

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Дарко Б. Михаљица

ПОТЕНЦИЈАЛ РЕКОМБИНАНТНИХ
ПРОТЕИНА ПЉУВАЧКЕ КРПЕЉА
IXODES RICINUS (LINNAEUS, 1758)
ЗА ДЕТЕКЦИЈУ СПЕЦИФИЧНИХ
АНТИТЕЛА КАО МАРКЕРА
УБОДА КРПЕЉА

докторска дисертација

Београд, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Darko B. Mihaljica

POTENTIAL OF RECOMBINANT
IXODES RICINUS (LINNAEUS, 1758)
TICK SALIVA PROTEINS FOR
DETECTION OF SPECIFIC ANTIBODIES
AS MARKERS OF TICK BITE

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

КОМИСИЈА ЗА ОДБРАНУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ментори:

др Драгана Марковић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду
Институт за медицинска истраживања

др Биљана Божић Недељковић, редовни професор
Универзитет у Београду
Биолошки факултет

Чланови комисије:

др Жељко Радуловић, Assistant Professor
Northwestern State University, LA, USA
School of Biological and Physical Sciences

др Снежана Томановић, виши научни сарадник
Универзитет у Београду
Институт за медицинска истраживања

др Љубиша Ж. Станисављевић, ванредни професор
Универзитет у Београду
Биолошки факултет

Датум одбране: _____

Ова докторска дисертација је у потпуности урађена у Групи за медицинску ентомологију Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, у оквиру реализације пројекта „Ензоотски трансмисиони циклуси патогених микроорганизама које преносе крпељи“ из програма основних истраживања, финансираног од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, под ознаком ОИ173006, чији је руководилац др Снежана Томановић.

тојој мајци Светлани

ЗАХВАЛНИЦА

Највећу захвалност дугујем менторки др Драгани Марковић, вишем научном сараднику Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, на пренетом знању, помоћи и подрици, без чијег залагања и посвећености ова теза не би била завршена.

Огромну захвалност дугујем менторки проф. др Биљани Божић-Недељковић, редовном професору Биолошког факултета Универзитета у Београду, на више него коректној сарадњи, стручној помоћи и професионалности.

Посебно велику захвалност дугујем др Жељку Радуловић (Assistant Professor, School of Biological and Physical Sciences, Northwestern State University, LA, USA) што ме је увео у веома интересантну и перспективну научну област.

Такође, посебно велику захвалност дугујем др Снежани Томановић, вишем научном сараднику Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду на подрици и помоћи при решавању проблема који су искрсавали, као и искуству и знању које ми је пренела током заједничког рада.

Проф. др Љубиши Станисављевићу, ванредном професору Биолошког факултета Универзитета у Београду, искрено хвала на сарадњи и корисним сугестијама при финалној изради ове дисертације.

Захваљујем др Јелени Самарџић, научном сараднику Института за молекуларну генетику и генетичко инжењерство Универзитета у Београду, на помоћи у кључним моментима током извођења експеримената. Такође, проф. др Милицу Ковачевић-Филиповић, редовном професору и Зорани Милановић, докторанду Факултета ветеринарске медицине, хвала на колегијалности и помоћи при добијању и анализи узорака испитиваних у овом раду. Др вет. мед. Владимиру Ћирковићу хвала на помоћи при добијању узорака.

Др Марији Милутиновић, научном саветнику у пензији Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, хвала што ме је примила у Групу за медицинску ентомологију, у којој сам започео своју професионалну каријеру. Колегама из Групе, докторандима Сањи Ђакић, Ратку Сукари и др Горани Веиновић, научном сараднику, као и Корани Коцић, докторанду Биолошког факултета Универзитета у Београду, захваљујем на помоћи и подршци.

Захваљујем се својим пријатељима на подршци и стрпљењу које су имали за мене последњих неколико година.

Неизмерну захвалност дугујем својим родитељима Светлани и Благоју, сестри Даринки, као и осталим члановима своје породице, чије су ми подршка и љубав дали снаге да истрајем до краја.

**ПОТЕНЦИЈАЛ РЕКОМБИНАНТНИХ ПРОТЕИНА ПЉУВАЧКЕ КРПЕЉА
Ixodes ricinus (LINNAEUS, 1758) ЗА ДЕТЕКЦИЈУ СПЕЦИФИЧНИХ
АНТИТЕЛА КАО МАРКЕРА УБОДА КРПЕЉА**

САЖЕТАК

Процена изложености крпељима је значајна у епидемиолошким студијама обољења чије узрочнике преносе крпељи, а потврда убода крпеља је важна за њихову дијагностику. У овом раду су испитана три протеина пљувачке, PA107, AV422 и калретикунин (CAL), крпеља *Ixodes ricinus*, медицински најзначајније врсте у Европи, у контексту употребе за детекцију специфичних антитела у серуму домаћина, као маркера убода. Анализа варијабилности њихових секвенци је указала на високу конзервираност сва три протеина, при чему се PA107 показао као најконзервиранији. С обзиром на убиквитарну заступљеност CAL код еукариота, даљи фокус у овој студији је био на PA107 и AV422, као протеинима који су специфични за крпеље и чији хомолози су први пут анализирани код врсте *Ixodes ricinus*. Испитивана је реактивност серума експерименталних животиња, пацова, на којима су храњене ларве *Ixodes ricinus* или *Dermacentor reticulatus*, са рекомбинантним формама *IrPA107* и *IrAV422*. Коришћењем *rIrAV422*, специфична антитела су детектована код свих инфестираних пацова, што указује да се *rIrAV422* може употребити за детекцију маркера убода различитих група тврдых крпеља уз високу сензитивност и специфичност. Реактивност у случају *IrPA107* је била значајно мања. За испитивање употребе *rIrAV422* у детекцији маркера убода у серумима домаћина изложених крпељима у природном окружењу, коришћени су ловачки пси као адекватна индикаторска група. Добијена серореактивност код свих анализираних паса у студији указује на широк потенцијал примене овог протеина пљувачке у процени изложености различитим врстама крпеља и ризика од инфекције патогенима које они преносе.

КЉУЧНЕ РЕЧИ: протеини пљувачке, рекомбинантни протеини, антитела, маркери убода крпеља, изложеност крпељима

НАУЧНА ОБЛАСТ: БИОЛОГИЈА

УЖА НАУЧНА ОБЛАСТ: ИМУНОБИОЛОГИЈА

УДК БРОЈ: [[[595.42+591.67]:612.313]: 591.111.8]:[616-035:57.087](043.3)

**POTENTIAL OF RECOMBINANT *IXODES RICINUS* (LINNAEUS, 1758) TICK
SALIVA PROTEINS FOR DETECTION OF SPECIFIC ANTIBODIES AS
MARKERS OF TICK BITE**

ABSTRACT

Assessment of exposure to ticks is a significant data in epidemiological studies of tick-borne diseases, and confirmation of tick bite is important for their diagnosis. In this study, three saliva proteins, PA107, AV422 and calreticulin (CAL), of *Ixodes ricinus* tick, medically most important species in Europe, were examined in the context of their use for detection of specific antibodies in sera of hosts, as bite markers. Sequence variability analysis revealed high conservativity of all three proteins, with PA107 as the most conservative. Since CAL is ubiquitous in eukaryotes, the further focus of this study was on PA107 and AV422, as proteins that are specific for ticks. Homologues of these proteins from *Ixodes ricinus* were analyzed for the first time. Reactivity of sera of experimental animals, rats, which were infested separately with *Ixodes ricinus* or *Dermacentor reticulatus* larvae, with recombinant forms of *Ir*PA107 and *Ir*AV422 were examined. Specific antibodies were detected in sera of all infested rats using *rIr*AV422, which implied its usage for detection of bites of tick species that belong to different groups of ixodid ticks, with high sensitivity and specificity. Reactivity with *Ir*PA107 was significantly lower. Hunting dogs, as good sentinels, were used for assessment of *rIr*AV422 usage for detection of markers in sera of hosts which are exposed to ticks in natural environment. Obtained seroreactivity in all dogs implies broad applicability of this saliva protein, in terms of assessment of exposure to different tick species and risk of infection with tick-borne pathogens.

KEY WORDS: saliva proteins, recombinant proteins, antibodies, tick bite markers, exposure to ticks

SCIENTIFIC FIELD: BIOLOGY

SCIENTIFIC SUBFIELD: IMMUNOBIOLOGY

UDK NUMBER: [[[595.42+591.67]:612.313]: 591.111.8]:[616-035:57.087](043.3)

САДРЖАЈ

1 УВОД	1
1.1 КРПЕЉИ	1
1.1.1 Опште карактеристике тврних крпеља	1
1.1.2 Медицински значај тврних крпеља	5
1.1.3 <i>Ixodes ricinus</i> - опште карактеристике и значај у патологији људи и животиња	7
1.2 ПЉУВАЧКА КРПЕЉА И ЊЕН ЗНАЧАЈ У ОДНОСУ КРПЕЉ-ДОМАЋИН.....	10
1.2.1 Улога пљувачке крпеља у узимању крвног оброка	10
1.2.2 Дејство компоненти пљувачке крпеља на хемостатски систем кичмењачког домаћина.....	12
1.2.3 Дејство компоненти пљувачке крпеља на имунски систем кичмењачког домаћина	13
1.2.3.1 Дејство компоненти пљувачке крпеља на урођени имунски одговор домаћина.....	13
1.2.3.2 Дејство компоненти пљувачке крпеља на стечени имунски одговор домаћина.....	15
1.2.4 Улога пљувачке у преношењу патогена	17
1.3 ИМУНСКИ ОДГОВОР ДОМАЋИНА НА УБОД И ХРАЊЕЊЕ КРПЕЉА.....	18
1.4 УПОТРЕБА АНТИТЕЛА СПЕЦИФИЧНИХ ЗА ПРОТЕИНЕ ПЉУВАЧКЕ КРПЕЉА КАО МАРКЕРА УБОДА - ПОТЕНЦИЈАЛНА ПРИМЕНА У КЛИНИЧКОЈ ПРАКСИ И ИСТРАЖИВАЧКИМ СТУДИЈАМА	22
1.4.1 Процена изложености крпељима и ризика од инфекције патогенима које преносе.....	22
1.4.2 Методолошки приступи у процени изложености крпељима	23
1.4.3 Маркери убода крпеља - одабир и могућности	25
2 ЦИЉЕВИ РАДА	28
3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	29
3.1 МАТЕРИЈАЛ	29

3.1.1	Крпељи	29
3.1.2	Експерименталне животиње.....	30
3.1.3	Ловачки пси - домаћини који су изложени повећаном ризику од убода крпеља у природном окружењу	31
3.1.4	Прајмери.....	34
3.1.5	Рестрикциони ензими	34
3.1.6	Плазмидни вектори	34
3.1.7	Бактеријски сојеви.....	35
3.1.8	Антитела.....	35
3.1.9	Китови	35
3.2	МЕТОДЕ	36
3.2.1	Експресија рекомбинантних протеина пљувачке крпеља <i>I. ricinus</i>	36
3.2.1.1	Умножавање кодирајућих секвенци гена за одабране протеине пљувачке крпеља	36
3.2.1.1.1	Дизајнирање прајмера	36
3.2.1.1.2	Изолација укупне РНК	37
3.2.1.1.3	Реверзна транскрипција.....	37
3.2.1.1.4	Реакција ланчаног умножавања ДНК	37
3.2.1.1.5	Пречишћавање умножених секвенци	38
3.2.1.2	Формирање експресионих вектора	38
3.2.1.2.1	Формирање примарних вектора	38
3.2.1.2.2	Секвенцирање и анализа кодирајућих нуклеотидних и одговарајућих аминокиселинских секвенци.....	40
3.2.1.2.3	Дигестија кодирајућих секвенци и експресионог вектора.....	40
3.2.1.2.4	Убацивање кодирајуће секвенце у експресиони вектор	41
3.2.1.3	Експресија рекомбинантних протеина пљувачке крпеља	43
3.2.1.3.1	Трансформација компетентних бактеријских ћелија.....	43
3.2.1.3.2	Експресија.....	43
3.2.1.4	Изолација и пречишћавање рекомбинантних протеина пљувачке крпеља	44
3.2.1.4.1	Процесуирање бактеријске културе.....	44
3.2.1.4.2	Електрофоретска анализа фракција бактеријских лизата	44

3.2.1.4.3 Специфична детекција рекомбинантних протеина Western blot анализом.....	45
3.2.1.4.4 Пречишћавање рекомбинантних протеина	46
3.2.2 Експериментална инфестација лабораторијских животиња ларвама крпеља.....	46
3.2.2.1 Добијање неинфицираних ларви крпеља у лабораторијским условима	46
3.2.2.2 Покретање хуморалног имунског одговора на увод крпеља, добивање одговарајућих серума и прикупљање насисаних ларви	47
3.2.3 Испитивање реактивности серума домаћина са рекомбинантним протеинима пљувачке крпеља <i>I. ricinus</i> - испитивање антигенских карактеристика протеина пљувачке крпеља.....	48
3.2.3.1 Испитивање реактивности серума експерименталних домаћина са екстрактом укупних протеина насисаних ларви.....	48
3.2.3.2 Испитивање реактивности серума експерименталних домаћина са рекомбинантним протеинима пљувачке крпеља <i>I. ricinus</i>	48
3.2.3.3 Одређивање укупног садржаја IgG у серумима пацова.....	49
3.2.3.4 Испитивање реактивности серума ловачких паса са rIrAV422	49
4 РЕЗУЛТАТИ	50
4.1 ЕКСПРЕСИЈА РЕКОМБИНАНТНИХ ПРОТЕИНА ПЉУВАЧКЕ КРПЕЉА <i>I. RICINUS</i>	50
4.1.1 Умножавање кодирајућих секвенци гена за протеине који се експримирају	50
4.1.2 Формирање експресионих вектора.....	52
4.1.2.1 Лигација кодирајућих секвенци у примарни вектор.....	52
4.1.2.2 Анализа кодирајућих нуклеотидних и одговарајућих аминокиселинских секвенци	53
4.1.2.3 Добијање експресионих вектора	58
4.1.2.4 Експресија, изолација и пречишћавање рекомбинантних протеина из лизата бактеријских ћелија.....	60
4.2 ИСПИТИВАЊЕ РЕАКТИВНОСТИ СЕРУМА ДОМАЋИНА СА РЕКОМБИНАНТНИМ ПРОТЕИНИМА ПЉУВАЧКЕ КРПЕЉА <i>I. RICINUS</i>	63
4.2.1 Испитивање реактивности серума експерименталних домаћина са екстрактом укупних протеина насисаних ларви	63

4.2.2	Испитивање реактивности серума експерименталних домаћина са рекомбинантним протеинима плувачке крпеља <i>I. ricinus</i>	64
4.2.3	Одређивање укупног садржаја IgG у серумима пацова.....	66
4.2.4	Испитивање реактивности серума ловачких паса са rIrAV422	67
5	ДИСКУСИЈА	69
6	ЗАКЉУЧЦИ.....	82
7	ЛИТЕРАТУРА	84

1 УВОД

1.1 КРПЕЉИ

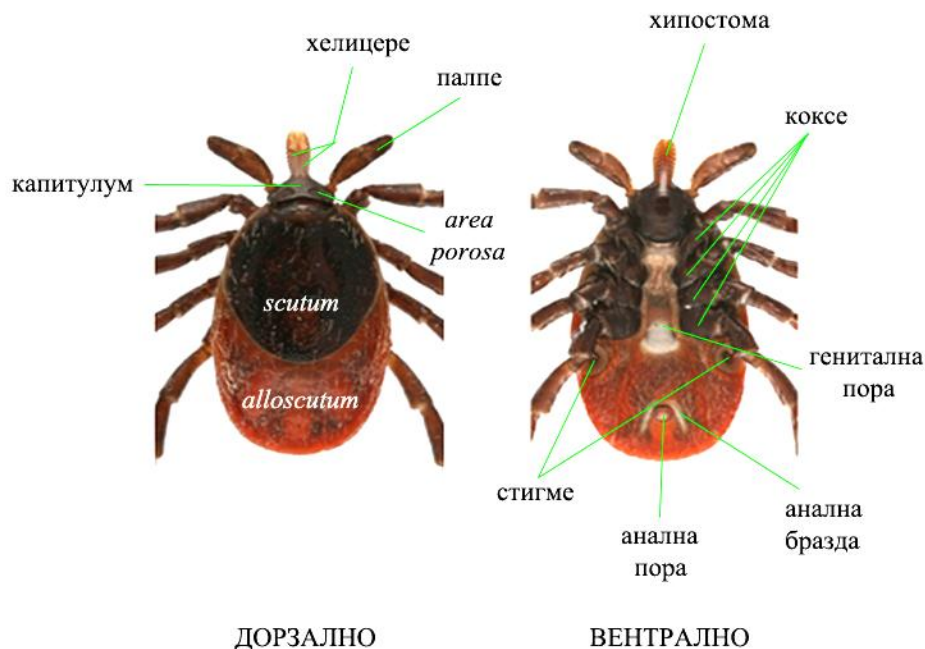
Крпељи (ред Ixodida, надфамилија Ixodoidea) се заједно са свим грињама сврставају у поткласу Acari (Acarina), групу са најразноврснијим и најбројнијим представницима, у оквиру класе Arachnida (Mehlhorn, 2016). Представљају ектопаразите водоземаца, гмизаваца, птица и сисара, којима је неопходан крвни оброк за комплетирање животног циклуса (облигатни хематофаги). Распрострањени су широм света, од поларних региона, преко суптропских до тропских области. Представљају малобројну групу са до сада описаних 896 врста (Guglielmo et al., 2010), које су сврстане у три фамилије: Ixodidae (тврди крпељи), Argasidae (меки крпељи) и Nuttalliellidae (моноспецијска фамилија са јужноафричком врстом *Nuttalliella namaqua*). Подела је извршена на основу разлика у морфолошким карактеристикама, начину исхране и специфичностима животног циклуса. Око 10% описаних врста је битно са аспекта хумане и ветеринарске медицине (Jongejan & Uilenberg, 2004), при чему су тврди крпељи у том смислу далеко значајнији (Gray, 2002). Због тога су само крпељи фамилије Ixodidae обрађивани у даљем тексту.

1.1.1 Опште карактеристике тврдих крпеља

Фамилија тврдих крпеља (Ixodidae) обухвата 683 врсте, које су, на основу разлика у морфолошким карактеристикама и одликама животног циклуса, сврстане у две групе: *prostriata* (род *Ixodes* (Latreille, 1795)) и *metastriata* (родови *Dermacentor* (Koch, 1844), *Boophilus* (Curtice, 1891), *Rhipicephalus* (Koch, 1844), *Haemaphysalis* (Koch, 1844), *Hyalomma* (Koch, 1844) и *Amblyomma* (Koch, 1844)). Хематофагни начин живота је условио развој бројних морфо-анатомских карактеристика, пре свега усних делова и дигестивног тракта, који омогућавају узимање великих количина крви. Тело им је овалног облика, величине од неколико стотина микрона до неколико милиметара (Слика 1). Састоји се од главеног (капитулум, *gnathosoma*) и грудно-абдоминалног региона (*idiosoma*). Антериорно на базу капитулума се наставља централно постављен роstrум и латерално позициониране палпе, грађене од по четири сегмента. Роstrум се састоји од назубљене

хипостоме и две двосегментне хелицере и представља једини део тела крпеља који улази у кожу домаћина.

Током животног циклуса, крпељи пролазе кроз три развојна стадијума - два јувенилна, полно незрела (ларве и нимфе) и репродуктивно способног адулта. Код ларви су присутна три пара екстремитета, док су код нимфи и адулта присутна четири пара. Са вентралне стране су присутне анална пора, позиционирана постериорно и генитална пора, која се налази између кокси. Генитална пора је често видљива код јувенилних стадијума, али је затворена (**Милутиновић и сар.**, 2012). Дисање се одвија трахејама, које спроводе атмосферски кисеоник директно до ћелија и представљају систем кутикулом обложених цевчица, који комуницира са спољашњом средином преко стигматских отвора, парних перфорираних површина смештених венролатерално у нивоу кокси четвртог пара екстремитета. Нервни систем је представљен масом фузионисаних нервних ћелија (синганглион), сета периферних нерава и неуроендокриних органа (**Roma et al.**, 2012). Високо развијеним чулима крпељи детектују различите стимулусе током потраге за домаћином. Они укључују олфакторне и густаторне хеморецепторе, механорецепторе и оне са терморецепторном функцијом. Очи се налазе латерално на предњем делу леђног штита, код врста које их поседују. Екскреција метаболита азота се одвија преко Малпигијевих судова који су повезани са ректалном кесом. Дигестивни тракт је специјализован за узимање великих количина крви током храњења и сегментиран је на букални канал, ждрело, једњак, средње црево и задње (танко) црево. Средње црево (енгл. midgut) се састоји од централно постављене коморе и неколико парова слепих, веома разгранатих тубуларних дивертикулума (цекума), који залазе у све регионе тела, па чак и екстремитете (**Милутиновић и сар.**, 2012).



Слика 1. Грађа тела женке врсте *Ixodes ricinus*, као типске врсте тврдих крпеља (преузето и модификовано према **Malcolm Storey/www.discoverlife.org**)

Код тврдих крпеља је заступљен полни диморфизам (Слика 2). Најмаркантнија разлика је у величини дорзално постављеног хитинског штита (*scutum*), који се налази дуж читаве дужине тела код мужјака, док код женки и јувенилних форми покрива само прву трећину тела. Остатак телесног покривача са дорзалне стране је без присуства штита и растељив је (*alloscutum*). Узимање великих количина крви и многоструко повећање тела током храњења јувенилних форми и женки је омогућено управо одсуством штитића целом дужином тела. Сперматогенеза и оогенеза су условљене храњењем (сем код мужјака рода *Ixodes*), као и пресвлачење код јувенилних форми (**Милутиновић и сар.**, 2012).

Већина тврдих крпеља пролази кроз тродомашински животни циклус, који подразумева да се на сваком развојном стадијуму хране на другом домаћину. Углавном припадају групи егзофилних крпеља и већи део живота (више од 90%) проводе слободни, насељавајући отворена станишта. Потрага за домаћином је сезонски условљена оптималним климатским условима, пре свега влажношћу ваздуха, температуром, и расположивим енергетским резервама (**Parola & Raoult**, 2001). Већина тврдих крпеља тражи домаћина техником заседе (енгл. *questing*), када заузимају карактеристични активан положај на одговарајућим истакнутим деловима вегетације и чекају да домаћин наиђе. За

комплетирање животног циклуса, као и репродукцију код већине родова тврних крпеља неопходно је претходно узимање крвног obroка на кичмењачком домаћину. Пуна крв чини есенцијални део исхране крпеља. Период проведен на домаћину се може поделити на осам фаза: (1) инфестација домаћина, (2) проналазак предилекционог места, тј. одговарајуће регије тела и места на домаћину погодног за убод и храњење, (3) пенетрација, (4) причвршћивање и успостављање ткивне лезије, (5) фаза спорог храњења, (6) фаза брзог храњења, (7) одвајање и (8) напуштање домаћина. Само узимање крвног obroка и процеси који га регулишу се одигравају од пенетрације до краја брзе фазе храњења (фазе 3-6). У контексту препознавања од стране домаћина и евентуалне превенције, најбитније је причвршћивање (фаза 3), тј. механизми и молекули који га омогућавају. Тврди крпељи се хране једном у току сваког стадијума, мада женке које су насилно откачене са домаћина могу у неким случајевима да наставе храњење на новом домаћину. Ларве проводе на домаћину два до четири, нимфе четири до шест, а адулти пет до 15 дана. Време проведено на домаћину зависи од врсте и животног стадијума крпеља, али и од типа домаћина (**Apanaskevich & Oliver, 2014**). Код тродомашинских врста, крпељи се одвајају од домаћина након храњења и напуштају га, док код једно- и дводомашинских врста јувенилни стадијуми остају на истом домаћину током пресвлачења у наредни стадијум и поново се хране на њему. Након парења које се углавном одиграва на домаћину и комплетирања крвног obroка, женке падају са домаћина и на погодном месту на тлу полажу, у просеку, неколико хиљада јаја, у зависности од врсте (**Apanaskevich & Oliver, 2014**) и потом угињавају. Фактори животне средине, пре свега температура, влажност ваздуха и фотопериод, утичу на трајање животног циклуса. Оно може веома да варира, како између врста, тако и у оквиру исте врсте. Периоде неповољних услова средине и одсуства потенцијалних домаћина, крпељи преживљавају уласком у дијапаузу, период успорене или заустављене морфогенезе, која може да настане на било ком развојном стадијуму крпеља, како пре, тако и после узимања крвног obroка.

Станишта тврних крпеља обухватају шумовита и травната подручја. Распрострањење различитих врста је условљено присуством оптималних услова у животној средини, од којих су најзначајнији температура, влажност ваздуха и присуство адекватних домаћина. У фауни тврних крпеља Србије, забележено је присуство врста

класификованих у пет родова: *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis* и *Hyalomma* (Милутиновић и сар., 2012).

1.1.2 Медицински значај тврдих крпеља

Медицински значај крпеља је двојак. Директни утицај се огледа у локалним и системским последицама које узрокују сам убод и храњење крпеља. Локалне последице се манифестују оштећењима на кожи на месту убода, у виду деструкције ткива проузрокованом усним деловима крпеља и локалном инфламаторном реакцијом. То је посебно изражено код убода крпеља са робустним усним апаратом, попут оних из родова *Amblyomma* и *Hyalomma*. Хистопатолошки налази коже показују да крпељи иницијално хипостомом пробијају кожу до дубљих слојева, а затим је враћају назад, повлачећи ка епидермису дубље постављене делове ткива. У системске последице се убрајају губитак крви, који код масовних инфестација може да доведе до акутне анемије, затим парализа (нпр. она коју изазива холоциклотоксин из аустралијског крпеља *I. holocyclus*), токсикоза (нпр. болест знојења код стоке коју проузрокује афричка врста *Hu. truncatum*) и имуносупресија, које су изазване активним компонентама убризганим преко пљувачке крпеља. С обзиром да је у инфестације код људи укључена најчешће једна или неколико јединки, директни штетни ефекти убода и храњења крпеља су мање изражени него код животиња, код којих инфестације могу бити далеко масовније. На њима може да паразитира неколико стотина, или чак хиљада крпеља, због чега масовне инфестације крпељима представљају озбиљан проблем у ветеринарској пракси (Милутиновић и сар., 2012).

Индиректни утицај убода и храњења крпеља се огледа у преносу (трансмисији) узрочника обољења људи и животиња, тј. у векторској улози крпеља. Вектори су организми који сами по себи не изазивају обољење, али доприносе његовом ширењу преношењем патогена са једног домаћина на другог. У контексту медицинског значаја, крпељи су далеко значајнији као вектори изазивача обољења, него по директном утицају који изазивају њихов убод и храњење. Они представљају најзначајнију групу зглавкара са аспекта преноса патогена са једне врсте животиња на другу (Balashov, 1972) и као вектора патогена стоке у свету (de la Fuente et al., 2007). Други су по значају као вектори хуманих патогена, одмах после комараца (Raoult & Parola, 2007; Beugnet & Marie, 2009). По

спектру различитих узрочника обољења које преносе (вируси, бактерије, протозое) истичу се више него било која друга група хематофагних зглавкара (**Dennis & Piesman, 2005**). **Estrada-Peña & Jongejan** (1999) наводе више од 20 врста тврдих крпеља које паразитирају на човеку. Крпељи се међусобно разликују по спектру патогена које преносе.

Болести узроковане РНК вирусима које преносе крпељи, представљају значајне медицинске проблеме у подручјима у којима се јављају. Вирусе из фамилије *Flaviviridae*, вирус крпељског енцефалитиса (енгл. Tick-Borne Encephalitis Virus, TBEV) и вирус шкотског енцефалитиса оваца (енгл. Louping Ill Virus, LIV) преносе крпељи *I. ricinus* (TBEV, LIV) и *I. persulcatus* (TBEV) у Европи и Азији. Вирус Кримске-Конго хеморагичне грознице (енгл. Crimean-Congo Haemorrhagic Fever, CCHF) из фамилије *Bunyaviridae* је распрострањен широм Африке, преко Блиског Истока све до централне и југозападне Азије, а констатован је и у појединим деловима Европе. За одржавање ензоотског жаришта циркулације овог вируса су одговорни крпељи из родова *Haemaphysalis*, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Hyalomma* и *Rhipicephalus*. По високом морталитету се издвајају кијасанурска шумска грозница (енгл. Kyasanur Forest Disease, KFD), која се јавља у јужној Азији и чије узрочнике преносе крпељи из рода *Haemaphysalis* (**Mourya et al., 2016**) и крпељска грозница Колорада (енгл. Colorado Tick Fever, CTF), која се јавља на Средњем западу Северне Америке и чије узрочнике преноси крпељ *D. andersoni* (**Florio et al., 1950**).

Лајмска борелиоза представља најзначајнију болест чије узрочнике преносе крпељи на северној хемисфери, коју изазивају спирохете *Borrelia burgdorferi sensu lato* комплекса. Вектори ових бактерија су крпељи рода *Ixodes*. Међу најзначајнијим бактеријским обољењима су још и хумана гранулоцитна анаплазмоза и туларемија, чији су узрочници *Anaplasma phagocytophilum* (вектори крпељи *I. ricinus* комплекса) и *Francisella tularensis* (вектори *D. reticulatus* и *I. ricinus*). Од бактеријских узрочника обољења које преносе крпељи других родова, треба споменути оне из рода *Rickettsia*, узрочнике рикецијских болести. На пример, грозницу Стеновитих планина (енгл. Rocky Mountain Spotted Fever), изазива *R. rickettsi* преношена крпељом *D. andersoni*. Q-грозницу (Q-fever) изазива бактерија *Coxiella burnetii*, чији су вектори у Европи крпељи рода *Dermacentor* (**Pluta et al., 2010**).

Бабезије су најзначајнији протозојски узрочници обољења које преносе крпељи. Представљају интраеритроцитне паразите домаћих животиња (говеда, паса), али и људи

широм света и закупљају све већу пажњу као узрочници зооноза у експанзији (**Kjemtrup & Conrad**, 2000). Узрочници хумане бабезиозе су *B. divergens* у Европи и *B. microti* у Северној Америци, а преносе их крпељи рода *Ixodes*.

