

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



Sezónní dynamika blech u plchů a detekce bartonel

Diplomová práce

Bc. Kateřina Bundilová

Studijní program: N1501 – Biologie

Studijní obor: Biologie – Geografie

Forma studia: prezenční

Vedoucí práce: Mgr. Peter Adamík, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Karolina Majerová

Olomouc 2020

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně v průběhu navazujícího studia pod vedením Mgr. Petera Adamíka, Ph.D. za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne:
.....

Chtěla bych tímto poděkovat všem přátelům a rodině za veškerou podporu, kterou mi věnovali během celého studia. Hlavně však babičce Alence, která mě inspirovala ke studiu biologie už od mého dětství a bohužel se nedožila šance vidět, jak mé studium zdárně absolvuji.

Pochopitelně největší poděkování patří mému školiteli – Mgr. Peteru Adamíkovi, Ph.D. – za možnost pracovat pod jeho vedením, za veškeré jeho rady a připomínky, za nakažlivé zapálení do vědy, za to, že mi vždy vyšel vstříc, kdykoliv jsem potřebovala. Za jeho lidský přístup a povzbuzení ve chvílích, které byly během vypracovávání mé práce náročné.

Velké díky patří všem lidem z Katedry parazitologie PřF UK, kteří mi buď pomáhali nebo mě zasvěcovali do úchvatného světa parazitologie; jmenovitě pak především doc. RNDr. Janu Votýpkovi, Ph.D. a Mgr. Karolině Majerové, která se mě ujala jako konzultant pro parazitologickou část mé práce, byla vždy ochotná mi pomoci a trávila se mnou její volný čas v laboratoři mnohdy do nočních hodin. Moc vděčná jsem také lidem z VFU Brno – Prof. MVDr. Davidu Modrému, Ph.D. a MVDr. Ladě Hofmannové, Ph.D. Neodmyslitelnou součástí poděkování jsou i moji kolegové Igor, Pája, Nikča a Barča, kteří mi v terénu pomáhali se sběrem vzorků a z náročné práce dokázali udělat zábavu. Speciální poděkování náleží statistické kouzelnici, outlierce a rodilé mluvčí pro jazyk R, Viki Nesrstové, bez jejíž pomoci by tato práce neměla tak dokonalé grafy.

Tato práce byla podpořena studentským grantem PřF Univerzity Palackého IGA_PrF_2019_019.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Bc. Kateřina Bundilová

Název práce: Sezónní dynamika blech u plchů a detekce bartonel

Typ práce: diplomová práce

Pracoviště: Katedra botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: Mgr. Peter Adamík, Ph.D.

Rok obhajoby: 2020

Abstrakt:

Hlodavci hrají klíčovou roli jako hostitelé pro řadu ektoparazitů, kteří přenášejí široké spektrum onemocnění u zvířat i lidí. Jedním z nejběžnějších ektoparazitů hlodavců jsou blechy, které jsou, mimo jiné, i hostitelským organismem pro bartonely – bakterie, které v současných parazitologických výzkumech nabývají na významu. V diplomové práci jsem se zabývala sezónní dynamikou blechy *Ceratophyllus (Monopsyllus) sciurorum* u plcha velkého (*Glis glis*) a detekcí bartonel v obou těchto hostitelích. U plcha velkého jsem v průběhu jeho aktivní sezóny zaznamenala kromě dominantního druhu – *Ceratophyllus (Monopsyllus) sciurorum* ještě blechy *Ceratophyllus gallinae* a *Hystrihopsylla talpae*. Přítomnost blech u plchů se v průběhu sezóny statisticky významně měnila s periodou (tedy datem odběru), dále s pohlavní aktivitou jedinců a v rámci odběrových lokalit. Věk a pohlaví jedince nemělo na přítomnost blech žádný vliv. V případě početnosti blech u plchů byla opět statisticky průkazná změna v průběhu sezóny, kdy nejvyšší početnost připadla na zří. Pohlavní aktivita plcha a lokalita se jeví jako neprůkazné. Proměnné pohlaví, velikost těla a věk plcha neměly na početnost blech žádný průkazný vliv. V průběhu celé sezóny jsem zaznamenala na hostitelích v průměru více samic blech *C. sciurorum* než samců. Prevalenci bartonel jsem vyhodnotila pro *C. sciurorum* i plcha velkého. V průběhu sezóny prevalence u blech fluktovala, průměrně dosahovala 44,7 %; nejvyšších hodnot dosáhla na konci července (52,4 %). Bartonely byly detekovány častěji u samic blech než u samců. Pro srovnání dvou ekologicky odlišných lokalit vyšel významný vliv pohlaví blechy a interakce mezi lokalitou a periodou. Obě lokality se v průběhu sezóny lišily ve vrcholu prevalence (uprostřed léta versus konec léta). V sezóně se zároveň odebíraly zvláště i vzorky z plchů a na nich parazitujících blech za účelem zjištění, zda v krvích i blechách kolují stejné druhy bartonel. Prevalence u takto odebíraných blech byla 45,6 %, v krevních vzorcích plchů 52,9 %. Následně jsem vyhodnocovala, zda je u pozitivního plcha alespoň jedna z odebraných blech rovněž pozitivní – ke shodě došlo v 39,2 % případů, což naznačuje, že plch velký je pravděpodobným zdrojem bartonelové infekce

pro blechy. Vyhodnocení sekvencí potvrdilo dvou odlišných druhů bartonel – *Bartonella grahamii*-like a zatím nepojmenovaného druhu *Bartonella* sp.

Klíčová slova: plch velký (*Glis glis*), blechy, *Ceratophyllus (Monopsyllus) sciurorum*, bartonela

Počet stran: 86

Počet příloh: 2

Jazyk: český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Bc. Kateřina Bundilová

Title of thesis: Seasonal dynamics of fleas in dormice and detection of *Bartonella* spp.

Type of thesis: Master thesis

Department: Department of Botany, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc

Supervisor: Mgr. Peter Adamík, PhD.

The year of presentation: 2020

Abstract:

Rodents play a key role as hosts for many ectoparasites which carry a wide spectrum of both human and animal diseases. Fleas are one of the most common rodent ectoparasites. Fleas also serve as a host organism for *Bartonella* – bacteria of a growing importance in present parasitological studies. In my Master thesis I analyzed seasonal dynamics of the flea *Ceratophyllus (Monopsyllus) sciurorum* found on the edible dormice (*Glis glis*) and the detection of *Bartonella* species in both hosts. During the active season of the edible dormouse I recorded – with the exception of the dominant species *Ceratophyllus (Monopsyllus) sciurorum* – also *Ceratophyllus gallinae* and *Hystrichopsylla talpae*. Flea presence on dormice substantially varied over the summer season and across sites, but also with host reproductive status. Age and sex of dormice had no effect on the presence of fleas. The number of fleas on dormice varied significantly during the trapping season with the highest numbers in September. There was no evidence for the effect of reproductive activity, study area, host sex, body size and age on the number of fleas on an individual. During the season I have recorded on average more female fleas of *C. sciurorum* than males. I evaluated the prevalence of *Bartonella* spp. in both *C. sciurorum* and the dormice. The prevalence in fleas fluctuated during the trapping season with an average of 44.7% and did reach the highest peak at the end of July (52.4%). *Bartonella* spp. were detected more frequently in female fleas than in males. When comparing two different study sites, there was a statistically significant effect of the sex of the flea and the interaction between the study area and the time period. Both study areas did vary in the recorded prevalence peaks (mid summer vs the end of summer). During the trapping season, I also separately collected both samples from the dormice and their parasiting fleas to determine if the the *Bartonella* spp. circulating in them are identical. The prevalence using this methodology reached 45.6 % in fleas and 52.9% in dormice blood samples. Then I compared if a *Bartonella*-positive dormice carry at least one *Bartonella*-positive flea – the congruence was recorded in 39.2% of cases, which implies that the edible dormouse is indeed a probable source of *Bartonella* infection for fleas. The evaluation of the

sequences confirmed two different *Bartonella* species – *Bartonella grahamii*-like and yet unnamed new species *Bartonela* sp.

Keywords: edible dormouse (*Glis glis*), fleas, *Ceratophyllus (Monopsyllus) sciurorum*, *Bartonella* spp.

Number of pages: 86

Number of appendices: 2

Language: Czech

OBSAH

ÚVOD A CÍLE PRÁCE.....	11
1 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	12
1.1 BLECHY (SIPHONAPTERA)	12
1.1.1 Základní charakteristika	12
1.1.2 Vývoj.....	12
1.1.3 Rozšíření blech v korelaci s hostitelskou specifitou.....	13
1.1.4 Výskyt blech v ptačích hnízdech.....	15
1.1.4.1 Savčí blechy v hnízdech ptáků	15
1.1.4.2 Výskyt blech v hnízdech plcha velkého	17
1.1.5 Blechy jako přenašeči.....	17
1.1.5.1 Příklady zoonóz přenášených blechami	20
1.2 ROD <i>BARTONELLA</i>	22
1.2.1 Charakteristické znaky bartonel	22
1.2.2 Taxonomie.....	22
1.2.3 Habitat	23
1.2.4 Izolace, růstové a kultivační vlastnosti.....	25
1.2.5 Determinace	25
1.2.6 Morfologie a fyziologie buněk	25
1.2.7 Hostitelská specifita bartonel	26
1.2.8 Výskyt bartonel u savců	26
1.2.8.1 Výskyt bartonel u hlodavců a jejich blech	27
1.2.8.1.1 Cesty přenosu bartonelových infekcí u hlodavců.....	29
1.2.8.1.2 Dynamika infekce bartonelami u hlodavců v laboratorním prostředí	29
1.2.8.1.3 Koinfekce	30
1.3 PLCH VELKÝ	31
1.3.1 Obecná charakteristika	31
1.3.2 Hibernace, reprodukce	31

1.3.3	Výskyt	32
1.3.4	Závislost reprodukce a populační dynamiky plchů na výskytu semenných let.....	34
2	MATERIÁL A METODY	35
2.1	Charakteristika sledovaného území.....	35
2.2	Práce v terénu	36
2.2.1	Odchyt plchů, sběr a uchovávání blech.....	37
2.2.2	Odběry vzorků z plchů	38
2.3	Druhová determinace blech.....	38
2.4	Výběr blech pro detekci bartonel	39
2.5	Práce v laboratoři	40
2.5.1	Izolace DNA z blech	40
2.5.2	Izolace DNA z krve plchů.....	41
2.5.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	42
2.5.4	Elektroforéza (ELFO)	43
2.5.5	Přešičtění/izolace DNA z PCR produktů	44
2.5.6	Sekvenační reakce	45
2.5.7	Vyhodnocení sekvencí a fylogenetické analýzy.....	45
2.6	Zápis, zpracování a statistická analýza dat.....	45
3	VÝSLEDKY.....	47
3.1	Druhové spektrum blech u plcha velkého	47
3.2	Sezónní dynamika blech.....	47
3.2.1	Proměnné ovlivňující přítomnost blech u plchů.....	47
3.2.2	Proměnné ovlivňující početnost blech u plchů.....	50
3.2.3	Analýza efektu pohlaví blech u plchů	52
3.3	Detekce bartonelové DNA	53
3.3.1	Stanovení metodiky pro detekci bartonelové DNA u odchycených blech.....	53
3.3.2	Detekce DNA bartonel u odchycených blech	55
3.3.3	Detekce bartonelové DNA u plchů a z nich odebraných blech.....	57
3.3.4	Vyhodnocení detekovaných bartonelových sekvencí	58

4	DISKUZE	59
4.1	Druhové spektrum blech u plcha velkého	59
4.2	Sezónní dynamika <i>C. sciurorum</i> u plcha velkého	60
4.2.1	Proměnné ovlivňující přítomnost a početnost <i>C. sciurorum</i> u plchů	61
4.2.2	Efekt pohlaví blech u plchů.....	63
4.3	Detekce bartonelové DNA	63
4.3.1	Detekce bartonelové DNA u odchycených blech.....	63
4.3.1.1	Porovnání prevalence u bartonel u dvou ekologicky odlišných lokalit.....	64
4.3.2	Detekce bartonelové DNA z plchů a k nim odebraných blech.....	64
4.3.3	Vyhodnocení detekovaných bartonelových sekvencí	65
5	DIDAKTICKÁ ANALÝZA ODBORNÉHO TÉMATU	67
5.1	Opakovací pracovní list.....	67
5.1.1	Časová dotace a organizace.....	68
5.1.1.1	Metody a formy výuky	68
5.1.1.2	Klíčové kompetence	69
5.1.1.3	Průřezová témata a mezipředmětové vztahy	69
5.1.1.4	Analýza prekonceptů a výukové cíle.....	69
5.1.1.5	Doporučené učebnice pro žáky a pro učitele.....	70
	ZÁVĚR	71
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	72
	PŘÍLOHY	86

ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Blechy (Siphonaptera) jsou obligátními ektoparazity řady savců a ptáků. Díky svému životu v bezprostřední blízkosti svých hostitelů a schopnosti být rezervoárem pro řadu infekčních agens (viry, bakterie, protozoa, helminti) jsou důležitým článkem v přenosu infekcí napříč širokým spektrem organismů. Původcem jedné z infekcí, které se v posledních letech dostává stále větší pozornosti ze strany vědců, jsou bakterie rodu *Bartonella*, které je možné detekovat u řady obratlovců a jejich ektoparazitů – především blech. Vysokou taxonomickou i genetickou diverzitu vykazují bartonely u hlodavců, mezi které řadíme mj. i plcha velkého, na kterého je tato práce zaměřena.

Zatímco sezónní dynamika blech u plchů a detekce různých patogenů v těchto ektoparazitech je v odborné literatuře popisována, v případě systému plch – blecha – bartonela dosud žádná rozsáhlejší výzkumná činnost neproběhla.

Za cíle této práce jsem zvolila:

- vyhodnocení druhového spektra a sezónní dynamiky blech u plcha velkého
- provedení statistické analýzy proměnných vysvětlujících přítomnost a početnost blechy *Ceratophyllus (Monopsyllus) sciurorum* u plcha velkého
- vyhodnocení prevalence bartonel u blech *Ceratophyllus (Monopsyllus) sciurorum* a plcha velkého

1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1 BLECHY (SIPHONAPTERA)

1.1.1 Základní charakteristika

Blechy se řadí do třídy Insecta (hmyz), podtřídy Pterygota (křídlatí) a řádu Siphonaptera (syn. Aphaniptera). Tento vysoce specializovaný a relativně malý řád sekundárně bezkřídlého holometabolního hmyzu čítá 2005 druhů a 828 poddruhů, rozčleněných do 242 rodů, 97 podrodů a 18 čeledí. Je však jisté, že se tato čísla budou postupně měnit, a to díky neustále probíhajícímu objevování a popisu nových druhů (Krasnov, 2012; Whiting *et al.*, 2008). Na území České republiky se v současné době vyskytuje více jak sto druhů blech. Dospělci blech žijí výhradně cizopasně a s výjimkou rodu *Tunga* se jedná o ektoparazity (Volf *et* Votýpka, 2007).

S parazitickým způsobem života se pojí celá řada morfologických tělních znaků, které jsou pro blechy charakteristické. Tělo dospělého je dlouhé přibližně 2 – 10 mm, je laterálně zploštělé, silně sklerotizované a nese množství dozadu směřujících štětín a hřebenů (ktenidií), které jsou často uspořádané do řad a napomáhají rychlému pohybu v srsti či peří hostitelů. Zároveň podstatně ztěžují odstranění blech hostitelem (Bitam *et al.*, 2010). Přítomnost ktenidií, jejich umístění a počet, slouží k taxonomickému určování druhů (Dobler *et* Pfeffer, 2011).

1.1.2 Vývoj

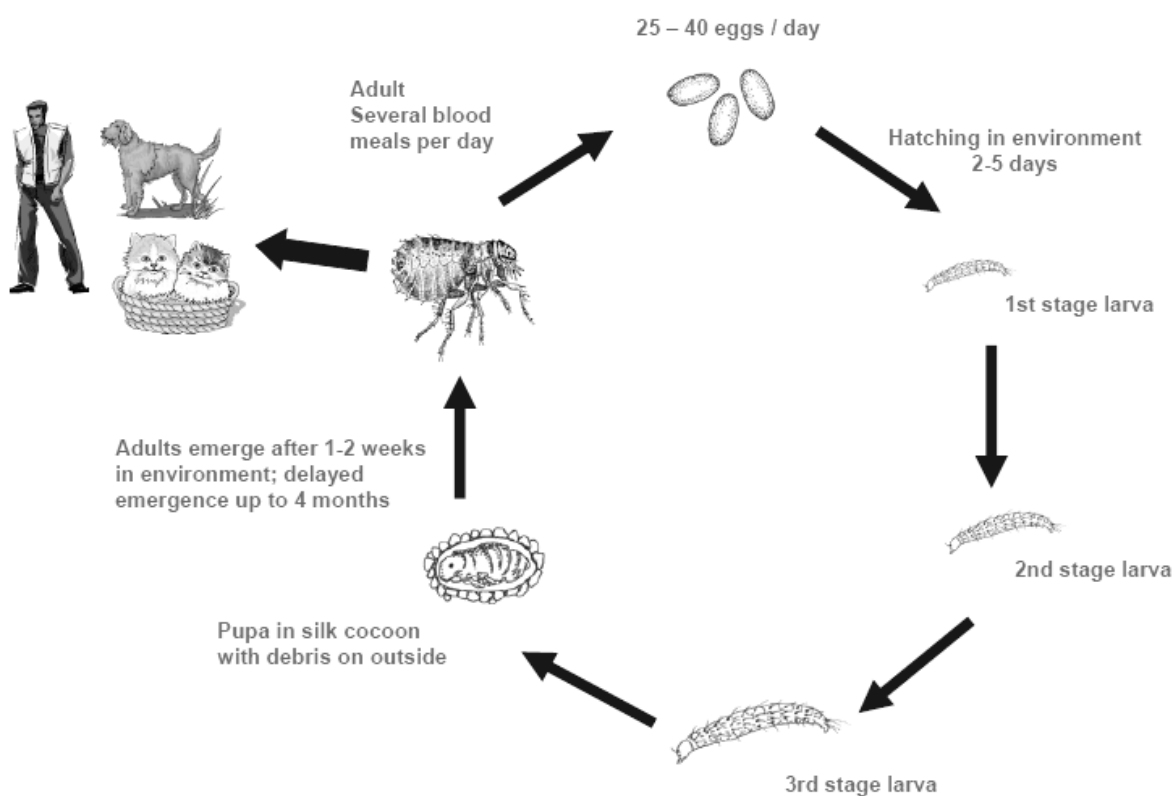
Samci i samice blech jsou obligatorní krev-sající ektoparazité s proměnou dokonalou. Životní cyklus proto začíná vajíčkem, ze kterého se vyvíjí larva procházející několika instary, která se následně kuklí a z kukly se pak líhne dospělý jedinec. Všechna stadia s výjimkou dospělého se zpravidla vyvíjejí mimo svého hostitele. Samice mohou za den naklást až 50 vajíček v období dlouhém až 100 dní (množství nakladených vajíček však postupně klesá). Vajíčka jsou malá (0,1 – 0,5 mm), oválná, bělavá až průsvitná (Bourne *et al.*, 2018; Iannino *et al.*, 2017).

Doba, za kterou se z vajíčka vylíhne larva, závisí na teplotě a vlhkosti prostředí, průměrně tento proces trvá dva dny až dva týdny. Velikost larválních stadií se liší dle instaru; první instar se pohybuje mezi 1 – 2 mm, třetí může měřit i více než 5 mm. Larvy jsou apodní, eucefální, mají bílé zbarvení, červovitý vzhled a bývají pokryty drobnými chlupy. Disponují párem čelistí a párem žláz, kterými později produkují hedvábné vlákno pro tvorbu kokonu (Bourne *et al.*, 2018; Durden *et* Hinkle, 2009; Iannino *et al.*, 2017). Na rozdíl od dospělců jsou larvy neparazitické a živí se organickým odpadem či trusem dospělých blech, který je přítomen v hnízdě hostitele. Po pozření tohoto typu potravy pak barva jejich těla tmavne (Blagburn *et* Dryden, 2009; Krasnov *et al.*, 2005). Období vývinu instarů trvá 2 – 3 týdny. Larvy ve třetím instaru produkují již zmíněný kokon

pro kuklu; hedvábná vlákna, která kuklu tvoří, jsou lepkavá a nachytává se na ně drobný materiál přítomný v hnízdě hostitele (např. prach, peří, chlupy); obalení kukly funguje jako maskovací mechanismus a zároveň chrání před vyschnutím (Dobler *et Pfeffer*, 2011).

V ideálních podmínkách (při cca 27 °C a 80 % relativní vlhkosti) se dospělec z kukly líhne po 1 – 2 týdnech. Líhnutí je podmiňováno znaky, které signalizují přítomnost potenciálního hostitele – jedná se např. o tlak, vibrace, teplotu či zvýšení obsahu CO₂; bez těchto stimulů může stadium kukly přetrvat až několik měsíců. Ihned po vylíhnutí se dospělec snaží vyhledat potravu – krev hostitele. Pokud ji nenalezne, dokáže přežít několik týdnů o hladu, avšak v případě, že se imago po vylíhnutí okamžitě nasaje, musí potravu znovu vyhledat za mnohem kratší časový interval (Bourne *et al.*, 2018).

K rozmnožování může docházet na těle hostitele i mimo něj, samice je schopná začít klást vajíčka 1 – 3 dny po prvním přijetí potravy. Dospělé blechy mohou žít v optimálním prostředí i více než rok (Bourne *et al.*, 2018). Celý životní cyklus blech demonstruje obrázek č. 1.



Obrázek č. 1: Schématické znázornění životního cyklu blechy kočičí (*Ctenocephalides felis*). Převzato z: Dobler *et Pfeffer* (2011); licencováno pod CC BY 2.0.

1.1.3 Rozšíření blech v korelaci s hostitelskou specifitou

Dospělci blech parazitují především na savcích (96 % druhů, z čehož až 70 % tvoří hlodavci) a ptácích (4 % druhů) (Hugot, 2006; Volf *et Votýpka*, 2007). Protože se dospělci blech živí výlučně krví, jsou velmi úzce spjati se svými hostiteli. Z obecného hlediska tráví blechy část svého života

v hnízdech hostitelů (vajíčka, larvy a kukly) a část přímo na hostiteli (dospělec). Doba, kterou stráví imaga blech na těle svého hostitele, se liší v rámci jednotlivých taxonů. Právě dle těchto rozdílů (ve vazbě k hostiteli) lze dospělé blechy z ekologického hlediska rozdělit na dvě skupiny: srstní a hnízdní. Srstní blechy tráví většinu svého dospělého života v srsti či peří hostitele; do této kategorie řadíme příslušníky rodů *Ctenocephalides*, *Chaetopsylla*, *Citellophilus*, *Tarsopsylla*, *Amphipsylla*, *Praceras*, *Peromyscopsylla*, *Traianapsylla*, *Leptopsylla*, *Paleopsylla*, blechy netopýrů atd. Hnízdní blechy tráví většinu času v hnízdě/noře hostitele; tato skupina zahrnuje rody *Ceratophyllus*, *Ctenophthalmus*, *Hystrihopsylla*, *Rhadinopsylla*, částečně i *Pulex* aj. Někdy se rozlišuje i skupina kombinující tyto dva typy dohromady – v takovém případě tráví blecha zhruba stejné období dospělého života na hostiteli i v hnízdě/noře. Ve srovnání jsou hnízdní blechy méně vázány na své hostitele než blechy srstní. Mezi těmito dvěma kategorizacemi, tedy dle preference mikrohabitatů, není s největší pravděpodobností žádná vazba, je však logické, že hnízdní blechy jsou méně vázány na své hostitele, než blechy srstní (Rosický, 1957; van der Mescht *et al.*, 2016).

Jednotlivé druhy blech se liší dle úrovně své hostitelské specifity – od hostitelsky specifických až po hostitelsky oportunistické druhy. Tradiční kategorizace ektoparazitů (včetně blech) z hlediska úrovně hostitelské specifity je založena na počtu hostitelských druhů a jejich taxonomickém postavení. Rozlišují se blechy:

- a) monoxenní (mající jeden hostitelský druh);
- b) oligoxenní (mající ≥ 2 hostitelské druhy náležící do stejného rodu),
- c) mezo- či pleioxenní (mající ≥ 2 hostitelské rody náležící do stejné čeledě);
- d) polyxenní (mající ≥ 2 hostitelské čeledě náležící do stejného řádu);
- e) euryxenní (mající ≥ 2 hostitelské řády či třídy).

Nelze přesně určit, která z těchto ekologických skupin u blech obecně převažuje – liší se jak zastoupení jednotlivých skupin napříč čeleděmi, tak souborná data prezentovaná různými autory. Zatímco hostitelsky specifické blechy (tedy monoxenní a oligoxenní) jsou vázány na ekologicky izolované hostitele (např. hlodavce žijící v zemi) z důvodu vyšší míry přizpůsobení se jejich tělu a mikroklimatickým podmínkám nory, hostitelsky oportunistické (mezo-/pleioxenní, polyxenní, euryxenní) druhy blech jsou spíše vázány na habitat hostitele než hostitele samotného. Proto obývají určitý habitat, kde využívají větší množství ekologicky podobných hostitelských druhů (Hugot, 2006).

Krasnov (2004a) upozorňuje na náročnost sledování hostitelské specifity u blech v různých přírodních podmínkách, které mohou zkreslovat sledování tohoto jevu. Například hostitel napadený určitým druhem blechy na jedné lokalitě nemusí být nutně hostitelem stejného druhu na lokalitě jiné, a to z důvodu rozdílných a pro daný druh blechy již nevyhovujících, přírodních podmínek – ty se mohou projevit například v rámci mikroklimatu hnízda hostitele, ve složení substrátu nory atd.

Protože se více druhů blech v různých vývojových stádiích může vyskytovat jak na dospělých (hlavně imaga), tak v hnízdech (hlavně vajíčka, larvy, kukly), kde se stávají nedílnou součástí biocenózy, dochází tím k vytvoření jisté ekologické jednotky, kterou Rosický (1957) označil jako „aphanipterium“ (v současné literatuře označováno jako „siphonapterium“). To tedy představuje konkrétní soubor druhů blech na jednom hostiteli v jednom hnízdě. Z jeho terénních poznatků také vyplynulo, že příslušníci určitého ptačího či savčího druhu mohou sdílet shodné siphonapterium. Jednotlivá siphonapteria se pak označují podle živočichů, které mají ve sledovaném pásmu převahu (např. siphonapterium drobných zemních savců, drobných pěvců v korunách stromů, větších zemních hlodavců, veverek, ježků, netopýrů, velkých šelem atd.).

Přestože blechy jsou ve vztahu ke svému hostiteli jen zřídka monoxenní, některé čeledě lze přiřadit k typické skupině hostitelů, na které parazitují (Whiting *et al.*, 2008).

1.1.4 Výskyt blech v ptačích hnízdech

Ptačí budky slouží plchům (ale i jiným drobným obratlovcům) jako úkryty během aktivní sezóny (Juškaitis, 1999). S tím pak souvisí i fakt, že poskytují útočiště i celé řadě ektoparazitů – blechy tak pochopitelně nejsou výjimkou. Výskyt blech ovlivňuje množství faktorů, z nichž je většina spjata s environmentálními podmínkami. Klíčový vliv může mít však i charakter mikrobiotopu, jakým je ptačí hnízdo (např. jeho výstelka atd.). Protože se ptáci během svého reprodukčního období s blechami v hnízdech setkávají dlouhodobě, vyvinuli si jisté behaviorální, fyziologické a imunologické strategie redukující působení těchto parazitů. Pokud ptáci detekují přítomnost blech ve svém hnízdě (obzvláště jsou-li přemnoženy), často se vyvarují následnému kontaktu změnou hnízdiště. Mohou také před zahájením odstranit původní výstelku a tím pravděpodobně snížit výskyt blech. Někteří ptáci do své výstelky přidávají čerstvý rostlinný materiál či peří, čímž celkově snižují fitness všech přítomných ektoparazitů. Výskyt většího množství blech v hnízdě může negativně ovlivnit i velikost snůšky ptáků (Heeb, Kölliker *et* Richner, 2000). Ekologická potence blech je z hlediska vztahu k hostitelům velmi různorodá. Nejvíce se projevuje u těch druhů, které za své hostitele preferují právě ptáky, a to hlavně díky jejich velké mobilitě a možnosti vzájemného kontaktu mezi ptáky jako hostiteli. Současně se projevuje i fyziologické přizpůsobení se k hostiteli a jeho hnízdním podmínkám společně se schopností blech aktivně migrovat. Šířka hostitelského spektra jednotlivých ptačích druhů blech je, na rozdíl od savčích druhů blech, prozatím relativně málo prozkoumanou oblastí (Cyprich, Krumpál *et* Plachý, 2009).

1.1.4.1 Savčí blechy v hnízdech ptáků

V hnízdech ptáků se poměrně často můžeme setkat i s blechami savčími. Přestože určité druhy či systematické skupiny blech výrazně preferují jako své hostitele buď ptáky nebo savce (kteří mají zcela odlišné tělo, habitat i způsob života), dochází mezi těmito hostiteli často k výměně jejich siphonapterofauny. Může se tak stát z několika různých důvodů; může jít o výsledek hostitelských

a potravních vztahů – typicky některé druhy hlodavců či lasicovitých šelem jsou hnízdními predátory ptáků nebo ptačí hnízda přechodně okupují, čímž do hnízda zanesou vlastní blechy. Nezanedbatelnou roli má i aktivní migrace blech v rámci stanoviště/biotopu, které s hostiteli sdílí (Czeszczewik, Walankiewicz *et* Stańska, 2008; Juškaitis, 1999).

Například Cyprich, Krumpál *et* Rolníková (2001) prováděli na území Slovenska v letech 1964 – 1999 rozsáhlý výzkum výskytu savčích druhů blech na ptácích a v jejich hnízdech. Celkově bylo kontrolováno 4 062 hnízd (striktně ptačích či takových, které společně s ptáky obývají i savci) od 229 různých hostitelských druhů ptáků a savců, ze kterých bylo nasbíráno 140 204 blech na 434 lokalitách. Celkově bylo zaznamenáno 16 taxonů blech, které jsou vývojem a potravou specializované na ptáky, a 21 taxonů, které jsou ve stejných ohledech specializované na savce. Je však nutné podotknout, že zastoupení ptačích blech bylo i přes menší počet taxonů převládající (přes 85 %). Savčí blechy byly pak rozděleny do tří různých kategorií dle procentuálního zastoupení a frekvence výskytu na následující:

a) *pravidelně se vyskytující* – s nejvyšším procentuálním zastoupením i frekvencí

- např.: *Megabothris turbidus*, *Nosopsyllus fasciatus*, *Cenophthalmus agrytes*, *Cenophthalmus assimilis* ad.;

b) *příležitostně/občasně se vyskytující* – s nízkým procentuálním zastoupením a frekvencí

- např.: *Ctenophthalmus solutus*, *Tarsopsylla octodecimentata* ad.;

c) *náhodně se vyskytující* – s minimálním procentuálním zastoupením a frekvencí

- např.: *Ctenophthalmus orientalis*, *Ischnopsyllus octactenus*, *Doratopsylla dasyncema*, *Paleopsylla soricis rosickyi*, *Hystrichopsylla* spp., *Ctenophthalmus uncinatus*, *Peromyscopsylla bidentata*, *Amphipsylla rossica*, *Amalaraeus penicillinger*, *Megabothris walkeri* ad.,

přičemž nejvíce savčích druhů blech v hnízdech ptáků náleželo do skupiny c) s náhodným výskytem, minimálním procentuálním zastoupením a frekvencí.

Otázkou zůstává, jak se savčí druhy blech do hnízd ptáků dostávají, jestli má jejich výskyt praktický význam, a zda v hnízdech objevené savčí blechy mohou sít na ptácích – tedy jestli je jejich výskyt vázán na potravu nebo jde o náhodný výskyt umožněný např. transportem blech společně se stavebním materiálem ptačího hnízda, přenesením ptáka jakožto potravy do ptačího hnízda či aktivní migrací blech společně se svými savčími hostiteli obývajícími stejná stanoviště. Tyto spekulace jsou z hlediska fylogenetického a potravního logické u těch savčích blech, které se v hnízdech vyskytují pravidelně (Cyprich, Krumpál *et* Duda, 2008; Cyprich, Krumpál *et* Rolníková, 2001; Cyprich *et* Štiavnická, 2003).

1.1.4.2 Výskyt blech v hnízdech plcha velkého

Plch velký preferuje pro své hnízdo uzavřená místa, kterými jsou často stromové dutiny nebo například i ptačí budky.

Jedním z pásem siphonapterií, které vyčlenil Rosický (1957), je i pásmo siphonapterií veverky, které zahrnuje mj. i plcha velkého. Celé toto pásmo je typické pro středoevropské arboreální savce, hnízda divoce žijících holubů rodu *Columba*, hrdliček *Streptopelia* a pro jiné ptáky, stavějící si hnízda podobná veverčím v korunách nebo dutinách stromů. Právě díky různým směnám hnízd dochází k časté výměně blech a jejich další specializaci. Mezi typické blechy tohoto pásma patří *Tarsopsylla octodecimdentata* a *Ceratophyllus (Monopsyllus) sciurorum*. Život veverky, který často zahrnuje pronikání do ptačích hnízd, zapříčiňuje, že na jejím těle mohou být zastíženy ptačí blechy, jako je např. *Ceratophyllus garei* a *Ceratophyllus gallinae* komplex.

