

## CHOV a STUDIUM KLÍŠŤAT

**Nepříjemné roztoče, s nimiž se lidé s nelibostí musejí vypořádávat po jarních či podzimních procházkách, si v Českých Budějovicích hýčkají. V Parazitologickém ústavu Biologického centra AV ČR jim dokonce i „vyvařují“, jak se dozvíme v následujících příspěvcích.**

**S**ystematický chov klíšťat vznikl v Parazitologickém ústavu BC AV ČR v druhé polovině devadesátých let minulého století, kdy úřad ředitele zastával prof. Libor Grubhoffer. Tehdy přišel s myšlenkou sloučit sporadické chovy krev sajících členovců, rozmístěné mezi jednotlivé pracovníky ústavu a studenty, a vznikl tak nový post: laborant-technik chovu.



**Samičky pijáka lužního (*Dermacentor reticulatus*) na počátku snůšky. Jedna samička naklade více než tisíc vajíček.**

K tomuto účelu jsme získali dosud nevyužívané prostory v budově zvěřince včetně klimatizovaných boxů, které původně sloužily k veterinárním účelům.

Chov klíšťat sám je nejen poměrně náročnou technickou záležitostí, jež vyžaduje regulaci teploty, vlhkosti, světelného režimu, ale zejména mnohé osobní zkušenosti a dovednosti. Ty jsme postupně získávali jak na našem

pracovišti, tak návštěvami v zahraničních laboratořích, které se chovem klíšťat dlouhodobě zabývají (například Oklahoma State University, USA).

Původně jsme se zaměřili na dva stěžejní druhy: evropské klíště obecné – *Ixodes ricinus* a afrického klíšťáka *Ornithodoros moubata*. V posledních 10 letech výrazně vzrostl počet výzkumných projektů zaměřený na *I. ricinus*, a to především kvůli jeho důležitosti jako přenašeče viru klíšťové encefalitidy a lymfské boreliózy, což přirozeně vyvolalo tlak na zvýšenou produkci klíšťat; přestože se pohybovala řádově ve stovkách dospělců a tisícovkách nymf ročně, nebyla stále dostačující. Z tohoto důvodu se v sezonních měsících doplňují počty klíšťat sběry z přírody, na nichž se významně podílejí studenti Přírodovědecké fakulty JU. Teprve nedávno se podařilo vyřešit problém dlouhodobého uchování dospělců *I. ricinus* získaných sběrem.

Sortiment chovaných klíšťat se postupně rozšířil o další druhy na současných 14 (čtyři druhy rodu *Ixodes*,

dva rodu *Dermacentor*, dva rodu *Haemophysalis*, tři druhy rodu *Rhipicephalus*, dva rodu *Hyalomma*, jeden rodu *Amblyomma* a jeden druh klíšťáka *Ornithodoros moubata*).

Chov klíšťat by se neobešel bez spolupráce se zvěřincem PAÚ BC AV ČR. Využívají se pro něj především laboratorní morčata a králíci, zatímco myši pro konkrétní experimenty. Pro úspěšné nasávání klíšťat jsme museli vyřešit techniku strojení laboratorních zvířat, aby úspěšnost sání klíšťat byla co nejvyšší, a postupně se tak snižovala potřeba živých zvířat. Další cestou, kterou lze částečně využít pro některé experimenty, je technika krmení *in vitro* na umělých membránách a hovězí krvi (viz následující příspěvek Jana Pernera).

Laboratorní chov klíšťat je schopen dodat materiál do laboratoře po celý rok. Může nabídnout klíšťata prostá patogenů, nebo naopak infikovaná (například konkrétním kmenem borelie).

V současnosti působí v PAÚ BC AV ČR několik oddělení, která se zabývají klíšťaty a jimi přenášenými nemocemi, a jsou tak závislá na pravidelné a spolehlivé dodávce klíšťat pro své experimenty. Jde o následující pracoviště: Laboratoř molekulární ekologie vektorů a patogenů (pod vedením Libora Grubhoffera), Laboratoř imunologie vektorů (Petr Kopáček), Laboratoř arbovirologie (Daniel Růžek), Laboratoř genomiky a proteomiky vektorů (Michalis Kotsyfakis), Laboratoř klíšťaty přenášených onemocnění (Ondřej Hajdušek). Laboratoře se zapojují do mezinárodních i aplikovaných projektů, z čehož na úspěšném chovu klíšťat profitují další zahraniční pracoviště včetně firemního výzkumu.

Kromě vlastní produkce klíšťat poskytujeme získané poznatky veřejnoprávním médiím, ale třeba i studentům převážně středních škol během *Dnů otevřených dveří*.

JAN ERHART,

Parazitologický ústav BC AV ČR, v. v. i.

## Membránové sání klíšťat

**A**lternativou ke krmení klíšťat na laboratorních zvířatech je jejich membránové sání. Umělé (membránové) sání má již poměrně dlouhou historii ve výzkumu biologie krev sajících členovců a zahrnuje škálu více či méně úspěšných experimentálních matric: od zvířecích vypraných střívek, přes umělá střívka až po Parafilm® nebo speciální edice nelubrikovaných

prezervativů. Umělé sání je poměrně snadno proveditelné u krev sajícího hmyzu, protože doba potřebná pro plné dosátí je relativně krátká, trvá v řádu několika minut. Naopak u klíšťat, která sají na svém hostiteli i několik dní (v závislosti na životním stadiu klíštěte), představuje doba potřebná pro plné dosátí výraznou metodickou komplikací.