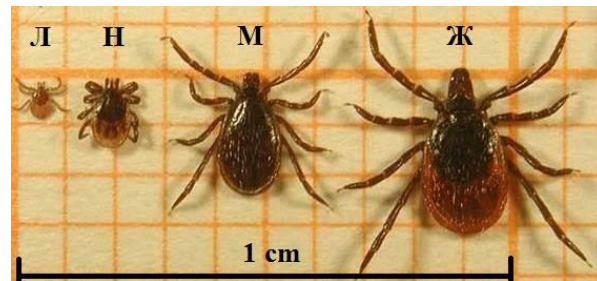
Поред омогућавања успешне трансмисије патогена, као механички или биолошки преносиоци, крпељи представљају и њихове резервоаре. У крпељима се преносе трансстадијално (патогени су присутни у крпељу током његовог развоја из једног животног стадијума у други) и трансваријално, што доприноси њиховом ензоотском одржавању у природи (**Urquhart et al.**, 1987). Током развоја у крпељима, патогени се умножавају и стичу фенотип битан за каснију инфекцију домаћина (**Singh & Girschick**, 2003). Самим тим је неопходно имати посебан опрез у анализи добијених резултата у студијама патогена које преносе крпељи, у којима се инокулација патогена у циљу инфекције експерименталних животиња врши вештачким путем, тј. шприцем.

Векторском потенцијалу тврних крпеља доприносе њихова специфична биологија и животни циклус. Спектар домаћина на којима се хране је изузетно широк, при чему се током живота хране на више различитих домаћина, с обзиром да је већина тврних крпеља са тродомашинским животним циклусом. Безболан увод и неометано храњење у трајању од неколико дана обезбеђују довољно времена за ефикасну трансмисију патогена. С обзиром да се дигестија крвног obroка одвија интрацелуларно (**Hynes**, 2014), одсуство изложености патогена дигестивним ензимима фаворизује њихов опстанак у цреву крпеља, што објашњава способност крпеља да преносе већи број патогена него друге групе зглавкара.

1.1.3 *Ixodes ricinus* - опште карактеристике и значај у патологији људи и животиња

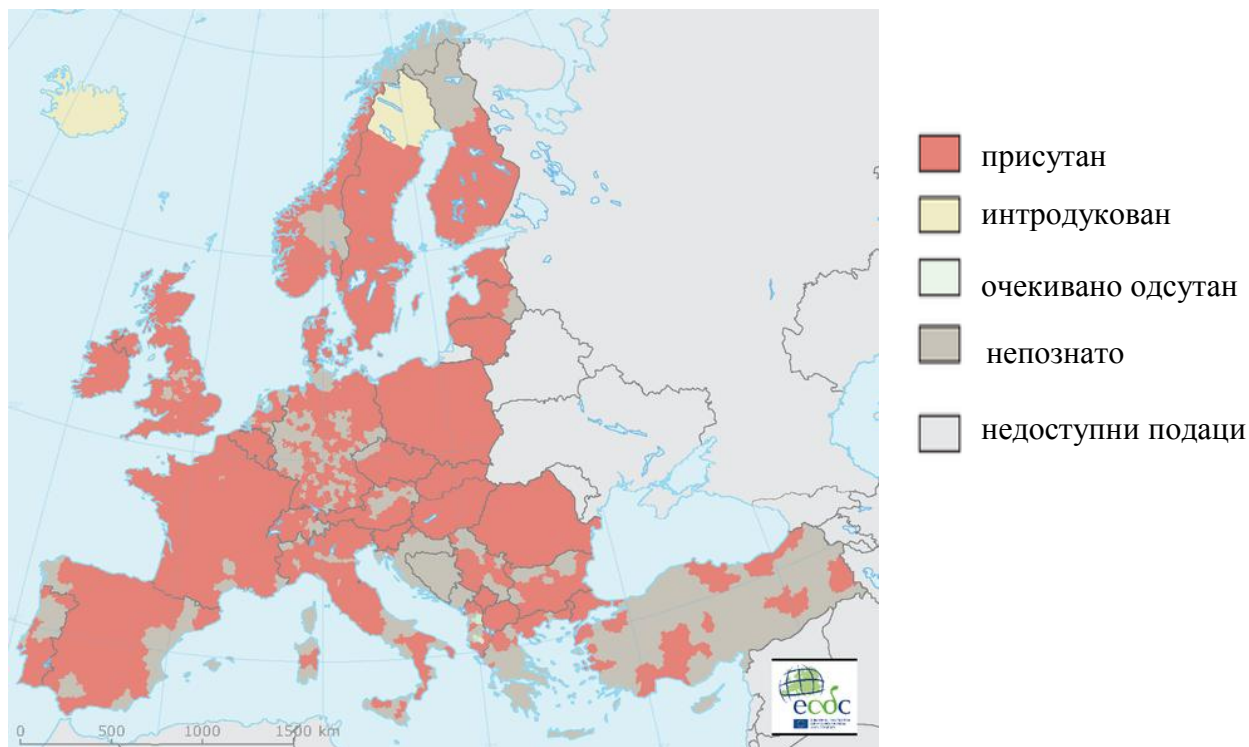
Најраспрострањенија и најбројнија врста крпеља у Европи је *I. ricinus* (Слика 2). Представља типску врсту рода *Ixodes* и групе *prostriata*. Битне таксономске карактеристике ове врсте јесу изглед тарзуса првог пара ногу, који се постепено сужава према врху и добро развијен унутрашњи трн кокси првог пара екстремитета. Код женки су такође битни приликом детерминације врсте и облик гениталне поре и *area porosae*, чулних структура на дорзалној страни базе капитулума, које имају значајну улогу приликом парења. Полни диморфизам је изражен, при чему су мужјаци мањих димензија, тамно браон до црне боје, док женке карактерише *alloscutum* светлије боје (**Милутиновић**

и сар., 2012). Тродомаћинска је врста крпеља, са веома широким спектром животиња на којима се храни. Ларве и нимфе се најчешће хране на ситнијим глодарима, бубоједима и гуштерима, а адулти на домаћим и дивљим сисарима (мачка, пас, овца, говече, јелен,...), као и птицама. Нимфе и адулти ове врсте често паразитирају на човеку.



Слика 2. Развојни стадијуми *Ixodes ricinus*. Л - ларва, Н - нимфа, М, Ж - адулти, мужјак и женка (преузето и модификовано према <https://www.lymeneteurope.org/info/ticks>)

Ареал ове врсте је готово континуиран на простору читаве Европе (Слика 3). Насељавају станишта различитих типова, од травнатих терена, преко листопадних и четинарских шума, до оних која су под изразитим антропогеним утицајем, попут излетишта и паркова. Последњих година је забележено убрзано ширење ове врсте, како на нова географска подручја, тако и на више надморске висине, што је последица утицаја различитих климатских и еколошких фактора (Medlock et al., 2013).



Слика 3. Ареал *Ixodes ricinus* у Европи (према

<https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/vector-borne-diseases-2/assessment>)

Примећена су два максимума у бројности популација ове врсте крпеља, у пролеће и у јесен, што указује на појаву две генерације у току једне године. Животни циклус траје од шест месеци до више од четири године, у зависности од еколошких услова, првенствено температуре. У умереном климату, животни циклус *I. ricinus* траје три године (Милутиновић и сар., 2012).

Ixodes ricinus је компетентан резервоар и вектор великог броја хуманих и анималних патогена. Међу ифективним агенсима које преноси, заступљени су бројни вируси, бактерије и протозое, од којих су многе са зоонотским потенцијалом. Због тога је посебно наглашен медицински значај ове врсте крпеља. Свакако најпознатије бактерије које преносе јесу спирохете *B. burgdorferi* sensu lato комплекса (Rizzoli et al., 2011; Vu Hai et al., 2014), које проузрокују лајмску борелиозу. Поред њих, ова врста крпеља преноси бактерије *A. phagocytophilum*, које узрокују хуману гранулоцитну анаплазмозу (Parola, 2004), *F. tularensis*, која узрокује туларемију (Ellis et al., 2002), као и различите рикеције које узрокују рикециозе (Medlock et al., 2013). Од вируса које преносе, најзначајнији су

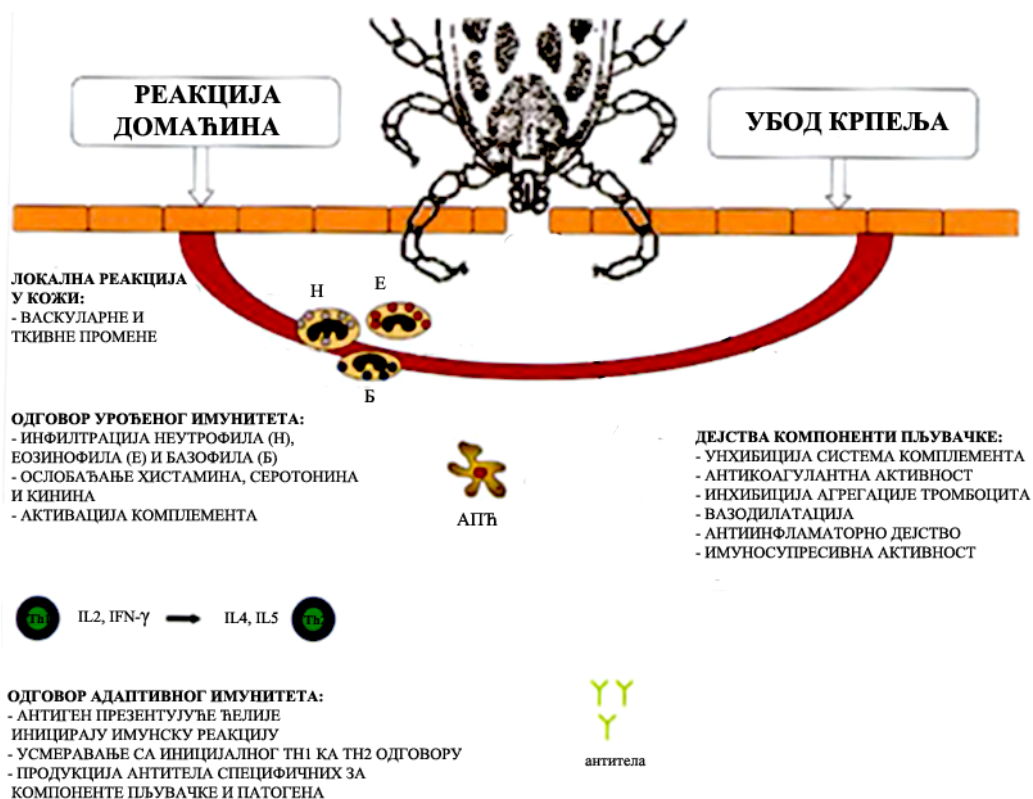
вирус крпељског енцефалитиса (ТБЕV) централноевропског типа и вируса шкотског енцефалитиса оваца (LIV). Међу протозојским патогенима којима ова врста служи као вектор, најзначајнија је *B. divergens* (Hildebrandt et al., 2013; Vu Hai et al., 2014), узрочник хумане бабезиозе у Европи.

1.2 ПЉУВАЧКА КРПЕЉА И ЊЕН ЗНАЧАЈ У ОДНОСУ КРПЕЉ-ДОМАЋИН

Преживљавање, развој и репродукција крпеља су условљени храћењем. Као облигатни хематофаги, крпељи се на свим развојним стадијумима хране крвљу кичмењачких домаћина. Успешно комплетирање крвног obroка обезбеђује пљувачка дејством њених компоненти на одбрамбене механизме домаћина.

1.2.1 Улога пљувачке крпеља у узимању крвног obroка

Током узимања крвног obroка, циклуси ингестије крви и лучења пљувачке крпеља у домаћина се наизменично смењују. Убризгавањем пљувачке на месту убода, у рану на кожи домаћина доспевају разне литичке компоненте које омогућавају одржавање и ширење иницијално формиране ране, као и биоактивни молекули, по природи протеини, липиди и бројне друге непротеинске супстанце, пореклом из пљувачних жлезда и хемолимфе крпеља, које имају вазодилататорно, антихемостатско и имуномодулаторно дејство. Причвршћивање крпеља за домаћина и почетак узимања крвног obroка доводи до активације бројних хемостатских и имунолошких реакција домаћина, које крпељ савладава убризгавањем пљувачке, која садржи бројне биоактивне молекуле, на место убода крпеља (Слика 4).



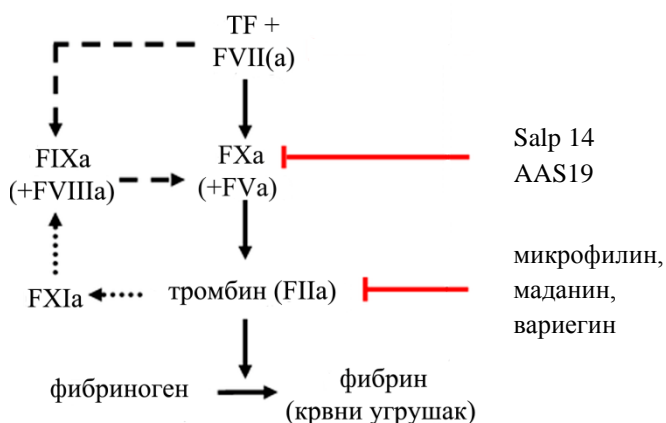
Слика 4. Однос крпељ-домаћин. Компоненте пљувачке крпеља убризгане на месту убода делују на хемостатски и имунски систем домаћина. С друге стране, код домаћина долази до покретања урођеног и стеченог имунског одговора. Преузето и модификовано према **Singh & Girschick (2003)**.

Примена савремених техника анализе транскриптома и протеома крпеља је показала да је састав пљувачке крпеља изузетно комплексан, са стотинама различитих протеина, од којих је већина сасвим нова по структури и функцији. Гени који их кодирају су углавном чланови мултигенских фамилија и диференцијално се експримирају за време храњења. Разлике у експресији гена и саставу пљувачке постоје између и унутар родова крпеља, док су неке фамилије гена конзервирание и код тврдих и код меких крпеља. Варијације у транскриптому пљувачних жлезда представљају адаптацију на физиолошке разлике између различитих домаћина и сталне интеракције између крпеља и домаћина за време храњења (Wikel, 2013). Састав пљувачке крпеља се мења током узимања крвног оброка. Kim et al. (2016) су показали да врста *I. scapularis* током узимања крвног оброка мења састав пљувачке, убризгавајући функционално сличне протеине који се разликују по

антигенским карактеристикама, што је вероватно адаптација на имунски одговор домаћина.

1.2.2 Дејство компоненти пљувачке крпеља на хемостатски систем кичмењачког домаћина

Крпељи на месту убода формирају раницу у којој се сакупља крв из оштећених крвних судова, из које се хране усисавањем крви (енгл. pool-feeders). Повреда на месту убода крпеља и оштећење крвних судова покрећу адхезију циркулишућих тромбоцита на место оштећења зида крвног суда и формирање крвног угрушка. Тромбоцити бивају активирани излагањем колагену у оштећеном субендотелијуму и ослобађају ADP, чиме интензивирају даље привлачење тромбоцита и њихову агрегацију. Процес коагулације се активира спољашњим (колаген) или унутрашњим путевима (ткивни фактори) коагулационе каскаде. Оба пута се сустичу у тачки активације фактора X и конверзије протромбина у тромбин. Активирани тромбин сече протеин плазме фибриноген, генеришући фрагменте који агрегацијом формирају фибрински угрушак (Stubbs & Bode, 1995).



Слика 5. Инхибиција коагулационе каскаде протеинима пљувачке крпеља.

TF - ткивни фактор субендотелијума; FVIIa, FXa, FVa, FIIa, FXIa, FVIIIa и FIXa - активирани фактори коагулационе каскаде VII, X, V, II, XI, VIII и IX. Инхибиторно дејство протеина пљувачке крпеља је приказано црвеним линијама. Преузето и модификовано према **Hovius et al.** (2008).

За успешно храњење крпеља, неопходно је да крв у формираној раници на месту убода буде у течном стању, за шта су заслужне компоненте пљувачке крпеља које инхибирају коагулацију крви, нагомилавање тромбоцита и вазоконстрикцију. Простагландин I₂ (PGI₂), изолован из пљувачке више врста крпеља, је битан инхибитор агрегације тромбоцита и хидролизе ADP (**Radomski et al.**, 1987). Већина антикоагуланаса крпеља (Salp14, AAS19) циљано делује на фактор згрушавања крви FXa, који представља активирани облик фактора X, или тромбин (микрофилин, маданин, вариегин), као финалне елементе у коагулационој каскади (**Hovius et al.**, 2008) (Слика 5). Идентификоване су и компоненте пљувачке крпеља које имају способност да инхибирају и по неколико ензима у коагулационој каскади (**Mulenga et al.**, 2013; **Ibelli et al.**, 2014; **Kim et al.**, 2015). Интересантан је инхибитор серинских протеаза из пљувачке врсте *A. americanum* означен као AAS19, који инхибира тромбин и факторе Xa и XIa, а инхибиторни ефекат овог протеина се вишеструко повећава у интеракцији са хепаран сулфатом који је присутан у ванћелијском матриксу на месту убода (**Radulović & Mulenga**, 2017). Компоненте пљувачке остварују и вазодилаторни ефекат активацијом синтезе cAMP и cGMP, који опуштају глатку мускулатуру крвних судова повећавајући тако проток крви (**Valenzuela**, 2004). Липидни вазодилатори, простагландини и простациклини су идентификовани у пљувачки неколико врста тврдих крпеља, а посебан вазодилаторни ефекат обезбеђују високи нивои простагландина E₂ и I₂ (**Sauer et al.**, 2000).

1.2.3 Дејство компоненти пљувачке крпеља на имунски систем кичмењачког домаћина

Храњење крпеља на кичмењачком домаћину покреће развој урођеног и стеченог имунског одговора. Међутим, компоненте пљувачке крпеља делују инхибиторно и модулаторно на ћелије и молекуле оба типа одговора, у циљу комплетирања крвног оброка.

1.2.3.1 Дејство компоненти пљувачке крпеља на урођени имунски одговор домаћина

У одговор урођеног имунског система домаћина на локално изазвано оштећење коже су укључени: систем комплемента, протеини акутне фазе, неутрофили, макрофаги,

маст ћелије, базофили, еозинофили, дендритске ћелије и урођеноубилачке (енгл. Natural Killer, NK) ћелије. Компоненте комплемента, простагландини, леукотријени, хемокини и цитокини, доприносе регрутовању проинфламаторних ћелија на место оштећења. С друге стране, пљувачка крпеља испољава антиинфламаторно дејство. Оваква улога пљувачке је веома важна, посебно за тврде крпеље који се хране на својим домаћинима по неколико дана. Протеини којима крпељи остварују овакво дејство укључују хемокин-везујуће протеине, евазине, хистамин-везујуће протеине, кининазе и инхибиторе протеаза (**Hovius**, 2009). Деловањем на цитокине домаћина се такође може спречити инфламаторна реакција. Прва истраживања дејства пљувачке крпеља на компоненте имунског система су укључивала испитивање дејства екстракта пљувачних жлезда (енгл. Salivary Gland Extract, SGE). Утврђено је да SGE крпеља *A. variegatum* редукује ниво хемокина CXCL8 (IL-8) који је главни хемоатрактант неутрофила, што доводи до инхибиције хемотаксе неутрофила на место инфламације (**Hajnická et al.**, 2001). Пљувачка многих крпеља показује инхибиторно дејство према овом хемокину, али садржи и разне друге инхибиторе хемокина, као што су CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP1 α) и CCL11 (еотаксин), који доводе до хемотаксе појединих група ћелија урођеног имунског одговора (моноцита, макрофага, и еозинофила), као и инхибиторе хемокина CCL5 (RANTES), који је неспецифични хемоатрактант бројних ћелија имунског одговора (Т-лимфоцита, моноцита, макрофага, еозинофила, базофила). Salp25D је амин-везујући протеин, изолован из крпеља *I. scapularis*, који интерагује са инфламаторним и вазоактивним аминима продукованим у процесу инфламације (**Das et al.**, 2001). Овај протеин показује висок ниво хомологије са глутатион-пероксидазама бескичмењака и кичмењака, чија је улога у спречавању негативних ефеката реактивних врста кисеоника. Рекомбинантна форма овог протеина катализује редукцију водоник-пероксида под одређеним условима. Salp25D својим дејством спречава привлачење неутрофила на место убода (**Ullmann-Moore**, 2011). Iris, протеин пљувачке *I. ricinus*, инхибира продукцију IFN γ и NO у макрофагима (**Hovius**, 2009). Пљувачка крпеља садржи и молекуле који су инхибитори система комплемента, као што су Isac (енгл. *I. scapularis* AntiComplement), IRAK (енгл. zymosan-mediated interleukin-1 Receptor Associated Kinase), Salp15 и Salp20 (**Valenzuela et al.**, 2000).

Један од начина да крпељи избегну имунски одговор домаћина је преко протеина пљувачке који имитирају протеине домаћина. Тако, пљувачне жлезде крпеља *A.*

americanum продукују MIF (енгл. Macrophage migration Inhibitory Factor), који је присутан у пљувачним жлездама женки пре храњења и три дана након храњења. MIF крпеља показује бројна дејства, на пример, инхибира миграцију макрофага, а делује инхибиторно и на NK ћелије (**Brossard & Wikel, 2004; Kazimirova, 2008**).

1.2.3.2 Дејство компоненти пљувачке крпеља на стечени имунски одговор домаћина

Пљувачка крпеља испољава комплексне инхибиторне ефекте на функцију дендритских ћелија, које су важна веза између урођеног и стеченог имунског одговора. Интрадермалном администрацијом пљувачке крпеља *I. ricinus* C57BL/6 мишевима, показано је да пљувачка инхибира сазревање и рану миграцију Лангерхансових ћелија из коже у дренирајуће лимфне чворове након примене инфламаторног стимулуса. Такође, смањује капацитет дендритских ћелија у дренирајућим лимфним чворовима да презентују солубилне антигене специфичним Т ћелијама и индукују поларизацију ка Th1 ћелијама и доводи до снажног покретања развоја Th2 ефекторских ћелија (**Skallova et al., 2008**). Како су дендритске ћелије кључне за развој стеченог имунског одговора, промена њихове функције може да представља важан механизам којим крпељи нарушавају адекватан имунски одговор домаћина. Диференцијација CD4⁺ Т ћелија индукована пљувачком крпеља у Th2 субсет, на супрот Th1, даје предност крпељу у преживљавању, због антиинфламаторног ефекта Th2 цитокина (**Kazimírová & Štibrániová, 2013; Wikel, 2013**). Инфламација на кожи домаћина посредована Th1 ћелијама би повећала ризик од уклањања крпеља за време храњења. Такође, развој реакције касне преосетљивости на месту убода и причвршћивања крпеља, која може довести до смрти или смањене вијабилности крпеља, је посредована Th1 одговором.

Модулација стеченог имунског одговора домаћина након убода крпеља настаје како услед утицаја пљувачке на дендритске ћелије и друге антиген-презентујуће ћелије, тако и директним утицајем компоненти пљувачке на Б- и Т-лимфоците и солубилне компоненте имунског одговора.

Разне врсте крпеља супримирају, *in vitro*, пролиферацију лимфоцита индуковану митогенима Б- и Т-лимфоцита (**Kazimirova, 2008**). Крпељи утичу на цитокине Т-ћелија, доводе до поларизације ка Th2 одговору, што је праћено смањеном синтезом Th1 цитокина (IL-2, IFN γ). Идентификовани су бројни протеини пљувачке који инхибирају

пролиферацију Т-ћелија, попут протеина молекуларске масе 36 kDa присутног у пљувачки крпеља *D. andersoni*. Iris, протеин пљувачке *I. ricinus*, супримира пролиферацију Т ћелија, индукује Th2 одговор и инхибира продукцију проинфламаторних цитокина IL-6 и TNF- α (Gillespie et al., 2001; Leboulle et al., 2002; Rolníkova et al., 2003). Salp15, протеин изолован из пљувачке крпеља *I. scapularis*, инхибира активацију Т-ћелија везивањем за CD4, што доводи до инхибиције сигнализације са Т-ћелијског рецептора. То за последицу има спречавање пролиферације Т-ћелија и смањену продукцију IL-2 (Garg et al., 2006; Ashish et al., 2008). SGE *I. ricinus* показује инхибиторни ефекат на Th1 и стимулаторни на продукцију Th2 профила цитокина (Kovar et al., 2001). У пљувачки крпеља *I. scapularis* је идентификован IL-2-везујући протеин, први са таквом функцијом детектован код паразита или патогена сисара (Gillespie et al., 2001; Kazimirova, 2008). Својим дејством овај протеин супримира пролиферацију Т-ћелија и активност других ефекторских ћелија имунског система на које IL-2 делује стимулаторно. Rolníkova et al. (2002) су показали да постоје разлике у ефектима антигена пљувачних жлезда крпеља на пролиферацију хуманих лимфоцита у односу на врсту и пол крпеља, као и да одговор лимфоцита претходно изложених SGE на митогене зависи од статуса храњења крпеља (Rolníkova et al., 2003).

Крпељи супримирају хуморални имунски одговор домаћина на више начина. Могу деловати директно на Б-ћелије инхибиторним протеинима. До сада су описани VIP (енгл. B-cell Inhibitory Protein), који је идентификован код крпеља *I. ricinus* и BIF (енгл. B-cell Inhibitory Factor), карактеристичан за *Hu. asiaticum asiaticum*. Имуносупресију домаћина карактерише смањена продукција примарних антитела (Kazimirova, 2008). Супресија реактивности Th1 ћелија од стране крпеља може да инхибира експанзију специфичних Т-ћелијских клонова и тиме диференцијацију Б-ћелија, чиме је продукција опсонизујућих и комплемент-везујућих антитела ограничена (Romagnani, 2000; Rolníkova et al., 2003). С друге стране, Th2 ћелије покрећу снажан хуморални одговор, а регулишу и синтезу антитела IgE класе, тј. појаву алергијских реакција. Како женке тврдих крпеља за време храњења могу повећати своју телесну масу и до сто пута због обилног крвног obroка, значајан део IgG и других протеина плазме домаћина доспева кроз црево крпеља у хемолимфу. IgG антитела домаћина у хемолимфи крпеља задржавају своју биолошку активност и могу се детектовати специфична антитела везана за унутрашње органе крпеља

(нпр. пљувачне жлезде и оваријуме). Крпељи су, са друге стране, развили софистициране механизме избегавања њиховог дејства. Показано је да долази до екскреције IgG преко пљувачке током храњења и да су за ову специфичну екскрецију одговорни IgG-везујући протеини у пљувачним жлездама и хемолимфи крпеља (**Wang & Nutall, 1994; Brossard & Wikel, 2004**). Насупрот IgG везујућим протеинима, протеини који везују IgE нису описани код крпеља (**Francischetti et al., 2009**).

1.2.4 Улога пљувачке у преношењу патогена

Поред модулације имунског одговора у контексту омогућавања храњења крпеља, пљувачка има кључну улогу и у преношењу патогена на кичмењачког домаћина. Патогени су еволиурани у контексту коришћења функција пљувачке за сопствену трансмисију, повећавајући тако значај крпеља као вектора (**Wikel, 1999**). Током храњења, крвни оброк се концентрише екскрецијом воде назад у домаћина функцијом типа I ацинуса пљувачних жлезда, што представља битан механизам којим се патоген преноси из крпеља у домаћина (**Sauer et al., 2000**). Трансмисија патогена потпомогнута пљувачком крпеља (енгл. Salivary Assisted Transmission, SAT) подразумева ослањање патогена које преносе крпељи на модулацију и супресију имунског одговора домаћина локално на месту убода (**Nutall & Jones, 1991; Nutall & Labuda, 2008**). Компонентама пљувачке, крпељ успоставља средину погодну за развој и одржавање патогених микроорганизама, мењајући имунске карактеристике како на месту убода, тако и у лимфном чвору који дренира дату област. Патогени лакше успостављају инфекцију у тако имуносупримираној средини и лакше се адаптирају на новог домаћина, пре него што започне дисеминација у друга ткива и органе.

Неки патогени, попут бактерије *B. burgdorferi*, користе протеине пљувачке и за колонизацију крпеља и за опстајање унутар вектора, поред трансмисије на кичмењачког домаћина (**Kung et al., 2013**). Доказано је да пљувачка крпеља омогућава и појачава инфекцију вирусима. Кинетика вирусне трансмисије је веома брза и модулација имунског одговора домаћина започиње одмах по причвршћивању крпеља и отпочињању храњења. Патогени се разликују у времену отпочињања трансмисије од тренутка убода и почетка храњења. Адекватна трансмисија, као и њена благовремена припрема, се ослањају на временски зависну промену протеинског састава пљувачке (**Heinze et al., 2012a**).

1.3 ИМУНСКИ ОДГОВОР ДОМАЋИНА НА УБОД И ХРАЊЕЊЕ КРПЕЉА

Убод и храњење крпеља активирају урођени и стечени имунски одговор домаћина, локално и системски, чији ток зависи од врсте крпеља и врсте домаћина. Компоненте имунског система бивају активирани оштећењем ткива на месту убода, као и убризганим молекулима као саставним компонентама плувачке. Састав плувачке крпеља се мења током процеса храњења, што утиче на заштитне механизме домаћина (**Balashov**, 1994; **Wikel**, 2013).

Тврди крпељи се до комплетног засићења хране на домаћину од неколико до 15 дана, у зависности од развојног стадијума. Примећена је приближна једнакост у броју дана између периода неопходног да тврди крпељи комплетирају крвни оброк и периода потребног да их домаћин препозна и покрене иницијални одговор. Да би били ефикасни, крпељи су морали да ускладе процес храњења са развојем имунског одговора домаћина.

Trager (1939) је први приметио да поновљене инфестације крпељима доводе до развоја отпорности домаћина на њихов убод и храњење. Стечена отпорност изазвана честим контактом домаћина са крпељима се огледа у смањеној маси насисаних крпеља, продуженом времену потребном за комплетирање крвног obroка, смањењу броја положених и вијабилних јаја, тј. редукованом фекундитету, немогућности пресвлачења у наредни стадијум и смрти насисаних крпеља (**Trager**, 1939; **Willadsen**, 1980; **Wikel**, 1996a). У имунски одговор на убод крпеља су укључене многе компоненте имунског система, попут неутрофила, базофила, еозинофила, маст ћелија, Лангерхансових ћелија, Б- и Т-ћелија, макрофага, цитокина, антитела, система комплемента и бројних других биоактивних молекула (**Wikel**, 1996b; **Brossard & Wikel**, 1997).

