



Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Detekce a identifikace potenciálních humánních patogenů u vybraných ektoparazitů se zaměřením na *Borrelia miyamotoi*

Detection and identification of potential human pathogens in selected ectoparasites
with a focus on *Borrelia miyamotoi*

Diplomová práce

Jméno studenta: Bc. Ondřej Karásek

Studijní obor: Učitelství chemie a biologie pro střední školy

Vedoucí práce: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.

Odborný konzultant: Mgr. Lenka Michalčíková



Zadání diplomové práce

Autor: Bc. Ondřej Karásek

Studium: S21CH005NP

Studijní program: N0114A130003 Učitelství chemie a biologie pro střední školy

Studijní obor:

Název diplomové práce: **Detekce a identifikace potenciálních humánních patogenů u vybraných ektoparazitů se zaměřením na *Borrelia miyamotoi***

Název diplomové práce AJ: Detection and identification of potential human pathogens in ectoparasitic arthropods with a focus on *Borrelia miyamotoi*

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Borrelia miyamotoi je relativně nově popsáný patogen, kterému je věnována větší pozornost v posledních letech. Příznaky nemoci způsobené touto bakterií jsou podobné Lymeské borelióze, ale vykazují některé specifické znaky. Přenašečem těchto bakterií bývají ektoparazitické členovci, obvykle klíšťata, stejně jako v případě známější bakterie *Borrelia burgdorferi*. V České republice nebyl zatím potvrzen případ výskytu tohoto onemocnění u člověka, nicméně v jiných zemích ano. Nicméně v ČR byl tento patogen u klíšťat opakovaně detekován. Zatím chybějící záznamy o výskytu u člověka mohou být dány jednak nižším výskytem této bakterie a pak také faktem, že *Borrelia miyamotoi* není zatím běžně známa, a tudíž se na ni detekční metody u klinických vzorků spíše nezaměřují. V práci budou pomocí metagenomických přístupů sbírána data o výskytu tohoto patogenu ve vybraných oblastech v ČR. Data budou následně vyhodnocena a shrnuta pro další výzkum v této oblasti.

Boyer, P.H., Koetsveld, J., Zilliox, L. et al. Assessment of *Borrelia miyamotoi* in febrile patients and ticks in Alsace, an endemic area for Lyme borreliosis in France. *Parasites Vectors* 13, 199 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04071-9>

Fukunaga M, Takahashi Y, Tsuruta Y, Matsushita O, Ralph D, McClelland M, Nakao M. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. *Int J Syst Bacteriol.* 1995 Oct;45(4):804-10. doi: 10.1099/00207713-45-4-804. PMID: 7547303

Franck M, Ghozzi R, Pajaud J, Lawson-Hogban NE, Mas M, Lacout A, Perronne C. *Borrelia miyamotoi*: 43 Cases Diagnosed in France by Real-Time PCR in Patients With Persistent Polymorphic Signs and Symptoms. *Front Med (Lausanne).* 2020 Feb 28;7:55. doi: 10.3389/fmed.2020.00055

Zadávací pracoviště: Katedra biologie,
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 23.1.2020

Prohlášení

„Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a uvedl jsem všechny použité prameny a literaturu.“

V Hradci Králové, dne:

Ondřej Karásek

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval vedoucí práce RNDr. Aleně Myslivcové Fučíkové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnou spolupráci, konzultace a rady, které mi věnovala. Současně bych chtěl poděkovat Mg. Lence Michalčíkové za její ochotu, čas, podnětné rady, odbornou pomoc a cenné připomínky, které mi poskytla při zpracování diplomové práce.

Anotace:

Borrelia miyamotoi je relativně nově popsáný patogen, kterému je věnována větší pozornost v posledních letech. Příznaky nemoci způsobené touto bakterií jsou podobné lymeské borelióze, ale vykazují některé specifické znaky. Přenašečem těchto bakterií bývají ektoparazitické členovci, obvykle klíšťata, stejně jako v případě známější bakterie *Borrelia burgdorferi*. V České republice nebyl zatím potvrzen případ výskytu tohoto onemocnění u člověka, ale v jiných zemích ano. Nicméně v ČR byl tento patogen u klíšťat opakovaně detekován. Zatím chybějící záznamy o výskytu u člověka mohou být dány jednak nižším výskytem této bakterie a pak také faktem, že *Borrelia miyamotoi* není zatím běžně známa, a tudíž se na ni detekční metody u klinických vzorků spíše nezaměřují. V práci budou pomocí metagenomických přístupů sbírána data o výskytu tohoto patogenu ve vybraných oblastech v ČR. Data budou následně vyhodnocena a shrnuta pro další výzkum v této oblasti.

Klíčová slova: *Borrelia miyamotoi*, *Ixodes ricinus*, lymeská borelióza

Annotation:

Borrelia miyamotoi is a relatively newly described pathogen that has received more attention in recent years. Symptoms of the disease caused by this bacterium are similar to Lyme disease, but show some specific features. The carriers of these bacteria are usually ectoparasitic arthropods, usually ticks, as in the case of the better-known bacterium *Borrelia burgdorferi*. There has not yet been a confirmed case of this disease in humans in the Czech Republic, but there are cases in other countries. However, this pathogen has been repeatedly detected in ticks in the Czech Republic. The so far missing records of its occurrence in humans can be due to the lower occurrence of this bacterium and also to the fact that *Borrelia miyamotoi* is not yet commonly known, and therefore detection methods in clinical samples tend not to focus on it. In the work, data on the occurrence of this pathogen in selected areas in the Czech Republic will be collected using metagenomic approaches. The data will then be evaluated and summarized for further research in this area.

Key words: *Borrelia miyamotoi*, *Ixodes ricinus*, Lyme disease

Obsah

1. Úvod	14
2. Teoretická část	15
2.1. Bakterie	15
2.1.1. Vědecká taxonomie	15
2.1.2. Makroskopické a mikroskopické rozlišení	15
2.1.3. Metabolické, antigenní a genetické rozlišení	16
2.1.4. Struktura bakterií	16
2.1.4.1. Intracelulární struktury	17
2.1.4.2. Extracelulární struktury	19
2.1.4.3. Obaly a povrchové struktury	20
2.1.4.4. Gramovo barvení	20
2.1.5. Spory a sporulace bakterií	22
2.1.5.1. Morfologie spor	22
2.1.5.2. Sporulace	22
2.1.5.3. Germinace	23
2.1.6. Genetika bakterií	23
2.1.6.1. Anatomie DNA a RNA	23
2.1.6.2. Bakteriální genom	23
2.1.6.3. Mechanismus genového transferu	24
2.1.7. Replikace bakterií a genetika	25
2.1.7.1. Binární dělení	25
2.1.7.2. Bakteriální buněčný cyklus – růstová křivka	25
2.1.7.3. Živné půdy (médiu)	26
2.1.8. Bakteriální metabolismus	27
2.1.8.1. Mikrobiální růst a výživa	27
2.1.8.2. Vztah bakterií ke kyslíku	27
2.1.8.3. Zdroj uhlíku	28
2.1.8.4. Zdroj energie	28
2.1.8.5. Respirace a fermentace	28
2.1.9. Mechanismus bakteriální patogeneze	29
2.1.9.1. Patogenita a infekce	29
2.1.9.2. Virulence	30
2.2. Přenašeči a původci	31
2.2.1. Lékařská a veterinární entomologie	31

2.2.2.	Klíště obecné (<i>Ixodes ricinus</i>)	31
2.2.2.1.	Taxonomie a fylogeneze	32
2.2.2.2.	Anatomie a fyziologie	32
2.2.2.3.	Proces přichycení a sání klíštěte	35
2.2.2.4.	Chování a ekologie	35
2.2.2.5.	Životní cyklus	36
2.2.2.6.	Nemoci přenášené klíšťaty	37
2.3.	Lymeská borelióza	38
2.3.1.	Etiologie	38
2.3.2.	Epidemiologie	39
2.3.3.	Patogeneze	40
2.3.4.	Klinický obraz	41
2.3.5.	Diagnostika	42
2.3.6.	Prevence a terapie	42
2.3.6.1.	Pesticidy	43
2.3.6.2.	Vakcíny	43
2.3.6.3.	Terapie	43
2.4.	Další příklady onemocnění způsobené klíšťaty	44
2.4.1.	Klíšťová paralýza a alergie	44
2.4.2.	Arboviry	44
2.4.3.	Rickettsiózy	44
2.4.4.	Ehrlichióza	45
2.4.5.	Tularémie	45
2.5.	<i>Borelia myiamotoi</i> a návratná horečka RF (Relapsing fever)	46
2.5.1.	Epidemiologie	46
2.5.2.	Přenos patogenů	46
2.5.3.	Klinický obraz	47
2.5.4.	Diagnostika	47
2.5.5.	Terapie a prevence	47
3.	Praktická část	48
3.1.	Materiál a pomůcky	48
3.2.	Chemikálie	48
3.3.	Lokality sběru a jejich charakteristika	49
3.3.1.	Hrádek u Nechanic	49
3.3.2.	Koliba	50

3.3.3.	Pařížov	51
3.3.4.	Mazurovy chalupy	52
3.4.	Metody a postupy	53
3.4.1.	Sběr, uchování a identifikace klíšťat	53
3.4.2.	Izolace DNA z klíšťat	54
3.4.3.	Detekce pomocí jednokrokové PCR	55
3.4.4.	Gelová elektroforéza	58
3.5.	Výsledky (sběr klíšťat v oblasti, početnost, pozitivita, prevalence)	61
3.5.1.	Distribuce, početnost a aktivita klíšťat na zkoumaných lokalitách	61
3.5.2.	Detekce patogenů u klíšťat <i>Ixodes ricinus</i>	61
4.	Diskuse	64
5.	Závěr	68
	Seznam použité literatury	70
	Zdroje obrázků	76

Seznam zkratk:

ADP – adenosindifosfát

ATP – adenosin trifosfát

DNA – deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

ED – efektivní dávka

EM – erythema migrans

HGA – lidská granulocytární anaplazmóza (human granulocytic anaplasmosis)

HGE – lidská granulocytární ehrlichioza (human granulocytic ehrlichiosis)

IgA – imunoglobulin A

IgG – imunoglobulin G

LD – lymeská borelióza (Lyme disease)

Osp – vnější povrchový protein (outer surface protein)

PBS – fosfátový pufr (phosphate-buffered saline)

RF – návratná horečka (relapsing fever)

TAE – tris-acetátový elektroforézový pufr (tris-acetate-EDTA)

TBE – klíšťová encefalitida (tick-borne encephalitis)

UV – ultrafialové záření

Seznam obrázků

Obrázek 1: Stavba prokaryotické buňky	16
Obrázek 2: Jednotlivé kroky Gramova barvení.....	21
Obrázek 3: Genový transfer – Transdukce, Konjugace, Transformace.....	24
Obrázek 4: Růstová křivka bakterií.....	26
Obrázek 5: Buněčný energetický metabolismus	28
Obrázek 6: Ixodes ricinus (larva, nymfa, samec, samice)	32
Obrázek 7: Vnější anatomie Ixodes ricinus (samice).....	33
Obrázek 8: Interní anatomie klíštěte (samice).....	34
Obrázek 9: Tříhostitelský životní cyklus klíštěte	37
Obrázek 10: Navrhovaný enzootický přenosový cyklus pro <i>Borrelia miyamotoi</i>	46
Obrázek 11: Hrádek u Nechanic	49
Obrázek 12: Koliba – Hradecké lesy	50
Obrázek 13: Pařížov – Přírodní park Doubrava	51
Obrázek 14: Přírodní rezervace Mazurovy chalupy.....	52
Obrázek 15: Identifikace klíšťat pomocí stereomikroskopu	53
Obrázek 16: Klíšťata po roztržení podle lokality sběru.....	53
Obrázek 17: Inkubátor ke kultivaci vzorků	54
Obrázek 18: Biohazard box Safemate Eco 1.2	54
Obrázek 19: Příprava poolů pro PCR	57
Obrázek 20: Thermocycler pro PCR – Mastercycler X50s	57
Obrázek 21: Reakce pro <i>B. miyamotoi</i>	57
Obrázek 22: Pooly vložené v PCR Thermocycleru	57
Obrázek 23: Gelová elektroforéza I.	59
Obrázek 24: Gelová elektroforéza II.....	59
Obrázek 25: Gelová elektroforéza III.	59
Obrázek 26: UV transiluminátor	59
Obrázek 27: <i>Borrelia miyamotoi</i> I	60
Obrázek 28: <i>Borrelia miyamotoi</i> II.....	60
Obrázek 29: <i>Borrelia burgdorferi</i>	60
Obrázek 30: <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	60

Seznam tabulek:

Tabulka 1: PCR systémy používané pro screening vzorků na přítomnost patogenů ..55	55
Tabulka 2: Složení reakční směsi v celkovém objemu 25 µl56	56
Tabulka 3: Počet klíšťat <i>I. ricinus</i> odebraných ze všech studovaných oblastí61	61
Tabulka 4: Celková frekvence patogenů odebraných klíšťat v porovnání obou krajů62	62
Tabulka 5: Frekvence jednotlivých patogenů odebraných v pozorovaných lokalitách...62	62
Tabulka 6: Prevalence <i>B. burgdorferi</i> s.l. v <i>I. ricinus</i> dle stádia a lokality62	62
Tabulka 7: Prevalence <i>B. miyamotoi</i> v <i>I. ricinus</i> dle stádia a lokality63	63
Tabulka 8: Prevalence <i>Anaplasma spp.</i> v <i>I. ricinus</i> dle stádia a lokality63	63
Tabulka 9: Porovnání prevalence <i>B. miyamotoi</i> jiných studií66	66

Cíle práce:

1. Vypracování teoretické části diplomové práce
2. Vypracování praktické části diplomové práce
 - 2.1. Sběr *Ixodes Ricinus* ze 4 lokalit Pardubického a Královéhradeckého kraje
 - 2.2. Identifikace a třídění klíšťat podle pohlaví, vývojového stádia a lokality
 - 2.3. Zjištění přítomnosti spirochét *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *B. miyamotoi*, *Anaplasma spp.* pomocí polymerázové řetězové reakce
 - 2.4. Srovnání výsledků a jejich interpretace s ohledem na lokalitu a sezónu
 - 2.5. Srovnání metod detekce a identifikace

1. Úvod

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) je přenašeč lidských a veterinárních patogenů, které mohou způsobit vážná onemocnění. (Nicholson, a další, 2019) Výskyt patogenů se stále zvyšuje především vlivem podnebí, hojnosti hostitelů a sociálními faktory, které hrají roli ve změnách v distribuci a sezónním výskytu klíšťat. Tyto důvody mají za následek vzestup epidemií přenášených klíšťaty na lidi. (Estrada-Peña, a další, 2012)

Tato studie se zabývá zjištěním prevalence patogenů *Borrelia miyamotoi*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* a Anaplasmataceae v odebraných klíšťatech na čtyřech vybraných lokalitách ve dvou krajích České republiky. Výzkum klíšťat byl proveden v lokalitách Koliba, Hrádek u Nechanic, Pařížov a Mazurovy chalupy. Následně došlo k interpretaci výsledků a porovnání Královehradeckého a Pardubického kraje. V této studii bylo odebráno 572 klíšťat rodu *Ixodes ricinus*. Převládajícím stádiem byly nymfy s 525 jedinci (91,78 %), samice v počtu 26 (4,55 %) a samci 21 (3,67 %). Velký počet nymfálního stádia je dán především sběrem v období května a června, kdy má toto stádium nejvyšší aktivitu a početnost. Po sběru klíšťat došlo ke třídění klíšťat podle lokalit a následovala izolace jejich DNA. Přítomnost tří patogenů byla stanovena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), po které následovala gelová elektroforéza. Prevalence infekce byla zjištěna u téměř 30 % klíšťat. Nejčastějším patogenem byl *B. burgdorferi s. l.* (20,45 %). Tato data nám ukazují rozsah patogenů přenášených klíšťaty v příměstských a městských oblastech a mohou poskytnout nové poznatky o prevalenci infekcí na regionální úrovni. V rámci regionů bylo zjištěno, že rozdíly závisejí na klimatických faktorech a charakteristikách biocenózy. Klíšťata mohou přenášet více než jeden patogen, což může významně ovlivnit lidské zdraví, protože se může přenášet více nemocí současně. Byl detekován přenos několika patogenů, což ukazuje na riziko dalších infekcí z přísátí klíštěte. Součástí práce je také srovnání metod detekce a identifikace zkoumaných patogenů a srovnání výsledků s ohledem na lokalitu sběru klíšťat. Práce je doplněna o teoretickou část související se zkoumaným tématem, aby co nejvíce přiblížila problematiku těchto patogenů a jejich vliv především na lidské zdraví a organismus. Součástí teoretické práce je zaměření se na základní vlastnosti bakterií, především jejich stavby, metabolismu a rozmnožování. Dále se zabývá obecnou anatomií a fyziologií klíšťat a také poskytuje informace k onemocněním, jež mohou být způsobeny velkým množstvím potenciálních patogenů přítomných v těle klíštěte.