Úspěšné zavedení experimentálního krmení evropského klíštěte *Ixodes ricinus* na umělých membránách se podařilo před zhruba 10 lety vyvinout na univerzitě ve švýcarském Neuchâtelu v laboratoři dr. Patricka Guerina. V současnosti se metoda membránového sání klíšťat s úspěchem používá i v Parazitologickém ústavu BC AV ČR v Českých Budějovicích a využívá se jak pro studium fyziologie klíšťat, tak i při experimentálních modelech přenosu patogenů.

Membránové sání není primárně určeno k udržování chovu klíšťat. Spíše nabízí rozmanité spektrum experimentálních nastavení, která nelze provést na živých hostitelích. V Laboratoři imunologie vektorů PaÚ BC AV ČR je rutinně zaveden membránový systém pro sání dospělých samic klíštěte *I. ricinus*. Krmicí systém se skládá ze speciální tenké silikonové membrány, která umožňuje proniknutí hypostomů (adaptovaného ústního ústrojí klíšťat) k defibrinované krvi. Klíšťata se lákají k přísátí na membráně pomocí zvláštních „parfémů“ extrahovaných ze srsti zvířat. V současnosti se systém optimalizuje i pro nymfální stadia (obr. 1), jež hrají nejvýznamnější roli při infekci klíšťaty přenášených patogenů (*Borrelia* spp., *Babesia* spp., *Anaplasma* spp. aj.).

Další výzvou je vývoj definovaného média pro klíštěcí sání. Aktuálně se většinou používá defibrinovaná hovězí krev dodávaná z jatek, u které lze jen stěží zajistit sterilitu a konstantní složení. Určení definovaného média by umožnilo snáze porovnávat výsledky jednotlivých studií mezi laboratořemi a zároveň delší skladování a okamžitou přípravu.

Základní výzkum orientujeme na dvě témata. První z nich se nazývá *Co dělá klíště parazitem?* – jinými slovy, co si musí klíště brát z hostitelské krve, aby mohlo přežít a rozmnožovat se. Jelikož si lze jen těžko představit, že by se odebíraly či přidávaly jednotlivé složky krve v živém hostiteli, membránové sání nabízí dosud nepřístupnou sérii pokusů určujících závislost klíšťat na jednotlivých složkách krve. Definování složek kultivačních médií umožnilo i velký průlom ve studiu jednobuněčných parazitů. Tito parazité mají oproti svým volně žijícím protějškům často zredukované některé metabolické dráhy a spíše spoléhají na získávání potřebných meziproductů ze svého hostitele. Zdá se, že i klíště ztratilo jednu důležitou anabolickou dráhu oproti neparazitickým příbuzným z řad roztočů. Klíšťata si neumí vytvářet molekulu



VŠECHNA FOTA: JAN ERHART, BC AV ČR

hemu a tento životně důležitý kofaktor mnoha enzymů si berou výhradně z hostitelské krve (hemoglobinu) a transportují ho do ostatních tkání. Výsledky studie založené na membránovém sání klíšťat na plné krvi nebo séru (obr. 2) shrnuje publikace, která je právě v recenzním řízení.

Ovlivňování aktivity některých imunitních složek v potravě umožňuje řešit i další problematiku: *Jak se klíště brání imunitní a zánětlivé odpovědi hostitele?* Je pozoruhodné, že klíšťata rodu *Ixodes* mohou sát na hostiteli až deset dní, a přesto je hostitel poměrně bezbranný při snaze klíště vypudit. Existuje mnoho studií popisujících jednotlivé pochody imunitní obrany, které jsou indukovány klíštěcím sáním. Klíště si ale zřejmě vyvinulo účinné mechanismy, jak dané imunitní a zánětlivé reakce potlačovat. Právě realizovaná studie (ve spolupráci s prof. José Ribeiirem z Národního ústavu zdraví v USA – NIH/NIAID) postupně rozkrývá, do jaké míry modeluje hostitelská imunita exprese proteinů ve slinných žlázách klíštěte, které jsou následně „plivány“ do místa sání. Časté obměňování repertoáru sekretovaných slinných proteinů zřejmě umožňuje klíštěti tak dlouhé setrvání na hostiteli. Další experimentální možnosti se nabízejí i pro studium klíšťaty přenášených patogenů a dynamiky přenosu.

Systém membránového sání dovoluje nejen realizovat dosud experimentálně nepřístupné pokusy základního výzkumu, ale má také značný potenciál v aplikované sféře.

V kontextu aplikované sféry bychom rádi uplatnili membránový systém k testování protiklíštěcích farmak. Testovací schémata umožňují ověřování protiklíštěcích repelentů, léčiv a vakcín, popřípadě látek bránících přenosu klíšťaty přenášených patogenů. Testování se uskutečňuje na membránovém sání, a tak testovaný produkt může při splnění podmínek získat certifikát *NETestováno na zvířatech* vyhovující standardům například Humane Cosmetics Standard (HCS). ■

JAN PERNER, MATĚJ KUČERA, PETR KOPÁČEK,  
Parazitologický ústav BC AV ČR, v. v. i.

### Membránové sání nymf a dospělých samic klíštěte *Ixodes ricinus*

### Dospělé samice *I. ricinus* nasáté na plné krvi (nalevo) nebo na séru (napravo)