На месту убода у кожи домаћина се најпре развија инфламаторна реакција (**Allen**, 1973; **Brossard & Fivaz**, 1982). У кожи се поред основних градивних ћелија налазе и резидентне ћелије имунског система, попут маст и Лангерхансових ћелија, макрофага и малог броја лимфоцита. Кератиноцити, фибробласти, дендритске ћелије и мастоцити су прве ћелије које реагују на озледу коже или антигену стимулацију, тако што брзо ослобађају *de novo* синтетисане или преформирани проинфламаторне молекуле и молекуле који учествују у хемотакси, укључујући хистамин и еикозаноиде (**Heinze et al.**, 2012a). У ћелијском инфилтрату на месту убода могу се наћи базофили, еозинофили и неутрофили,

који учествују у инфламаторној реакцији. Мада се дуго сматрало да је рани одговор домаћина на увод крпеља минималан услед способности инхибиције скоро сваког аспекта накупљања ћелија од стране компоненти пљувачке крпеља (**Heinze et al.**, 2012б), новија истраживања су показала да се ране проинфламаторне промене јављају већ у прва 3 сата након инфестације BALB/c мишева нимфама крпеља *I. scapularis* (**Heinze et al.**, 2012а). У првом и трећем сату након инфестације долази до модулације експресије проинфламаторних гена, а до шестог сата се повећава и експресија гена чији су продукти повезани са одговором на микроорганизме, регулацијом нивоа продукције реактивних врста кисеоника, зарастањем рана, сигналом трансдукцијом путем G-протеина и MAPK и последичном активацијом транскрипционих фактора AP-1 и NFκB. У дванаестом часу након инфестације, храњење крпеља индукује експресију хемокина специфичних за накупљање неутрофила (CXCL8, тј. IL-8) и моноцита (CCL2) (**Heinze et al.**, 2012а; **Wikel**, 2013). Хистопатолошке анализе и анализе генске експресије применом биочипова указују на дегранулацију мастоцита 1 сат након инфестације и интензивнији прилив неутрофила у трећем сату након инфестације. Изражен је проинфламаторни локални одговор у кожи, уз наглашену улогу неутрофила, који се интензивира како храњење одмиче, поготову око шестог сата након инфестације. Већ око дванаестог сата ствара се изразита инфламаторна лезија узрокована дејством неутрофила. Она се карактерише променама попут миозитиса, некрозе мишића и интензивне конгестије крвних судова близу хипостоме (**Heinze et al.**, 2012а). Око усних делова крпеља може да се развије апсцес испуњен течномшћу и дегранулисаним базофилима и еозинофилима.

Имунски одговор покренут убодом и храњењем крпеља представља комбинацију ћелијског и хуморалног имунитета. Важне регулаторне и ефекторске компоненте имуности на увод крпеља представљају Т-ћелије (**Singh & Girschick**, 2003). Активација Т-ћелија, специфичних за компоненте пљувачке, покреће миграцију базофила, неутрофила и еозинофила на место убода (**Allen**, 1973; **Brown & Askenase**, 1983). Ослобађају се ћелијски медијатори који утичу на одбацивање крпеља, као што су серотонин, хепарин, кинини, простагландини и хистамин (**Galbe & Oliver**, 1992). Код домаћина који су инфицирани крпељима стварају се антитела специфична за протеине крпеља која могу да се вежу за Fc рецепторе на базофилима, што омогућава ослобађање разних биолошки активних молекула из ових ћелија након стварања комплекса антитела везаних за Fc

рецепторе са имуногенима крпеља. На пример, хистамин који ослобађају базофили инхибира саливацију и храњење крпеља. Миграција базофила на место убода и њихова активација су познати као кожна базофилна хиперсензитивност, форма реакције касне преосетљивости која је посредована Th1 лимфоцитима (**Singh & Girschick, 2003**). Запажено је да је ова реакција код људи важна, јер је одговор на упорни свраб изазван присуством крпеља повезан са смањењем могућности обољевања од лајмске болести. Наиме, примећено је да се код особа које развијају реакцију преосетљивости на убуд крпеља *I. scapularis* ређе развија лајмска болест, у односу на оне који немају имунску реакцију (**Burke et al., 2005**). Неке компоненте пљувачке крпеља стимулишу антиген-специфичну пролиферацију лимфоцита. У инфилтрату на месту убода су присутније CD4+ Т-ћелије у односу на CD8+ Т-ћелије (**Singh & Girschick, 2003**).

Th1 одговор кога карактерише синтеза проинфламаторних цитокина IL-2, IFN γ и TNF- α и реакција касне преосетљивости праћена инфилтрацијом лимфоцита, макрофага, базофила и еозинофила, представља иницијалну реакцију на храњење крпеља (**Wikel, 1996a**). У каснијој фази инфестације крпељима, као последица дејства бројних компоненти пљувачке крпеља, одговор се пребацује на Th2 тип цитокина, IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13 (**Ganapamo et al., 1995; Singh & Girschick, 2003**). Ефекти цитокина Th2 одговора представљају предност у преживљавању крпеља због њиховог антиинфламаторног ефекта, што иде у корист и трансмисији патогена (**Schoeler & Wikel, 2001; Wikel & Alarcon-Chaidez, 2001; Rolníkova et al., 2003**).

Убуд крпеља доводи до активације хуморалног имунског одговора домаћина. У лимфним чворовима који дренирају место инфестације на кожи домаћина, развијају се герминативни центри, што указује на пролиферацију и диференцијацију Б-ћелија. Пасивним трансфером серума животиња на којима су храњени крпељи наивним лабораторијским животињама, показано је учешће хуморалних фактора у имунском одговору на крпеље (**Brossard & Wikel, 2004**). Циркулишућа IgG антитела специфична за антигене пљувачке, индукована храњењем крпеља, детектована су у различитим домаћинима (**Inokuma et al., 2000; Vu Hai et al., 2013**). Код зечева инфестираних *I. ricinus* крпељима се уочава јак хуморални одговор покренут антигенима пљувачке, као и синтеза специфичних антитела IgG и IgE изотипа (**Christe et al., 1998**). Ток хуморалног имунског одговора зависи и од генетске предиспозиције домаћина и од интензитета инфестација

крпељима. Тако, испитивањем обрасца хуморалног одговора након инфестација крпељима *B. microplus* код две расе говеда, отпорних и осетљивих на крпеље, утврђено је да инфестација крпељима супримира продукцију IgG1 и IgG2 поткласа антитела код осетљиве расе, да антитела IgE изотипа не учествују у протективном имунском одговору и да обим инфестација мења профил продукованих антитела код осетљиве расе, тако што се повећава продукција IgG1 код масовнијих инфестација (**Kashino et al.**, 2005).

Протеин пљувачке крпеља који је до сада највише изучаван у контексту покретања хуморалног имунског одговора је калретикулин (CAL) (**Sanders et al.**, 1998; **Alarcon-Chaidez et al.**, 2006; **Vu Hai et al.**, 2013). Постоје подаци и за бројне друге протеине пљувачке: Rs24p (**Inokuma et al.**, 1999, 2000), Hsp70, PDI, Rs (протеин цемента) и TNAP из протеома пљувачке *R. sanguineus*, EF-1 α и MSI из протеома пљувачке *D. reticulatus*, VDAS из протеома пљувачке *R. sanguineus* и *D. reticulatus*, VCP, Trap и Hrp из протеома пљувачке *I. ricinus* (**Vu Hai et al.**, 2013). Примењени есеји су детектовали антитела специфична за ове протеине IgG изотипа.

Чињеница да пљувачка неких крпеља садржи IgG-везујуће протеине, а да протеини који везују имуноглобулине IgE нису детектовани, указује на то да је продукција антитела важан ефекторски механизам на увод крпеља и да је IgG главни изотип у хуморалном имунском одговору (**Francischetti et al.**, 2009). Поларизација Th ћелија услед убода крпеља се одражава и на продукцију антитела, у погледу интензитета имунског одговора и у погледу изотипа синтетисаних антитела, чиме је одређена и њихова ефекторска функција. Th2 ћелије секретују IL-4, који усмерава продукцију антитела ка IgG1 и IgE код мишева, односно IgG4 и IgE код људи. IFN- γ , цитокин Th1 одговора, стимулише експресију IgG2a антитела код мишева (**Christe et al.**, 1998; **Abbas et al.**, 2016).

Крпељи са патогенима које преносе и кичмењачким домаћинима на којима се хране, формирају уравнотежен систем настао дуготрајним коеволуционим процесима (**Jongejan & Uilenberg**, 2004). Ове кооплексне интеракције представљају баланс/дисбаланс између одбрамбених механизма домаћина усмерених на паразите и стратегије крпеља која омогућава успешно храњење и трансмисију патогена. Потенцијални домаћини се грубо могу поделити у две групе: компетентне и некомпетентне, који развијају различит одбрамбени одговор на увод крпеља. Код компетентних домаћина, храњење одређене врсте крпеља не индукује имунски одговор

или је он слабог интензитета и долази до инхибиције инфламаторних процеса, што омогућава крпељу комплетирање крвног оброка (Ullmann-Moore et al., 2011). Код некомпетентних домаћина увод и храњење крпеља изазивају алергијске реакције и имунски одговор, што води последичном смањењу степена насисаности крпеља (Ribeiro, 1989).

1.4 УПОТРЕБА АНТИТЕЛА СПЕЦИФИЧНИХ ЗА ПРОТЕИНЕ ПЉУВАЧКЕ КРПЕЉА КАО МАРКЕРА УБОДА - ПОТЕНЦИЈАЛНА ПРИМЕНА У КЛИНИЧКОЈ ПРАКСИ И ИСТРАЖИВАЧКИМ СТУДИЈАМА

Изложеност крпељима представља показатељ ризика од инфекције патогенима које они преносе. Услед тога се јавља потреба за развојем стандардних и поузданих метода којима би се она процењивала, а детекција антитела специфичних за протеине пљувачке као маркера убода се намеће као приступ који испуњава поменуте критеријуме.

1.4.1 Процена изложености крпељима и ризика од инфекције патогенима које преносе

Клиничке манифестације већине болести чије узрочнике преносе крпељи нису специфичне и сличне су грипу. Дијагноза може бити отежана, а у случају коинфекције (крпељ инфициран са два или више патогена), клиничка слика пацијента се додатно компликује. У пракси, информација о убуду крпеља као анамнестички податак често недостаје, што додатно отежава диференцијалну дијагностику код људи (Briant & Marshall, 2000). Један од разлога зашто увод крпеља пролази неопажено, јесте услед анестетичког дејства пљувачке (Francischetti et al., 2009). Притом, предоминантни стадијум *I. ricinus* који се храни на људима јесу нимфе (Wilhelmsson et al., 2013), које је тешко приметити због малих димензија.

Појављивање нових болести чије узрочнике преносе крпељи на неком подручју и поновно јављање старих, представљају изазове здравственим системима на свим континентима (Socolovschi et al., 2009; Hubalek & Rudolf, 2012; Oteo & Portillo, 2012). Експанзија болести је условљена дистрибуцијом крпеља као вектора и њихових домаћина

као резервоара узрочника обољења (**Korch**, 1994). У Европи је забележена промена дистрибуције неколико врста крпеља, како у смислу да шире свој ареал на нове типове станишта, тако и да заузимају станишта на вишим надморским висинама (**Danielova et al.**, 2006; **Szell et al.**, 2006; **Földvári et al.**, 2007; **Zygner et al.**, 2009; **Jore et al.**, 2011; **Pérez Vera et al.**, 2014). Сматра се да је то последица климатских промена, које фаворизују њихово ширење. Упоредо са ширењем крпеља, последњих година је забележена и повећана инциденца болести чије узрочнике преносе крпељи у целом свету (**Paddock & Telford**, 2011), што указује на то да је већи део популације људи и животиња изложен убуду крпеља и повећаном ризику од инфекције патогенима које они преносе. Постоји све већа потреба за поузданом проценом ризика од изложености крпељима и инфекције патогенима које они преносе, што је важно како у хуманој, тако и у ветеринарској медицинској пракси (**Parola & Raoult**, 2001; **Fritz**, 2009).

1.4.2 Методолошки приступи у процени изложености крпељима

У циљу процене нивоа изложености крпељима, развијено је неколико метода. Један приступ представља фокусирање на пацијенте, тј. део хумане популације која је у ризику од инфекције. Прикупљање података о инциденти и преваленцији болести чије узрочнике преносе крпељи од стране лекара и здравствених служби, може да пружи увид у епидемиолошку ситуацију на одређеном подручју. Неједнака регулатива обавезе пријављивања ових болести у различитим земљама, неадекватна упућеност здравствених радника на њих и примена различитих дијагностичких тестова представљају недостатке оваквог приступа. Серолошки скрининг шире популације на присуство антитела развијених на патогене које преносе крпељи, може да послужи за процену њихове заступљености на одређеном подручју (**Lledo et al.**, 2004, 2006; **Bazovska et al.**, 2005). Међутим, трошкови таквих студија и одабир адекватне индикаторске популације отежавају њихово извођење.

С обзиром да болести чије узрочнике преносе крпељи испољавају зоонотски карактер, испитивање одговарајућих популација дивљих и домаћих животиња серолошким или молекуларним методама на присуство патогена које преносе крпељи, може да укаже и на ризик по хуману популацију у неком подручју (**Beugnet & Marie**, 2009). Испитивање инфестираности тих животиња крпељима може да пружи информације

о дистрибуцији и бројности крпеља (**Pavlidou et al.**, 2008), што побољшава процену ризика од инфекције патогенима које преносе. Да би овако добијени подаци били поуздани, истраживања треба понављати у одређеним временским интервалима. Разлог за то су промене у стопи инфицираности домаћина, на коју утичу промене у бројности популација крпеља и домаћина изазване евентуалним променама еколошких параметара.

Ризик од убода крпеља и инфекције се може проценити и ентомолошким приступом, тј. прикупљањем ненасисаних крпеља (**Nazzi et al.**, 2010). Детекција патогена у њима обезбеђује информацију који патогени циркулишу у датом подручју. Међутим, с обзиром да бројност популација крпеља варира из сезоне у сезону, неопходно је спроводити сукцесивна истраживања током неколико година. Такође, иако се обезбеђује информација о заступљености, бројности и стопи заражености крпеља, овакав приступ је приметан и захтева знатна финансијска улагања, а резултати су ограничени само на испитивана подручја (**Capelli et al.**, 2012).

Моделовање у епидемиологији болести чије узрочнике преносе крпељи, које би анализирано климатске, географске, и социо-економске сетове података, заједно са подацима везаним за дистрибуцију и бројност популација крпеља и домаћина, може индиректно да предвиди подручја и периоде са повећаним степеном изложености крпељима, те и повећаним ризиком од инфекције патогенима које они преносе. Међутим, предиктивност модела ограничавају фактори укључени у његово креирање и поузданост доступних података током тог процеса.

За поуздану процену изложености одређених популација људи и животиња крпељима, као поуздан метод може да послужи детекција специфичних антитела развијених на протеине пљувачке крпеља у серуму домаћина (**Schwartz et al.**, 1991; **Alarcon-Chaidez et al.**, 2006; **Vu Hai et al.**, 2014). Протеини пљувачке бивају убризгани у домаћина током храњења крпеља, као њене саставне секреторне компоненте. На антигенске детерминанте ових протеина долази до развоја хуморалног имунског одговора (**Francischetti et al.**, 2009). Иако остаје да се истражи тачна улога овако индукованих антитела специфичних за различите антигене, она могу да послуже као поуздани маркери убода крпеља.

1.4.3 Маркери убода крпеља - одабир и могућности

Прва демонстрација употребе маркера убода крпеља, било је указивање на повезаност између нивоа антитела специфичних за екстракте протеина плувачке *I. scapularis* у серумима шумских радника и њихове изложености овој врсти крпеља, од стране **Schwartz et al.** (1990). Међутим, прикупљање плувачке и дисекција плувачних жлезда као извора антигена је захтеван посао који изискује прецизност и време, при чему је принос протеина низак (**Almeras et al.**, 2010; **Fontaine et al.**, 2011). Додатан проблем представља отежана стандардизација добијених протеинских екстраката због разлика у саставу плувачке, које су условљене полом, развојним стадијумом и степеном насисаности. Као софитициранији и практичнији приступ се намеће анализа појединачних протеина плувачке за детекцију специфичних маркера. Проблем који се јавља јесте одабир адекватног протеина.

Постоје два критеријума која тест за детекцију маркера мора да испуни. То су специфичност и сензитивност. Постојање хомологих секвенци између ортологичких протеина плувачке различитих врста хематофагних зглавкара (**Alarcon-Chaidez et al.**, 2006; **Ribeiro et al.**, 2010) отежава одабир специфичног маркера за серолошка испитивања на нивоу рода и/или врсте крпеља, услед унакрсне реактивности (**Wheeler et al.**, 1991; **Trevejo et al.**, 2005). С друге стране, постоје протеини плувачке специфични за крпеље, који нису присутни у другим хематофагним зглавкарима (**Francischetti et al.**, 2009). Недостатак сазнања о овим протеинима на генском и нивоу посттранслационе обраде може да отежа процену њихове поузданости у контексту специфичности.

Адекватним одабиром протеина би се постигла задовољавајућа специфичност и сензитивност серолошких тестова. Један приступ подразумева њихову селекцију поређећи читав транскриптом или протеом плувачних жлезда векторских врста од интереса. Поређење се може извести користећи BLAST опцију у GenBank бази података (**Poinsignon et al.**, 2008) или другим *in silico* методама (**Fontaine et al.**, 2012). Други приступ је базиран на антигенским карактеристикама протеина плувачке, при чему се одабир протеина врши у односу на показану реактивност серума домаћина који је изложен одговарајућој врсти вектора (**Vu Hai et al.**, 2013), или формирањем библиотека у којима су потенцијални антигени плувачке крпеља експримирани на спољашњем делу капсида фага (енгл. phage

display) и доступни су за интеракцију са антителима из серума домаћина у процесу селекције (енгл. biopanning) (**Radulović et al.**, 2014).

Протеини који омогућавају и регулишу узимање крвног оброка су протеини са конзервираним улогама и представљају добре „мете“ за детекцију специфичних маркера. CAL је један од највише изучаваних протеина пљувачке у контексту процене изложености крпељима (**Sanders et al.**, 1998; **Alarcon-Chaidez et al.**, 2006; **Vu Hai et al.**, 2014). Убиквитарно је заступљен код еукариота. Иако је првобитно дефинисан као протеин ендоплазматичног ретикулума који је укључен у регулацију хомеостазе унутарћелијског Ca^{2+} и као молекулски шаперон који помаже успостављању конформације новосинтетисаних протеина, CAL заправо представља мултифункционални протеин, лоциран на различитим местима у ћелији (**Eggleton & Michalak**, 2003; **Xu et al.**, 2005; **Michalak et al.**, 2009). Код различитих врста паразита, CAL се повезује са њиховом способношћу модулације хемостатских процеса и имунског одговора домаћина. Као високо имуногени протеин, индукује протективни одговор домаћина (**Xu et al.**, 2005). Код тврдых крпеља је идентификован у протеому пљувачке, као протеин који доприноси комплетирању крвног оброка и трансмисији патогена, вероватно инхибирајући коагулацију крви и компоненте комплемента (**Jaworski et al.**, 1995; **Kaewhom et al.**, 2008; **Michalak et al.**, 2009). Није детектабилан у пљувачки ненасисаних крпеља, а почиње да се секретује тек трећег дана храњења (**Jaworski et al.**, 1995). Услед веома изражених антигених својстава и извесног степена хомологије између различитих врста/родова крпеља, сматрало се да CAL може да буде индикатор изложености различитим врстама крпеља услед унакрсне реактивности (**Sanders et al.**, 1998). Упркос ранијим подацима да је CAL високо конзервиран међу крпељима (**Xu et al.**, 2005), услед унакрсне реактивности са антителима развијеним на епитопе антигена ендопаразита (**Jaworski et al.**, 1996; **Xu et al.**, 2005; **Kim et al.**, 2015) и веће сличности са сисарским хомолозима него са онима из зглавкара (**Ferreira et al.**, 2002), специфичност антитела за CAL крпеља у контексту детекције маркера убода је доведена у питање. Истражујући молекуларне основе фазе причвршћивања крпеља *A. americanum*, **Mulenga et al.** (2007) су утврдили висок степен конзервираности међу крпељима два протеина пљувачке, који су означени као PA107 и AV422. Њихова експресија је повишена пре саме пенетрације, током излагања стимулусима за храњење. Иако су донекле окарактерисани, остаје да се детаљно утврде

њихове улоге током узимања крвног оброка. За PA107 се претпоставља да је компонента цемента, који код већине тврдих крпеља омогућава додатно причвршћивање за домаћина. С обзиром да је у његовој пептидној секвенци забележено присуство „GPP“ мотива, који интерагује са тромбоцитним рецептором за колаген (**Ribeiro et al.**, 2006; **Smerthurst et al.**, 2006), вероватно делује инхибиторно на нагомилавање тромбоцита у крвним судовима на месту убода. У транскриптому пљувачне жлезде *I. scapularis* је описана велика фамилија протеина сличних PA107 (**Ribeiro et al.**, 2006), који омогућавају причвршћивање крпеља и спречавају коагулацију крви. AV422 је као секреторни протеин пљувачке крпеља окарактерисан код врсте *A. americanum* (*AamAV422*) (**Mulenga et al.**, 2013). Припада посебној, новој фамилији протеина зглавкара, коју карактерише присуство 14 цистеина у аминокиселинској секвенци и седам дисулфидних веза. Представља имуногени конституент протеома пљувачке који је укључен у рану фазу храњења, присутан у пљувачки независно од развојног стадијума крпеља (**Mulenga et al.**, 2013; **Tirloni et al.**, 2014, 2015). Биоинформатичка анализа је указала на конзервираност AV422 међу врстама крпеља, без постојања хомолога код сисара, па ни код других група зглавкара, што га чини протеином специфичним за крпеље (**Mulenga et al.**, 2007, 2013). AV422 и његови хомолози су идентификовани у протеому пљувачке *A. americanum* и *I. scapularis* (**Radulović et al.**, 2014; **Lewis et al.**, 2015; **Kim et al.**, 2016), *R. microplus* (**Tirloni et al.**, 2014) и *Ha. longicornis* (**Tirloni et al.**, 2015). Женке *A. americanum* почињу да убризгавају овај протеин у домаћина као саставну компоненту пљувачке у току 24 сата након причвршћивања (**Mulenga et al.**, 2013). Регулише припремну фазу храњења, тј. причвршћивање и формирање ткивне лезије на месту убода (**Mulenga et al.**, 2013). Због наведених карактеристика, протеини пљувачке крпеља PA107 и AV422 представљају добре кандидате за развој серолошких тестова за процену изложености крпељима.

2 ЦИЉЕВИ РАДА

Циљ овог истраживања је процена могућности употребе рекомбинантних протеина пљувачке крпеља за припрему серолошких тестова који би служили за испитивање изложености домаћина убоду крпеља. Фокус је на протеинима RA107, AV422 и CAL из пљувачке крпеља *I. ricinus*, као медицински најзначајније врсте у Србији и Европи. Ради постизања постављеног циља, дефинисани су следећи задаци истраживања:

1. Анализа кодирајућих секвенци гена и аминокиселинских секвенци одабраних протеина пљувачке крпеља *I. ricinus*
2. Експресија рекомбинантних протеина пљувачке крпеља *I. ricinus*
3. Испитивање реактивности рекомбинантних протеина пљувачке крпеља *I. ricinus* са серумима домаћина који су били изложени убоду крпеља ове врсте
4. Испитивање реактивности рекомбинантних протеина пљувачке крпеља *I. ricinus* са серумима домаћина који су били изложени убоду друге врсте крпеља
5. Испитивање реактивности рекомбинантних протеина пљувачке крпеља *I. ricinus* са серумима домаћина који су изложени повећаном ризику од убода крпеља у природном окружењу (ловачки пси)

3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1 МАТЕРИЈАЛ

3.1.1 Крпељи

За израду овог рада су коришћене јединке крпеља врста *I. ricinus* и *D. reticulatus*.

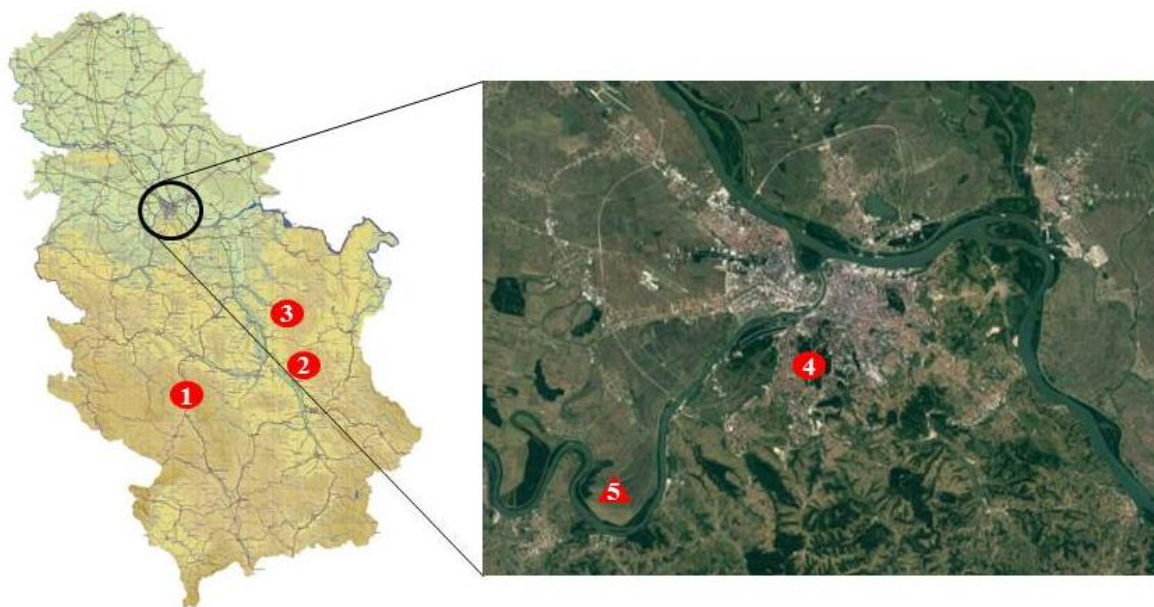
Да би се добиле кодирајуће секвенце гена за протеине пљувачке *I. ricinus*, прикупљане су адултне ненасисане јединке. Ненасисани крпељи су сакупљани са вегетације „dragging“ методом (превлачењем белог платна димензија 1x1 m преко травнате површине и опалог лишћа, причвршћеног једном страном за дрвени штап за чије крајеве је везан канап) и „flagging“ методом (превлачењем заставице од белог платна преко нижег растиња и жбунова). Након прикупљања, крпељи су живи транспортовани до Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду у епруветама са комадићем влажног филтер папира. Крпељи коришћени у овој студији су прикупљани на четири географски и еколошки различита локалитета у Србији: Баљевац, Бованско језеро, Ресавица и Кошутњак у Београду (Слика 6). Након детерминације врсте, развојног стадијума и пола, по стандардном кључу (Померанцев, 1950), ненасисани крпељи су груписани према полу и локалитету на коме су сакупљени. Формирано је укупно 8 група, са по 10 јединки. Са сваког локалитета је формирано по две групе, једна са женкама и друга са мужјацима. Крпељи су потапани у RNAlater (Ambion, Carlsbad, CA, USA), раствор намењен за стабилизацију РНК и заштиту од деградације, а потом мацерирани помоћу одговарајућих маказа и третирани помоћу сонификатора (UP50H, dr. Hielscher, Teltow, Germany), у циљу разбијања ћелијских мембрана и ослобађања ћелијске РНК. Овако припремљени узорци су чувани на -80°C до даље употребе. За експерименталну инфестацију лабораторијских животиња ларвама крпеља, прикупљане су насисане женке *I. ricinus* и *D. reticulatus* са различитих домаћина (шакала, паса и мачака). Сакупљени крпељи су одржавани у лабораторијским условима у виваријуму МТТ-VIVA08 (МТТ INFIZ, Земун, Србија) на Институту за медицинска истраживања до овипозиције. Ларве које су се излегле из положених јаја су коришћене за инфестацију лабораторијских животиња.

3.1.2 Експерименталне животиње

За експерименталну инфестацију ларвама крпеља и покретање хуморалног имунског одговора, тј. стварање антитела специфичних за протеине пљувачке крпеља који се убризгавају у домаћина током узимања крвног оброка, коришћени су мужјаци пацова соја Wistar, старости месец дана, гајени у виваријуму Института за медицинска истраживања. Експерименталне животиње су држане под стандардним условима (температура 25°C, релативна влажност ваздуха 97%, светлосни режим 12:12 h односа светла и мрака), уз слободан приступ води и храни. Истраживања су спроведена у сагласности са Законом о добробити животиња („Сл. гл. РС“ No6/10), уз одобрења Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду и Управе за ветерину Министарства пољопривреде и заштите животне средине Републике Србије (No 323-07-04717/2015-05).

3.1.3 Ловачки пси - домаћини који су изложени повећаном ризику од убода крпеља у природном окружењу

За испитивање реактивности рекомбинантних протеина пљувачке крпеља са антителима из серума домаћина који су изложени повећаном ризику од убода крпеља у природном окружењу, коришћени су серуми ловачких паса. Анализирани пси су били у власништву ловаца из Бољеваца, насеља у градској општини Сурчин, Београд (Слика 6).



Слика 6. Локалитети теренског прикупљања крпеља на подручју Србије, означени са ● (1 - Баљевац, 2 - Бованско језеро, 3 - Ресавица, 4 - Кошутњак (Београд)), са мапом ширег подручја Београда са локалитетом са ког су прикупљени серуми ловачких паса, означен са ▲ (5 - Бољевци)

Вађењу крви је претходио ветеринарски преглед, током којег је утврђено да су сви пси клинички здрави. Методом упитника су прикупљени подаци везани за старост, претходне инфестације крпељима и употребу репелената против ектопаразита. Група испитиваних паса се састојала од 15 јединки, пет мужјака и 10 женки, три расе (немачки краткодлаки и оштродлаки птичари, спрингер шпанијел) и једног мешанца (Табела 1). Старост паса је била од седам месеци до осам година (медијана три године). Сви пси су активно учествовали у лову током целе године.