Blechy mají obecně negativní dopad na savce i ptáky. Nejenom že mohou způsobovat ztrátu krve, poškození a podráždění kůže po sání (z důvodu transmise toxinů přítomných ve slinách), ale jsou také významnými přenašeči různých patogenů (Hawlena, Abramsky *et* Krasnov, 2006).

Ceratophyllus (Monopsyllus) sciurorum náleží do čeledi Ceratophyllidae, infrařádu Certaphyllomorpha (Krasnov, 2012). Jedná se o široce rozšířený druh vyskytující se po celé Palearktické oblasti s výjimkou tundry. Zároveň jde o jeden z nejhojnějších druhů celého řádu. Pravděpodobně jde o druh s nejširším hostitelským spektrem v Palearktické oblasti a rovněž se předpokládá, že jde o přenašeče celé řady onemocnění (Cyprich, Špitalská *et* Krumpál, 2001).



500 μ m

Obrázek č. 2: Samice blechy *Ceratophyllus (Monopsyllus) sciurorum*. Převzato z: Wikimedia Commons, URL 1; licencováno dle CC BY 2.0.

1.1.5 Blechy jako přenašeči

Patogeny, které jsou přenášeny mezi zvířaty, lidmi a rostlinami skrze hematofágní členovce, jsou zodpovědné za značnou morbiditu a mortalitu lidí v průběhu celé historie (Álvarez-Hernández *et* S-

Rivera, 2017). V současné době se většina výzkumů zaměřuje na takové vektory, které přenášejí významné zoonózy – jde především o komáry (např. západonilská horečka) a klíšťata (např. lymská borelióza). Vektorům, jakými jsou blechy, a jimi přenášeným patogenům, je věnována podstatně menší pozornost, ačkoliv jsou zodpovědné za řadu nemocí (např. morová onemocnění), které si v průběhu historie lidstva vyžádaly miliony obětí (Eisen *et* Gage, 2012).

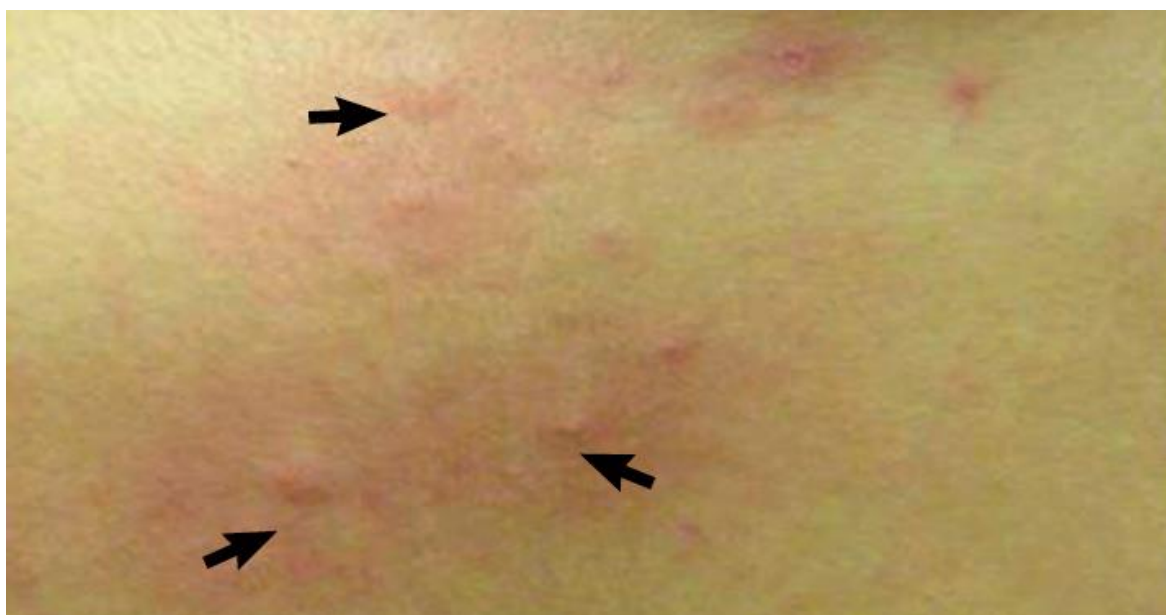
V případě zoonóz se blecha nakazí původci případných onemocnění při sání infikované krve hostitele. To, jestli se patogen v bleše bude vyvíjet, pak závisí na mnoha faktorech, jakými jsou např. druh blechy, množství nasátých infekčních částic, přítomnost antagonistických mikroorganismů ve střevě blechy, vlivy prostředí (teplota, vlhkost) atd. Pokud jsou všechny tyto podmínky pro daný patogen optimální, dochází k jeho dalšímu rozvoji a často je schopen v bleše přetrvat až do konce jejího života (Rosický, 1957).

Krví hostitele se živí obě pohlaví blech, a to především sáním z přímo rozrušených krevních cév. Protože jsou často samy hostiteli/vektory pro řadu patogenů, hrají nezastupitelnou roli pro jejich přirozené šíření. Lze rozlišit pět hlavních způsobů přenosu patogenů blechami:

1. Orální cestou, kdy hostitel pozře infikovanou blechu nebo si slíže infikované výkaly blech ze srsti – hostitelé si místa iritovaná bleším poštípáním často vykusují (např. psi, hlodavci) nebo se olizují, což umožňuje perorální nakažení hostitele nebo vstup patogenu do organismu skrz sliznici ústní dutiny. Tento způsob infekce je častý u helmintů (např. tasemnice psi – *Dipylidium caninum*) či v případě hlodavčích trypanozom.
2. Proniknutí patogenu kůží, která byla narušena vpichy blech – výkaly blech nebo zbytky rozkousaných těl blech se dostanou na místa, kde je kůže poškozena v místě sání; zde je nutné zmínit, že jeden vpich, který má v průměru 0,02 mm zpravidla nestačí pro přenos infekce a je jich proto zapotřebí série či následné rozdrásání rány drápy, nehty atd. Pro proniknutí a úspěšné infikování hostitele však stačí i jediná infekční částice. Tímto způsobem se mohou přenášet např. bartonely.
3. Mechanický přenos kontaminovaným ústním ústrojím – tento způsob není u blech příliš častý (na rozdíl např. od ovádů), ale mohlo k němu docházet např. při sání na hostiteli infikovaném morem a bezprostředním přechodu na zdravého jedince.
4. Přenos patogenu infikovanou slinou blechy – typický pro přenos skvrnivky krysí, kdy byly rickettsie zjištěny ve slinných žlázách blech.
5. Přenos patogenu vyvrháním části obsahu zažívacího traktu (regurgitace) blechy při sání – tento přenos, kdy dochází k narušení fyziologické činnosti záklopy ve žvýkacím žaludku blechy, je typický pro nákazu morovou bakterií *Yersinia pestis*. Ta se v žaludku přemnoží a vytváří „překážku“, kterou blokuje průchod krve z přední části zažívací soustavy do středního střeva, a krev nasátá blechou s touto „překážkou“ pak nemůže projít do středního střeva, vrací se zpět do místa vpichu

a s sebou strhává infekční částice. Blecha se není schopna dostatečně nasytit, hladoví a pokouší se opakovaně sát, čímž zvyšuje potenciál nakažení několika dalších hostitelů za sebou. Mimo bakterii *Yersinia pestis* se tímto způsobem mohou přenášet i pneumokoky (Bitam *et al.*, 2010; Eisen, Dennis *et Gage*, 2015; Gutiérrez *et al.*, 2015; Rosický, 1957).

Přenosu patogenů předchází v drtivém případě vpich blechy a následné sání krve. Tento akt může u hostitele vyvolat nepříjemné pocity, podráždění kůže či v krajních případech při rozsáhlé infestaci také anémii. K iritaci kůže dochází z důvodu specifického složení slin blech, jež obsahují řadu látek typu histaminů, dále enzymů, polypeptidů a aminokyselin, a při sání se rankou dostávají do krve hostitele, kde vyvolají imunitní reakci manifestující typické svědivé příznaky (Traversa, 2013; Wilkerson *et al.*, 2004). Reakce na poštípání blechou bývá opožděná (projeví se až po několika minutách) a je typická zarudnutím (může být přítomen i drobný průsak krve) a následným pruritem různé intenzity. Léze mohou někdy vytvořit papuly tvrdé konzistence (Dassot, 2009). Opakované vystavení bleším štípancům může vyvolat alergii (FAD – flea allergy dermatitis), která se běžně objevuje u psů a koček (Traversa, 2013). Typické poštípání blechou na lidské kůži lze vidět na obrázku č. 3.



Obrázek č. 3: Poštípání blechou *Ctenocephalides felis*. Převzato z: Leelavathi, Norhayati *et Lee* (2012); licencováno dle CC BY-NC 3.0.

Blechy mohou přenášet nejen virové, bakteriální nebo protozoární patogeny; prokázány u nich byly i někteří parazitické červi (helminți) (Otranto *et Dantas-Torres*, 2010). Největší zastoupení mají ve výzkumech ty druhy blech, které jsou spojeny se zoonózami a nemocemi vyskytujícími se u domestikovaných zvířat (majoritně psi a kočky). Vzhledem k tomu, že neexistuje žádný druh blechy specifický přímo pro člověka, zaměřuje se pozornost na tzv. synantropní druhy blech, které se nacházejí v blízkosti lidských sídel a pro člověka představují především ekonomické, ale i určité zdravotní riziko (Bitam *et al.*, 2010). Příklady těchto druhů jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Přehled vybraných druhů synantropních blech vč. jejich hlavních hostitelů, rozšíření a příkladu přenášeného patogenu. Dle Ahn *et al.* (2018); Bitam *et al.* (2010); Eremeeva *et al.* (2012); Lareschi *et al.* (2018); Roucher *et al.* (2012).

DRUH BLECHY	HLAVNÍ HOSTITELÉ	ROZŠÍŘENÍ	PŘENÁŠENÝ PATOGEN
<i>Pulex irritans</i>	morčata, psi, kočky, křasy, kozy	kosmopolitní	<i>Bartonella</i> spp., <i>Rickettsia</i> spp. ad.
<i>Ctenocephalides felis</i> , <i>Ctenocephalides canis</i>	psi, kočky, křasy, mývali, vačice	mírné a tropické podnebné oblasti	<i>Bartonella</i> spp. <i>Rickettsia typhi</i> <i>Rickettsia felis</i> ad.
<i>Xenopsylla cheopsis</i>	křasy, pískomilové	tropické a subtropické oblasti	<i>Yersinia pestis</i> , <i>Rickettsia typhi</i> , <i>Bartonella</i> spp., parazitičtí helminti ad.
<i>Nosopsyllus fasciatus</i>	křasy, myši, norníci, šelmy	mírné podnebné oblasti	<i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Francisella tularensis</i> , <i>Trypanosoma lewisi</i> ad.
<i>Echidnophaga gallinacea</i>	psi, kočky, králíci, hlodavci, ptáci	tropické a subtropické podnebné oblasti	<i>Rickettsia felis</i> , <i>Myxomavirus</i> , ad.
<i>Tunga penetrans</i>	krávy, prasata, psi	není jasně vymezeno; vázána na teplé a vlhké oblasti	endoparazitický druh způsobující tungózu

1.1.5.1 Příklady zoonóz přenášených blechami

Na člověku parazituje asi 20 druhů blech (Lehane, 2005), které jsou zodpovědné za řadu zoonóz, tedy onemocnění, která jsou primárně přenášená mezi zvířaty a přirozeně mohou být přenesena i na člověka. Nejčastěji se u zoonotických infekcí můžeme setkat s bakteriálními původci. Za historicky nejvýznamnější onemocnění přenášené blechami, jež si ve 14. století vyžádalo 25 milionů lidských obětí, se považuje mor, způsobený bakterií *Yersinia pestis* a přenášený především blechami *Xenopsylla cheopsis* a *Pulex irritans* (Rollins, Rollins *et al.* Ryan, 2003; Smíšková, 2010). *Xenopsylla cheopsis* a další hlodavčí druhy blech bývají spojovány se skvrnivkou křasí neboli endemickým tyfem, který způsobuje bakterie *Rickettsia typhi* (Lara *et al.*, 2012). Dále se mezi tyto zoonózy řadí také bartonelóza neboli nemoc kočičího škrábnutí působená bakterií *Bartonella henselae*, přenášená zejména blechou *Ctenocephalides felis* (Chomel, Boulouis *et al.* Breitschwerdt, 2004) či tularemie, kterou způsobuje bakterie *Francisella tularensis* a přenos bývá spojován např. s blechou *Nosopsyllus fasciatus* (Harik, 2013; Rodríguez-Pastor *et al.*, 2019). Jako příklad zoonotické nákazy helminty lze uvést tasemnici psí (*Dipylidium caninum*) detekovanou v blechách

Ctenocephalides canis či *C. felis* a vyskytující se primárně u dětí (Lehane, 2005). Zvláštní skupinu tvoří endoparazitická blecha písečná (*Tunga penetrans*), která není klasifikována jako přenašeč určitého patogenu, avšak sama o sobě je původcem nemoci tungóza, při které samice proniká do kůže zvířat nebo člověka (nejčastěji do distálních částí končetin), kde se zapouzdří a pomocí otvoru v kůži dýchá a vylučuje vajíčka. Tungózu často doprovází sekundární infekce a gangréna (Feldmeier *et al.*, 2014; Mutebi *et al.*, 2015; Volf *et Votýpka*, 2007).

1.2 ROD *BARTONELLA*

1.2.1 Charakteristické znaky bartonel

Bakterie rodu *Bartonella* jsou malé (přibližně $0,3 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$), gramnegativní (G⁻) pleomorfní kokobacily náležící do čeledi Bartonellaceae, řádu Rhizobiales, třídy Alphaproteobacteria a kmene Proteobacteria (Kešnerová, Moritz *et al.*, 2016; Saisongkorh *et al.*, 2009). Jde o fakultativně intracelulární patogeny, z nichž některé jsou schopny hemotrofie, tedy parazitace erytrocytů. Tato schopnost byla popsána v rámci savců (v některých případech i vč. člověka) u více rodů bakterií; kromě bartonel např. i *Anaplasma*, *Mycoplasma* ad. (Minnick *et al.*, 2000). Všechny druhy rodu *Bartonella* jsou náročné na pěstování a v laboratorních podmínkách (*in vitro*) rostou velmi pomalu (Pendle, Ginn *et al.*, 2006).

Bartonely dokáží infikovat širokou škálu savčích hostitelů (Kosoy, 2010) a minimálně tři druhy (*B. bacilliformis*, *B. henselae* a *B. quintana*) jsou relativně častými a prokázanými patogeny i u člověka. Celkový počet druhů, které byly u člověka zjištěny, je však vyšší – jedná se o 16 druhů: *B. henselae*, *B. quintana*, *B. bacilliformis*, *B. koehlerae*, *B. cinsonii* ssp. *Berkhoffi*, *B. bovis*, *B. tamiiae*, *B. doshiae*, *B. grahamii*, *B. mayotimonensis*, *B. elizabethae*, *B. washoensis*, *B. rochalimae*, *B. vinsonii* ssp. *arupensis*, *B. melophagi* a *B. alsatica* (Cheslock *et al.*, 2019).

Dalším společným znakem je přenos, který se děje prostřednictvím vektorů. Bartonely jsou mezi savčími hostiteli nejčastěji přenášeny členovci, přičemž jednotlivé druhy mají typicky konkrétního bezobratlého vektora. Jako rezervoáry infekce slouží široká škála savců; je však nutné zmínit, že za rezervoár (ve smyslu dlouhodobých hostitelů) jsou pro některé druhy bartonel považovány i samotné blechy (Gutiérrez *et al.*, 2015; Minnick *et al.*, 2006; Tołkacz *et al.*, 2018).

1.2.2 Taxonomie

Rod *Bartonella* zahrnuje v současnosti 36 pojmenovaných druhů a asi 20 druhů s nekompletním popisem, tzv. *Candidatus* (Tołkacz *et al.*, 2018). V nedávné době však prošel tento rod značnou taxonomickou reorganizací. První druh – *B. bacilliformis* – byl objeven v roce 1909 a na dlouhou dobu byl jediným popsáním zástupcem celého rodu. V 90. letech 20. století však byly na základě DNA analýzy bakterie původně tvořící rody *Rochalimaea* a *Grahamella* přearány do rodu *Bartonella*, čímž se počet celkových zástupců zvýšil na 15. Samotná čeleď Bartonellaceae byla vyjmuta z řádu Rickettsiales – taxonomické skupiny, která původně zahrnovala čeledě Anaplasmataceae, Rickettsiaceae a Bartonellaceae. Bartonely však s čeledí Rickettsiales sdílí řadu znaků, jako například již zmíněnou malou velikost, přenos na člověka za pomoci vektorů (členovců) a schopnost žít v hostitelských buňkách; nejsou však obligátními intracelulárními parazity jako rickettsie (Minnick *et al.*, 2006).

Na základě analýzy nukleotidové sekvence genu kódujícího 16S podjednotku rRNA bylo rovněž stanoveno, že bartonely spadají do podskupiny α -2 Alphaproteobacteria a nejbližší příbuznými rody jim jsou *Brucella*, *Rhizobium* a *Agrobacterium* (Billeter *et al.*, 2014). Ač mohou tyto rody působit značně rozmanitě, sdílí několik společných charakteristik; například společný vývoj směrem k endoparazitismu eukaryotických buněk, kdy *Bartonella* spp. a *Brucella* spp. jsou intracelulárními parazity savčích buněk a druhy *Agrobacterium* a *Rhizobium* mohou parazitovat v rostlinných buňkách. Zároveň není ani jeden druh považován za obligátního parazita a všechny mohou být kultivovány *in vitro*. Jisté podobnosti lze pozorovat i v případě lidských chorob, kdy rody *Brucella* i *Rhizobium* vykazují řadu vlastností podobných bartonelám; mohou způsobovat bakteriémii či endokarditidu (Minnick *et Anderson*, 2006).

1.2.3 Habitat

Bartonely byly – mimo člověka – izolovány či detekovány napříč širokou škálou zvířecích druhů, které by mohly sloužit jako rezervoáry. Jedná se například o kočky, psy, hlodavce, králíky nebo skoty. Nalezeny však byly i u dalších obratlovců, např. mořských savců, herbivorů ad. (Frank, Boyd *et Hadly*, 2018; Okaro *et al.*, 2017)

Přenos bartonel se nejčastěji děje prostřednictvím vektorů; hematofágních členovců, jakými jsou např. dvoukřídlí, blechy nebo vši. Některé studie naznačují i možnost přenosu pomocí klíšťat, některých druhů mravenců, štěnic či dokonce pavouků – žádný z těchto vektorů ale dosud nebyl experimentálně potvrzen. Škála popsanych vektorů se však se zvýšeným zájmem o tuto problematiku neustále rozrůstá (Cheslock *et Embers*, 2019; Reis *et al.*, 2011).

Některé bartonely jsou geograficky značně omezené, např. *B. bacilliformis* se vyskytuje pouze v jihoamerických Andách, a to kvůli omezenému výskytu svého vektora z čeledi Psychodidae (koutulovití) – *Lutzomyia verrucarum*. Jiné druhy, např. *B. quintana*, *B. henselae* či *B. elizabethae* jsou naopak rozšířeny po celém světě (Chomel *et Rolain*, 2007).

Z hlediska hlavních rezervoárů různých bartonel se setkáváme s velmi širokým spektrem; z veterinárního pohledu jsou nejvýznamnějšími kočkovité a psovitě šelmy společně s hlodavci. Z kočkovitých je kočka domácí přenašečem a hlavním rezervoárem pro *B. henselae*, *B. clarridgeiae* a *B. koehlerae*. Infekce druhem *B. henselae* je přenášena z kočky na kočku především blechou kočičí (*Ctenocephalides felis*), avšak také blechou psí (*Ctenocephalides canis*). Role těchto blech se však v případě infikování člověka zdá být málo pravděpodobná (Chomel *et Rolain*, 2007). Z hlediska infekce člověka (ve spojitosti s bartonelózou – nemocí kočičího škrábnutí) byl potvrzen mechanický přenos, při kterém je infekce přenášena prostřednictvím kočičích drápů, které jsou kontaminovány infekčními výkaly blech (Breitschwerdt *et Kordick*, 2000). Možnost přenosu *B. henselae* na člověka pomocí klíšťat je neustále předmětem diskuzí (Regier, Balhorn *et Kempf*, 2017).

Více bakteriémické jsou pochopitelně kočky venkovní či mladé. Prevalence infekce je vyšší v teplém a vlhkém klimatu, které kočičím blechám vyhovuje a vykazují v něm vyšší abundanci. U *Ctenocephalides felis* byl rovněž prokázán výskyt *B. quintana*, *B. koehlerae* a *B. clarridgeiae*, což by nasvědčovalo, že i pro tyto druhy funguje kočičí blecha jako hostitel. Ve spojitosti s čeledí psovitých se nejběžněji setkáme s *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, proti kterým jsou přítomny zvýšené protilátky v krvi divokých i domestikovaných psů z tropických oblastí a kojetů z kalifornské oblasti. Součástí přenosu *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* na psy mohou být i klíšťata. Se širokou škálou bartonel se lze setkat u hlodavců (Chomel *et* Rolain, 2007; Malania *et al.*, 2016). Přehled druhů, případně poddruhů bartonel, jejich hlavní rezervoáry a předpokládaní vektorů (někteří nepotvrzení, avšak pravděpodobní) shrnuje tabulka č. 2.

Tabulka č. 2: Přehled vybraných druhů (poddruhů) bartonel, jejich hostitelů a pravděpodobných vektorů. Dle Cheslock *et* Embers (2019); Chomel *et* Rolain (2007).

BARTONELLA SP.	HOSTITEL	PŘEDPOKLÁDANÍ VEKTOŘI
<i>B. henselae</i>	kočky, psi, koně, lidé	blechy, vši, klíšťata, pavouci
<i>B. quintana</i>	makaci, kočky, psi, lidé	veš šatní (<i>Pediculus humanus</i>), blechy, štěnice
<i>B. bacilliformis</i>	lidé	flebotomus (<i>Lutzomyia verrucarum</i>)
<i>B. koehlerae</i>	kočky, psi, lidé	blechy
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	psi, koně, lišky, lidé	blechy, klíšťata
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	psi, lidé	blechy, klíšťata
<i>B. bovis</i>	dobytěk, kočky, psi, lidé	ovádi, klíšťata
<i>B. clarridgeiae</i>	kočky, psi	blechy, klíšťata
<i>B. rattimassiliensis</i>	krysy	blechy
<i>B. tamiiae</i>	krysy, lidé	roztoči
<i>B. tribocorum</i>	krysy	blechy
<i>B. rousetii</i>	netopýři	muchule
<i>B. schoenbuchensis</i>	dobytěk	ovádi, klíšťata
<i>B. chomelii</i>	dobytěk	ovádi, klíšťata
<i>B. doshiae</i>	krysy, lidé	blechy
<i>B. grahamii</i>	myši, lidé	blechy
<i>B. birtlesii</i>	myši	blechy
<i>B. mayotimonensis</i>	netopýři, lidé	muchule, blechy, klíšťata
<i>B. elizabethae</i>	krysy, psi, lidé	blechy
<i>B. washoensis</i>	psi, lidé	blechy, klíšťata
<i>B. rochalimae</i>	psi, lidé	blechy, klíšťata
<i>B. melophagi</i>	ovce, lidé	kloš ovčí (<i>Melophagus ovinus</i>)
<i>B. alsatica</i>	králíci, lidé	blechy, klíšťata

1.2.4 Izolace, růstové a kultivační vlastnosti

Izolace bartonel z klinických vzorků vyžaduje dlouhou inkubační periodu a specifické kultivační médium. Materiály vhodné pro izolaci bartonel zahrnují především krev či biotický vzorek postižené tkáně nebo orgánu (Diddi *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2017). Pro růst bartonel se nejčastěji využívají média s obsahem 5% krve (nejlépe králičí či koňské; lze však použít i krev ovčí). Některé druhy bartonel (např. *B. koehlerae*) se na běžném krevním agaru pěstují jen těžko, proto se může přistoupit ke kultivaci pomocí tzv. čokoládového agaru (CHOC). Naočkovaná krev by měla být inkubována při teplotě okolo 35 °C za přítomnosti 5% CO₂ a vysoké vlhkosti. Výjimkou je *B. bacilliformis*, která vyžaduje nižší teplotu (okolo 28 °C). Doba růstu prvních kolonií se liší dle druhu bartonely; zatímco některým druhům postačuje 3 – 5 dní, většina bartonel vyžaduje 5 – 6 týdnů. Z důvodu dlouhé inkubace se zvyšuje riziko kontaminace jinými mikroorganismy; tomu lze předejít přidáním amphotericinu B do kultivačního média (Bai *et al.*, 2012; Gutiérrez *et al.*, 2017). Charakter kolonií se rovněž liší dle druhu; zpravidla bývají vystouplé, průhledné či bělavé s nepravidelným tvarem a různou velikostí, nejčastěji hladkého povrchu (avšak lze se setkat i s drsným), suché nebo vlhké konzistence (Harms *et Dehio*, 2012; Litwin *et Johnson* 2005).

1.2.5 Determinace

Bartonely, nefermentující aerobní bakterie, se vyznačují pozoruhodnou fyziologií. Biochemické testování je v případě tohoto řádu velice složité a zpravidla neprůkazné pro identifikaci konkrétních druhů. V současné době se pro nejrychlejší identifikaci druhů z izolátů využívá polymerázové řetězové reakce (PCR) s následným sekvenováním. PCR je velmi citlivá a specifická metoda, ke které se přistupuje v případě lidských vzorků u „nekultivovatelných“ bartonel nebo k obecné identifikaci izolátů DNA s podezřením na bartonelovou infekci. Často se PCR využívá například pro namnožení částí či celého genu 16S rRNA, Tento 16S rRNA PCR produkt je následně sekvenován a získaná data srovnána s již známými 16S rRNA sekvencemi uloženými v databázi GenBanku, kde dojde na základě shody k identifikaci druhu. Mimo 16S rRNA lze také využít tmRNA (*ssrA*), gen pro syntézu riboflavinu (*ribC*), gama podjednotky NADH dehydrogenázy (*nuoG*), gen pro syntézu proteinu FtsZ (*ftsZ*) či 17kD antigen protein (*virB5-B6*) (Gutiérrez *et al.*, 2018; Minnick *et Anderson*, 2006). Bartonely lze mimo metodu PCR dále druhově identifikovat pomocí analýzy polymorfismu délky restričních fragmentů (RFLP) nebo metody MALDI (Diddi *et al.*, 2013; Hamzaoui, Laroche *et Parola*, 2019).

1.2.6 Morfologie a fyziologie buněk

Jak již bylo uvedeno, buňky bartonel jsou gram-negativní, pleomorfni, neacidorezistentní kokobacily či polárně se rozšiřující tyčinky. Buňky však mohou být dále kokovité, korálkovité, vláknité nebo v řetězcích. Pozorovány byly i prstencovité formy. Struktura buněčné stěny je u bartonel srovnatelná

s jinými gram-negativními bakteriemi. Velikost je uniformě menší než 3 μm v největším rozměru; průměrná velikost se pohybuje okolo 0,5 μm \times 1,0 μm . Obecně vykazují buňky bartonel špatnou barvitelnost safraninem, naopak dobře se barví za pomoci Giemsova barvení. U rodu *Bartonella* je možné rozlišit dva základní morfologické typy buněk: bičíkaté a bezbičíkaté. Do první kategorie, která ke svému pohybu využívá unipolární lofotrichní bičíky (flagellum), řadíme *B. bacilliformis*, *B. clarridgeiae*, *B. capreoli* a *B. schoenbuchensis*. Do druhé kategorie spadají ostatní druhy r. *Bartonella* – jde tedy o podstatně početnější skupinu; tyto druhy využívají k pohybu vlasovité útvary, jakými jsou fimbrie či pili. Pili jsou rovněž zodpovědné za adhezenci k buňkám a mohou zprostředkovávat specifickou interakci s hostitelskými erytrocyty a endotelovými buňkami. U žádného druhu nebyly pozorovány kapsuly ani struktury podobné sporám (Minnick *et al.*, 2000; 2015).

1.2.7 Hostitelská specifita bartonel

Bartonely jsou typicky vázány na savce, kteří, jsou-li chronicky nakaženi, slouží jako jejich rezervoáry. Nejčastěji jsou tyto bakterie zaznamenávány u hlodavců, hmyzožravců, psů, koček a lidí, u kterých jsou přenášeny prostřednictvím členovců, mezi kterými dominují především blechy (Boulouis *et al.*, 2007, Cáceres *et al.*, 2013; Kosoy *et al.*, 2010), avšak izolovány byly například i z klíšťat, vší, štěnic, ovádů ad. Zatímco některé druhy bartonel jsou vázány na jednoho hostitele, jiné se mohou vyskytnout u různých druhů hostitelů; tato nevytvořená specifita se dá dobře pozorovat u hlodavců, v rámci kterých mohou různé druhy bartonel přecházet; jedná se např. o *B. elizabethae*, *B. taylorii*, *B. grahamii* a *B. doshiae*. Je tedy evidentní, že bartonely jsou z hlediska hostitelské specifity velice různorodé (Buffet *et al.*, 2013; Cheslock *et al.*, 2019).

1.2.8 Výskyt bartonel u savců

Dosavadní studie poukazují na schopnost adaptace bartonel k savcím erytrocytům. Jak již bylo uvedeno, jde o fakultativně intercelulární parazity, kteří jsou schopni pronikat do endotelových buněk či červených krvinek (u kterých mohou případně přilnout k jejich povrchu), čímž se úspěšně vyhýbají zásahu imunitního systému hostitele a způsobují dlouhotrvající bakteriémiu. Ta poskytuje optimální prostředí pro přenos tohoto patogenu prostřednictvím bezobratlého vektora/rezervoáru (Deng *et al.*, 2018; Chomel *et al.*, 2009). Vertikální přenos (z matky na potomka) je rovněž možný, což bylo prokázáno u různých druhů hlodavců (Kosoy, 1998; Tołkacz *et al.*, 2018).

Bylo nashromážděno velké množství informací týkajících se výskytu bartonel u různých savcích druhů, nicméně vazba mezi jednotlivými druhy bakterií se specifickými taxonomickými skupinami hostitelů je stále poměrně nedostatečně prostudována. Výjimkou tvoří druhy vyskytující se u psů a koček, na které je zaměřena pozornost veterinárních výzkumů (Kosoy *et al.*, 2019).

Infekce je u savčího hostitele zpravidla chronická a asymptomatická, a to i přes dlouhotrvající bakteriémií (tj. přítomnost bakterií v krvi), která může např. u koček přetrvávat až rok od infekce (Marignac *et al.*, 2010; Regier, O'Rourke *et Kempf.*, 2016). Nejedná se však o pravidlo; některé bartonely mohou u zvířat i lidí způsobovat nespecifické chřipkovité příznaky, případně i závažnější projevy, kterými jsou endokarditida, myokarditida, artritida, hepatitida nebo artralgie. Zdali a jak se infekce projeví klinicky, záleží i na celkovém stavu nakaženého (Iannino *et al.*, 2018).

1.2.8.1 Výskyt bartonel u hlodavců a jejich blech

Výzkumy probíhající po celém světě prokázaly, že jedním z hlavních rezervoárů pro bartonely jsou hlodavci, u kterých bylo zjištěno vysoké procento nákazy různými druhy této bakterie. Zároveň se potvrdilo, že klíčovou roli v životním cyklu bartonel hrají blechy, které jsou v přenosu této bakterie mezi hlodavci velice efektivní (Gutiérrez *et al.*, 2015).

Některé druhy bartonel, které jsou vázány primárně na hlodavce, se prokázaly i jako původci lidských klinických manifestací, včetně endokarditidy, myokarditidy, horečky a neurologických poruch, neuroretinitidy, meningitidy, splenomegalie a lymfadenopatie. Tato zjištění činí z hlodavců a jejich blech vhodný objekt pro studium ekologických cest patogenů u zoonotických nemocí přenášených vektory, které mohou mít dopad na lidské zdraví (Bai *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2015).

Hlodavci nakažení bartonelami byli popisováni už od poloviny 20. století, avšak většina hlášení se začala kumulovat až po roce 1993, kdy došlo k taxonomické reorganizaci rodu a jeho značnému rozšíření (Gutiérrez *et al.*, 2015). První výzkumy pochází ze Severní Ameriky a Evropy, později se však přidaly i studie z Asie, Afriky, Latinské Ameriky i Oceánie (Bai *et al.*, 2007; 2011); rozšíření je tedy celosvětové.

V současné době představují hlodavci řád savců s největší diverzitou bartonel; 22 druhů a poddruhů bylo izolováno z více než 98 druhů hlodavců náležících do 7 čeledí. Z tohoto množství pak bylo několik druhů potvrzeno i u lidských infekcí. Chronologické pořadí druhů zjištěných u hlodavců je následující: *B. elizabethae*, *B. vinsonii* subsp. *vinsonii*, *B. doshiae*, *B. grahamii*, *B. taylorii*, *B. tribocorum*, *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, *B. birtlesii*, *B. washoensis*, *B. phoceensis*, *B. rattimassiliensis*, *B. rochalimae*, *B. tamiae*, *B. rattaaustraliani*, *B. queenslandensis*, *B. coopersplainsensis*, *B. japonica*, *B. silvatica*, *B. jaculi*, *B. callosciuri*, *B. pachyuromydis* a *B. acomydis*. Nejedná se však o finální číslo; stále se objevují nově popisované druhy či poddruhy (Gutiérrez *et al.*, 2015; Mardosaitė-Busaitienė *et al.*, 2019). Objasnění této široké diverzity ve vztahu hlodavec-bartonela se pravděpodobně nachází v potenciální zrychlené evoluci rodu *Bartonella* v samotných hlodavcích, jakožto důsledek častých rekombinací, horizontálního přenosu genetické informace (laterálního genového transferu; LGT) a nashromáždění mutací. Tomuto fenoménu samozřejmě napomáhá i obecně větší zájem o výzkum v této oblasti (Berglund *et al.*, 2010; Guy *et al.*, 2013).

