



Wykorzystanie kleszczowych linii komórkowych w badaniach patogenów odkleszczowych

Use of tick cell lines in studies of tick-borne pathogens

Violetta Zajac^{1, A-F}, Anna Sawczyn-Domańska^{1, A-F}

¹ Zakład Biologicznych Szkodliwości Zdrowotnych i Parazytologii, Instytut Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki, Lublin, Polska

A – Koncepcja i projekt badania, B – Gromadzenie i/lub zestawianie danych, C – Analiza i interpretacja danych, D – Napisanie artykułu, E – Krytyczne zrecenzowanie artykułu, F – Zatwierdzenie ostatecznej wersji artykułu

Sawczyn-Domańska A, Zajac V. Wykorzystanie kleszczowych linii komórkowych w badaniach patogenów odkleszczowych. Med Og Nauk Zdr. 2021; 27(4): 349–355. doi: 10.26444/monz/145008

■ Streszczenie

Wprowadzenie i cel pracy. Kleszcze to stawonogi odżywiające się krwią zwierząt i ludzi. Transmitują chorobotwórcze bakterie, wirusy i pierwotniaki, w tym krętki *Borrelia burgdorferi* wywołujące boreliozę z Lyme i wirusa kleszczowego zapalenia mózgu. Hodowle komórkowe wyprowadzone z tkanek wektorów znalazły szerokie zastosowanie w badaniach *in vitro*. Celem pracy był przegląd literatury dotyczącej kleszczowych linii komórkowych oraz ich zastosowania w badaniach naukowych.

Metody przeglądu. W pracy opisano artykuły wyszukane w bazie PubMed na podstawie słów kluczowych: „kleszczowa linia komórkowa” (ang. *tick cell line*) lub „linia komórkowa z kleszczy” (ang. *cell line from tick*).

Opis stanu wiedzy. Pierwszą kleszczową linię komórkową wyprowadzoną z *Rhipicephalus appendiculatus* opisano w 1975 roku. Obecnie wyprowadzono ponad 50 ciągłych linii komórkowych z różnych gatunków kleszczy. Większość z nich należy do embrionalnych, czyli wyprowadzonych z jaj złożonych przez samicę kleszcza. Z gatunku *Ixodes ricinus*, najczęściej spotykanego w Polsce, dostępne są 4 linie komórkowe. Linie są szeroko wykorzystywane w badaniach naukowych nad biologią i fizjologią kleszczy, ich odpornością na akarycydy oraz poświęconych poznaniu układu immunologicznego kleszczy. Hodowle znalazły zastosowanie w badaniach interakcji wektor-patogen, charakterystyce mikroorganizmów oraz w izolacji licznych patogennych i niepatogennych drobnoustrojów ze środowiska.

Podsumowanie. Skuteczność zastosowania kleszczowych linii komórkowych jako narzędzia badawczego potwierdza stale rosnąca liczba prac naukowych z ich wykorzystaniem. Ich użycie może mieć znaczenie dla opracowania skutecznej diagnostyki, profilaktyki oraz w leczeniu chorób odkleszczowych. Dzięki stale rozwijającym się nowym metodom badawczym kleszczowe linie komórkowe mogą być przydatnym narzędziem w przyszłych pracach naukowych.

■ Słowa kluczowe

kleszczowa linia komórkowa, kleszcz, choroby odkleszczowe

■ Abstract

Introduction and Objective. Ticks are blood-feeding parasites of animals and humans belonging to arthropods. They transmit pathogenic bacteria, viruses, and protozoa, including *Borrelia burgdorferi* (causative agent of Lyme borreliosis) and tick-borne encephalitis virus. Cell cultures derived from vector tissues are tools for a wide range of *in vitro* studies. The aim of the study was to review the literature on tick cell lines and their application in scientific research.

Review methods. The terms “tick cell line” or “cell line from tick” were used in searching the PubMed® database.

Brief description of the state of knowledge. The first tick cell line derived from *Rhipicephalus appendiculatus* was described in 1975. Currently, more than 50 continuous cell lines from various species have been derived. Most of them are embryonic and derived from eggs laid by female ticks. Four cell lines are available from the most common tick in Poland – *Ixodes ricinus*. The lines are widely used in research on the biology and physiology of ticks, their resistance to acaricides, and the understanding of the immune system of ticks. Cultures have been used in the study of vector-pathogen interactions, the characteristics of microorganisms, and for the isolation of numerous pathogenic and non-pathogenic microorganisms from the environment.

Summary. The effectiveness of tick cell lines as a research tool is confirmed by an increasing number of scientific reports. Their use may be important in the development of effective diagnosis, prevention, and treatment of tick-borne diseases. Tick cell lines may be a useful tool in future research through the development of new research methods.

■ Key words

tick, tick-borne diseases, tick cell line

Adres do korespondencji: Violetta Zajac, Zakład Biologicznych Szkodliwości Zdrowotnych i Parazytologii, Instytut Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki, ul. Jaczewskiego 2, 20-090 Lublin, Polska
E-mail: violetta.zajac@poczta.fm

Nadesłano: 22.11.2021; zaakceptowano do publikacji: 16.12.2021; publikacja online: 23.12.2021

WPROWADZENIE I CEL PRACY

Kleszcze należą do pasożytniczych stawonogów odżywiających się krwią żywicieli. Uczestniczą w przenoszeniu chorobotwórczych bakterii, wirusów oraz pierwotniaków. Na świecie opisano ponad 900 gatunków kleszczy, z czego blisko 70 gatunków występuje w Europie. Gatunkiem kleszcza najczęściej spotykanym na terenie Polski jest *Ixodes ricinus* (kleszcz pospolity). *I. ricinus* uczestniczy w przenoszeniu 2 najważniejszych patogenów odkleszczowych w Europie: *Borrelia burgdorferi* – bakterii wywołujących boreliozę z Lyme oraz wirusa kleszczowego zapalenia mózgu. W ostatnich latach odnotowywany jest wzrost aktywności kleszczy oraz liczby zachorowań na choroby odkleszczowe, co związane jest ze zmianami klimatycznymi, przemieszczaniem zwierząt oraz wzrostem zainteresowania społeczeństwa rekreacją na terenach występowania kleszczy [1, 2].