2. Teoretická část

2.1. Bakterie

Bakterie jsou jednobuněčné mikroorganismy, které postrádají jadernou membránu, jsou metabolicky aktivní a dělí se binárním dělením. Z lékařského hlediska jsou hlavní příčinou mnoha onemocnění. Navenek se bakterie jeví jako relativně jednoduché formy života, ale ve skutečnosti jsou sofistikované a vysoce přizpůsobivé. Tyto organismy existují široce v parazitických i volně žijících formách. (Baron, 1996)

2.1.1. Vědecká taxonomie

Taxonomie se zabývá klasifikací neboli rozdělením organismů do taxonomických skupin podle podobných vlastností (genotypových i fenotypových). Dále se zabývá nomenklaturou, která se věnuje správnému pojmenování jednotlivých taxonů podle daných pravidel. (Hurych, a další, 2021) Bakterie patří mezi jednobuněčné prokaryotické organismy. Prokaryota jsou seskupena do dvou domén, Archaea a Bacteria. Každá doména je rozdělena na kmeny, každý kmen na třídy. Každá třída je dále rozdělena na řád, čeleď, rod, nakonec každý rod na jednotlivé druhy. Bakterie se také běžně rozlišují podle toho, zda jsou gramnegativní nebo grampozitivní. (Tortora, a další, 2019) Mimo jiné je lze klasifikovat podle jejich makroskopického a mikroskopického vzhledu, podle charakteristických růstových a metabolických vlastností, podle jejich antigenicity a nakonec podle jejich genotypu. (Murray, a další, 2010)

2.1.2. Makroskopické a mikroskopické rozlišení

Počáteční rozlišení mezi bakteriemi lze provést na základě růstových charakteristik na různých živných a selektivních médiích. Ty poskytují rozlišovací vlastnosti, jako je barva, velikost, tvar a vůně. Lze také určit schopnost bakterií odolávat určitým antibiotikům, fermentovat specifické cukry, lyzovat erythrocyty, hydrolyzovat lipidy a podobně. Mikroskopický vzhled, včetně velikosti, tvaru a konfigurace organismů a jejich schopnost udržet Gramovo barvení jsou primárními prostředky pro rozlišení bakterií. (Murray, a další, 2010)

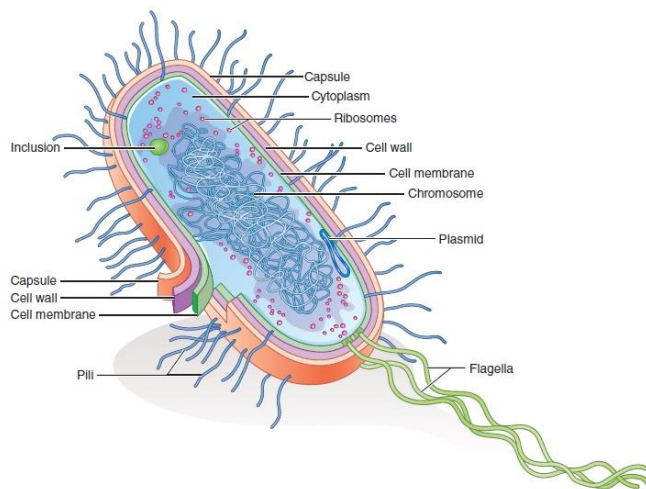
Bakterie mají charakteristické tvary (koky, tyčinky, spirálky atd.) a často se vyskytují v agregátech (páry, řetízky, tetrády, shluky atd.). Tyto znaky jsou diagnosticky užitečné. Obvykle jsou typické pro určitý rod bakterií. (Salton, a další, 1996)

2.1.3. Metabolické, antigenní a genetické rozlišení

Další úroveň klasifikace je založena na metabolismu bakterií, včetně požadavku na anaerobní nebo aerobní prostředí, požadavku na specifické živiny (např. schopnost fermentovat specifické sacharidy nebo používat různé sloučeniny jako zdroj uhlíku pro růst). Dají se rozlišit také podle vytváření charakteristických metabolických produktů (kyseliny, alkoholy) a specifických enzymů (např. stafylokokové katalázy). (Murray, a další, 2010) Bakterie jsou také identifikovány morfologickými a biochemickými testy. Například pomocí protilátek k detekci antigenů (sérotypizace) nebo vzorce inhibice antibiotik. (Baron, 1996) Nejpřesnější metodou pro klasifikaci bakterií je analýza jejich genetického materiálu. Novější molekulární techniky umožňují rozlišit bakterie detekcí specifických charakteristických sekvencí DNA. Tyto techniky zahrnují hybridizaci DNA, amplifikaci polymerázovou řetězovou reakcí (PCR), sekvenování DNA a další. (Murray, a další, 2010)

2.1.4. Struktura bakterií

Bakterie mají relativně jednoduchou strukturu. Jsou to prokaryotické organismy – jednoduché jednobuněčné organismy bez jaderné membrány, mitochondrií, Golgiho tělísek nebo endoplazmatického retikula. Rozmnožují nepohlavním dělením. (Murray, a další, 2010) Součástí bakterie je charakteristicky buněčný obal, který zahrnuje vrstvenou buněčnou stěnu a vnější povrchové struktury. Mezi ty řadíme bičíky, což jsou orgány pohybu, a také fimbrie, které pomáhají při adhezi bakterií. Mezi vnitrobuněčné struktury se řadí především nukleoid, obklopený amorfní cytoplazmou, která obsahuje ribozomy. V bakteriích je více struktur, včetně plazmidů, inkluzí a granulí. (Bhatia, a další, 2008)



Obrázek 1: Stavba prokaryotické buňky (Engelkirk, a další, 2014)

Bakterie jsou mnohem menší než eukaryotické buňky. Většina bakterií spadá do velikosti zhruba 1–5 μm . Pomocí světelného mikroskopu je však možné rozpoznat rozdíly ve tvaru a uspořádání bakterií. (Hogg, 2006) Existuje velké množství různých variací, nicméně většina z nich má jeden ze tří základních tvarů: tyčinkovitý (bacily), kulovitý (koky) nebo zakřivený (vibria, spirily, spirochéty). (Bhatia, a další, 2008) Tyto tvary poskytují určité výhody. Například tyčinky s velkým povrchem jsou schopny lépe absorbovat živiny ze svého okolí, zatímco koky jsou méně náchylné k vysychání. Spirálové formy zase usnadňují pohyb přes vodní prostředí. Kromě těchto charakteristických tvarů buněk lze bakterie také nalézt seskupené v konkrétních formacích. (Hogg, 2006)

2.1.4.1. Intracelulární struktury

2.1.4.1.1. Cytoplazma

Většina cytoplazmy je tvořena vodou. Obsah vody se pohybuje od přibližně 65 do 95 procent v závislosti na různých faktorech. Obsahuje také různé látky, jako jsou bílkoviny, sacharidy, lipidy, anorganické ionty a pigmenty. (Hollar, 2012) Cytoplazma je hustá, vodnatá, poloprůhledná a elastická. Hlavní struktury v cytoplazmě prokaryot jsou nukleoid (obsahující DNA), plastidy, ribozomy a inkluze. V cytoplazmě se nachází řada vláken, které nazýváme cytoskelet. Prokaryotický cytoskelet přebírá role v buněčném dělení, udržování buněčného tvaru, růstu, pohybu DNA, zacílení proteinů a uspořádání organel. (Tortora, a další, 2019)

2.1.4.1.2. Nukleoid

Pravděpodobně nejmarkantnější rozdíl mezi prokaryoty a eukaryoty je způsob, jakým je zabalen jejich genetický materiál. Eukaryotické buňky mají dva nebo více chromozomů obsažených v membránou ohraničeném jádru. Naproti tomu prokaryota jádro postrádají. Prokaryotický chromozom se nachází v nepravidelně tvarované oblasti zvané nukleoid. (Prescott, 2002) Bakteriální genom je tvořen jednou molekulou dvouvláknové DNA, která je uspořádaná do kruhové formy. Za určitých okolností se z tohoto kruhového uspořádání může vytvořit řetězec o délce přibližně 1 000 μm . Bakteriální chromozom se během replikace dělí pouze jednou. Bakteriální DNA představuje pouze 2 % až 3 % hmotnosti buňky, ale zaujímá téměř 10 % jejího objemu. Není obklopen jadernou membránou ani neobsahuje dělicí aparát. (Bhatia, a další, 2008)

2.1.4.1.3. Plazmidy

Bakterie často obsahují malé, obvykle kruhové, dvouvláknové molekuly DNA nazývané plazmidy. Replikují se nezávisle na chromozomální DNA. Obvykle obsahují 5 až 100 genů, které nejsou klíčové pro přežití bakterií za normálních podmínek prostředí. Plazmidy však dávají buňkám v některých situacích výhodu. Lze v nich nalézt geny, které mohou zajišťovat rezistenci na antibiotika, toleranci k toxickým kovům, produkci toxinů nebo syntézu enzymů. (Tortora, a další, 2019) Genetický materiál plazmidů může být přenášen z generace na generaci nebo mezi různými bakteriálními kmeny. Dalšími mechanismy genetické výměny u prokaryot jsou transformace, které zahrnují přímý příjem DNA a včlenění genů do hostitelského chromozomu, a transdukce, při které je přenos zprostředkován bakteriofágem. (Paul, 2007)

2.1.4.1.4. Ribozomy

Kromě nukleoidu jsou hlavními vnitřními strukturami prokaryotických buněk ribozomy. Jsou to místa syntézy proteinů a v aktivní buňce jich může být mnoho tisíc, což dodává cytoplazmě skvrnitý vzhled. Ribozomy se skládají z komplexu proteinu a RNA a jsou místem syntézy proteinů v buňce. I když plní podobnou funkci, ribozomy prokaryotických buněk jsou menší a lehčí než jejich eukaryotické protějšky. Ribozomy jsou měřeny ve Svedbergových jednotkách (S), jako funkce jejich velikosti a tvaru. Jsou určeny rychlostí sedimentace. Ribozomy obsahují dvě nestejně podjednotky. U prokaryot jsou to 50S a 30S. Každá podjednotka obsahuje vlastní RNA a proteiny. (Hogg, 2006)

2.1.4.1.5. Inkluze a granula

V cytoplazmě prokaryotických buněk se může nacházet několik druhů rezervních látek, známé jako inkluze. Buňky mohou akumulovat určité živiny a používat je, když je prostředí nevyhovující. Některé inkluze jsou společné pro širokou škálu bakterií, zatímco jiné jsou omezeny na malý počet druhů. Mohou tedy sloužit pro identifikaci. (Tortora, a další, 2019) Tato tělíska se obvykle používají pro skladování (např. sloučeniny uhlíku, anorganické látky a energie) a také snižují osmotický tlak vázáním molekul ve formě částic. Některá inkluzní tělíska nejsou ohraničena membránou a leží volně v cytoplazmě – například polyfosfátová granula. Protože inkluzní tělíska slouží především pro uchovávání látek, jejich množství se liší podle nutričního stavu buňky. (Prescott, 2002)

2.1.4.2. Extracelulární struktury

2.1.4.2.1. Pouzdro (kapsula)

Některé bakteriální buňky jsou obklopeny viskózní látkou tvořící krycí vrstvu nebo obal kolem buněčné stěny. Studie pomocí elektronového mikroskopu odhalila, že pouzdro se skládá ze sítě jemných vláken. Chemicky jsou tvořeny z vysokomolekulárních viskózních polysacharidů nebo polypeptidů. Mohou být složeny z jednoho nebo více druhů cukrů. (Trivedi, a další, 2010)

Tato vrstva může mít tloušťku až 10 μm . Kapsuly se mohou vyskytovat u grampozitivních i negativních bakterií. Ačkoli pouzdro není nezbytné pro životaschopnost, uděluje buňce odolnost vůči fagocytóze, brání jejímu vysychání a chrání ji před reakcemi hostitele vůči invazi. (Salton, a další, 1996)

2.1.4.2.2. Bičik (Flagellum)

Bičíky jsou tenké vlasové struktury, které slouží bakteriím k pohybu. Jsou často mnohem delší než samotná buňka. Bičik je duté a tuhé válcovité vlákno. Skládá se z bílkoviny flagelinu. Je připojený háčkem k bazálnímu tělísku, které jej připevňuje k buněčné stěně a plazmatické membráně. (Hogg, 2006)

Bičíky se liší svou délkou od 3 do 20 μm a průměrem od 0,01 do 0,013 μm . Bičíky mohou mít charakteristické uspořádání u různých bakterií. Jedná se o:

- Monotrichní bakterie, které mají jeden polární bičik, např. *Vibrio cholerae*.
- Lofotrichní bakterie s chomáčem několika polárních bičiků, např. ve *Spirillum*.
- Amfitrichní bakterie s bičíky na obou koncích, např. *Campylobacter sps*.
- Peritrichní bakterie s bičíky po celém povrchu, např. u *Salmonella typhi*.
- Atrichní bakterie, které nemají žádný bičik, např. v *Shigella sps*.

(Bhatia, a další, 2008)

2.1.4.2.3. Fimbrie (Pili)

Pili nebo fimbrie jsou struktury podobné vlasům nacházející se na povrchu určitých gramnegativních bakterií. Fimbrie jsou orgány, které pomáhají bakteriím v přilnavosti k povrchům. Kdežto pili konkrétně umožňují připojení k jiným bakteriím. Jediným grampozitivním organismem, který má tyto pili, je *Corynebacterium renale*. Pili jsou tedy především orgány adheze, které pomáhají ukotvení v nutričně příznivém prostředí, zajišťují genetický přenos materiálu mezi bakteriemi a slouží pro kolonizaci bakterií. (Bhatia, a další, 2008)

2.1.4.3. Obaly a povrchové struktury

2.1.4.3.1. Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmu prokaryotické buňky obklopuje buněčná membrána (také známá jako cytoplazmatická membrána). Tato membrána je podobná eukaryotické buněčné membráně, ať už svojí strukturou nebo funkcí. Chemicky je buněčná membrána tvořena z proteinů a fosfolipidů. Membrána reguluje, které chemikálie mohou vstupovat do buňky nebo z ní vystupovat, protože je selektivně propustná. V membráně je navázána řada enzymů a probíhají zde různé metabolické procesy. (Engelkirk, a další, 2014)

2.1.4.3.2. Buněčná stěna

Prokaryotické buňky jsou obklopeny obecně tuhou buněčnou stěnou, která chrání buňku před osmotickou lýzou. Buněčná stěna je také důležitá při identifikaci a klasifikaci bakterií, definované na základě Gramova barvení. (Paul, 2007) Buněčná stěna označuje část buněčného obalu, která je vnější k cytoplazmatické membráně a vnitřní k pouzdru glykokalyxu. Buněčná stěna bakterií je vícevrstvá. Tvoří asi 20 % suché hmotnosti bakterie. Průměrnou tloušťka se pohybuje mezi 0,15 až 0,50 μm . Mezi její základní funkce patří dodávat organismu tuhost, chránit buňku před vnějším prostředím. Nachází se zde receptorová místa pro fágy, může obsahovat látky toxické pro hostitele a určuje charakter barvení podle Grama. (Bhatia, a další, 2008)

2.1.4.4. Gramovo barvení

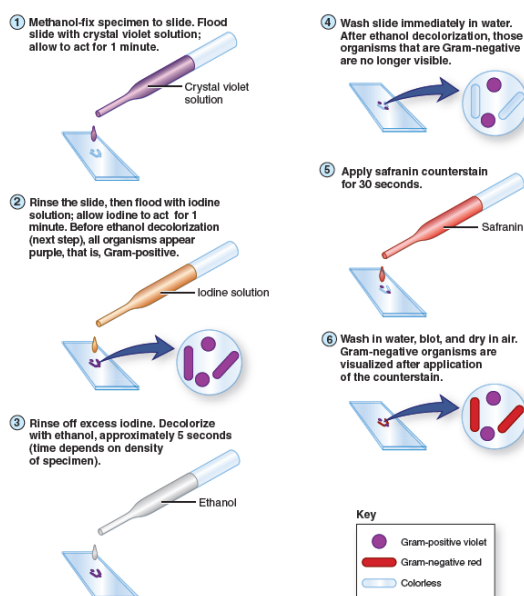
Strukturální a chemické rozdíly mezi buněčnými stěnami gramnegativních a grampozitivních bakterií jsou dobře podloženy. I když existují případy odchylek barvení v důsledku věku a dalších proměnných, Gramovo barvení je stále klíčovou technikou, používanou zejména v klinické a potravinářské mikrobiologii. Může také nastat situace, že ve fázi exponenciálního vývoje některé organismy reagují grampozitivně; nicméně ve stacionární fázi reagují gramnegativně. (Dworkin, a další, 2006) Barva bakterií na konci postupu barvení podle Grama závisí na chemickém složení jejich buněčné stěny. (Engelkirk, a další, 2014) Jak grampozitivní, tak gramnegativní bakterie mají peptidoglykany buněčné stěny, které propůjčují buňce charakteristický tvar a poskytují buňce mechanickou ochranu. Peptidoglykany jsou jedinečné pro prokaryotické organismy a sestávají z glykanového hlavního řetězce kyseliny muramové a glukosaminu (oba N-acetylované) a peptidových řetězců. (Salton, a další, 1996)

2.1.4.4.1. Grampozitivní bakterie

Buněčná stěna grampozitivních buněk se skládá z jediné silné vrstvy peptidoglykanu, která obklopuje cytoplazmatickou membránu. Buněčné stěny obvykle obsahují také kyselinu teichoovou, polymery glycerolu nebo ribitolu, spojené fosfátovými skupinami a obsahujícími také aminokyseliny a cukry. (Paul, 2007) Pokud bakterie nebyly odbarveny během kroku odbarvování, budou na konci postupu barvení podle Grama modré až fialové. Takové mikroorganismy se označují jako grampozitivní. Silná vrstva peptidoglykanu v buněčných stěnách komplikuje odstranění komplexu krystalová violeť-jod během kroku odbarvování. (Engelkirk, a další, 2014)

2.1.4.4.2. Gramnegativní bakterie

Ve složitější gramnegativní buněčné stěně je vrstva peptidoglykanu mnohem tenčí a je obklopena vnější membránou uzavírající periplazmatický prostor, který obsahuje enzymy podílející se na získávání živin, transportu elektronů a ochraně před toxiny. (Paul, 2007) Pokud byla na rozdíl od grampozitivních bakterií krystalová violeť z buněk odstraněna během kroku odbarvování a buňky byly následně obarveny safraninem (červené barvivo), budou na konci postupu barvení podle Grama růžové až červené. Jedná se tedy o gramnegativní bakterie. Tenká vrstva peptidoglykanu v buněčných stěnách gramnegativních bakterií usnadňuje odstranění komplexu krystalová violeť-jod během odbarvování. Kromě toho odbarvování rozpouští lipidy v buněčných stěnách tohoto typu bakterií. To narušuje integritu buněčné stěny, což ještě více napomáhá odstraňování komplexu. (Engelkirk, a další, 2014)



Obrázek 2: Jednotlivé kroky Gramova barvení (Engelkirk, a další, 2014)

2.1.5. Spory a sporulace bakterií

2.1.5.1. Morfologie spor

Za nepříznivých podmínek prostředí, jako je ztráta nutričních požadavků, se bakterie mohou přeměnit z vegetativního stavu dormance. Tyto struktury se nazývají spory. Umístění spor v buňce je charakteristické pro bakterii a může pomoci při identifikaci bakterie. Obsahuje kompletní kopii chromozomu, naprosté minimální koncentrace proteinů a ribozomů a vysokou koncentraci vápníku vázaného na kyselinu dipikolinovou. Spora má vnitřní membránu, dvě peptidoglykanové vrstvy a vnější keratinový proteinový obal. (Murray, a další, 2010). Jsou vyráběny za podmínek omezeného přísunu uhlíku, dusíku a fosforu. Spory jsou odolné vůči teplu, chemikáliím, vysychání, mrazu a záření. V dormanci mohou přežít i 50 let a při získání příznivých podmínek prostředí mohou vyklíčit a zahájit nový bakteriální život. Spory jsou tedy vysoce odolné struktury. Odolnost je způsobena následujícími důvody:

- Velmi malá metabolická aktivita
- Velmi malé množství vody
- Nepochůdný a ochranný obal spor
- Nedostatek aktivních enzymů
- Vysoké procento iontů Ca^{2+} v kompozici spor
- Přítomnost stabilizační sloučeniny – kyseliny dipikolinové (Trivedi, a další, 2010)

2.1.5.2. Sporulace

Sporulace (sporogeneze) je tvorba spor. Tento proces normálně začíná, když se růst zastaví kvůli nedostatku živin. Je to složitý proces a lze jej rozdělit do sedmi fází.