Псима је крв извађена и транспортована на 4°C у Институт за медицинска истраживања. Из крви је изолован серум центрифугирањем 10 min на 4000 rpm, при температури од 4°C. Серуми штенаци из легла одржаваног без инфестација крпељима, су послужили као негативне контроле.

Пси су третирани различитим типовима репелентних производа и средствима за убијање ектопаразита. Коришћена заштитна средства су се разликовала како у активним супстанцама и начину примене, тако и у дужини периода заштите, који је трајао од мање од месец дана до седам месеци (Табела 1).

Табела 1. Параметри анализирание групе паса. НКП – немачки краткодлаки птичар, НОП - немачки оштродлаки птичар, СШ - спрингер шпанијел, М - мешанац; m- мужјак, f - женка

Узорак	Раса	Пол	Старост (године)	Забележени претходни инфестације крпељима	Употреба репелената	Протективни период (месеци)	Активни састојак
1	НКП	m	4	+	Frontline®	1	фипронил
2	М	f	4	+	Прашак против бува, Neostomosan®	<1	перметрин, трансметрин, тетраметрин
3	СШ	m	3	+	Frontline®, Neostomosan®	1	фипронил, трансметрин, тетраметрин
4	НКП	f	6	+	Нема података		
5	НКП	m	1.5	+	Neostomosan®	<1	трансметрин, тетраметрин
6	НКП	f	0.7	+	Neostomosan®	<1	трансметрин, тетраметрин
7	НКП	f	8	+	Frontline®	1	фипронил
8	НКП	f	7	+	Нема података		
9	НКП	m	3	+	Огрлица	7	пропоксур, флуометрин
10	НОП	m	2	+	Нема података		
11	НКП	f	2	+	Огрлица	7	пропоксур, флуометрин
12	НКП	f	0.6	+	Ectanon®	<1	диазинон
13	НКП	f	3	+	Ectanon®	<1	диазинон
14	НОП	f	4	-	Frontline®	1	фипронил
15	НОП	f	2	-	Frontline®, Neostomosan®	1	фипронил, трансметрин, тетраметрин

Истраживања су спроведена у сагласности са Законом о добробити животиња („Сл. гл. РС“ No6/10), уз одобрења Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду и Управе за ветерину Министарства пољопривреде и заштите животне средине Републике Србије (No 323-07-03455/2015-05/3).

3.1.4 Прајмери

За умножавање *IrPA107*, коришћени су прајмери:

*Bam*HI_PA107_F: 5'-ggatccCAGATCGTGGAGCGCCGTA-3' и

*Eco*RI_PA107_R: 5'-gaattcTTAGTAGCGCCCGCCACGACG-3'.

За умножавање *IrAV422*, коришћени су прајмери:

*Bam*HI_AV422_F: 5'-ggatccCAGGCTTGCCACCTTCG-3' и

*Eco*RI_AV422_R: 5'-gaattcTTAGTTGCCCAGGTAGGCGGAG-3'.

За умножавање *IrCAL*, коришћени су прајмери:

*Bam*HI_CAL_F: 5'-ggatccGACCCCAAGGTGTACCTCAAG-3' и

*Eco*RI_CAL_R: 5'-gaattcTCACAGCTCCTCGTGGTCGTGC-3'.

3.1.5 Рестрикциони ензими

За дигестију плаزمида током процеса клонирања, коришћени су рестрикциони ензими *Bam*HI и *Eco*RI (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania).

3.1.6 Плазмидни вектори

Лигација умножених кодирајућих секвенци за одабране протеине пљувачке крпеља је вршена у отворени комерцијални плазмид pJET1.2/blunt Cloning Vector (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania). За експресију рекомбинантних протеина коришћен је вектор pRSET A (Invitrogen, Paisley, UK).

3.1.7 Бактеријски сојеви

За умножавање и одржавање примарних и експресионих вектора, коришћене су компетентне ћелије *Escherichia coli*, JM107 (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) и One Shot TOP10F' (Invitrogen, Waltham, MA, USA). За експресију рекомбинантних протеина, коришћене су *E. coli* BL21(DE3)pLysS ћелије (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania).

3.1.8 Антитела

- Anti-HisG-HRP (Invitrogen, Paisley, UK) - антитело специфично за полихистидински наставак фузионисаног пептида (6xHis епитоп), конјуговано са пероксидазом рена
- Goat Anti-Rat IgG (H+L), HRP (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) - антитело специфично за лаке и тешке ланце IgG пацова, конјуговано са пероксидазом рена
- Goat Anti-Canine IgG (H+L), HRP (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) - антитело специфично за лаке и тешке ланце IgG паса, конјуговано са пероксидазом рена

3.1.9 Китови

- RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) - за синтезу комплементарне ДНК
- GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) - за изолацију и пречишћавање ДНК фрагмената из агарозних гелова
- CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) - за клонирање PCR продуката
- TransformAid Bacterial Transformation Kit (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) - за припрему и трансформацију компетентних *E. coli* ћелија
- GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) и PureYield Plasmid Miniprep System Kit (Promega, Madison, WI, USA) - за изолацију плазмидне ДНК
- IP Lysis Buffer Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) - за екстракцију протеина
- Metal Enhanced DAB Substrate Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) - за хромогенску визуализацију реакције антигена са антителом конјугованим са пероксидазом рена

3.2 МЕТОДЕ

3.2.1 Експресија рекомбинантних протеина пљувачке крпеља *I. ricinus*

3.2.1.1 Умножавање кодирајућих секвенци гена за одабране протеине пљувачке крпеља

3.2.1.1.1 Дизајнирање прајмера

Кодирајуће секвенце гена одабраних секреторних протеина пљувачке крпеља *A. americanum*, PA107, AV422 и CAL, су послужиле као основ за одабир хомологих нуклеотидних секвенци код других родова крпеља, депонованих у бази GenBank (**Clark et al.**, 2016). Поменуте секвенце су део транскриптома врсте *A. americanum* формираног у лабораторији др Алберта Муленге са Texas A&M University, USA. Приликом дизајнирања прајмера коришћене су консензус секвенце са крајева кодирајућих секвенци, на које су додате палиндромске секвенце одговарајућих рестрикционих ензима који су коришћени у процесу припреме експресионог вектора.

За добијање консензус секвенце, неопходне за дизајнирање специфичних прајмера за умножавање кодирајуће секвенце *I. ricinus* PA107 (*IrPA107*), изабрано је четири хомолога из различитих врста крпеља родова *Ixodes* и *Rhipicephalus* са идентификационим бројевима секвенци: XM002399588, GACK01007882, GACK01007883 и GACK01007884.

За добијање консензус секвенце, неопходне за дизајнирање специфичних прајмера за умножавање кодирајуће секвенце *I. ricinus* AV422 (*IrAV422*), изабрано је 17 хомолога из различитих врста крпеља родова *Ixodes*, *Rhipicephalus* и *Amblyomma* са идентификационим бројевима секвенци: XM002406216, GADI01002126, GACK01004441, BK007204, JO842177, XM002410237, GADI01001646, JO844573, BK007127, XM002414928, XM002401121, XM002414494, XM002414488, XM002414490, XM002414491, JO844187 и XM002414929.

За добијање консензус секвенце, неопходне за дизајнирање специфичних прајмера за умножавање кодирајуће секвенце *I. ricinus* CAL (*IrCAL*), изабрано је 50 хомолога из различитих врста крпеља родова *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Boophilus*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Amblyomma*, *Dermacentor* и *Rhipicephalus* са идентификационим бројевима секвенце: AY395272, AY395273, XM002402036, AY395268, AY395266, AY395264,

AY395270, AY395262, AY395267, AY271304, AY395261, AY395253, AY962875, AY395254, JX502832, JX502831, AF420211, AY395259, AY395246, AY395257, AY395248, AY271306, AY395255, AY395247, AY395256, AY395258, U07708, AY395275, AY241957, JN016805, JX502833, AY395274, AY395271, AY395269, AY395265, AY395263, AY395260, FJ536258, GADI01001784, JO842510, JO842963, BK007726, AY690335, XM002401188, AY395252, AY395250, AY395251, AY271305, AY395249 и AY271303.

3.2.1.1.2 *Изолација укупне РНК*

Крпељи су хомогенизовани у TRIzol Reagent (Ambion, Austin, TX, USA). Након додавања хлороформа и центрифугирања на 12000 rpm у трајању од 25 min на 4°C, издвојена је водена фаза у којој се налази РНК. За преципитацију РНК је коришћен 2-пропанол, а испирање је вршено помоћу 70% етанола. Након испирања талог РНК је осушен и растворен у води третираној диетилпирокарбонатом (DEPC), чиме су уклоњене нуклеазе. Тако изолована РНК је одложена на -80°C до даље употребе.

3.2.1.1.3 *Реверзна транскрипција*

Изолована РНК је послужила за синтезу комплементарне ДНК реверзном транскрипцијом, користећи RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, према упутству произвођача. За синтезу комплементарне ДНК коришћени су Oligo(dT) прајмери и 1 µg укупне РНК за сваки узорак.

3.2.1.1.4 *Реакција ланчаног умножавања ДНК*

Кодирајуће секвенце гена одабраних протеина пљувачке *I. ricinus* су добијене реакцијом ланчаног умножавања (енгл. Polymerase Chain Reaction, PCR), користећи дизајниране прајмере, добијену комплементарну ДНК и Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania). Иницијална денатурација на 98°C у трајању од 30 s, је праћена са осам циклуса денатурације на 98°C у трајању од 10 s, хибридизације прајмера на 56°C за *IrPA107*, 52°C за *IrAV422*, 53°C за *IrCAL* у трајању од 30 s и екстензије на 72°C у трајању од 30 s, а потом са додатних 35 циклуса денатурације на 98°C у трајању од 10 s, хибридизације прајмера на 61°C за *IrPA107*, 58°C за *IrAV422*,

60°C за *IrCAL* у трајању од 30 s и екстензије на 72°C у трајању од 30 s и финалном екстензијом на 72°C у трајању од 10 min.

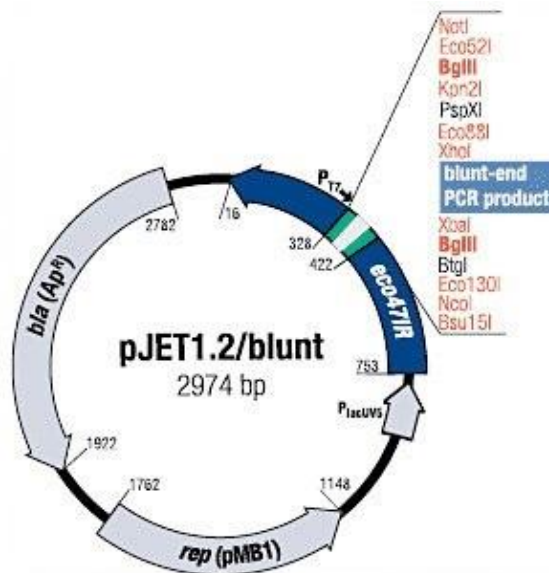
3.2.1.1.5 Пречишћавање умножених секвенци

Умножене секвенце су раздвојене електрофорезом на 1% агарозном гелу, при чему је за припремање гела коришћен 1xTAE пуфер (40 mM Tris-acetat, 1mM EDTA pH 8), а за визуализацију под UV светлом флуоресцентне боје етидијум-бромид или Midori Green (Nippon Genetics, Japan), које су додаване у гел пре полимеризације. Секвенце су изоловане и пречишћене из комада агарозног гела које их садрже користећи GeneJET Gel Extraction Kit, према упутству произвођача. Величина фрагмената ДНК је одређивана коришћењем комерцијалног маркера GenePilot 100 bp Plus (Qiagen, Hilden, Germany).

3.2.1.2 Формирање експресионих вектора

3.2.1.2.1 Формирање примарних вектора

Умножене и пречишћене кодирајуће секвенце су лигацијом убачене у плазмид pJET1.2/blunt Cloning Vector, комерцијално доступан у оквиру CloneJET PCR Cloning Kit-a. Добијеним примарним вектором су трансформисане претходно припремљене компетентне ћелије *E. coli* JM107, користећи TransformAid Bacterial Transformation Kit, према упутству произвођача. Трансформисане ћелије су потом засејане на селективној чврстој LB (енгл. Lysogeny Broth) агарозној хранљивој подлози са ампицилином, у концентрацији од 100 µg/ml, комерцијално доступној као Fast-Media Amp Agar (InvivoGen, San Diego, CA, USA), с обзиром да pJET1.2/blunt Cloning Vector садржи ген одговоран за отпорност на ампицилин (Слика 7). Ћелије су потом инкубиране преко ноћи (оптимално 16 h) на 37°C до појаве колонија.



Слика 7. Мапа генетичких елемената плаزمида pJET1.2/blunt Cloning Vector.

Bla (Ap^R) - ген за β-лактамазу која обезбеђује отпорност на ампицилин

Да би се испитало које колоније трансформисаних ћелија садрже одговарајуће примарне векторе, извршена је провера „insert-check“ PCR-ом, користећи pJET1.2Forward (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3') и pJET1.2Reverse (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3') Sequencing прајмере, половину сваке испитиване колоније и PCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania). Иницијална денатурација на 95°C у трајању од 2 min, је праћена са 35 циклуса денатурације на 95°C у трајању од 30 s, хибридизације прајмера на 52°C у трајању од 30 s и екстензије на 72°C у трајању од 1 min, и финалном екстензијом на 72°C у трајању од 10 min. Продукти умножавања су анализирани након електрофорезе на 1.5% агарозном гелу (1xTAE пуфер, бојен етидијум бромидом).

Друга половина испитиваних колонија је послужила за формирање Master Plate-а, тј. формирање реплика испитиваних колонија на чврстој LB агарозној хранљивој подлози са ампицилином. Након потврде присуства одговарајућих примарних вектора у ћелијама „insert-check“ PCR-ом, одређен број адекватних колонија са Master Plate-а је пресејан у неселективну течну SOB (енгл. Super Optimal Broth) хранљиву подлогу и култура је инкубирана преко ноћи на 37°C уз непрестано мешање. Након тога је извршена изолација плазмидне ДНК из бактерија, користећи GeneJET Plasmid Miniprep Kit, према упутству произвођача.

3.2.1.2.2 Секвенцирање и анализа кодирајућих нуклеотидних и одговарајућих аминокиселинских секвенци

Кодирајуће секвенце из 5-10 клонова сваког од три типа примарних вектора су секвенциране „Sanger“ методом (**Sanger & Coulson, 1975**) у Центру за геномику и информатику на Texas A&M University, USA. Добијене нуклеотидне и одговарајуће аминокиселинске секвенце (формиране на основу нуклеотидних секвенци) *IrPA107* и *IrAV422* су поређене са хомолозима из *I. scapularis*, као блиском врстом, депонованим у GenBank бази података (DQ065913 за поређење са *IrPA107* и XM002406216 за поређење са *IrAV422*), док су секвенце за *IrCAL* поређене са секвенцом из *I. ricinus*, депонованом у GenBank бази података (AY395272), уз помоћ BioEdit софтвера (Version 7.1.9) (**Hall, 1999**).

За поређење добијених *IrCAL* секвенци са CAL секвенцама из других родова крпеља, коришћене су секвенце депоноване у GenBank бази података (*H. longicornis* (AY395260), *H. anatolicum excavatum* (AY395259), *A. americanum* (U07708), *R. sanguineus* (AY271303), *D. variabilis* (AY271306) и *I. ricinus* (AY395272)). Поређење је вршено уз помоћ BioEdit софтвера, користећи Clustal W модул.

За поређење добијених *IrCAL* секвенци са депонованим секвенцама за CAL из *I. ricinus* и других родова крпеља, инсеката и са по једном секвенцом птица и сисара као „out“ група, коришћене су оне депоноване у GenBank бази података (*Ha. longicornis* (AY395260), *Hu. anatolicum excavatum* (AY395259), *D. variabilis* (AY271306), *R. sanguineus* (AY271303), *A. americanum* (U07708), *I. ricinus* (AY395272), *Drosophila simulans* (XM002104054), *Anopheles albimanus* (DQ206710), *Culex quinquefasciatus* (XM001848772), *Aedes aegypti* (AF466603), *Ficedula albicollis* (XM005062787) и *Oryctolagus cuniculus* (NM001082235)), користећи BioEdit софтвер. Реконструисано је филогенетско стабло, при чему су филогенетске дистанце израчунаване „neighbor-joining“ методом, са „bootstrap“ вредностима израчунаваним са 1000 понављања.

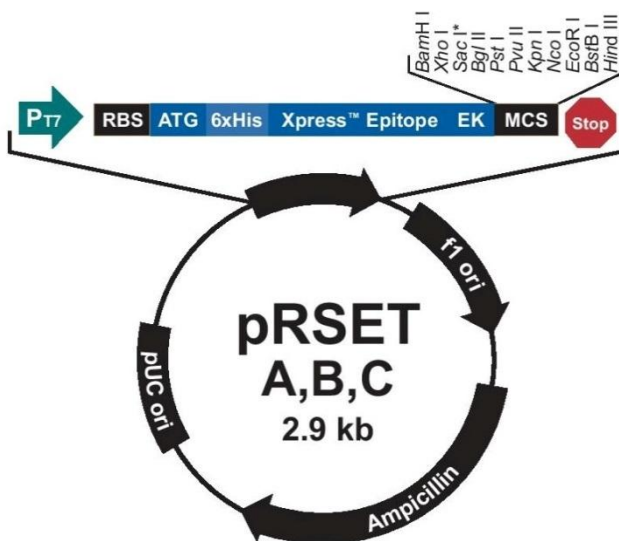
3.2.1.2.3 Дигестија кодирајућих секвенци и експресионог вектора

За добијање експресионих вектора, тј. одговарајућих плаزمида са кодирајућим секвенцама за одабране протеине којим ће се трансформисати адекватне бактеријске ћелије, извршено је исецање кодирајућих секвенци из примарних вектора, као и двострука

дигестија самог („празног“) експресионог вектора pRSET A истим рестрикционим ензимима, *Bam*HI и *Eco*RI. На тај начин су формираны лепљиви крајеви на кодирајућим секвенцама и отвореном експресионом вектору, који су неопходни за њихову лигацију.

3.2.1.2.4 Убацавање кодирајуће секвенце у експресиони вектор

Добијени фрагменти су након дигестије раздвојени на 1% гелу (1xTAE пуфер, бојење етидијум бромидом), након чега су изоловани и пречишћени користећи GeneJET Gel Extraction Kit, према упутству произвођача. Потом је извршена лигација кодирајућих секвенци у pRSET A експресиони вектор помоћу T4 DNA Ligase (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania), формирајући на тај начин рекомбинантни вектор којим су трансформисане претходно припремљене One Shot TOP10F' компетентне ћелије, према упутству произвођача. Трансформисане ћелије су засејане на чврстој LB агарозној хранљивој подлози са ампицилином, с обзиром да pRSET A вектор садржи ген одговоран за отпорност на ампицилин (Слика 8) и инкубиране преко ноћи на 37°C до појаве колонија.



Слика 8. Мапа генетичких елемената експресионог вектора pRSET A, са геном одговорним за отпорност на ампицилин

Да би се испитало које колоније трансформисаних ћелија садрже експресиони вектор са кодирајућом секвенцом, извршена је провера „insert-check“ PCR-ом, користећи специфичне прајмере за умножавање кодирајућих секвенци гена за протеина пљувачке, половину сваке испитиване колоније израсле преко ноћи на чврстој подлози и PCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania). Иницијална денатурација на 95°C у трајању од 2 min, је праћена са 35 циклуса денатурације на 95°C у трајању 30 s, хибридизације прајмера на 55°C за *IrPA107*, 53°C за *IrAV422*, у трајању од 30 s и екстензије на 72°C у трајању од 1 min и финалном екстензијом на 72°C у трајању од 10 min. Продукти умножавања су анализирани након електрофорезе на 1.5% агарозном гелу гелу (1xTAE пуфер, бојен етидијум бромидом).

Друга половина сваке испитиване колоније је послужила за формирање Master Plate-а, тј. формирање реплика испитиваних колонија на чврстој LB агарозној хранљивој подлози са ампицилином. Након потврде присуства експресионог вектора са одговарајућом кодирајућом секвенцом у испитиваним колонијама, одређен број адекватних колонија са Master Plate-а је пресејан у неселективну течну SOB хранљиву подлогу и култура је инкубирана преко ноћи на 37°C уз непрестано мешање. Након тога је извршена изолација плазмидне ДНК из бактерија, користећи PureYield Plasmid Miniprep System Kit, према упутству произвођача. Изолована плазмидна ДНК је коришћена за трансформацију бактеријских ћелија *E. coli* соја BL21(DE3)pLysS у којима је вршена експресија рекомбинантних протеина.

Као карактеристика експресије протеина користећи pRSET A експресиони вектор, рекомбинантни протеин поседује на N-терминалном крају фузионисани пептид са полихистидинским наставком (6xHis епитоп), који је потребан за детекцију рекомбинантног протеина специфичним антителом. Ради потврде инсерције кодирајућих секвенци у одговарајућем оквиру читања са N-терминалним фузионисаним пептидом и провере адекватне оријентације, извршено је секвенцирање добијених експресионих вектора, користећи комерцијални сервис Macrogen Europe.

3.2.1.3 *Експресија рекомбинантних протеина пљувачке крпеља*

3.2.1.3.1 *Трансформација компетентних бактеријских ћелија*

Као експресиони систем, послужиле су бактеријске ћелије *E. coli* соја BL21(DE3)pLysS. Након пресејавања у течну SOB хранљиву подлогу и достизања оптичке густине $OD_{600} \sim 0.5$, бактеријске ћелије су центрифугиране на 4000 rpm у трајању од 10 min на 4°C. Талог са ћелијама је ресуспендован у 50 mM CaCl₂, након чега су остављене на леду 30 min. Након поновног центрифугирања при истим условима у трајању од 5 min, настали талог је поново ресуспендован у 50 mM CaCl₂. Тако припремљене ћелије су биле спремне за трансформацију експресионим векторима, који су додати (10-100 ng) у аликвоте припремљених ћелија. Након инкубирања на леду у трајању од 30 min, уследио је топлотни шок инкубацијом на 42°C у трајању од 45 s и враћењем на лед. Након додавања SOC (енгл. Super Optimal broth with Catabolite repression) хранљиве подлоге и инкубирања на 37°C у трајању од 45 min, извршена је селекција на двоструко селективној чврстој LB агарозној хранљивој подлози (10 g Tryptone, 10 g NaCl, 5 g екстракта квасца, 15 g агара / 1 l дејонизоване воде, pH 7.0), која је садржавала антибиотике ампицилин, у концентрацији од 50 µg/ml и хлорамфеникол, у концентрацији од 35 µg/ml. Ампицилин је неопходан за селекцију трансформаната који садрже pRSET A вектор, тј. кодирајућу секвенцу за одабране протеине, а хлорамфеникол за селекцију ћелија које нису изгубиле pLysS плазмид. Плазмид pLysS је неопходан за експресију T7 лизозима, који се везује за T7 РНК полимеразу и инхибира базалну транскрипцију. Тиме се спречавају могући нежељени ефекти на вијабилност трансформисаних бактеријских ћелија у којима се одвија експресија.

3.2.1.3.2 *Експресија*

Након пресејавања трансформисаних BL21(DE3)pLysS ћелија у SOB течни хранљиви медијум са ампицилином, у концентрацији од 50 µg/ml и хлорамфениколом, у концентрацији од 35 µg/ml и инкубације преко ноћи на 37°C уз непрестано мешање, део културе је пребачен у по две епрувете са по 10 ml SOB течног хранљивог медијума, до постизања $OD_{600} \sim 0.1$. Нове културе су инкубирани у истим условима до постизања $OD_{600} \sim 0.4-0.6$. Једна епрувета је представљала контролну бактеријску културу у којој није

индукована експресија, док је у другу додат изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (IPTG), као хемијски индуктор експресије. Обе културе су инкубиране 15-16 h у истим условима, након чега су центрифугиране на 4000 rpm, 25 min, на собној температури. Супернатант је одливен, а ћелијски талог је ресуспендован у фосфатном пуферу (енгл. Phosphate-Buffered Saline, PBS) и одложен на -80°C .

Током извођења експеримената, формиран су глицеролски стокови трансформисаних бактеријских ћелија са примарним и експресионим векторима, који представљају колекцију култура за дугорочно складиштење на -80°C (1-2 ml преконоћне културе са 0.85 ml стерилног глицерола).

3.2.1.4 Изолација и пречишћавање рекомбинантних протеина пљувачке крпеља

3.2.1.4.1 Процесуирање бактеријске културе

У циљу изоловања и пречишћавања експримираних рекомбинантних протеина, бактеријске ћелије су лизирание сонификацијом и пуфером за лизу (PBS pH 7.3, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF), уз додаток коктела инхибитора протеаза (Serva, Heidelberg, Germany) и у присуству DNaseI ендонуклеазе (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania). Добијени лизат је фракционисан након три циклуса центрифугирања на 10000 rpm у трајању од 15 min на 4°C , при чему је супернатант прикупљан, а талог ресуспендован у PBS-у. Изузетак је био други циклус центрифугирања, коме је претходило растварање талоба у денатуришућем пуферу (6M уреа, 0.5 M NaCl, 50 mM имидазол, 20 mM Tris pH 7.9) преко ноћи.

3.2.1.4.2 Електрофоретска анализа фракција бактеријских лизата

Фракције лизата бактеријских ћелија у којима су експримирани рекомбинантни протеини (укупно четири: три супернатанта добијена након сваког центрифугирања и ресуспендовани талог добијен након последњег центрифугирања), су анализирание дисконтинуираном натријум-додецилсулфат-полиакриламидном гел електрофорезом (енгл. Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE), према Laemmli-ју (Laemmli, 1970), на апарату Hoefer miniVE (Amersham Biosciences, San Diego, CA, USA). У фракције лизата је додат редукујући пуфер за припрему узорика (0,125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% глицерола, 0,2 M DTT, 0,02% бромфенол плаво, pH 6,8), након чега је смеша кувана 5 min на 100°C у воденом купатилу. Узорци су наносени на 4% гел за

концентровање узорака и раздвајани на 12% гелу, дебљине 1 mm, при константној струји од 20 mA. Коришћен је комерцијални раствор акриламида и бис-акриламида, Acrylamide/Bis Solution, 37.5:1 (30% w/v), 2.6% C (Serva, Heidelberg, Germany). Како би се одредила молекулска маса раздвојених протеина, на сваки гел је нанета и смеша референтних протеина познатих молекулских маса, PagePuler Plus Prestained Protein Ladder, 10 - 250 kDa (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania).

Након електрофорезе, гел је бојен Coomassie Brilliant Blue (СВВ) бојом (0, 025% СВВ R250, 40% метанол, 7% сирћетна киселина) којом се неспецифично боје сви протеини присутни у добијеним фракцијама лизата. Након 2 h инкубације у раствору боје, гелови су обезбојавани најпре у раствору за обезбојавање I (40% метанол, 7% сирћетна киселина) у трајању од 30 min, а затим у раствору за обезбојавање II (5% метанол, 7% сирћетна киселина), два пута по 30 min. Гелови су чувани у раствору за чување гелова (7% сирћетна киселина), до скенирања и анализе. На основу присуства, интензитета и молекулске масе добијених протеинских трака, процењено је могуће присуство рекомбинантних протеина у појединачним фракцијама.

3.2.1.4.3 Специфична детекција рекомбинантних протеина Western blot анализом

Фракције лизата су упоредо испитиване Western blot-ом. Након електрофорезе под претходно описаним условима, раздвојени протеини су са гелова пренети на нитроцелулозну мембрану (Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK) полусувим трансфером, на апарату Multiphor II, Nova Blot (LKB, Uppsala, Sweden), при константној струји јачине 55 mA (0.8 mA/cm²) у трајању од 1 h, у пуферу за трансфер (25 mM Tris-HCl, 192 mM глицин, 20% метанол, 0,1% SDS). Мембрана је затим инкубирана у раствору за блокирање неспецифичног везивања протеина (4% немасно млеко/PBS/0.05% Tween 20). Након тога је уследила инкубација током 2 h са Anti-HisG-HRP антителом, специфичним за полихистидински наставак (6xHis епитоп) пептида који је фузионисан са N-терминалним крајем рекомбинантног протеина. Реактивност је визуализована хромогенски, користећи Metal Enhanced DAB Substrate Kit.

3.2.1.4.4 Пречишћавање рекомбинантних протеина

Фракција бактеријског лизата за коју се показало да садржи највећи принос експримираног рекомбинантног протеина је послужила за његово пречишћавање и изолацију. То је постигнуто елуцијом са PVDF (поливинилиден дифлуорид) мембране (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) након SDS-PAGE електрофорезе и полусувог трансфера под претходно описаним условима. Због свог хемијског састава, PVDF мембрана је погоднија за ту сврху од нитроцелулозне мембране. Након трансфера исецан је део PVDF мембране који садржи траку са рекомбинантним протеином, што је одређено помоћу маркера молекулске масе и испиран у пуферу за елуцију (1% Triton X-100, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 9.4), а потом центрифугиран на 11000 rpm у трајању од 2 min на собној температури. Чистоћа рекомбинантних протеина који су изоловани на овај начин је затим проверена бојењем гела након SDS-PAGE електрофорезе и Western blot анализом под претходно описаним условима, након чега су добијени елуати одложени на -80°C до даље употребе.