Metody badawcze umożliwiające ciągłą hodowlę komórek wyprowadzonych z tkanek wektorów i rezerwuarów stanowią ważną dziedzinę badań *in vitro*. Znajdują szerokie zastosowanie w badaniach podstawowych biologii pasożytów, oddziaływań gospodarz–wektor–patogen oraz w zapobieganiu chorobom przenoszonym przez wektory. Przykładem takich linii są kleszczowe linie komórkowe (KLIK), wyprowadzone z tkanek kleszczy. Od roku 1975, kiedy to opisano pierwsze hodowle KLIK, zakres ich wykorzystania stale się poszerza i obejmuje przede wszystkim namnażanie patogenów w KLIK, badania nad biologią, genomiką i proteomiką kleszczy oraz manipulacje genetyczne [3].

Celem pracy był przegląd piśmiennictwa dotyczącego kleszczowych linii komórkowych (ang. *tick cell lines*) oraz ich zastosowania w badaniach naukowych. W artykule skupiono się na liniach kleszczowych wyprowadzonych z gatunków kleszczy występujących na terenie Polski oraz ich wykorzystaniu w badaniach nad patogenami wykrywanymi na obszarze kraju. W pracy opisano artykuły wyszukiwane w bazie PubMed, wyselekcjonowane na podstawie słów kluczowych: „kleszczowa linia komórkowa” lub „linia komórkowa z kleszczy” (ang. *cell line from tick*). Uwzględniono głównie publikacje, które ukazały się w latach 2000–2021.

OPIS STANU WIEDZY

Historia kleszczowych linii komórkowych

Prace nad hodowlą komórek kleszczy rozpoczęto ponad 60 lat temu. Początkowo ich żywotność osiągała zaledwie 6 miesięcy. Pierwsza ciągła linia została wyprowadzona z kleszcza należącego do gatunku *Rhipicephalus appendiculatus* [4]. Wydaje się, że podstawowe znaczenie w dążeniu do wyprowadzenia ciągłej linii ma doświadczenie naukowca oraz czas i cierpliwość, ponieważ stworzenie odpowiednich warunków hodowli może zająć nawet 5 lat. Uzyskane dotychczas KLIK w ogromnej większości zostały opracowane przez dwa zespoły naukowców kierowane przez T.J. Kurtti i U.G. Munderloh oraz przez L. Bell-Sakyi. Najwięcej dostępnych KLIK zostało wyprowadzonych z komórek embrionalnych (51 spośród 58), pozostałe uzyskano z larw lub nimf kleszczy.

Charakterystyka i warunki hodowli kleszczowych linii komórkowych

Kleszczowa hodowla komórkowa składa się z dwóch lub więcej rodzajów komórek w różnych proporcjach, zależnych

do czasu hodowli i numeru pasaży. Hodowla komórek posiada wspólne cechy z odżywiającymi się krwią kleszczami i dlatego wymaga zastosowania podłoża wzbogaconych o surowice, tak jak w przypadku hodowli komórek ssaków. Nie przylegają silnie do podłoża i rosną w 3 warstwach jako komórki tworzące monowarstwę komórek oraz komórki zawieszane w podłożu. KLIK należą do rzadko dzielących się komórek i nie wymagają ciągłych pasaży. Mogą być przez krótki czas przechowywane w temperaturze 4 lub 12 °C, co jest preferowaną metodą przechowywania, ponieważ mrożenie w ciekłym azocie jest niezalecane dla tego typu linii. Podsumowując, należy stwierdzić, iż linie są dosyć odporne i mogą być utrzymywane przez kilka lat przy regularnej zmianie podłoża i rzadkich pasażach [3].

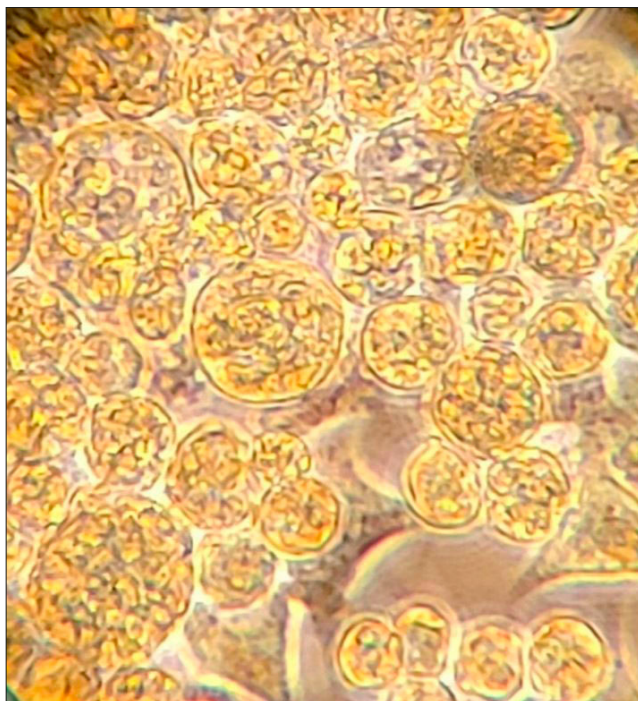
Większość dostępnych KLIK należy do linii embrionalnych, o czym decyduje rodzaj materiału wyjściowego użytego do założenia hodowli. Jaja kleszczy to materiał najbardziej dostępny w porównaniu do pozostałych stadiów rozwojowych kleszczy. Ponadto hodowla wyprowadzona z jaj składa się w większości z komórek niezróżnicowanych o największym potencjale do szybkiego wzrostu. Wyprowadzenie takiej linii rozpoczyna się od napitej krwią samicy kleszcza, która poddawana jest powierzchniowemu odkażeniu, a następnie w warunkach laboratoryjnych składa jaja. Po zakończeniu tego procesu jaja są sterylizowane i rozkruszone w odpowiednim podłożu hodowlanym lub roztworze soli. Przygotowana zawiesina tkanek i komórek kleszczy inkubowana jest w odpowiedniej temperaturze, wynoszącej najczęściej od 28 do 34°C [5]. W większości hodowli podłoże jest wymieniane w odstępach tygodniowych; najczęściej stosowane jest podłoże Leibovitz L-15 z dodatkiem suplementów: bulionu fosforanowo-tryptozowego (ang. *tryptose phosphate broth*, TPB) i płodowej surowicy bydlęcej (ang. *fetal bovine serum*, FBS) lub modyfikowane podłoże L-15B opisane przez Munderloh i Kurtti [6]. W przypadku niektórych gatunków kleszczy sukcesem zakończyły się próby wyprowadzenia hodowli z młodocianych stadiów – larw i nimf, natomiast do dziś nie udało się uzyskać hodowli z narządów kleszcza, takich jak ślinianki, jajniki czy jelita. Ciągłe hodowle komórek kleszczy wykazują zróżnicowanie fenotypowe i genotypowe, co stanowi ich zaletę w badaniach nad nieznanymi mechanizmami, np. tym, który rodzaj komórek kleszczy wspomaga replikację wirusa. Heterogenność linii jest korzystna także dlatego, że umożliwia izolację nowych wirusów pochodzących ze środowiska lub próbek klinicznych [5, 7].