- 1) Tvoří se axiální vlákno jaderného materiálu.
- 2) Následuje sbalení buněčné membrány, aby se uzavřela část DNA, tvoří se septum.
- 3) Membrána pokračuje v růstu a pohltí nezralou sporu ve druhé membráně.
- 4) Mezi membrány se vloží kortex, akumuluje se vápník a kyselina dipikolinová.
- 5) Kolem kortexu se vytváří proteinové povlaky.
- 6) Dochází k dozrání spor.
- 7) Nakonec lytické enzymy zničí sporangium a uvolní spory. (Prescott, 2002)

2.1.5.3. Germinace

Klíčení spor do vegetativního stavu je stimulováno narušením vnějšího pláště mechanickým namáháním, pH, teplem nebo jiným stresorem. Vyžaduje také vodu a spouštěcí živinu (např. alanin). Proces trvá přibližně 90 minut. Poté, co začne proces klíčení, spora přijme vodu, nabobtná a začne tvořit jednu novou vegetativní buňku identickou s původní vegetativní buňkou, čímž dokončí celý cyklus. Jakmile začne klíčení a obal spory je narušen, začne být spora opět zranitelná a může být inaktivována jako jiné bakterie. (Murray, a další, 2010)

2.1.6. Genetika bakterií

2.1.6.1. Anatomie DNA a RNA

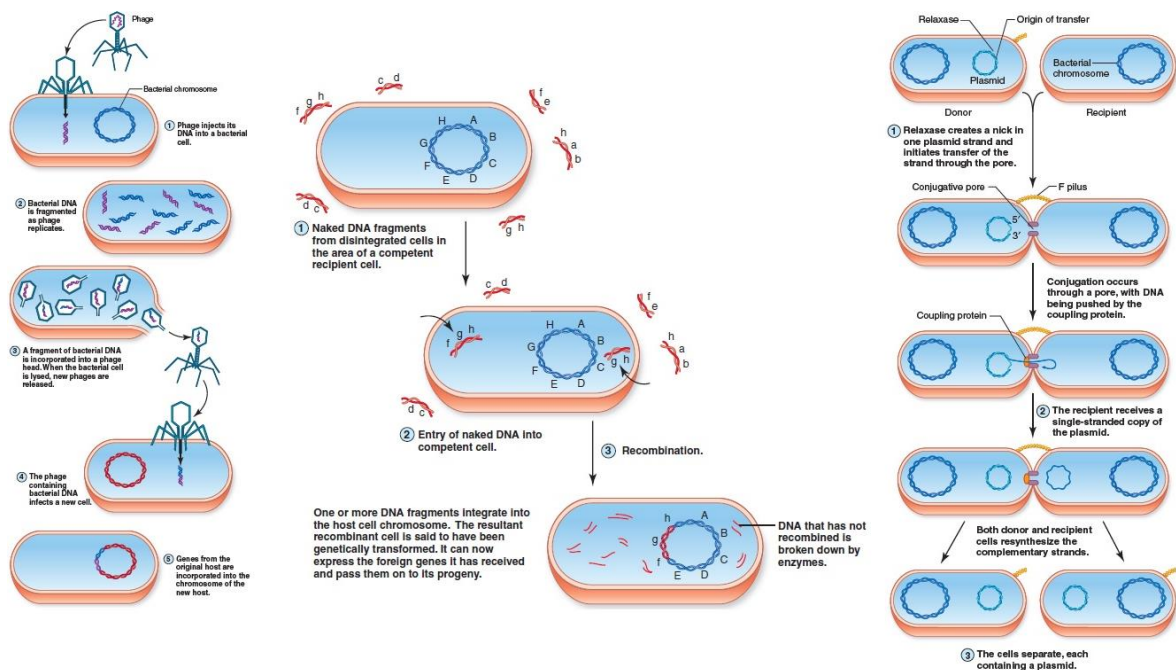
DNA je dvoušroubovicový řetězec nukleotidů. Nukleotid je komplex, který se skládá z fosfátové skupiny, pětiuhlíkatého sacharidu (deoxyribózy) a dusíkaté báze (purinové nebo pyrimidinové). Mezi purinové báze se řadí adenin (A) a guanin (G). Pyrimidinové báze se skládají z thyminu (T) a cytosinu (C). Nukleotid vzniká, když se 5' uhlík cukru a jedna z dusíkatých bází naváže na 1' uhlík pentózového cukru. To jsou základní stavební kameny DNA. V RNA je dusíkatá báze thymin nahrazena uracilem, dalším pyrimidinem. Na rozdíl od DNA je RNA zpravidla jednovláknová a krátká, nikoli dvouvláknová a dlouhá. Také obsahuje cukr ribózu, nikoli deoxyribózu. (Mahon, a další, 2015)

2.1.6.2. Bakteriální genom

Bakteriální genom je veškerý soubor genů nesených bakteriemi jak na jejich chromozomu, tak i na jejich extrachromozomálních genetických elementech. Bakterie mají obvykle pouze jednu kopii svých chromozomů a jsou tedy haploidní. Pouze s jedním chromozomem bude mít změna bakteriálního genu (mutace) mnohem větší účinek na celou buňku. Struktura bakteriálního chromozomu je udržována polyaminy, jako je spermin a spermidin. Bakterie mohou také obsahovat extrachromozomální genetické prvky, které se nazývají plasty. Ty jsou nezávislé na bakteriálním chromozomu a ve většině případů mohou být přenášeny z jedné buňky do druhé. (Murray, a další, 2010)

2.1.6.3. Mechanismus genového transferu

Existují různé mechanismy, kterými si bakterie vyměňují genetický materiál. Při transformaci přijímá bakterie příjemce extracelulární donorovou DNA. K rekombinaci dochází mezi jednotlivými molekulami transformující DNA a chromozomy recipientních bakterií. Molekuly transformující DNA odpovídají velmi malým fragmentům bakteriálního chromozomu. Při transdukcii donorová DNA zabalená v bakteriofágu infikuje bakterii příjemce. Každý jednotlivý transdukující fág nese odlišnou sadu úzce spojených genů, které představují malý segment bakteriálního genomu. Při konjugaci se přenáší DNA příjemci pomocí cytoplazmatického spojení mezi dvěma bakteriemi. (Holmes, a další, 1996) Bakteriální buňka (donorová), která má pohlavní pilus, se připojuje k jiné bakteriální buňce (recipientní). Retrakce pilu pak přivede obě buňky do těsného kontaktu. Jediný řetězec DNA je pak přenesen z dárcovské buňky do přijímající buňky pórem v místě spojení dvou bakteriálních buněk. Tento typ genetické rekombinace se vyskytuje většinou u druhů gramnegativních bacilů, ale byl hlášen i u rodů *Pseudomonas* a *Streptococcus*. (Engelkirk, a další, 2014)



Obrázek 3: Genový transfer – Transdukcce, Konjugace, Transformace (Engelkirk, a další, 2014)

2.1.7. Replikace bakterií a genetika

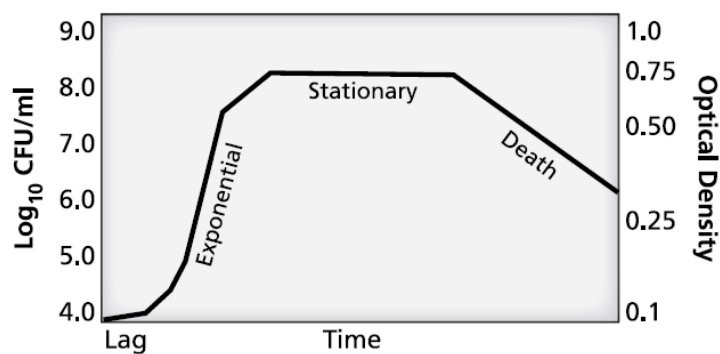
2.1.7.1. Binární dělení

Binární dělení je metoda asexuální replikace, při které se jedna buňka dělí za vzniku dvou téměř identických dceřiných buněk. Proces replikuje genetickou informaci v každé buňce a poskytuje stejné kopie oběma dceřiným buňkám. Tímto genetickým materiálem je deoxyribonukleová kyselina. Jakmile buňka vytvoří dvě kopie DNA, podstoupí řadu kroků, které rozdělí buňku na dvě poloviny takovým způsobem, který chrání jejich buněčný obsah a zároveň dává dvěma novým buňkám tvar totožný s tvarem mateřské buňky. Ty poté obklopí nový materiál buněčné stěny. (Maczulak, 2011)

2.1.7.2. Bakteriální buněčný cyklus – růstová křivka

Růst v buňkách je jakýkoli nárůst buněčných složek a je měřen zvýšením počtu buněk. Růstová křivka je graf, který znázorňuje tuto změnu počtu v průběhu času. Bakterie se rozmnožují binárním dělením. Rozlišujeme čtyři fáze růstu podle pořadí, ve kterém probíhají. U většiny bakteriálních druhů probíhají fáze během několika hodin až dnů. (Maczulak, 2011)

- a) Lag-fáze je období, kdy si bakteriální buňky zvykají na nové prostředí. Určitou dobu se v médiu nereprodukují. Probíhá ale vysoká metabolická aktivita a syntetizují se látky a enzymy, které jsou potřeba při nadcházejícím dělení. (Hurych, a další, 2021)
- b) Log-fáze (logaritmická) je období exponenciálního růstu. Buňky se začnou dělit. Buněčná reprodukce je v tomto období nejaktivnější a generační doba dosahuje konstantního minima. (Tortora, a další, 2019)
- c) Stacionární fáze je období rovnováhy. Exponenciální růst se zastaví, protože se bakterie přiblížili nosné kapacitě prostředí. To je počet organismů, které může prostředí podporovat. Je řízena dostupnými živinami, akumulací odpadů a prostorem. (Tortora, a další, 2019)
- d) Fáze odumírání nastává, když počet úmrtí začne převyšovat počet nově vytvořených buněk. Populace vstupuje do fáze logaritmického poklesu. Ta pokračuje, dokud se populace nezmenší na minimum nebo dokud zcela nevymře. (Tortora, a další, 2019)



Obrázek 4: Růstová křivka bakterií (Maczulak, 2011)

Doba potřebná pro rozdělení jedné buňky na dvě buňky se nazývá generační doba nebo doba zdvojení. Doba generování bakterie v kultuře může trvat 20 minut pro rychle rostoucí bakterie (*E. coli*) nebo 24 hodin pro pomalu rostoucí bakterii (*Mycobacterium tuberculosis*). (Mahon, a další, 2015)

2.1.7.3. Živné půdy (médiu)

Medium je jakákoli formulace živin ve vodě, která podporuje růst mikroorganismů a zajišťuje jejich výživu. Mohou být pevná, polopevná nebo kapalná. Médiu se vkládá do Petriho misek nebo do zkumavek. Poté jsou mikroorganismy naočkovány do média a inkubovány tak, aby se úspěšně reprodukovaly. Výsledná populace buněk se nazývá kultura. Mikrobiologie obsahuje širokou škálu variací médií pro konkrétní účely. (Maczulak, 2011)

Média, která jsou složitější a vyrobená z výtažků z masa nebo sójových bobů, se nazývají živná média (např. živný bujón). Růstové médiu, které obsahuje přidané růstové faktory, jako je krev a vitamíny, se označuje jako obohacené (např. krevní agar, čokoládový agar). Média obsahující přísady, které inhibují růst některých bakterií, ale umožňují růst jiným, se nazývají selektivní média (např. MacConkey agar, který je selektivní pro gramnegativní bakterie, zatímco inhibuje grampozitivní bakterie). Složky v médiích, které umožňují vizualizaci metabolických rozdílů mezi skupinami nebo druhy bakterií, se nazývají diagnostická média. Pokud je nutná prodleva mezi odběrem vzorku a kultivací vzorku, použije se transportní médiu. To je určené k zachování životaschopnosti mikroorganismů ve vzorku, ale neumožňuje množení (např. média Amies a Cary-Blair). (Mahon, a další, 2015)

2.1.8. Bakteriální metabolismus

Bakteriální fyziologické vlastnosti jsou projevy druhově specifických metabolických drah. Pokud jde o celkový energetický metabolismus, vztah dané bakterie ke kyslíku a světlu určuje, zda jako primární mechanismus produkující energii používá fotosyntézu, fermentaci nebo dýchání. Také studiem toho, jak konkrétní bakterie využívá živiny, produkuje metabolity nebo má přítomné enzymy, lze identifikovat její metabolické vlastnosti. (Dworkin, a další, 2006)

2.1.8.1. Mikrobiální růst a výživa

Všechny bakterie mají tři hlavní nutriční potřeby pro růst. Jedná se o dostatečný zdroj uhlíku, který je nutný pro výrobu buněčných složek. Uhlík představuje 50 % suché hmotnosti bakterie. Pro správnou tvorbu bílkovin je nutný dusík, ten tvoří 14 % sušiny. Potřebný je také zdroj energie, což zajišťují molekuly adenosintrifosfátu. Ty se uplatňují při většině buněčných pochodů a funkcí. Důležitá je také přítomnost různých kovů a iontů pro enzymatickou aktivitu. Nezbytné jsou také minerální ionty, jako je Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} . Ačkoli základní stavební látky potřebné pro růst a vývoj jsou pro všechny buňky stejné, bakterie se liší ve schopnosti využívat různé zdroje těchto molekul. (Mahon, a další, 2015)

2.1.8.2. Vztah bakterií ke kyslíku

Potřeba kyslíku pro konkrétní bakterii odráží její mechanismus k uspokojení potřeby energie. Na tomto základě jsou bakterie rozděleny do následujících skupin:

- a) Aerobní organismus nejvíce prospívá v přítomnosti atmosférického kyslíku. Organismus, který nemůže růst bez kyslíku, je obligátně aerobní.
- b) Fakultativně anaerobní organismus je aerobní organismus schopný růstu v nepřítomnosti kyslíku, to znamená, že O_2 není absolutně nezbytný pro jeho metabolismus. Příklady jsou střevní bacily a stafylokoky.
- c) Aerotolerantní anaeroby nevyužívají kyslík, ale mohou v jeho přítomnosti přežít. Příkladem jsou laktobacily a anaerobní streptokoky.
- d) Anaerobní organismus neroste v normálním atmosférickém kyslíku a chybí mu metabolické enzymové systémy pro využití kyslíku při dýchání. Mikroby inhibované kyslíkem se nazývají obligátní anaeroby. Příkladem jsou: *Clostridium tetani*, *Bacterioides* sps. (Bhatia, a další, 2008)

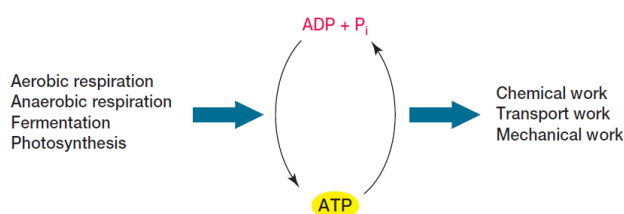
2.1.8.3. Zdroj uhlíku

Uhlík je potřebný jako základ všech organických molekul. Jedním z důležitých zdrojů uhlíku, který nedodává vodík ani energii, je oxid uhličitý (CO_2). Pravděpodobně všechny mikroorganismy dokážou CO_2 fixovat, tedy redukovat ho a zabudovat do organických molekul. Jako jediný a hlavní zdroj uhlíku mohou CO_2 používat jako pouze autotrofní organismy. Organismy, které používají redukované, předem vytvořené organické molekuly jako zdroje uhlíku, jsou heterotrofní. Ty obvykle pocházejí z jiných organismů. (Prescott, 2002)

2.1.8.4. Zdroj energie

Organismy mají k dispozici pouze dva zdroje energie. Světelnou energii a energii produkovanou oxidací anorganických nebo organických molekul. Chemotrofní organismy získávají energii z oxidace chemických molekul (organických nebo anorganických), zatímco fototrofní organismy získávají energii ze světla. (Prescott, 2002)

Všechny buňky potřebují k přežití neustálý přísun energie. Vyrobená energie může být poté využita při syntéze buněčných složek (buněčné stěny, proteiny, mastné kyseliny, nukleové kyseliny). (Murray, a další, 2010) Velká část energie uložené a uvolněné buňkami spočívá ve sloučeninách adenosintrifosfátu (ATP) a adenosindifosfátu (ADP). Obě sloučeniny jsou složeny z uhlíku, dusíku, vodíku, kyslíku a fosforu. Ukládají přebytečnou energii a ponechají ji pro energetické nároky dalších reakcí. Bohaté na energii jsou zejména vazby mezi fosfáty. (Maczulak, 2011)



Obrázek 5: Buněčný energetický metabolismus (Prescott, 2002)

2.1.8.5. Respirace a fermentace

Respirace je typ heterotrofního metabolismu za přítomnosti kyslíku. Oxidace glukózy je nejčastěji studovaná disimilační reakce vedoucí k produkci energie nebo syntéze ATP. Kompletní oxidace glukózy může zahrnovat tři základní biochemické dráhy. První je glykolytická dráha, druhá je Krebsův cyklus a třetí je řada membránově vázaných oxidací elektronového transportu spojených s oxidativní fosforylací. (Jurtshuk, 1996)

Fermentace probíhá v prostředí bez kyslíku a pyruvát produkovaný glykolýzou se přeměňuje na různé konečné produkty v závislosti na druhu bakterií. Mnoho z nich je identifikováno na základě jejich fermentačních konečných produktů. (Murray, a další, 2010) Fermentace je tedy typ metabolismu, při kterém enzymy degradují cukry za produkce organických kyselin a sloučeniny adenosintrifosfátu (ATP) ukládající energii. (Maczulak, 2011) Ty jsou generovány prostřednictvím dehydrogenačních reakcí, ke kterým dochází při enzymatickém štěpení glukózy. Organické konečné produkty vzniklé z tohoto biologického procesu slouží také jako konečné akceptory elektronů a vodíku. (Jurtshuk, 1996)