Ze všech ektoparazitů hlodavců jsou blechy považovány za hlavního vektora pro přenos bartonel. Za přenos tohoto patogenu je zodpovědné značné množství druhů blech, které tak plní roli kompetentních vektorů. U některých druhů blech parazitujících na hlodavcích byl přenos bartonel potvrzen i v laboratorních podmínkách (Bown, Bennet *et* Begon, 2004; Li *et al.*, 2007). Bartonely se zároveň ukázaly jako dominantní patogen u mnoha hlodavčích blech (Hawlena *et al.*, 2013). Časté sání blech a jejich schopnost přesunu z jednoho hostitele na druhého by mohla být vysvětlením pro vysokou prevalenci a diverzitu bartonel napříč hlodavci i blechami samotnými (Kosoy, Hayman *et* Chan, 2012).

Se vzrůstajícím počtem nových výzkumů, které se zaměřují mj. na pochopení ekologických vlastností hlodavců a dynamiky blech včetně jejich zamoření u hostitelů, se pozvolna odhaluje způsob, jakým se bartonely k těmto rezervoárům dostaly. Přírozený habitat hlodavců, jejich chování a parazitismus blech hrají pravděpodobně roli nejdůležitějších proměnných, které ovlivňují přenos a hostitelskou vazbu jednotlivých druhů bartonel. Tyto faktory se různí u jednotlivých druhů a také dle geografického rozšíření (Gutiérrez *et al.*, 2015).

Habitat hlodavců rozhoduje o účinnosti přenosu bartonel a jejich druhového složení na daném místě. Jak již bylo uvedeno, habitat hnízda může přímo ovlivňovat životní cyklus blech, protože larvální stádia žijí mimo tělo hostitele a mají určité mikroklimatické preference; nejsou-li podmínky příznivé pro vývin blech, nemusí k přenosu bartonel přes vektory vůbec dojít. Lokalizace habitatu společně s geograficky určenými přírodními podmínkami (tj. například výskyt ročních období, období dešťů a sucha atd.) se také podílejí na ovlivňování příjmu potravy u hlodavců, což může vést ke zvýšení rizika nákazy z důvodu oslabení obranyschopnosti. Invaze teritorií nebo hnízd jiných hlodavců může představovat důležitý zdroj výměny blech a tím i bartonel (Beldomenico *et* Begon, 2010; Gutiérrez *et al.*, 2015; Morick *et al.*, 2010).

Samotné chování hlodavců může mít také podstatný vliv na mezidruhový přenos bartonel v rámci jedné komunity živočichů. Fyzický kontakt mezi hlodavci může podnítit a usnadnit přenos infikovaných blech, stejně jako vzájemná péče o srst, při které často dochází k poškození kůže a přenosu patogenu (Krasnov *et* Khokhlova, 2001). Jardine *et al.* (2006) zmiňují roli hibernace, při které může dojít k přetrvání či vymizení infekce. Dále uvádí, že roli může hrát případně i roční období (nejnižší prevalence bývá koncem jara a postupně roste až do začátku podzimu). Kosoy *et al.* (2004a) poukazují ještě na faktor věku zvířete, kdy prevalence a bakterémie s věkem nakaženého zvířete klesá z důvodu získané imunity.

Fundamentální význam mají v celém procesu ovlivnění přenosu a získání bartonel ještě hostitelská specifita, míra výměny blech mezi hlodavci a abundance těchto ektoparazitů. V případě hostitelské specifity se u hostitelsky oportunistických blech zvyšuje potenciál úspěšné výměny blech mezi hlodavci, a to v rámci jednoho i více druhů; naopak u hostitelsky specifických druhů se vyskytuje opačná situace. U abundance blech platí pravidlo přímé úměry; čím více blech parazituje na hostiteli, tím větší je pravděpodobnost úspěšné nákazy. Opět je však nutné zdůraznit, že

i abundance podléhá různým vlivům, např. druhu hlodavce, habitatu daného blešního druhu a sezónnosti (Krasnov *et al.*, 2004b; Krasnov *et Khokhlova*, 2001).

1.2.8.1.1 Cesty přenosu bartonelových infekcí u hlodavců

Cesty přenosu byly u bartonel sledovány v experimentálních podmínkách; například Bown, Bennett *et Begon* (2004) sledovali úspěšný přenos *B. grahamii* a *B. taylorii* prostřednictvím blechy *Ctenophthalmus nobilis* na norníky rudé (*Myodes glareolus*) a Morick *et al.* (2011) potvrdili, že blecha *Xenopsylla ramesis* úspěšně přenáší bartonely na pískomily hedvábné (*Meriones crassus*). Tato studie zaznamenala i vysokou účinnost v přenosu bartonel; 69 – 100 % blech se nakazilo bakteriemi v časovém rámci 72 hodin a shodný čas stačil blechám k předání patogenu svému hlodavčímu hostiteli. Birtles (2005) potvrdil, že cesta přenosu z blechy na savce probíhá prostřednictvím gastrointestinálního obsahu, a to především výkaly. Ač se tato cesta může jevit neefektivní, velice častý kontakt mezi hostitelem a blechou poskytuje dostatek příležitostí pro depozici infikovaných bleších výkalů na kůži hostitele. Společně s drážděním, které vyvolává poštipání blechou, a následným frekventovaným škrábáním postiženého místa (mnohdy až do krve), se infikovaný materiál může dostat přímo do těla hostitele.

Existují i alternativní cesty přenosu infekce; např. orální (tj. přímé pozření blechy, např. při péči o srst), okulární (vpravení bakterií do očí a průniku přes spojivkový vak) či intradermální (vpravení bakterií do kůže opět vlivem péče o srst či agresivního chování mezi hlodavci). Marignac *et al.* (2010) experimentálně ověřovali cesty přenosu *B. birtlesii* prostřednictvím inokulace myší (tj. vpravení určitého množství bakterií do organismu). Ukázalo se, že výše uvedené způsoby infekce u tohoto modelu fungují, a to v 33 – 66 % u orální a okulární cesty a 100 % u intradermální inokulace. Poslední zmíněný způsob se však v přírodě zdá být jako nejméně pravděpodobný. Tyto cesty byly sledovány a potvrzeny i u jiných savců. Např. Guptill *et al.* (1999) sledovali přenos *B. henselae* na kočky prostřednictvím orální a intradermální inokulace a oba tyto způsoby označili za úspěšné.

1.2.8.1.2 Dynamika infekce bartonelami u hlodavců v laboratorním prostředí

Jakmile se blechy dostanou do krevního řečiště hostitele, infikují jejich cílové místo, kterým jsou erytrocyty či endotelové buňky. V průběhu infekce byly pozorovány opakované bakteriémické vlny (*in vitro* a *in vivo*), které se zdají být následkem potlačení infekce imunitním systémem hostitele a následným opakovaným propuknutím infekce (Deng *et al.*, 2018; Morick *et al.*, 2013; Schülein *et al.*, 2001).

Délka bakteriémie se různí dle infekční dávky, druhu bartonely a druhu hlodavčího hostitele. U hlodavčích modelů experimentálně infikovaných bartonelou se vyskytovala dlouhotrvající bakteriémie. Kosoy *et al.* (1999) pozorovali bakteriémii způsobenou třemi druhy bartonel u křečků bavlníkových (*Sigmodon hispidus*), kteří analyzovali přítomnost těchto bakterií po dobu 7 – 15 týdnů,

dle obdržené dávky. Morick *et al.* (2013) pozorovali délku bakteriémie u pískomilů hedvábných, u kterých se nejdelší perioda vyšplhala až k 26 týdnům.

Po laboratorních testech vyvstaly dva různé scénáře týkající se hostitelské specifity fungující v přirozeném prostředí; zatímco některé bartonely jsou hostitelsky specifické či mají limitované hostitelské spektrum, u jiných byla popsána schopnost „přeskakovat“ z jednoho druhu hostitele na druhý. Příkladem druhů, u kterých byla tato schopnost potvrzena, jsou *B. grahamii*, *B. elizabethae*, *B. taylorii* a *B. doshiae* (Berglund *et al.*, 2009; Buffet *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2015).

1.2.8.1.3 Koinfekce

Běžným jevem je u hlodavců i jejich blech koinfekce, tedy infikování více než jedním druhem bartonel. Rozsáhlejší analýze se věnovali Gutiérrez *et al.* (2018), kteří sledovali koinfekci u pískomilů Andersonových (*Gebillus andersoni*), pískomilů egyptských (*Gerbillus pyramidum*) a jejich blech; u pozitivních 20 krevních vzorků pískomilů a 39 blech identifikovali celkem čtyři druhy bartonel (*B. krasnovii*, *B. khokhlovae*, *B. gerbillinarum* a *B. negeviensis*) a 38 jejich genotypů. Koinfekce byla potvrzena v 56 % těchto vzorků, přičemž na jeden vzorek vycházely 2 – 4 genotypy náležící až třem druhům bartonel. Birtles *et al.* (2001) detekovali u 70 krevních vzorků z 12 sympatrických druhů hlodavců celkem 12 různých genotypů bartonel náležících třem známým druhům: *B. taylorii*, *B. grahamii*, *B. doshiae* a dvěma blíže nespecifikovaným genospecies. Koinfekci 2 – 5 druhů bartonel potvrdili v 11 vzorcích (15,7 % případů). Kosoy *et al.* (2004b) potvrdili koinfekci v téměř 21 % případů z 408 jedinců křečka bavlníkového (*Sigmodon hispidus*); opět až pět různých druhů bartonel na jednice.

1.3 PLCH VELKÝ

1.3.1 Obecná charakteristika

Pro plchy velké je typická noční aktivita a pohyb ve stromech. Přes den se ukrývají nejčastěji v dutinách stromů či v budkách, kde spí. V úkrytech lze zpravidla nalézt jednoho spícího plcha, avšak poměrně častým jevem je i přítomnost dvojic nebo dokonce větších skupin čítajících až 13 jedinců, kteří svůj úkryt sdílí. Předpokládá se, že důvodem tohoto jevu je sociální termoregulace, která umožňuje šetření energie během období reprodukce (Koppmann-Rumpf, Scherbaum-Heberer *et* Schimdt, 2012; Trout *et al.*, 2012).

Plši využívají širokou škálu potravy, která se v průběhu aktivního období mění. Na jaře (po probuzení z hibernace) se typicky živí pupeny nebo ohlodávají kůru mladých stromů, požírají zelené části rostlin ale i drobné živočichy – známá je například predace hnízd drobných ptáků. V letním období tvoří pak hlavní zdroj obživy plody různých dřevin včetně ovoce, na podzim jde především o nejvýživnější potravu bohatou na obsah lipidů, které jsou nutné pro značné navýšení tělesné hmotnosti před vstupem do hibernace – jde hlavně o bukvice, jednu z nejdůležitějších složek potravy plchů, na jejichž přítomnosti závisí i jejich reprodukce či délka a úspěšnost hibernace (viz kapitola 1.3.4), dále pak žaludy či různé ořechy (Dobroruka, 2004; Hürner *et* Michaux, 2009; Trout *et al.*, 2012).

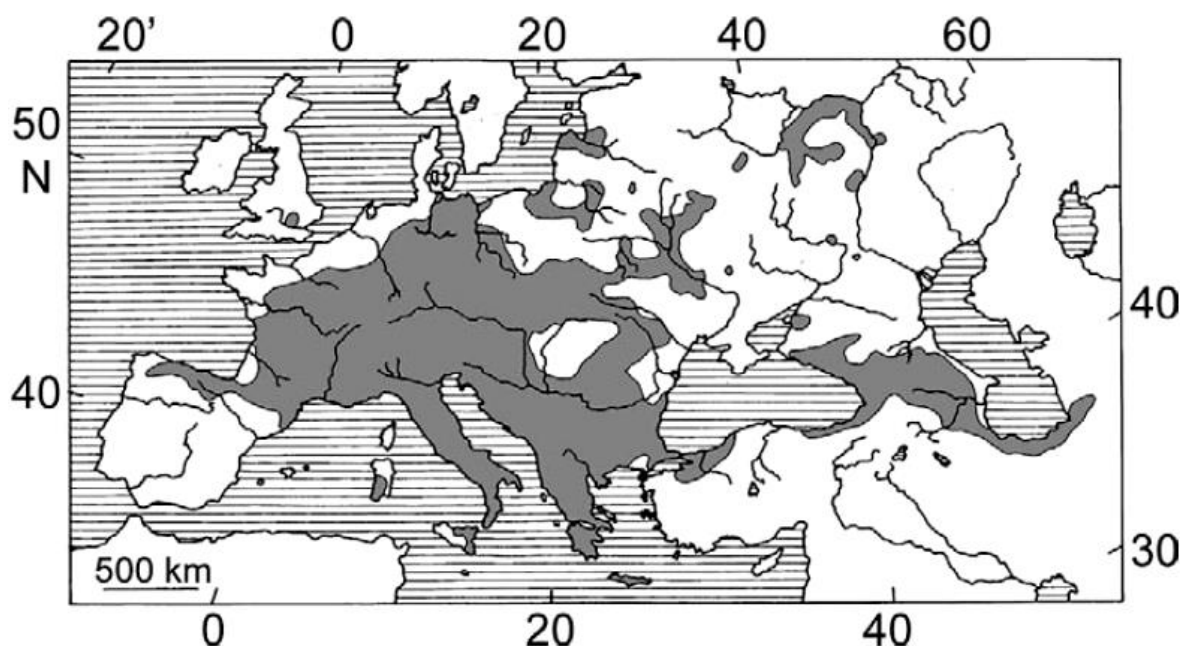
1.3.2 Hibernace, reprodukce

Plši jsou typickými zástupci tzv. obligátní hibernace, což je adaptace, která umožňuje v období stresových podmínek – především nízké teploty a nedostatku potravy – značné šetření energie v podobě výrazného utlumení metabolismu a snížení tělesné teploty (Çolak *et al.*, 1998; Koppmann-Rumpf, Scherbaum-Heberer *et* Schimdt, 2012). Aktivita plcha velkého značně závisí na konkrétních klimatických podmínkách prostředí, které ovlivňují dostupnost potravy v oblasti, ve které se plši nachází. Délka trvání aktivního období se pohybuje okolo pěti měsíců, nejčastěji od června do října, avšak podle charakteru přírodních podmínek může vykazovat různé posuny (Lebl *et al.*, 2011). Podle délky a výskytu aktivního období se pak odráží i období hibernace, které trvá nejčastěji okolo 7 měsíců – od října do května. V extrémních podmínkách s nedostatkem potravy, kdy se plši nerozmnožují (viz níže), však může hibernace trvat až 11 měsíců. Hibernace je rovněž účinnou zbraní proti predátorům – snižuje tedy predáční tlak (Hoelzl *et al.*, 2015). Plch velký nejčastěji hibernuje v podzemních děrách hlubokých až 1 metr, kde přečkává nepříznivé období stočen do klubíčka, s končetinami přitaženými blízce k tělu a obtočeným ocasem (Jurczyszyn 2007; Trout *et al.*, 2018). S krátkým aktivním obdobím a poměrně dlouhým obdobím hibernace se pojí i relativní dlouhověkost plchů velkých oproti jiným druhům hlodavců podobných tělesných rozměrů. V přirozených podmínkách se mohou plši velcí dožívat až 9 let (Lebl *et al.*, 2011).

Úroveň reprodukce je nízká, většina samic (96 %) rodí mláďata 1 – 2x za celý svůj život (Bieber *et* Ruf, 2008) a většinou mají jeden vrh ročně. V našich podmínkách se plši velcí rozmnožují zhruba během července a srpna, následuje období březosti trvající 30 dní. Průměrně bývá ve vrhu 5 – 6 mláďat, avšak zdokumentováno bylo až 11 jedinců. Mláďata jsou rozena v úkrytech plchů (hlavně dutiny stromů či ptačí budky), kde se o ně samice stará bez pomoci samců po dobu asi jednoho měsíce (Fietz *et al.*, 2005; Holcová Gazárková *et* Adamík, 2016).

1.3.3 Výskyt

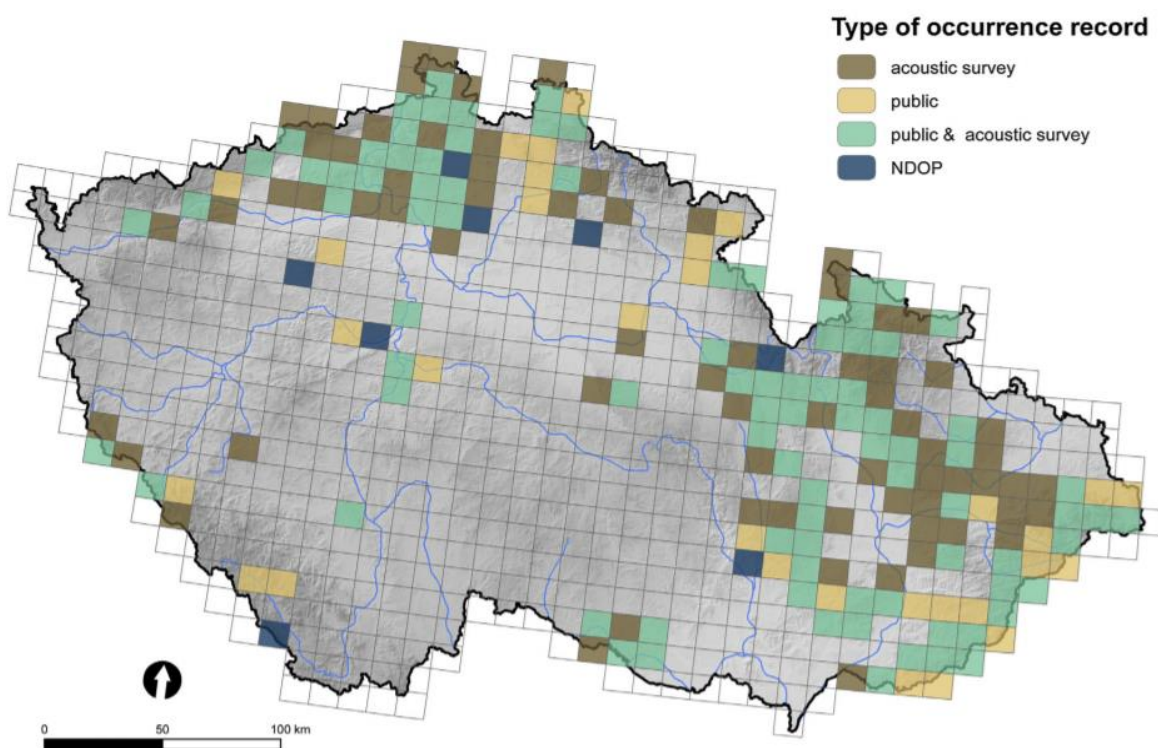
Těžištěm výskytu plcha velkého jsou především opadavé a smíšené lesy Evropy a jihozápadní Asie. Konkrétně se areál výskytu plcha velkého rozprostírá napříč západní, střední a jihovýchodní Evropou s výjimkou Dánska, pobřeží Atlantského oceánu v oblasti zemí Beneluxu a Francie a severní části Iberského poloostrova. Východní hranici jeho výskytu v rámci Evropy představuje řeka Volha. V rámci jihozápadní Asie je pak mapován výskyt plcha velkého v oblasti severního Turecka, Arménie, Ázerbajdžánu, jižního až jihovýchodního pobřeží Kaspického moře a pohoří Kavkaz. Ostrovní oblasti výskytu plcha velkého pak zahrnují 19 ostrovů Středozemního a Baltského moře a Velkou Británii v oblasti Anglie, kam byl plch úspěšně introdukován. Z pohledu nadmořské výšky se plši velcí vyskytují od nížin až do 1 545 m n. m. v Alpách a do 2 000 m n. m. v Pyrenejích a Kavkazu (Kryštufek, 2010). Geografické rozšíření plcha velkého lze vidět na obrázku č. 4.



Obrázek č. 4: Geografické rozšíření plcha velkého. Převzato z: Kryštufek (2010). Použito se svolením autora.

Na území České republiky vykazuje výskyt plcha velkého regionální rozdíly. V některých oblastech se vyskytuje hojně, jinde naopak sporadicky či vůbec. Celkově je charakter jeho rozšíření roztroušený. V Čechách se hojněji vyskytuje především v Děčínské vrchovině, Podkrušnohoří,

Českém středohoří, Ralské pahorkatině v oblasti dolního toku Berounky a Sázavy. Ostrůvkovitý výskyt je pak v Železných horách, Podkrkonošské oblasti, Orlických horách, v oblasti Broumova, v jihovýchodní části Českého lesa a na území Šumavy. V oblastech Moravy a Slezska obývá oblasti Východních Sudet a Západních Karpat, na území Moravského krasu a jihu Jevišovické pahorkatiny. Mimo lesní oblasti se lze s plchem velkým setkat i v hemisynantropních lokalitách jako jsou městské parky, chaty a sruby, osamělá stavení, včelíny či zahrady. Vyhýbá se oblastem lužních lesů, pro které je charakteristický značný humusový horizont půd a vysoká hladina spodní vody, což plchům znemožňuje hibernaci pod zemí. Na území ČR se plch velký vyskytuje z 83,1 % v rozmezí 200 – 600 m n. m., horní hranici pak představuje pásmo horní hranice lesa v průměrné nadmořské výšce 1 100 – 1 200 m n. m. Nálezy plcha velkého jsou od roku 1950 do roku 2011 hlášeny celkem z 340 lokalit v rámci 138 faunistických kvadrantů, což představuje 22 % celkové rozlohy České republiky (Adamík *et al.* 2019; Anděra *et Gaisler*; 2012). Rozšíření plcha velkého na území ČR je patno z obrázku č. 5.



Obrázek č. 5: Geografické rozšíření plcha velkého na území České republiky. Data dle hlasových záznamů, záznamů veřejnosti a informací z databáze NDOP (Nálezová databáze ochrany přírody). Převzato z: Adamík *et al.*, 2019. Použito se svolením autora.

Velikost domovského areálu jednoho jedince se různí dle pohlaví – samci mají areál větší než samice, hlavně kvůli větší mobilitě během reprodukce, avšak záleží i na charakteru prostředí a množství potravy v daném místě. Obvykle je velikost udávána v rozmezí několika hektarů. Samotní plši se pak pohybují v rozmezí cca 200 m od úkrytu, nicméně zaznamenány byly i přesuny ve vzdálenosti až 1 100 m (Anděra *et Gaisler*, 2012).

1.3.4 Závislost reprodukce a populační dynamiky plchů na výskytu semenných let

Rozšíření plcha velkého se značně překrývá s areálem výskytu buku lesního (*Fagus sylvatica*), jehož bukvice jsou jedním z nejdůležitějších zdrojů potravy na jejichž výskytu závisí nejen populační dynamika plchů, ale i jejich rozmnožování (Juškaitis *et* Auguté, 2015).

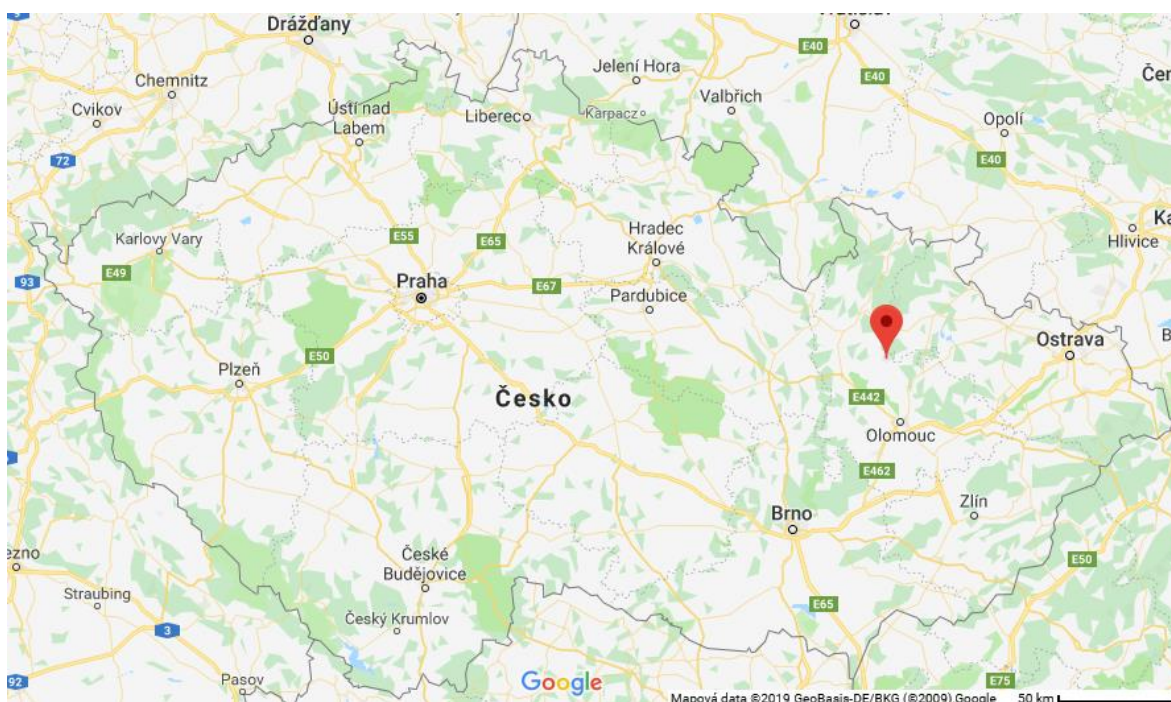
Jak již bylo uvedeno, reprodukce společně s délkou a úspěšností hibernace se úzce pojí s výskytem tzv. semenných roků buků (semenné roky se samozřejmě dají aplikovat i na jiné dřeviny). Semenným rokem buků rozumíme takový rok, během kterého plodí buky na plošně rozsáhlých územích (na úrovni subkontinentu nebo celého kontinentu) velké množství bukvic. Během nesemenných let je naopak množství vyprodukovaných bukvic řádově nižší (avšak neznamena to, že buk zcela neplodí), protože buky prochází regenerací a připravují se na další semenný rok. Konkrétní množství bukvic, které musí být vyprodukováno, aby mohl být rok kategorizován jako semenný, se napříč různými autory liší. Obecně lze ale říci, že zatímco během semenných roků může jeden buk vyprodukovat až stovky kilogramů bukvic, nesemenný rok se pohybuje pouze v řádu několika kilogramů. Výskyt semenných roků je nepravidelný, nejčastěji v intervalech 3 – 10 let. Na jeho výskytu se značně podílí i orografické podmínky a roční chod teplot se srážkami (Övergaard, Gemmel *et* Karlsson, 2007).

Udává se, že v období nesemenných let buků plši neinvestují tolik energie do rozmnožování z důvodu nedostatečného zdroje lipidů, proteinů či cukrů. Množství těchto látek, které plši konzumují, determinuje tělesnou hmotnost narozených mláďat i dospělců před hibernací, která musí být dostatečná, protože během hibernace dochází k úbytku až 1/3 celkové tělesné hmotnosti. Právě proto, že jsou bukvice na obsah těchto složek nejbohatší, je tato souvislost intenzivně studována a jsou patrné značné rozdíly ve váze jedinců před vstupem do hibernace v oblastech bukových lesů, kde vykazují plši značně vyšší hmotnost z důvodu dostatku zdrojů pro vytvoření tukové tkáně, a oblastech s nižším či žádným zastoupením této dřeviny, kde je vstupní váha jedinců před hibernací nižší a vzrůstá i úmrtnost plchů z důvodu nedostatečného množství zásobních látek (Fietz *et al.*, 2005). Fietz *et al.* (2005) také pro srovnání uvádí, že jedna bukvice obsahuje v průměru cca 41,5 % lipidů a 22,8 % proteinů, kdežto žalud (který je plchy v případě nedostatku bukvic také značně vyhledávaným zdrojem potravy), obsahuje cca 3,4 % lipidů a 0,9 % proteinů. Rozdíl v obsahu látek klíčových pro životní cyklus plchů je tedy značný. Omezením či úplnou absencí reprodukce v nesemenných letech se plši rovněž vyhýbají zvýšenému riziku nedostatečného zdroje potravy pro svá mláďata (Juškaitis *et* Auguté, 2015).

2 MATERIÁL A METODY

2.1 Charakteristika sledovaného území

Sledované lokality, na kterých probíhal odchyt plchů a sběr blech, se nachází v blízkosti obce Dlouhá Loučka, okrese Olomouc, v geomorfologickém celku Nížký Jeseník (N 49° 49,5', E 17° 12,7') v nadmořské výšce 300 – 450 m. Do sledovaného území zasahuje v jihozápadní části částečně PP Sovinecko. Celá oblast náleží do mírně teplé, ve vyšších polohách mírně chladné, klimatické oblasti. Převažujícím typem vegetace jsou smíšené lesy; dubohabřiny a květnaté bučiny. Dominantními dřevinami jsou buk lesní (*Fagus sylvatica*) a dub zimní (*Quercus petraea*), o něco méně jsou zastoupeny habry obecné (*Carpinus betulus*), lísky obecné (*Corylus avellana*) či javor klen (*Acer pseudoplatanus*). Na území některých lokalit zasahuje v menší míře smrk ztepilý (*Picea abies*). V oblastech, kde v současné době probíhá kácení lesa, se objevují husté porosty ostružiníků (*Robus* spp.). Bylinné patro je na lokalitách zastoupeno jen střídavě, především na okrajích lesů a v prosvětlených mýtinách. Nejhojněji zastoupenými druhy jsou netýkavka malokvětá (*Impatiens parviflora*), svízel přítula (*Galium aparine*), svízel vonný (*Galium odoratum*), barvínek menší (*Vinca minor*), kokořík mnohokvětý (*Polygonatum multiflorum*), kopřiva dvoudomá (*Urtica dioica*) či kaprad' samec (*Dryopters filix-mas*).



Obrázek č. 6: Geografická lokalizace sledovaného území poblíž obce Dlouhá Loučka na mapě ČR. Převzato z: Google Maps (2020), URL 2.

2.2 Práce v terénu

Výzkum probíhá na území sledovaných lokalit už po dobu několika let. Odchyt plchů se provádí z ptačích budek, které jsou umístěny na kmenech ve výšce asi 1,5 – 2 m. Převažují budky typu sýkorník (s průměrem vletového otvoru cca 3,2 cm), se střešovým či předním otevíráním. V oblasti jedné z lokalit jsou přítomny ještě budky určené pro plšika lískového (*Muscardinus avellanarius*), které jsou vstupním otvorem orientovány ke kmeni stromu, avšak běžně se v nich vyskytuje i námi sledovaný plch velký.

Lokality se pravidelně navštěvují od června, kdy se plši probouzí z hibernace a začínají osidlovat ptačí budky, přibližně do poloviny října, kdy se naopak k hibernaci ukládají. V období aktivity plchů jsem tedy v sezóně 2018 společně s kolegy v přibližně dvoutýdenních intervalech navštěvovala sedm lokalit pracovníčně označovaných jako „horní polda“, „dolní polda“, „klasika“, „plšíkové“, „sovinec“, „střelnice“ a „studánky“. Celkem bylo na těchto lokalitách kontrolováno 247 budek, avšak v průběhu sezóny bylo 6 budek poškozeno nebo ztraceno, a to z důvodu lokálního kácení či vlivu působení extrémního počasí.

Jako hlavní časový ukazatel pro analýzu počtu blech na plších jsme vytvořili tzv. periody, které označují období, ve kterém proběhla jedna kompletní kontrola všech sledovaných lokalit. Rozčlenění aktivní sezóny plchů do period rovněž eliminuje ty terénní odběry, které zasahovaly do dvou měsíců. Rozdělení period a data, ve kterých proběhla kontrola, shrnuje tabulka č. 3. Sezóna 2018 byla rozčleněna celkem do 9 period; počet dnů, v rámci kterých probíhaly kontroly během dílčích period, se v sezóně lišil podle počtu zvířat přítomných v budkách.

Tabulka č. 3: Přehled period a dat, ve kterých probíhaly kontroly

Perioda	Datum
1	13. 6. 2018
2	23. 6. 2018
3	30. 6. – 1. 7. 2018
4	10. 7., 14. – 15. 7. 2018
5	24. 7., 28. – 29. 7. 2018
6	6. – 8. 8., 11. – 12. 8. 2018
7	21., 25. 8. 2018
8	8. – 11. 9. 2018
9	22. – 23. 9., 7. 10. 2018

2.2.1 Odchyt plchů, sběr a uchovávání blech

Použité pomůcky:

- dřevěný žebřík
- odchytné pytlíky
- pružinová váha Medio Line (Pesola)
- ornitologické pravítko (Ecotone)
- identifikační veterinární mikročipy (Tierchip)
- čtečka veterinárních mikročipů (Trovan Ltd.)
- entomologická pinzeta (měkká)
- plastové minizkumavky 1,5 ml (Eppendorf)
- ethanol 96 % (PENTA)

Protože jsou plši typičtí svou noční aktivitou, mohli jsme je společně s kolegy odchytnat od brzkého rána až do odpoledních hodin, kdy v ptačích budkách spí. Po odchytní plcha proběhlo vždy jeho vážení za použití pružinové váhy, změření délky tibie pomocí ornitologického pravítka, zaznamenání pohlaví, pohlavní aktivity (reprodukčně aktivní nebo neaktivní v daném roce, a to dle viditelnosti a hmatnosti varlat u samců, gravidity a laktace u samic) a stáří. Prvně odchytní jedinci jsou označeni čipem do interskapulárního regionu, stáří se odhaduje dle délky tibie a zbarvení srsti – kategorizuje se jako – juvenil (J – „juvenile“), jedinec po první hibernaci (SY – „second year“) a jedinec po více hibernacích (ASY – „after second year“). V případě, že se v hnízdě nacházela samice s vrhem mláďat, bylo u každého mláděte určeno pohlaví a hmotnost; jejich značení proběhlo až po odstavení.