3.2.2 Експериментална инфестација лабораторијских животиња ларвама крпеља

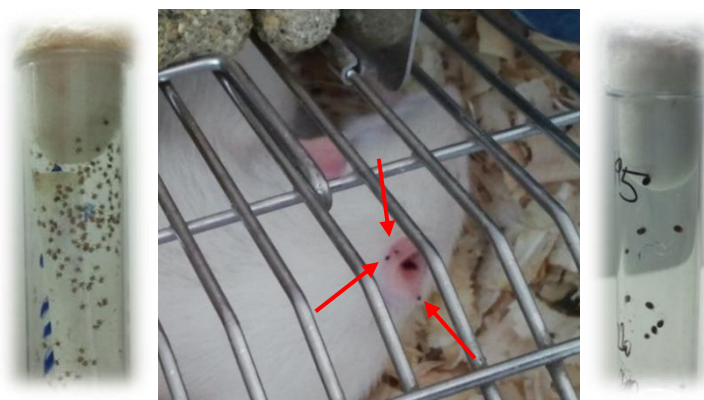
3.2.2.1 Добијање неинфицираних ларви крпеља у лабораторијским условима

Ларве крпеља су добијене у лабораторијским условима (Слика 9). Након прикупљања са домаћина, насисане женке *I. ricinus* и *D. reticulatus* су одржаване у виваријуму у оптималним условима (температура 22°C, релативна влажност ваздуха 88-90%, светлосни режим 16:8 h односа светла и мрака) на Институту за медицинска истраживања, до и током полагања јаја, након чега су конзервиране у 70% етанолу. Јаја су била одвајана од женки свакодневно током целокупног периода полагања јаја, а затим одлагана у виваријум и одржавана под истим условима као и женке. Излегле ларве су држане у виваријуму најмање 15 дана од излегања, тј. током периода очвршћавања до храњења на пацовима, под истим оптималним условима.

3.2.2.2 Покретање хуморалног имунског одговора на увод крпеља, добијање одговарајућих серума и прикупљање насисаних ларви

Лабораторијске животиње су инфициране ларвама крпеља са циљем покретања хуморалног имунског одговора, тј. стварања антитела специфичних за протеине које током увода крпељи убризгавају у домаћина. Као домаћини су послужили мужјаци пацова соја Wistar (Слика 9). Ларве *I. ricinus* и *D. reticulatus* су постављане ентомолошком иглом на главени регион, углавном на уши. Ларве су остављане на домаћину до комплетирања крвног оброка, након чега су се одвајале и потом прикупљане. Укупно је изведено четири циклуса инфестација ларвама, при чему је у једном циклусу стављано по 50 ларви у просеку на једног пацова. Храњење ларви је трајало у континуитету просечно 33 дана. Ларве крпеља *I. ricinus* су храњене на шест, а ларве *D. reticulatus* на три пацова, као домаћинима. Две недеље након последње инфестације, сакупљена је крв пацова ексангвинацијом из абдоминалне аорте. Томе је претходило анестезирање животиња натријум-пентобарбиталом, у дози од 35 mg/kg, интраперитонеално. Након коагулисања крви и центрифугирања на 4000 rpm у трајању од 10 min на 4°C, серум је прикупљен и одложен на -80°C до даље анализе. Иолован је и серум пацова на коме нису храњене ларве, који је коришћен као негативна контрола.

Прикупљене насисане ларве *I. ricinus* (Слика 9) су хомогенизоване мацерирањем, након чега је извршена екстракција укупних протеина користећи IP Lysis Buffer, према упутству произвођача.



Слика 9. Неинфициране ларве крпеља *I. ricinus*, добијене у лабораторијским условима (лево), ларве које се хране на пацовима у циљу покретања хуморалног имунског одговора на увод крпеља (средина) и прикупљене насисане ларве (десно)

3.2.3 Испитивање реактивности серума домаћина са рекомбинантним протеинима пљувачке крпеља *I. ricinus* - испитивање антигенских карактеристика протеина пљувачке крпеља

3.2.3.1 Испитивање реактивности серума експерименталних домаћина са екстрактом укупних протеина насисаних ларви

У циљу испитивања покретања хуморалног одговора на убризгане протеине пљувачке крпеља у експерименталним условима, проверена је реактивност серума пацова након инфестације ларвама крпеља са екстрактом укупних протеина насисаних ларви. Укупни протеини насисаних ларви су раздвојени SDS-PAGE електрофорезом, након чега су пренети на нитроцелулозну мембрану, под истим условима као приликом анализе фракција лизата бактеријских ћелија након експресије рекомбинантних протеина. Мембрана је након блокирања неспецифичног везивања протеина инкубирана преко ноћи са серумима пацова, разблаженим у односу 1:30 у раствору 1% немасног млека/PBS/0.05% Tween 20. За детекцију реактивности антитела у серумима пацова са протеинима насисаних ларви коришћено је Anti-Rat HRP IgG (H+L) антитело, разблажено у односу 1:2000. Након испирања мембране, реактивност је визуализована хромогенски користећи Metal Enhanced DAB Substrate Kit.

3.2.3.2 Испитивање реактивности серума експерименталних домаћина са рекомбинантним протеинима пљувачке крпеља *I. ricinus*

Испитивана је реактивност серума пацова на којима су храњене ларве крпеља са добијеним рекомбинантним (r) протеинима пљувачке *I. ricinus*, тј. могућност детекције анти-PA107 и анти-AV422 антитела, продукованих као одговор на храњење ларви. Пречишћени rIrPA107 и rIrAV422 су раздвојени SDS-PAGE електрофорезом и потом пренети на нитроцелулозну мембрану. Нитроцелулозна мембрана је затим прецизно исечена на траке које садрже електрофоретски раздвојене рекомбинантне протеине. Након блокирања неспецифичног везивања, појединачне траке са rIrAV422 и rIrPA107 су инкубирани преко ноћи са серумима пацова разблаженим у односу 1:75 (у случају rIrAV422) и 1:100 (у случају rIrPA107), а сутрадан са Anti-Rat HRP IgG (H+L) антителом,

разблаженим у односу 1:2000, у трајању од 2 h. Након испирања мембрана, реактивност је визуализована хромогенски користећи Metal Enhanced DAB Substrate Kit.

3.2.3.3 Одређивање укупног садржаја IgG у серумима пацова

Укупни садржај IgG у серуму, као процена имунског статуса пацова који су послужили као домаћини за храњење ларви *I. ricinus*, одређиван је титрацијом у dot blot-у. По 3 μ l серума је пажљиво наносено на нитроцелулозну мембрану пипетом, у серији разблажења од 1:400 до 1:25600, на обележене кружне површине у низу. Мембрана је након сушења на ваздуху и блокирања неспецифичног везивања, инкубирана са Anti-Rat HRP IgG (H+L) антителом, разблаженим у односу 1:5000, у трајању од 2 h. Након испирања мембране, реактивност је визуализована хромогенски користећи Metal Enhanced DAB Substrate Kit. Последње разблажење серума у коме је забележена реактивност је представљало титар IgG антитела.

3.2.3.4 Испитивање реактивности серума ловачких паса са rIrAV422

Да би се испитала реактивност серума паса, као домаћина крпеља у природном окружењу, пречишћен rIrAV422 је раздвојен SDS-PAGE електрофорезом, а потом пренет на нитроцелулозну мембрану. Након инкубације у раствору за блокирање неспецифичног везивања, мембрана је изложена преко ноћи серумима паса разблаженим у односу 1:75, а сутрадан са Anti-Canine HRP IgG (H+L) антителом, разблаженим у односу 1:5000, у трајању од 2 h. Након испирања мембране, реактивност је визуализована хромогенски користећи Metal Enhanced DAB Substrate Kit.

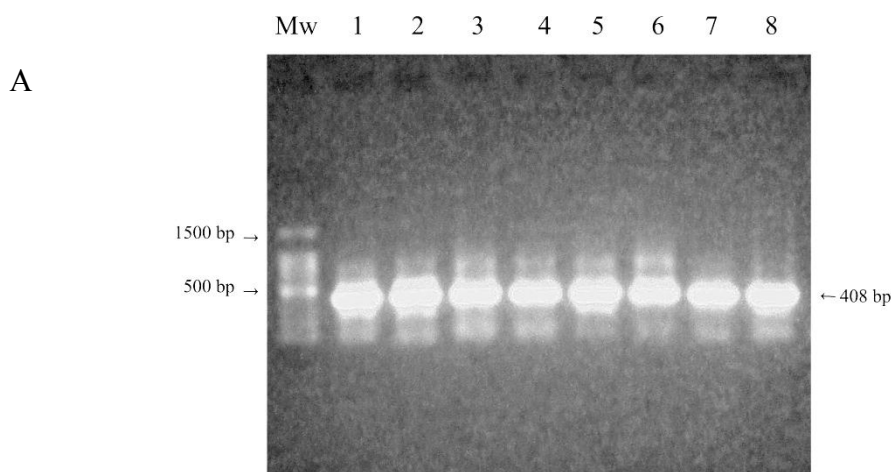
4 РЕЗУЛТАТИ

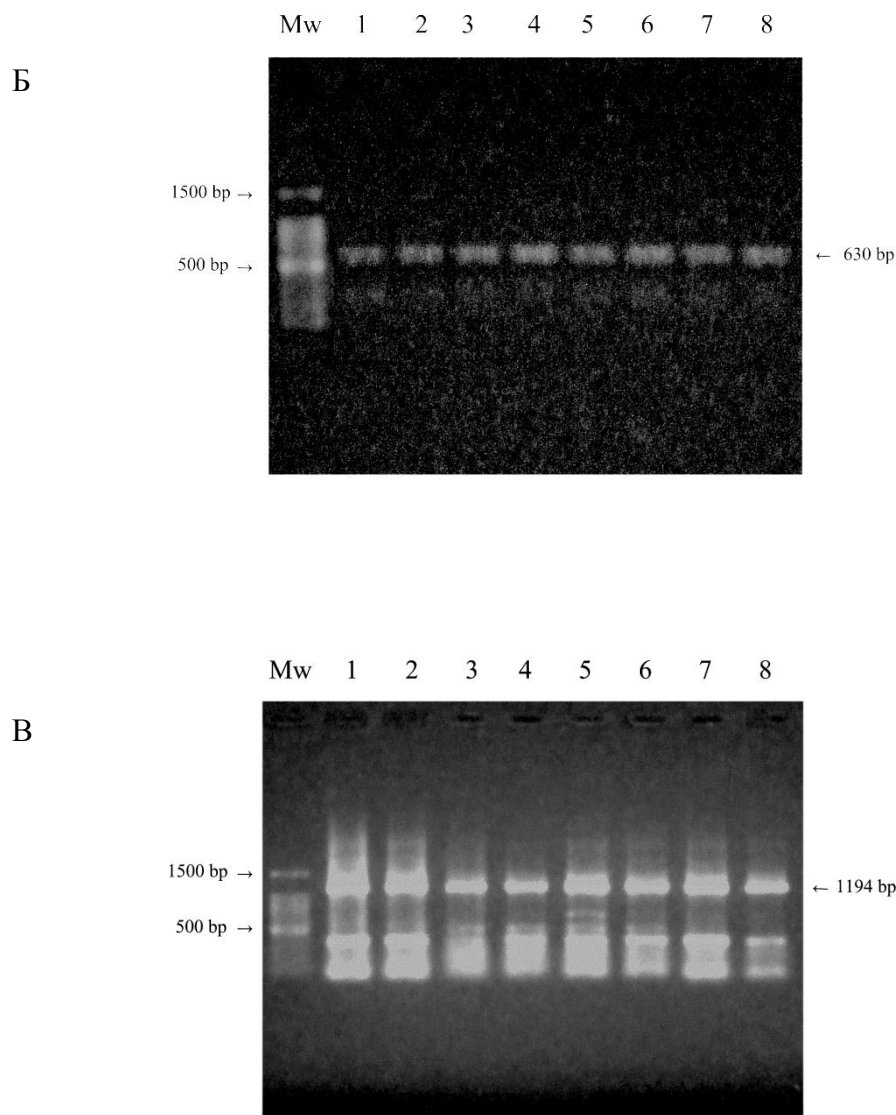
Протеини пљувачке крпеља *I. ricinus* анализирани у овој студији су прво испитивани у контексту интра- и интерспецијске варијабилности, поређењем њихових кодирајућих нуклеотидних и одговарајућих аминокиселинских секвенци са секвенцама депонованим у GenBank бази. С обзиром на показану конзервираност и специфичност за крпеље, извршен је одабир протеина, који су потом експримирани у бактеријском експресионом систему. Пречишћени рекомбинантни протеини су даље коришћени у детекцији маркера убода крпеља, тј. специфичних антитела развијених на убризгане протеине пљувачке током храњења крпеља, у серуму експериментално инфестираних домаћина и домаћина изложених крпељима у природном окружењу.

4.1 ЕКСПРЕСИЈА РЕКОМБИНАНТНИХ ПРОТЕИНА ПЉУВАЧКЕ КРПЕЉА *I. RICINUS*

4.1.1 Умножавање кодирајућих секвенци гена за протеине који се експримирају

Први корак у експресији рекомбинантних протеина пљувачке је било добијање комплетних кодирајућих секвенци гена који их кодирају. Оне су успешно умножене PCR методом, користећи претходно дизајниране прајмере и комплементарну ДНК добијену из формираних група прикупљених крпеља (Слика 10).





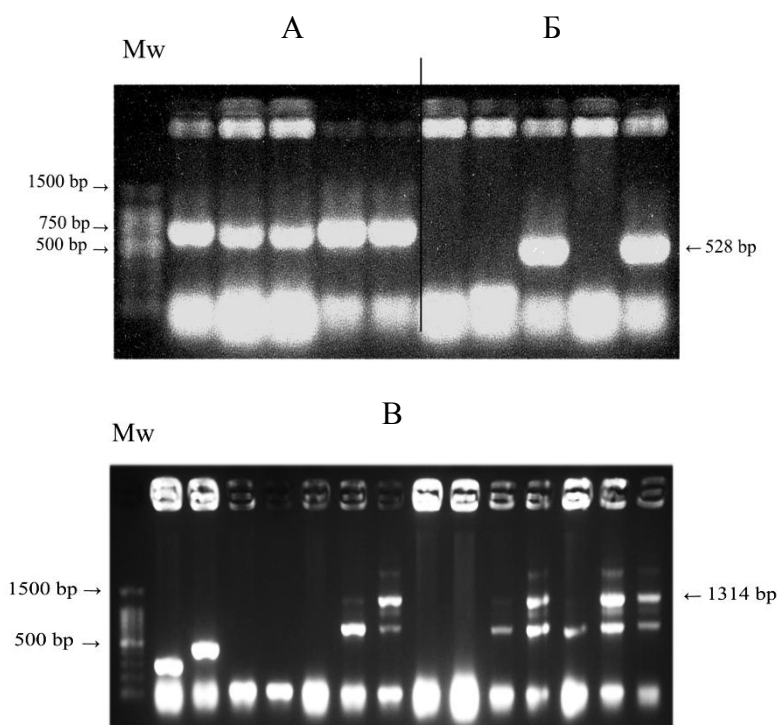
Слика 10. Умножене кодирајуће секвенце (А) *IrPA107* (408 bp), (Б) *IrAV422* (630 bp) и (В) *IrCAL* (1194 bp) PCR методом. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 - групе крпеља формиране према полу и локалитету прикупљања; Mw - маркер молекулске масе

Код свих група су успешно умножене кодирајуће секвенце одабраних протеина пљувачке, без обзира на пол крпеља и локалитет сакупљања. PCR продукти су изоловани из гела и коришћени у даљем раду.

4.1.2 Формирање експресионих вектора

4.1.2.1 Лигација кодирајућих секвенци у примарни вектор

Након умножавања и пречишћавања, кодирајуће секвенце су коришћене у лигационој реакцији са претходно припремљеним линеаризованим примарним плазмидом (pJET1.2/blunt Cloning Vector). Након инкубације, продукти лигационе реакције су коришћени за трансформацију компетентних *E. coli* JM107 ћелија. Потврда присуства одговарајуће кодирајуће секвенце у плазмиду је извршена „insert-check“ PCR-ом (Слика 11). Њиховим умножавањем, коришћењем pJET1.2 Forward и Reverse Sequencing прајмера, добија се фрагмент који је за 120 bp дужи од инсерта, те се траке за кодирајуће секвенце гена за протеине добијају на 528 bp за *IrPA107*, на 750 bp за *IrAV422* и на 1314 bp за *IrCAL*.



Слика 11. Потврда присуства кодирајућих секвенци (А) *IrAV422*, (Б) *IrPA107* и (В) *IrCAL* у pJET1.2/blunt Cloning Vector плазмиду у колонијама трансформисаних *E. coli* JM107 ћелија. Приказани су резултати „insert-check“ PCR-а. Mw - маркер молекулске масе

4.1.2.2 *Анализа кодирајућих нуклеотидних и одговарајућих аминокиселинских секвенци*

Кодирајуће секвенце присутне у примарним векторима су секвенциране да би се утврдиле разлике које постоје између секвенци за анализиране протеине у овој студији и секвенци депонованих у GenBank бази, тј. да би се утврдила евентуална варијабилност одабраних протеина пљувачке унутар врсте *I. ricinus* и између различитих врста и родова тврдих крпеља. Резултати су показали присуство интра- и интерспецијске варијабилности у испитиваним секвенцама протеина пљувачке крпеља.

За *IrPA107* (Слика 12), утврђено је 12 варијабилних нуклеотидних секвенци, при чему су идентификоване четири репрезентативне (присутна сва детектована полиморфна нуклеотидна места), две са локалитета Кошутњак и две са локалитета Бованско језеро. У нуклеотидним секвенцама за *PA107* је детектовано 10 полиморфних нуклеотидних позиција, од којих су само три биле интраспецијске за врсту *I. ricinus*. У одговарајућим аминокиселинским секвенцама су детектоване три варијабилне позиције, од којих је само једна била интраспецијска за врсту *I. ricinus* (позиција 76, где су присутни аргинин или метионин).

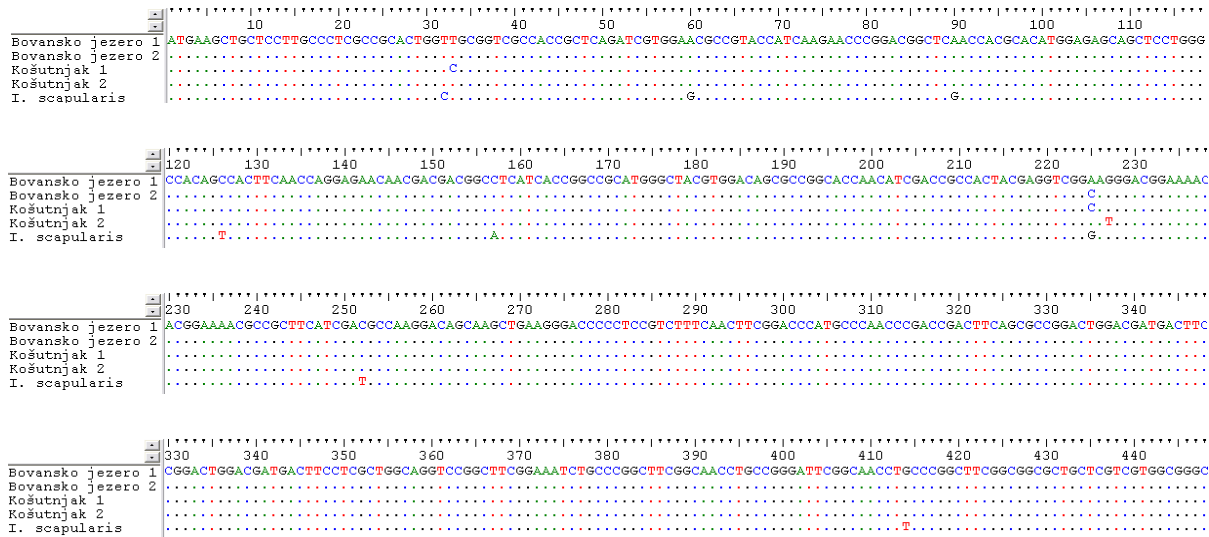
За *IrAV422* (Слика 13), добијено је укупно 14 варијабилних нуклеотидних секвенци, при чему је идентификовано шест репрезентативних, пет са локалитета Кошутњак и једна са локалитета Бованско језеро. У нуклеотидним секвенцама за *AV422* је детектовано 17 полиморфних позиција, од којих је 10 било интраспецијско за врсту *I. ricinus*. У одговарајућим аминокиселинским секвенцама је детектовано девет полиморфних позиција, свих девет интраспецијских за врсту *I. ricinus*.

За *IrCAL* (Слика 14), добијено је укупно 15 варијабилних нуклеотидних секвенци, при чему су идентификоване четири репрезентативне, три са локалитета Кошутњак и једна са локалитета Ресавица. У нуклеотидним секвенцама за *CAL* је детектовано 34 полиморфне позиције, од којих је 19 било интраспецијско за врсту *I. ricinus*. У одговарајућим аминокиселинским секвенцама су детектоване три полиморфне позиције, све три интраспецијске за врсту *I. ricinus*.

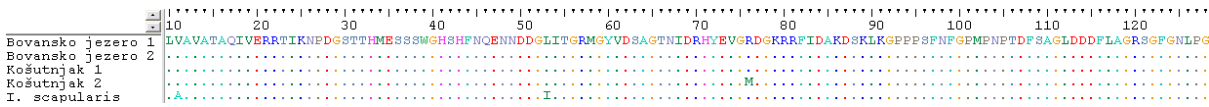
Анализа добијених нуклеотидних секвенци је показала да је пропорција полиморфних нуклеотидних позиција у оквиру добијених секвенци најмања код секвенце

за *IrPA107* (3/456) и износи 0.007, док је код *IrAV422* (10/690) и *IrCAL* (19/1242) иста и износи 0.015.

А



Б

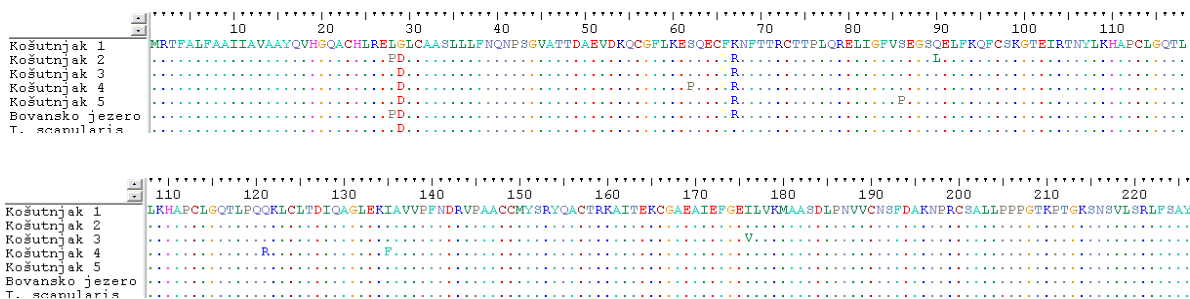


Слика 12. Варијабилност (А) кодирајућих нуклеотидних и (Б) одговарајућих аминокиселинских секвенци протеина пљувачке *IrPA107*

А

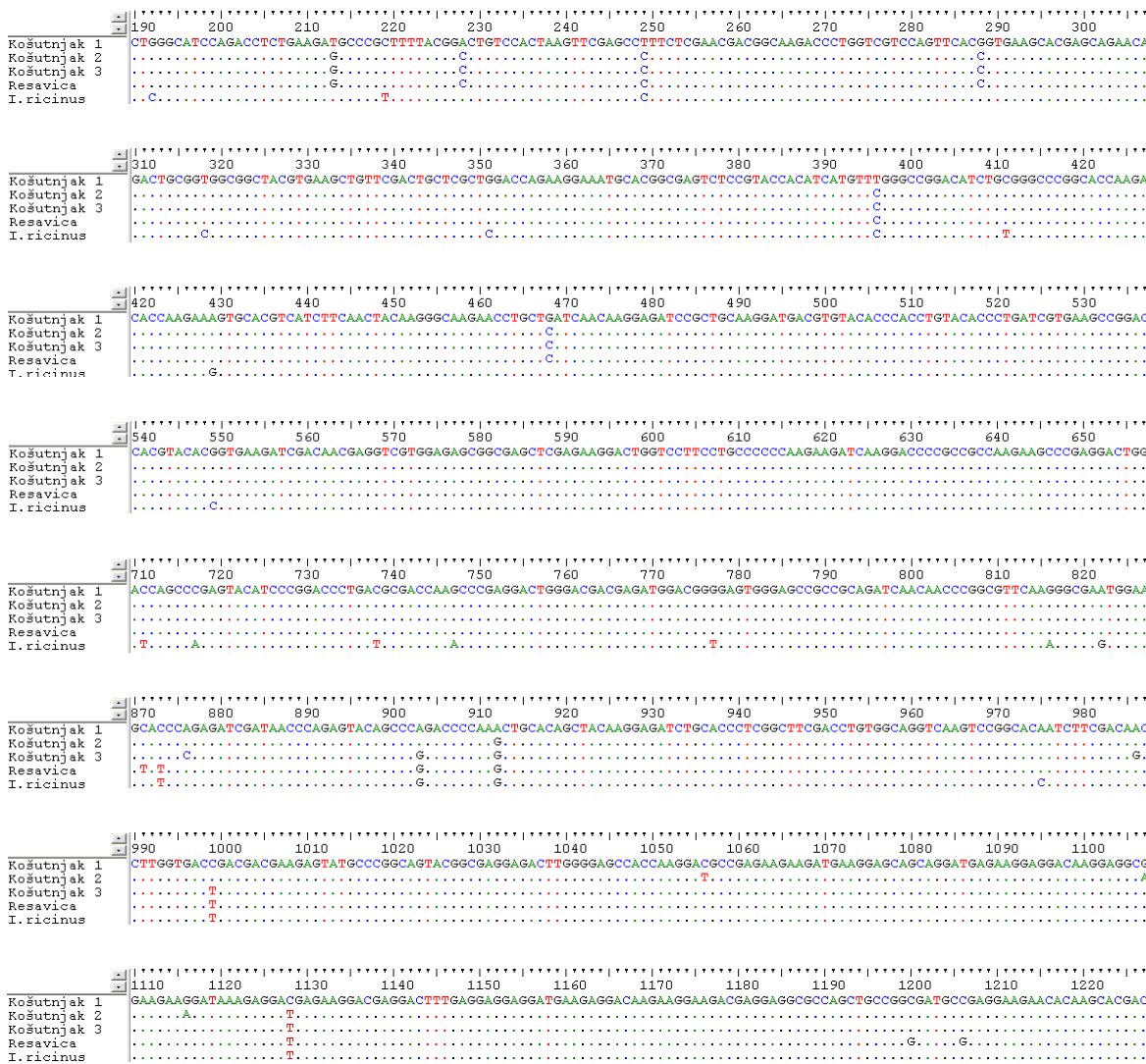


Б

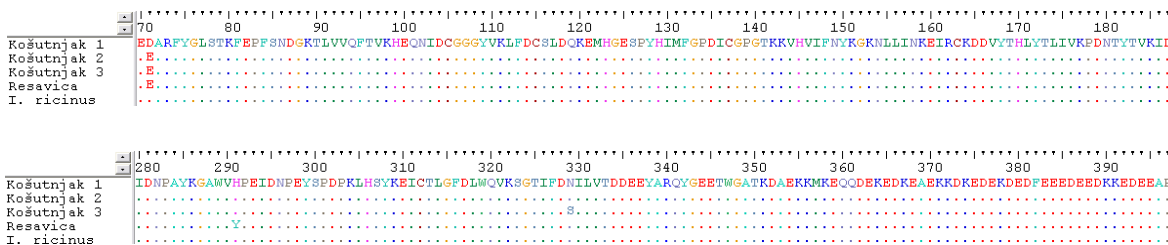


Слика 13. Варијабилност (А) кодирајућих нуклеотидних и (Б) одговарајућих аминокиселинских секвенци протеина пљувачке *IrAV422*

А

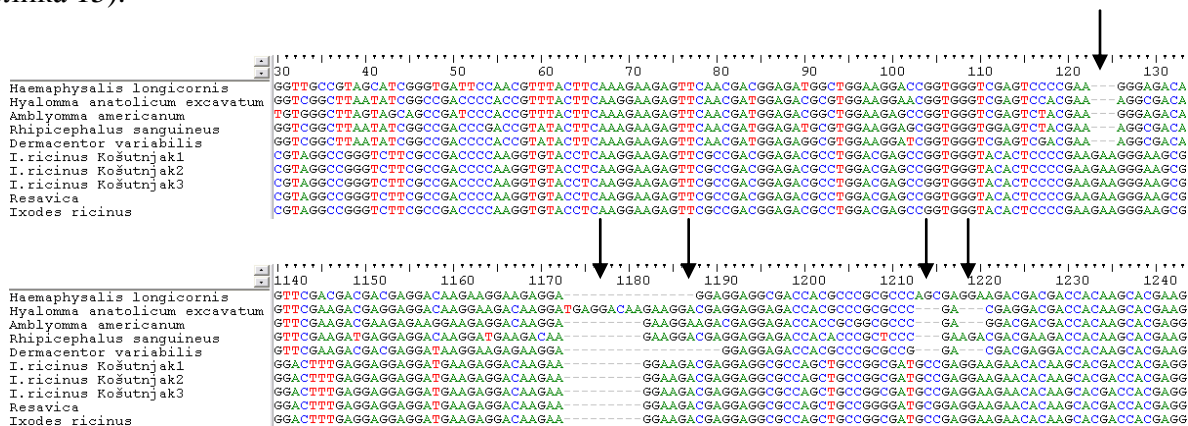


Б



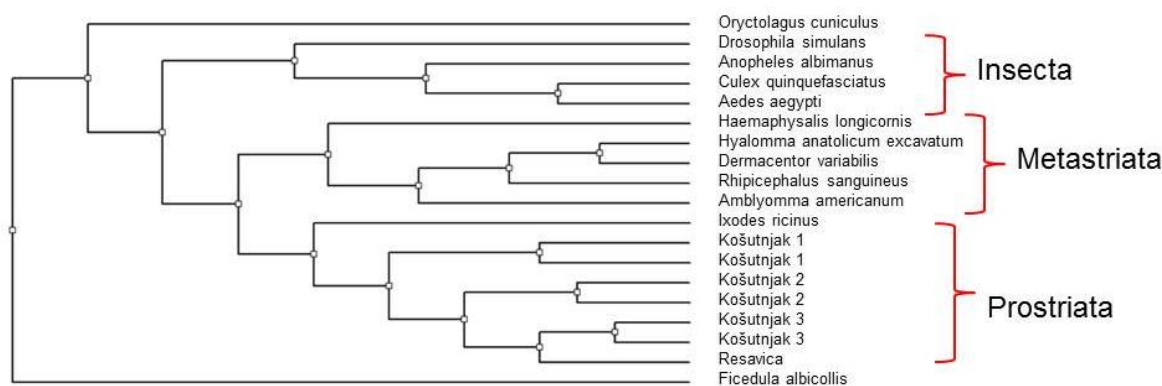
Слика 14. Варијабилност (А) кодирајућих нуклеотидних и (Б) одговарајућих аминокиселинских секвенци протеина пљувачке *IrCAL*

Поређењем добијених секвенци за *IrCAL* и хомологих секвенци из других родова крпеља, уочене су празнине дуге по три нуклеотида или по неколико тринуклеотида (Слика 15).