2.1.9. Mechanismus bakteriální patogeneze

Aby byl organismus považován za patogen, musí během určité fáze svého životního cyklu změnit zdraví nebo chování jiného organismu, tedy svého hostitele. Tato schopnost vyvolat onemocnění se nazývá virulence. Jedním ze způsobů, jak získat přehled o specifických faktorech přispívajících k virulenci, bylo identifikovat genetické rozdíly mezi patogeny a blízkce příbuznými nepatogenními bakteriemi. (Ochman, 2000)

2.1.9.1. Patogenita a infekce

Vědecké studium nemoci se nazývá patologie. Patologie se nejprve zabývá příčinou nebo etiologií onemocnění. Za druhé se zabývá patogenezí, což je způsob, jakým se nemoc vyvíjí. Za třetí se také zabývá strukturálními a funkčními změnami způsobenými nemocí a jejich účinky na tělo. (Tortora, a další, 2019) Patogenita je schopnost mikroorganismu vyvolat onemocnění. Dle vnímavosti hostitele může být popsán jako obligátní patogen nebo jako oportunní patogen. Obligátní (primární) patogeny jsou organismy, o kterých se uznává, že způsobují onemocnění u zdravých jedinců. Při rozhodování, zda konkrétní organismus, který byl izolován, je patogen, musíme také vzít v úvahu, jestli hostitel nemá základní onemocnění, které může ovlivnit náchylnost k infekci. (Mahon, a další, 2015) Infekce je invaze nebo kolonizace těla patogenními mikroorganismy. Onemocnění nastává, když infekce vede k jakékoli změně zdravotního stavu. Infekce ale může existovat i v nepřítomnosti detekovatelného onemocnění (bez příznaků). Jen málo mikroorganismů je patogenních. Ve skutečnosti může přítomnost některých mikroorganismů hostiteli dokonce prospět. (Tortora, a další, 2019)

2.1.9.2. Virulence

Virulence je měřítkem patogenity organismu. Stupeň virulence přímo souvisí se schopností organismu způsobit onemocnění navzdory mechanismům rezistence hostitele. Existuje několik proměnných, které mohou ovlivňovat virulenci. Například počet infikujících bakterií, místo vstupu do těla, specifické a nespecifické obranné mechanismy hostitele a faktory virulence samotné bakterie. Lze ji experimentálně stanovit určením počtu bakterií, které způsobily onemocnění zvířat nebo jejich smrti. K tomu se používají výpočty účinné dávky způsobující symptom onemocnění u 50 procent populace zvířat (ED_{50}) nebo výpočty letální dávky ovlivňující 50 procent populace zvířat (LD_{50}). Tyto údaje jsou užitečné při srovnávání virulence různých typů bakterií. (Peterson, 1996)

2.2. Přenašeči a původci

2.2.1. Lékařská a veterinární entomologie

Lékařská entomologie je studium hmyzu, nemocí přenášených hmyzem a dalších souvisejících problémů, které ovlivňují lidi a veřejné zdraví. Veterinární entomologie je studium hmyzu a problémů souvisejících s hmyzem, které postihují zvířata, zejména hospodářská a společenská zvířata. Oblasti lékařské a veterinární entomologie tradičně zahrnují zdravotní problémy týkající se pavoukovců (zejména roztočů, klíšťat, pavouků a štírů). Alternativně se studium problémů souvisejících se zdravím pavoukovců nazývá lékařsko-veterinární arachnologie. Pokud se uvažuje pouze o roztočích a klíšťatech, tak lékařsko-veterinární akarologie. (Mullen, a další, 2019)

2.2.2. Klíště obecné (*Ixodes ricinus*)

Klíšťata jsou dobře známými přenašeči lidských a veterinárních patogenů. Přenášejí větší množství infekčních organismů než jakákoli jiná skupina členovců sajících krev. Pokud jde o jejich význam pro veřejné zdraví, nachází se hned na druhém místě za komáry. Klíšťata přenášejí prvoky, virové, bakteriální a houbové patogeny. U lidí se ročně objeví tisíce případů onemocnění přenášených klíšťaty způsobených těmito původci a výskyt onemocnění celosvětově stoupá. Kromě toho mohou kousnutí klíštěte způsobit toxické reakce, alergické reakce nebo dokonce smrtelné ochrnutí. Rány, které způsobí, mohou vytvořit vstupní místa pro sekundární mikrobiální infekce. Studium klíšťat tak výrazně přispělo k naší schopnosti porozumět a kontrolovat šíření infekčních nemocí. (Nicholson, a další, 2019)

Klíšťata parazitují převážně na obratlovcích. Jako ektoparazité se živí krví a lymfou svých hostitelů. (Singh, 2007) Všechna klíšťata jsou během svého larválního, nymfálního a dospělého stádia epidermální parazité. Mnoho roztočů může parazitovat na kůži, dýchacím systému nebo jiných orgánech svých hostitelů nebo v nich. Klíšťata se nacházejí téměř v každé zemi světa. Po celém světě se ročně utratí mnoho milionů dolarů na pokusy o kontrolu těchto škůdců a nemocí, které přenášejí. (Roberts, a další, 2008)

2.2.2.1. Taxonomie a fylogeneze

Klíšťata patří do kmene Arthropoda (členovci), třídy Arachnida (pavoukovci), podtřídy Acari (roztoči), nadřádu Parasitiformes, řádu Ixodida (klíšťatovci). (Krantz, 2009) Klíšťata jsou výhradně parazitická. Ixodida obsahuje tři existující čeledi: Ixodidae (klíšťatovití), Argasidae (klíšťákovití) a Nuttalliellidae. Ixodidae se dělí na Prostriata, reprezentovanou jediným rodem *Ixodes* (klíště) s 244 druhy a Metastriata se 459 druhy, zahrnujícími dalších 14 rodů. V této skupině je 707 uznaných druhů, což představuje asi 78 % všech druhů klíšťat, které byly popsány. Argasidae obsahují čtyři rody a asi 190 druhů. Nuttalliellidae je monospecifická čeleď, zastoupená pouze jedním druhem, *Nuttalliella namaqua*. (Gugliemone, a další, 2010)

2.2.2.2. Anatomie a fyziologie

2.2.2.2.1. Vnější anatomie

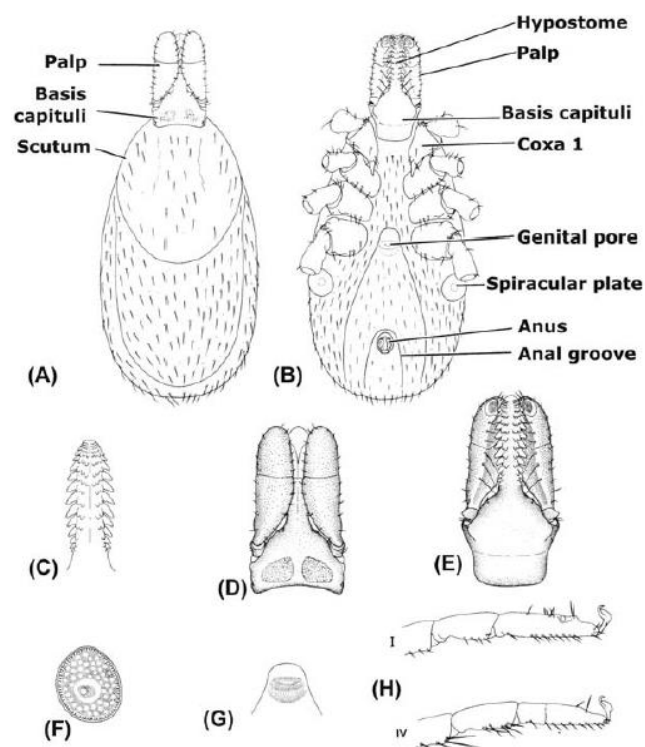
Dospělá klíšťata jsou dorzoventrálně zploštělá, mají oválný tvar a jsou asi 2–23 mm dlouhá. Velikost závisí na druhu a na tom, zda jsou nekrmená nebo plně prokrvená. Samice jsou obvykle větší než samci, protože přijímají větší krevní potravu. (Service, 2012)



Obrázek 6: *Ixodes ricinus* (larva, nymfa, samec, samice) (Ticksafety.com, 2023)

Povrch těla obsahuje jedinou vrstvu buněk (epidermis), která na vnější straně vylučuje nebuněčnou kutikulu a která je od hemolymfy oddělena bazální laminou. Mezi epidermálními buňkami jsou rozptýleny četné specializované buňky, včetně dermálních žláz, které ústí na povrch přes drobné póry. Kutikula klíšťat je často pigmentovaná. (Eldridge, a další, 2004)

Tělo je dělitelné různými způsoby. V zásadě jej lze rozdělit na přední část (gnathosoma) a zadní část (idiosoma). Idiosoma se dále dělí na oblast nesoucí nohy (podosoma) a zbývající část (opisthosoma). Přední hlavová část bývá nazývána také termínem kapitulum. Tvoří ho segmentované palpy (makadla), chelicery a hypostom (chobotek). Kapitulum klíšťat se nachází na předním konci těla. Chelicery se nacházejí na hřbetní straně hlavy. Každá chelicera se skládá ze dvou článků. Slouží k proniknutí hostitelských tkání během přichycení. Hypostom je ventrálně umístěná struktura, která na svém povrchu nese řadu zpětně zakřivených zoubků. Palpy se skládají ze čtyř odlišných segmentů. U nymf a dospělých jedinců většiny druhů je malý koncový (čtvrtý) segment zapuštěn v dutině třetího segmentu a na svém konci nese četné jemné chlupy. (Nicholson, a další, 2019) Zadní část nese tři (u larev) nebo čtyři (u nymf a dospělých) páry nohou a také vnější otvory (stigmata nebo spirakuly) dýchacího systému a různé smyslové a sekreční struktury. (Eldridge, a další, 2004) U čeledi Ixodidae je hřbetní štítek (scutum) nejdůležitějším znakem odlišujícím od čeledi Argasidae. Scutum je u samic a nymf mnohem menší a nachází se na předním dorzálním povrchu. U samců pokrývá celý povrch dorzálního těla. (Sonenshine, a další, 2014)

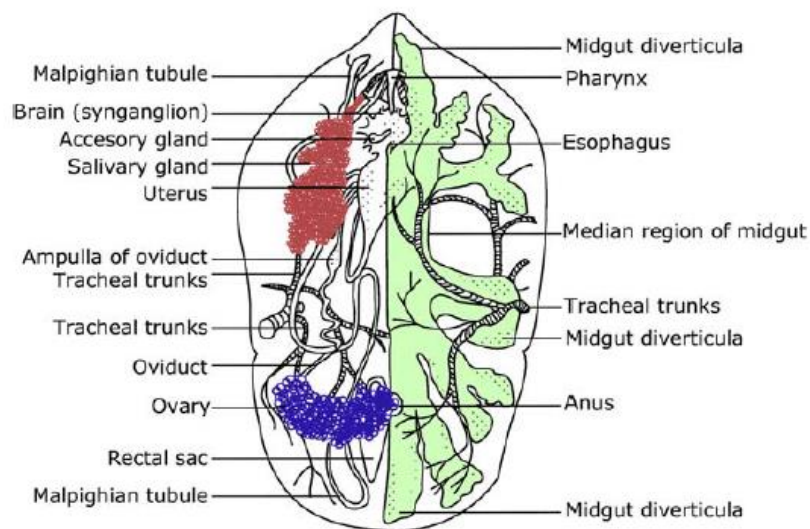


Obrázek 7: Vnější anatomie *Ixodes ricinus* (samice) (A) Dorsální pohled, (B) Ventrální pohled, (C) Hypostom, (D) Kapitulum, (E) Kapitulum – ventrální pohled, (F) Spirakulum, (G) Genitální otvor, (H) Nohy (Nicholson, a další, 2019)

2.2.2.2.2. Vnitřní anatomie

Orgány jsou obklopeny cirkulující tekutinou, která se nazývá hemolymfa. Hemolymfa je vodné médium bohaté na soli, aminokyseliny, rozpustné proteiny a další rozpuštěné látky. Kromě toho obsahuje několik typů hemocytů, z nichž nejvýznamnější jsou plazmatocyty a granulocyty. Tyto buňky se uplatňují především při fagocytóze invazních mikrobů, ale mají i jiné funkce. (Matsuo, a další, 2007)

Jednoduché srdce, umístěné uprostřed dorzálně, filtruje a cirkuluje tuto životně důležitou tělesnou tekutinu. Svaly se rozprostírají od dorzálních a ventrálních kutikulárních povrchů k vnitřním strukturám. Nejvýraznějším vnitřním orgánem je střední střevo, velký vakovitý útvar s četnými postranními divertikly. Tvar středního střeva závisí na stavu prokrvení. Dýchání je zajištěno tracheálními trubicemi. U klíšťat je vylučování prováděno Malpighovými trubicemi, párem dlouhých stočených struktur, které ústí do rektálního vaku. Centrální nervový systém u klíšťat je srostlý do synganglia, který reguluje funkci výše popsaných struktur. Klíšťata obsahují také párové slinné žlázy, které jsou spojeny slinnými kanálky s ústním ústrojím. Slinné žlázy obsahují farmakologicky aktivní sloučeniny, které usnadňují přichycení a potlačují zánětlivé reakce hostitele. (Nicholson, a další, 2019)



Obrázek 8: Interní anatomie klíštěte (samice), střední střevo na levé straně odstraněno, na pravé straně ponecháno (Nicholson, a další, 2019)

2.2.2.3. Proces přichycení a sání klíštěte

Proces sání, dokonce ani na preferovaných hostitelích, není jednotný proces. Sání začíná brzy po kontaktu a přijetí rozpoznávacích znaků, které určují, že zvíře je vhodným hostitelem. Klíště se zařízne do kůže chelicerami a vloží svůj hypostom, aby zahájil proces přichycení. Následně klíště začne slinit do vznikajícího hematomu a sát krev. Slinění a sání krve se střídají. Klíště vstříkuje do rány antikoagulační a antihemostatické sloučeniny. (Nicholson, a další, 2019)

Klíšťata, která se živí stejným hostitelem, se však často setkávají se značným odporem a nejsou schopna se nasytit. Poté mohou odpadnout nebo dokonce zemřít, což je fenomén známý jako získaná odolnost vůči kousnutí klíštětem. (Wikel, 2014)

Trávení krve probíhá u klíšťat ve středním střevě. Erytrocyty a další krvinky jsou lyzovány brzy po požití. Hemoglobin z lyzovaných buněk se váže na receptory na epiteliálních buňkách středního střeva a je začleněn procesem známým jako receptorem zprostředkovaná endocytóza do drobných vakuol v trávicích buňkách. (Coons, a další, 1986) Následně kaskáda proteolytických enzymů tráví hemoglobin, uvolňuje dipeptidy a volné aminokyseliny pro transport ven z buňky do hemolymfy (Horn, a další, 2009)

Typická doba přichycení se pohybuje od 2 dnů u larev, až do 13 dnů u samic. Po dokončení krmení se hmotnost krve a dalších spotřebovaných tekutin pohybuje od 11 do 17násobku tělesné hmotnosti klíštěte před sáním. Měření objemu spotřebované krve se u různých druhů pohybuje od 0,7 ml do 8,9 ml na samici. (Nicholson, a další, 2019)

2.2.2.4. Chování a ekologie

Mnoho druhů klíšťat je více či méně specifických pro hostitele. Například některé druhy parazitují výhradně na ptácích, jiné na plazích nebo na určitých druzích savců, jako jsou netopýři, psovitě šelmy nebo turovití. Některé druhy se ale živí téměř všemi dostupnými hostiteli, včetně lidí. (Service, 2012)

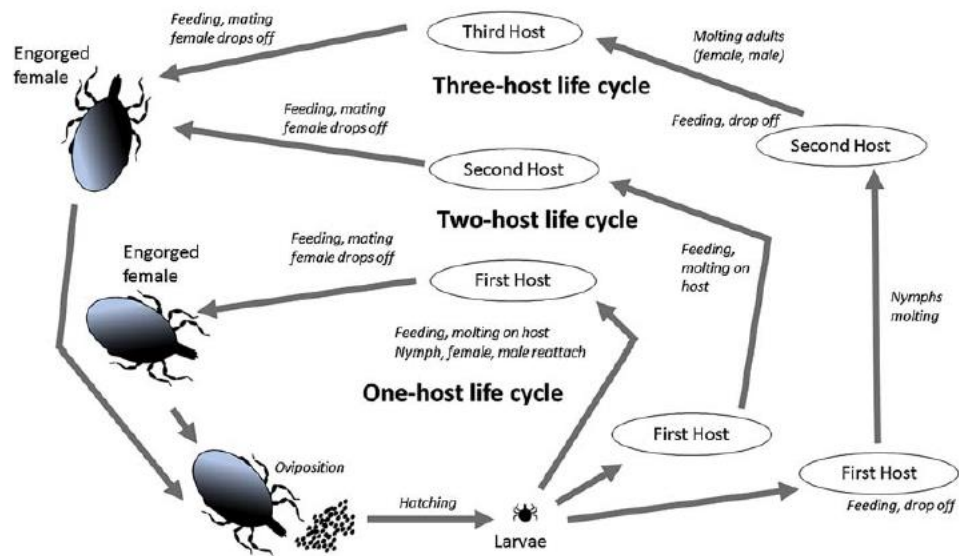
Většina druhů klíšťat žije v lesích, savanách, oblastech druhého růstu křovin a křovin a travnatých loukách. Jiní zůstávají pohřbeni v písku nebo písčité půdě, pod kameny, ve štěrbinách nebo v podestýlce a hnijící vegetaci lesů a pastvin. Klíšťata jsou aktivní v určitých obdobích roku, kdy klimatické podmínky podporují vývoj a rozmnožování. (Nicholson, a další, 2019)