Pro účely mého výzkumu jsem odchytnávala blechy pomocí měkké entomologické pinzety přímo z kožichu jedince a následně ze sběrových pytlíků, kde po manipulaci s plchem zůstaly často zachyceny. Nasbírané blechy jsem pak ukládala do 1,5 ml minizkumavky naplněné 500 μ l 96% ethanolu, ve kterém byly uchovávány při pokojové teplotě až do další manipulace. Každá minizkumavka byla označena písmenem F – „flea“ a číslem sběru. Jeden odběr byl vztažen ke všem jedincům obývajících jednu budku.

Dle původního protokolu jsem blechy během sezóny odebírala za celé hnízdo (tedy za všechny jedince plchů, kteří byli v době odchytu v budce). Pro vyhodnocení infestace blech u plchů jsem zahrнула pouze ta pozorování, která zahrnovala jednoho jedince plcha v budce. Ve vyhodnocení nejsou zahrnuti i veškerí juvenilní jedinci – tj. narození během sezóny 2018. Důvodem je, že nelze přiřadit blechy ke konkrétnímu jedinci, pokud jich bylo v budce vícero.

2.2.2 Odběry vzorků z plchů

Použité pomůcky, chemikálie a roztoky:

- Domitor 1 mg/ml roztok (Orion Pharma s. r. o.)
- Narkamon 10 mg/ml roztok (Bioveta a. s.)
- Revertor 5mg/ml roztok (WERFFT CHEMIE)
- plastové minizkumavky 1,5 ml (Eppendorf)
- ethanol 96 % (Sigma-Aldrich)

Ve spolupráci s kolegy z Oddělení parazitologie Ústavu patologické morfologie a paraziologie Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně se dvakrát za sezónu 2018 (v červenci a září) odebírala krev z plchů pro další mikrobiologické vyšetření. Jedincům byl intramuskulárně aplikován přípravek Domitor (účinná látka medetomidin – 0,2 mg/kg) a Narkamon (účinná látka ketamin 20 mg/kg). Odběr malého množství vzorku (0,1 – 0,3 ml) se prováděl z *vena cava cranialis*. Po odběru následoval ještě dodatečný odběr ektoparazitů – blech a klíšťat. Do 15 – 20 minut od aplikace anestetik bylo aplikováno antidotum – Revertor (účinná látka atipamezol 5mg/ml), které zrušilo sedativní účinky medetomidinu. Každý jedinec byl posléze navrácen do budky, ze které byl odebrán. Manipulaci s plchy prováděli veterinární lékaři, odběr blech a klíšťat jsem pak obstarávala já společně se studenty Fakulty veterinárního lékařství (VFU).

Všechny odebrané vzorky (celkem 51 krevních odběrů a 327 blech) se ukládaly do 1,5 ml minizkumavek s 96% čistým molekulárním ethanolem. Po příjezdu z terénu se vzorky uchovávaly až do zpracování v mrazáku při teplotě –20 °C, ektoparazité při pokojové teplotě.

Protože se v tomto případě lišil sběrový protokol odběru blech (oproti pravidelným terénním sběrům s kolegy bylo možné ektoparazity odebírat z uspaného zvířete s dostatkem času pro důkladné prohlédnutí srsti, čímž se lišily i výsledné součty odebraných blech), nejsou blechy získané tímto způsobem započítávány mezi finální součty blech získaných z našich lokalit.

Identické odběry byly provedeny také během sezón 2017 (61 odběrů) a 2016 (17 odběrů) za účelem mikrobiologického vyšetření na brněnském pracovišti.

2.3 Druhá determinace blech

Použité pomůcky:

- entomologická pinzeta
- plastové minizkumavky 1,5 ml (Eppendorf)
- podložní mikroskopická skla (Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH ©)
- biologický mikroskop (CX31, Olympus Optica, Inc.)
- ethanol 96 % (PENTA)

S využitím mikroskopu jsem pak pro všechny sesbírané blechy na základě morfologických a anatomických znaků určila pohlaví a druh dle Rosického (1957). Blechy byly na podložní sklíčko vkládány jednotlivě do kapky 96% ethanolu a následně překryty sklíčkem krycím – žádné montovací médium nebylo použito. Všichni určení jedinci byli následně podle druhu a pohlaví rozděleni do nových plastových minizkumavek 1,5 ml (Eppendorf) s 0,5 ml 96% ethanolu a označeni číslem sběru (ponechán z terénních záznamů) a pohlavím. Před dalším zpracováním byly blechy ponechány v minizkumavce s ethanolem při pokojové teplotě.

2.4 Výběr blech pro detekci bartonel

Pro zhodnocení výskytu bartonel za sezónu 2018 jsem vybrala celkem 430 blech – 292 samic a 138 samců. Vzorky pocházely za měsíce červen, červenec, srpen a září, a brány byly maximálně tři kusy za každé pohlaví blechy druhu *Ceratophyllus (Monopsyllus) sciurorum* získané z jednoho hnízda – tj. maximální množství z jednoho hnízda bylo 6 blech (zbytek blech byl uchován). Za měsíc červen jsem vybrala blechy ze všech sedmi sledovaných lokalit, a to především kvůli nižšímu výskytu blech korelujícímu s nižším výskytem plchů, kteří teprve začínali osidlovat ptačí budky po hibernaci. Za měsíce červenec, srpen a září jsem přistoupila k detekci bartonel u blech sesbíraných z lokalit „střelnice“ a „klasika“, a to z důvodu rozdílného charakteru sledovaného území.

Lokalita „střelnice“ je značně členitá, s výskytem prosvětlených míst a mýtin, kde je hojně zastoupené křovinné a bylinné patro, jehož druhové zastoupení se v průběhu sezóny pozvolně proměňuje. Dominují již výše zmíněné druhy jako ostružiníky, netýkavky malokvěté, kopřivy dvoudomé, svízele ad. Hojně je zastoupen také bez černý (*Sambucus nigra*). Les v této lokalitě není zapojený, ale je z podstatné části na jižní a západní straně areálu ohraničen loukami a poli. Oproti tomu druhá zvolená lokalita – „klasika“, představuje kontrastní oblast bez výrazné členitosti, se zapojeným lesem, s žádným nebo minimálním zastoupením křovinného a bylinného porostu. Převažují dřeviny – především habr obecný, dub zimní, buk lesní a javor klen.

V některých případech byly blechy při manipulaci (především přímo při odběru v terénu) poškozeny. Takoví jedinci byli započítáni do celkového součtu blech získaných během sezóny, avšak kvůli možnému poškození DNA nebyli použiti pro detekci bartonel a ze vzorků byli vyřazeni.

Před samotným začátkem detekce bartonelové DNA u odchycených blech se pro stanovení metodiky a postupu pro izolaci bartonelové DNA v první řadě přistoupilo k analýze blech, které byly získány kolegy z Ústavu parazitologie VFU Brno během sběrů za rok 2017; celkem se jednalo o 161 blech – 88 samic, 73 samců.

2.5 Práce v laboratoři

Veškerou práci související s detekcí bartonel v blechách a krevních vzorcích plchů jsem prováděla v laboratoři Biologie hmyzích vektorů a jimi přenášených patogenů na Katedře parazitologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. Výjimkou byla izolace DNA z krve plchů, která byla prováděna kolegy na Ústavu patologické morfologie a parazitologie Fakulty veterinárního lékařství na Veterinární a farmaceutické univerzitě v Brně. Tyto izoláty byly následně převezeny na pražské pracoviště pro další manipulaci.

2.5.1 Izolace DNA z blech

Použité pomůcky, chemikálie a roztoky:

- komerční kit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)
- plastové minizkumavky 1,5 ml (Eppendorf)
- PCR H₂O (Top-Bio)
- 96% ethanol (Sigma-Aldrich)

Blechy byly po druhové determinaci a určení pohlaví skladovány v minizkumavkách v 96% ethanolu. Před začátkem samotné izolace DNA byl ze zkumavek ethanol odsát a místo něj přidáno 200 µl PCR vody na dobu minimálně 5 hodin (zpravidla ponechány přes noc cca 8 hodin), aby byl ethanol ze vzorků vymyt. Po uplynutí této doby byla PCR voda odsáta a zkumavky s blechami se nechaly s otevřeným víčkem cca 30 minut v termobloku vyschnout při teplotě 37 °C, čímž se odpařila voda i případné zbytky ethanolu. Následně byly blechy rozděleny po jednotlivcích do nových samostatných plastových minizkumavek (1,5 ml), které byly označeny číslem odběru a pohlavím blechy. K takto přichystaným jedincům se přidalo 200 µl lyzačního pufru ATL z komerčního kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) a blechy byly všechny homogenizovány plastovými písty. Homogenizované blechy byly poté vortexovány (cca 10 sekund). V prvních předpokusech jsme izolovali DNA z poolů. Pooly byly vytvořeny smícháním 1 – 7 jedinců blech (dle pohlaví a sběru). Podle počtu jedinců (jednotlivec nebo počet blech v poolu) bylo následně 70 – 100 µl homogenátu odebráno jako rezerva pro další manipulaci a skladováno v –20 °C. Postup pro konkrétní počet jedinců uveden v tabulce č. 4. Vzhledem k výsledkům předpokusů s pooly (~90 % PCR pozitivních vzorků) jsme přistoupili k individuální izolaci DNA z jednotlivců a tento postup byl použit pro všechny zbývající vzorky.

Tabulka č. 4: Postup přípravy poolů pro izolaci DNA dle celkového počtu jedinců

Konečný počet jedinců v poolu	Objem pufru ATL přidáný k homogenátu jednotlivce (100 μ l)	V O R T E	Objem odebraný do poolu pro izolaci	Objem, který zbyl z homogenátu jednotlivých blech (uložen v -20°C)	Objem pufru ATL, který se přidal k poolu	Vstupní objem smíchaných homogenátu do izolace*
1	100 μ l	X	100 μ l	100 μ l	100 μ l	200 μ l
2	100 μ l	O	100 μ l	100 μ l	-	200 μ l
3	-	V	50 μ l	50 μ l	-	150 μ l
4	-	A	35 μ l	65 μ l	-	140 μ l
5	-	T	35 μ l	65 μ l	-	175 μ l
6	-		30 μ l	70 μ l	-	180 μ l

* podle protokolu snaha přiblížit se vstupnímu objemu pufru ATL + tkáň k cca 180 μ l

Z homogenátů byla izolována celková DNA dle pokynů výrobce komerčního kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). Pouze v posledním kroku celého procesu izolace byla DNA z kolonky eluována do 100 μ l směsi PCR vody a elučního pufru AE v poměru 1 : 1, a to na základě zkušeností ostatních kolegů z laboratoře.

2.5.2 Izolace DNA z krve plchů

Použité pomůcky, chemikálie a roztoky:

- komerční kit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)
- plastové minizkumavky 1,5 ml a 2 ml (Eppendorf)
- PCR H₂O (Top-Bio)
- 96% ethanol (Sigma-Aldrich)

Krev z plchů byla izolována kolegy z Oddělení parazitologie VFU Brno. Po odběru byla před další manipulací fixována v 96% čistém molekulárním ethanolu a následně uchovávána při teplotě -20°C . Odtud byl do 2ml minizkumavek (Eppendorf) přendán pelet fixované krve o maximální velikosti cca 2×2 mm nebo přepipetováno maximální množství 500 μ l roztoku krve s ethanolom, který byl dále centrifugován po dobu maximálně 1 min a poté zbaven ethanolu (odsátím) pro získání krevního peletu. Zkumavky s peletem a otevřenými víčky byly následně umístěny do termobloku bez třepání vyhřívaného na 37°C a ponechány přes noc (cca 8 hodin) pro odpaření ethanolu. Následný postup izolace DNA z plší krve se již realizoval dle pokynů výrobce komerčního kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). Pouze v posledním kroku celého procesu izolace byla DNA z kolonky eluována do 100 μ l elučního pufru AE. Výsledný zisk cca 100 μ l DNA byl uchován v 1,5 ml minizkumavkách, popsán a uložen v -20°C . Odtud byla izolovaná DNA převezena v termoboxu na pražské pracoviště pro další zpracování (PCR, ELFO, sekvenace).

2.5.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Použité pomůcky, chemikálie a roztoky:

- templátová DNA z izolátu
- specifické primery (viz níže)
- EmeraldAmp GT PCR Master Mix (TaKaRa Bio Inc.)
- PCR H₂O (Top-Bio s.r.o.)

Na základě rešerše odborných publikací byly zvoleny čtyři různé páry primerů, které autoři Maggi *et* Breitschwerdt (2005), Cherry *et al.* (2009), Norman *et al.* (1995) a Birtles *et* Raoult (1996) používali pro detekci bartonel. Primery nazvané pro účely této práce „ITS_2“ a „ITS_1“ byly zacíleny na vnitřní přepisovaný mezerník mezi geny kódující 16S a 23S rRNA (*16S – 23S rRNA intergenic spacer region*; ITS). Primery v této práci označované jako „GLTA_1“ a „GLTA_2“ byly zacíleny na gen pro syntézu citrátu (*Citrate Synthase Gene*; *gltA*). Přehled použitých primerů zobrazuje tabulka č. 5, složení amplifikační reakce tabulka č. 6 a nastavení teplotních cyklů pro amplifikaci jednotlivých primerů tabulky 7 – 10.

Tabulka č. 5: Přehled použitých primerů

Název primeru	Orientace	Sekvence primeru (5'→3')	Citace (autor)
„ITS_2“	forward	AGATGATGATCCCAAGCCTTCTGG	Maggi <i>et</i> Breitschwerdt (2005)
„ITS_2“	reverse	TGTTCTYACAACAATGATGATG	
„ITS_1“	forward	CTTCAGATGATGATCCCAAGCCTTCTGGCG	Cherry <i>et al.</i> (2009)
„ITS_1“	reverse	GAACCGACGACCCCCTGCTTGCAAAGCA	
„GLTA_1“	forward	GGGGACCAGCTCATGGTGG	Norman <i>et al.</i> (1995)
„GLTA_1“	reverse	AATGCAAAAAGAACAGTAAACA	
„GLTA_2“	forward	GCTATGTCTGCATTCTATCA	Birtles <i>et</i> Raoult (1996)
„GLTA_2“	reverse	AATGCAAAAAGAACAGTAAACA	

Tabulka č. 6: Složení amplifikační reakce

Master Mix (2× koncentrovaný)	10 µl
PCR H ₂ O	8 µl
Primer F (10 pmol/µl)	0,5 µl
Primer R (10 pmol/µl)	0,5 µl
Vzorek DNA	1 µl

Tabulka č. 7: Nastavení teplotního cyklu pro amplifikaci (primery „ITS_2“)

Počet opakování	Teplota	Čas
1×	95 °C	5 min
45×	94 °C	45 s
	54 °C	45 s
	72 °C	45 s
1×	72 °C	10 min

Tabulka č. 8: Nastavení teplotního cyklu pro amplifikaci (primery „ITS_1“)

Počet opakování	Teplota	Čas
1×	92 °C	2 min
55×	94 °C	15 s
	66 °C	15 s
	72 °C	18 s
1×	72 °C	1 min

Tabulka č. 9: Nastavení teplotního cyklu pro amplifikaci (primery „GLTA_1“)

Počet opakování	Teplota	Čas
1×	95 °C	5 min
35×	95 °C	20 s
	51 °C	30 s
	72 °C	2 min
1×	72 °C	10 min

Tabulka č. 10: Nastavení teplotního cyklu pro amplifikaci (primery „GLTA_2“)

Počet opakování	Teplota	Čas
1×	95 °C	5 min
35×	95 °C	10 s
	50 °C	20 s
	72 °C	50 s
1×	72 °C	10 min

Získané PCR produkty byly z části použity na gelovou elektroforézu (ELFO) a zbytek byl skladován v lednici při teplotě cca 4 °C.

2.5.4 Elektroforéza (ELFO)

Použité pomůcky, chemikálie a roztoky:

- TAE pufr (AppliChem GmbH, BioChemica)
- agaróza (Invitrogen)
- SybrSafe DNA gel stain (Invitrogen)

- GeneRuler™ 100bp DNA Leader Plus (Fermentas life science)
- PCR produkty

U produktů, které byly získány pomocí polymerázové řetězové reakce, se dále zjišťovala přítomnost specifického amplikonu za použití horizontální gelové elektroforézy (ELFO). Ta byla provedena na 1% agarózovém gelu s pufrém TAE (1× koncentrovaný). Po povaření pufru s agarózou a následném zchlazení se do směsi dodalo barvivo SybrSafe pro zviditelnění DNA pod ultrafialovým světlem. Směs byla poté nalita do elektroforetické soupravy společně se zasazením jamkových hřebenů a cca 20 se minut čekalo na zatuhnutí gelu. Po vyndání hřebenů se pak do krajních pozic napipetovalo 6,5 µl markeru GeneRuler™ 100bp DNA Leader Plus, který sloužil pro odečtení velikosti výsledných amplikonů. Do zbylých jamek mezi markery se přeneslo 10 µl PCR produktů. Zbylých 10 µl PCR produktů z každého vzorku se ponechalo na následnou izolaci DNA a sekvenaci. Po spuštění elektroforézy a jejím doběhnutí byly získané gely pod UV světlem vyfoceny.

2.5.5 Přečištění/izolace DNA z PCR produktů

Použité pomůcky, chemikálie a roztoky:

- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)
- ExoSAP-IT® Express PCR Product Cleanup (Affymetrix, Inc.)
- isopropanol

U pozitivních vzorků se ze zbývajících 10 µl odpovídajícího PCR produktu následně přečišťovala DNA pomocí enzymatické směsi ExoSAP. Enzymatické přečištění PCR produktů bylo prováděno dle protokolu výrobce, avšak některé kroky byly po konzultaci s kolegy v laboratoři mírně pozměněny – jednalo se o množství přidaného enzymu a časy nastavené v jednotlivých krocích probíhajících v termocycleru (viz níže). Doporučené teploty zůstaly zachovány.

Práce s enzymatickou směsí se prováděla na vychlazeném stojánku (na ledu) při teplotě max. 4 °C. Po smíchání 5 µl PCR produktu s 1 µl enzymatické směsi, následovala centrifugace vzorku po dobu cca 10 sekund. Odtud byly PCR produkty s enzymem umístěny do termocycleru, kde následovala inkubace vzorku při 37 °C po dobu 8 minut, při které došlo k degradaci zbylých primerů a nukleotidů v PCR produktech, denaturace při 80 °C po dobu 2 minut pro inaktivaci enzymatické směsi a následně zchlazení na 4 °C, po kterém byl PCR produkt připraven pro DNA sekvenaci.

V jednom případě jsem si vyzkoušela také izolování DNA přímo z pozitivních proužků v gelu, které byly vyřezány sterilním skalpelem pod UV světlem. Vyřezané segmenty gelu se ukládaly do minizkumavky a zvažily se. Dále se již opět postupovalo dle pokynů výrobce uvedených v protokolu komerčního kitu High Pure PCR Product Purification Kit (Roche).

2.5.6 Sekvenační reakce

Použité pomůcky, chemikálie a roztoky:

- PCR H₂O (Top-Bio s.r.o.)
- sekvenační primery v koncentraci 3,2 pmol/μl
- vzorky izolované DNA

Po izolování DNA z PCR produktů následovala sekvenace, pro kterou byla nachystána směs o celkovém objemu 8 μl, která sestávala z 1,5 μl přečištěné DNA, 1,5 μl příslušného sekvenačního primeru o koncentraci 3,2 pmol/μl a 5 μl PCR H₂O. Sekvenační primery byly připraveny zředěním amplifikačních primerů. Takto připravené vzorky byly pro provedení sekvenace zaslány do Laboratoře sekvenace DNA Přírodovědecké fakulty UK Praha.

2.5.7 Vyhodnocení sekvencí a fylogenetické analýzy

Obdržené sekvence byly v podobně fluorescenčních křivek zobrazeny a zkontrolovány v programu BioEdit. Odtud byly pomocí algoritmu BLAST porovnány se sekvencemi, které jsou uloženy v databázích NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Sekvence, které odpovídaly bartonelám se pak dodatečně upravovaly v programu Geneious. Tyto úpravy souvisely především s přípravou alignmentů pro porovnání sekvencí mezi sebou či v některých případech opravu chyb vzniklých při dvojitým čtením.

2.6 Zápis, zpracování a statistická analýza dat

Počet všech odchycených blech v rámci hnízda (budky) včetně označení sběru byl při terénní práci zaznamenán do pracovních listů k ostatním charakteristikám plchů (datum, lokalita, budka, kód zvířete, pohlaví, věk, případně další poznámky). Data z pracovních listů byly následně převedeny do hromadné tabulky Excel (MS Office). Tuto tabulku jsem následně upravila pro vlastní zpracování dat a po druhové determinaci zaznamenala počet samců a samic blech. Statistické hodnocení a tvorba grafů proběhla v programu R.

Pro statistické analýzy související se sezónní dynamikou blech v závislosti od vlastnosti hostitele jsem použila datový soubor, který zahrnoval pouze blechy druhu *Ceratophyllus (Monopsyllus) sciurorum* nálezy s dospělými solitárními plchy (tj. vyskytujícími se samostatně v budce) a bez opakovaných odchytů stejných jedinců v průběhu sezóny. V případě opakovaných odběrů v průběhu sezóny byl náhodně vybrán jeden z nich. Původní datový soubor obsahoval 1520 pozorování plcha velkého (dospělců i mláďat) a odebraných 1123 blech. Po zohlednění výše uvedených kroků obsahuje soubor využívaný v této práci 299 pozorování plcha velkého s 420 odchycenými blechami. Důvodem pro tento postup bylo zamezení pseudoreplikace a odstranění

matoucího efektu skupinově odpočívajících plchů. Provedla jsem standardní exploraci vztah mezi proměnnými (vliv váhy jedince, délka tibie, sezónalita, věk, pohlaví a reprodukční aktivita hostitele).

Pro ověření, které proměnné ovlivňují přítomnost blech u plchů byl zvolen zobecněný lineární model s binomickým rozdělením. Analyzoval se vztah mezi prezencí blech na plších a proměnnými pohlaví plcha, pohlavní aktivita, věk, lokalita a perioda. Na základě explorační analýzy dat byly v modelu použity všechny proměnné, a to bez interakcí.

Pro ověření, které proměnné ovlivňují početnost blech u plchů, byl zvolen zobecněný lineární model s negativním binomickým rozdělením (funkce `glm.nb` v programu R). Analyzoval se vztah mezi počtem blech na jedinci a proměnnými věk, pohlaví, perioda, lokalita, pohlavní aktivita, velikost těla (ta je vyjádřena jako reziduály z lineární regrese mezi délkou tibie a hmotnosti). Na základě explorační analýzy dat byly v modelu použity všechny proměnné. Model je bez interakcí mezi proměnnými.

Dle explorační analýzy bylo zřejmé, že pohlaví hostitele má vliv na poměr pohlaví hostujících blech. Z tohoto důvodu byl zkonstruován jednoduchý zobecněný lineární smíšený model s binomickým rozdělením. V tomto modelu se jako závislá proměna použil počet bleších samců vůči bleším samicím.

Efekt pohlaví blech se vyhodnotil pomocí zobecněného lineárního modelu s binomickým rozdělením.

Pro porovnání dvou ekologicky odlišných lokalit – „klasiky“ a „střelnice“, byl zvolen zobecněný lineární model s binomickým rozdělením. Analyzoval se vztah bartonely vůči pohlaví blech, periodě, lokalitě a interakci periody s lokalitou.

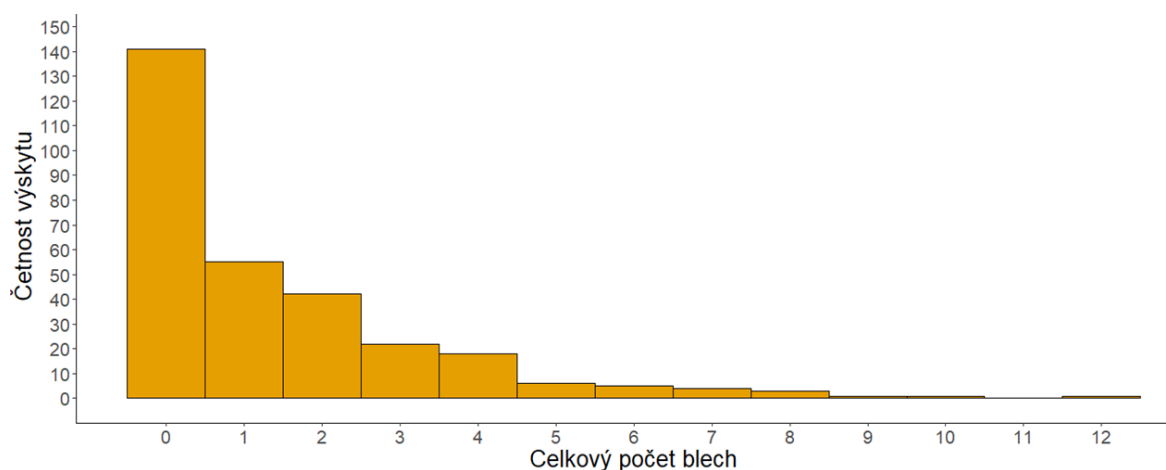
3 VÝSLEDKY

3.1 Druhové spektrum blech u plcha velkého

Během aktivní sezóny plcha velkého jsme provedli 1520 odchytů plchů, ze kterých jsme odebrali 1123 blech. 1114 blech náleželo do rodu *Ceratophyllus (Monopsyllus) sciurorum* (99,2 %). Minimálně byly zastoupeny druhy *Ceratophyllus gallinae* – 8 blech (0,7 %) a v jednom případě jsem zaznamenala blechu *Hystrichopsylla talpae* (0,1 %). Protože jsou druhy *Ceratophyllus gallinae* a *Hystrichopsylla talpae* typické pro jiné hostitele (*C. gallinae* pro ptáky a *H. talpae* pro krky), nebyly do analýz dále započítávány.

3.2 Sezónní dynamika blech

Celkem 299 plchů – 95 samic a 204 samců splňovalo podmínku solitérního výskytu v budce. Z těchto pozorování bylo 158 plchů (52,8 %) infestováno alespoň jednou blechou a celkem 420 blechami druhu *Ceratophyllus (Monopsyllus) sciurorum* – 300 samicemi a 120 samci. V případě infestovaného jedince jsem nejčastěji našla 1 – 2 blechy, průměr = $1,4 \pm 1,97$ SD. Větší množství blech jsem zaznamenala jen v ojedinělých případech, maximální počet byl 12 blech na jedince (viz obrázek č. 7).



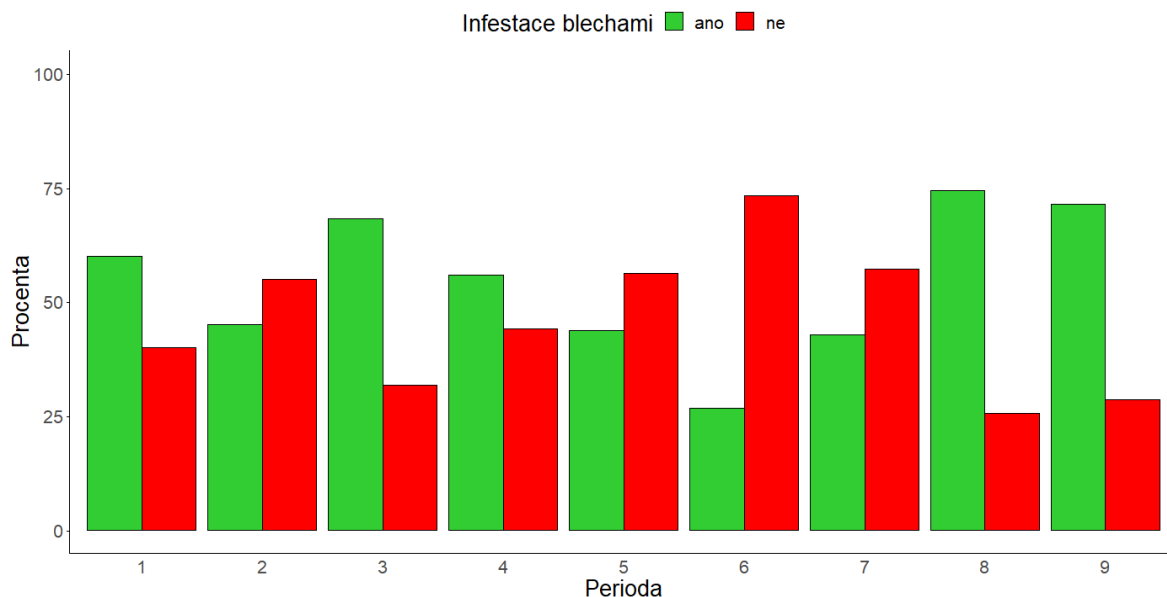
Obrázek č. 7: Histogram zobrazující četnost výskytu blech na jedince v průběhu sezony.

3.2.1 Proměnné ovlivňující přítomnost blech u plchů

Přítomnost blech u plchů se významně měnila v průběhu sezóny, mezi lokalitami a s pohlavní aktivitou jedinců (viz tabulka č. 11). Věk a pohlaví plchů neměly průkazný vliv na pravděpodobnost infestace. Podíl infestovaných a neinfestovaných jedinců v průběhu period zobrazuje obrázek č. 8.

Tabulka č. 11: Vliv vybraných proměnných na prezenci/absenci blech u plchů

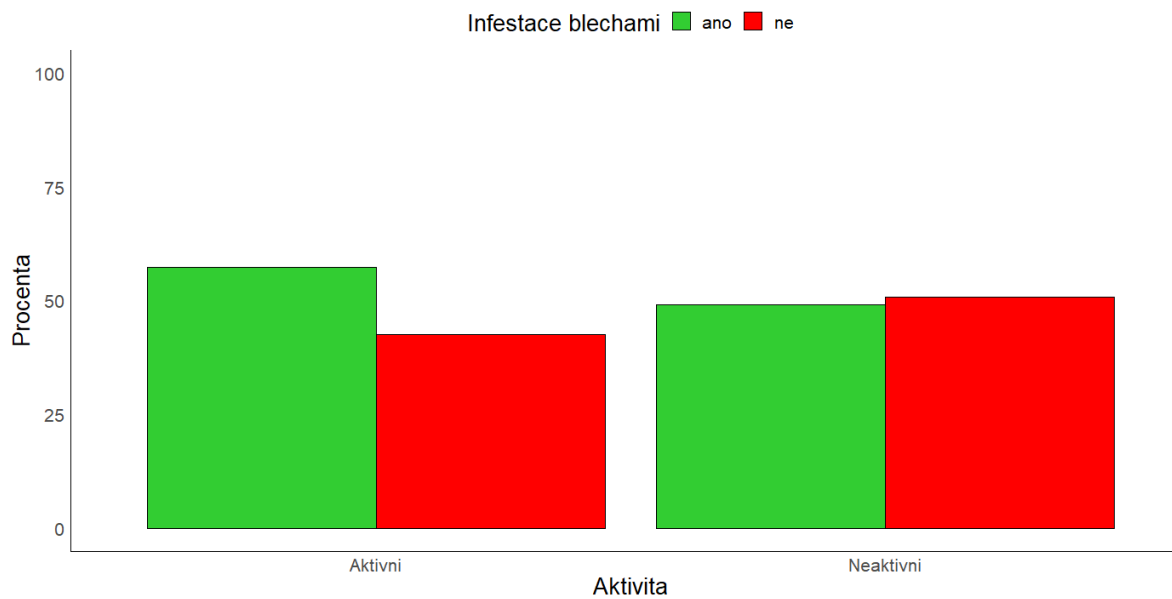
	DF	Deviance	LRT	P
Intercept	362,41	398,41	–	–
Perioda	8	396,34	33,932	<0,0001
Pohlavní aktivita plcha	1	369,10	3,689	0,0097
Lokalita	6	378,26	15,857	0,0145
Pohlaví plcha	1	363,90	1,1488	0,2226
Věk plcha	1	362,89	0,486	0,4859



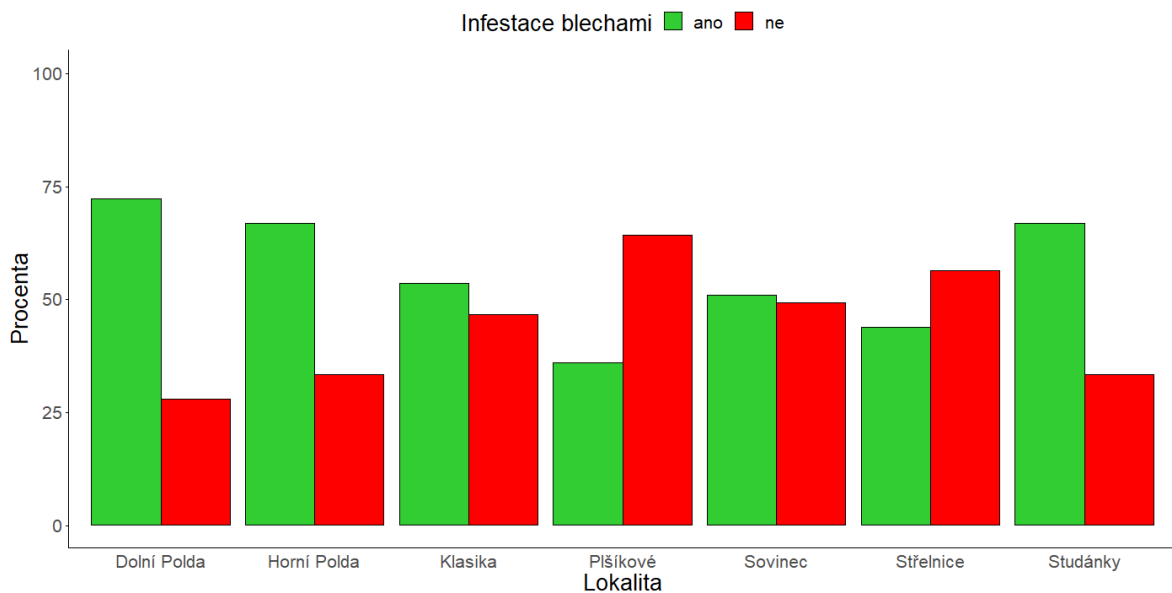
Obrázek č. 8: Sezónní změna infestace plchů blechami.