Слика 15. Поређење добијених секвенци за *IrCAL* са секвенцама из других родова крпеља депонованих у GenBank бази података. Стрелицама су обележене празнине дуге по три нуклеотида или по неколико тринуклеотида.

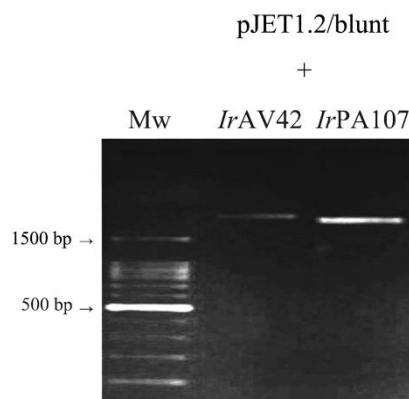
Како је CAL опште заступљен протеин еукариота, извршено је поређење одговарајућих аминокиселинских секвенци из различитих врста крпеља, инсеката, птице и сисара и формирано филогенетско стабло (Слика 16).



Слика 16. Филогенететско стабло базирано на одговарајућим аминокиселинским секвенцама *IrCAL*, формираним на основу нуклеотидних секвенци добијених у овој студији и хомологих секвенци из различитих родова крпеља, инсеката и секвенци из птице *Ficedula albicollis* и сисара *Oryctolagus cuniculus* као „out“ група, депонованих у GenBank бази података.

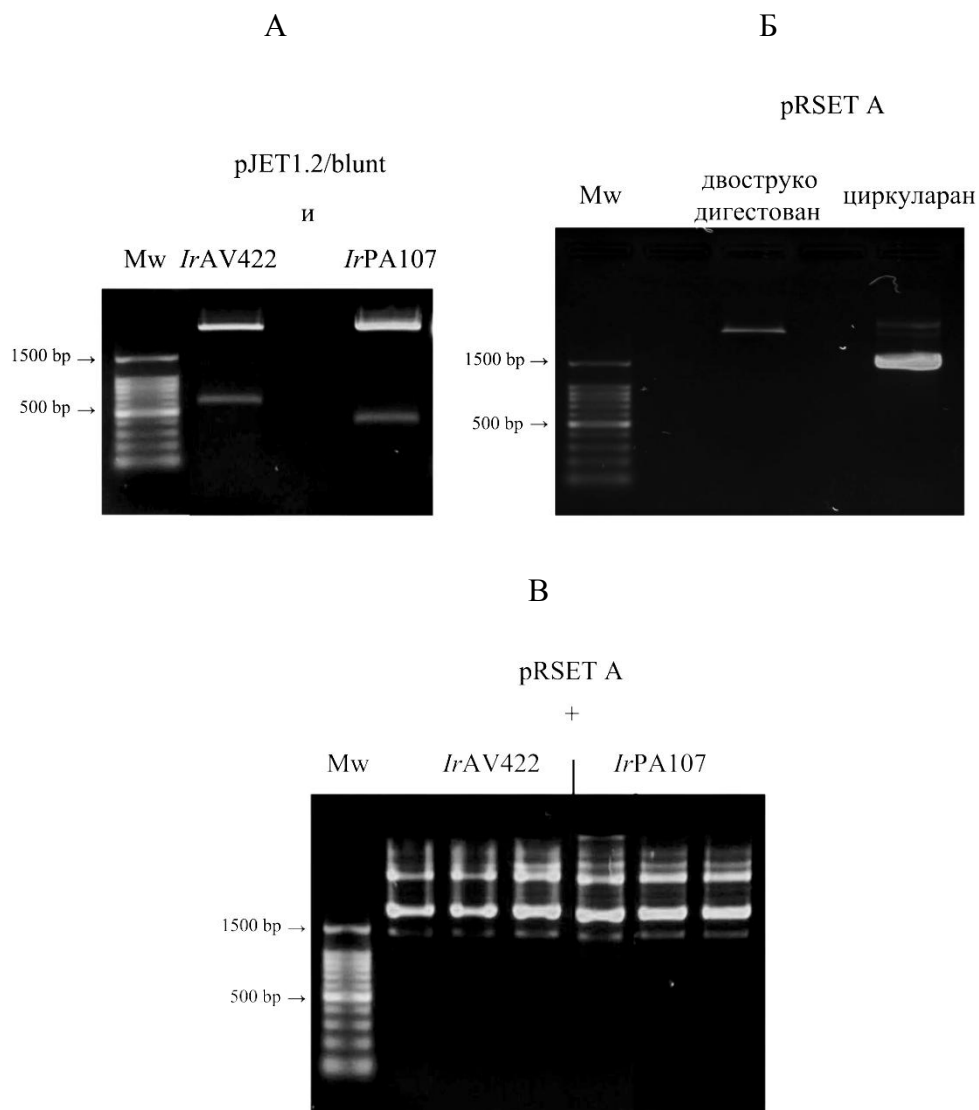
4.1.2.3 Добијање експресионих вектора

Колоније бактеријских ћелија у којима је доказано присуство адекватних примарних вектора умножавањем „insert-check“ PCR-ом, су даље гајене у течной хранљивој подлози и након умножавања ћелија из њих су изоловани и пречишћени плазмиди (Слика 17).



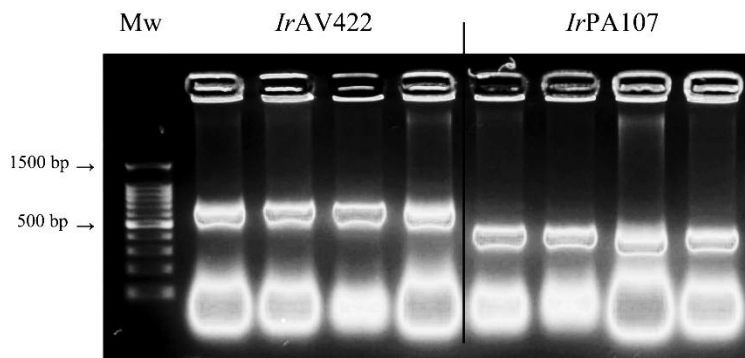
Слика 17. Пречишћени и концентровани примарни вектори. Разлике у висинама трака одговарају разлици у дужини кодирајућих секвенци *IrPA107* и *IrAV422*. Mw - маркер молекулске масе

Примарни вектори и експресиони вектор pRSET A су потом подвргнути двострукој дигестији рестрикционим ензимима *Bam*HI и *Eco*RI (Слика 18А и Б), како би се добили компатибилни лепљиви крајеви. Рекомбинантни експресиони вектори су формиранли лигацијом кодирајућих секвенци гена за протеине пљувачке крпеља *I. ricinus* у отворене векторе pRSET A (Слика 18В).



Слика 18. Формирање експресионих вектора. (А) двоструко дигестовани примарни вектори, тј. плаزمиди који садрже кодирајуће секвенце за *IrAV422* и *IrPA107*; (Б) двоструко дигестовани и циркуларан експресиони вектор pRSET A; (В) рекомбинантни експресиони вектори. Mw - маркер молекулске масе

Након трансформације компетентних One Shot TOP10F' ћелија, присуство експресионих конструката у њима је доказано „insert-check“ PCR-ом (Слика 19).



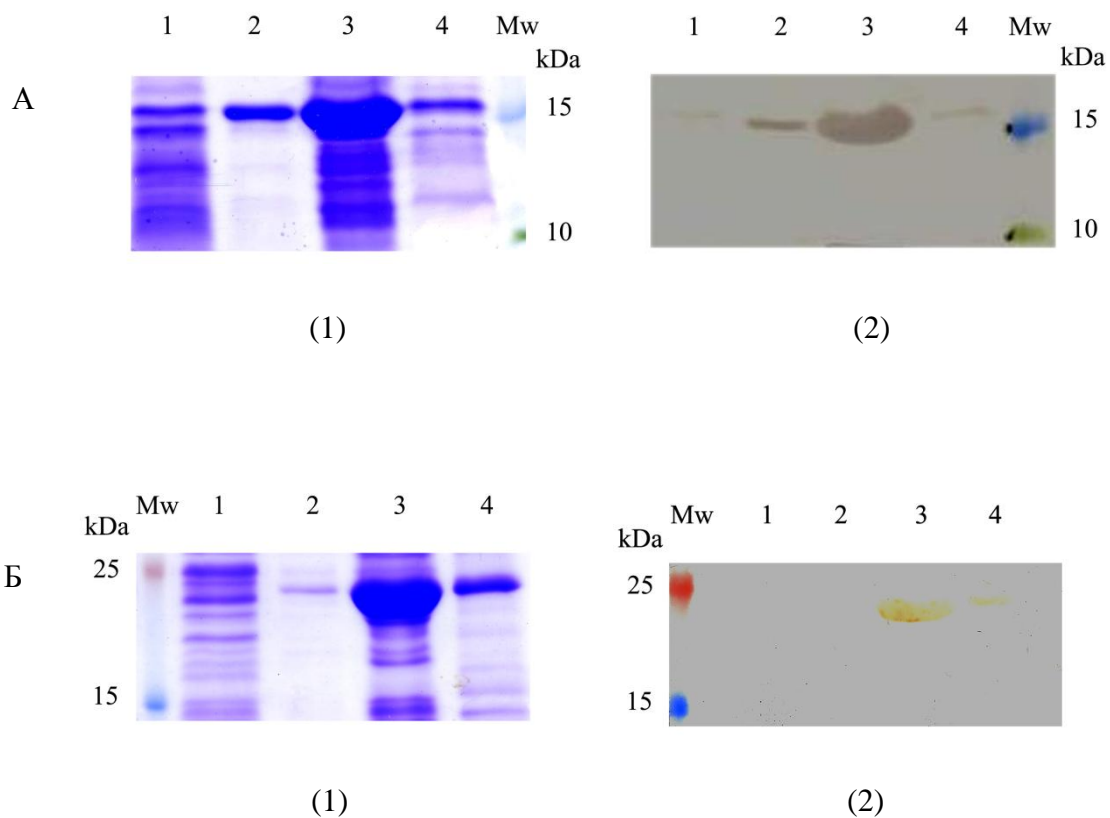
Слика 19. Потврда присуства експресионих вектора у колонијама трансформисаних ћелија „insert-check“ PCR методом. Mw - маркер молекулске масе

Експресиони вектори су секвенцирани да би се потврдила адекватна инсерција кодирајућих секвенци у експресиони вектор, тј. да се провери оријентација кодирајуће секвенце и да ли је она у оквиру читања са N-терминалним фузионисаним пептидом. Колоније бактерија које су садржавале исправно добијене експресионе векторе су пресејане и даље гајене у течној хранљивој подлози и након умножавања су из њих изоловани експресиони вектори. Њима су, након пречишћавања, трансформисане BL21(DE3)pLysS бактеријске ћелије у којима ће се индуковати експресија рекомбинантних протеина пљувачке крпеља.

4.1.2.4 Експресија, изолација и пречишћавање рекомбинантних протеина из лизата бактеријских ћелија

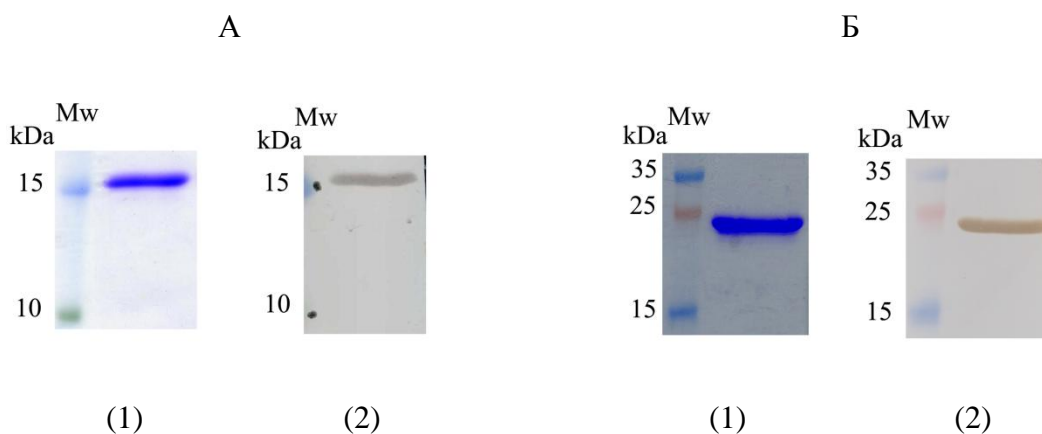
Експресија рекомбинантних форми *IrPA107* и *IrAV422* протеина је хемијски индукована у трансформисаним ћелијама. Након времена потребног да се рекомбинантни протеин синтетише у бактеријским ћелијама, оне су биле подвргнуте механичкој и хемијској лизи, тј. разбијањем ћелија сонификацијом у адекватном пуферу. На крају су добијене четири фракције ћелијског лизата, које су представљале супернатант прикупљан након центрифугирања ресуспендованих лизираних ћелија у PBS-у. Изузетак је представљала трећа по реду добијена фракција лизата, добијена након центрифугирања лизираних ћелија у денатуришућем пуферу који је садржавао уреу. У добијеним фракцијама лизата је потом проверено присуство и принос експримираног рекомбинантног протеина. То је постигнуто неспецифичним бојењем гела након

електрофорезе СВВ бојом, и специфичним доказивањем присуства рекомбинантног протеина, помоћу антитела специфичног за полихистидински пептидни фузионисани наставак, Western blot анализом. У све четири фракције лизата бактеријских ћелија неспецифичним бојењем гелова након електрофорезе је показано присуство протеинских трака, за које је Western blot анализом специфично показано да одговарају рекомбинантним протеинима *IrPA107* и *IrAV422* (Слика 20). Највећи принос рекомбинантних протеина је био у трећој фракцији лизата, добијеној након инкубације у денатуришућем пуферу са уреом. Експресија рекомбинантних протеина није детектована у неиндукованој култури трансформисаних бактеријских ћелија.



Слика 20. Доказивање присуства експримираних рекомбинантних протеина (А) *IrPA107* и (Б) *IrAV422* у фракцијама лизата бактеријских ћелија, (1) неспецифично, бојењем гела СВВ бојом и (2) специфично, Western blot анализом са специфичним антителом на полихистидински пептидни фузионисани наставак. Mw - маркер молекулске масе

У трећој фракцији лизата је био највећи принос рекомбинантног протеина, у оба случаја, због чега су и *IrPA107* и *IrAV422* даље изоловани из ове фракције елуцијом, након раздвајања SDS-PAGE електрофорезом и полусувог трансфера на PVDF мембрану. Чистоћа изолованих рекомбинантних протеина је проверена бојењем гела након SDS-PAGE електрофорезе, а затим и Western blot анализом (Слика 21).



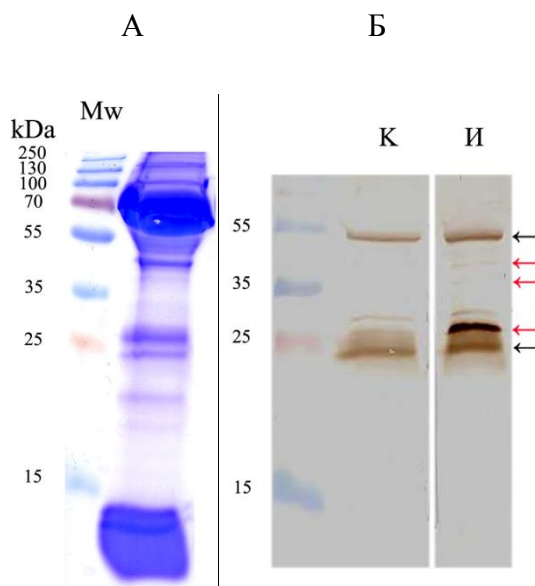
Слика 21. Провера чистоће рекомбинантних протеина (А) *IrPA107* и (Б) *IrAV422* након елуције са PVDF мембране, (1) бојењем гела СВВ бојом након раздвајања протеина SDS-PAGE електрофорезом и (2) Western blot анализом користећи специфично антитело на полихистидински наставак. Mw - маркер молекулске масе

4.2 ИСПИТИВАЊЕ РЕАКТИВНОСТИ СЕРУМА ДОМАЋИНА СА РЕКОМБИНАНТНИМ ПРОТЕИНИМА ПЉУВАЧКЕ КРПЕЉА *I. RICINUS*

4.2.1 Испитивање реактивности серума експерименталних домаћина са екстрактом укупних протеина насисаних ларви

Након комплетирања крвног obroка, насисане ларве *I. ricinus* су се одвајале од пацова, након чега су биле прикупљане и из њих је извршена екстракција укупних протеина, који су раздвојени SDS-PAGE електрофорезом у редукујућим условима (Слика 22А). Покретање хуморалног одговора на убризгане протеине пљувачке крпеља је процењено испитивањем реактивности изолованих серума пацова са екстрактом укупних протеина насисаних ларви (Слика 22Б). Обрасци реактивности серума пацова на коме су

храњене ларве и серума који је послужио као негативна контрола, садрже заједничке траке (око 25 и 50 kDa) које вероватно одговарају лаким и тешким ланцима имуноглобулина пацова, који су унети крвним оброком. Међутим, додатне траке у обрасцу реактивности серума инфицираног пацова одговарају протеинима пљувачке крпеља на које су се развила специфична антитела, при чему се трака, која се јавила у нивоу молекулске масе од приближно 25 kDa, посебно истиче.

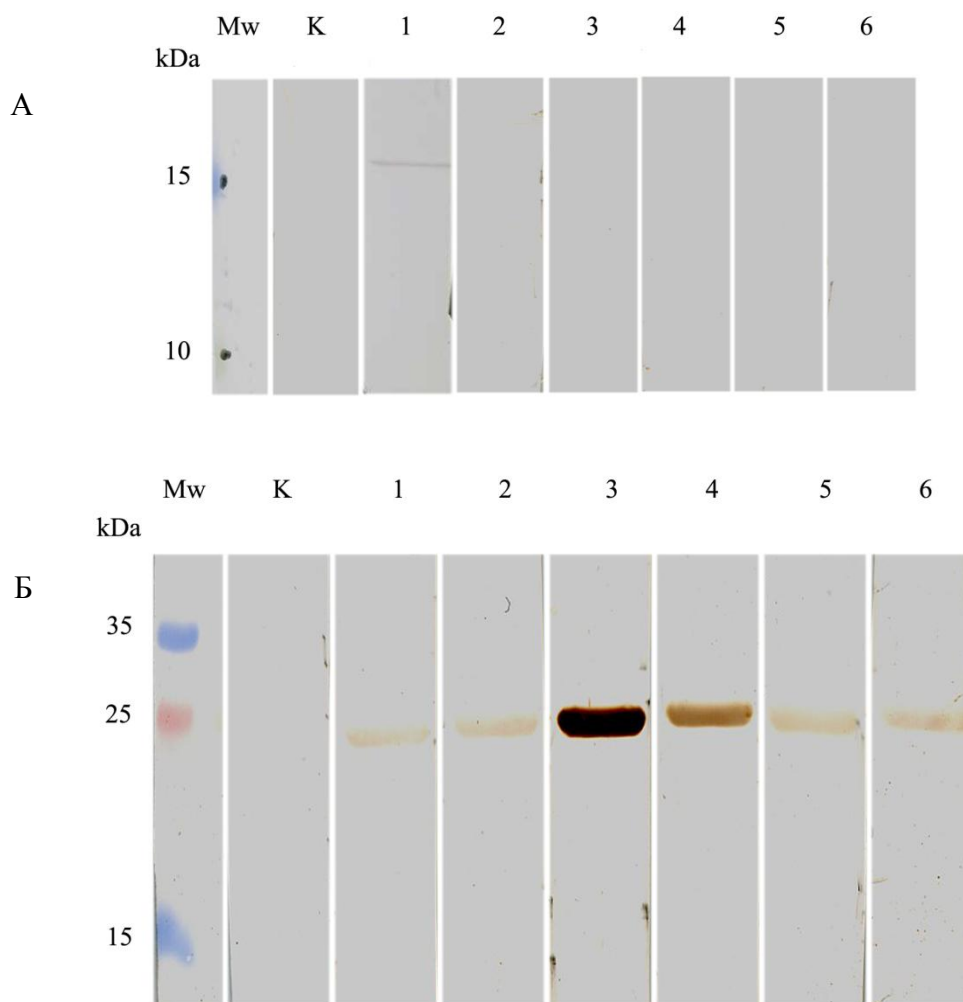


Слика 22. (А) Протеински профил насисаних ларви *I. ricinus*, након храњења на пацовима. (Б) Разлика у реактивности серума пацова који је инфициран ларвама крпеља (И) и пацова који није био изложен убуду крпеља (К), са екстрактом укупних протеина насисаних ларви. Црним стрелицама су обележене траке присутне у обрасцу реактивности оба типа серума, а црвеним траке које су се јавиле само код испитивања серума инфицираних животиња. Mw - маркер молекулске масе

4.2.2 Испитивање реактивности серума експерименталних домаћина са рекомбинантним протеинима пљувачке крпеља *I. ricinus*

Серуми пацова који су коришћени за експерименталну инфестацију крпељима су испитивани на присуство анти-*IrPA107* и анти-*IrAV422* антитела, као маркера убода крпеља. Од свих шест пацова који су послужили као домаћини ларвама *I. ricinus*, у серуму само једног је детектовано присуство анти-*IrPA107* антитела, док су остали били

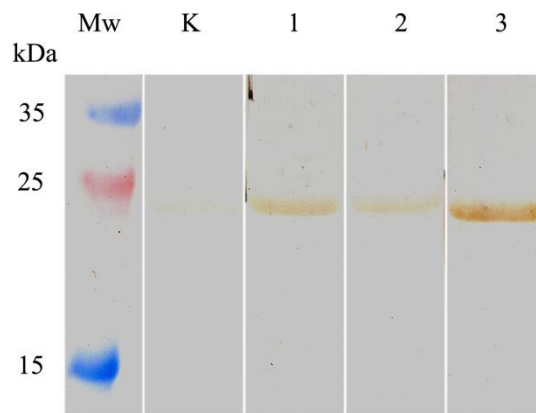
нерактивни (Слика 23А). За разлику од тога, у серумима свих пацова су детектована анти-*IrAV422* антитела (Слика 23Б).



Слика 23. Испитивање реактивности серума пацова који су послужили као домаћини ларвама *I. ricinus* (1-6) и контролног серума (К) са (А) *rIrPA107* и (Б) *rIrAV422*.

Mw - маркер молекулске масе

Да би се утврдило да ли *rIrAV422* унакрсно реагује са антителима развијеним на хомологи протеин из пљувачке врсте *D. reticulatus*, крпеља из групе *metastriata*, даље се испитала реактивност серума пацова на којима су храњене ларве ове врсте са *rIrAV422*. Присуство антитела специфичних за хомологи протеин је детектовано у серумима сва три пацова (Слика 24).

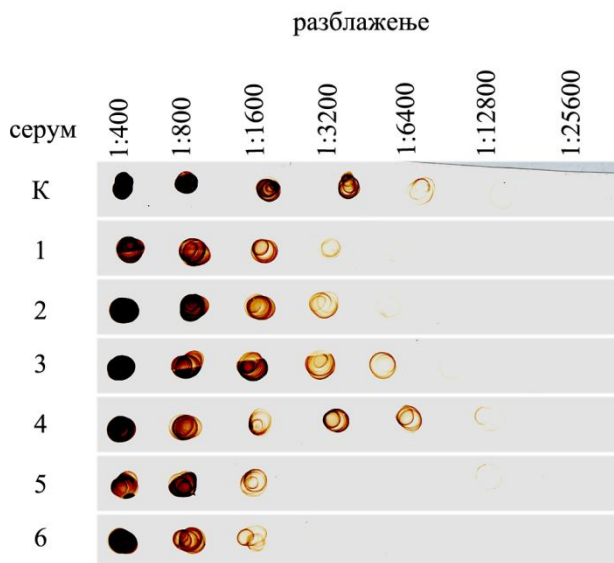


Слика 24. Испитивање реактивности серума пацова који су послужили као домаћини ларвама *D. reticulatus* (1-3) и контролног серума (K) са rIrAV422.

Mw - маркер молекулске масе

4.2.3 Одређивање укупног садржаја IgG у серумима пацова

Индивидуалне имунолошке варијабилности пацова такође могу да утичу на интензитет реактивности серума. Да би се добиле информације о хуморалном имунском статусу индивидуалних експерименталних животиња које су послужиле као домаћини ларвама *I. ricinus* и да би се додатно потврдила специфичност реакције рекомбинантних протеина пљувачке са антителима развијеним на протеине пљувачке, одређен је садржај укупних IgG у серумима dot blot анализом (Слика 25). Количина укупних IgG се разликовала међу анализираним животињама. У већини случајева је повећан садржај укупних IgG код инфицираних животиња пратио повећање интензитета реактивности серума са rIrAV422, што није био случај са контролним серумом, где, без обзира на несмањени садржај укупних IgG, није било реактивности са rIrAV422.

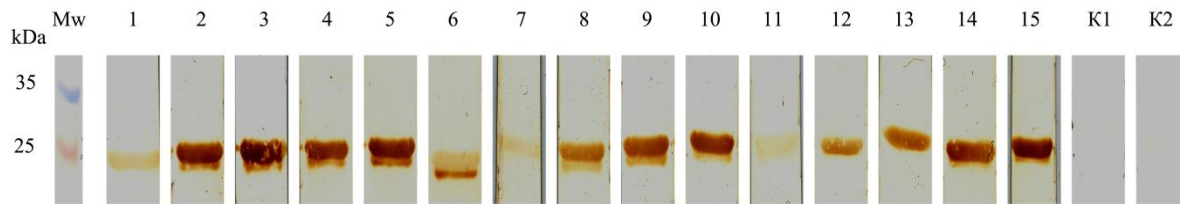


Слика 25. Dot-blot титрација серума пацова на којима су се храниле ларве *I. ricinus* (1-6) и контролног серума (К) у циљу одређивања укупних IgG, користећи антитело специфично за IgG пацова

4.2.4 Испитивање реактивности серума ловачких паса са *rIrAV422*

Ловачки пси представљају добру индикаторску групу за процену изложености крпељима, услед веће изложености њима током активности у које су укључени.

Присуство специфичних антитела развијених на хомологе AV422 из различитих врста крпеља којима су ови пси били изложени, је детектовано у серумима свих 15 паса, коришћењем пречишћеног *rIrAV422*, док су контролни серуми били нереактивни (Слика 26). Серореактивност се разликовала међу псима и није се могла повезати ни са једним од параметара као што су раса, пол и старост. Уочена је мање интензивна реактивност код паса који су заштићени дугорочно против ектопаразита (Табела 1, пси 1, 7 и 11).



Слика 26. Испитивање реактивности серума ловачких паса (1-15) са *rIrAV422*.

K1 и K2 - контролни серуми; Mw - маркер молекулске масе

5 ДИСКУСИЈА

У овој студији је испитиван потенцијал рекомбинантних протеина пљувачке крпеља *I. ricinus* за детекцију специфичних антитела као маркера убода крпеља.

Улога крпеља у преносу патогена, узрочника бројних обољења људи и животиња, је значајна услед широког спектра домаћина на којима могу да паразитирају. Одсуство дигестивних ензима у лумену црева крпеља, односно унутарћелијска дигестија крвног оброка, омогућава лакше опстајање великог броја различитих патогена у њима као векторима, укључујући различите вирусе, бактерије и протозојске паразите, што повећава значај крпеља као ефикасних вектора. *I. ricinus* представља најзначајнију врсту у Европи са медицинског аспекта, с обзиром да је ова врста крпеља компетентан вектор и резервоар великог броја различитих патогена и да је присутна на територији практично целог континента.

Ентомолошке студије крпеља и њихових популација указују на ширење различитих врста у Европи, пре свега *I. ricinus*, *D. reticulatus* и *R. sanguineus* као главних векторских врста (**Vu Hai et al.**, 2014). Упоредо са експанзијом крпеља, повећан је и ризик од убода и инфекције ширих популација људи и животиња патогенима које они преносе, што потврђује повећана инциденца болести чије узрочнике преносе крпељи (**Paddock & Telford**, 2011; **Rizolli et al.**, 2011; **Hubalek & Rudolf**, 2012). Тиме се намеће потреба за поузданим начином за процену изложености крпељима и ризика од убода код популација потенцијалних домаћина, како би се разјаснила епидемиолошка ситуација и дефинисале стратегије за бољу контролу ових болести, што је посебно значајно у ендемским подручјима за поједина обољења. У медицинској пракси, потврда убода крпеља би допринела бржем постављању дијагнозе и примени одговарајућег терапијског протокола, како је то анамнестички податак који често недостаје. Такође, детекција сваког убода, укључујући и убоде крпеља који нису комплетирали крвни оброк, је од изузетног значаја за процену ризика од инфекције, с обзиром да је различитим патогенима потребно различито време од тренутка причвршћивања на кичмењачког домаћина да отпочну трансмисију. То време за већину патогена износи више од 24 h, при чему оно може значајно да варира и у оквиру истог рода патогена. Генерално, најкраће време од убода

крпеља је потребно за пренос вируса. На пример, Повасански вирус (енгл. Powassan Virus) започиње трансмисију 15-30 min након причвршћивања крпеља (**Richards et al.**, 2017). Како већина болести чије узрочнике преносе крпељи има неспецифичан клинички ток, успостављање дијагнозе може да буде отежано. Узимајући у обзир и да већина убода крпеља прође неопажено од стране пацијената услед неосетног убода и малих димензија крпеља, додатно је наглашена важност детекције свих убода крпеља за адекватно и благовремено лечење.