Bank komórek kleszczy i dostępne linie komórkowe

Bank komórek kleszczy (Tick Cell Biobank) został utworzony w 2009 r. w strukturach Uniwersytetu w Liverpoolu w Wielkiej Brytanii (Institute of Infection and Global Health, University of Liverpool). Obecnie w Tick Cell Biobank zdeponowanych jest 58 kleszczowych linii komórkowych, w tym 51 z kleszczy twardych oraz 7 pozyskanych z kleszczy miękkich. Opisano 19 gatunków kleszczy, które na stałe występują na obszarze Polski [8]. Spośród nich z kleszczy miękkich *Argas reflexus* w Banku zdeponowano jedną linię – ARE/LULS41. Z gatunku kleszcza *I. ricinus*, najpowszechniej spotykanego na terenie Polski, dostępne są 4 linie kleszczowe (IRE/LUAP46, IRE/CTVM19, IRE/CTVM20 oraz IRE11); wszystkie należą do linii embrionalnych (tab. 1). Obraz komórek linii IRE/CTVM19 w mikroskopie świetlnym przedstawia Rycina 1.

Z rodzaju *Ixodes*, oprócz ww. 4 linii z *I. ricinus*, dostępnych jest również 5 linii wyprowadzonych z gatunku *I. scapularis*.

Nie jest dostępna hodowla pozyskana z *Dermacentor reticulatus*, gatunku kleszcza również spotykanego na terenie Polski. Zdeponowano natomiast 4 linie z innych gatunków należących do tego rodzaju: *D. albipictus*, *D. andersoni* oraz *D. variabilis*. Nadal podejmowane są prace nad wyprowadzeniem ciągłych linii komórkowych z kolejnych gatunków kleszczy, czego przykładem jest zainicjowanie embrionalnej linii z kleszczy *Haemaphysalis bispinosa* [11].



Rycina 1. Obraz mikroskopowy kleszczowej linii komórkowej IRE/CTVM19 (Mikroskop świetlny odwrócony IB-100, Delta Optical, Polska; powiększenie 200x). Źródło: zdjęcie własne

Zastosowanie kleszczowych linii komórkowych

KLK umożliwiają prowadzenie badań dotyczących biologii i fizjologii kleszczy oraz ograniczenia ich rozprzestrzeniania. Z powodzeniem są wykorzystywane do izolacji i namnażania wirusów oraz bakterii, jak również w różnorodnych badaniach oddziaływań kleszcz–patogen. Znalazły zastosowanie w ocenie alergii wywołanych pogryzieniem przez kleszcza oraz w badaniach mikrobiomu tych stawonogów [3, 5]. Badania międzynarodowe potwierdziły efektywność KLK w izolacji patogenów z kleszczy należących do gatunków *I. ricinus*, *D. marginatus* i *D. reticulatus*, takich jak nowe polskie szczepy *Spiroplasma* spp. i *Rickettsia raoultii* [12].

Hodowle komórek kleszczowych znalazły również szerokie zastosowanie w badaniach nad odpornością kleszczy na akarycydy i w doświadczeniach mających służyć opracowaniu szczepionki przeciwko kleszczom i chorobom odkleszczowym oraz poznaniu układu immunologicznego kleszczy [13, 14]. Linie kleszczowe wykorzystano do badań pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki kleszczy w odpowiedzi na zakażenie *F. tularensis* i *A. phagocytophilum* [15]. KLK wykorzystywane są również do oceny kompetencji gatunków kleszczy jako wektorów patogenów, czego przykładem jest zastosowanie linii z *I. scapularis* względem *D. andersoni* w odpowiedzi na zakażenie *Francisella tularensis* spp. *novicida* [16].

Ciągłe linie kleszczowe stosowane są w badaniach nad wrodzoną odpornością kleszczy. Dzięki ich wykorzystaniu udało się zidentyfikować i scharakteryzować szlaki sygnalizacyjne oraz receptory odpowiedzialne za rozpoznawanie patogenów oraz ich interakcje z drobnoustrojami. Upośledzenie odporności wrodzonej kleszczy, która chroni je przed bakteriami, grzybami i wirusami, jest najskuteczniejszą strategią w zwalczaniu tych stawonogów [17].

Linie komórkowe z *I. ricinus* są często stosowane w badaniach naukowych. D.S. Loginov i wsp., wykorzystując spektrometrię mas, zbadali profil białkowy trzech linii z *I. ricinus*: IRE/CTVM19, IRE/CTVM20 oraz IRE11. Każda z nich charakteryzowała się odrębnym widmem masowym, najbardziej zbliżonym u IRE11 i IRE/CTVM20, a także wspólnymi sygnałami w poszczególnych organach, takich jak jajniki czy ślinianki [18]. W.J. Cramaro i wsp. przy pomocy spektrometrii mas określili wielkość genomu komórek linii IRE/CTVM19, wykazując, że jest 1,4 razy większy od genomu kleszczy zebranych z wegetacji i hodowanych w laboratorium [19]. Linia IRE/CTVM19 została wykorzystana do izolacji i hodowli nowej bakterii *Candidatus Rickettsia vini*, pozyskanej z kleszczy *I. arboricola* w Belgii [20], natomiast IRE11 wykorzystano do hodowli *Rickettsia buchneri* sp. nov., endosymbiontu kleszczy *I. scapularis* [21]. Wirusa Alongshan, należącego do rodziny *Flaviviridae*, wyizolowano i hodowano w linii IRE/CTVM19 przez 3 lata, bez efektu cytopatycznego w komórkach kleszczy [22].

Nie odnaleziono prac eksperymentalnych wykorzystujących linię IRE/LUAP46, co prawdopodobnie związane jest z trudnościami w pasażowaniu tej hodowli. Liczba pasaży tej linii wynosi zaledwie 8 w porównaniu do ponad 50 czy 200 dla innych hodowli.