V průběhu sezóny jsme zaznamenali 134 sexuálně aktivních (29 samic a 105 samců) a 165 neaktivních zvířat (66 samic a 99 samců). U pohlavně aktivních jedinců je patrná signifikantně vyšší pravděpodobnost ($P = 0,0097$) infestace blechami (57,5 % infestovaných, 42,5 % neinfestovaných), naopak u neaktivních jedinců je podíl infestovaných a neinfestovaných jedinců téměř totožný (49,1 % infestovaných a 50,9 % neinfestovaných), viz obrázek č. 9.

Vyšší pravděpodobnost infestace blechami vykazují napříč sezónou lokality „dolní polda“ (72,2 %), „horní polda“ (66,7 %) a „studánky“ (66,7 %). Téměř shodné zastoupení infestovaných a neinfestovaných jedinců lze nalézt na lokalitách „sovinec“ (50,8% infestace) a „klasika“ (53,4% infestace). Nejméně infestovaných zvířat pak bylo na lokalitách „plšíkové“ (35,9 %) a „střelnice“ (43,8 %), viz obrázek č. 10.



Obrázek č. 9: Přehled infestace blechami u pohlavně aktivních a neaktivních jedinců.



Obrázek č. 10: Přehled infestace plchů blechami v průběhu celé sezony na jednotlivých lokalitách.

Blechy byly přítomné u 46,3 % samic a u 55,9 % samců. Mladší zvířata (sy) vykazovala infestaci 45,9 % a starší zvířata (asy) 47,9 %.

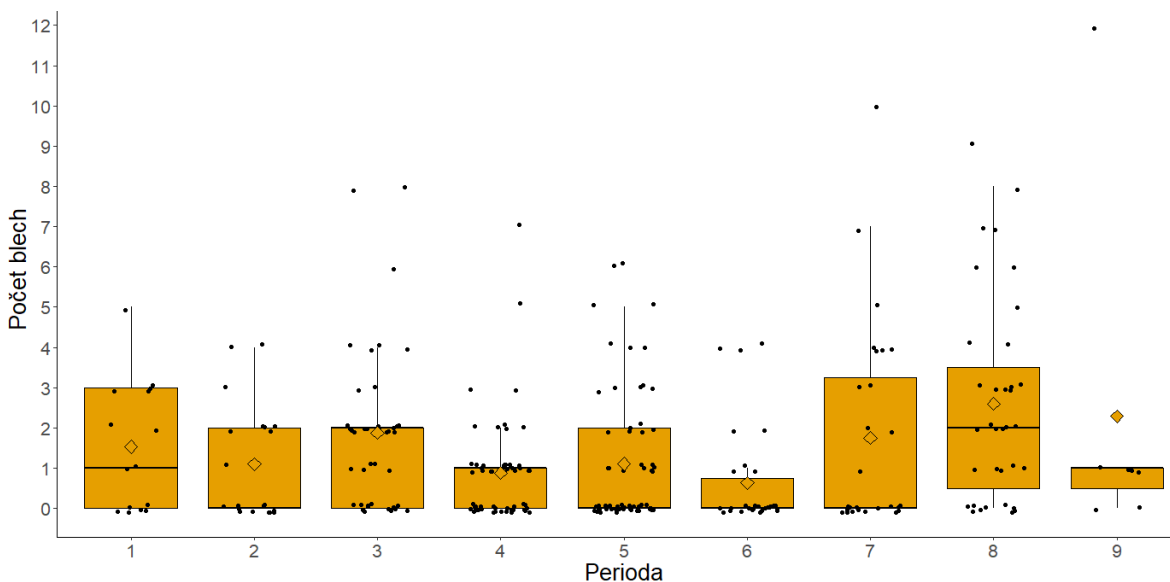
3.2.2 Proměnné ovlivňující početnost blech u plchů

Model pracující s počty blech u plchů ukázal, že se statisticky průkazně mění v průběhu sezóny. Nejvyšší počty blech na jedince jsem zjistila v září. Výstup modelu shrnuje tabulka č. 12.

Tabulka č. 12: Vliv vybraných proměnných na sílu infestace plchů blechami. Použit zobecněný lineární model s negativním binomickým rozdělením.

	DF	Deviance	LRT	P
Intercept	304,32	964,00	–	–
Perioda	8	330,75	26,4264	0,0009
Pohlavní aktivita plcha	1	307,79	3,4712	0,0624
Lokalita	6	316,10	11,7774	0,0671
Pohlaví plcha	1	306,90	2,5809	0,1082
Velikost těla plcha (RES)	1	304,92	0,5991	0,4389
Věk plcha	1	304,82	0,5033	0,4781

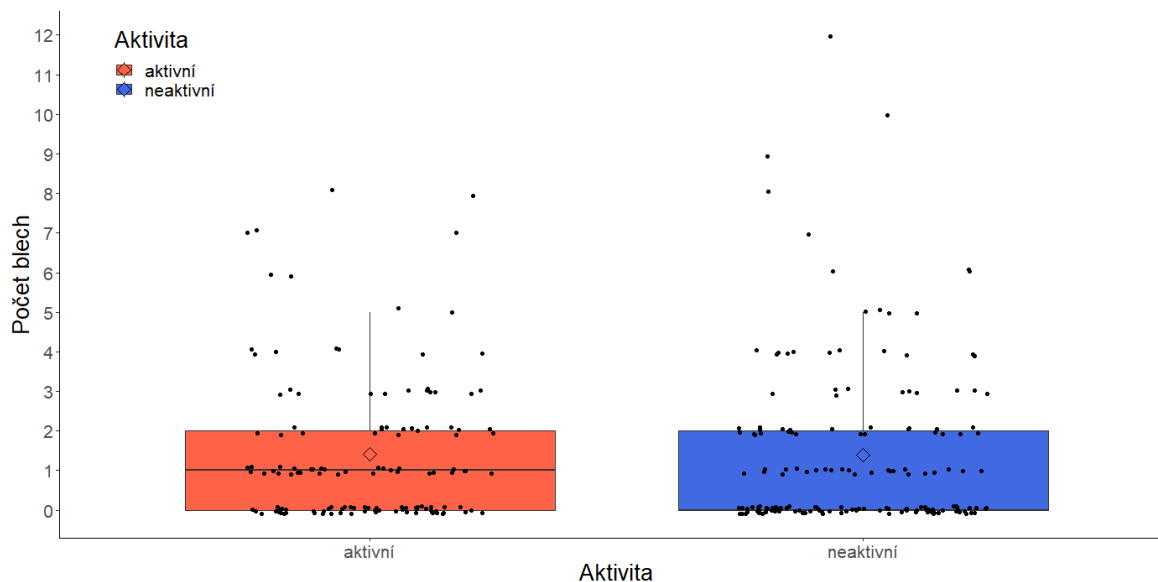
Nejvyšší průměrný počet blech na jedince jsem zaznamenala ve 3., 8. a 9. periodě (průměry = 1,88; 2,60 a 2,29). Nejvyšší mediány jsou pak patrné pouze pro 3. a 8. periodu (med = 2; med = 2), protože v 9. periodě je přítomna odlehlá hodnota (12 blech na jedince). Nejnižší průměrné hodnoty blech na jedince jsou pak ve 4. a 6. periodě (průměry = 0,88 a 0,63). Nulové mediány jsou zaznamenány u 2., 5., 6. a 7. periody. Početnost blech během period zobrazuje obrázek č. 11.



Obrázek č. 11: Početnost blech na plších během jednotlivých period. Černé body zobrazují jednotlivé plchy, kosočtverce průměrné hodnoty a zdůrazněné linie v jednotlivých boxech mediány. Vousy na boxech nám zobrazují hranice pro vysoké hodnoty; nad jejich hranicí se nachází hodnoty odlehlé (outliery) zobrazující raritní pozorování.

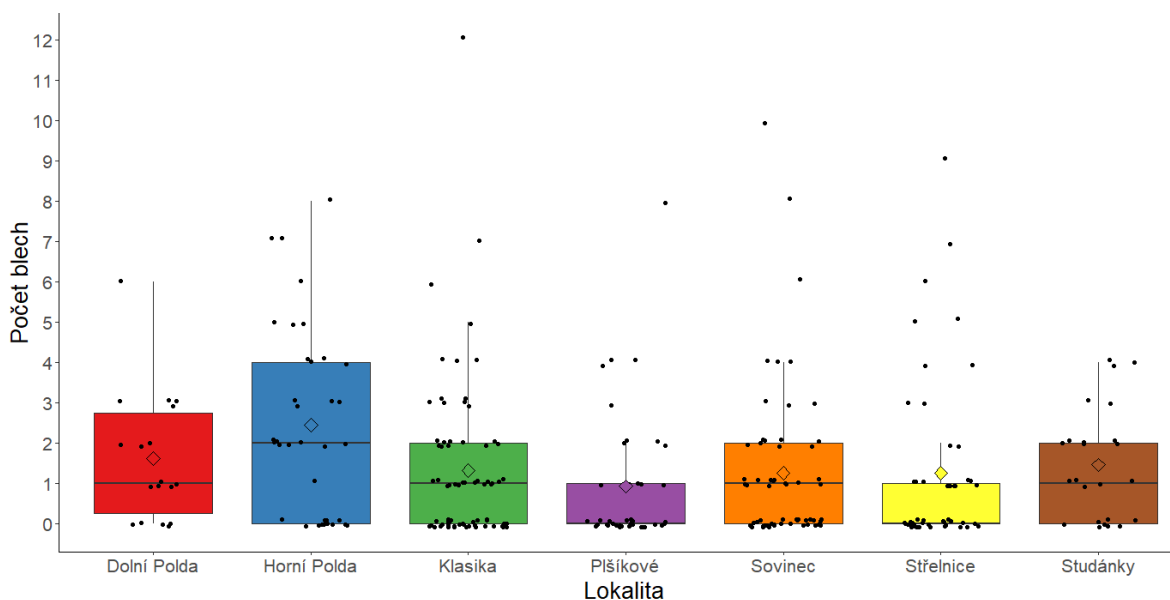
Proměnné pohlavní aktivita a lokalita byly lehce za hranicí statistické průkaznosti.

U pohlavně aktivních plchů ($P = 0,0624$) jsem zaznamenala průměr = 1,58 blech na jedince, med = 1 blecha na jedince a maximální množství 8 blech na jedince. U neaktivních plchů průměr = 1,41 blech na jedince, med = 1 blecha na jedince a maximální množství 12 blech na jedince. Početnost blech u pohlavně aktivních a neaktivních plchů zobrazuje obrázek č. 12.



Obrázek č. 12: Početnost blech na aktivních a neaktivních plších v průběhu celé sezony.

Průměrné počty blech na plcha na jednotlivých lokalitách zobrazuje obrázek č. 13.

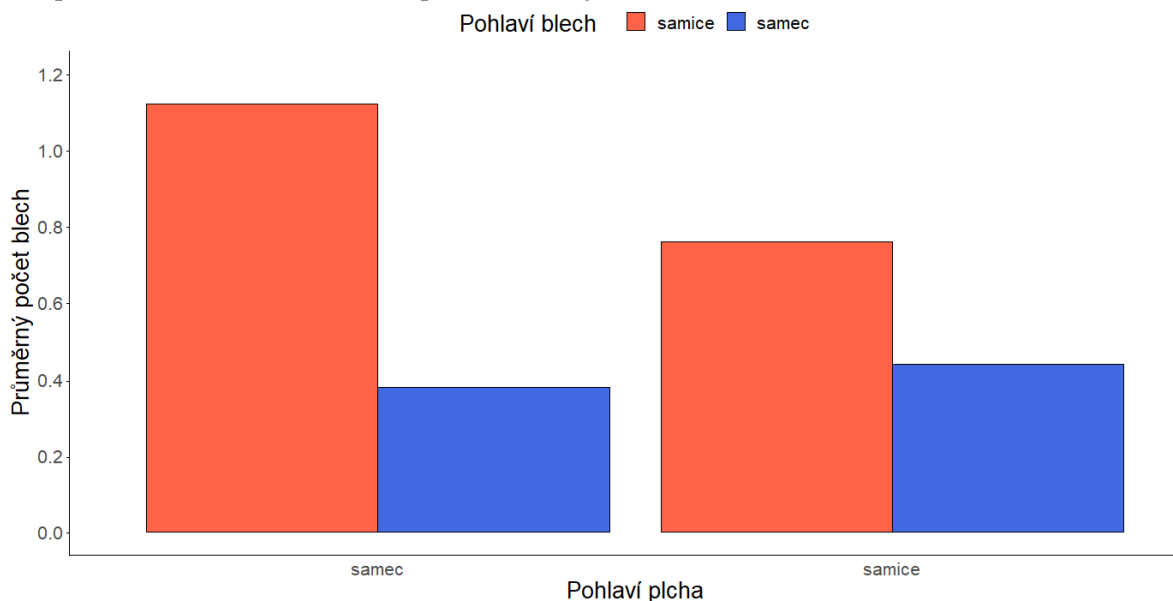


Obrázek č. 13: Početnost blech na plších v průběhu celé sezony na jednotlivých lokalitách.

Proměnné věk, pohlaví plcha a velikost těla plcha nemají na celkovou početnost blech na jedinci významný vliv.

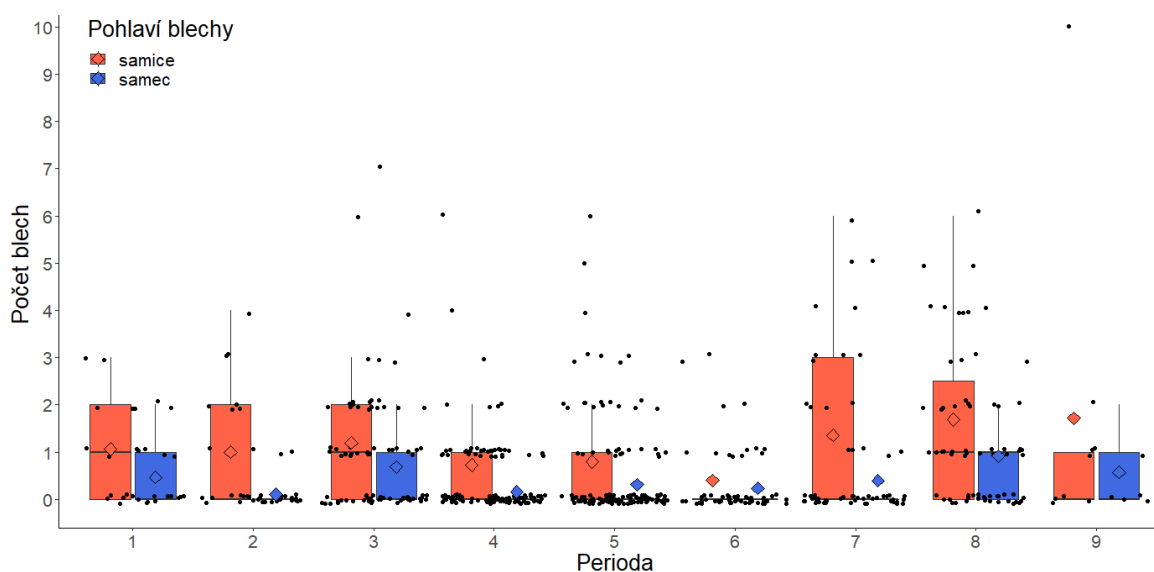
3.2.3 Analýza efektu pohlaví blech u plchů

U 95 samic plcha jsem zaznamenala celkem 114 blech – 75 samic a 42 samců. U 204 samců plcha jsem zaznamenala celkem 306 blech – 228 samic, 78 samců. Vztah mezi pohlavím blech a pohlavím plcha je statisticky signifikantní: $b = -0,53 \pm 0,23$; $z = -2,28$; $P = 0,0228$. Průměrný počet blech dle pohlaví na samcích a samicích plchů zobrazuje obrázek č. 14.



Obrázek č. 14: Průměrný počet blech dle pohlaví na samcích a samicích plchů.

S přihlédnutím k pohlaví blech jsem pak během sezóny zaznamenala ve všech periodách průměrně více samic než samců. Nejvíce samic na jednom jedinci bylo přítomno v 8. a 9. periodě (průměr = 1,69 a 1,71). Nejvyšší průměrný počet samců byl během 3. a 8. periody (průměr = 0,68 a 0,91). Mediány pro samičí blechy dosáhly hodnoty $med = 1$ v 1., 3. a 8. periodě, ve zbývajících byl $med = 0$. Samičí mediány byly nulové ve všech periodách. Početnost blech s ohledem na pohlaví zobrazuje obrázek č. 15.



Obrázek č. 15: Početnost samců a samic blech na plších během jednotlivých period.

3.3 Detekce bartonelové DNA

3.3.1 Stanovení metodiky pro detekci bartonelové DNA u odchycených blech

Celkem jsme jednotlivě homogenizovali 161 blech ze sběrů z roku 2017. V případě každého vzorku jsme část homogenátu zachovali v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a část byla použita pro vytvoření směsných poolů; celkem 161 blech v 54 poolech o 1 – 7 jedincích podle pohlaví a sběru. Z těchto poolů jsme pak izolovali DNA a detekce bartonel jsme prováděli pomocí čtyř nezávislých PCR pro zjištění četnosti pozitivních vzorků a senzitivity jednotlivých párů primerů. Výsledky shrnuje tabulka č. 13.

Tabulka č. 13: Vyhodnocení senzitivity vybraných primerů u zkušebních poolů

Název poolu	Poč. F	Poč. M	Celkem blech	Výsledek PCR <i>Bartonella</i> „ITS_2“	Výsledek PCR <i>Bartonella</i> „ITS_1“	Výsledek PCR <i>Bartonella</i> „GLTA_1“	Výsledek PCR <i>Bartonella</i> „GLTA_2“
OL F	4	0	4	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní
OL M	0	2	2	negativní	negativní	negativní	negativní
1 F	3	0	3	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní
1 M	0	3	3	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní
2 F+M	1	3	4	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní
2	0	3	3	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní
3	2	1	3	pozitivní	negativní	slabě pozitivní	pozitivní
5	1	1	2	pozitivní	slabě pozitivní	slabě pozitivní	pozitivní
6	1	0	1	negativní	negativní	negativní	negativní
7	2	1	3	pozitivní	pozitivní	slabě pozitivní	pozitivní
10+12	3	4	7	pozitivní	pozitivní	slabě pozitivní	pozitivní
13	2	1	3	pozitivní	slabě pozitivní	pozitivní	pozitivní
14	0	2	2	pozitivní	slabě pozitivní	slabě pozitivní	pozitivní
16	3	0	3	pozitivní	slabě pozitivní	pozitivní	pozitivní
17	1	0	1	pozitivní	slabě pozitivní	slabě pozitivní	pozitivní
18	1	0	1	pozitivní	slabě pozitivní	slabě pozitivní	pozitivní
19	1	1	2	pozitivní	slabě pozitivní	pozitivní	pozitivní
20	0	1	1	pozitivní	slabě pozitivní	slabě pozitivní	pozitivní
22	1	3	4	pozitivní	negativní	pozitivní	pozitivní
23	2	1	3	pozitivní	negativní	slabě pozitivní	pozitivní
25	1	1	2	pozitivní	negativní	negativní	negativní
26	3	0	3	pozitivní	slabě pozitivní	pozitivní	pozitivní
27 F1	3	0	3	pozitivní	negativní	pozitivní	pozitivní
27 F2	3	0	3	pozitivní	negativní	pozitivní	pozitivní
28	2	1	3	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní
29	1	1	2	pozitivní	slabě pozitivní	slabě pozitivní	pozitivní
30	2	1	3	pozitivní	slabě pozitivní	pozitivní	pozitivní
31	0	2	2	slabě pozitivní	negativní	negativní	negativní
32 F	5	0	5	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní
32 M	0	5	5	pozitivní	slabě pozitivní	pozitivní	pozitivní

33 F1	6	0	6	pozitivní	negativní	pozitivní	pozitivní
33 F2	6	0	6	pozitivní	negativní	slabě pozitivní	pozitivní
33 F3	5	0	5	pozitivní	slabě pozitivní	pozitivní	slabě pozitivní
33 M1	0	5	5	pozitivní	negativní	pozitivní	slabě pozitivní
33 M2	0	4	4	pozitivní	slabě pozitivní	pozitivní	pozitivní
34 F	4	0	4	pozitivní	pozitivní	slabě pozitivní	slabě pozitivní
34 M	0	6	6	pozitivní	slabě pozitivní	pozitivní	pozitivní
35	3	2	5	pozitivní	slabě pozitivní	pozitivní	pozitivní
37	0	2	2	pozitivní	negativní	negativní	slabě pozitivní
38	2	0	2	pozitivní	negativní	pozitivní	pozitivní
40	1	2	3	pozitivní	negativní	pozitivní	pozitivní
44	1	1	2	pozitivní	negativní	pozitivní	pozitivní
45	1	1	2	pozitivní	negativní	pozitivní	pozitivní
46	0	3	3	pozitivní	negativní	pozitivní	pozitivní
50	1	0	1	slabě pozitivní	negativní	negativní	negativní
54	0	1	1	negativní	negativní	negativní	negativní
55	0	2	2	pozitivní	negativní	pozitivní	pozitivní
56	2	0	2	negativní	negativní	negativní	negativní
57	0	1	1	negativní	negativní	negativní	negativní
58	1	1	2	pozitivní	slabě pozitivní	pozitivní	slabě pozitivní
59	1	0	1	pozitivní	negativní	pozitivní	negativní
60	3	1	4	pozitivní	slabě pozitivní	pozitivní	pozitivní
61	1	2	3	pozitivní	pozitivní	negativní	pozitivní
63	2	1	3	pozitivní	slabě pozitivní	negativní	pozitivní

Poč. F = počet blech – samic; Poč. M = počet blech – samců

Slabá pozitivita vyjadřuje slabou intenzitu bandu na gelové elektroforéze

Z výsledků je patrné, že:

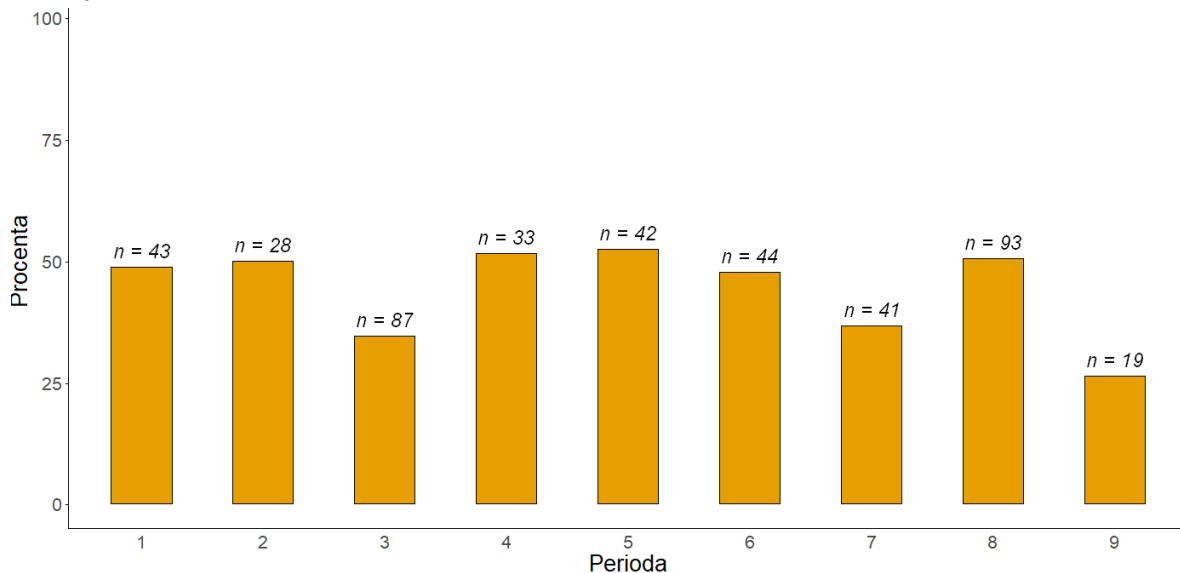
- výsledky detekce pro primery „ITS_2“ byly pozitivní u 47 poolů (87 %), slabě pozitivní u 2 poolů (3,7 %) a negativní u 5 poolů (9,3 %)
- výsledky detekce pro primery „ITS_1“ byly pozitivní u 11 poolů (20,4 %), slabě pozitivní u 19 poolů (35,2 %) a negativní u 24 poolů (44,4 %)
- výsledky detekce pro primery „GLTA_1“ byly pozitivní u 31 poolů (57,4 %) slabě pozitivní u 12 poolů (22,2 %) a negativní u 11 poolů (20,4 %)
- výsledky detekce pro primery „GLTA_2“ byly pozitivní u 40 poolů (74 %), slabě pozitivní u 5 poolů (9,3 %) a negativní u 9 poolů (16,7 %)

Na základě těchto výsledků jsme pro všechny následující detekce bartonel (blechy z roku 2018, plši z let 2016, 2017 a 2018) vybrali PCR s primery pro ITS („ITS_2“), které byly ze zkoušených kombinací nejsenzitivnější.

Celkem jsme použili 98 homogenátů jednotlivých blech (testovaných původně v rámci 31 směsných vzorků) pro individuální testování a podrobnější stanovení prevalence. Tato individuální analýza ukázala, že 40 blech bylo na bartonelu pozitivních (40,8 %), 12 slabě pozitivních (12,2 %) a 46 negativních (46,9 %). Z těchto výsledků bylo vyvozeno, že pro objektivní posouzení míry nakažení blech bartonelou není vhodné pracovat s pooly, ale s jednotlivými blechami, protože z důvodu vysokého počtu bartonela-pozitivních blech by hrozilo riziko, že se nepodaří sekvenovat jednotlivé bartonely, ale budou často přítomny směsné infekce.

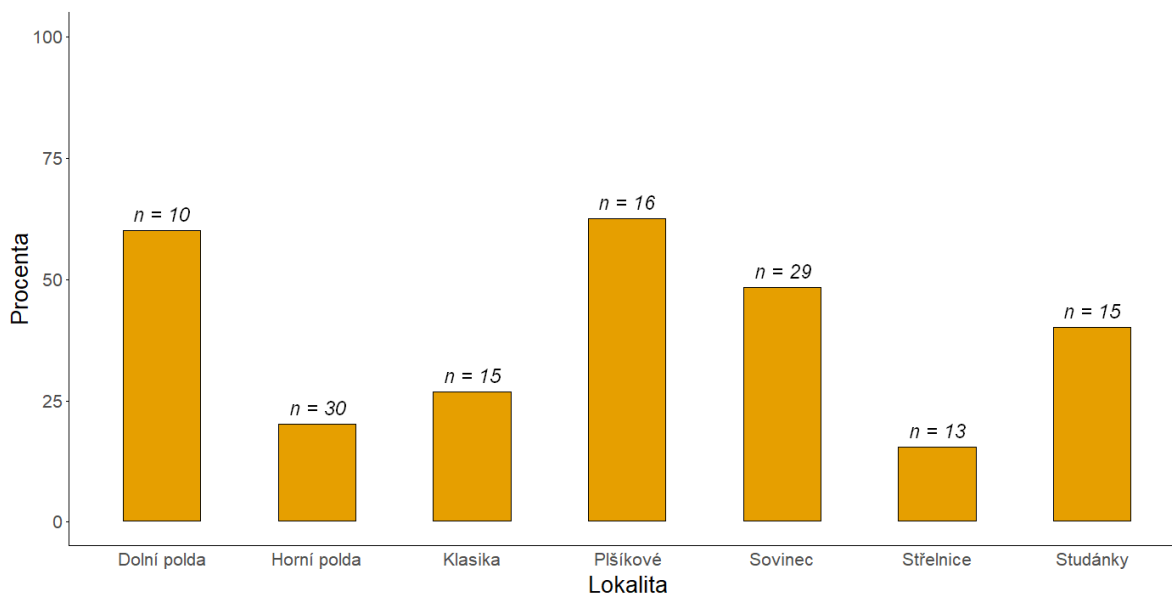
3.3.2 Detekce DNA bartonel u odchycených blech

Za sezónu 2018 jsme vyšetřili celkem 430 blech – 292 samic a 138 samců. Celková prevalence bartonely za všechny periody dosahovala 44,6 %; v průběhu sezóny se prevalence pohybovala v rozmezí od 26,3 % (9. perioda) do 52,4 % (5. perioda). Hodnoty prevalence v průběhu period shrnuje obrázek č. 16.



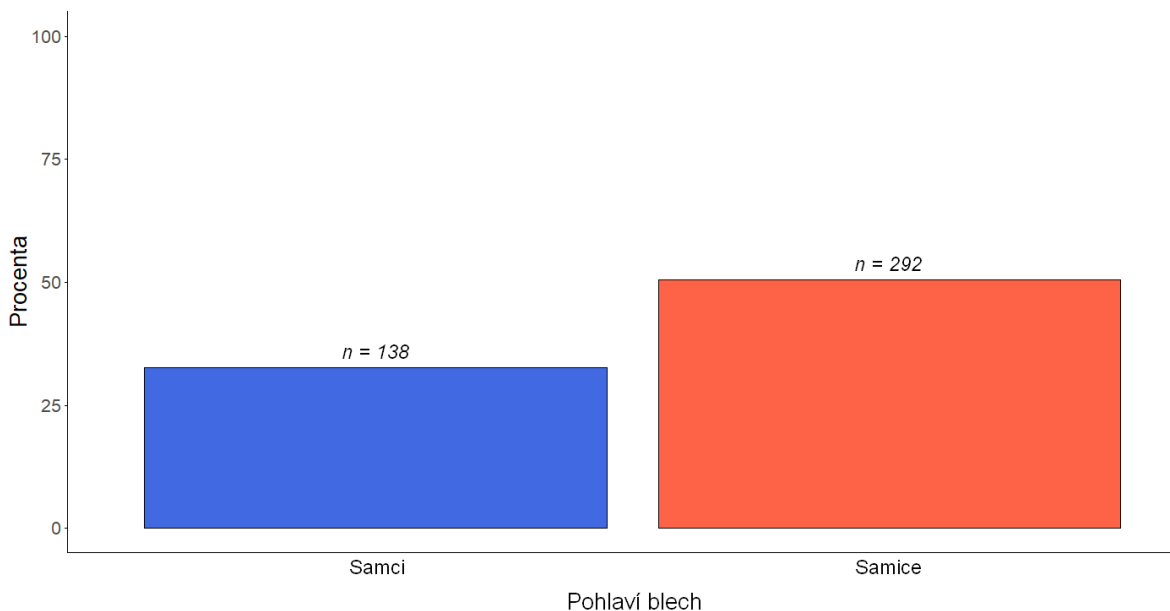
Obrázek č. 16: Sezónní změna prevalence bartonel v blechách v roce 2018. Hodnota *n* nad sloupci udává počet vyšetřených blech.

Při pohledu na prevalenci v rámci jednotlivých odběrových lokalit je nutné připomenout, že všechny lokality jsme odebírali pouze v červnu (1., 2. a část 3. periody). Za červenec, srpen a září se odebíraly lokality „klasika“ a „střelnice“. Prevalence v rámci jednotlivých lokalit je tedy vytvořena jen za měsíc červen. Nejvyšších hodnot (nad 50 %) dosahují lokality „plšíkové“ (62,5 %) a „dolní polda“ (60 %), naopak nejnižších „střelnice“ (15,4 %) a „horní polda“ (20 %). Ostatní hodnoty zobrazuje obrázek č. 17.