Klíšťata si vyvinula několik různých strategií, které jim pomáhají při lokalizaci potenciálních hostitelů. Buď se vyskytují na vnořené vegetaci jako jsou stébla trávy nebo dřeviny, kde čekají na procházejícího hostitele, na kterém se poté uchopí. (Sonenshine, a další, 2014) Nebo mohou vylézat ze svých úkrytů, když jsou vzrušena pachy hostitele a aktivně ho vyhledat. Po kontaktu s potenciálním hostitelem z obratlovců musí klíště vnímat vhodné signály pro rozpoznání hostitele, které mu umožní určit, zda se má přisát a nakrmit, nebo zda ustoupit a pokračovat v hledání hostitele. Pachy, sálavé teplo, vizuální obrazy nebo vibrace stimulují klíště a umožňují mu rozpoznat potenciálního hostitele. Pachy jsou asi nejdůležitější podněty. (Nicholson, a další, 2019) Mezi důležitější atraktanty emitované hostiteli patří oxid uhličitý v dechu zvířat a amoniak v moči a dalších živočišných odpadech. Dalšími pachy, které přitahují klíšťata, jsou kyselina máselná a kyselina mléčná, která se běžně vyskytuje v potu a další tělní tekutiny. V různých experimentech byly také používány např. aceton a 1-okten-3-ol. Ukázalo se, že tyto chemické látky také přitahují klíšťata. (Carr, a další, 2016)

U mnoha druhů, které obývají mírné nebo boreální oblasti světa, klíšťata mohou přestat vyhledávat hostitele a přezimovat hluboko v hniající vegetaci, písku nebo trhlinách a štěrbinách v půdě, kde se mohou ukrýt před mrazem. Tento jev se nazývá diapauza a prodlužuje životní cyklus minimálně na jeden a někdy i více let. (Sonenshine, a další, 2014) Diapauza je tedy důležité chování, které klíšťatům umožňuje přežít nepříznivé podmínky prostředí a šetřit energii, dokud podmínky nejsou lepší. Klíšťata se stávají neaktivními, snižují rychlost metabolismu a neživí se na hostitelích. (Gray, a další, 2016)

2.2.2.5. Životní cyklus

Životní cyklus klíšťat zahrnuje vajíčko, jednu larvu, jednu nymfu a dospělce (samce a samice), ačkoli několik druhů má pouze samice, které se rozmnožují partenogeneticky. Některé druhy (několik z nich hospodářsky významných) mají cyklus klíšťat s jedním hostitelem. Tato klíšťata zůstávají na hostiteli po celou dobu parazitické fáze včetně přeměny na nymfu a dospělce. Oddělují se od něj jako nasycené samice. Jiné druhy mají cyklus klíšťat se dvěma hostiteli, charakterizovaný larvami, které se živí a oddělují od hostitelů jako přeplněné nymfy. Nymfy se mění v dospělce volně v prostředí a výsledné samice se přichytí k jinému hostiteli, aby dokončili parazitický cyklus. Některé druhy mají tříhostitelský cyklus, kdy se oddělují od hostitele už jako larvy. Zbytek cyklu pak probíhá jako předchozí příklady. (Nava, a další, 2017)



Obrázek 9: Tříhostitelský životní cyklus klíštěte (Nicholson, a další, 2019)

2.2.2.6. Nemoci přenášené klíšťaty

Klíšťata jsou široce obávaná kvůli jejich roli při přenosu nemocí lidí a zvířat. Příklady lidských onemocnění způsobených patogeny přenášenými klíšťaty zahrnují lymeskou boreliózu, horečku Rocky Mountain, středomořskou tečkovanou horečku, anaplazmózu, tularémii, klíšťovou horečku Colorado, klíšťovou encefalitidu atd. Příklady nemocí hospodářských a společenských zvířat přenášených klíšťaty zahrnují babeziózu, theileriózu, anaplazmózu, lymeskou boreliózu, ehrlichiózu a další. Kromě přenosu nebezpečných infekčních patogenů může kousnutí klíštěte vést k závažným toxickým reakcím, alergickým reakcím nebo dokonce smrtelným paralytickým příznakům. Klíšťata mohou působit velmi negativně, přestože nepřenášejí škodlivé patogeny. Napadení klíšťaty je škodlivé pro hospodářská zvířata a domácí zvířata, často zraňuje jejich kůži a zanechává otevřené rány, které se mohou infikovat. Velké zatížení klíšťaty může také vést ke snížení přírůstku hmotnosti, ztrátě produkce mléka nebo potratu. V některých oblastech světa je živočišná výroba téměř nemožná bez velkých investic do hubení klíšťat. (Sonenshine, a další, 2014)

Ačkoli přesné údaje nejsou k dispozici, celosvětová ekonomická ztráta způsobená nemocemi nebo zamořením klíšťaty, spolu s náklady na očkování a léčbu akaricidy, se odhaduje na miliardy dolarů ročně. Navzdory mnoha pokrokům v boji proti klíšťatům a nemocem přenášeným klíšťaty, dále ohrožují zdraví lidí a zvířat na celém světě. (Jongejan, a další, 2004)

2.3. Lymeská borelióza

Lymeská borelióza byla poprvé rozpoznána v roce 1976 v městě Old Lyme ve státě Connecticut v USA, kdy byly zjištěny případy juvenilní artritidy. Mnoho z těchto pacientů také hlásilo kožní léze, které byly podobné těm, které byly hlášeny v Evropě a které byly již dříve spojeny s kousnutím klíštětem. V roce 1982 byla za příčinu určena spirochéta nalezená u klíšťat rodu *Ixodes*. (Burgdorfer, a další, 1982) Dnes je lymeská borelióza diagnostikována a léčena v časných stádiích onemocnění u naprosté většiny pacientů, to však nesnižuje její význam pro veřejné zdraví. Nadále se jedná stále o nově se vyvíjející infekční onemocnění, přičemž rozšiřující se škála klíšťových vektorů je klíčovým faktorem jeho zvýšeného výskytu. Objev onemocnění v polovině 70. let odstartoval zrychlenou fázi vyšetřování, která vyústila v potvrzení infekční etiologie. Rozsáhlý klinický a laboratorní výzkum přinesl významný pokrok v porozumění patogenezi, diagnostice a léčbě infekce *Borrelia burgdorferi* a v objasnění interakcí patogen–hostitel–vektor. (Sood, 2011)

2.3.1. Etiologie

Lymeská borelióza, známá také jako erythema chronicum migrans, Bannwarthův syndrom a klíšťová meningopolyneuritida, je onemocnění přenášené klíšťaty způsobené spirochetami ze skupiny příbuzných druhů známých jako komplex *Borrelia burgdorferi sensu lato (s.l.)*. (Nicholson, a další, 2019) Tato rozšiřující se skupina nyní zahrnuje nejméně 23 pojmenovaných genospecií a mnoho uznávaných genotypů. Mezi druhy *B. burgdorferi s.l.*, které jsou důležitými patogeny pro člověka, jsou např. *Borrelia burgdorferi sensu stricto (s.s.)*, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii* nebo *B. miyamotoi*. Další druhy infikují lidi příležitostně nebo zřídka (např. *B. bissettii*, *B. lusitaniae*, *B. americana*, *B. mayonii*). (Golovchenko, a další, 2016)

Ve stejném ekosystému může cirkulovat mnoho druhů borelií, což má za následek, že jedno klíště může být infikováno dvěma nebo více druhy borelií, virem TBE a dalšími druhy pro člověka patogenních bakterií. V celé Evropě je 13 % infekcí *Borrelia* u *Ixodes ricinus* smíšených infekcí (Rauter, a další, 2005) Vícenásobná infekce klíštěte může nastat, protože hostitel, kterým se klíště živilo, měl vícenásobnou infekci nebo protože se klíště živilo dvakrát nebo vícekrát na hostitelích infikovaných různými *Borrelia spp.* V Evropě ve smíšených infekcích převládají *B. garinii* a *B. valaisiana*, následované smíšenými infekcemi *B. garinii/B. afzelii*. (Piesman, a další, 2008)

2.3.2. Epidemiologie

Epidemiologie lymeské boreliózy u lidí je úzce spojena s životním cyklem klíštěte, jeho stanovištěm a interakcí mezi klíštětem, hostitelem (včetně člověka) a konkrétními druhy borelií, kterých se to týká. V Evropě jsou za hlavní přenašeče boreliózy považovány tři druhy klíšťat: *I. ricinus*, *I. hexagonus* a *I. uriae*. (Piesman, a další, 2008) V Severní Americe se jedná o *I. scapularis*, *I. pacificus* a *I. persulcatus* v Eurasii. Přestože všechny tyto druhy klíšťat mají jedinečné aspekty jejich biologie a ekologie, sdílejí důležité rysy, které mají za následek jejich dopad na veřejné zdraví. Jsou široce rozšířeny na rozsáhlých územích severní polokoule, kde jsou vyšší srážky a převládají listnaté a smíšené lesy. V tomto prostředí nižších vegetačních vrstev a listnatém opadu nalézají celoročně vhodné životní podmínky. (Piesman, a další, 2011)

Lymeská borelióza se tedy vyskytuje v Severní Americe (od hranic s Mexikem na jihu po jižní kanadské provincie na severu), celé Evropě, části severní Afriky (Maghreb) a severní Asii (ruská Sibiř a Dálný východ, Sachalin, Japonsko, Čína a Korea). V Severní Americe jen několik států USA nehlásí nebo dokonce nezaznamenává výskyt toho onemocnění (Aljaška, Arizona, Montana, Nebraska, Nové Mexiko a Wyoming). Občas se objevují zprávy o výskytu onemocnění na jižní polokouli, ale nikdy nebyly spolehlivě potvrzeny. (Hubálek, 2009)

V Severní Americe je lymeská borelióza nejrozšířenější v Nové Anglii, na Středozápadě, v Kalifornii a v Oregonu. Tyto oblasti představují 15 000 až 20 000 hlášených případů každý rok. (Steere, a další, 2004) V severní Evropě je onemocnění endemické ve většině zemí. Nejvyšší míra infekce je v Německu, Rakousku, Slovinsku a Švédsku. (Lindgren, a další, 2006) V České republice bylo v období od roku 2007 až 2016 hlášeno 39 074 případů lymeské boreliózy s průměrným výskytem 37,3/100 000 obyvatel na rok. Tato incidence řadí Českou republiku mezi evropské země s vyšším výskytem onemocnění. (Kříž, a další, 2018) Přestože je míra infekce u dospělých klíšťat v evropských populacích *I. ricinus* vyšší (průměr 17,4 %, rozmezí 3–58 %) než u nymf (průměr 10,8 %, rozmezí 2–43 %), nymfy jsou obvykle důležitější pro přenos patogenů na člověka než samice dospělých klíšťat. (Hubálek, a další, 1998) Většina pacientů přichází od května do října, ale případy jsou diagnostikovány po celý rok. Nejvyšší výskyt byl zjištěn u dětí ve věku 5-9 let a u dospělých ve věku 60-74 let. (Berglund, a další, 1995) Nebyl nalezen významný rozdíl ve výskytu onemocnění u mužů a u žen, ale bylo zjištěno, že opakované infekce se vyskytují častěji u žen. (Bennet, a další, 2002)

2.3.3. Patogeneze

Termín patogeneze znamená řetězec událostí vedoucích ke konkrétnímu onemocnění v důsledku řady změn ve struktuře nebo funkci buňky, tkáně nebo orgánu, které je způsobeno mikrobiálním, chemickým nebo fyzikálním činitelem. (Kapoor, 2010)

Během přenosu bakterie prochází změnami v genové expresi, které jí umožňují přizpůsobit se savčímu prostředí. Přežití a replikace v dermis zahrnují adaptaci na zvýšenou teplotu, změněné pH a rozdíly v dostupnosti živin, stejně jako odražení vrozených imunitních mechanismů hostitele. Vazba regulátorů komplementu řadou různých proteinů *B. burgdorferi* pravděpodobně hraje klíčovou roli v přežití během infekce a u různých hostitelů obratlovců. Pro lokální a systémové šíření jsou také důležité motilita a chemotaxe. (Radolf, a další, 2021)

Během procesu krmení migrují spirochéty do slinných žláz klíštěte z jeho středního střeva. Poté vnikají spolu s klíšťovými slinami do savčí tkáně v místě přichycení. Při tomto přenosu hrají klíčovou roli vnější povrchové proteiny (Osp – outer surface proteins). (Seinost, a další, 1999)

Při této migraci byly prokázány změny v antigenním složení *Borrelia burgdorferi*. OspA je hlavní protein vnějšího povrchu, když *B. burgdorferi* sídlí v klíšťatech, kde zprostředkovává vazbu na buňky středního střeva. Exprese OspA se snižuje během krmení klíšťat, zatímco OspC se zvyšuje. V době přenosu na zvířecí hostitele tedy převládá OspC. Bylo prokázáno, že OspC chrání spirochéty před požitím makrofágů a před protilátkami. Po infekci by povrchové proteiny, které zprostředkovávají adhezi na fibronektin nebo prvky extracelulární matrix, mohly být důležité v časných stádiích onemocnění. (Ryan, a další, 2018)

Postupně pronikají do krevního řečiště a mohou se šířit po celém těle, často se lokalizují v kloubech, v centrálním nebo periferním nervovém systému a v srdci. Klinické příznaky a symptomy se obvykle objevují během 1-2 týdnů po přisátí infekčního klíštěte. Většina případů se vyskytuje během pozdního jara nebo léta, což se shoduje se sezónní aktivitou nymfálních stádií primárních vektorů. (Piesman, a další, 2011)

2.3.4. Klinický obraz

Lymeská borelióza je diagnostikována klinicky na základě příznaků, objektivních fyzických nálezů, anamnézy možné expozice infikovaným klíšťatům a také sérologických testů. Klinické projevy lymeské boreliózy jsou komplexní a lze je rozdělit do tří různých stádií: akutní-lokalizovaná, akutní-diseminovaná a chronická. (Shin, 2014) Klinická lymeská borelióza je pozoruhodně variabilní, zejména v projevech chronických syndromů. V raném stádiu dochází k nástupu „chřipkových“ příznaků. Dochází k nim po jednom až třítýdenním inkubačním období po přenosu kousnutím klíštětem. Tyto příznaky jsou obecně charakterizovány bolestí hlavy, horečkou, lymfadenopatií, myalgiemi, artralgiemi, bolestmi v krku a ztuhlostí šíje. Méně častými příznaky jsou malátnost, únava, nevolnost a zvracení. Přibližně 60–80 % lidí také vykazuje kruhovou vyrážku v místě kousnutí, nazývanou erythema migrans (EM). (Norris, 2008) Erythema migrans je pomalu se rozšiřující, obvykle kruhová nebo eliptická léze, která často vykazuje jasně červené vnější okraje a částečně centrální projasnění. Většina pacientů má jednu lézi v místě přisátí klíštěte, ale u 25-50 % se může vyvinout mnohočetné satelitní léze. Vyrážka by se neměla zaměňovat s kožními lézemi, které se vyvinou během minut až několika hodin a mají tendenci se rychle zvětšovat po přisátí klíštěte. Ty jsou obvykle výsledkem alergických reakcí přecitlivělosti proteinů ze slin klíšťat. (Steere, a další, 2016) V diseminovaném stádiu po infekci se spirochéty šíří krví a lymfou a dostávají se do dalších orgánů, jako je srdce, klouby a nervový systém. (Shin, 2014) K tomu dochází během dnů až týdnů po neléčené infekci. Časně neurologické projevy zahrnují silnou bolest hlavy a ztuhlost šíje, Bellovu obrnu, bolest nebo abnormální pocity v periferních nervech. Mezi muskuloskeletální příznaky patří bolesti kloubů, šlach, svalů nebo kostí. (Stanek, a další, 2003) Závažnější komplikace se mohou objevit u neléčených pacientů několik měsíců po počáteční infekci spirochéty. Nejčastějším příznakem je chronická artritida. (Chin, 2000) Další potenciální problémy jsou relativně vzácné. Zahrnují poruchy paměti, bolest, necitlivost a řadu možných srdečních komplikací. Někteří pacienti zůstávají s vysilující únavou a dalšími neurologickými komplikacemi i po vyloučení bakterie z těla. (Stanek, a další, 2003) Léčba časného onemocnění 2–3 týdny perorálními antibiotiky (nejčastěji doxycyklinem nebo amoxicilinem) obvykle zabrání nástupu chronických příznaků. Léčba chronických projevů je mnohem komplikovanější a kontroverznější a může zahrnovat více orgánových systémů. (Norris, 2008)

2.3.5. Diagnostika

V současné době je diagnóza časně lymeské boreliózy založena na expozici a typických klinických nálezech. Ačkoli *B. burgdorferi* lze kultivovat z kožních lézí erythema migrans, krve, kloubní tekutiny a mozkomíšního moku, jen málo laboratoří má dovednosti, jak toho dosáhnout. Spirochety jsou zřídka detekovány při jakémkoli druhu přímého mikroskopického vyšetření. Byly vyvinuty postupy amplifikace nukleové kyseliny schopné detekovat sekvence DNA specifické pro *B. burgdorferi* v tělesných tekutinách. Vzhledem k tomu, že kultivace obecně není dostupná, diagnóza v pozdějších stádiích onemocnění obvykle spočívá na průkazu cirkulujících protilátek proti *B. burgdorferi*. Současné doporučení je nejprve provést senzitivní screeningový test (enzymový imunotest) a následně konfirmační imunoblot (Western blot), který detekuje specifické antigeny organismu. (Pottinger, a další, 2018)

2.3.6. Prevence a terapie

Prevence lymeské boreliózy je možná nejúčinnější na úrovni jednotlivce snížením expozice a vyhýbáním se kousnutí klíštětem. Toho může být dosaženo buď vyhýbáním se sezónním lokalitám klíšťat nebo dodržováním osobních ochranných postupů, jako je nošení dlouhých rukávů a kalhot, zastrčení kalhot do bot a používání akaricidů a repelentů např. na bázi pyrethroidů. Důležité jsou také časté kontroly a pečlivé odstraňování přisátých klíšťat. (Norris, 2008) Délka přisátí klíštěte na člověka je také důležitým faktorem přenosu onemocnění. Riziko je mnohem větší, když se klíště krmí alespoň 48 až 72 hodin. (Pottinger, a další, 2018)

Včasná léčba je zásadní pro prevenci chronických projevů. Ačkoli s lymeskou boreliózou není přímo spojena výrazná lidská úmrtnost, tak zdravotní komplikace spojené s chronickými projevy mohou být velmi závažné a zaslouží si další vědecké zkoumání. (Norris, 2008)

