 8575-8579.

**Nadelman R. B., Nowakowski J., Forseter G., Goldberg N. S., Bittker S., Cooper D., Agüero-Rosenfeld M., Wormser G. P.** (1996). The clinical spectrum of early Lyme borreliosis in patients with culture-confirmed erythema migrans. *American Journal of Medicine*, 100: 502–508.

**Nuttall P. A., Labuda M.** (2004). Tick-host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology*, 129: 177-189.

**Nuttall P.A., Trimmell A. R., Kazimirova M., Labuda M.** (2006). Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunology*, 28: 155-163.

**Pal U., Li X., Wang T., Montgomery R. R., Ramamoorthi N., deSilva A. M., Bao F., Yang X., Pypaert M., Pradhan D., Kantor F. S., Telford S., Anderson J. F., Fikrig E.** (2004). TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell*, 119: 457–468.

**Pal U., Yang X., Chen M., Bockenstedt L. K., Anderson J. F., Flavell R. A., Norgard M. V., Fikrig E.** (2004). OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *The Journal of Clinical Investigation*, 113: 220-230.

**Ramamoorthi N., Narasimhan S., Pal U., Bao F., Yang X. F., Fish D., Anguita J., Norgard M. V., Kantor F. S., Anderson J. F., Koski R. A., Fikrig E.** (2005). The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature*, 436: 573-577.

**Rasmussen E.,** (1956). Behaviour of Sacculinized Shore Crabs (*Carcinus maenas* Pennant). *Nature*, 183: 479-480.

- Reese S. M., Beaty M. K., Gabitzsch E. S., Blair C. D., Beaty B. J.** (1999). *Aedes triseriatus* females transovarially infected with La Crosse virus mate more efficiently than uninfected mosquitoes. *Journal of Medical Entomology*, 46: 1152-1158.
- Rudenko N., Golovchenko M., Belfiore N. M., Grubhoffer L., Oliver J. H.** (2014). Divergence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochetes could be driven by the host: diversity of *Borrelia* strains isolated from ticks feeding on a single bird. *Parasites & Vectors*, 7: 1-11.
- Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L., Oliver J. H.** (2009). *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from the Southeastern region of the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 134-141.
- Rust R. S., Thompson W. H., Matthews C. G., Beaty B. J., Chun R. W.** (1999). La Crosse and other forms of California encephalitis. *Journal of Child Neurology*, 14: 1-14.
- Schnarr S., Franz J. K., Krause A., Zeidler H.** (2006). Infection and musculoskeletal conditions: Lyme borreliosis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 20: 1099-1118.
- 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. *Microbiology*, 92: 2909-2913.
- Steere A. C.**, (1989). Lyme disease. *The New England Journal of Medicine*, 321: 586-596.
- Steere A. C., Malawista S. E., Snyderman D. R., Shope R. E., Andiman W. A., Ross M. R., Steele F. M.** (1977). Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis and Rheumatism*, 20: 7-17.
- Strle F., Stanek G.** (2009). Clinical manifestations and diagnosis of Lyme borreliosis. *Current Problems in Dermatology*, 37: 51-110.

**van Dam A. P., Kuiper H., Vos K., Widjojokusumo A., de Jongh B. M., Spanjaard L., Ramselaar A. C. P., Kramer M. D., Dankert J.** (1993). Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clinical Infectious Diseases*, 17: 708-717.

**Volf P., Horák P.** Paraziti a jejich biologie. 1. vyd. Praha: TRITON, 2007. 318 s.

**Zouache K., Michelland R. J., Failloux A. B., Grundmann G. L., Mavingui P.** (2012). Chikungunya virus impacts the diversity of symbiotic bacteria in mosquito vector. *Molecular Ecology*, 21: 2297-2309.