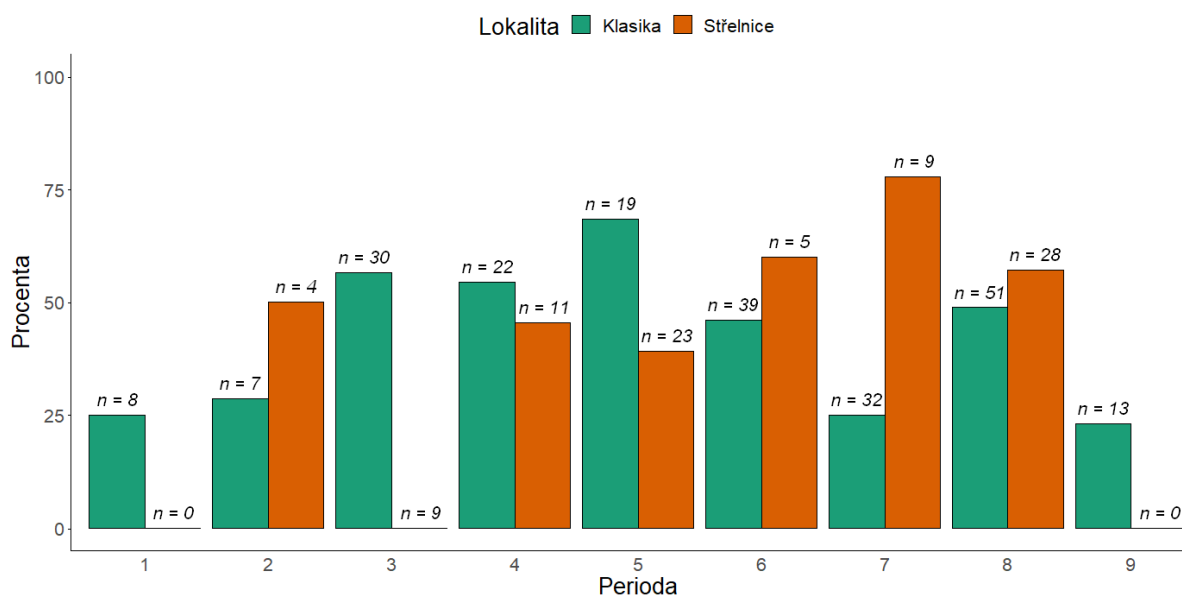
Obrázek č. 17: Prevalence bartonel na jednotlivých lokalitách (data pouze pro měsíc červen). Hodnota n nad sloupci udává počet vyšetřených blech.

Bartonely jsme častěji detekovali u bleších samic (50,3 %) než u samců (32,6 %) a tento rozdíl je statisticky průkazný (zobecněný lineární model s binomickou distribucí $b = -0,74 \pm 0,22$; $z = -3,42$; $P = 0,0006$). Srovnání prevalence bartonely v průběhu celé sezóny u samců a samic blech zobrazuje obrázek č. 18.



Obrázek č. 18: Srovnání výskytu bartonely za celou sezónu u samců a samic blech. Hodnota n nad sloupci udává počet vyšetřených blech.

Pro porovnání dvou ekologicky odlišných lokalit – „klasiky“ a „střelnice“, byl opět zvolen zobecněný lineární model s binomickým rozdělením. Analyzovali jsme vztah bartonely vůči pohlaví blech, periodě, lokalitě a interakci periody s lokalitou. Zjistila jsem statisticky signifikantní vliv pohlaví blechy ($b = -0,56 \pm 0,25$; $z = -2,23$; $p = 0,0256$) a interakce mezi lokalitou a periodou ($b = 0,37 \pm 0,14$; $z = 2,76$; $p = 0,0058$). Je zřejmé, že obě lokality se liší v sezónní prevalenci bartonel, kdy lokalita „klasika“ má dřívější vrchol uprostřed léta, kdežto druhá lokalita má posunutý vrchol výskytu bartonel do konce léta; viz obrázek č. 19.



Graf č. 19: Sezónní dynamika prevalence bartonel v rámci dvou srovnávaných lokalit – „klasika“ a „střelnice“. Hodnota n nad sloupci udává velikost vzorku (počet vyšetřených blech).

3.3.3 Detekce bartonelové DNA u plchů a z nich odebraných blech

Počty vyšetřených vzorků a prevalence během odběrových let shrnuje tabulka č. 14.

Tabulka č. 14: Prevalence bartonely u plchů dle roku odběru

Rok odběru	Počet odebraných vzorků	<i>Bartonella</i> pozitivní	Prevalence [%]
2016	17	1	5,9
2017	61	15	24,6
2018	51	27	52,9
Celkem	129	43	33,3

Za rok 2018 jsme z kontrolovaných zvířat odebírali i blechy, aby bylo možné porovnat, zda bartonely přítomné v plších kolují i v blechách. K 51 vzorkům z plchů jsme odebrali celkem 327 blech. V rámci námi zvoleného protokolu bylo za každého plcha kontrolováno maximálně pět a pět samčích blech (v nižším počtu kontrolovány všechny blechy); celkově jsme tedy analyzovali 261 blech, u kterých bylo 119 blech na bartonelu pozitivních (prevalence 45,6 %).

Následně jsme srovnávali, zda je u krevně pozitivního plcha alespoň jedna z odebraných (a kontrolovaných) blech pozitivní. Z 51 pozorování jsme došli ke shodě ve 20 případech (39,2 %).

3.3.4 Vyhodnocení detekovaných bartonelových sekvencí

Pro zjištění, jaké druhy bartonel jsou přítomny v námi kontrolovaných vzorcích krví a blech, a zda jsou tyto druhy v krvi plchů a jejich blech totožné, jsme připravili celkem 53 vzorků (31 pocházejících z blech a 22 z plchů), které jsme následně odeslali do sekvenační laboratoře. Dle výsledků sekvencí byly jak u plchů, tak i u blech detekovány dva druhy bartonel; *Bartonella grahamii*-like a *Bartonella* sp.

4 DISKUZE

4.1 Druhové spektrum blech u plcha velkého

U plcha velkého jsem z celkového množství 1123 jedinců blech zaznamenala tři druhy – dominantně *Ceratophyllus (Monopsyllus) sciurorum* a jen okrajově *Ceratophyllus gallinae* a *Hystrichopsylla talpae*. Druhové složení blech na plchu velkém tedy vykazuje dle Rosického (1957) zástupce typicky hnízdni. Pro *C. sciurorum* je plch velký jedním z hlavních hostitelů. Ekologicky náleží mezi blechy typické pro veverky. V hnízdech ptáků je lze detekovat často, a to právě díky savcím hostitelům, kteří se do těchto hnízd dostávají (Cyprich *et* Krumpál, 2007; Cyprich, Krumpál *et* Špitalská, 2002; Rosický, 1957; Trilar, 1997). *C. gallinae* je druhem typickým pro zpěvné ptáky, a protože plši často obývají původně ptačí hnízda, není výskyt ptačích blech u plchů nijak překvapující. Detekován byl během prvních dvou period (jarní měsíce), dále už se nevyskytoval. Má stejné ekologické požadavky jako *C. sciurorum* avšak nižší ekologický potenciál z důvodu specializace na ptáky hnízdící v dutinách/budkách (Cyprich, Krumpál *et* Lukáš, 1992, Lipatova *et al.*, 2015a). Poslední identifikovaný druh – *H. talpae* je typický pro savce, jakými jsou například krtci, rejsci, norníci či myšice. U plchů se objevuje spíše jen vzácně, zpravidla na konci aktivní sezóny, kdy s nimi přichází plši do kontaktu během přípravy na hibernaci (Lipatova *et al.*, 2015a; Trilar 1997). To odpovídá našemu nálezu v polovině září. K nálezům více druhů blech na plchovi velkém tedy dochází z důvodu kontaktu mezi plchem a ptáky či jinými malými savci (Cyprich, Krumpál *et* Lukáš, 1992).

Znalost siphonapterofauny u plchů není příliš rozsáhlá; v Evropě (včetně Ruska) se touto problematikou zabývali např. Cyprich, Krumpál *et* Lukáš (1992), kteří u plchovitých zaznamenali 16 druhů blech na území Slovenska; dále Kirillova, Kirillov *et* Ivashkina (2006) se 7 druhy na území Ruska; Büchner, Stubbe *et* Striese (2003) 5 druhů na území Německa, či Trilar (1997) tři druhy v oblasti Slovinska. Jednalo se o tyto druhy: *Ceratophyllus (Monopsyllus) sciurorum*, *Ceratophyllus enefdeae*, *Ceratophyllus fringillae*, *Ceratophyllus garei*, *Ceratophyllus hirundinis*, *Ceratophyllus pullatus*, *Ceratophyllus rusticus*, *Ceratophyllus tribulis*, *Ctenophthalmus agyrtes*, *Ctenophthalmus assimilis assimilis*, *Ctenophthalmus solutus solutus*, *Ctenophthalmus uncinatus*, *Dasyopsyllus gallinulae*, *Hystrichopsylla orientalis*, *Megabothris turbidus* a *Nosopsyllus fasciatus*. Ve výsledných číslech nejsou zahrnuty ty druhy blech, u kterých autoři předpokládají pouze náhodné zavlečení do hnízda.

Námi pozorované druhy blech ve velmi podobném procentuálním zastoupení pozorovali při analýze hnízd plchovitých v Litvě i Lipatova *et al.* (2015a), kteří během dvou sezón odchytili celkem 1112 blech náležících do 6 druhů – *Ceratophyllus (Monopsyllus) sciurorum* (ve 95,2 %), *Ceratophyllus gallinae* (ve 2,5 %), *Ctenocephalides agyrtes* (1,7 %), *Hystrichopsylla talpae* (0,3 %),

Ctenocephalides assimilis (0,2 %) a *Megabothris turbidus* (0,1 %). Bohatější druhové složení může být důsledkem odlišné metody sběru vzorků; zatímco v našem případě se blechy odebíraly přímo ze srsti kontrolovaných plchů, Lipatova *et al.* (2015a) odebírali celá hnízda, která následně detailně analyzovali. Rolí může hrát i větší druhová pestrost testovaných hostitelů – kontrolován byl plch velký, plch lesní (*Dryomys nitedula*) a plšík lískový. Z pohledu celkového druhového složení a jeho zastoupení lze říci, že všechny jiné druhy než *C. sciurorum* byly u plchů pouze náhodně zavlečeny. Cyprich, Krumpál *et* Lukáš (1992) a Trilar (1997) ve svých pracích zmiňují, že druhy nacházející se v hnízdech plchů jsou spíše oportunistické a parazitují i na jiných drobných savcích a ptácích. Smíšená siphonapterofauna je pak pravděpodobně zapříčiněna výměnou těchto ektoparazitů mezi hostiteli.

Na základě všech těchto zjištění lze také tvrdit, že nález pouhých tří druhů u plcha velkého je v našem případě překvapující a dalo by se předpokládat nalezení širšího druhového spektra tohoto ektoparazita. Je také možné soudit, že by siphonapterofauna byla bohatější v případě, že by se vzorky kontinuálně sbíraly nejen ze srsti plchů, ale také z jejich hnízd.

4.2 Sezónní dynamika *C. sciurorum* u plcha velkého

Při studiu sezónní dynamiky blechy *C. sciurorum* v hnízdech plcha velkého jsem nejvyšší míru infestace pozorovala ve 3., 8. a 9. periodě, což odpovídá dvěma maximům v průběhu celé sezóny; první na přelomu června a července, druhé na přelomu září a října. Nejnižší infestace byla pak patrná ve 2. a 6. periodě, což odpovídá konci června a začátku srpna. Jsou tedy patrná dvě maxima přibližně stejných hodnot, a to na začátku léta a na začátku podzimu. Dvě maxima pozorovali i Cyprich, Špitalská *et* Krumpál (2001), kteří sledovali sezónní dynamiku *C. sciurorum* v hnízdech více savčích druhů – plchovitých, myšovitých (Muridae), hrabošovitých (Arvicolinae) a psovitých (Canidae); plchovití však tvořili až 92 % jejich vzorků. V jejich případě naměřili nejvyšší infestaci blechami na jaře a na podzim. Podotýkají, že při zaměření pouze na čeled' plchovitých nejsou mezi vrcholy na jaře a na podzim výrazné rozdíly, což platí i pro naše výsledky. První vrchol v jarních měsících přisuzují Cyprich, Krumpál *et* Lukáš (1992) zvýšené infestaci z důvodu probouzení zvířat po zimním spánku, aktivním hledání potravy plcha po hibernaci a hledání vhodného místa k vybudování hnízda, při kterém dochází v rámci možné návštěvy již osídlených hnízd ke zvýšení možnosti kontaminace více blechami. Druhé maximum pak přisuzuje Cyprich, Špitalská *et* Krumpál (2001) životnímu cyklu *C. sciurorum*; aby bylo v méně příznivých podmínkách (hlavně s poklesem teplot na podzim) zajištěno přežití blech, snižuje se sice abundance, ale značně narůstá frekvence výskytu, které blechy dosahují pomocí aktivní migrace, vyhledávání jiných hostitelů s odlišným typem hnízda. Cyprich, Krumpál *et* Lukáš (1992) také podotýkají, že maximální hodnoty výskytu blech přímo u plcha velkého na podzim souvisí s vertikální migrací, tedy s hledáním a přípravou hnízd v zemi/stromových dutinách pro hibernaci. Konkrétní důvod pro vyšší počet blech v tomto období

však už nevysvětlují. Pro srovnání pak sezónní dynamiku *C. sciurorum* pozoroval i Trilar (1997) na území Slovinska, který v hnízdech plcha velkého pozoroval u dospělců pouze jeden vrchol na přelomu května a června, odkud následoval prudký pokles napříč létem, který se znatelně zmírnil v září, odkud už jen hodnoty pozvolně klesaly. Rozdíly pozorované mezi našimi hodnotami a výsledky autorů mohou být pravděpodobně zapříčiněno rozdílnou metodikou (odběry z živého jedince/odběry z odebraných hnízd). Roli může samozřejmě hrát i naše menší velikost vzorku. Pro srovnání s jiným hostitelem pozorovali Romeo *et al.* (2014) u veverek popelavých (*Sciurus carolinensis*) *C. sciurorum* opět se dvěma vrcholy na jaře a na podzim, avšak v případě sledovaných veverek bylo jarní maximum vyšší než podzimní. Autoři vyšší jarní vrchol považují za následek období po prvním páření, kdy se zvyšuje populační hustota a kontakt mezi jedinci. Lze tedy tvrdit, že sezónní dynamika *C. sciurorum* vykazuje zpravidla dvě maxima výskytu; jeden okolo jara/léta a druhý na podzim. Hodnoty těchto vrcholů se pak různí v závislosti na ekologii hostitele, na kterém je tato blecha pozorována.

4.2.1 Proměnné ovlivňující přítomnost a početnost *C. sciurorum* u plchů

Efekt periody představuje rozdíly v přítomnosti (i množství) či absenci blech na plších ovlivněnou datem, ve kterém byly prováděny kontroly. Při nich se na jednotlivých lokalitách v průběhu sezóny mění charakter vegetace, klima (hlavně teplota a vlhkost), ale i pohlavní aktivita plchů a s tím související mobilita v rámci hnízd. Všechny tyto faktory a jejich fluktuace mohou ovlivnit, zda jedinec bude infestován, případně i do jaké míry (Ngeleja, Luboobi *et* Nkansah-Gyekye, 2017; Young *et al.*, 2015). S vlivem sezóny na výskyt a počet námi sledované blechy *C. sciurorum* se lze setkat u řady autorů; například Romeo *et al.* (2013) prokázali statisticky významný vliv data odběru na přítomnost *C. sciurorum* u veverek obecných (*Sciurus vulgaris*). Mazzamuto *et al.* (2016) potvrdili signifikantní vliv sezóny na prevalenci *C. sciurorum* v případě veverek Pallasových (*Callosciurus erythraeus*).

Efekt pohlavní aktivity plcha značí období, během kterého se samci rozmnožují a jsou aktivnější v rámci hnízd. Naopak u samic jde o období gravidity a laktace, kdy zpravidla zůstávají v jednom hnízdě, které připravují pro narození mláďat (Weber *et al.*, 2018). Způsob, jakým pohlavní aktivita ovlivňuje početnost a přítomnost blech se u autorů různí. Krasnov *et al.* (2005) pozorovali u polygynních pouštních hlodavců signifikantně vyšší infestaci u pohlavně aktivních samců. Tento jev vysvětluje právě zvýšenou mobilitou samců v rámci hnízd za účelem páření se samicemi, a tedy i větší šanci k získání blech. Mooring, Blumstein *et* Stoner (2004) uvádí možnou souvislost se zvýšenou hladinou androgenů (především testosteronu) při které pohlavně aktivní samci nedbají tolik o svou srst a následkem toho vykazují vyšší počty ektoparazitů.

Efekt lokality představuje vliv oblastí, ve kterých jsou rozmístěny námi kontrolované budky. Přítomnost a početnost blech u plchů napříč lokalitami mohou ovlivňovat faktory související

především s charakterem mikroklimatu, převažující vegetace (Ngeleja, Luboobi *et* Nkansah-Gyekye, 2017; Young *et al.*, 2015) a pochopitelně i antropogenními zásahy, které se silně podílí na změnách ve vztazích hostitelů a parazitů. Jedná se především o kácení, remodelaci krajiny, míra polutantů atd., kdy v zásadě platí, že čím větší disturbance, tím méně ektoparazitů. V souvislosti s tím hraje roli samozřejmě i vzdálenost sledované lokality od lidských sídel (Altman *et* Byers, 2014; Budria *et* Candolin, 2014; Lüdtko *et al.*, 2013).

Rozdíly v přítomnosti a početnosti ektoparazitů dle pohlaví hostitele jsou hojně pozorovány u většiny vyšších obratlovců, a to především ve vztahu k pohlavnímu dimorfismu (související hlavně s velikostí těla), dále pak například z důvodu imunokompetence, hladiny hormonů a pak pochopitelně z důvodu behaviorálních a ekologických rozdílů (např. větší pohyblivost samců). Obvykle bývá pozorováno více parazitů u samců než u samic (Ferrari *et al.*, 2010; Romeo *et al.*, 2013; Wilson *et al.*, 2002). Vyšší infestaci u samců pozorovali například Mooring, Blumstein *et* Stoner (2004), kteří tento jev zkoumali na klíšťatech kopytníků. Přisuzují jej menší péči o srst u sexuálně aktivních samců oproti samicím, podobně jako v případě výše zmíněné pohlavní aktivity, která je s efektem pohlaví úzce spjata.

Věk hostitele je jedním z klíčových faktorů ve vztahu hostitel-parazit, protože může ovlivňovat mj. právě pravděpodobnost a míru infestace (Hawlona, Abramsky *et* Krasnov, 2006). Hawlona, Abramsky *et* Krasnov (2005) uvádí, že mladší jedinci (především však juvenilní) mají větší povrch k objemu těla, a proto i větší energetické nároky pro údržbu těla na jednotku tělesné hmotnosti. Zároveň vyžadují více energie pro tělesný růst, prospívání a upevnění imunitní odpovědi. I na základě terénních výzkumů (tedy pod vlivem faktorů, jako je parazitismus, riziko predace a omezené potravní zdroje) autoři předpokládají, že starší jedinci jsou lepším výživovým zdrojem než mladší jedinci, a proto jsou blechami preferováni. Na výzkumu blech u pískomilů Andersonových se však efekt věku jako statisticky signifikantní neprokázal.

Efekt velikosti těla plcha je pak vyjádřen jako rezidua z lineární regrese mezi délkou tibie a hmotností. U tohoto efektu je předpokladem vyšší abundance parazitů u tělesně větších hostitelů. Tento jev souvisí s tím, že větší tělo je schopno agregovat více parazitů, a to především díky celkově větší tělesné hmotnosti (a tím i potenciálně většího množství potravy pro parazita) i ploše. Větší těla zároveň disponují zvýšenou výkonností metabolismu, kterou musí doplňovat větším objemem potravy, pro jejíž zisk musí vykazovat větší mobilitu, čímž dochází k větší expozici parazitům (Bordes *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2015). Mazzamuto *et al.* (2016), sledující výskyt *C. sciurorum* u veverek Pallasových, které reprezentují podobný model jako plch velký, však nepozorovala statisticky signifikantní vliv velikosti těla na prezenci ani výskyt blech.

4.2.2 Efekt pohlaví blech u plchů

V průběhu odchytné sezóny jsem pozorovala evidentní nadpočetnost samičích blech oproti samcům blech, a to u obou pohlaví plchů; u samců plchů jsme našli v průměru 1,12 samičích blech na jedince ku 0,38 samčích blech na jedince. U samic pak průměrně 0,76 samičích blech na jedince a 0,44 samčích blech na jedince. Vztah mezi pohlavím blech a pohlavím plcha byl statisticky průkazný. Nadpočet samic blech *C. sciurorum* pozorovala ve svých výzkumech řada autorů, a to jak u plchovitých, tak napříč širším spektrem hlodavců či drobných savců. Důvody pro tento fenomén u námi sledovaného druhu však žádný z nich neuvádí. Gorrell *et* Schulte-Hostedde (2008), kteří rovněž pozorovali nadpočet samičích blech (druhy *Opisodasys pseudoarctomys* a *Orchopeas caedens*) u populace veverek obecných, uvádí, že samice blech žijí obecně déle než samci, což typicky vyúsťuje v jejich převahu ve sledovaných populacích. Krasnov *et al.* (2008) uvádí, že samice blech jsou oproti samcům obecně odolnější vůči extrémním podmínkám prostředí, čímž se snižuje jejich mortalita a vzniká fenomén nadpočtu samičích blech.

4.3 Detekce bartonelové DNA

Epidemiologické studie z celého světa potvrzují, že hlodavci a na nich parazitující blechy vykazují vysokou prevalenci a diverzitu bartonel. Interakce mezi bartonelami, hlodavci a blechami vykazují vysoký stupeň adaptace mezi těmito organismy. Vertikální i horizontální přenos bartonel mezi blechami a z blech na hlodavce byl pozorován v mnohých studiích, které tímto poukazují na fakt, že jsou blechy klíčovým článkem v přenosu bartonel na hlodavce (Gutiérrez *et al.*, 2015; Lipatova *et al.*, 2015b; Mardosaitė-Busaitienė *et al.*, 2019).

4.3.1 Detekce bartonelové DNA u odchycených blech

Bartonely jsme u odchycených blech detekovali pomocí páru primerů zacíleného na vnitřní prepisovaný mezerník mezi geny kódující 16S a 23S rRNA (Maggi *et* Breitschwerdt, 2005), u kterého se nám potvrdila nejvyšší senzitivita pro detekci bartonel. Při zjišťování prevalence bartonely u blechy *C. sciurorum* odchycených ze srsti plchů jsme v průběhu sezóny naměřili na 430 blechách průměrnou prevalenci 44,7 %, přičemž hodnoty v průběhu sezóny kolísaly v rozmezí 26,3 % v 9. periodě (přelom září a října) až 52,4 % v 5. periodě (konec července).

Zatímco prevalence bartonel u různých druhů blech i hostitelů je běžně pozorována, dynamika prevalence bartonel v blechách v průběhu roku není příliš zdokumentována. Lipatova *et al.* (2020) sledovali jen celkovou prevalenci bartonel v bleše *C. sciurorum* za užití stejného páru primerů u veverek obecných. V jejich případě vyšla průměrná prevalence bartonel v blechách 55,5 % (20/36 vzorků pozitivních). Rozsáhleji se této problematice věnovali Tsai *et al.* (2011), kteří pomocí páru primerů zacílených na gen pro syntézu citrátu (*GltA*) detekovali bartonely u blechy kočičí

(*C. felis*); v jejich případě dosahovala prevalence 18,5 % (35/189 vzorků) u *C. felis* sesbíraných z koček a 1,3 % (3/231 vzorků) z psů; celkově šlo tedy o 38/420 pozitivních blech s prevalencí 9,1 %, kterou je však nutné posuzovat obezřetně (díky nízké prevalenci bartonely u *C. felis* u psů). Stejní autoři se zároveň zabývali prevalencí bartonel u blechy *C. felis* v průběhu jednoho kalendářního roku; během ledna a února byla prevalence zanedbatelná (< 5 %), v jarních měsících (březen, duben) se navýšila na hodnotu cca 20 %, nejvyšších hodnot dosahovala v červnu (> 30 %), odkud prudce poklesla asi na 10 % v červenci. Srpen, září a říjen se vyznačoval 5 – 10 %, načež následoval ostrý nárůst k 20 % v listopadu a k 30 % v prosinci. Autoři udávají, že průměrná hodnota prevalence bartonel detekovaná u blech parazitujících u koček se pohybuje v rozmezí 20 – 30 %. Můžeme tedy uvažovat, že prevalence bartonel v blechách se různí podle sledovaných druhů parazit-hostitel, podle vzájemné koadaptace či podle prumerů použitých pro jejich detekci. Důvod, proč dochází k fluktuaci hodnot prevalence bartonel, nebyl v odborné literatuře dosud vysvětlen.

Prevalenci bartonely v blechách jsme sledovali v rámci odběrových lokalit pouze za měsíc červen, kdy jsme nejvyšších hodnot prevalence (nad 50 %) zaznamenali na lokalitách „plšíkové“ a „horní polda“. Nejnižší hodnoty (pod 20 %) vykazovaly blechy na lokalitách „střelnice“ a „horní polda“.

Bartonely byly častěji detekovány u bleších samic (50 %) než u samců (33 %). Důvodem pro tento jev může být fakt, že samice přijímají větší množství krve za účelem zvýšeného energetického výdeje pro zrání a kladení vajec (Kiefer *et al.*, 2016; Krasnov *et al.*, 2008); s vyšší konzumací krve se může zvyšovat pravděpodobnost nákazy.

4.3.1.1 Porovnání prevalence u bartonel u dvou ekologicky odlišných lokalit

Za měsíce červen, červenec, srpen a září se následně porovnávaly dvě ekologicky rozdílné lokality – „klasika“ a „střelnice“. Obě lokality se prokazatelně liší v sezónní prevalenci bartonel; zatímco lokalita „klasika“ má nejvyšší prevalenci uprostřed léta (5. perioda), lokalita „střelnice“ má vrchol posunutý na konec léta (7. perioda). Můžeme uvažovat, že rozdílné hodnoty prevalence v průběhu sezóny jsou pravděpodobně ovlivněny rozdílnými ekologickými charakteristikami porovnávaných lokalit.

4.3.2 Detekce bartonelové DNA z plchů a k nim odebraných blech

Prevalence bartonel v krvích plchů se napříč roky měnila; v roce 2016 dosahovala 5,9 % (pozitivní 1/17 vzorků), v roce 2017 24,6 % (pozitivní 15/61 vzorků) a v roce 2018 52,9 % (pozitivní 27/51 vzorků).. Celková prevalence během let 2016 – 2018 dosahovala 33,3 % (43/129).

Mikrobiální prevalence v obratlovcích se může různit na základě změn v rezistenci proti infekci, spojitosti s jinými mikrobiálními druhy a změnami v aktivitě vektorů (Telfer *et al.*, 2007). Zároveň bylo pozorováno, že prevalence bartonel se může podstatně lišit v průběhu jednoho roku i napříč více lety (Bai *et al.*, 2008), jak je patrné i v našem případě. Důvod této změny je však nejasný.

Z celosvětového hlediska je křivka prevalence u hlodavců obecně vyšší od pozdního léta cca do raného podzimu. Tato zvýšená prevalence v teplejším období koreluje s rozením mláďat hlodavců (Bai *et al.*, 2008; Jardine *et al.*, 2006; Kosoy *et al.*, 2004a), Letní období je rovněž charakteristické zvýšenou aktivitou hlodavců (především za účelem rozmnožování) a nejpočetnějším výskytem blech (Krasnov *et al.*, 2002).

Průměrné prevalence bartonelových infekcí se dle autorů značně liší; jedny z nejvyšších hodnot byly však prokázány právě u hlodavců a jejich blech. Bai *et al.* (2007) například sledovali prevalenci u široké škály hlodavců – převážně u křečkovitých (Cricetidae). Z celkových 680 jedinců bylo bartonela-pozitivních 356 (celková prevalence 52,4 %); hodnoty však podle druhu hlodavce kolísaly mezi 20 – 90 %. Tato zjištění přispěla k názoru, že se mezi bakterií a jejím rezervoárem vytvořila vzájemná koadaptace. I přesto se ale mezi hlodavci mohou objevovat druhy, které vykazovaly nižší susceptibilitu či kompletní rezistenci vůči infekci (Bai *et al.*, 2007; 2011; Gutiérrez *et al.*, 2015). Důvodem pro velmi nízkou prevalenci v roce 2016 (pozitivní 1 ze 17 odebraných plchů) je s největší pravděpodobností malá velikost vzorku či možné poškození DNA.

Za sezónu 2018 bylo k 51 krevním vzorkům z plchů odebráno i 261 blech, u kterých dosahovala prevalence 46 %. K situaci, kdy byla u bartonela-pozitivního plcha alespoň jedna pozitivní blecha, došlo v 20 případech (39 %). Tento jev lze zdůvodnit mobilitou blech, které mohou za život vystřídat více plchů, čímž se zvyšuje pravděpodobnost nákazy bartonelami.

4.3.3 Vyhodnocení detekovaných bartonelových sekvencí

Za účelem zjištění, zda bartonely přítomné v krvích plchů kolují prokazatelně i v odchylených ektoparazitech jsme z námi vybraných vzorků blech a krví plchů připravili celkem 53 vzorků pro sekvenaci. Detekovány byly dva odlišné druhy bartonel; na základě porovnání vnitřního přepisovaného mezerníku mezi geny kódujícími 16S a 23S rRNA vykazoval první druh dle algoritmu BLAST ~90 % podobnost s druhem *B. grahamii* (s překryvem sekvencí 80 – 97 %). La Scola *et al.* (2003) postulovali, že bartonely, které jsou při porovnání nukleotidových sekvencí úseků genů *proglA* a *rpoB* identické z více než ~96 %, by měly být považovány za jeden druh. U oblasti vnitřního přepisovaného mezerníku bartonel je však takto vysoká identita výjimečná; ITS je velmi variabilním regionem i v rámci jednoho druhu (Houpikian *et Raoult*, 2001; La Scola *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006). Na základě porovnání pomocí algoritmu BLAST lze proto pouze tvrdit, že sekvence ITS námi detekovaného druhu bartonely jsou velmi podobné publikovaným sekvencím *B. grahamii* – označovat jej tedy lze jako *Bartonella grahamii*-like – nebo se může jednat o blízcě příbuzný sesterský druh. Druhý detekovaný druh v této práci vykazoval při vyhodnocení BLAST největší podobnost (~92 %) s *B. washoensis*, avšak překryv sekvencí byl velmi nízký (~50 %), a proto jej můžeme označit pouze jako *Bartonella* sp. Evidentně se jedná o nový, dosud nepopsaný druh. Celkově byl druh *B. grahamii*-like detekován ve 20 případech (14 blech, 6 plchů) a *Bartonella* sp.

ve 33 případech (17 blech, 16 plchů). *Bartonella grahamii* je u hlodavců zjišťována velmi často; jde o druh, který je na tuto skupinu hostitelů velmi dobře adaptovaný (Bown, Bennet *et* Begon, 2004; Favacho *et al.*, 2015; Gutiérrez *et al.*, 2015; Mardosaitė-Busaitienė *et al.*, 2019).

K detailnějšímu fylogenetickému zařazení by bylo nutné provést důkladnější sekvenaci, případně využít jiný pár primerů zacílený na konkrétní gen, například gen pro syntézu citrátu (Birtles *et* Raoult, 1996). Námi zvolené primery zacílené na vnitřní přepisovaný mezerník mezi geny kódujícími 16S a 23S rRNA však vykazovaly při prvotním testování ze všech primerů nejvyšší citlivost, a to pravděpodobně díky tomu, že byly navrženy tak, aby byla s jejich použitím co největší šance zachytit širokou škálu druhů/genotypů bartonel, i přes vysokou variabilitu v sekvencích tohoto regionu (Maggi *et al.*, 2005). Zároveň nám však tyto primery znemožnily dostatečně přesnou fylogenetickou analýzu detekovaných druhů (viz výše). Je však zřejmé, že oba námi detekované druhy bartonel kolují v plších i na nich parazitujících blechách a plch velký je tedy prokazatelně hostitelským druhem těchto bartonel.

5 DIDAKTICKÁ ANALÝZA ODBORNÉHO TÉMATU

Z důvodu značné komplexnosti tématu mé diplomové práce a poměrně úzkého zaměření je její zpracování z pohledu vzdělávání, a tedy i didaktické analýzy, poměrně složité. Komplexně na ni lze pohlížet jako na učivo související s parazitologií. Parazitologie se zaměřením na parazitující prvky, helminty, hmyz a pavoukovce (tedy v užším slova smyslu) se jako celek v rámci základního ani středního vzdělávání nevyučuje; je roztroušena napříč učivem celého přírodopisu (respektive biologie), hlavně v souvislosti s probíráním vektorů nebo hostitelů jednotlivých parazitů a pochopitelně onemocnění, která jsou různými parazity způsobována.

Dle Rámcového vzdělávacího programu pro základní vzdělávání spadá téma parazitologie (v užším slova smyslu) na pomezí několika vzdělávacích oblastí; osobně bych jej zařadila do vzdělávací oblasti Člověk a příroda, vzdělávacího oboru Přírodopis a okruhu Obecná biologie a genetika, Biologie živočichů či Biologie živočichů (RVP ZV, 2017). Dle Rámcového vzdělávacího programu pro gymnázia bych se pak přikláběla ke vzdělávací oblasti Člověk a příroda, vzdělávacímu oboru Biologie a okruhu Biologie virů, Biologie bakterií, Biologie protist, Biologie živočichů a biologie člověka (RVP G, 2007). Je nutné podotknout, že dle obou RVP se celá tematika částečně dotýká – ať už přímo nebo nepřímo – většiny vzdělávacích okruhů – její striktní zařazení je tedy značně obtížné.