KLK są również wykorzystywane do namnażania patogenów, których hodowla w innych liniach jest niemożliwa, a także do izolacji ze środowiska niescharakteryzowanych drobnoustrojów związanych z kleszczami. *Anaplasma* sp. została wyizolowana z krwi sarny w linii ISE6 z *I. scapularis*, a chorobotwórcza dla człowieka *Borrelia lonestari* w linii z kleszcza *Amblyomma americanum* [3, 5]. Hodowle kleszczowe są narzędziem w badaniach symbiontów kleszczy spokrewnionych z patogenami, czego przykładem są badania *Rickettsia peacockii* w linii DAE100 wyprowadzonej z *D. andersoni* [3]. N.A. Najm i wsp. wykryli bakterię blisko spokrewnioną z *Candidatus* *Midichloria mitochondrii* (endosymbiont wielu gatunków kleszczy przekazywany transowarialnie) w 2 spośród 8 badanych linii kleszczowych wyprowadzonych z *I. ricinus* i *R. docoloratus*. Niewykluczone, że komórki kleszczy w warunkach laboratoryjnych wytracają endosymbionty występujące w wyjściowym materiale (np. jajach kleszczy) [23].

Kleszczowe linie komórkowe mogą przyczynić się do poprawy skuteczności diagnostyki chorób odkleszczowych u ludzi i zwierząt. Komórki kleszczy linii IDE8 z *I. scapularis* zakażone *Anaplasma phagocytophilum* wykorzystano jako antygen w metodzie immunoenzymatycznej (ELISA) do wykrywania odpowiedzi serologicznej na zakażenie bakterią u owiec [24].

W piśmiennictwie odnaleziono jedynie dwie pozycje dotyczące hodowli pierwotniaków *Babesia* w komórkach kleszczy. W roku 1983 R.E. Droleskey i wsp. wykazali, że *B. bovis* przechodzi fazę płciową swojego cyklu rozwojowego w komórkach linii z *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, podobnie jak ma to miejsce w warunkach *in vivo* [25].

Tabela 1. Charakterystyka kleszczowych linii komórkowych wyprowadzonych z gatunku *Ixodes ricinus*

| Nazwa linii | Pochodzenie | Rodzaj | Liczba pasaży | Optymalna temperatura hodowli | Podłoża hodowlane | Piśmiennictwo |
|-------------|-----------------|-------------|---------------|-------------------------------|-------------------------------------|---|
| IRE/LUAP46 | Hiszpania | Embrionalna | 8 | 28°C | Brak danych | Bell-Sakyi Lesley, dane nie publikowane |
| IRE/CTVM19 | Wielka Brytania | Embrionalna | 230 | 28°C | L-15, 20% FBS, 10% TPB, antybiotyki | [3] |
| IRE/CTVM20 | Wielka Brytania | Embrionalna | 180 | 28°C | L-15/L-15B | [3] |
| IRE11 | Niemcy | Embrionalna | 56 | 32°C–34°C | L-15, 20% FBS, 10% TPB, antybiotyki | [9] |

Źródło: [10]

Tabela 2. Wybrane patogeny odkleszczowe hodowane w kleszczowych liniach komórkowych

| Patogen | Użyta kleszczowa linia komórkowa (gatunek kleszcza z którego się wywodzi) | Uwagi | Piśmiennictwo |
|---|--|--|--|
| <i>Borrelia burgdorferi</i> | ISE6 (<i>I. scapularis</i>) | Wykazano zmianę ekspresji genów <i>ospC</i> i <i>ospA</i> w zależności od temperatury hodowli. | [27] |
| | ISE6, IDE8 (<i>I. scapularis</i>) | Potwierdzono zewnątrzkomórkowy wzrost bakterii. Do namnażania <i>B. burgdorferi</i> konieczna była obecność komórek kleszczy (brak namnażania w samym podłożu hodowlanym L15B). Wykazano zmianę ekspresji genów bakterii w obecności KLK. | [28] |
| | AVL/CTVM17 (<i>Amblyomma variegatum</i>), HAE/CTVM8 (<i>Hyalomma anatolicum</i>), IRE/CTVM19 (<i>I. ricinus</i>), IDE8, ISE6 (<i>I. scapularis</i>), RA243, RAE/CTVM1 (<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>), BME/CTVM2 (<i>R. microplus</i>) | Wykazano wnikanie bakterii do komórek kleszczy przy użyciu cytometrii przepływowowej. | [29] |
| | RAE25 (<i>R. appendiculatus</i>), RML15 (<i>Dermacentor variabilis</i>), BME26 (<i>Boophilus microplus</i>), nowa linia z <i>I. dammini</i> | Wykazano małą specyficzność krętków względem wektora w zakresie adherencji do komórek różnych gatunków kleszczy. | [30] |
| | IRE/CTVM19 (<i>I. ricinus</i>), ISE6 (<i>I. scapularis</i>) | Wykazano zwiększone namnażanie <i>Ehrlichia ruminantium</i> po zakażeniu hodowli kleszczowej już zakażonej <i>B. burgdorferi</i> . Natomiast inokulacja <i>B. burgdorferi</i> po wcześniejszym zakażeniu <i>E. ruminantium</i> nie wpływała na jej namnażanie. | [31] |
| | ISE6 (<i>I. scapularis</i>) | Nie wykazano wpływu bakterii na ekspresję genów kodujących polipeptydy transportujące aniony organiczne (OATP). | [32] |
| | IDE12, ISE6 (<i>I. scapularis</i>), DAE15 (<i>D. andersoni</i>) | Nie wykazano wpływu endosymbiontów kleszczy na zdolność komórek kleszczy do fagocytowania <i>B. burgdorferi</i> . | [33] |
| | IDE8 (<i>I. scapularis</i>), RAE25 (<i>R. appendiculatus</i>) | Wykorzystano KLK do oceny interakcji <i>B. burgdorferi</i> i komórek wektora. Wykazano zmiany w plazmidach bakterii i adaptację do zmieniającego się środowiska. | [34] |
| | ISE6 (<i>I. scapularis</i>) | Wykazano wpływ temperatury na zmianę ekspresji białek powierzchniowych <i>OspA</i> i <i>OspC</i> zarówno dla <i>B. burgdorferi</i> s.s. jak i <i>B. afzelii</i> utrzymywanych z komórkami kleszczy, jednak z wykorzystaniem różnych modeli regulacji. | [35] |
| | Wirus kleszczowego zapalenia mózgu (KZM) | ISE6 (<i>I. scapularis</i>) | Pierwsza izolacja bakterii z kleszcza <i>A. americanum</i> . |
| IRE/CTVM19 (<i>I. ricinus</i>) | | Wykazano zmiany w wirulencji i mutacje wirusa KZM hodowanego w KLK w porównaniu do wirusa w linii ssaczej. | [37] |
| IRE/CTVM20 (<i>I. ricinus</i>) | | Zakażenie linii kleszczowej wirusem KZM i/lub <i>A. phagocytophilum</i> wpływa na aktywację różnych szlaków komórkowych zaangażowanych w apoptozę i odporność wrodzoną kleszczy. | [38] |
| IDE8 (<i>I. scapularis</i>), IRE/CTVM19 (<i>I. ricinus</i>) | | Potwierdzono różnice w ekspresji genów komórek kleszczy w zależności od pochodzenia w odpowiedzi na zakażenie wirusem. | [39] |
| IRE/CTVM19 (<i>I. ricinus</i>) | | Wykazano wpływ zakażenia wirusem KZM na widma masowe komórek kleszczy określone metodą spektrometrii mas. | [40] |
| HAE/CTVM8 (<i>Hyalomma anatolicum</i>), IRE/CTVM19 (<i>I. ricinus</i>) | | Wykazano, że wirus wykazuje zbliżone tempo replikacji w hodowlach linii z gatunku kleszcza naturalnie przenoszącego wirusa (<i>I. ricinus</i>), jak i w linii z gatunku nie transmitującego wirusa KZM (<i>H. anatolicum</i>). | [41] |
| BME/CTVM2 (<i>B. microplus</i>), HAE/CTVM9 (<i>H. anatolicum</i>), IRE/CTVM18, IRE/CTVM19, IRE/CTVM20 (<i>I. ricinus</i>), IDE2 (<i>I. scapularis</i>) OME/CTVM21, OME/CTVM22 (<i>Ornithodoros. moubata</i>), RA-257 (<i>R. appendiculatus</i>) | | Wszystkie wykorzystane linie kleszczowe mogą być stosowane do hodowli wirusa. Jednak replikacja europejskiego podtypu wirusa KZM przebiegała najszybciej w liniach wyprowadzonych z naturalnego wektora - <i>I. ricinus</i> . | [42] |
| RA-257 (<i>R. appendiculatus</i>), IDE2 (<i>I. scapularis</i>) | | Potwierdzono zmiany w procesie dojrzewania wirusa hodowanego w liniach kleszczowych w porównaniu do hodowli w komórkach ssaków. | [43] |
| IRE/CTVM19 (<i>I. ricinus</i>) | | Wykazano zmiany w glikozylacji białka E wirusa hodowanego w ludzkich komórkach neuronalnych względem hodowanego w komórkach kleszczowych. | [44] |