2.3.6.1. Pesticidy

Pesticidy (=akaricidy) se aplikují postřikem na dané místo, nebo častěji aplikováním na jednotlivá domácí zvířata. Jiné způsoby používají systémový akaricid nebo zahrnují systémy řízeného podávání, jako jsou obojky impregnované akaricidem s pomalým uvolňováním. Vývoj rezistence vůči akaricidům v posledních letech a jejich nepříznivé účinky na životní prostředí podnítily použití jiných prostředků, jako jsou vakcíny a environmentální management k hubení klíšťat. Jiné strategie využívají feromony nebo CO₂ k přilákání klíšťat do pastí obsahujících pesticidy. (Coons, a další, 2008)

2.3.6.2. Vakcíny

V současnosti existuje několik komerčních vakcín proti klíšťatům. Všechny tyto využívají skutečnost, že hostitelský IgG ve středním střevě klíštěte je imunologicky kompetentní a jako takový je transportován středním střevem do hemolymfy klíštěte. Nejúčinnější vakcíny používají skryté antigeny. Jedná se o antigeny z klíštěte, kterým hostitel nikdy nebyl vystaven před očkováním. Skryté antigeny obvykle vyžadují přeočkování vakcíny. (Coons, a další, 2008)

2.3.6.3. Terapie

Doxycyklin, amoxicilin a cefuroxim jsou antimikrobiální látky první volby pro léčbu časné lymeské boreliózy a artritidy. Alternativami jsou azithromycin a klarithromycin. Odpověď na léčbu je typicky pomalá a vyžaduje pokračování podávání antimikrobiálních látek po dobu 30 až 60 dnů. Chronická lymeská borelióza je s největší pravděpodobností autoimunitní stav, proto by antimikrobiální látky nebyly účinné. (Pottinger, a další, 2018)

2.4. Další příklady onemocnění způsobené klíšťaty

2.4.1. Klíšťová paralýza a alergie

Samice klíšťat, hlavně druhů *Dermacentor* a *Ixodes*, mohou způsobit klíšťovou paralýzu, což je reakce hostitele na toxické látky vylučované ve slinách klíštěte. Lidské případy byly hlášeny ze Severní a Jižní Ameriky, Evropy, Asie, Austrálie a Jižní Afriky. Příznaky se objevují 4–7 dní po kousnutí klíštěte. Může dojít k paralýze postihující nejprve nohy, následně paže a objevuje se problematika s mluvením, polykáním a dýcháním. Nejvážněji jsou ohroženy malé děti do 2 let. (Service, 2012) Kousnutí mnoha druhů klíšťat může způsobit jiné reakce hostitele než paralýzu. Ty se pohybují od drobných, lokalizovaných, zánětlivých reakcí, které odezní brzy po odstranění klíštěte, až po těžké, systémové reakce, které zahrnují kožní vyrážku, horečku, nevolnost, zvracení, průjem, šok a v krajním případě i smrt. (Nicholson, a další, 2019)

2.4.2. Arboviry

Klíšťata přenášejí širokou škálu arbovirů (viry členovců). Viry přenášené klíšťaty se vyskytují v šesti různých virových čeledí (Asfarviridae, Reoviridae, Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Flaviviridae) a nejméně devíti rodech. S jedinou výjimkou (virus afrického moru prasat) jsou všechny viry přenášené klíšťaty RNA viry. Některé viry představují významnou hrozbu pro zdraví lidí (virus klíšťové encefalidity, virus krymsko-konžské hemoragické horečky, virus coloradské klíšťové horečky) nebo hospodářských zvířat (virus afrického moru prasat, virus nairobské nemoci ovcí). (Labuda, a další, 2008)

2.4.3. Rickettsiózy

Rickettsie jsou malé kokobacily, jejichž velikost se pohybuje mezi 0,3 až 0,5 μm . I když je Gramovo barvení negativní, rickettsie přijímají barvení špatně a lépe se prokazují imunofluorescencí. Jejich morfologie je podobná jako u jiných gramnegativních bakterií. (Pottinger, a další, 2018) Rod *Rickettsia* zahrnuje virulentní patogeny, např. *R. prowazekii*, která způsobuje endemický tyfus. Příznaky tyfu jsou bolest hlavy, vysoká horečka, šířící se vyrážka, delirium a bolest svalů a při epidemickém tyfu umírá 10 až 60 % neléčených pacientů. Přenašeči tyfu jsou hlavně vši. Existují také druhy tyfu přenášené klíšťaty. (Gullan, a další, 2014)

Další onemocnění způsobené těmito bakteriemi jsou např. horečka Skalistých hor (*Rickettsia rickettsii*), africká klíšťová horečka (*Rickettsia conorii*), rickettsiové neštovice (*Rickettsia akari*) a Q horečka způsobená *Coxiella burnetii*. (Service, 2012)

2.4.4. Ehrlichioza

Ehrlichia a *Anaplasma* zahrnují několik druhů gramnegativních bakterií přenášených klíšťaty, které způsobují onemocnění zvířat a lidí. Hlavními chorobami jsou granulocytární ehrlichiozu (HGE), která je způsobena *E. chaffeensis*, a lidská granulocytární anaplazmóza (HGA), která je způsobena bakterií *Anaplasma phagocytophilum*. Všechny jsou obligátní intracelulární patogeny, které infikují bílé krvinky. (Pottinger, a další, 2018) Ehrlichioza je rozšířená v Evropě a USA, kde se zdá, že prevalence infekcí narůstá, ale několik případů lidské ehrlichiozy bylo hlášeno také z Venezuely a afrických zemí, jako je Mali, Burkina Faso a Mosambik. (Service, 2012) Příležitostně může být diagnóza ehrlichiozy nebo anaplazmózy navržena pozorováním charakteristických intracytoplazmatických inkluzí v mononukleárních buňkách nebo granulocytech. Diagnóza je obvykle stanovena sérologickými testy nebo diagnostickým testem pro detekci DNA pomocí PCR. Lidská ehrlichioza nebo anaplazmóza se většinou projevuje klesajícím počtem leukocytů, trombocytopenií, anémií a zhoršenou funkcí jater a ledvin. U obou forem se jako lék používá doxycyklin. (Pottinger, a další, 2018)

2.4.5. Tularémie

Tularémie je bakteriální onemocnění způsobené bakterií *Francisella tularensis*, které existují čtyři poddruhy. Vyskytuje se na celé severní polokouli, včetně USA, Evropy, Turecka a části Asie, na Středním východě, v severní Africe a vzácně i v Austrálii. Infikuje především králíky a zajíce, ale také drobné hlodavce, bobry a jeleny, ti všichni mohou být rezervoárovými hostiteli. Infekce se šíří různými metodami přímého kontaktu, jako je manipulace s infikovanými živými zvířaty nebo kadávery, pitím kontaminované vody, vdechováním infikovaných aerosolů, konzumací syrového a tepelně neupraveného masa a také kousnutím různých druhů klíšťat. V Evropě jsou hlavními přenašeči druhy *Ixodes ricinus* a *Dermacentor*. (Service, 2012)

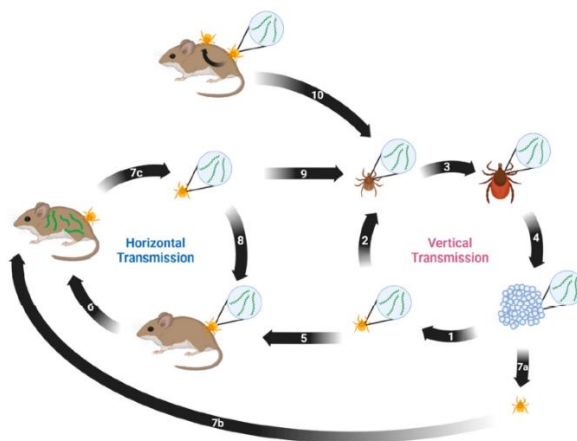
2.5. *Borelia myiamotoi* a návratná horečka RF (Relapsing fever)

2.5.1. Epidemiologie

Rod *Borrelia* zahrnuje skupinu bakterií způsobující onemocnění lymeské boreliózy (*B. burgdorferi* a další podobné druhy spirochét), ale také skupinu bakterií způsobující recidivující horečku (včetně *B. hermsii*, *B. turicatae*, *B. parkeri* a *B. miyamotoi*). Ačkoliv jiné spirochéty s relapsující horečkou infikují především čelď klíšťákovití (Argasidae), přesněji rod *Ornithodoros*, *B. miyamotoi* je výjimkou. Infikuje klasická klíšťata rodu *Ixodes*, která také mohou přenášet *B. burgdorferi*, proto může *B. miyamotoi* pokrývat velmi podobný geografický rozsah. (Della-Giustina, a další, 2001) *Borrelia miyamotoi* byla poprvé pospána v Japonsku v roce 1995, když byly spirochéty izolovány ze středního střeva *Ixodes persulcatus* v krvi *Apodemus argenteus*. (Fukunaga, a další, 1995) Patogenita *B. miyamotoi* byla zjištěna v Rusku v roce 2011, kdy 51 pacientů s podezřením na kousnutí klíštětem mělo nespecifické horečnaté onemocnění. U pacientů bylo zjištěno, že jsou infikováni *B. miyamotoi* pomocí specifické polymerázové řetězové reakce (PCR) nebo imunoglobuliny proti boreliím v séru. Symptomy pacientů se projevily horečkou, bolestí hlavy, zimnicí, únavou a myalgií. U jednoho pacienta došlo k relapsu, kterému bylo možné u jiných pacientů předejít antibiotickou léčbou. (Platonov, a další, 2011)

2.5.2. Přenos patogenů

Borrelia miyamotoi se mohou přenášet horizontálně i vertikálně. K horizontálnímu přenosu dochází mezi vektorem a hostitelem nebo naopak. Vertikální přenos probíhá transovariálně mezi samicí klíštěte a jejím potomkem. Předpokládá se, že oba módy hrají klíčovou roli v přetrvávání *B. miyamotoi* v prostředí. (Cleveland, a další, 2023)



Obrázek 10: Navrhovaný enzootický přenosový cyklus pro *Borrelia miyamotoi* (Cleveland, a další, 2023)

2.5.3. Klinický obraz

Nejčastějšími klinickými projevy infekce *B. miyamotoi* jsou horečka, únava, bolest hlavy, zimnice, myalgie, artralgie a nauzea a vzácně meningoencefalitida. (Burde, a další, 2023) Obvykle se vyskytuje bez výrazné vyrážky nebo vředu v místě kousnutí, čímž se odlišuje od lymeské boreliózy. Po inkubační době, která trvá přibližně týden, následují horečky obvykle po dobu 3-5 dní, během kterých jsou v periferní krvi přítomny spirochéty. Horečnaté období je zakončeno krizovým obdobím s velmi vysokou horečkou. Následné recidivy mohou následovat po zhruba 5-7 dnech. Tento střídavý cyklus febrilních a afebrilních period u neléčených pacientů se může opakovat dvakrát nebo i vícekrát. V závislosti na počtu cyklů může onemocnění trvat několik týdnů a někdy může končit i smrtí. Mezi další příznaky, které se vyskytují, patří bolesti svalů, kloubů, bolesti břicha, průjem a petechiální vyrážka na trupu. (Dworkin, a další, 2008)

2.5.4. Diagnostika

K detekci infekcí *B. miyamotoi* u lidí se nejčastěji používají dvě diagnostické metody, mezi které řadíme detekci DNA/RNA a sérodiagnostiku. (Siński, a další, 2016) *B. miyamotoi* lze identifikovat také mikroskopickým vyšetřením tenkých krevních nátěrů či odstředěného vzorku mozkomíšního moku. (Burde, a další, 2023) K průkazu infekce se experimentálně provádí sérodiagnostika měřením protilátek (IgA, IgG) proti glycerofosfodiester-fosfodiesteráze (GlpQ), což je antigen, který je přítomný u všech RF borelií (včetně *B. miyamotoi*), nikoliv však u *B. burgdorferi s.l.* Vzorky jsou testovány pomocí ELISA a pozitivní séra jsou testována metodou western blot. Je hodnocena dynamika protilátek a diagnostická hodnota. (Koetsveld, a další, 2018)

2.5.5. Terapie a prevence

Při léčbě se využívají antimikrobiální látky, které jsou účinné při odstraňování infekce a jsou stejná jako antibiotika používaná u Lymeské boreliózy, včetně doxycyklinu, tetracyklinu, erytromycinu, penicilinu a ceftriaxonu. Preventivní opatření zahrnují vyhýbání se oblastem, kde se nacházejí klíšťata infikovaná *B.miyamotoi*, správu krajiny a osobní strategie, jako je vhodný oděv, používání akaricidů a kontroly klíšťat s případným rychlým odstraněním. (Burde, a další, 2023)

3. Praktická část

3.1. Materiál a pomůcky

- Analytické váhy (Bel Engineering, Itálie)
- Biohazard box Safemate Eco 1.2 (Bioair, Itálie)
- Běžné laboratorní sklo (Ehrlenmeyerovy baňky, zkumavky)
- Centrifuga Minispin plus (Eppendorf, Německo)
- Centrifugační zkumavky Falkony 50 (CAPP, Dánsko)
- Dekontaminační box aura PCR (BioAir, Itálie)
- Expell PCR zkumavky (CAPP, Dánsko)
- Elektroforetická vana (Scie-Plas, Anglie)
- Flanelová vlajka pro sběr klíšťat
- Chlazené inkubátory Incu-Line (VWR, USA)
- Inkubátor/třepačka pro mikrozukavky PHMT (Grant, Anglie)
- Napěťový zdroj Enduro mini 300 V (Labnet, USA)
- Rukavice nitrilové Sempercare (Semperit, Rakousko)
- Různé typy mikrozukavek (Eppendorf, Německo)
- PCR – Mastercycler X50s (Eppendorf, Německo)
- Pipety různých objemů (Eppendorf, Německo)
- Stereomikroskop binokulární SLX-2 (Helago, Česká republika)
- Špičky pro mikropipety (Eppendorf, Německo)
- UV transiluminátor (Uvitec, Anglie)
- Vortex mixer PV-1 (Grant, Anglie) a ZX4 (Velp, Itálie)

3.2. Chemikálie

- DreamTaq™ DNA Polymerase
- 10x DreamTaq Buffer, dNTP Mix, Ultrapure Water
- DNA Gel Loading Dye
- Ethanol (75 % a 96 %), sterilní glycerol (30 %) a roztok amoniaku (5 %)
- Fosfátový pufr PBS (Phosphate-buffered Saline)
- GeneRuler 1 kb DNA Ladder 5 x 50 µg
- SYBR™ Safe DNA gel stain 400 µl
- Elektroforetický pufr (tris-acetátový TAE)
- UltraPure™ Agarose 100 g

3.3. Lokality sběru a jejich charakteristika

Celkem byly vzorkovány 4 lokality ve 2 krajích ČR (Pardubický a Královehradecký). Odběr vzorků probíhal mezi 9:00 a 17:30. Odběr klíšťat trval na každém stanovišti 3–5 hodin. Jednalo se převážně o lesoparky a městské parky, které jsou hojně navštěvovány. Sběry byly prováděny v květnu a červnu 2022. Sbírání byli pouze dospělci a nymfy.

3.3.1. Hrádek u Nechanic

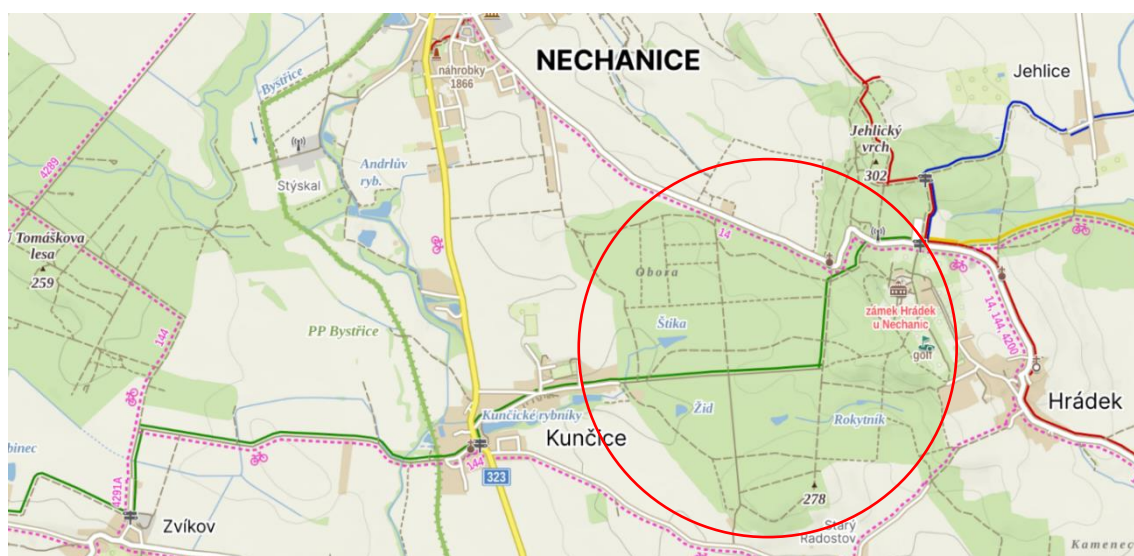
GPS souřadnice: 50.220034N 15.658163E

Nadmořská výška: 263 m. n. m.