Студије су показале да се на компоненте пљувачке различитих хематофагних зглавкара, укључујући комарце, буве и крпеље, развијају антитела у организму домаћина (**Bosio et al.**, 2014; **Hemme et al.**, 2016). Метод са великим апликативним потенцијалом у потврди и процени претходне изложености крпељима јесте детекција и квантификација специфичних антитела развијених на протеине пљувачке, као маркера убода (**Alarcon-Chaidez et al.**, 2006). Присуство антитела у серуму пацијената који још увек не показују знаке обољевања, може значајно да утиче на успешност лечења. То је очигледно код лајмске борелиозе, најзначајније болести чије узрочнике преносе крпељи на северној хемисфери. Инциденца овог обољења броји десетине хиљада нових случајева сваке године у Европи и Северној Америци (**Krupka et al.**, 2007). Акутна фаза болести се карактерише неспецифичним симптомима сличним грипу. Уколико болест не буде дијагностикована у раним фазама, спирохете се системски дисеминују и клинички ток болести прелази у хроничну фазу. Нелечену болест карактеришу конкретнији, али и даље недовољно специфични симптоми, попут артритиса, кожних, неуролошких или срчаних компликација, у зависности од врсте борелија која је узрочник. Услед способности борелија да перзистирају у латентном стању, код неких пацијената се развија хронична инфекција упркос антибиотској терапији. Скрининг серума пацијената на присуство антитела специфичних за протеине пљувачке крпеља би поспешио диференцијалну дијагностику лајмске борелиозе у раним фазама развоја болести, а благовремена и ефикасна терапија антибиотцима би спречила компликацију клиничког стања пацијента. Предност детекције маркера убода крпеља у епидемиолошким истраживањима, у односу на друге приступе, се огледа у стандардизацији. На пример, праћење изложености и инциденце убода крпеља на исти начин током дужег временског периода би омогућило поређење, чиме би епидемиолошки надзор болести чије узрочнике преносе крпељи био

поузданији. Употреба rIrAV422, рекомбинантне форме протеина AV422 *I. ricinus*, за детекцију маркера убода крпеља у серуму експериментално инфестираних домаћина и домаћина изложених крпељима у природном окружењу се показала у овој студији као поуздан метод потврде претходних убода и инфестираности крпељима, како код експерименталних, тако и код природно изложених животиња.

Коришћење рекомбинантних протеина пљувачке за развој поузданог теста којим би се процењивала претходна изложеност крпељима има неколико предности у односу на коришћење екстраката целих пљувачних жлезда као извора антигена. Оне се пре свега огледају у специфичности и могућности стандардизације таквог приступа. Међутим, проблем који настаје јесте одабир адекватног протеина у комплексној смеши каква је пљувачка крпеља. У пљувачним жлездама се експримира мноштво протеина, који се сврставају у неколико фамилија према структури и функцији. Притом, функционална и структурна карактеризација већине ових протеина тек предстоји. Протеински састав пљувачке се мења у току храњења (**Gregson**, 1967; **McSwain et al.**, 1982; **Kaufman**, 1989; **Ribeiro et al.**, 2006), као и током животног циклуса крпеља (**Tirloni et al.**, 2015) услед чега варирају и антигени који бивају убризгани у домаћина. Различит временски образац њихове експресије током дугог времена потребног за узимање крвног obroка код тврдих крпеља, огледа се у варијабилности кодирајућих секвенци и различитим функцијама дуплицираних гена насталих током дуге еволутивне историје крпеља (**Valenzuela et al.**, 2002; **Narasimhan et al.**, 2007). Промене у обрасцу транскрипције протеина пљувачке код тврдих крпеља могу да буду и последица различитих услова храњења, попут доступности различитих кичмењачких домаћина (**Tirloni et al.**, 2015). Због динамичке природе протеома пљувачке, неопходно је идентификовати протеине који се секретују током храњења свих развојних стадијума већине, или свих родова тврдих крпеља, тј. издвојити оне који су конзервирани и који врше кључне функције у узимању крвног obroка.

Због тога су за испитивање потенцијала рекомбинантних протеина пљувачке крпеља *I. ricinus* за детекцију специфичних антитела као маркера убода крпеља у овој студији одабрани CAL, који је један од највише изучаваних протеина пљувачке у контексту процене изложености крпељима, и протеини PA107 и AV422, који су структурно и функционално делимично окарактерисани, али показују висок степен конзервираниости међу крпељима и чија је експресија повишена током излагања

стимулусима за храњење. Хомолози PA107 и AV422 из крпеља *I. ricinus* до сада нису анализирани. У литератури постоје подаци да CAL и AV422 поседују антигенске детерминанте и индукују хуморални имунски одговор домаћина, док такви подаци за PA107 још увек не постоје.

Као први корак у избору адекватног протеина за развој теста за поуздану детекцију маркера убода крпеља у овој студији је била анализа конзервираности одабраних протеина плувачке, тј. анализа варијабилности кодирајућих нуклеотидних и одговарајућих аминокиселинских секвенци. Утврђено је да је кодирајућа секвенца за *IrPA107* еволутивно конзервирана од оних које кодирају *IrAV422* и *IrCAL*, што је илустровано и на пептидном нивоу, где је детектована само једна аминокиселинска замена у оквиру добијених секвенци за *I. ricinus*. Конзервираност у кодирајућим секвенцама имплицира очуваност функције и присуство истих антигенских детерминанти овог протеина код различитих родова крпеља. Поређењем добијених секвенци за *IrCAL* у овој студији и секвенци за CAL из других родова крпеља, утврђен је приближан степен сличности као и у студији **Xu et al.** (2005). Аутори су испитивали конзервираност овог протеина код четири врсте тврдих крпеља из *prostriata* и *metastriata* групе и показали су да су аминокиселинске секвенце 77-98% међусобно идентичне, што је прилично висок степен конзервираности у поређењу са већином протеина плувачке крпеља. Међутим, присуство инсерција и делеција у кодирајућим секвенцама за CAL различитих група крпеља, показано у овој студији, може да буде од значаја за имуногени потенцијал, с обзиром да су те разлике представљене празнинама дугим по три нуклеотида или неколико тринуклеотида, а које могу да се одсликају на пептидном нивоу у оквиру важних антигенских детерминанти. С обзиром на битне улоге у храњењу и трансмисији патогена (**Jaworski et al.**, 1995; **Kaewhom et al.**, 2008; **Michalak et al.**, 2009) и изражена антигена својства, CAL је један од највише изучаваних протеина плувачке у контексту процене изложености крпељима (**Sanders et al.**, 1998; **Alarcon-Chaidez et al.**, 2006; **Vu Hai et al.**, 2013). Међутим, недовољна специфичност која га карактерише и унакрсна реактивност са антителима развијеним на епитопе антигена неких ендопаразита (**Jaworski et al.**, 1996; **Xu et al.**, 2005; **Kim et al.**, 2015), указују да CAL није погодан кандидат за развој специфичног теста за потврду убода крпеља. У прилог томе иде и чињеница да почиње да се секретује тек трећег дана храњења (**Jaworski et al.**, 1995), тј. детекцијом анти-CAL антитета се не би

детектовали убоди крпеља који су били причвршћени краће од тог периода, а што је довољно време за трансмисију већине патогена на кичмењачког домаћина. Ипак, иако CAL није специфичан за крпеље, због убиквитарне заступљености код еукариота, овај протеин може да послужи у истраживањима еволутивних процеса и филогенетских односа. Због наведених карактеристика секвенци за CAL, даљи рад је фокусиран на експресију рекомбинантних протеина специфичних за крпеље, PA107 и AV422, из врсте *I. ricinus*, за које је анализа варијабилности секвенци показала већи или исти степен конзервираности у односу на убиквитарно заступљени CAL.

Рекомбинантне форме PA107 и AV422 протеина пљувачке крпеља *I. ricinus* су експримиране у бактерији *E. coli*, као експресионом систему. Припремљене компетентне ћелије су трансформисане експресионим векторима, тј. конструктима плаزمида који садрже кодирајуће секвенце протеина пљувачке крпеља. Како синтетисани рекомбинантни протеини нису садржавали сигналну секвенцу за транспорт из ћелије, задржавали су се у бактеријама и нису били присутни у хранљивом медијуму. Зато је изолација рекомбинантних протеина захтевала претходну лизу бактеријских ћелија.

Након механичке лизе, уследила је хемијска лиза која је резултирала добијањем четири фракције ћелијских лизата. Највећи принос rIrAV422 и rIrPA107 је био у фракцији лизата добијеној након растварања ћелијског талога у денатуришућем пуферу са уреом. Уреа ремети водоничне везе и хидрофобне интеракције унутар протеина и међу њима. У довољно високим концентрацијама нарушава секундарну структуру протеина, чинећи претходно нерастворљиве протеине растворљивим. Висок принос PA107 у фракцији лизата након третмана уреом, указује на велико учешће хидрофобних интеракција у успостављању његове структуре. Хомолог AV422 из врсте *A. americanum* је окарактерисан као хидрофобни протеин са седам дисулфидних веза (Mulenga et al., 2013), што објашњава највећу концентрацију rIrAV422 управо у фракцији лизата добијеној након инкубације у денатуришућем пуферу који је садржавао уреу. Овакви налази о биохемијским карактеристикама протеина пљувачке ближе објашњавају механизме њихове реактивности и доприносе ширем сагледавању њихових могућих улога у узимању крвног obroка.

Домаћин реагује на убод и храњење крпеља, активирајући различите одбрамбене механизме. Са становишта дугорочне заштите и стварања меморије у односу на антигене

убризгане као компоненте пљувачке, важну улогу у одбрани домаћина игра хуморални одговор, тј. стварање специфичних антитела. Потенцијал различитих протеина пљувачке да индукују развој антитела, која се могу користити као маркери убода крпеља, варира у зависности од њихове имуногености. Испитивањем реактивности серума пацова који је послужио као експериментални домаћин ларвама *I. ricinus* са екстрактом укупних протеина насисаних ларви, утврђено је да је дошло до покретања хуморалног имунског одговора на убод ларви. Western blot анализа је показала присуство неколико идентичних трака код контролног серума и серума инфестираног пацова, које вероватно потичу од реактивности IgG пацова из крвног оброка и антитела које је коришћено за детекцију маркера убода крпеља, специфичног за лаке и тешке ланце IgG пацова. Међутим, додатне траке у обрасцу реактивности серума инфестираног пацова одговарају протеинима пљувачке крпеља на које су се развила специфична антитела. Пошто су за инфестацију пацова коришћене ларве крпеља, а не адулти, током њиховог храњења је збирно убризгана мања количина пљувачке, тј. нижа концентрација антигена за покретање хуморалног одговора домаћина. То може да буде објашњење за одсуство већег броја трака, тј. одсуство разноврснијег хуморалног одговора и развоја антитела специфичних за већи број протеина пљувачке. Трака у Western blot анализи серума пацова који је био инфестиран ларвама, која се јавила у нивоу молекулске масе од приближно 25 kDa се посебно истиче. Ова трака потенцијално потиче од интеракције са *IrAV422*, с обзиром на његову израчунату молекулску масу од око 27 kDa.

Критеријуми при одабиру протеина пљувачке крпеља за детекцију маркера убода крпеља у серуму експериментално инфестираних домаћина у овој студији су били да су секвенце које их кодирају конзервирани међу различитим родовима и да су специфични за крпеље. PA107 и AV422 су протеини који испуњавају те услове, с обзиром да су то конзервирани протеини пљувачке, чија је експресија повишена током фазе причвршћивања крпеља, када врше своје функције у узимању крвног оброка (**Mulenga et al.**, 2007). Висок степен конзервираниости њихових кодирајућих секвенци је показан и у овој студији, при чему је секвенца за PA107 најконзервиранија од три испитивана протеина пљувачке. Тиме је овај протеин пљувачке уједно и најпогоднији кандидат за развој специфичног теста за детекцију маркера убода крпеља. Међутим, од свих анализираних серума пацова, само један је био реактиван са *rIrPA107*, тј. само у њему су

детектована анти-*IrPA107* антитела. Добијени резултати указују на недовољну сензитивност евентуалног теста базираног на њему. Претпоставља се да *PA107* улази и у састав цементног чепа, чије формирање прати инсерцију хипостоме код већине тврдих крпеља и који омогућава додатно причвршћивање за домаћина. Могуће објашњење одсуства шире серореактивности у овој студији са *rIrPA107* може да представља чињеница да су за инфестацију пацова коришћене ларве *I. ricinus*, врсте из групе *prostriata*, чији припадници продукују мање протеина цементног чепа (**Francischetti et al.**, 2009). Други одабрани протеин, *AV422*, је секреторни конституент протеома плувачке специфичан за крпеље, идентификован код неколико родова крпеља и присутан у плувачки независно од развојног стадијума. Представља протеин плувачке који је укључен у битне процесе који омогућавају храњење крпеља, попут одлагања коагулације, инхибиције нагомилавања тромбоцита и активације комплемента, што је показано *in vitro* испитивањем рекомбинантне форме *AV422* крпеља *A. americanum* (**Mulenga et al.**, 2013). Значај *AV422* је наглашен и чињеницом да смањење његове експресије значајно редукује обим крвног obroка (**Mulenga et al.**, 2013). У овој студији је показано да *IrAV422*, убризган у домаћина као компонента плувачке током експерименталне инфестације ларвама крпеља, индукује развој специфичних анти-*IrAV422* антитела, која су детектована код свих инфестираних пацова помоћу рекомбинантне форме овог протеина, *rIrAV422*. Серум пацова на којем нису храњене ларве крпеља није показао реактивност са *rIrAV422*. Тиме је показано да овај конституент плувачке може да буде погодан за развој теста довољне сензитивности, али и специфичности, с обзиром да су убоди крпеља у овој студији једини разлог серореактивности.

Студија **Tirloni et al.** (2015) је показала да се протеински садржај плувачке *Ha. longicornis* мења током животног циклуса крпеља, при чему аутори наглашавају разлике, али и сличности између плувачке нимфи и адулта. Протеини идентификовани у оба развојна стадијума крпеља могу да буду укључени у важне процесе у храњењу, а тиме и да представљају добре таргете за развој вакцине против крпеља. У току ове студије, *rIrAV422* је добијен коришћењем секвенци из адулта, док су детектована антитела добијена као одговор на храњење ларви. Присуство *IrAV422* у плувачки независно од развојног стадијума, заједно са конзервираношћу кодирајућих секвенци и очуваношћу антигенских карактеристика, сугеришу да је *rIrAV422* добар кандидат за развој теста којим би се

проценила претходна изложеност крпељима. Њиме би се могли потврдити убоди како адулта, тако и јувенилних форми крпеља. Како се AV422 секретује у првих 24 сата храњења, детекцијом маркера помоћу *rIrAV422* би се потврдили и убоди крпеља који нису комплетирали крвни оброк, тј. који су се одвојили од домаћина пре комплетирања крвног obroка. С обзиром да се трансмисија вируса одвија убрзо након причвршћивања крпеља, употреба овог протеина у сврху дијагностике вирусних обољења може да буде посебно значајна.

Кодирајуће секвенце ортологих протеина плувачке из различитих врста крпеља, или чак и других зглавкара, могу да буду сличне до одређеног степена (**Ribeiro et al.**, 2010; **Vu Hai et al.**, 2013). Услед специфичности за крпеље и високе конзервираности, тест за потврду убода крпеља и процену изложености њима, базиран на *rIrAV422* би био поуздан због смањене могућности појаве лажно позитивних резултата проузрокованих унакрсном реактивношћу са антителима развијеним на компоненте плувачке других хематофагних зглавкара. Показана реактивност серума пацова који су послужили као домаћини ларвама *D. reticulatus* са *rIrAV422* у овој студији, указује на постојање специфичних антитела у серуму развијених на хомологи протеин плувачке из ове врсте крпеља, детектованих помоћу *rIrAV422*. Идентификација AV422 и њему сличних протеина у протеому плувачке крпеља је изузетно важна. Унакрсна реактивност *rIrAV422* са антителима развијеним на хомологи протеин из *D. reticulatus*, указује на могућност шире примене теста базираног на *rIrAV422*, тј. у контексту процене претходне изложености различитим врстама крпеља, како из групе *prostriata*, тако и из групе *metastriata*. Такође, широка заступљеност и конзервираност AV422 код крпеља имплицира да он учествује у регулацији битних процеса за успешност храњења, који су заједнички за различите родове.

Серуми свих анализираних пацова су били реактивни са *rIrAV422*, чиме је показана висока сензитивност у детекцији специфичних антитела као маркера убода крпеља. Међутим, иако су експерименталне инфестације пацова вршене уједначено, реактивност серума се разликовала међу пацовима, што се манифестовало различитим интензитетом специфичних трака у Western blot-у. То може да буде последица неколико фактора. Експерименталне инфестације ларвама се не могу стриктно контролисати. У тренутку њиховог постављања на домаћина, ларве се могу налазити у различитим фазама

активности и спремности за храњење. Стога је број прикачених ларви увек различит међу пацовима и мањи од броја постављених ларви, који је претходно дефинисан и исти за све пацове. Такође, у случајевима када инфестације следе једна другу, пацов почиње током времена да уклања ларве са себе непосредно након њиховог постављања, што је временом све израженије. Као крајњи резултат, укупан број ларви који је планиран за инфестацију се може знатно разликовати од броја ларви које комплетирају крвни оброк, што се опет разликује од пацова до пацова. Ипак, упркос различитом обиму збирних инфестација којима су индивидуални пацови били изложени, маркери убода су детектовани код свих, показујући тиме употребу *rIrAV422* у детекцији маркера високо сензитивном и поузданом.

Поред разлика у обиму инфестација, тј. броју ларви које су биле причвршћене и/или комплетирале крвни оброк, анализирани пацови су се разликовали и у инхерентним имунолошким предиспозицијама, које су одраз индивидуалне варијабилности, без обзира што су сви били истог соја, пола и старости. Као процена индивидуалног хуморалног статуса одређен је садржај укупних IgG сваког пацова. Он се разликовао међу пацовима, а примећено је да су серуми код којих је регистрован виши титар укупних IgG у Western blot-у интензивније реаговали са *rIrAV422*. Контролни серум је био нереактиван, упркос високој концентрацији укупних IgG, тј. великој могућности неспецифичних унакрсних реакција. Одсуство неспецифичне реактивности, упркос високом садржају укупних IgG, додатно потврђује специфичност потврде убода крпеља користећи *rIrAV422*.

Испитивање реактивности серума пацова као експериментално инфицираних домаћина са *rIrPA107* и *rIrAV422*, је показало да је *rIrAV422* више специфичан и сензитиван у детекцији маркера убода крпеља. Због тога је уследила анализа његове употребе у процени претходне изложености крпељима домаћина у природном окружењу, испитивањем реактивности серума ловачких паса.

Како људи и пси често живе у непосредној близини, ове животиње могу да послуже за процену ризика од инфекције људи патогенима које преносе крпељи (**Fritz**, 2009). Као адекватна индикаторска (сентинел) група за ову сврху, посебно се издвајају ловачки пси (**Lim et al.**, 2010; **Hornok et al.**, 2013). Учешће у лову и чест боравак у природним стаништима, чине их подложнијим инфестацијама различитим врстама крпеља које су присутне на одређеном подручју. Понављани убоди и константна изложеност

протеинима пљувачке као антигенима, обезбеђују присуство специфичних антитела у серуму у довољним концентрацијама да буду детектована као маркери. Група анализираних паса се састојала од јединки оба пола, различитих раса и старости. Такође су се разликовали и по третираности препаратима против ектопаразита. Серуми свих паса из ове веома хетерогене групе су били реактивни са *rIrAV422*, чиме се указало на присуство специфичних антитела, која су развијена као одговор на убод крпеља. Поред показане сензитивности, одсуство реактивности контролних серума указује на специфичност потврде претходних инфестација крпељима, користећи *rIrAV422*.

Подаци везани за претходне инфестације су били доступни само као произвољне изјаве власника паса. Узорци крпеља сакупљених са паса нису били доступни за детерминацију. Према подацима из литературе, углавном адулти, али и нимфе 16 врста крпеља из родова *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor* и *Hyalomma* инфестирају псе у Европи, при чему су *I. ricinus*, *R. sanguineus* и *D. reticulatus* од највећег значаја у контексту дистрибуције, ветеринарског и зоонотског значаја (Shaw et al., 2001; Beugnet, 2002; Földvári & Farkas, 2005; Földvári et al., 2007; Coimbra-Dores et al., 2016). Ови крпељи су присутни у Србији и такође је забележено да инфестирају псе (Milutinović et al., 1998; Milutinović & Radulović, 2002; Potkonjak et al., 2016). Хомолози AV422 су идентификовани у протеомима пљувачке неколико врста које припадају различитим родовима, попут *Ixodes*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus* и *Haemaphysalis* (Radulović et al., 2014; Tirloni et al., 2014, 2015; Lewis et al., 2015; Kim et al., 2016). Серуми ловачких паса садрже антитела специфична за нативне хомологе пљувачке оних врста крпеља које су учествовале у претходним инфестацијама. С обзиром на то да су хомолози AV422 присутни у пљувачки крпеља који инфестирају псе и на показану унакрсну реактивност *rIrAV422* са антителима развијеним на хомолог из пљувачке *D. reticulatus* у овој студији користећи експериментално инфестиране животиње, реактивност серума анализираних паса потврђује могућу примену *rIrAV422* за процену изложености домаћина крпељима различитих врста.

Иако претходне инфестације крпељима нису пријављене од стране власника неких паса, с обзиром на њихову старост и боравак у природном окружењу током лова, може се претпоставити са великом вероватноћом да су раније били инфестирани крпељима. Интезивна серореактивност ових паса са *rIrAV422* недвосмислено указује на убоде

крпеља који су прошли неопажено од стране власника. Употреба *rIrAV422* у скринингу популација домаћина које су у ризику од убода крпеља може да представља поуздан начин за процену претходне изложености крпељима и евентуални ризик од инфекције патогенима које они преносе. Како већину болести чије узрочнике преносе крпељи не карактеришу специфични симптоми, додатно је наглашена важност потврде инфестираниости крпељима у студијама које испитују циклусе кружења патогена чији значај још није довољно испитан и испитују идентификацију њихових резервоара.

Сви анализирани пси су били клинички здрави, што је потврђено ветеринарским прегледом непосредно пре вађења крви. Активно су учествовали у лову на разну дивљач током целе године, тј. током периода активности различитих врста и стадијума крпеља. На тај начин су били константно изложени протеинима пљувачке као антигенима током убода и храњења крпеља. Понављана изложеност протеинима пљувачке, попут „booster“ ефекта приликом ревакцинације, осигурава константно присуство антитела у серуму у детектабилним концентрацијама. Интензитет реактивности серума са *rIrAV422* се разликовао међу псима. Поред индивидуалних имунолошких карактеристика и варијабилности, примећене разлике у реактивности могу да буду последица кинетике развоја хуморалног одговора у домаћину и могу да укажу на временски оквир употребе специфичних антитела као маркера. Разлог слабије реактивности могу да буду мање масивне инфестације. Такође, третман репелентним средствима, без обзира на начин примене, може да угрози „booster“ ефекат поновљених убода. Постоји приметна разлика у реактивности серума између паса који су третирали средствима за дугорочну заштиту („spot-on“ препарати и огрлице) од оних третирали производима за краткорочну заштиту (спорадични третмани купкама и спрејевима), без обзира на разлике у активним састојцима коришћених производа. Узимајући у обзир наведене могуће ефекте различитих фактора, може се закључити да реактивност серума паса са *rIrAV422* зависи од бројних параметара, од којих су само неки идентификовани. Додатна истраживања су неопходна за квантификацију детекције маркера убода, у циљу одређивања периода протеклог од убода крпеља и обима претходних инфестација.

*

У овој студији је испитиван потенцијал рекомбинантних протеина плувачке крпеља *I. ricinus* за детекцију специфичних антитела као маркера убода крпеља. Рекомбинантни протеини су експримирани у компетентним бактеријским сојевима. Експресија *rIrAV422* у еукариотским ћелијама, попут ћелија квасца, би евентуално представљала следећи корак у анализи карактеристика овог протеина, која би обезбедила синтезу посттранслационо модификованог протеина, сличнијег нативним формама по структури и имуногенском потенцијалу.

Истраживање антигенских карактеристика протеина плувачке доприноси и идентификацији нових таргета за развој ефикасне универзалне вакцине против крпеља. С обзиром на изузетну комплексност односа крпељ-домаћин, ефикасност одређене вакцине пре свега зависи од врсте крпеља, одабраног антигена, самог домаћина, као и географског подручја где је примењена, што се показало и приликом употребе прве синтетисане рекомбинантне вакцине против крпеља, иначе прве антиартроподне вакцине уопште, TickGARD 1994. године, развијене у циљу смањења инциденце бабезиозе код стоке (McMillen & Sumpio, 1995; de la Fuente & Kocan, 2003; Willadsen, 2004). Вакцинацијом би се деловало превентивно на инциденцу болести чије узрочнике преносе крпељи, што ће представљати један од императива здравствене заштите у будућности услед ширења крпеља и повећаног ризика од убода. Контрола инфестираности крпељима се данас врши пре свега употребом различитих акарицида. Највише се користе у сточној производњи, због великих губитака које инфестираност крпељима и болести чије узрочнике преносе узрокују. Међутим, њихову употребу карактерише неколико недостатака, попут развијања отпорности, штетног утицаја на животну средину и резидуалних појава у произведеној храни. Вакцинација би представљала ефикасан, специфичан и мање штетан метод у заштити од убода крпеља, а самим тим и од инфекције патогенима које они преносе. Поред заштите самог домаћина, вакцинацијом би се допринело успоравању даљег ширења патогена преко крпеља као вектора.

Да би универзална вакцина против крпеља била ефикасна, протеини који су најпогоднији кандидати за њен развој су они са израженим имуногенским својствима, присутни код већине медицински значајних родова крпеља, независно од развојног

стадијума. AV422 представља управо такав протеин и истраживања његових антигенских карактеристика доприносе напорима за развој ефикасне вакцине. У овој студији је показано да су хомолози секреторног протеина пљувачке AV422 различитих врста крпеља имуногени који индукују развој хуморалног одговора. С обзиром да се овај протеин пљувачке убризгава у домаћина у раним фазама храњења, тачније причвршћивања, да је специфичан за крпеље и еволутивно конзервиран, као и да учествује у процесима кључним за успешно храњење и комплетирање крвног оброка, независно од развојног стадијума, он представља протеин са значајним потенцијалом у истраживањима која за циљ имају развијање ефикасне вакцине против крпеља.

6 ЗАКЉУЧЦИ

- Анализа секвенци за калретикулин је показала да се између *prostriata* и *metastriata* група крпеља јављају разлике у виду инсерција и делеција дугих по три нуклеотида или неколико тринуклеотида, што може да буде од значаја за структуру антигенских детерминанти овог протеина код различитих родова крпеља. С обзиром да је калретикулин убиквитарни протеин еукариота и није специфичан за крпеље, може да послужи и у истраживањима еволутивних процеса и филогенетских односа.
- RA107 и AV422 су протеини пљувачке специфични за крпеље. Анализа секвенци *IrPA107* и *IrAV422* је показала да су еволутивно конзервирани, тако да антитела специфична за ове протеине могу да буду погодни маркери убода крпеља.
- Храњење ларви на пацовима је довело до покретања хуморалног имунског одговора, што је показано детекцијом неколико антитела специфичних за протеине пљувачке. Одсуство разноврснијег хуморалног имунског одговора може се објаснити чињеницом да су за инфестацију пацова коришћене ларве, а не адулти крпеља, током чијег храњења се у домаћина убризгава мања количина пљувачке, тј. мање протеина пљувачке као антигена.
- Испитивање реактивности серума пацова као експерименталних домаћина крпеља са *rIrPA107* је показало да овај протеин није погодан за детекцију маркера убода крпеља, с обзиром да није детектована шира серореактивност за овај протеин.
- Реактивност серума свих пацова на којима су храњене ларве *I. ricinus* и свих пацова на којима су храњене ларве *D. reticulatus*, са *rIrAV422* указује на високу сензитивност и широки потенцијал примене овог протеина у детекцији маркера убода различитих врста крпеља, услед показане унакрсне реактивности и конзервираности овог протеина пљувачке крпеља. Како је AV422 саставна

компонента протеома пљувачке и јувенилних и адултних крпеља, која се секретује у раној фази храњења, његов значај је још више наглашен, с обзиром да се могу детектовати убоди различитих развојних стадијума крпеља, као и оних који су се одвојили од домаћина пре комплетирања крвног оброка.

- Детекција маркера убода крпеља, употребом *rIrAV422*, у серумима ловачких паса као домаћина изложених крпељима у природним условима, показала се ефикасном и специфичном.