| Patogen | Użyta kleszczowa linia komórkowa (gatunek kleszcza z którego się wywodzi) | Uwagi | Piśmiennictwo |
|----------------------------------|--|--|--|
| <i>Anaplasma phagocytophilum</i> | IRE/CTVM20 (<i>I. ricinus</i>) | Potwierdzono długotrwałe utrzymywanie w hodowli bakterii wyizolowanych z krwi psów. | [45] |
| | IDE8 (<i>I. scapularis</i>) | Bakterie izolowane z krwi koni, psów i saren. | [46] |
| | ISE6 (<i>I. scapularis</i>) | Izolacja bakterii z kleszczy oraz krwi kóz. | [47, 48] |
| | IDE8 (<i>I. scapularis</i>) | Izolacja bakterii z krwi saren w Niemczech. | [49] |
| | ISE6 (<i>I. scapularis</i>) | Wykazano wpływ bakterii na zmiany regulacji szlaków metabolicznych, zmiany w cytoszkielecie oraz hamowanie apoptozy komórek kleszczy. Wykazano również, że komórki kleszczy kontrolują zakażenie <i>A. phagocytophilum</i> poprzez zwiększenie syntezy kwasu fosfoenolopirogronowego. | [50 – 53] |
| | ISE6 (<i>I. scapularis</i>), IRE/CTVM20 (<i>I. ricinus</i>) | Porównano odpowiedź komórek kleszczy na zakażenie bakterią w oparciu o sekwencjonowanie RNA. Odpowiedź komórek linii <i>I. ricinus</i> była zbliżona do odpowiedzi w jellitach kleszcza, natomiast u <i>I. scapularis</i> przypominała odpowiedź hemocytów. Bakteria hamowała apoptozę komórek kleszczowych obu linii. | [54, 55] |
| | ISE6 (<i>I. scapularis</i>) | Potwierdzono wpływ bakterii na zmianę ekspresji genów w komórkach kleszczy, hamowanie apoptozy i indukowanie zmian w cytoszkielecie komórek kleszczy. | [56] |
| | ISE6 (<i>I. scapularis</i>) | Potwierdzono ekspresję genów systemu sekrecji typu IV u bakterii namnażającej się zarówno w komórkach ludzkich, jak i kleszczowych. | [57] |
| | ISE6 (<i>I. scapularis</i>) | Wykazano przydatność linii komórkowej do badań nad oddziaływaniem patogenów i synganglionu (układu nerwowego kleszcza). | [58] |
| | ISE6 (<i>I. scapularis</i>), IRE/CTVM20 (<i>I. ricinus</i>) | Wskazano potencjalne antygeny jakie mogą być wykorzystane w szczepionce chroniącej kleszcze przed zakażeniem <i>A. phagocytophilum</i> . | [59] |
| <i>Rickettsia</i> spp. | ISE6 (<i>I. scapularis</i>) | Linia wykorzystana do hodowli mikroorganizmów z kleszczy odłowionych z wegetacji, potwierdzono gatunki <i>R. asiatica</i> , <i>R. helvetica</i> , <i>R. monacensis</i> , <i>R. tamurae</i> i <i>Rickettsia</i> sp. LON. Część bakterii wywoływała efekt cytotatyczny w komórkach kleszczy. | [60] |
| | RML-RSE (<i>R. sanguineus</i>), REE/CTVM28, REE/CTVM29 (<i>R. evertsii</i>), IRE/CTVM19 (<i>I. ricinus</i>) | Izolacja <i>R. raoultii</i> z kleszcza <i>D. marginatus</i> odłowionego z wegetacji w Hiszpanii. Bakteria była widoczna po 50 dniach od zakażenia w linii RML-RSE. | [61] |
| | BME/CTVM2, BME/CTVM23 (<i>R. microplus</i>), ANE58 (<i>D. nitens</i>), DALBE3 (<i>D. albipictus</i>), DAE15 (<i>D. andersoni</i>), pierwotna hodowla z <i>D. reticulatus</i> | Izolacja <i>R. raoultii</i> z kleszcza <i>D. reticulatus</i> odłowionego z wegetacji w Niemczech (hodowla pierwotna). Przepasażowanie bakterii na pozostałe linie wywoływało silny efekt cytotatyczny i śmierć komórek (oprócz DALBE3). Jedynie w linii DAE15 nie potwierdzono utrzymywania się bakterii. | [62] |
| | BME/CTVM23 (<i>R. microplus</i>), RSE/PILS35 (<i>R. sanguineus</i>), IDE8 (<i>I. scapularis</i>) | <i>R. raoultii</i> namnażała się najszybciej w linii IDE8, mniej intensywnie w linii BME/CTVM23 i RSE/PILS35. | [63] |
| | BME/CTVM2 (<i>R. microplus</i>) | Izolacja <i>R. raoultii</i> z kleszcza <i>D. reticulatus</i> odłowionego z wegetacji w Austrii. Bakterie wykryto po 65 dniach od zakażenia linii. | [64] |
| | ISE6 (<i>I. scapularis</i>) | Izolacja <i>Rickettsia monacensis</i> sp. nov z kleszcza <i>I. ricinus</i> odłowionego z wegetacji w Niemczech w linii ISE6. Z sukcesem przepasażowano bakterie do IRE11 i DAE100. | [9] |
| | <i>Coxiella burnetii</i> | IDE8 (<i>I. scapularis</i>) | Wykazano przydatność linii kleszczowej do hodowli bakterii i oceny oddziaływań z komórkami wektora. Bakteria utrzymywała się również po przepasażowaniu do komórek ssaczy. |