Datum sběru: 19. 5. 2022

Čas sběru: 14:00 – 15:30

Počasí: 24 °C, slunečno, listnatý les



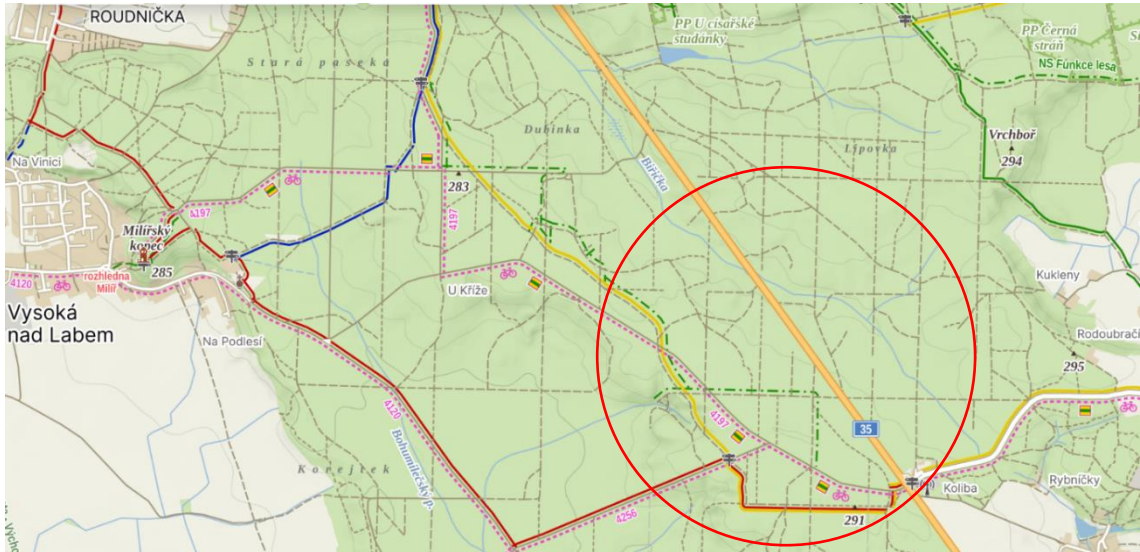
Obrázek 11: Hrádek u Nechanic (Mapy.cz, 2023)

Popis lokality:

Lokalitu Hrádek u Nechanic najdeme mezi městy Hradec Králové a Nový Bydžov. V okolí Nechanic najdeme poměrně rozlehlé lesní celky. Po geologické stránce jsou podkladem převážně jemnozrnné svrchnokřídové sedimenty české pánve. Z půdních typů se zde nejčastěji vyskytují hnědozemě. V okolí najdeme spíše listnaté nebo smíšené lesy s převahou dubu letního (*Quercus robur*). Fauna odpovídá poloze ve východním Polabí. Můžeme zde nalézt stáda daňka skvrnitého (*Dama dama*), v lesích hnízdí čáp černý (*Ciconia nigra*), datel černý (*Dryocopus martius*) či kulíšek nejmenší (*Glaucidium passerinum*). (Faltysová, a další, 2002)

3.3.2. Koliba

GPS souřadnice: 50.142753N 15.887082E
Nadmořská výška: 290 m. n. m.
Datum sběru: 5. 6. 2022
Čas sběru: 9:00 – 11:00
Počasí: 19 °C, deštivo, smíšený les



Obrázek 12: Koliba – Hradecké lesy (Mapy.cz, 2023)

Popis lokality:

Lesní porost v komplexu Novohradeckých lesů v blízkosti motorestu Koliba asi 5 km jihovýchodně od Nového Hradce Králové. V blízkosti se nachází kóta Vrchboř (294 m n. m.) a přírodní památky Černá Stráň a Sítovka. Podkladem jsou svrchnokřídové jemnozrnné usazeniny (vápnité jílovce a slínovce). Převládající půda je pararendzina pseudoglejová. Jedná se o přirozený smíšený lesní porost s převahou borovice lesní (*Pinus sylvestris*), dubu letního (*Quercus robur*) a habru obecného (*Carpinus betulus*) či lípy malolisté (*Tilia cordata*). Mezi rostlinami se zde vyskytuje jaterník trojlaločný (*Hepatica nobilis*), sasanka hajní (*Anemonoides nemorosa*), kopytník evropský (*Asarum europaeum*), svízel lesní (*Galium sylvaticum*). Žije zde typická lesní fauna, jako například káně lesní (*Buteo buteo*), strakapoud velký (*Dendrocopos major*), datel černý (*Dryocopus martius*), veverka obecná (*Sciurus vulgaris*). V některých zachovalých porostech se mohou objevit vzácné druhy motýlů. (Faltysová, a další, 2002)

3.3.3. Pařížov

GPS souřadnice: 50.142753N 15.887082E

Nadmořská výška: 329 m. n. m.

Datum sběru: 14. 5. 2022

Čas sběru: 14:00 – 16:00

Počasí: 19 °C, slunečno, smíšený les



Obrázek 13: Pařížov – Přírodní park Doubrava (Mapy.cz, 2023)

Popis lokality:

Pařížov je vodní přehrada nedaleko obce Běstvina v okrese Chrudim. Je součástí přírodního parku Doubrava, který se nachází na ploše zhruba 430 hektarů. Skály tvoří sedimenty české křídové pánve. Na svazích údolí se nacházejí smrkové porosty a bučiny. Mezi zajímavé jedince místní flory můžeme zařadit např. pryšec mandloňovitý (*Tithymalus amygdaloides*), růže převislá (*Rosa pendolina*), prvosenka vyšší (*Primula elatior*) nebo kostival hlíznatý (*Symphytum tuberosum*). Ze zvířat se zde vyskytuje mlok skvrnitý (*Salamandra salamandra*), vydra říční (*Lutra lutra*), ledňáček říční (*Alcedo atthis*), konipas horský (*Motacilla cinerea*) nebo datel černý (*Dryocopus martius*). U přehrady přezimuje netopýr černý (*Barbastella barbastellus*). (Faltysová, a další, 2002)

3.3.4. Mazurovy chalupy

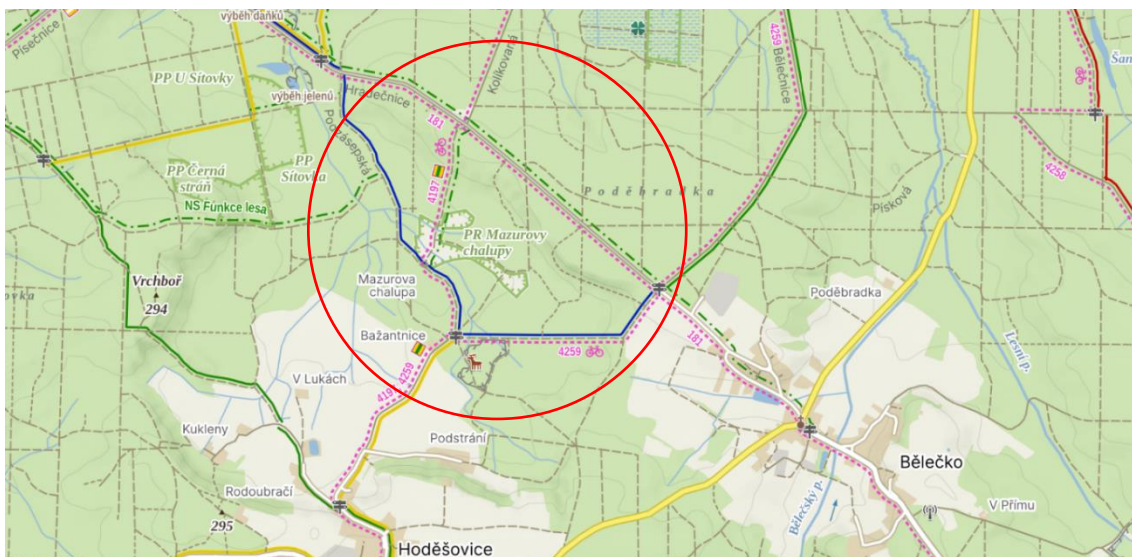
GPS souřadnice: 50.142753N 15.887082E

Nadmořská výška: 261 m. n. m.

Datum sběru: 12. 5. 2022

Čas sběru: 16:00 – 17:30

Počasí: 22 °C, slunečno, jehličnatý les



Obrázek 14: Přírodní rezervace Mazurovy chalupy (Mapy.cz, 2023)

Popis lokality:

Sběr probíhal v okolí přírodní rezervace Mazurovy chalupy. Tato lokalita se nachází severovýchodně od vsi Hoděšovice na pomezí Pardubického a Královehradeckého kraje. Jedná se prostor vlhkých slatinných a mezofilních luk. Nadmořská výška se pohybuje kolem 260–265 m n.m. V okolí se v rámci lesních porostů nacházejí dubohabřiny, doubravy, ale i jehličnaté porosty. Podkladem jsou jílovce a slínovce. Ze zajímavých rostlin zde můžeme najít hořec hořeplník (*Gentiana pneumonanthe*), koromáč kmínolistý (*Silaum silaus*), bařičku bahenní (*Triglochin palustre*) nebo hadilku obecnou (*Ophioglossum vulgatum*). Na loukách je zajímavá především entomofauna. (Faltysová, a další, 2002)

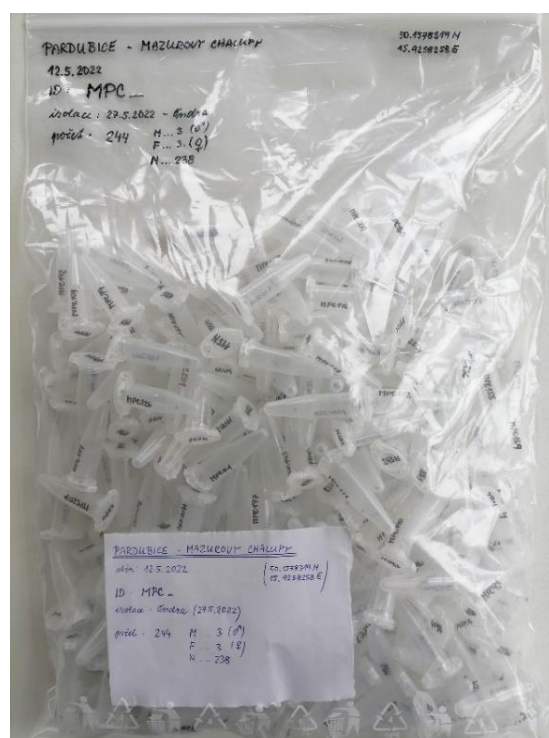
3.4. Metody a postupy

3.4.1. Sběr, uchování a identifikace klíšťat

Sběr klíšťat probíhal v terénu tzv. vlajkováním, kdy se pomocí flanelové látky – vlajky (100 x 100 cm) upevněné na dřevěné tyči smýkalo po vegetaci. Sběry proběhly v květnu a v červnu. Klíšťata uchycená na vlajce byla pinzetou přemístěna do falkon (50 ml). Do nich byly také vloženy stébla trávy, aby se udržela dostatečná vlhkost. Všechna odebraná klíšťata byla skladována při teplotě 4-8 °C po dobu maximálně 24 hodin a byla zpracována další den. Na základě morfologických kritérií byla klíšťata identifikována na úrovni druhu a dále rozdělena podle životní fáze a pohlaví. Morfologické charakteristiky klíšťat byly pozorovány pomocí binokulárního stereomikroskopu SLX-2. Nebyly odebrány žádné larvy. Kromě klíštěte obecného *Ixodes ricinus* nebyly na těchto lokalitách zachyceny jiné druhy klíšťat. Počet vyšetřených klíšťat je uveden v tabulce č.1. Klíšťata byla jednotlivě roztríděna do mikrozkušavek podle lokalit nalezení a poté rozdělena na dvě poloviny. Jedna polovina byla okamžitě extrahována a druhá polovina byla skladována při -80 °C v 30 % glycerolu, pro možnost dalšího výzkumu. Dále byla u vzorků provedena detekce pomocí jedнокrokové polymerázové řetězové reakce (PCR).



Obrázek 15: Identifikace klíšťat pomocí stereomikroskopu (Foto: autor)



Obrázek 16: Klíšťata po roztržení podle lokality sběru (Foto: autor)

3.4.2. Izolace DNA z klíšťat

Izolace byla prováděna v biohazard boxu Safemate Eco 1.2 (Bioair, Itálie). DNA z nymf, samečů a samic dospělých klíšťat byla extrahována pomocí jednoduché alkalické hydrolýzy. Vzorky DNA byly skladovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do analýzy polymerázové řetězové reakce (PCR).

Postup:

Klíště opláchneme ethanolem, vysušíme před izolací na ubrousku. Do mikrozumavek Eppendorf pipetujeme $60\text{ }\mu\text{l}$ PBS. Klíště vložíme do mikrozumavek a rozdrtíme. Připravíme odpovídající počet dalších mikrozumavek a do každé přidáme $100\text{ }\mu\text{l}$ 30 % glycerolu. Z mikrozumavek s rozdrčeným klíštětem odebereme $30\text{ }\mu\text{l}$ a vložíme do glycerolu. Poté zmrazíme na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Do mikrozumavek s klíštětem pipetujeme $45\text{ }\mu\text{l}$ H_2O . Následně přidáme $25\text{ }\mu\text{l}$ 5 % roztoku NH_3 . Mikrozumavky promícháme na vortexu a poté vložíme mikrozumavky do thermobloku na 10 minut. Po uplynutí času mikrozumavky otevřeme na 15 minut a necháme odpařit amoniak. Po dokončení předáme mikrozumavky do inkubátoru a uchováme.



Obrázek 17: Inkubátor ke kultivaci vzorků (Foto: autor)



Obrázek 18: Biohazard box Safemate Eco 1.2 (Foto: autor)

3.4.3. Detekce pomocí jednokrokové PCR

Reakce byla prováděna v termocykleru pro PCR (Mastercycler X50s). Vzorky byly před provedením PCR rozděleny podle jednotlivých lokalit. V rámci jedné lokality byla DNA klíšťat testována v poolích většinou po deseti jedincích. Pokud došlo k pozitivnímu nálezu některého z poolů, PCR se zopakovala pro všech deset jedinců zvlášť, aby se poznalo konkrétní infikované klíště. Před provedením reakce bylo nutné znát sekvenci DNA v amplifikovaném úseku a vybrat správnou sekvenci primerů. (Tabulka č.1)

Tabulka č.1: PCR systémy používané pro screening vzorků na přítomnost patogenů:

Druhy a cílové geny	Primer	Sekvence primeru
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. rrfA-rrlB intergenic spacer	IGSa IGSb	CGACCTTCTTCGCCTTAAAGC AGCTCTTATTCGCTGATGGTA (Derdáková et al., 2003)
<i>Anaplasmataceae</i> family 16S RNA	EHR521 EHR747	TGTAGGCGGTTTCGGTAAGTTAAAG GCACTCATCGTTTACAGCGTG (Chmielewska-Badora et al., 2007)
<i>Borrelia miyamotoi</i> glpQ	BmiyF BmiyR	CACCATTGATCATAGCTCACAG CTGTTGGTGCTTCATTCCAGTC (Fomenko et al., 2010)

Pro úspěšné provedení polymerázové řetězové reakce byla potřeba připravit složky reakční směsi. Reakci připravujeme na ledu. DNA polymerázu vyndáme z mrazáku těsně před použitím. Používáme negativní a pozitivní kontrolu. Pro PCR používáme speciální, tenkostěnné zkumavky. Při přípravě více vzorků (x) si nachystáme master mix pro min. (x + 1) vzorků. Reakční směs připravujeme v objemu 25 µl (konkrétně 23 µl master mixu a 2 µl vzorku). Konkrétní složky jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Složení reakční směsi v celkovém objemu 25 μ l

Složení reakční směsi	Objem [μ l]
Vzorek DNA z klišťete	2
Primer 1	1
Primer 2	1
dNTP mix	1
Reakční pufr	2,5
H ₂ O:	17,38
DNA polymeráza	0,12

Reakce č.1: *Borrelia burgdorferi*

Úvodní denaturace	5 minut při teplotě 95 °C	
Denaturace	60 sekund při 95 °C	} (opakování 35x)
Nasedání primerů	30 sekund při 55 °C	
Extense	60 sekund při 72 °C	
Závěrečná extense	5 minut při 72 °C	
Hold	10 °C	

Reakce č.2: *Borrelia miyamotoi*

Úvodní denaturace	5 minut při teplotě 95 °C	
Denaturace	30 sekund při 95 °C	} (opakování 35x)
Nasedání primerů	30 sekund při 48 °C	
Extense	40 sekund při 72 °C	
Závěrečná extense	10 minut při 72 °C	
Hold	4 °C	

Reakce č.3: *Anaplasma phagocytophilum*

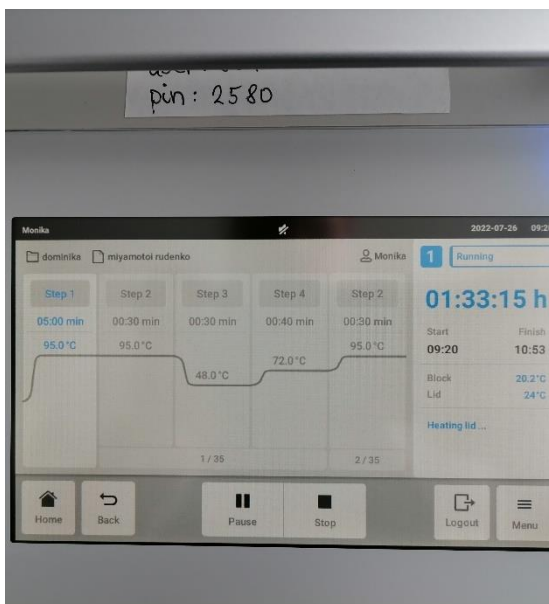
Úvodní denaturace	4 minuty při teplotě 94 °C	
Denaturace	30 sekund při 94 °C	} (opakování 40x)
Nasedání primerů	30 sekund při 55 °C	
Extense	60 sekund při 72 °C	
Závěrečná extense	5 minut při 72 °C	
Hold	10 °C	



Obrázek 19: Příprava poolů pro PCR (Foto: autor)



Obrázek 20: Thermocycler pro PCR (Mastercycler X50s) (Foto: autor)



Obrázek 21: Reakce pro B. miyamotoi (Foto: autor)



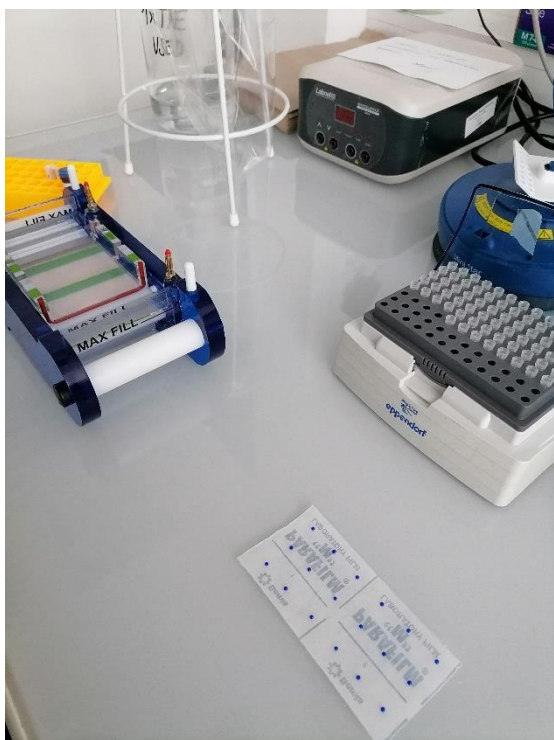
Obrázek 22: Pooly vložené v PCR Thermocycleru (Foto: autor)