Na základě studia učebnic opatřených schvalovací doložkou MŠMT a Školních vzdělávacích programů dvou největších gymnázií v Olomouci – Slovanského gymnázia v Olomouci (ŠVP, 2009a; 2009b) a gymnázia Olomouc – Hejčín (ŠVP, 2009c) a jedné základní školy – ZŠ Zeyerova v Olomouci (ŠVP, 2018) je patrné, že se téma související s parazitologií učí nejobsáhleji v 6. ročníku základního vzdělávání (prima) a 1. ročníku středního vzdělávání (kvinta). Větší pozornosti se parazitologii může dostávat v případě středních škol například v rámci volitelných předmaturitních seminářů.

5.1 Opakovací pracovní list

Pro účely této práce jsem vytvořila pracovní list (včetně jeho řešené verze; viz příloha I a II), sloužící ke komplexnějšímu zopakování parazitů významných pro člověka. Pracovní list je zkonstruován pro žáky 1. ročníku víceletého gymnázia (prima) podle učiva uváděného v učebnici Přírodopis 6 pro ZŠ a víceletá gymnázia (Pelikánová *et al.*, 2014); lze jej však velmi snadno upravit i pro žáky středních škol, a to buď zpřísněním kritérií pro vypracování (např. odebrání možnosti používání učebnic, knih či zápisů v sešitech) nebo mírnou modifikací otázek. Jeho úpravou lze vytvořit i test ověřující znalosti žáků v dané problematice.

Pracovní list se skládá ze čtyř cvičení zaměřených na různé myšlenkové operace. Prioritně by žáci měli být schopni plnit jednotlivá cvičení bez pomoci jakékoliv studijní literatury. Pokud by však úkoly byly příliš náročné, je možné nahlédnout do učebnice, sešitu či jedné z doporučených knihy (viz níže). V prvním cvičení žáci dle obrázků určují nejvýznamnější zástupce parazitů (uvádí se rodové i druhové jméno). Ve druhém cvičení tvoří žáci správné trojice přenašeč – patogen – onemocnění. Třetí cvičení je uděláno formou jednoduché křížovky, jejíž tajenka dá žákům jeden z parazitologických pojmů, které mají následně stručně vysvětlit. Čtvrté cvičení je kombinací pěti různých otázek, na které žáci jednoduše odpovídají. K pracovnímu listu jsou přiloženy i zdroje informací – literatury a obrázků, u kterých by měl učitel po skončení kontroly pracovního listu zdůraznit jejich důležitost z hlediska přejímání informací použitých v různých pracích. Domnívám se totiž, že žáci by s citacemi a autorskými právy měli být alespoň seznámeni již na druhém stupni základního vzdělávání, pro pochopení jejich funkce a důležitosti.

5.1.1 Časová dotace a organizace

Optimální časová dotace pro vypracování listu jsou dvě vyučovací hodiny (90 minut) – ideálně v rámci hodin určených pro přírodopisný (biologický) seminář, kde bývají žáci rozděleni do dvou skupin střídajících se nejčastěji v rámci sudých a lichých týdnů. Práce s menší skupinkou žáků umožňuje snazší dostupnost odborné literatury a možnost učitele se žákům více věnovat v případě, že mají problém s některou z úloh. Celkově doporučuji 90 minut pro práci rozdělit dle tabulky č. 15.

Tabulka č. 15: Doporučené rozložení časové dotace pro vypracování pracovního listu

Činnost	Časová dotace
Seznámení s pracovním listem, představení pracovních úloh a pomocné literatury pro řešení	10 minut
Samostatná práce žáků – vypracování pracovního listu	60 minut
Kontrola pracovního listu – odpovědi, dodatečné informace a zajímavosti, závěrečné opakování a uzavření tématu, reflexe žáků, sebereflexe učitele	20 minut

5.1.1.1 Metody a formy výuky

Použitou vyučovací metodou (dle Lerner, 1986) je metoda reproduktivní, jejíž podstatou je reprodukce dříve osvojených poznatků a vybavení zapamatovaných informací, a která je založena na řešení úloh zkonstruovaných učitelem. Lze přistoupit i metodě problémového výkladu, a to v případě, kdy by bylo vyplnění pracovního listu pro žáky příliš obtížné. Výukovou formu bych na základě náročnosti úloh doporučovala především individuální; skupinová forma výuky není v tomto případě zcela vhodná.

5.1.1.2 *Klíčové kompetence*

Z hlediska klíčových kompetencí žáka rozvíjíme v rámci tohoto pracovního listu hlavně:

- **kompetence k učení:**
 - Žáci vyhledávají informace v učebnicích a knihách.
 - Žáci pracují s odbornou terminologií a latinskými názvy (jen názvy patogenů).
 - Žáci určují fotografie jednotlivých zástupců parazitů pomocí určovacích klíčů.
- **kompetence k řešení problémů:**
 - Žáci posuzují význam a dopady parazitů pro člověka a společnost.
 - Žáci navrhují řešení pro omezení šíření nakažlivých parazitárních onemocnění.
- **kompetence komunikativní** (rozvíjeny v případě umožnění porady se spolužákem):
 - Žáci dokáží s učitelem i spolužáky funkčně komunikovat o dané problematice a srozumitelně formulovat otázky a odpovědi.

5.1.1.3 *Průřezová témata a mezipředmětové vztahy*

Průřezovým tématem je environmentální výchova související hlavně s problematikou vztahů organismů a prostředí – vč. člověka. Mezipředmětové vztahy se pak dotýkají především:

- **zeměpisu** – např. znalost oblastí, které jsou postižené medicínsky významnými parazitárními nemocemi;
- **chemie** – např. voda jako prostředí a její chemické vlastnosti, léčiva a vakcíny;
- částečně **dějepis** – v širším kontextu kolonizace a její vliv na šíření nemocí, světové pandemie (mor), cesty šíření nemoci.

5.1.1.4 *Analýza prekonceptů a výukové cíle*

Protože je pracovní list založen na opakování již nabytých znalostí související s probíraným učivem souvisejícím s parazitologií (v užším slova smyslu), analýza prekonceptů spočívá ve zvládnutí probírané látky. Výukové cíle se tedy s prekoncepty značně propojují a jsou vedeny jako cíle nabyté během hodin, ve kterých se parazitologické učivo probíralo. Při stanovování výukových cílů jsem se snažila o využití širšího spektra úrovní myšlenkových operací, díky kterým by žáci měli být schopni snáze pracovat s informacemi a efektivněji se učit.

Výukové cíle:

- Žák pozná, pojmenuje a systematicky zařadí hlavní zástupce parazitů.
- Žák uvede příklady nejvýznamnějších parazitárních onemocnění, jejich hostitelů a původců.
- Žák se orientuje v základních pojmech souvisejících s parazitologickým učivem 6. ročníku ZŠ/1. ročníku osmiletých gymnázií.

- Žák je schopen popsat vývojové cykly vybraných parazitů.
- Žák dokáže funkčně diskutovat s učitelem i spolužáky v rozsahu probírané látky.
- Žák analyzuje přístupy prevence a léčby u parazitárních onemocnění člověka a domácích zvířat.
- Žák si připomene důležitost hygienických návyků (mytí rukou atd.).
- Žák vyvodí možné dopady nevýznamnějších parazitologických onemocnění na společnost.

5.1.1.5 Doporučené učebnice pro žáky a pro učitele

- **Anděra M. a kolektiv autorů (2019):** Velká kniha živočichů: Hmyz, ryby, obojživelníci, plazi, ptáci, savci. Bratislava: IKAR, Bratislava.
- **Kolibáč J., Hudec K., Laštůvka Z., Peňáz M. (2019):** Příroda České republiky: průvodce faunou. Academia, Praha.
- **Pelikánová I., Čabradová V., Hasch F., Sejpka J., Šimonová P. (2014):** Přírodopis 6: pro základní školy a víceletá gymnázia: [nová generace]. Fraus, Plzeň.
- **Volf P., Horák P. (2007):** Paraziti a jejich biologie. Triton, Praha.

ZÁVĚR

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na sezónní dynamiku blechy *Ceratophyllus (Monopsyllus) sciurorum* u plcha velkého a na detekci bartonel u obou těchto hostitelů. U plcha velkého jsem zaznamenala siphonapterofaunu skládající se ze tří druhů blech – dominantní druh *Ceratophyllus (Monopsyllus) sciurorum* a dva pravděpodobně náhodně se vyskytující druhy *Ceratophyllus gallinae* a *Hystrichopsylla talpae*.

Přítomnost blech u plchů se v průběhu sezóny statisticky významně měnila s periodou (dobou odchyty), pohlavní aktivitou jedinců i v rámci odběrových lokalit. Početnost blech u plchů pak průkazně ovlivňoval pouze průběh sezóny. V průměru jsem zaznamenala více samičích blech *C. sciurorum* oproti samčím.

Prevalenci bartonel jsem sledovala u plchů velkých i na nich parazitujících blechách *C. sciurorum*. Prevalence v průběhu sezóny fluktovala, bartonely byly detekovány častěji u samičích blech než u samčích. Při srovnání dvou ekologicky rozdílných lokalit se mi podařilo potvrdit statisticky významný vliv pohlaví blechy a interakce mezi lokalitou a periodou. Lokality vykazovaly rozdílné vrcholy prevalence v průběhu sezóny.

Při sledování prevalence ze zvláště odebraných vzorků z plchů a na nich parazitujících blech *C. sciurorum* byla patrná vyšší prevalence v krevních vzorcích plchů oproti blechám. Na základě sekvenace provedené ze vzorků plchů i blech se podařilo detekovat dva různé druhy bartonel – *Bartonella grahamii*-like a *Bartonella* sp. Toto zjištění dokazuje, že bakterie detekované v blechách *C. sciurorum* kolují průkazně i v plších a podporuje to hypotézu, že plch velký slouží jako rezervoár pro bartonely a na něm parazitující blechy jsou efektivními vektory pro jejich přenos.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. **Adamík P., Poledník L., Poledníková K., Romportl D. (2019):** Mapping an elusive arboreal rodent: Combining nocturnal acoustic surveys and citizen science data extends the known distribution of the edible dormouse (*Glis glis*) in the Czech Republic. *Mammalian Biology* 99: 12 – 18.
2. **Ahn K. S., Huh S. E., Seol S. W., Kim H. J., Suh K. H., Shin S. (2018):** *Ctenocephalides canis* is the dominant flea species of dogs in the Republic of Korea. *Parasites & Vectors* 11(1): 196.
3. **Altman I., Byers J. E. (2014):** Large-scale spatial variation in parasite communities influenced by anthropogenic factors. *Ecology* 95(7): 1876 – 1887.
4. *Journal of Vector Borne Diseases: Open Access* 1(1): 1001.
5. **Anděra M., Gaisler J. (2012):** Savci České republiky: popis, rozšíření, ekologie, ochrana. Academia, Praha.
6. **Álvarez-Hernández D. A., S-Rivera A. (2017):** An introduction to Vector-Borne diseases. *Austin Journal of Vector Borne Diseases: Open Access* 1(1): 1001.
7. **Bai Y., Calisher Ch. H., Kosoy M. Y., Root J. J., Doty J. B. (2011):** Persistent infection of successive reinfection of deer mice with *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 77(5): 1728-1731.
8. **Bai Y., Kosoy M. E., Cully J. F., Bala T., Ray C., Collinge S. K. (2007):** Acquisition of nonspecific *Bartonella* strains by the northern grasshopper mouse (*Onychomys leucogaster*). *FEMS Microbiology Ecology* 61(3): 438 – 448.
9. **Bai Y., Kosoy M. Y., Ray C., Brinkerhoff R. J., Collinge S. K. (2008):** Temporal and spatial patterns of *Bartonella* infection in black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*). *Microbial Ecology* 56(2): 373-382.
10. **Bai Y., Recuenco S., Gilbert A. T., Osikowicz L. M., Gómez J., Rupprecht Ch., Kosoy M. Y. (2012):** Prevalence and diversity of *Bartonella* spp. in bats in Peru. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 87(3): 518 – 523.
11. **Beldomenico P. M., Begon M. (2010):** Disease spread, susceptibility and infection intensity: vicious circles? *Trends in Ecology & Evolution* 25(1): 21 – 27.
12. **Berglund E. C., Ellegaard K., Granberg F., Xie Z., Maruyama S., Kosoy M. Y. (2010):** Rapid diversification by recombination in *Bartonella grahamii* from wild rodents in Asia contrasts with low levels of genomic divergence in Northern Europe and America. *Molecular Ecology* 19(11): 2241 – 2255.
13. **Berglund E. C., Frank A. C., Calteau A., Pettersson O. V., Granberg F., Eriksson A. S., Näslund K., Holmberg M., Lindroos H., Andersson S. G. E. (2009):** Run-off replication of

host-adaptability genes is associated with gene transfer agents in the genome of mouse-infecting *Bartonella grahamii*. *PLoS Genetics* 5(7): e1000546.

14. **Bieber C., Ruf T. (2008):** Summer dormancy in edible dormouse (*Glis glis*) without energetic constraints. *The Science of Nature* 96(1): 165 – 171.
15. **Billeter S. A., Borchert J. N., Atiku L. A., Mpanga J. T., Gage K. L., Kosoy. M. Y. (2014):** *Bartonella* species in invasive rats and indigenous rodents from Uganda. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 14(3): 182 – 188.
16. **Birtles R. J. (2005):** Bartonellae as elegant hemotropic parasites. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1063(1): 270 – 279.
17. **Birtles R. J., Hazel S. M., Bennett M., Bown K., Raoult D., Begon M. (2001):** Longitudinal monitoring of the dynamics of infections due to *Bartonella* species in UK woodland rodents. *Epidemiology and Infection* 126(2): 323 – 329.
18. **Birtles R. J., Raoult D. (1996):** Comparison of partial citrate synthase gene (*gltA*) sequences for phylogenetic analysis of *Bartonella* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46(4): 891 – 897.
19. **Bitam I., Dittmar K. Parola P., Whiting M. F., Raoult D. (2010):** Fleas and flea-borne diseases. *International Journal of Infectious Diseases* 14(8): e667- 676.
20. **Blagburn B. L., Dryden M. W. (2009):** Biology, treatment, and control of flea and tick infestations. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 39(6): 1173 – 1200.
21. **Bordes F., Morand S., Kelt D. A., Van Vuren D. H. (2009):** Home range and parasite diversity in mammals. *The American Naturalist* 173(4): 467 – 474.
22. **Boulouis H. J., Haddad N., Vayssier-Taussat M., Chomel B. B. (2007):** Persistent *Bartonella* infection: epidemiological and clinical implications. *Bulletin de l'Académie nationale de Médecine* 191(6): 1037 – 1044.
23. **Bourne D., Craig M., Crittall J., Elsheikha H., Griffiths K., Keyte S., Merritt B., Stokes L., Whitfield V., Wilson A. (2018):** Fleas and flea-borne diseases: biology, control & compliance. *Companion Animal* 23(4): 203 – 211.
24. **Bown K. J., Bennett M., Begon M. (2004):** Flea-borne *Bartonella grahamii* and *Bartonella taylorii* in bank voles. *Emerging infectious diseases* 10(4): 684 – 687.
25. **Breitschwerdt E. B., Kordick D. L. (2000):** *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. *Clinical Microbiology Reviews* 13(3): 428 – 438.
26. **Budria A., Candolin U. (2014):** How does human-induced environmental change influence host-parasite interactions? *Parasitology* 141(4): 462 – 474.

27. **Buffet J. P., Pisanu B., Brisse S., Roussel S., Félix B., Halos L., Chapuis J. L., Vayssier-Taussat M. (2013):** Deciphering *Bartonella* diversity, recombination, and host specificity in a rodent community. *PLoS ONE* 8(7): e68956.
28. **Büchner S., Stubbe M., Streise D. (2003):** Breeding and biological data for the common dormouse (*Muscardinus avellanarius*) in Eastern Saxony (Germany). *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 49(1): 19 – 26.
29. **Cáceres A. G., Padilla C., Stella J. A., Crisanto G. H., Pérez A. G. (2013):** Detection of *Bartonella* spp. and *Rickettsia* spp. in fleas, ticks and lice collected in rural areas of Peru. *Revista Peruana de Biología* 20(2): 165 – 169.
30. **Cyprich D., Krumpál M. (2007):** Phenology of fleas (Siphonaptera) *Ceratophyllus gallinae*, *C. pullatus* and *C. tribulis* in nests of birds and mammals. *Entomofauna carpathica* 19:65 – 69.
31. **Cyprich D., Krumpál M., Duda M. (2008):** Blchy (Siphonaptera) vtákov (Aves) hniezdiacich v dutinách z územia Slovenska. *Entomofauna carpathica* 20: 1 – 5.
32. **Cyprich D., Krumpál M., Lukáš J. (1992):** Contribution to the knowledge of the flea fauna (Siphonaptera) of dormouse nests (Myoxidae) in Slovakia. *Parasitologia Hungarica* 25: 97 – 105.
33. **Cyprich D., Krumpál M., Plachý J. (2009):** Hostiteľské spektrum vtáčích druhov blch (Siphonaptera) rodov *Ornithophaga* Mikulin, *Ceratophyllus* Curtis a *Dasypsyllus* Baker na Slovensku. *Sylvia* 45: 209 – 237.
34. **Cyprich D., Krumpál M., Rolníková T. (2001):** Zriedkavo sa vyskytujúce vtáacie druhy blch (Siphonaptera) na Slovensku. *Folia faunistica Slovaca* 6: 109 – 118.
35. **Cyprich D., Krumpál M., Špitalská E. (2002):** The relationship of *Ceratophyllus (Monopsyllus) sciurorum* (Siphonaptera) to various ecological groups in Slovakia. *Biologia* 57(2): 243 – 250.
36. **Cyprich D., Špitalská E., et Krumpál M. (2001):** Seasonal dynamics of *Ceratophyllus sciurorum sciurorum* (Schränk, 1803) (Siphonaptera) in Slovakia. *Wiadomosci parazytologiczne* 47(1): 49 – 59.
37. **Cyprich D., Štiavnická I. (2003):** Blchy (Siphonaptera) z hniezd cicavcov (Mammalia) z pozostalosti prof. Milana Mrciaka – Vysoké a Belianské tatry. *Folia faunistica Slovaca* 8: 53 – 55.
38. **Czeszczewik D., Walankiewicz W., Stańska M. (2008):** Small mammals in nests of cavity-nesting birds: Why should ornithologists study rodents? *Canadian Journal of Zoology* 86(4): 286 – 293.
39. **Cherry N. A., Maggi R. G., Cannedy A. L., Breitschwerdt E. B. (2009):** PCR detection of *Bartonella bovis* and *Bartonella henselae* in the blood of beef cattle. *Veterinary Microbiology* 135(3 – 4): 308 – 312.

40. **Cheslock M. A., Embers M. E. (2019):** Human Bartonellosis: an underappreciated public health problem? *Tropical Medicine and Infectious Disease* 4(2): e69.
41. **Chomel B. B., Boulouis H. J., Breitschwerdt E. B. (2004):** Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 224(8): 1270 – 1279.
42. **Chomel B. B., Boulouis H. J., Breitschwerdt E. B., Kasten R. W., Vayssier-Taussat M., Birtles R. J., Koehler J. E., Dehio Ch. (2009):** Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. *Veterinary Research* 40(2): 29.
43. **Chomel B. B., Rolain J. M. (2007):** *Bartonella*: Natural habitats. In: Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Landry M. L., Pfaller M. A. (Eds.): *Manual of Clinical Microbiology*, 9th edition. ASM Press, Washington DC.
44. **Çolak E., Yiğit N., Sözen M., Özkurt Ö. (1998):** Hibernation and body weight in dormice, *Glis glis orientalis* (Nehring, 1903) (Rodentia: Gliridae), maintained under uncontrolled conditions. *Turkish Journal of Zoology* 22: 1 – 7.
45. **Dassot C. L. (2009):** Flea allergy in dogs: Clinical signs and diagnosis. *European Journal of Companion Animal Practice* 19(3): 242 – 248.
46. **Deng H., Pang Q., Zhao B., Vayssier-Taussat M. (2018):** Molecular mechanisms of *Bartonella* and mammalian erythrocyte interactions: a review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8: 431.
47. **Diddi K., Chaudhry R., Sharma N., Dhawan B. (2013):** Strategy for identification & characterization of *Bartonella henselae* with conventional & molecular methods. *Indian Journal of Medical Research* 137(2): 380 – 387.
48. **Dobler G., Pfeffer M. (2011):** Fleas as parasites of the family Canidae. *Parasites & Vectors* 4(1): 139.
49. **Dobroruka L. (2004):** Savci Evropy a Středomoří. Aventinum, Praha.
50. **Durden L. A., Hinkle N. C. (2009):** Fleas (Siphonaptera): Morphology. In: Mullen G. R., Durden L. A. (Eds.): *Medical and Veterinary Entomology*, 2nd edition. Academic Press (Elsevier), London.
51. **Eisen E. J., Dennis D. T., Gage K. L. (2015):** The role of early-phase transmission in the spread of *Yersinia pestis*. *Journal of Medical Entomology* 52(6): 1183 – 1192.
52. **Eisen R. J., Gage K. L. (2012):** Transmission of flea-borne zoonotic agents. *Annual Review of Entomology* 57: 61 – 82.
53. **Eremeeva M. E., Karpathy S. E., Kreuger L., Hayes E. K., Williams A. M., Zaldivar Y., Bennet S., Cummings R., Tilzer A., Velten R. K., Kerr N., Dasch G. A., Hu R. (2012):** Two pathogens and one disease: detection and identification of flea-borne rickettsiae in areas

endemic for murine typhus in California. *Journal of Medical Entomology* 49(6): 1485 – 1494.

54. Favacho A. R. de Mendonça, Andrade M. N., de Oliveira R. C., Bonvicino C. R., D’Andrea P. S., de Lemos E. R. S. (2015): Zoonotic *Bartonella* species in wild rodents in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Microbes and Infection* 17(11 – 12): 889 – 892.
55. Feldmeier H., Heukelbach J., Ugbomoiko U. S., Sentongo E., Mbabazi P., Samson-Himmelstjerna G., Krantz I., The International Expert Group for Tungiasis (2014): Tungiasis – a neglected disease with many challenges for global public health. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8(10): e3133.
56. Fernandes F. R., Cruz L. D., Linhares A. X., Von Zuben C. J. (2015): Effect of body size on the abundance of ectoparasitic mites on the wild rodent *Oligoryzomys nigripes*. *Acta Parasitologica* 60(3): 515 – 524.
57. Ferrari N., Rosà R., Lanfranchi P., Ruckstuhl K. E. (2010): Effect of sexual segregation on host–parasite interaction: Model simulation for abomasal parasite dynamics in alpine ibex (*Capra ibex*). *International Journal for Parasitology* 40(11): 1285 – 1293.
58. Fietz J., Pflug M., Shlund W., Tataruch F. (2005): Influences of the feeding ecology on body mass and possible implications for reproduction in the edible dormouse (*Glis glis*). *Journal of Comparative Physiology B* 175(1): 45 – 55.
59. Frank H. K., Boyd S. D., Hadly E. A. (2018): Global fingerprint of humans on the distribution of *Bartonella* bacteria in mammals. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12(11): e0006865.
60. Gorrell J. C., Schulte-Hostedde A. I. (2008): Patterns of parasitism and body size in red squirrels (*Tamiasciurus hudsonicus*). *Canadian Journal of Zoology* 86(2): 99 – 107.
61. Gupta L., Slater L., Wu Ch., Glickman L. T., Lin T. L., Welch D. F., Crippen J. T., HogenEsch H. (1999): Immune response of neonatal specific pathogen-free cats to experimental infection with *Bartonella henselae*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 71(3 – 4): 233 – 243.
62. Gutiérrez R., Cohen C., Flatau R., Marcos-Hadad E., Garrido M., Halle S., Nachum-Biala Y., Covo S., Hawlena H., Harrus S. (2018): Untangling the knots: Co-infection and diversity of *Bartonella* from wild gerbils and their associated fleas. *Molecular Ecology* 27(23): 4787 – 4807.
63. Gutiérrez R., Krasnov B., Morick D., Gottlieb Y., Khokhlova I. S., Harrus S. (2015): *Bartonella* infection in rodents and their flea ectoparasites: an overview. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 15(1): 27 – 39.
64. Gutiérrez R., Vayssier-Taussat M., Buffet J. P., Harrus S. (2017): Guidelines for the isolation, molecular detection and characterization of *Bartonella* species. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 17(1): 42 – 50.

65. **Guy L., Nystedt B., Toft C., Zaremba-Niedzwiedzka K., Berglund E. C., Granberg F., Näslund K., Eriksson A. S., Andersson S. G. (2013):** A gene transfer agent and a dynamic repertoire of secretion systems hold the keys to the explosive radiation of the emerging pathogen *Bartonella*. *PLoS Genetics* 9(3): e1003393.
66. **Hamzaoui B. E., Laroche M., Parola P. (2019):** Detection of *Bartonella* spp. in *Cimex lectularius* by MALDI-TOF MS. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 64: 130 – 137.
67. **Harik N. S. (2013):** Tularemia: epidemiology, diagnosis and treatment. *Pediatric Annals* 42(7): 288 – 292.
68. **Harms A., Dehio Ch. (2012):** Intruders below the radar: molecular pathogenesis of *Bartonella* spp. *Clinical Microbiology Reviews* 25(1): 42 – 78.
69. **Hawlena H., Abramsky Z., Krasnov B. (2006):** Ectoparasites and age-dependent survival in a desert rodent. *Oecologia* 148(1): 30 – 39.
70. **Hawlena H., Abramsky Z., Krasnov B. R. (2005):** Age-biased parasitism and density-dependent distribution of fleas (Siphonaptera) on a desert rodent. *Oecologia* 146: 200 – 208.
71. **Hawlena H., Rynkiewicz E., Toh E., Alfred A., Durden L. A., Hastriter M. W., Nelson D. E., Rong R., Munro D., Dong Q., Fuqua C., Clay K. (2013):** The arthropod, but not the vertebrate host or its environment, dictates bacterial community composition of fleas and ticks. *The ISME Journal* 7(1): 221 – 223.
72. **Heeb P., Kölliker M., Richner H. (2000):** Bird-ectoparasite interactions, nest humidity, and ectoparasite community structure. *Ecology* 81(4): 958 – 968.
73. **Hoelzl F., Bieber C., Cornils J. S., Gerritsmann H., Stalder G. L., Walzer Ch., Ruf T. (2015):** How to spend the summer? Free-living dormice (*Glis glis*) can hibernate for 11 months in non-reproductive years. *Journal of Comparative Physiology B* 185(8): 931 – 939.
74. **Holcová Gazárková A., Adamík P. (2016):** Timing of breeding and second litters in edible dormouse (*Glis glis*). *Folia Zoologica* 65(2): 165 – 168.
75. **Hugot J. P. (2006):** Coevolution of macroparasites and their small mammalian hosts: cophylogeny and coadaptation. In: S. Morand, Krasnov B. R., Pulin R. (Eds.): *Micropmammals and Macroparasites From Evolutionary Ecology to Management*. Springer, New York, NY.
76. **Hürner H., Michaux J. (2009):** Ecology of the edible dormouse (*Glis glis*) in a western edge population on Southern Belgium. *Vie et Milieu* 59(2): 243 – 250.
77. **Iannino F., Salucci S., Di Provvido A., Paolini A., Ruggieri E. (2018):** *Bartonella* infections in human dogs and cats. *Veterinaria Italiana* 54(1): 63 – 72.
78. **Iannino F., Sulli N., Maitino A., Pascucci I., Pampiglione G., Salucci S. (2017):** Fleas of dog and cat: species, biology and flea-borne diseases. *Veterinaria Italiana* 53(4): 277 – 288.

79. **Jardine C., Waldner C., Wobeser G., Leighton F. A. (2006):** Demographic features of *Bartonella* infections in Richardson's ground squirrels (*Spermophilus richardsonii*). *Journal of Wildlife Diseases* 42(4): 739 – 749.
80. **Jurczyszyn M. (2007):** Hibernation cavities used by edible dormouse, *Glis glis* (Gliridae, Rodentia). *Folia Zoologica* 56(2): 162 – 168.
81. **Juškaitis R. (1999):** Mammals occupying nestboxes for birds in Lithuania. *Acta Zoologica Lituonica* 9(3): 19 – 23.
82. **Juškaitis R., Augutė V. (2015):** The fat dormouse, *Glis glis*, in Lithuania: living outside the range of the European beech, *Fagus sylvatica*. *Folia Zoologica* 64(4): 310 – 315.
83. **Kešnerová L., Moritz R., Engel P. (2016):** *Bartonella apis* sp. nov., a honeybee gut symbiont of the class Alphaproterobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66(1): 414 – 421.
84. **Kiefer D., Warburton E. M., Khokhlova I. S., Krasnov B. R. (2016):** Reproductive consequences of female size in haematophagous ectoparasites. *Journal of Experimental Biology* 219(15): 2368 – 2376.
85. **Kirillova N., Kirillov A., Ivashkina V. (2006):** Ectoparasites of the edible dormouse *Glis glis* L. of Samarskaya Luka Peninsula (Russia). *Polish Journal of Ecology* 54(3): 387 – 390.
86. **Koppmann-Rumpf B., Scherbaum-Heberer C., Schmidt K. H. (2012):** Nestbox sharing of the edible dormouse (*Glis glis*) during the active season. *Peckiana* 8: 189 – 196.
87. **Kosoy M. Y. (2010):** Ecological associations between bacteria of the genus *Bartonella* and mammals. *Biology Bulletin* 37(7): 716 – 724.
88. **Kosoy M. Y., Goodrich I. (2019):** Comparative ecology of *Bartonella* and *Brucella* infections in wild carnivores. *Frontiers in Veterinary Science* 5: 332.
89. **Kosoy M. Y., Hayman D. T. S., Chan K. S. (2012):** *Bartonella* bacteria in nature: where does population variability end a species start? *Infection, Genetics and Evolution* 12(5): 894 – 904.
90. **Kosoy M. Y., Mandel E., Green D., Marston E., Childs J. (2004a):** Prospective studies of *Bartonella* of rodents. Part I. Demographic and temporal patterns in population dynamics. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 4(4): 285 – 295.
91. **Kosoy M. Y., Mandel E., Green D., Marston E., Jones D. C., Childs J. (2004b):** Prospective studies of *Bartonella* in rodents. Part II. Diverse infections in a single rodent community. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 4(4): 296 – 305.
92. **Kosoy M. Y., Regnery R. L., Kosaya O. I., Jones D. C., Marston E. L., Childs J. E. (1998):** Isolation of *Bartonella* spp. from embryos and neonates of naturally infected rodents. *Journal of Wildlife Diseases* 34(2): 305 – 309.

93. **Kosoy M. Y., Regnery R. L., Kosaya O. I., Childs J. E. (1999):** Experimental infection of cotton rats with three naturally occurring *Bartonella* speices. *Journal of Wildlife Diseases* 35(2): 275 – 284.
94. **Krasnov B. R. (2012):** Composition of the order: Infraorders and families. In: Krasnov B. R.: Functional and evolutionary ecology of fleas. Cambridge University Press, Cambridge.
95. **Krasnov B. R., Burdelova N. V., Shenbrot G. I., Khokhlova I. S. (2002):** Annual cycles of four flea species in the central Negev desert. *Medical and Veterinary Entomology* 16(3): 266 – 276.
96. **Krasnov B. R., Khokhlova I. S. (2001):** The effect of behavioral interactions on the transfer of fleas (Siphonaptera) between two rodent species. *Journal of Vector Ecology* 26(2): 181 – 190.
97. **Krasnov B. R., Morand S., Hawlena H., Khokhlova I. S., Shenbrot G. I. (2005):** Sex-biased parasitism, seasonality and sexual size dimorphism in desert rodents. *Oecologia* 146(2): 209 – 217.
98. **Krasnov B. R., Mouillot D., Shenbrot G. I., Khokhlova I. S., Poulin R. (2004a):** Geographical variation in host specificity of fleas (Siphonaptera) parasitic on small mammals: the influence of phylogeny and local environmental conditions. *Ecography* 27(6): 787 – 797.
99. **Krasnov B. R., Poulin R., Shenbrot G. I., Mouillot D., Khokhlova I. S. (2004b):** Ectoparasitic “jacks-of-all-trades”: relationship between abundance and host specificity in fleas (Siphonaptera) parasitic on small mammals. *The American Naturalist* 164(4): 506 – 516.
100. **Krasnov B. R., Shenbrot G. I., Khokhlova I. S., Hawlena H. Degen A. A. (2008):** Sex ratio in flea infrapopulations: number of fleas, host gender and host age do not have an effect. *Parasitology* 135(9): 1133 – 1141.
101. **Kryštufek B. (2010):** *Glis glis* (Rodentia: Gliridae). *Mammalian Species* 42(865): 195 – 206.
102. **La Scola B., Zeaiter Z., Khamis A., Raoult D. (2003):** Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: The *Bartonella* paradigm. *Trends in Microbiology* 11(7): 318 – 321.
103. **Lara G. P., Dzul-Rosado K. R., Zavala Velázquez J. E., Zavala-Castro J. (2012):** Murine typhus: clinical and epidemiological aspects. *Colombia Médica* 43(2): 175 – 180.
104. **Lareschi M., Venzal J. M., Nava S., Mangold A. J., Portillo A., Palomar-Urbina A. M., Oteo J. A. (2018):** The human flea *Pulex irritans* (Siphonaptera: Pulicidae) in northwestern Argentina with an investigation of *Bartonella* and *Rickettsia* spp. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 89(2): 375 – 381.
105. **Lebl K., Bieber C., Adamík P., Fietz J., Morris P., Pilastro A., Ruf T. (2011):** Survival rates in a small hibernator, the edible dormouse: a comparison across Europe. *Ecography* 34(4): 683 – 692.