Natomiast *B. bigemina* namnażała się do 8. dnia od zarażenia w hodowli z *I. scapularis* (IDE8) [26]. Przegląd piśmiennictwa dotyczącego hodowli patogenów odkleszczowych spotykanych w Polsce w kleszczowych liniach komórkowych przedstawiono w tab. 2.

PODSUMOWANIE

Kleszczowe linie komórkowe znalazły szerokie zastosowanie w eksperymentach naukowych, zarówno w badaniach nad kleszczami i patogenami przez nie przenoszonymi, jak i w ocenie oddziaływań wektor-patogen. Znaczenie KLK w badaniach naukowych potwierdza częstość ich wykorzystania w porównaniu do hodowli wyprowadzonych z komarów. W latach 2000–2018 mniej niż połowę spośród 80 linii wyprowadzonych z komarów użyto w doświadczeniach, podczas gdy 66 linii kleszczowych spośród 84 wykorzystano w różnych

badaniach *in vitro* [5]. Zastosowanie KLK jako narzędzia badawczego potwierdza stale rosnąca liczba prac naukowych z ich wykorzystaniem oraz potencjalne znaczenie w opracowaniu skutecznej diagnostyki, profilaktyki oraz leczenia chorób odkleszczowych. Stale rozwijające się metody molekularne umożliwiają manipulacje genetyczne, zarówno komórek kleszczy, jak i mikroorganizmów. Komórki kleszczy utrzymywane w warunkach laboratoryjnych mogą w nich odgrywać istotną rolę. Badania *in vitro* pozwalają na znacznie szybszą wstępną ocenę hipotez naukowych, przed ich weryfikacją w warunkach *in vivo*. Pomimo licznych badań naukowych z wykorzystaniem KLK nadal istnieje przestrzeń, gdzie mogą być skutecznym narzędziem w przyszłych pracach badawczych.

Źródło finansowania

Publikacja jest finansowana przez Instytut Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki w ramach realizacji projektu badawczego numer 17050.