7 ЛИТЕРАТУРА

Аbbas АК, Lichtman АН, Pillai S (2016). Основна имунологија - Функционисање и поремећаји имунског система. Дата Статус, Београд

Alarcon-Chaidez F, Ryan R, Wikel S, Dardick K, Lawler C, Foppa IM, Tomas P, Cushman A, Hsieh A, Spielman A, Bouchard KR, Dias F, Aslanzadeh J, Krause PJ (2006). Confirmation of tick bite by detection of antibody to *Ixodes calreticulin* salivary protein. *Clin Vaccine Immunol* 13: 1217-1222

Allen JR (1973). Tick resistance: basophils in skin reactions of resistant guinea pigs. *Int J Parasitol* 3: 195-200

Almeras L, Fontaine A, Belghazi M, Bourdon S, Boucomont-Chapeaublanc E, Orlandi-Pradines E, Baragatti M, Corre-Catelin N, Reiter P, Pradines B, Fusai T, Rogier C (2010). Salivary gland protein repertoire from *Aedes aegypti* mosquitoes. *Vector-Borne Zoonot* 10: 391-402

Apanaskevich DA & Oliver JHJr (2014). Life cycles and natural history of ticks. In: *Biology of ticks* (eds. Sonenshine DE, Roe RM). Oxford University Press, New York, Vol. 1, p. 60, 68

Ashish Juncadella IJ, Garg R, Boone CD, Anguita J, Krueger JK (2008). Conformational rearrangement within the soluble domains of the CD4 receptor is ligand-specific. *J Biol Chem* 283: 2761-2772

Вalashov YS (1972). Blood sucking ticks (Ixodidae) - Vectors of disease of man and animals. *Misc Publ Entomol Soc Am* 8: 161-376

Balashov YS (1994). The role of the salivary glands in ixodid ticks (Ixodidae) in regulating their feeding process. *Parazitologiya* 28: 437-444

Bazovska S, Machacova E, Spalekova M, Kontrosova S (2005). Reported incidence of Lyme disease in Slovakia and antibodies to *B. burgdorferi* antigens detected in healthy population. Bratisl Lek Listy 106: 270-273

Beugnet F (2002). Guide to major vector-borne diseases. Merial, S.A.S., Lyon

Beugnet F & Marie JL (2009). Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. Vet Parasitol 163: 298-305

Bosio CF, Viall AK, Clayton O, Jarrett CO, Gardner D, Rood MP, Hinnebusch BJ (2014). Evaluation of the murine immune response to *Xenopsylla cheopis* flea saliva and its effect on transmission of *Yersinia pestis*. PLoS Neglect Trop D 8: 9, e3196

Briant KA & Marshall GS (2000). Clinical manifestations of tick-borne infections in children. Clin Diagn Lab Immunol 7: 523-527

Brossard M & Fivaz V (1982). *Ixodes ricinus* L.: mast cells, basophils and eosinophils in the sequence of cellular events in the skin of infested or re-infested rabbits. Parasitology 85: 583-592

Brossard M & Wikel SK (1997). Immunology of interactions between ticks and hosts. Med Vet Entomol 11: 270-276

Brossard M & Wikel SK (2004). Tick immunobiology. Parasitology 129 Suppl: S161-S176

Brown SJ & Askenase PW (1983). Immune rejection of ectoparasites (ticks) by T cell and IgG1 antibody recruitment of basophils and eosinophils. Fed Proc 42: 1744-1749

Burke G, Wikel SK, Spielman A, Telford SR, McKay K, Krause PJ (2005). Hypersensitivity to ticks and Lyme disease risk. Emerg Infect Dis 11: 36-41

Capelli G, Ravagnan S, Montarsi F, Ciocchetta S, Cazzin S, Porcellato E, Babiker AM, Cassin R, Salviato A, Cattoli G, Otranto D (2012). Occurrence and identification of risk areas of *Ixodes ricinus*-borne pathogens: a cost-effectiveness analysis in north-eastern Italy. Parasite Vector 5:

Christe M, Rutti B, Brossard M (1998). Susceptibility of BALB/c mice to nymphs and larvae of *Ixodes ricinus* after modulation of IgE production with anti-interleukin-4 or anti-interferon-gamma monoclonal antibodies. *Parasitol Res* 84: 388-393

Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers E W (2016). GenBank. *Nucleic Acids Res* 44 (Database issue): D67-D72. <http://doi.org/10.1093/nar/gkv1276>

Coimbra-Dores MJ, Nunes T, Dias D, Rosa F (2016). *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) species complex: morphometric and ultrastructural analyses. *Exp Appl Acarol* 70: 455-468

Danielova V, Rudenko N, Daniel M, Holubova J, Materna J, Golovchenko M, Schwarzova L (2006). Extension of *Ixodes ricinus* ticks and agents of tick-borne diseases to mountain areas in the Czech Republic. *Int J Med Microbiol* 296: S48-S53

Das S, Banerjee G, DePonte K, Marcantonio N, Kantor FS, 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

Dennis DT & Piesman J (2005). Overview of tick-borne infections of humans. In: *Tick-borne diseases of humans* (eds. Goodman JL, Dennis DT, Sonenshine DE). American Society of Microbiology, Washington DC, p. 3-11

Eggleton P & Michalak M (2003). Introduction to calreticulin. In: *Calreticulin* (eds. Eggleton P, Michalak M). Kluwer Academic Press, New York, p. 1-9

Ellis J, Oyston PCF, Green M, Titball RW (2002). Tularemia. *Clin Microbiol Rev* 15(4): 631-646

Estrada-Peña A & Jongejan F (1999). Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Exp Appl Acarol* 23(9): 685-715

Ferreira CAS, Vaz IDSJr, Da Silva SS, Haag KL, Valenzuela JG, Masuda A (2002). Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. *Exp Parasitol* 101: 25-34

Florio L, Miller MS, Mugrage ER (1950). Colorado tick fever: isolation of the virus from *Dermacentor andersoni* in nature and a laboratory study of the transmission of the virus in the tick. *J Immunol* 64: 257-263

Földvári G & Farkas R (2005). Ixodid tick species attaching to dogs in Hungary. *Vet Parasitol* 129: 125-131

Földvári G, Márialigeti M, Solymosi N, Lukács Z, Majoros G, Kósa JP, Farkas R (2007). Hard ticks infesting dogs in Hungary and their infection with *Babesia* and *Borrelia* species. *Parasitol Res* 101: 25-34

Fontaine A, Pascual A, Diouf I, Bakkali N, Bourdon S, Fusai T, Rogier C, Almeras L (2011). Mosquito salivary gland protein preservation in the field for immunological and biochemical analysis. *Parasit Vectors* 4: 33

Fontaine A, Fusai T, Briolant S, Buffet S, Villard C, Baudelet E, Pophillat M, Granjeaud S, Rogier C, Almeras L (2012). *Anopheles* salivary gland proteomes from major malaria vectors. *BMC Genomics* 13: 614

Francischetti IM, Sa-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JM (2009). The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci* 14: 2051-2088

Fritz CL (2009). Emerging tick-borne diseases. *Vet Clin N Am-Small* 39: 265-278

de la Fuente J & Kocan KM (2003). Advances in the identification and characterization of protective antigens for recombinant vaccines against tick infestations. *Expert Rev Vaccines* 2: 583-593

de la Fuente J, Estrada-Peña A, Venzal JM, Kocan KM, Sonenshine DE (2007). Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front Biosci* 13: 6938-6946

Galbe J & Oliver JHJr (1992). Immune response of lizards and rodents to larval *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 29: 774-783

Ganapamo F, Rutti B, Brossard M (1995). In vitro production of interleukin-4 and interferon- γ by lymph node cells from BALB/c mice infested with nymphal *Ixodes ricinus* ticks. Immunology 85: 120-124

Garg R, Juncadella IJ, Ramamoorthi N, Ashish Ananthanarayanan SK, Thomas V, Rincon M, Krueger JK, Fikrig E, Yengo CM, Anguita J (2006). Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15. J Immunol 177: 6579-6583

Gillespie RD, Dolan MC, Piesman J, Titus RG (2001). Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. J Immunol 166: 4319-4326

Gray J (2002). Biology of *Ixodes* species ticks in relation to tick-borne zoonoses. Wien Klin Wochenschr 114/13-14: 473-478

Gregson JD (1967). Observations on the movement of fluids in the vicinity of the mouthparts of naturally feeding *Dermacentor andersoni* Stiles. Parasitology 57: 1-8

Guglielmone AA., Robbins RG, Apanaskevich DA, Petney TN, Estrada- Peña A, Horak IG, Shao R, Barker SC (2010). The Argasidae, Ixodidae and Nutalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. Zootaxa 2528: 1-28

Hajnická V, Kocáková P, Sláviková M, Slovák M, Gašperík J, Fuchsberger N, Nuttall PA (2001). Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. Parasite Immunol 23: 483-489

Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser 41: 95-98

Heinze DM, Carmical JR, Aronson JF, Thangamani S (2012a). Early immunologic events at the tick-host interface. PLoS One 7(10): e47301

Heinze DM, Wikel SK, Thangamani S, Alarcon-Chaidez FJ (2012). Transcriptional profiling of the murine cutaneous response during initial and subsequent infestations with *Ixodes scapularis* nymphs. *Parasit Vectors* 5: 26

Hemme RR, Poole-Smith BK, Hunsperger EA, Felix GE, Horiuchi K, Biggerstaff BJ, Lopez-Ortiz R, Barrera R (2016). Non-human primate antibody response to mosquito salivary proteins: Implications for dengue virus transmission in Puerto Rico. *Acta Trop* 164: 369-374

Hildebrandt A, Gray SJ, Hunfeld KP (2013). Human babesiosis in Europe: what clinicians need to know. *Infection* 41: 1057-1072

Hornok S, Dénes B, Meli ML, Tánczos B, Fekete L, Gyuranecz M, de la Fuente J, Fernández de Mera IG, Farkas R, Hofmann-Lehmann R (2013). Non-pet dogs as sentinels and potential synanthropic reservoirs of tick-borne and zoonotic bacteria. *Vet Microbiol* 167: 700-703

Hovius JWR, Levi M, Fikrig E (2008). Salivating for knowledge: Potential pharmacological agents in tick saliva. *PLoS Med* 5: 2, e43

Hovius JWR (2009). Spitting Image: Tick saliva assists the causative agent of Lyme disease in evading host skin's innate immune response. *J Invest Dermatol* 129: 2337-2339

Hubalek Z & Rudolf I (2012). Tick-borne viruses in Europe. *Parasitol Res* 111: 9-36

Hynes WL (2014). How ticks control microbes. In: *Biology of ticks* (eds. Sonenshine DE, Roe RM). Oxford University Press, New York, Vol. 2, p. 132

Ibelli AMG, Kim TK, Hill CC, Lewis LA, Bakshi M, Miller S, Porter L, Mulenga A (2014). A blood meal-induced *Ixodes scapularis* tick saliva serpin inhibits trypsin and thrombin, and interferes with platelet aggregation and blood clotting. *Int J Parasitol* 44: 369-379

Inokuma H, Mukai M, Ohno K, Yamamoto Y, Takahashi S, Onishi T (1999). Duration of antibodies against 24 kD protein of *Rhipicephalus sanguineus* extract in dogs infested with the adult ticks. *J Vet Med Sci* 61: 179-181

Inokuma H, Ohno K, Onishi T (2000). Is the detection of anti-*Rhipicephalus sanguineus* (Rs24p) antibodies a valuable epidemiological tool of tick infestation in dogs? *Vet Res* 31: 365-369

Jaworski DC, Simmen FA, Lamoreaux W, Coons LB, Muller MT, Needham GR (1995). A secreted calreticulin protein in Ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. *J Insect Physiol* 41: 369-375

Jaworski DC, Higgins JA, Radulović Š, Vaughan JA, Azad AF (1996). Presence of calreticulin in vector fleas (Siphonaptera). *J Med Entomol* 33: 482-489

Jongejan F & Uilenberg G (2004). The global importance of ticks. *Parasitology* 129: S3-14

Jore S, Viljugrein H, Hofshagen M, Brun-Hansen H, Kristoffersen AB, Nygard K, Brun E, Ottesen P, Saevik BK, Ytrehus B (2011). Multi-source analysis reveals latitudinal and altitudinal shifts in range of *Ixodes ricinus* at its northern distribution limit. *Parasit Vectors* 4: 84

Kaewhom P, Stich RW, Needham GR, Jittapalapong S (2008). Molecular analysis of calreticulin expressed in salivary glands of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* indigenous to Thailand. *Ann NY Acad Sci* 1149: 53-57

Kashino S, Resende J, Sacco AMS, Rocha C, Proença L, Carvalho WA, Firmino AA, Queiroz R, Benavides M, Gershwin LJ, De Miranda Santos IKF (2005). *Boophilus microplus*: The pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. *Exp Parasitol* 110: 12-21

Kaufman WR (1989). Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. *Parasitology today* 5: 47-56

Kazimírová M (2008). Pharmacologically active compounds in tick salivary glands. *Advances in Arachnology and Developmental Biology. Monographs* 12: 281-296

Kazimírová M & Štibrániová I (2013). Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Front Cell Infect Microbiol* 3(43): 1-19

Kim TK, Ibelli AMG, Mulenga A (2015). *Amblyomma americanum* tick calreticulin binds C1q but does not inhibit activation of the classical complement cascade. *Ticks Tick-Borne Dis* 6: 91-101

Kim TK, Tirloni L, Pinto AFM, Moresco J, Yates JR III, Vaz IdSJr, Mulenga A (2016). *Ixodes scapularis* tick saliva proteins sequentially secreted every 24 h during blood feeding. *PLoS Neglect Trop D* doi:10.1371/journal.pntd.0004323

Kjemtrup A & Conrad PA (2000). Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *Int J Parasitol* 30: 1323-1337

Korch GWJr (1994). Geographic dissemination of tick-borne zoonoses. In: *Ecological dynamics of tick-borne zoonoses* (eds. Sonenshine DE, Mather TN). Oxford University Press, New York, p. 139-197

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

Krupka M, Raska M, Belakova J, Horynova M, Novotny 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* 152(2): 175-186

Kung F, Anguita J, Pal U (2013). *Borrelia burgdorferi* and tick protein supporting pathogen persistence in the vector. *Future Microbiol* 8: 41-56

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

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

Lewis L, Radulović Ž, Kim TK, Porter LM, Mulenga A (2015). Identification of 24 h *Ixodes scapularis* tick saliva proteins. Ticks Tick-Borne Dis 6: 424-434

Lim S, Irwin PJ, Lee SR, Oh MH, Ahn KS, Myung BY, Shin SS (2010). Comparison of selected canine vector-borne diseases between urban animal shelter and rural hunting dogs in Korea. Parasit Vector 3: 32

Lledo L, Gegundez MI, Saz JV, Beltran M (2004). Screening of the prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in Madrid province, Spain. Eur J Epidemiol 19: 471-472

Lledo L, Gegundez MI, Fernandes N, Sousa R, Vicente J, Alamo R, Fernandez-Soto P, Perez-Sanchez R, Bacellar F (2006). The seroprevalence of human infection with *Rickettsia slovaca*, in an area of northern Spain. Ann Trop Med Parasitol 100: 337-343

McMillen MA & Sumpio BE (1995). Endothelins: polyfunctional cytokines. J Am Coll Surg 180: 621-637

McSwain JL, Essenberg RC, Sauer JR (1982). Protein changes in the salivary glands of the female lone star tick, *Amblyomma americanum*, during feeding. J Parasitol 68: 100-106

Medlock JM, Hansford KM, Bormane A, Derdakova M, Estrada-Peña A, George JC, Golovljova I, Jaenson TG, Jensen JK, Jensen PM, Kazimirova M, Oteo JA, Papa A, Pfister K, Plantard O, Randolph SE, Rizzoli A, Santos-Silva MM, Sprong H, Vial L, Hendrickx G, Zeller H, Van Bortel W (2013). Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. Parasit Vector 6: 1

Mehlhorn H (2016). Encyclopedia of parasitology. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg

Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M (2009). Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. Biochem J 417: 651-666

Milutinović M, Aleksić-Barkač N, Pavlović I (1998). Faunistic and ecological notes on ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) in the extended area of Belgrade. *Magy Allatorvosok* 120: 434-436

Milutinović M & Radulović Ž (2002). Ecological notes on ticks (Acari: Ixodidae) in Serbia (Central regions). *Acta Vet-Beograd* 52: 49-57

Милутиновић М, Радуловић Ж, Томановић С, Петровић З (2012). Крпељи (Acari: Ixodidae, Argasidae) Србије (ур. Анђелковић М). Српска академија наука и уметности, Београд, стр. 21, 29, 32, 38, 55, 176, 207, 209, 213

Mourya DT, Sapkal GN, Yadav PD (2016). Difference in vector ticks dropping rhythm governs the epidemiology of Crimean-Congo haemorrhagic fever and Kyasanur forest disease in India. *Indian J Med Res* 144(4): 633-635

Mulenga A, Blandon M, Khumthong R (2007). The molecular basis of the *Amblyomma americanum* tick attachment phase. *Exp Appl Acarol* 41: 267-287

Mulenga A, Kim TK, Ibelli AMG (2013). Deorphanization and target validation of cross-tick species conserved novel *Amblyomma americanum* tick saliva protein. *Int J Parasitol* 43: 439-451

Narasimhan S, Deponte K, Marcantonio N, Liang X, Royce TE, Nelson KF, Booth CJ, Koski B, Anderson JF, Kantor F, Fikrig E (2007). Immunity against *Ixodes scapularis* salivary proteins expressed within 24 hours of attachment thwarts tick feeding and impairs *Borrelia* transmission. *PLoS One* 2: e451

Nazzi F, Martinelli E, Del FS, Bernardinelli I, Milani N, Iob A, Pischutti P, Campello C, D'Agaro P (2010). Ticks and Lyme borreliosis in an alpine area in north-east Italy. *Med Vet Entomol* 24: 220-226

Nuttall PA & Jones LD (1991). Non-viraemic tick-borne virus transmission: mechanisms and significance. In: *Modern Acarology* (eds. Dusbabek F, Bukva V). Academia Prague and SPB Academic Publishing, The Hague, Vol. 2, p. 3-6

Nuttall PA & Labuda M (2008). Saliva-assisted transmission of tick-borne pathogens. In: Ticks: biology, disease and control (eds. Bowman AS, Nuttall PA). Cambridge University Press, Cambridge; New York, p. 205-219

Oteo JA & Portillo A (2012). Tick-borne rickettsioses in Europe. *Ticks Tick Borne Dis* 3: 271-278

Paddock CD & Telford III SR (2011). Through a glass, darkly: the global incidence of tick-borne diseases. In: Critical needs and gaps in understanding prevention, amelioration, and resolution of Lyme and other tick-borne diseases: The Short-Term and Long-Term Outcomes. Workshop Report. National Academies Press, Washington DC, p. 37

Parola P & Raoult D (2001). Ticks and tick-borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis* 32: 897-928

Parola P (2004). Tick-borne rickettsial diseases: emerging risks in Europe. *Comp Immunol Microb* 27: 297-304

Pavlidou V, Gerou S, Kahrmanidou M, Papa A (2008). Ticks infesting domestic animals in northern Greece. *Exp Appl Acarol* 45: 195-198

Pérez Vera C, Kapiainen S, Junnikkala S, Aaltonen K, Spillmann T, Vapalahti O (2014). Survey of selected tick-borne diseases in dogs in Finland. *Parasit Vector* 7: 285

Pluta S, Hartelt K, Oehme R, Mackenstedt U, Kimmig P (2010). Prevalence of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp. in ticks and rodents in southern Germany. *Ticks Tick-Borne Dis* 1: 145-147

Poinsignon A, Cornélie S, Mestres-Simon M, Lanfrancotti A, Rossignol M, Boulanger D, Cisse B, Sokhna C, Arcà B, Simondon F, Remoué F (2008). Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to *Anopheles* bites. *PLoS One* 3: e2472

Померанцев БИ (1950). Фауна СССР. Паукообразные. Иксодовые клещи (Ixodidae) (ур. Павловский ЕН, Штакельберг АА). Академ. Наук. СССР, Москва-Ленинград (на русском)

Potkonjak A, Gutiérrez R, Savić S, Vračar V, Nachum-Biala Y, Jurišić A, Kleinerman G, Rojas A, Petrović A, Baneth G, Harrus S (2016). Molecular detection of emerging tick-borne pathogens in Vojvodina, Serbia. *Ticks Tick-Borne Dis* 7: 199-203

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1987). The anti aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* 92: 639-646

Radulović ŽM, Kim TK, Porter LM, Sze SH, Lewis L, Mulenga A (2014). A 24-48 h fed *Amblyomma americanum* tick saliva immune-proteome. *BMC Genomics* 15: 518

Radulović ŽM & Mulenga A (2017). Heparan sulfate/heparin glycosaminoglycan binding alters inhibitory profile and enhances anticoagulant function of conserved *Amblyomma americanum* tick saliva serpin 19. *Insect Biochem Mol Biol* 80: 1e10

Raoult D & Parola P (2007). *Rickettsial diseases*. Informa Healthcare USA, Inc., New York

Ribeiro JM (1989). Role of saliva in tick-host interactions. *Exp Appl Acarol* 7: 15-20

Ribeiro JMC, Francisco AC, Franchischetti IMB, Mans BJ, Mather TN, Valenzuela JG, Wikel SK (2006). An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Biochem Mol Biol* 36: 111-119

Ribeiro JM, Mans BJ, Arca B (2010). An insight into the sialome of blood-feeding Nematocera. *Insect Biochem Mol Biol* 40: 767-784

Richards SL, Langley R, Apperson CS, Watson E (2017). Do tick attachment times vary between different tick-pathogen systems? *Environments* 4: 37

Rizzoli A, Hauffe H, Carpi G, Vourc'h G, Neteler M, Rosa R (2011). Lyme borreliosis in Europe. *Euro Surveill* 16: 27

Rolníková T, Kazimírová M, Buc M (2002). Proliferačné odpovede ľudských periférnych krvných lymfocytov na extrakty slinných žliaz kliešťa *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae). *Alergie* 4, Suppl. 3: 90 (на словачком)

Rolníková T, Kazimírová M, Buc M (2003). Modulation of human lymphocyte proliferation by salivary gland extracts of ixodid ticks (Acari: Ixodidae): effect of feeding stage and sex. *Folia Parasitologica* 50: 305-312

Roma GC, Nunes PH, Oliveira PR, Remedio RN, Bechara GH, Mathias MIC (2012). Central nervous system of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae): an ultrastructural study. *Parasitol Res* 111(3): 1277-1285

Romagnani S (2000). T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* 85(1): 9-18

Sanders ML, Jaworski DC, Sanchez JL, Defraites RF, Glass GE, Scott AL, Raha S, Ritchie BC, Needham GR, Schwartz BS (1998). Antibody to a cDNA-derived calreticulin protein from *Amblyomma americanum* as a biomarker of tick exposure in humans. *Am J Trop Med Hyg* 59(2): 279-285

Sanger F & Coulson AR (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94(3): 441-446

Sauer JR, Essenberg RC, Bowman AS (2000). Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. *J Insect Physiol* 46: 1069-1078

Schoeler GB & Wikel SK (2001). Modulation of host immunity by haematophagous arthropods. *Ann Trop Med Parasitol* 95: 755-771

Schwartz BS, Ribeiro JM, Goldstein MD (1990). Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research. *Am J Epidemiol* 132: 58-66

Schwartz BS, Ford DP, Childs JE, Rothman N, Thomas RJ (1991). Antitick saliva antibody - a biologic marker of tick exposure that is a risk factor for Lyme disease seropositivity. *Am J Epidemiol* 134: 86-95

Shaw SE, Day MJ, Birtles RJ, Breitschwerdt EB (2001). Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends Parasitol* 17: 74-80

Singh SK & Girschick HJ (2003). Tick-host interactions and their immunological implications in tick-borne diseases. *Curr Sci* 85(9): 1284-1298

Skallova A, Iezzi G, Ampenberger F, Kopf M, Kopecky J (2008). Tick saliva inhibits dendritic cell migration, maturation, and function while promoting development of Th2 responses. *J Immunol* 180: 6186-6192

Smerthurst PA, Onley DJ, Jarvis GE, O'connor MN, Knight CG, Herr AB, Ouwehand WH, Farndale RW (2006). The platelet-collagen interaction: the smallest effective motif for glycoprotein VI-mediated platelet adhesion and activation contains two glycine-proline-hydroxyproline triplets. *J Biol Chem* 282: 1296-1304

Socolovschi C, Mediannikov O, Raoult D, Parola P (2009). Update on tick-borne bacterial diseases in Europe. *Parasite* 16: 259-273

Stubbs MT & Bode W (1995). The clot thickens: clues provided by thrombin structure. *Trends Biochem Sci* 20: 23-28

Szell Z, Sreter-Lancz Z, Marialigeti K, Sreter T (2006). Temporal distribution of *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* in Hungary. *Vet Parasitol* 141: 377-379

Tirloni L, Reck J, Terra RM, Martins JR, Mulenga A, Sherman NE, Fox JW, Yates JR III, Termignoni C, Pinto AFM, Vaz IdSJr (2014). Proteomic analysis of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* saliva: a comparison between partially and fully engorged females. *PLoS One* 9(4): e94831

Tirloni L, Islam MS, Kim TK, Diedrich JK, Yates JR III, Pinto AFM, Mulenga A, You MJ, Vaz IdSjr (2015). Saliva from nymph and adult females of *Haemaphysalis longicornis*: a proteomic study. *Parasit Vector* 8: 338

Trager W (1939). Acquired immunity to ticks. *J Parasitol* 25: 57-81

Trevejo RT, Reisen WK, Yoshimura G, Reeves WC (2005). Detection of chicken antibodies to mosquito salivary gland antigens by enzyme immunoassay. *J AmMosq Control Assoc* 21: 39-48

Ullmann-Moore AJ (2011). Tick salivary gland proteins (SALPS) as antigens for vaccine development to decrease spirochete load in a murine model of Lyme borreliosis. Doctoral Dissertation, Colorado State University, Fort Collins, Colorado

Urquhart MG, Armour J, Duncen JL et al. (1987). Pathogene significance. *Vet Parasit* 178

Valenzuela JG, Charlab R, Mather TN, Ribeiro JM (2000). Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *J Biol Chem* 275: 18717-18723

Valenzuela JG, Francischetti IM, Pham VM, Garfield MK, Mather TN, Ribeiro JM (2002). Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *J Exp Biol* 205: 2843-2864

Valenzuela JG (2004). Exploring tick saliva: from biochemistry to 'sialomes' and functional genomics. *Parasitology* 129: S83-S94

Vu Hai V, Pages F, Boulanger N, Audebert S, Parola P, Almeras L (2013). Immunoproteomic identification of antigenic salivary biomarkers detected by *Ixodes ricinus*-exposed rabbit sera. *Ticks Tick-Borne Dis* 4: 459-468

Vu Hai V, Almeras L, Socolovschi C, Raoult D, Parola P, Pagès F (2014). Monitoring human tick-borne disease risk and tick bite exposure in Europe: Available tools and promising future methods. *Ticks Tick-Borne Dis* 5: 607-619

- Wang H & Nuttall PA (1994). Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology* 109: 525-530
- Wheeler CM, Coleman JL, Benach JL (1991). Salivary gland antigens of *Ixodes dammini* are glycoproteins that have interspecies cross-reactivity. *J Parasitol* 77: 965-973
- Wikel SK (1996a). Host immunity to ticks. *Annu Rev Entomol* 41: 1-22
- Wikel SK (1996b). Immunology of the tick-host interface. In: *The immunology of host-ectoparasitic arthropod relationships* (ed. Wikel SK). CAB International, Wallingford, p. 204-231
- Wikel SK (1999). Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *Int J Parasitol* 29: 851-859
- Wikel SK & Alarcon-Chaidez FJ (2001). Progress toward molecular characterization of ectoparasite modulation of host immunity. *Vet Parasitol* 101: 275-287
- Wikel SK (2013). Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick counter measures, and a suitable environment for pathogen establishment. *Front Microbiol* 4: 337
- Wilhelmsson P, Lindblom P, Fryland L, Nyman D, Jaenson TGT, Forsberg P, Lindgren PE (2013). *Ixodes ricinus* ticks removed from humans in Northern Europe: seasonal pattern of infestation, attachment sites and duration of feeding. *Parasit Vector* 6: 362
- Willadsen P (1980). Immunity to ticks. *Adv Parasitol* 18: 293-311
- Willadsen P (2004). Anti-tick vaccines. *Parasitology* 129 Suppl.: S367-S387
- Xu G, Fang QQ, Sun Y, Keirans JE, Durden LA (2005). Hard tick calreticulin (CRT) gene coding regions have only one intron with conserved positions and variable sizes. *J Parasitol* 91: 1326-1331

Zygner W, Gorski P, Wedrychowicz H (2009). New localities of *Dermacentor reticulatus* tick (vector of *Babesia canis canis*) in central and eastern Poland. Pol J Vet Sci 12: 549-555

БИОГРАФИЈА АУТОРА

Дарко Михаљица је рођен 11. децембра 1982. у Београду. Након завршене Земунске гимназије (природно-математички смер) у Београду, школске 2001/2002. године уписује студије на Биолошком факултету Универзитета у Београду (смер Молекуларна биологија и физиологија, изборна област Експериментална биомедицина). Дипломирао је 2010., са просечном оценом током студија 8.91, одбранивши дипломски рад под називом „Молекуларна детекција узрочника бабезиозе у крпељима на територији Београда“, са оценом 10. Докторске студије је уписао исте године на Биолошком факултету Универзитета у Београду, на модулу Имунобиологија и положио је све програмом предвиђене испите.

Дарко Михаљица је од 2010. укључен у рад Групе за медицинску ентомологију Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду, као волонтер, а од јануара 2011. је запослен као истраживач приправник у овој Групи, на пројекту „Ензоотски трансмисиони циклуси патогених микроорганизама које преносе крпељи“ (ОИ173006). Октобра 2012. је изабран у звање истраживач сарадник, у које је потом реизабран у јулу 2015. Ангажован је на билатералним пројектима са Италијом и Аустријом. Члан је Српског ентомолошког друштва и Друштва паразитолога Србије.

До сада је у сарадњи са другим ауторима објавио 35 библиографских јединица. Укупан број објављених радова у целини је девет, од којих су шест објављена у врхунским међународним часописима (М21) и три у часописима међународног значаја. На међународним скуповима је објавио једно саопштење штампано у целини (М33) и 20 саопштења штампаних у изводу (М34). На скуповима националног значаја је објавио једно саопштење штампано у целини (М63) и два саопштења штампана у изводу (М64).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а **Дарко Б. Михаљица**

број индекса **Б3002/2010**

Изјављујем

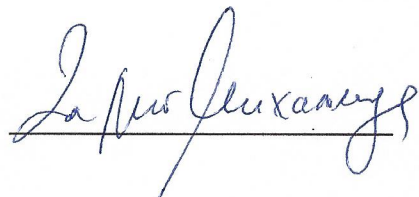
да је докторска дисертација под насловом

Потенцијал рекомбинантних протеина пљувачке крпеља *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) за детекцију специфичних антитела као маркера убода крпеља

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 06.11.2017.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Дарко Б. Михаљица**
Број индекса **Б3002/2010**
Студијски програм **Имунобиологија**
Наслов рада **Потенцијал рекомбинантних протеина пљувачке
крпеља *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) за детекцију
специфичних антитела као маркера убода крпеља**
Ментор **др Драгана Марковић**, виши научни сарадник Институт
за медицинска истраживања Универзитет у
Београду

Потписани/а **Дарко Б. Михаљица**

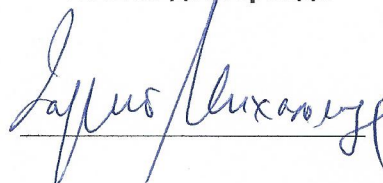
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 06.11.2015.

Потпис докторанда



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Потенцијал рекомбинантних протеина пљувачке крпеља *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) за детекцију специфичних антитела као маркера убода крпеља

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

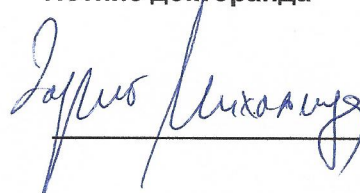
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 06.11.2017.

Потпис докторанда



1. **Ауторство** - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство - некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство - некомерцијално - без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство - без прераде.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство - делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.