106. **Leelavathi M., Norhayati M., Lee Y. Y. (2012):** Cat flea infestation in a hospital: a case report. *The Korean Journal of Parasitology* 50(1): 79 – 82.
107. **Lehane M. J. (2005):** The blood-sucking insect groups: Siphonaptera. In: Lehane M. J.: The Biology of Blood-Sucking in Insects. Cambridge University Press, Cambridge.
108. **Lerner I. J. (1986):** Didaktické základy metod výuky. In: Kalhous Z., Obst O. (2002): Školní didaktika. Portál, Praha.
109. **Li D. M., Liu Q. Y., Yu D. Z., Zhang J. Z., Gong Z. D., Song. X. P. (2007):** Phylogenetic analysis of *Bartonella* detected in rodent fleas in Yunnan, China. *Journal of Wildlife Diseases* 43(4): 609 – 617.
110. **Li W., Chomel B. B., Maruyama S., Guptil L., Sander A., Raoult D., Fournier P. E. (2006):** Multispacer typing to study the genotypic distribution of *Bartonella henselae* populations. *Journal of Clinical Microbiology* 44(7): 2499 – 2506.
111. **Liaptova I., Razanske I., Jurgelevičius V., Paulauskas A. (2020):** *Bartonella washoensis* infection in red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and their ectoparasites in Lithuania. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 68: 101391.
112. **Lipatova I., Paulauskas A., Puraite I., Radzijeuskaja J., Balčiauskas L., Gedminas V. (2015b):** *Bartonella* infection in small mammals and their ectoparasites in Lithuania. *Microbes and Infection* 17(11 – 12): 884 – 888.
113. **Lipatova I., Stanko M., Paulauskas A., Spakovaite S., Gedminas V. (2015a):** Fleas (Siphonaptera) in the nest of dormice (Gliridae: Rodentia) in Lithuania. *Journal of Medical Entomology* 52(3): 469 – 474.
114. **Litwin Ch. M., Johnson J. M. (2005):** Identification, cloning, and expression of the CAMP-like factor autotransporter gene (*cfa*) of *Bartonella henselae*. *infection and immunity* 73(7): 4205 – 4213.
115. **Lüdtke B., Moser I., Santiago-Alarcon D., Fischer M., Kalko E. K. V., Schaefer H. M., Suarez-Rubio M., Tschapka M., Renner S. C. (2013):** Associations of forest type, parasitism and body condition of two European passerines, *Fringilla coelebs* and *Sylvia atricapilla*. *PLoS One* 8(12): e81395.
116. **Maggi R., Breitschwerdt E. B. (2005):** Potential limitations of the 16S-23S rRNA intergenic region for molecular detection of *Bartonella* species. *Journal of Clinical Microbiology* 43(3): 1171 – 1176.
117. **Malaria L., Bai Y., Osikowicz L. M., Tsertsvadze N., Katsitadze G., Innadze P., Kosoy M. (2016):** Prevalence and diversity of *Bartonella* species in rodents from Georgia (Caucasus). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 95(2): 466 – 471.
118. **Mardosaitė-Busaitienė D., Radzijeuskaja J., Balčiauskas L., Bratchikov M., Jurgelevičius V., Paulauskas A. (2019):** Prevalence and diversity of *Bartonella* species in small rodents from coastal and continental areas. *Scientific Reports* 9: 12349.

119. **Marignac G., Barrat F., Chomel B., Vayssier-Taussat M., Gandoin C., Bouillin C., Boulouis H. J. (2010):** Murine model for *Bartonella birtlesii* infection: New aspects. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 33(2): 95 – 107.
120. **Mazzamuto M. V., Pisanu B., Romeo C., Ferrari N., Preatoni D., Wauters L. A., Chapuis J. L., Martinoli A. (2016):** Poor parasite community of an invasive alien species: macroparasites of Pallas's squirrel in Italy. *Annales Zoologici Fennici* 53(1 – 2): 103 – 112.
121. **Minnick F. M., Anderson B. E. (2015):** *Bartonella*: Introduction. In: Tang Y., Sussman M., Liu D., Poxton I., Schwartzman. (Eds.): *Molecular Medical Microbiology*, 2nd edition. Academic Press (Elsevier), London.
122. **Minnick M. F., Anderson B. E. (2000):** *Bartonella* interactions with host cells. *Subcellular Biochemistry* 33: 97–123.
123. **Minnick M. F., Anderson B. E. (2006):** The genus *Bartonella*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E. (Eds.): *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY.
124. **Mooring M. S., Blumstein D. T., Stoner Ch. J. (2004):** The evolution of parasite-defense grooming in ungulates. *Biological Journal of the Linnean Society* 81(81): 17 – 37.
125. **Morick D., Krasnov B. R., Khokhlova I. S., Gottlieb Y., Harrus S. (2011):** Investigation of *Bartonella* acquisition and transmission in *Xenopsylla ramesis* fleas (Siphonaptera: Pulicidae). *Molecular Ecology* 20(13): 2864 – 2870.
126. **Morick D., Krasnov B. R., Khokhlova I. S., Gottlieb Y., Harrus S. (2013):** Transmission dynamics of *Bartonella* sp. Strain OE 1-1 in Sundevall's jirds (*Meriones crassus*). *Applied and Environmental Microbiology* 79(4): 1258 – 1264.
127. **Morick D., Krasnov B. R., Khokhlova I. S., Shenbrot G. I., Kosoy M. Y., Harrus S. (2010):** *Bartonella* genotypes in fleas (Insecta: Siphonaptera) collected from rodents in the Negev desert, Israel. *Applied and Environmental Microbiology* 76(20): 6864 – 6869.
128. **Mutebi F., Krücken J., Feldmeier H., Waiswa N. M., Sentongo E., von Samson-Himmelstjerna G. (2015):** Animal reservoirs of zoonotic tungiasis in endemic rural villages of Uganda. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9(10): e0004126.
129. **Ngeleja R. C., Luboobi S., Nkansah-Gyekye Y. (2017):** The effect of seasonal weather variation on the dynamics of the plague disease. *International Journal of Mathematics and Mathematical Sciences* 2017(1): 1 – 25.
130. **Norman A. F., Regnery R., Jameson P., Greene C., Krause D. C. (1995):** Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *Journal of Clinical Microbiology* 33(7): 1797 – 1803.

131. **Okaro U., Addisu A., Casanas B., Anderson B. (2017):** *Bartonella* species, an emerging cause of blood-culture-negative endocarditis. *Clinical Microbiology Reviews* 30(3): 709 – 746.
132. **Otranto D., Dantas-Torres F. (2010):** Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. *Parasites & Vectors* 3(1): 2.
133. **Övergaard R., Gemmel P., Karlsson M. (2007):** Effects of weather condition on mast year frequency in beech (*Fagus sylvatica* L.) in Sweden. *Forestry* 80(5): 555 – 565.
134. **Pelikánová I., Čabradová V., Hasch F., Sejkpa J., Šimonová P. (2014):** Přírodopis 6: pro základní školy a víceletá gymnázia: [nová generace]. Fraus, Plzeň.
135. **Pendle S., Ginn A., Iredell J. (2006):** Antimicrobial susceptibility of *Bartonella henselae* using Etest methodology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57(4): 761 – 763.
136. **Rámcový vzdělávací program pro gymnaziální vzdělávání (2007):** Člověk a příroda. Národní ústav pro vzdělávání. Praha. Navštíveno dne: 10. 1. 2020. Dostupné na: <http://www.nuv.cz/file/159>
137. **Rámcový vzdělávací program základní vzdělávání (2016):** Člověk a příroda. Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy. Praha. Navštíveno dne: 10. 1. 2020. Dostupné na: <http://www.msmt.cz/file/43792/>
138. **Razali N. B., Shamsudin N., Rahaniza A. M. J., Yaakop S., Khoo J. J., Mohd-Taib F. S. (2018):** Ectoparasites (ticks and mites) prevalence on small to medium-sized mammals associated with habitat condition in Kemasul, Pahang. *Serangga* 23(1): 72 – 88.
139. **Regier Y., Balhorn W., Kempf V. A. (2017):** Molecular detection of *Bartonella henselae* in 11 *Ixodes ricinus* ticks extracted from a single cat. *Parasites & Vectors* 10(1): 105.
140. **Regier Y., O'Rourke F., Kempf V. A. J. (2016):** *Bartonella* spp. – a chance to establish One Health concepts in veterinary and human medicine. *Parasites & Vectors* 9(1): 261.
141. **Reis C., Cote M., Le Rhun D., Lecuelle B., Levin M. L., Vayssier-Taussat M., Bonnet S. I. (2011):** Vector competence of the tick *Ixodes ricinus* for transmission of *Bartonella birtlesii*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5(5): e1186.
142. **Rodríguez-Pastor R., Mougeot F., Vidal M. D., Jado I., Gonzáles-Martín-Niño R. M., Escudero R., Luque-Larena J. J. (2019):** Zoonotic bacteria in fleas parasitizing common voles, Northwestern Spain. *Emerging Infectious Diseases* 25(7): 1423 – 1425.
143. **Rollins S. E., Rollins S. M., Ryan E. T. (2003):** *Yersinia pestis* and the plague. *American Journal of Clinical Pathology* 119(Suppl 1): 78 – 85.
144. **Romeo C., Pisanu B., Ferrari N., Basset F., Tillon L., Wauters A., Martinoli A., Saino N., Capuis J. L. (2013):** Macroparasite community of the Eurasian red squirrel (*Sciurus vulgaris*): poor species richness and diversity. *Parasitology Research* 112(10): 3527 – 3536.

145. **Romeo C., Wauters L. A., Ferrari N., Lanfranchi P., Martinoli A., Pisanu B., Preatoni D. G., Saino N. (2014):** Macroparasite fauna of alien grey squirrels (*Sciurus carolinensis*): composition, variability and implications for native species. *PLoS One* 9(2): e88002.
146. **Rosický B. (1957):** Fauna ČSR. Svazek 10, Blechy – Aphaniptera. Nakladatelství Československá akademie věd, Praha.
147. **Roucher C., Mediannikov O., Diatta G., Trape J. F., Raoult D. (2012):** A new *Rickettsia* species found in fleas collected from human dwellings and from domestic cats and dogs in Senegal. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 12(5): 360 – 365.
148. **Saisongkorh W., Rolain J. M., Suputtamongkol Y., Raoult D. (2009):** Emerging *Bartonella* in humans and animals in Asia and Australia. *Journal of the Medical Association of Thailand* 92(5): 707 – 731.
149. **Schüle R., Seubert A., Gille Ch., Lanz Ch., Hansmann Y., Piémont Y., Dehio Ch. (2001):** Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes: a unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *Journal of Experimental Medicine* 193(9): 1077 – 1086.
150. **Smišková D. (2010):** Zoonózy – nejčastější klinické projevy a diferenciální diagnostika. *Medicína pro praxi* 7(10): 384 – 386.
151. **Školní vzdělávací program Gymnázia Olomouc – Hejčín (2009c):** Školní vzdělávací program pro gymnaziální vzdělávání: osmiletý a čtyřletý program: vyšší i nižší stupeň osmiletého gymnázia. Navštíveno dne: 10. 1. 2020. Dostupné na: <<https://www.gytool.cz/soubory/SVP/2016-08-18%20SVP%202009.pdf>>
152. **Školní vzdělávací program Slovanského gymnázia v Olomouci (2009a):** Školní vzdělávací program pro základní vzdělávání: osmiletý vzdělávací program – část nižší stupeň osmiletého gymnázia. Navštíveno dne: 10. 1. 2020. Dostupné na: <<https://www.sgo.cz/uploads/page/20/doc/%C5%A0koln%C3%AD-vzd%C4%9BI%C3%A1vac%C3%AD-program-ni%C5%BE%C5%A1%C3%AD-gymn%C3%A1zium.pdf>>
153. **Školní vzdělávací program Slovanského gymnázia v Olomouci (2009b):** Školní vzdělávací program pro gymnaziální vzdělávání: osmiletý a čtyřletý program – čtyřleté gymnázium a vyšší stupeň osmiletého gymnázia. Navštíveno dne: 10. 1. 2020. Dostupné na: <<https://www.sgo.cz/uploads/page/20/doc/%C5%A0koln%C3%AD-vzd%C4%9BI%C3%A1vac%C3%AD-program-vy%C5%A1%C5%A1%C3%AD-gymn%C3%A1zium.pdf>>
154. **Školní vzdělávací program Základní školy Olomouc, Zeyerova 28 (2018):** Školní vzdělávací program pro základní vzdělávání. Navštíveno dne: 10. 1. 2020. Dostupné na: <<https://www.zs-zeyerova.cz/wp-content/uploads/2019/09/%C5%A0kola-pro-%C5%BEivot-ver.6.pdf>>

155. **Telfer S., Clough H., Birtles R. J., Bennett Malcolm, Carslake D., Helyar S. J., Begon M. (2007):** Ecological differences and coexistence in guild microparasites: *Bartonella* in wild rodents. *Ecology* 88(7): 1841 -1849.
156. **Tolkacz K., Alsarraf M., Kowalec M., Dwużnik D., Grzybek M., Behnke J. M., Bajer A. (2018):** *Bartonella* infections in three species of *Microtus*: prevalence and genetic diversity, vertical transmission and the effect of concurrent *Babesia microti* infection on its success. *Parasites & Vectors* 11(1): 491.
157. **Traversa D. (2013):** Fleas infesting pets in the era of emerging extra-intestinal nematodes. *Parasites & Vectors* 6(1): 59.
158. **Trilar T. (1997):** Ectoparasites from the nests of the fat dormouse (*Myoxus glis*) in Slovenia. *Natura Croatica* 6(4): 409 – 421.
159. **Trout R. C., Brooks S., Lim J., Rozycka D., Grimsey P., Grimsey M., Griffiths L. (2018):** Movements by edible dormice (*Glis glis*) to their hibernation site and implications for population control. *Folia Zoologica* 67(2): 91 – 97.
160. **Trout R. C., Mayo E., Perceau-Wells S., Brooks S. (2012):** Predation by the edible dormouse (*Glis glis*) on British woodland birds breeding in dormouse nestboxes. *Peckiana* 8: 209 – 214.
161. **Tsai K. H., Huang C. G., Fang C. T., Shu P. Y., Wu W. J. (2011):** Prevalence of *Rickettsia felis* and the first identification of *Bartonella henselae* Fizz/CAL-1 in cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae) from Taiwan. *Journal of Medical Entomology* 48(2): 445 – 452.
162. **van der Mescht L., le Roux C. P., Matthee A., Raath M. J., Manthee S. (2016):** The influence of life history characteristics on flea (Siphonaptera) species distribution models. *Parasites & Vectors* 9(1): 178.
163. **Volf P., Votýpka J. (2007):** Parazitičtí členovci (lékařská entomologie). In: Volf P., Horák P. (Eds.): Paraziti a jejich biologie. Triton, Praha.
164. **Weber K., Hoelzl F., Cornils J. S., Smith S., Bieber C., Balint B., Ruf Thomas (2018):** Multiple paternity in a population of free-living edible dormice (*Glis glis*). *Mammalian Biology* 93(1): 45 – 50.
165. **Whiting M. F., Whiting A. S., Hastriter M., Dittmar K. (2008):** A molecular phylogeny of fleas (Insecta: Siphonaptera): Origins and host associations. *Cladistics* 24(5): 677 – 707.
166. **Wilkerson M. J., Bagladi-Swanson M., Wheeler D. W., Floyd-Hawkins K., Craig C., Lee K. W., Dryden M. (2004):** The immunopathogenesis of flea allergy dermatitis in dogs, an experimental study. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 99 (3 – 4)z: 179 – 192.
167. **Wilson K., Bjørnstad O. N., Dobson A. P., Merler S., Poglajen G., Randolph S. E., Read A. F., Skorpung A. (2002):** Heterogeneities in microparasite infections: patterns and process. In: Hudson P. J., Rizzoli A., Grenfell B. T., Heesterbeek H. & Dobson A. P. (Eds.): The Ecology of Wildlife Diseases. Oxford University Press, Oxford.

168. Young H. S., Dirzo R., McCauley D. J., Agwanda B., Cattaneo L., Dittmar K., Eckerlin R. P., Fleischer R. C., Helgen L. E., Hintz A., Montinieri J., Zhao S., Helgen K. M. (2015): Drivers of intensity and prevalence of flea parasitism on small mammals in east African savanna ecosystems. *Journal of Parasitology* 101(3): 327 – 335.

Použité jednotné adresy zdroje (URL):

URL 1: Wikimedia Commons – *Ceratophyllus (Monopsyllus) sciurorum*. Navštíveno dne: 10. 1. 2020. Dostupné na:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/89/NHMUK010177296_A_squirrel_flea_-_Ceratophyllus_Monopsyllus_sciurorum_%28Schrank%2C_1803%29.jpg

URL 2: Google Maps (2020): Geografická lokalizace sledovaného území poblíž obce Dlouhá Loučka na mapě ČR. Navštíveno dne: 10. 1. 2020. Dostupné na:

<https://www.google.cz/maps/place/783+86+Dlouh%C3%A1+Lou%C4%8Dka/@49.6848089,14.2294091,7.84z/data=!4m5!3m4!1s0x47123bf995fb3397:0x441811763c62a7a3!8m2!3d49.816257!4d17.1796806>

PŘÍLOHY

- **Příloha I:** pracovní list k parazitologickému učivu – zadání
- **Příloha II:** pracovní list k parazitologickému učivu – řešení

PŘÍLOHA I: pracovní list k parazitologickému učivu – zadání

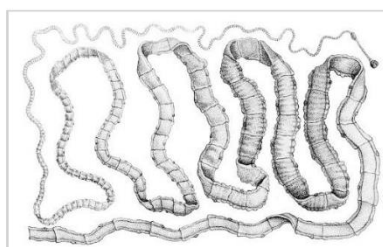


OPAKOVACÍ PRACOVNÍ LIST – PARAZITI ČLOVĚKA



PŘÍRODOPIS 6 – CVIČENÍ

I. Pojmenuj parazity (rodové i druhové jméno). Když nebudeš vědět, nahlédni do učebnice, sešitu či knihy.



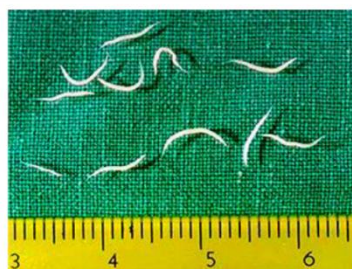
Obr. A: _____



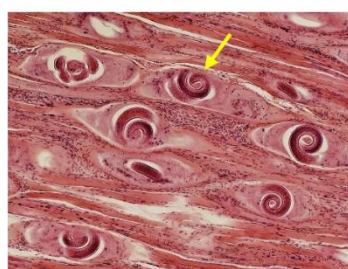
Obr. B: _____



Obr. C: _____



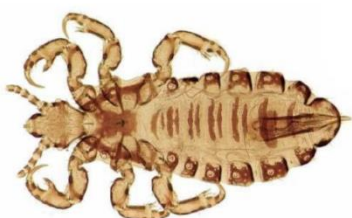
Obr. D: _____



Obr. E: _____



Obr. F: _____



Obr. G: _____



Obr. H: _____



Obr. I: _____

II. Vytvoř správné trojice. Když nebudeš vědět, nahlédni do učebnice, sešitu či knihy.

PŘENAŠEČ

- a) blecha
- b) anofeles čtyřskvrnný
- c) klíště
- d) moucha bodalka
- e) veš

PATOGEN

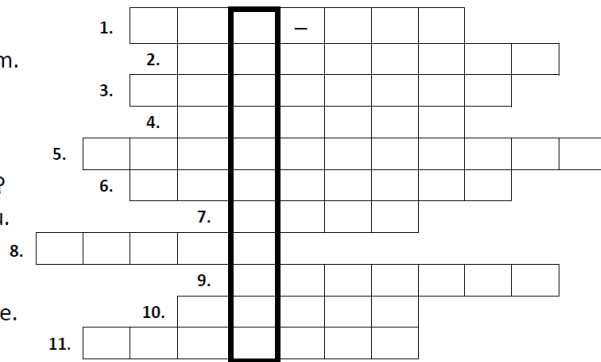
- Yersinia pestis*
- Borrelia*
- Rickettsia*
- Plasmodium (zimnička)*
- Trypanosoma*

ONEMOCNĚNÍ

- malárie
- mor
- skvrnitý tyfus
- spavá nemoc
- lymská borelióza

III. Vyplň křížovku. Pojem, který ti vyjde v tajence vysvětlí a uved' alespoň tři příklady. Můžeš použít svůj sešit.

1. Jak se jinak označuje moucha bodalka?
2. Hlístice žijící hl. v tenkém střevě, dlouhá až 20 cm.
3. Ploštěnec parazitující v játrech (hlavně ovcí).
4. Larvální stadium tasemnic.
5. Původce spavé nemoci.
6. Jaká hlístice způsobuje onemocnění *elefantiáza*?
7. Hlístice způsobující intenzivní svědění konečníku.
8. Vajíčko od vši.
9. Parazit, který způsobuje kožní chorobu – svrab.
10. Látka (alkaloid), která se využívá k léčbě malárie.
11. Do jakého řádu řadíme klíšťata?



Tajenka: _____. **Příklady:** _____, _____, _____, _____, atd.

IV. Odpověz na otázky. Když nebudeš vědět, nahlédni do učebnice, sešitu či knihy.

1) Jaké dvě hlavní nemoci může na člověka přenášet klíště obecné a jak se proti nim můžeme chránit?

2) Ve kterém století propukla v Evropě největší morová epidemie a z jakých důvodů se tak rychle šířila?

3) Na první stránce pracovního listu je v pravém horním rohu u nadpisu obrázek útvaru typického pro jednoho parazita. Kterému patří a k čemu slouží?

4) Na „Obrázku J“ vidíš parazita mezi červenými krvinkami. O jakého zástupce se jedná a kdo je jeho přenašečem? Pojmenuj nemoc, kterou způsobuje a největší oblast výskytu.



← *Obr. J*

5) Stručně popiš životní cyklus škrkavky dětské.

ZDROJE:

Literatura:

Horák P., Mikeš L. (2007): Helmintologie. In: Volf P., Horák P.: Paraziti a jejich biologie. Triton s.r.o., Praha.

Pelikánová I., Čabradová V., Hasch F., Sejpka J., Šimonová P. (2014): Přírodopis 6: pro základní školy a víceletá gymnázia: [nová generace]. Fraus, Plzeň.

Volf P., Votýpka J. (2007): Parazitičtí členovci (lékařská entomologie). In: Volf P., Horák P.: Paraziti a jejich biologie Triton s.r.o., Praha.

Obrázky:

Obrázky v záhlaví:

- *Vlevo* – komár: <http://atlas-content-cdn.pixelsquid.com/stock-images/mosquito-JeKQDVF-600.jpg> [online] [cit: 8. 10. 2019]
- *Vpravo* – skolex: <https://i.iinfo.cz/images/513/tasemnice-1.jpg> [online] [cit: 8. 10. 2019]

Obr. A: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4b/Taenia_solium.jpg [online] [cit: 8. 10. 2019]

Obr. B: <https://images.fineartamerica.com/images-medium-large-5/1-sheep-liver-fluke-fasciola-hepatica-lm-science-stock-photography.jpg> [online] [cit: 8. 10. 2019]

Obr. C: http://bloodsuckersforbullions.weebly.com/uploads/2/0/7/7/20778948/s621259426347860403_p4_i5_v600.jpeg [online] [cit: 8. 10. 2019]

Obr. D: <http://nemaplex.ucdavis.edu/images/pin-worms.jpg> [online] [cit: 8. 10. 2019]

Obr. E: https://www.sciencesource.com/Doc/TR1_WATERMARKED/3/b/c/f/SS2738480.jpg?d63644266551 [online] [cit: 8. 10. 2019]

Obr. F: <http://cdn.iflscience.com/images/dd70bf7a-66e5-56c9-a61f-1de28ba710bd/content-1492700589-credit-the-carter-center.jpg> [online] [cit: 8. 10. 2019]

Obr. G: <http://4a.upol.cz/images/ves01.jpg> [online] [cit: 8. 10. 2019]

Obr. H: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/32/Pulex_irritans_female_ZSM.jpg/1024px-Pulex_irritans_female_ZSM.jpg [online] [cit: 8. 10. 2019]

Obr. I: <https://www.warrenphotographic.co.uk/photography/bigs/35460-Culex-mosquito-white-background.jpg> [online] [cit: 8. 10. 2019]

PŘÍLOHA II: pracovní list k parazitologickému učivu – řešení



OPAKOVACÍ PRACOVNÍ LIST – PARAZITI ČLOVĚKA

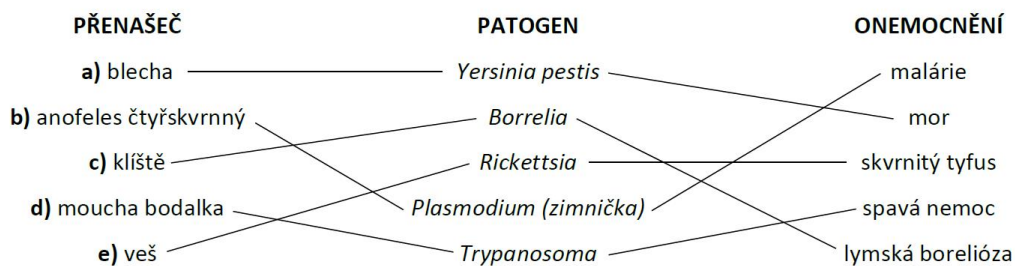


PŘÍRODOPIS 6 – CVIČENÍ

I. Pojmenuj parazity (rodové i druhové jméno). Když nebudeš vědět, nahlédni do učebnice, sešitu či knihy.

<p>Obr. A: Tasemnice dlouhočlenná</p>	<p>Obr. B: Motolice jaterní</p>	<p>Obr. C: Škrkavka dětská</p>
<p>Obr. D: Roup dětský</p>	<p>Obr. E: Svalovec stočený</p>	<p>Obr. F: Vlasovec medicínský</p>
<p>Obr. G: Veš dětská</p>	<p>Obr. H: Blecha obecná</p>	<p>Obr. I: Komár pisklavý</p>

II. Vytvoř správné trojice. Když nebudeš vědět, nahlédni do učebnice, sešitu či knihy.



Odpovědi: a) blecha – *Yersinia pestis* – mor; b) anofeles čtyřskvrnný – *Plasmodium* – malárie; c) klíště – *Borrelia burgdorferi* s.l. – lymská borelióza; d) moucha bodalka – *Trypanosoma gambiense/rhodiense* – spavá nemoc; e) veš – *Rickettsia prowazekii* – skvrnitý tyfus

III. Vyplň křížovku. Pojem, který ti vyjde v tajemce vysvětli a uveď alespoň tři příklady. Můžeš použít svůj sešit.

1. Jak se jinak označuje moucha bodalka?
2. Hlístice žijící hl. v tenkém střevě, dlouhá až 20 cm.
3. Ploštěnec parazitující v játrech (hlavně ovcí).
4. Larvální stadium tasemnic.
5. Původce spavé nemoci.
6. Jaká hlístice způsobuje onemocnění *elefantiáza*?
7. Hlístice způsobující intenzivní svědění konečníku.
8. Vajíčko od vši.
9. Parazit, který způsobuje kožní chorobu – svrab.
10. Látka (alkaloid), která se využívá k léčbě malárie.
11. Do jakého řádu řadíme klíšťata?

1.	T	S	E	-	T	S	E		
2.	Š	K	R	K	A	V	K	A	
3.	M	O	T	O	L	I	C	E	
4.	B	O	U	B	E	L			
5.	T	R	Y	P	A	N	O	S	O
6.	S	V	A	L	O	V	E	C	
7.	R	O	U	P					
8.	H	N	I	D	A				
9.	Z	Á	K	O	Ž	K	A		
10.	CH	I	N	I	N				
11.	R	O	Z	T	O	Č	I		

Tajenka: *EKTOPARAZIT* = vnější parazit; žije na povrchu těla jiného organismu; **např.:** komár, klíště, blecha, atd.

IV. Odpověz na otázky. Když nebudeš vědět, nahlédni do učebnice, sešitu či knihy.

1) Jaké dvě hlavní nemoci může na člověka přenášet klíště obecné a jak se proti nim můžeme chránit?

- lymská borelióza, klíšťová encefalitida
- hlavní obrana spočívá v prevenci – do míst, kde se vyskytují klíšťata si bereme světlý oděv, používáme repelent, po příchodu z přírody zkontrolujeme, zda klíště nemáme, případě ihned šetrně odstraníme
- proti klíšťové encefalitidě se lze bránit očkováním; proti lymské borelióze zatím očkování pro člověka neexistuje

2) Ve kterém století propukla v Evropě největší morová epidemie a z jakých důvodů se tak rychle šířila?

- 14. století, větší města velmi hustě zalidněna, špatné hygienické podmínky
- blechy, které parazitovaly na krysách se infikovaly morovým patogenem – bakterií *Yersinia pestis*, která ucpává trávící trubici blech – ty z tohoto důvodu hladoví, má problém s nasátím krve hostitele a snaží se proto opakovaně sát na různých hositelích, čímž zvyšuje pravděpodobnost nákazy

3) Na první stránce pracovního listu je v pravém horním rohu u nadpisu obrázek útvaru typického pro jednoho parazita. Kterému patří a k čemu slouží?

- jde o SKOLEX – hlavičku tasemnice se čtyřmi přísavkami a háčky, které slouží k přichycení ve střevě hostitele

4) Na „Obrázku J“ vidíš parazita mezi červenými krvinkami. O jakého zástupce se jedná a kdo je jeho přenašečem? Pojmenuj nemoc, kterou způsobuje a největší oblast výskytu.



- jedná se trypanozomu spavičnou – prvoka (bičkovce) způsobující spavou nemoc, která je přenášena mouchou tse-tse
- člověk, který se touto nemocí nakazí trpí horečkami, hubne a ztrácí sílu a stále spí – pokud se včas nezahájí léčba, je nemoc smrtelná
- nejvíce rozšířena v oblastech tropické Afriky

← **Obr. J**

5) Stručně popiš životní cyklus škrkavky dětské.

- samička škrkavky vytváří denně až 200 tisíc vajíček, které se dostávají do těla hostitele zpravidla kontaminovanou nedostatečně tepelně upravenou nebo neumytou potravou
- ve střevě se z vajíček vyvinou larvy, které provrtávají střevní stěnu a dostávají se do jater nebo do cév, odkud se následně dostávají krevní cestou do srdce a do plic
- v plicích rostou (do velikosti cca 3 mm) a následně pronikají dýchacími cestami do dutiny ústní, odkud jsou spolknuty a putují do tenkého střeva, kde dospívají v dospělého jedince
- celý cyklus trvá 2 – 3 měsíce
- podle aktuálního místa výskytu škrkavky bývá onemocnění (askarióza) doprovázeno např. záněty jater, v plicní fázi kašlem, záněty plic, emboliemi, horečkami a ve fázi dospělců v tenkém střevě dráždění jater, žlučovýchodů, vyrážkami (díky toxickým látkám, které vylučují), poruchami trávení, nechutenstvím, zvracením, krvavými průjmy, v krajních případech i k perforaci střeva a infekci dutiny břišní

ZDROJE:

Literatura:

Horák P., Mikeš L. (2007): Helmintologie. In: Volf P., Horák P.: Paraziti a jejich biologie. Triton s.r.o., Praha.

Pelikánová I., Čabradová V., Hasch F., Sejpka J., Šimonová P. (2014): Přírodopis 6: pro základní školy a víceletá gymnázia: [nová generace]. Fraus, Plzeň.

Volf P., Votýpka J. (2007): Parazitičtí členovci (lékařská entomologie). In: Volf P., Horák P.: Paraziti a jejich biologie Triton s.r.o., Praha.

Obrázky:

Obrázky v záhlaví:

- *Vlevo* – komár: <http://atlas-content-cdn.pixelsquid.com/stock-images/mosquito-JeKQDVF-600.jpg> [online] [cit: 8. 10. 2019]
- *Vpravo* – skolex: <https://i.iinfo.cz/images/513/tasemnice-1.jpg> [online] [cit: 8. 10. 2019]

Obr. A: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4b/Taenia_solium.jpg [online] [cit: 8. 10. 2019]

Obr. B: <https://images.fineartamerica.com/images-medium-large-5/1-sheep-liver-fluke-fasciola-hepatica-lm-science-stock-photography.jpg> [online] [cit: 8. 10. 2019]

Obr. C: http://bloodsuckersforbullions.weebly.com/uploads/2/0/7/7/20778948/s621259426347860403_p4_i5_v600.jpeg [online] [cit: 8. 10. 2019]

Obr. D: <http://nemaplex.ucdavis.edu/images/pin-worms.jpg> [online] [cit: 8. 10. 2019]

Obr. E: https://www.sciencesource.com/Doc/TR1_WATERMARKED/3/b/c/f/SS2738480.jpg?d63644266551 [online] [cit: 8. 10. 2019]

Obr. F: <http://cdn.iflscience.com/images/dd70bf7a-66e5-56c9-a61f-1de28ba710bd/content-1492700589-credit-the-carter-center.jpg> [online] [cit: 8. 10. 2019]

Obr. G: <http://4a.upol.cz/images/ves01.jpg> [online] [cit: 8. 10. 2019]

Obr. H: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/32/Pulex_irritans_female_ZSM.jpg/1024px-Pulex_irritans_female_ZSM.jpg [online] [cit: 8. 10. 2019]

Obr. I: <https://www.warrenphotographic.co.uk/photography/bigs/35460-Culex-mosquito-white-background.jpg> [online] [cit: 8. 10. 2019]