PIŚMIENNICTWO

- Cerný J, Lynn G, Hrnková J, et al. Management options for *Ixodes ricinus*-associated pathogens: a review of prevention strategies. *Int J Environ Res Public Health*. 2020; 17(6): 1830. <https://doi.org/10.3390/ijerph17061830>
- Cutler SJ, Vayssier-Taussat M, Estrada-Peña A, et al. Tick-borne diseases and co-infection: Current considerations. *Ticks Tick Borne Dis*. 2021; 12(1): 101607. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101607>
- Bell-Sakyi L, Zwegarth E, Blouin EF, et al. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends Parasitol*. 2007; 23(9): 450–457. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.07.009>
- Varma MG, Pudney M, Leake CJ. The establishment of three cell lines from the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) and their infection with some arboviruses. *J Med Entomol*. 1975; 11(6): 698–706. <https://doi.org/10.1093/jmedent/11.6.698>
- Bell-Sakyi L, Darby A, Baylis M, et al. The Tick Cell Biobank: A global resource for in vitro research on ticks, other arthropods and the pathogens they transmit. *Ticks Tick Borne Dis*. 2018; 9(5): 1364–1371. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.05.015>
- Munderloh UG, Kurtti TJ. Formulation of medium for tick cell culture. *Exp Appl Acarol*. 1989; 7: 219–229. <https://doi.org/10.1007/BF01194061>
- Bell-Sakyi L, Attoui H. Endogenous tick viruses and modulation of tick-borne pathogen growth. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013; 3: 25. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00025>
- Nowak-Chmura M, Siuda K. Ticks of Poland. Review of contemporary issues and latest research. *Ann Parasitol*. 2012; 58(3): 125–155.
- Simser JA, Palmer AT, Fingerle V, et al. *Rickettsia monacensis* sp. nov., a spotted fever group *Rickettsia*, from ticks (*Ixodes ricinus*) collected in a European city park. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68(9): 4559–4566. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4559-4566.2002>
- Tick Cell Biobank. <https://www.liverpool.ac.uk/liverpool-shared-research-facilities/facilities/bio-resources/tick-cell-biobank/> (access: 2021.11.08).
- Lim F-S, Khoo J-J, Chen F, et al. Initiation of primary cell cultures from embryonic *Haemaphysalis bispinosa* ticks. *Syst Appl Acarol*. 2017; 22(3): 323–332. <https://doi.org/10.11158/saa.22.3.1>
- Palomar AM, Premchand-Branker S, Alberdi P, et al. Isolation of known and potentially pathogenic tick-borne microorganisms from European ixodid ticks using tick cell lines. *Ticks Tick Borne Dis*. 2019; 10(3): 628–638. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.02.008>
- Al-Rofaai A, Bell-Sakyi L. Tick cell lines in research on tick control. *Front Physiol*. 2020; 11: 152. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00152>
- Shaw DK, Wang X, Brown LJ, et al. Infection-derived lipids elicit an immune deficiency circuit in arthropods. *Nat Commun*. 2017; 8: 14401. <https://doi.org/10.1038/ncomms14401>
- Oliva Chávez AS, Wang X, Marnin L, et al. Tick extracellular vesicles enable arthropod feeding and promote distinct outcomes of bacterial infection. *Nat Commun*. 2021; 12(1): 3696. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23900-8>
- Reif KE, Ujczó JK, Alperin DC, et al. *Francisella tularensis novicida* infection competence differs in cell lines derived from United States populations of *Dermacentor andersoni* and *Ixodes scapularis*. *Sci Rep*. 2018; 8(1): 12685. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30419-4>
- Goodman CL, Kang DS, Stanley D. Cell line platforms support research into arthropod immunity. *Insects*. 2021; 12: 738. <https://doi.org/10.3390/insects12080738>
- Loginov DS, Loginova YF, Dycka F, et al. Tissue-specific signatures in tick cell line MS profiles. *Parasit Vectors*. 2019; 12(1): 212. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3460-5>
- Cramaro WJ, Hunewald OE, Bell-Sakyi L, et al. Genome scaffolding and annotation for the pathogen vector *Ixodes ricinus* by ultra-long single molecule sequencing. *Parasit Vectors*. 2017; 10(1): 71. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2008-9>
- Al-Khafaji AM, Bell-Sakyi L, Fracasso G, et al. Isolation of *Candidatus Rickettsia vini* from Belgian *Ixodes arboricola* ticks and propagation in tick cell lines. *Ticks Tick Borne Dis*. 2020; 11(6): 101511. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101511>
- Kurtti TJ, Felsheim R, Burkhardt NY, et al. *Rickettsia buchneri* sp. nov., a rickettsial endosymbiont of the blacklegged tick *Ixodes scapularis*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015; 65(Pt 3): 965–970. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000047>
- Kholodilov IS, Litov AG, Klimentov AS, et al. Isolation and characterization of Alongshan virus in Russia. *Viruses*. 2020; 12(4): 362. <https://doi.org/10.3390/v12040362>
- Najm NA, Silaghi C, Bell-Sakyi L, et al. Detection of bacteria related to *Candidatus* Midichloria mitochondrii in tick cell lines. *Parasitol Res*. 2012; 110(1): 437–442. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2509-y>
- Woldehiwet Z, Horrocks BK. Antigenicity of ovine strains of *Anaplasma phagocytophilum* grown in tick cells and ovine granulocytes. *J Comp Pathol*. 2005; 132: 322–328. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2004.12.002>
- Droleskey RE, Holman PJ, Craig TM, et al. Ultrastructure of *Babesia bovis* sexual stages as observed in *Boophilus microplus* cell cultures. *Res Vet Sci*. 1983; 34(2): 249–251.
- Ribeiro MF, Bastos CV, Vasconcelos MM, et al. *Babesia bigemina*: in vitro multiplication of sporokinets in *Ixodes scapularis* (IDE8) cells. *Exp Parasitol*. 2009; 122(3): 192–195. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.03.011>
- Obonyo M, Munderloh UG, Fingerle V, et al. *Borrelia burgdorferi* in tick cell culture modulates expression of outer surface proteins A and C in response to temperature. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(7): 2137–2141. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.7.2137-2141.1999>
- Bugrysheva J, Dobrikova EY, Godfrey HP, et al. Modulation of *Borrelia burgdorferi* stringency response and gene expression during extracellular growth with tick cells. *Infect Immun*. 2002; 70(6): 3061–3067. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.6.3061-3067.2002>
- Teixeira RC, Baêta BA, Ferreira JS, et al. Fluorescent membrane markers elucidate the association of *Borrelia burgdorferi* with tick cell lines. *Braz J Med Biol Res*. 2016; 49(7): e5211. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20165211>
- Kurtti TJ, Munderloh UG, Krueger DE, et al. Adhesion to and invasion of cultured tick (Acarina: Ixodidae) cells by *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetales) and maintenance of infectivity. *J Med Entomol*. 1993; 30(3): 586–596. <https://doi.org/10.1093/jmedent/30.3.586>
- Moniuszko A, Rückert C, Alberdi MP, et al. Coinfection of tick cell lines has variable effects on replication of intracellular bacterial and viral pathogens. *Ticks Tick Borne Dis*. 2014; 5(4): 415–422. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.01.010>
- Taank V, Zhou W, Zhuang X, et al. Characterization of tick organic anion transporting polypeptides (OATPs) upon bacterial and viral infections. *Parasit Vectors*. 2018; 11(1): 593. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3160-6>
- Mattila JT, Munderloh UG, Kurtti TJ. Phagocytosis of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, by cells from the ticks, *Ixodes scapularis* and *Dermacentor andersoni*, infected with an endosymbiont, *Rickettsia peacockii*. *J Insect Sci*. 2007; 7: 58. <https://doi.org/10.1673/031.007.5801>
- Munderloh UG, Park YJ, Diogh JM, et al. Plasmid modifications in a tick-borne pathogen, *Borrelia burgdorferi*, cocultured with tick cells. *Insect Mol Biol*. 1993; 1(4): 195–203. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1993.tb00092.x>
- Fingerle V, Laux H, Munderloh UG, et al. Differential expression of outer surface proteins A and C by individual *Borrelia burgdorferi* in different genospecies. *Med Microbiol Immunol*. 2000; 189(2): 59–66. <https://doi.org/10.1007/pl00008257>
- Varela AS, Luttrell MP, Howerth EW, et al. First culture isolation of *Borrelia lonestari*, putative agent of southern tick-associated rash illness. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(3): 1163–1169. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1163-1169.2004>
- Helmová R, Höning V, Tykalová H, et al. Tick-borne encephalitis virus adaptation in different host environments and existence of quasispecies. *Viruses*. 2020; 12(8): 902. <https://doi.org/10.3390/v12080902>
- Mansfield KL, Cook C, Ellis RJ, et al. Tick-borne pathogens induce differential expression of genes promoting cell survival and host resistance in *Ixodes ricinus* cells. *Parasit Vectors*. 2017; 10(1): 81. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2011-1>
- Weisheit S, Villar M, Tykalová H, et al. *Ixodes scapularis* and *Ixodes ricinus* tick cell lines respond to infection with tick-borne encephalitis virus: transcriptomic and proteomic analysis. *Parasit Vectors*. 2015; 8: 599. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1210-x>
- Loginov DS, Böttinger K, Loginova YF, et al. Biotyping of IRE/CTVM19 tick cell line infected by tick-borne encephalitis virus. *Ticks Tick Borne Dis*. 2020; 11(4): 101420. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101420>
- Belova OA, Litov AG, Kholodilov IS, et al. Properties of the tick-borne encephalitis virus population during persistent infection of ixodid ticks and tick cell lines. *Ticks Tick Borne Dis*. 2017; 8(6): 895–906. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.07.008>
- Růžek D, Bell-Sakyi L, Kopecký J, et al. Growth of tick-borne encephalitis virus (European subtype) in cell lines from vector and non-vector ticks. *Virus Res*. 2008; 137(1): 142–146. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.05.013>
- Senigl F, Grubhoffer L, Kopecký J. Differences in maturation of tick-borne encephalitis virus in mammalian and tick cell line. *Intervirology*. 2006; 49(4): 239–248. <https://doi.org/10.1159/000091471>
- Lattová E, Straková P, Pokorná-Formanová P, et al. Comprehensive N-glycosylation mapping of envelope glycoprotein from tick-borne

- encephalitis virus grown in human and tick cells. *Sci Rep.* 2020; 10(1): 13204. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70082-2>
45. Dyachenko V, Geiger C, Pantchev N, et al. Isolation of canine *Anaplasma phagocytophilum* strains from clinical blood samples using the *Ixodes ricinus* cell line IRE/CTVM20. *Vet Microbiol.* 2013; 162(2–4): 980–986. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.10.021>
46. Passos LM. In vitro cultivation of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in tick cell lines: a review. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2012; 21(2): 81–86. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612012000200002>
47. Massung RF, Levin ML, Munderloh UG, et al. Isolation and propagation of the Ap-Variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophilum* in a tick cell line. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(7): 2138–2143. <https://doi.org/10.1128/JCM.00478-07>
48. Massung RF, Levin ML, Munderloh UG, et al. Isolation of *Anaplasma phagocytophilum* strain Ap-variant 1 in a tick-derived cell line. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1078: 541–544. <https://doi.org/10.1196/annals.1374.105>
49. Silaghi C, Kauffmann M, Passos LM, et al. Isolation, propagation and preliminary characterisation of *Anaplasma phagocytophilum* from roe deer (*Capreolus capreolus*) in the tick cell line IDE8. *Ticks Tick Borne Dis.* 2011; 2(4): 204–208. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2011.09.002>
50. Cabezas-Cruz A, Alberdi P, Valdés JJ, et al. *Anaplasma phagocytophilum* infection subverts carbohydrate metabolic pathways in the tick vector, *Ixodes scapularis*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017a; 7: 23. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00023>
51. Cabezas-Cruz A, Alberdi P, Valdés JJ, et al. Remodeling of tick cytoskeleton in response to infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2017b; 22: 1830–1844. <https://doi.org/10.2741/4574>
52. Cabezas-Cruz A, Alberdi P, Ayllón N, et al. *Anaplasma phagocytophilum* increases the levels of histone modifying enzymes to inhibit cell apoptosis and facilitate pathogen infection in the tick vector *Ixodes scapularis*. *Epigenetics.* 2016; 11(4): 303–319. <https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1163460>
53. Cabezas-Cruz A, Espinosa PJ, Obregón DA, et al. *Ixodes scapularis* tick cells control *Anaplasma phagocytophilum* infection by increasing the synthesis of phosphoenolpyruvate from tyrosine. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017c; 7: 375. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00375>
54. Alberdi P, Mansfield KL, Manzano-Román R, et al. Tissue-specific signatures in the transcriptional response to *Anaplasma phagocytophilum* infection of *Ixodes scapularis* and *Ixodes ricinus* tick cell lines. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016; 6: 20. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00020>
55. Alberdi P, Ayllón N, Cabezas-Cruz A, et al. Infection of *Ixodes* spp. tick cells with different *Anaplasma phagocytophilum* isolates induces the inhibition of apoptotic cell death. *Ticks Tick Borne Dis.* 2015; 6(6): 758–767. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.07.001>
56. Ayllón N, Villar M, Busby AT, et al. *Anaplasma phagocytophilum* inhibits apoptosis and promotes cytoskeleton rearrangement for infection of tick cells. *Infect Immun.* 2013; 81(7): 2415–2425. <https://doi.org/10.1128/IAI.00194-13>
57. Crosby FL, Munderloh UG, Nelson CM, et al. Disruption of VirB6 paralogs in *Anaplasma phagocytophilum* attenuates its growth. *J Bacteriol.* 2020; 202(23): e00301–20. <https://doi.org/10.1128/JB.00301-20>
58. Mateos-Hernández L, Pipová N, Allain E, et al. Enlisting the *Ixodes scapularis* embryonic ISE6 cell line to investigate the neuronal basis of tick-pathogen interactions. *Pathogens.* 2021; 10(1): 70. <https://doi.org/10.3390/pathogens10010070>
59. Contreras M, Alberdi P, Fernández De Mera IG, et al. Vaccinomics approach to the identification of candidate protective antigens for the control of tick vector infestations and *Anaplasma phagocytophilum* infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 7: 360 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00360>
60. Thu MJ, Qiu Y, Kataoka-Nakamura C, et al. Isolation of *Rickettsia*, *Rickettsiella*, and *Spiroplasma* from questing ticks in Japan using arthropod cells. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2019; 19(7): 474–485. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2373>
61. Santibáñez S, Portillo A, Palomar AM, et al. Isolation and maintenance of *Rickettsia raoultii* in a *Rhipicephalus sanguineus* tick cell line. *Microbes Infect.* 2015; 17(11–12): 866–869. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.09.018>
62. Alberdi MP, Nijhof AM, Jongejan F, et al. Tick cell culture isolation and growth of *Rickettsia raoultii* from Dutch *Dermacentor reticulatus* ticks. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012; 3(5–6): 349–354. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.020>
63. Husin NA, Khoo JJ, Zulkifli MMS, et al. Replication kinetics of *Rickettsia raoultii* in Tick Cell Lines. *Microorganisms.* 2021; 9(7): 1370. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071370>
64. Wijnveld M, Schötta AM, Pintér A, et al. Novel *Rickettsia raoultii* strain isolated and propagated from Austrian *Dermacentor reticulatus* ticks. *Parasit Vectors.* 2016; 9(1): 567. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1858-x>
65. Herrin B, Mahapatra S, Blouin EF, et al. Growth of *Coxiella burnetii* in the *Ixodes scapularis*-derived IDE8 tick cell line. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011; 11(7): 917–922. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0126>