3.4.4. Gelová elektroforéza

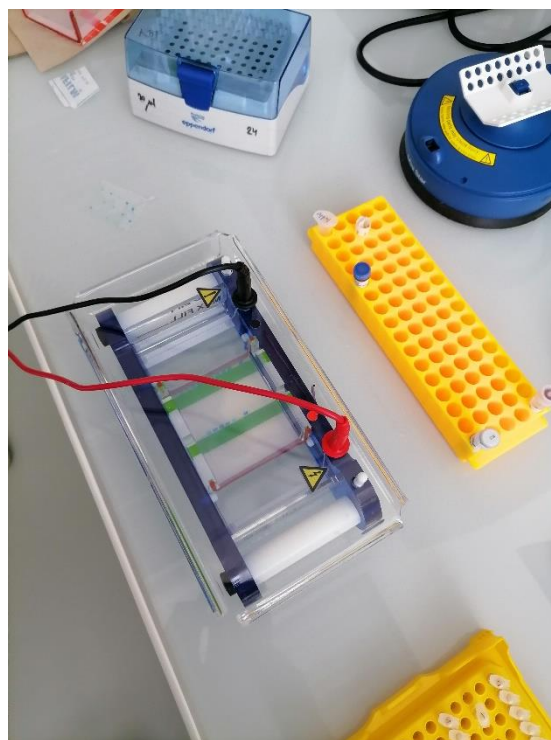
Amplifikovaná DNA byla podrobena elektroforetické separaci na 1 % agarózovém gelu s následnou UV detekcí pro zajištění spolehlivosti a platnosti experimentálních výsledků. Pro všechny testy *I. ricinus* v této práci byly použity negativní a pozitivní kontroly se vzorky DNA pro *B. miyamotoi*, *B. burgdorferi s.l.* a *Anaplasma spp.* Spolu s produkty byl na gel nanášen standard (DNA ladder) pro kontrolu amplifikovaných fragmentů. Jako pozitivní vzorky bylo možné označit ty, u kterých šlo identifikovat viditelný pruh odpovídající pozitivní kontrole (band). Pokud byly výsledky nejasné, došlo k opakování. Po provedení elektroforézy byla zjištěna u některých vzorků prevalence infekce klíštěte *I. ricinus* patogeny *B. miyamotoi*, *B. burgdorferi s. l.* a *Anaplasma spp.*

Postup:

Do baňky nalijeme 40 ml roztoku TAE. Poté přidáme 0,4 g agarózy a zahřejeme v mikrovlnné troubě k varu do rozpuštění. Do roztoku přidáme 6 µl barviva SYBR a vylijeme do připravené elektroforetické vany. Jamky připravíme vložением hřebínku. Agar ztuhne asi po 20-30 minutách. Po ztuhnutí gelu vyndáme hřebínek a zalijeme roztokem TAE, aby byl gel ponořen. Případné bublinky odstraníme špičkou pipety. Do první jamky nanese 3 µl markeru (standard, DNA ladder, loading dye). Do ostatních jamek nanese jednotlivé vzorky, včetně pozitivní kontroly smíchané s 3 µl loading dye. Připojíme ke zdroji napětí a zahájíme elektroforézu (20 minut, 90 voltů). Po uplynutí času odpojíme zdroj napětí, vylejeme roztok TAE a gel přemístíme na UV transiluminátor. Pod UV zářením poté pozorujeme výsledek přes plastový kryt.



Obrázek 23: Gelová elektroforéza I. (Foto: autor)



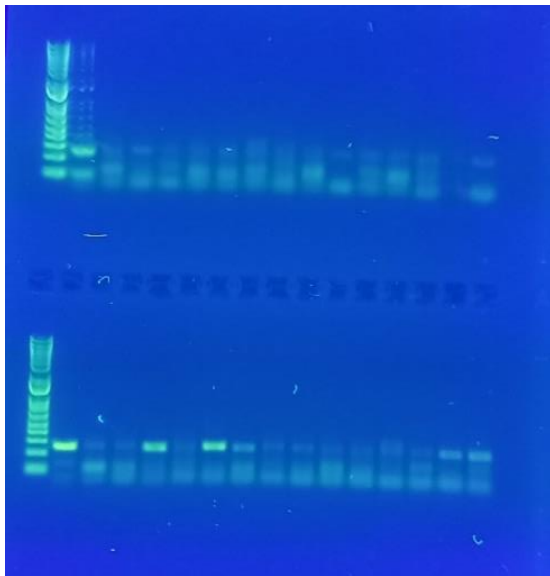
Obrázek 24: Gelová elektroforéza II. (Foto: autor)



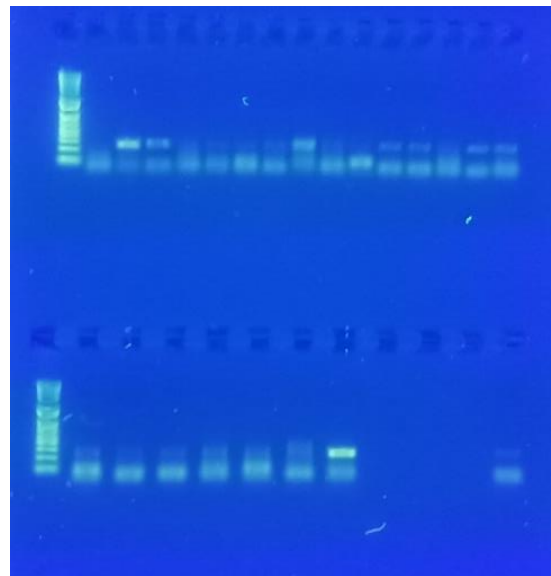
Obrázek 25: Gelová elektroforéza III. (Foto: autor)



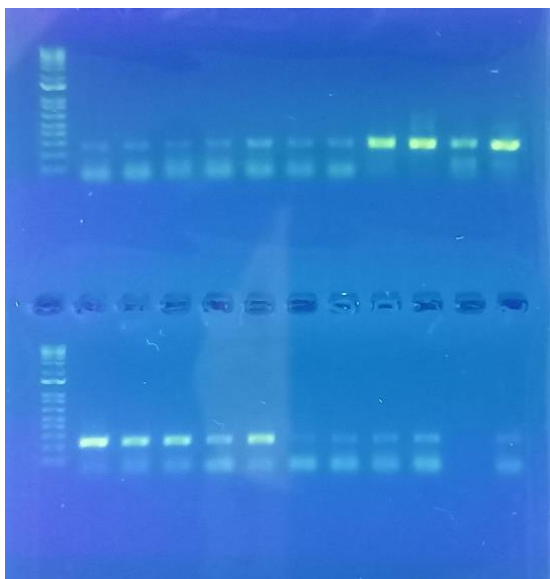
Obrázek 26: UV transiluminátor (Foto: autor)



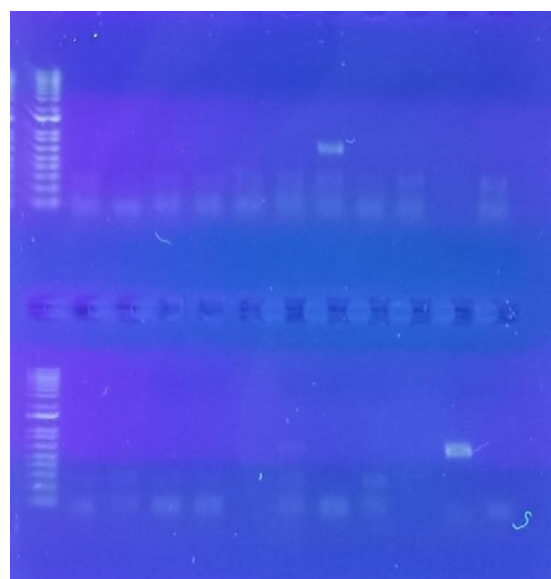
Obrázek 27: *Borrelia miyamotoi* I
– příklad pozitivního vzorku po PCR (Foto: autor)



Obrázek 28: *Borrelia miyamotoi* II
– příklad pozitivního vzorku po PCR (Foto: autor)



Obrázek 29: *Borrelia burgdorferi*
– příklad pozitivního vzorku po PCR (Foto: autor)



Obrázek 30: *Anaplasma phagocytophilum*
– příklad pozitivního vzorku po PCR (Foto: autor)

3.5. Výsledky (sběr klíšťat v oblasti, početnost, pozitivita, prevalence)

3.5.1. Distribuce, početnost a aktivita klíšťat na zkoumaných lokalitách

Celkem bylo v květnu a červnu 2022 nasbíráno 572 klíšťat na 4 lokalitách v Pardubickém a Královehradeckém kraji. Všechna klíšťata byla v nymfálním nebo dospělém stádiu. Nebyly odebrány žádné larvy. Kromě klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*), nebyly na této lokalitě zachyceny žádné další druhy klíšťat. Převládajícím stádiem u druhu *I. ricinus* byly nymfy s 525 jedinci (91,78 %), následovaly samice v počtu 26 (4,55 %) a samci 21 (3,67 %). Počty jednotlivých jedinců ukazují, že v měsíci květnu a červnu je početnost velmi vysoká především u nymfálního stádia. Nejvyšší výskyt klíšťat byl v oblasti Mazurovy chalupy a to 42,66 % z celkového počtu 572 klíšťat. Největší zastoupení samic klíšťat bylo v Pařížově. Nejméně klíšťat bylo nalezeno v oblasti Koliba v Královehradeckém kraji. (Tabulka č. 3)

Tabulka č. 3: Počet klíšťat *I. ricinus* odebraných ze všech studovaných oblastí

Kraj	Místo	<i>Ixodes ricinus</i>			Počet nymf	Počet dospělců	Celkem
		Nymfy	Samice	Samci			
Hradec	Hrádek	108	2	5	108	7	115
Králové	Koliba	80	5	7	80	12	92
Pardubice	Pařížov	99	16	6	99	22	121
	Mazurovy chalupy	238	3	3	238	6	244

3.5.2. Detekce patogenů u klíšťat *Ixodes ricinus*

Přítomnost patogenů přenášených klíšťaty byla potvrzena u 29,5 % (169/572) odebraných klíšťat. Nejčastějším patogenem u infikovaného *I. ricinus* byla *B. burgdorferi s.l.* s 20,45 % (117/572), dále *B. miyamotoi* s 8,39 % (48/572) a *Anaplasma spp.* s 1,05 % (6/572). Mírně vyšší prevalence u všech klíšťat byla zjištěna u měřených lokalit v Pardubickém kraji (30,68 %) oproti Královehradeckému kraji (28,50 %). Nicméně tento rozdíl není nijak extrémně výrazný. (Tabulka č.4)

Tabulka č.4: Celková frekvence patogenů odebraných klíšťat v porovnání obou krajů

Kraj	Porovnání prevalence – všechny zkoumané patogeny – % (n/N)
Hradec Králové	28,50 (59/207)
Pardubice	30,68 (112/365)

Pozn.: N = počet testovaných klíšťat; n = počet infikovaných klíšťat; (%) – prevalence.

Co se týče jednotlivých patogenů, tak pozorujeme vyšší výskyt *B. burgdorferi* s.l. v Pardubickém kraji o 5,6 %, naopak u *B. miyamotoi* je vyšší prevalence v Královéhradeckém kraji o 4,1 %. U *Anaplasma spp.* nepozorujeme výrazný rozdíl v prevalenci. V obou krajích se jedná asi o 1 % infikovaných jedinců. (Tabulka č. 5)

Tabulka č. 5: Frekvence jednotlivých patogenů odebraných v pozorovaných lokalitách

Kraj	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	<i>B. miyamotoi</i>	<i>Anaplasma spp.</i>
	% (n/N)	% (n/N)	% (n/N)
Hradec Králové	16,91 (35/207)	10,63 (22/207)	0,97 (2/207)
Pardubice	22,47 (82/365)	7,12 (26/365)	1,10 (4/365)

Pozn.: N = počet testovaných klíšťat; n = počet infikovaných klíšťat; (%) – prevalence.

Patogeny *B. burgdorferi* s.l. vykazovaly významné rozdíly mezi stádii *I. ricinus* na každém místě. Celková prevalence byla 20,45 % (117/572). Samice měly nejvyšší infekci na lokalitách Koliba (5/5) a Hrádek (2/2), kde byla zaznamenána 100% prevalence. Vysoká prevalence spirochét na těchto lokalitách byla zjištěna také u samců 58,33 % (7/12). Naopak v lokalitě Pařížov nebyl infikován žádný jedinec mezi dospělými jedinci (0/12). U nymf byla největší prevalence v Mazurových chalupách. (Tabulka č. 6)

Tabulka č. 6: Prevalence *B. burgdorferi* s.l. v *I. ricinus* dle stádia a lokality

Lokalita	<i>Nymfy</i>	<i>Samice</i>	<i>Samci</i>	<i>Celkem</i>
	% (n/N)	% (n/N)	% (n/N)	% (n/N)
Hrádek	7,41 (8/108)	100,00 (2/2)	60,00 (3/5)	11,30 (13/115)
Koliba	16,25 (13/80)	100,00 (5/5)	57,14 (4/7)	23,91 (22/92)
Pařížov	11,11 (11/99)	- (0/16)	- (0/6)	9,09 (11/121)
Mazurovy chalupy	28,99 (69/238)	33,33 (1/3)	33,33 (1/3)	29,10 (71/244)

Pozn.: N = počet testovaných klíšťat; n = počet infikovaných klíšťat; (%) – prevalence.

Celková prevalence *B. miyamotoi* ve všech stádiích klíšťat *I. ricinus* byla ve zkoumaných oblastech 8,73 % (50/573). Nejvyšší míru infekce měly dospělci na lokalitě Mazurovy chalupy 33,33 % (2/6). U nymfálního stádia byla nejvyšší prevalence v lokalitách Hrádek a Koliba, kde byla v průměru 11,18 % (21/188). Naopak nejnižší prevalence byla u dospělých stádií v lokalitě Hrádek, kde nebyl infikován ani jeden jedinec. Přítomnost *B. miyamotoi* v samicích byla zjištěna pouze v Pardubickém kraji. Vyšší prevalence v porovnání obou krajů byla vyšší v Královeshradeckém kraji v lokalitách Hrádek a Koliba, kde byla skoro 11 %. (Tabulka č. 7)

Tabulka č. 7: Prevalence *B. miyamotoi* v *I. ricinus* dle stádia a lokality

Lokality	<i>Nymfy</i>	<i>Samice</i>	<i>Samci</i>	<i>Celkem</i>
	% (n/N)	% (n/N)	% (n/N)	% (n/N)
Hrádek	11,11 (12/108)	- (0/2)	- (0/5)	10,43 (12/115)
Koliba	11,25 (9/80)	- (0/5)	14,29 (1/7)	10,87 (10/92)
Pařížov	5,05 (5/99)	6,25 (1/16)	16,67 (1/6)	5,79 (7/121)
Mazurovy chalupy	7,14 (17/238)	33,33 (1/3)	33,33 (1/3)	8,61 (21/244)

Pozn.: N = počet testovaných klíšťat; n = počet infikovaných klíšťat; (%) – prevalence.

Prevalence infekce *Anaplasma spp.* u zkoumaných klíšťat byla výrazně nejvyšší v lokalitě Pařížov, kde bylo infikováno 25 % samic (4/16). Ze všech vzorků se jedná o průměrnou prevalenci 1,05 %. Konkrétně v Pardubickém kraji se jednalo o hodnotu 1,10 % (4/365) a v Královeshradeckém kraji 0,97 % (2/207). Na lokalitě Koliba (0/92) a Mazurovy chalupy (0/244) se nevyskytlo jediné klíště s tímto patogenem. (Tabulka č. 8)

Tabulka č. 8: Prevalence *Anaplasma spp.* v *I. ricinus* dle stádia a lokality

Lokality	<i>Nymfy</i>	<i>Samice</i>	<i>Samci</i>	<i>Celkem</i>
	% (n/N)	% (n/N)	% (n/N)	% (n/N)
Hrádek	1,85 (2/108)	- (0/2)	- (0/5)	1,74 (2/115)
Koliba	- (0/80)	- (0/5)	- (0/7)	- (0/92)
Pařížov	- (0/99)	25,00 (4/16)	- (0/6)	3,31 (4/121)
Mazurovy chalupy	- (0/238)	- (0/3)	- (0/3)	- (0/244)

Pozn.: N = počet testovaných klíšťat; n = počet infikovaných klíšťat; (%) – prevalence.

4. Diskuse

Shromážděná data v této práci lze použít v kontextu početnosti a aktivity, distribuce klíšťat a jejich patogenů a porovnání dvou lokalit Pardubického a Královehradeckého kraje. Sbírký klíšťat jsou především z turistických oblastí nedaleko měst, kde je potvrzena vysoká abundance klíšťat a jejich patogenů. V této studii byly identifikovány tři patogeny: *B. burgdorferi s.l.*, *B. miyamotoi* a *Anaplasma spp.*

Borrelia miyamotoi se vyskytuje na světové severní polokouli, kde kocirkuluje s *B. burgdorferi sensu lato*. Tyto dvě borélie mají překrývající se hostitele obratlovců a klíšťat. Chybějící dostatečné množství kultivovatelných izolátů komplikuje vyšetřování lidské infekce a jejích důsledků. Koinfekce *B. burgdorferi* a *B. miyamotoi* jsou běžně pozorovány jak u obratlovců, tak u klíšťat. (Cutler, a další, 2019) I přesto, že koinfekce u klíšťat jsou poměrně časté, při zkoumání přítomnosti patogenů v této práci nebyl shledán ani jeden případ koinfekce zkoumaných patogenů u všech 572 sesbíraných klíšťat ve zmíněných lokalitách v Pardubickém a Královehradeckém kraji.

V rámci klíšťat vzniká další úroveň složitosti z rostoucího uznání toho, jak mohou různé mikroby usnadnit přežití nebo přenos. Je navržena například ekologická synergie, kdy mezi bakteriemi *B. burgdorferi s.l.* a *Babesia microti* je takový vztah, že si navzájem prospívají (Diuk-Wasser, a další, 2016), ale v současné době nemáme žádné znalosti o takových interakcích pro *B. miyamotoi*. (Cutler, a další, 2019)

Není také zcela jasné, zda koinfekce *B. miyamotoi* a *B. burgdorferi* vede k závažnějšímu onemocnění u lidí, ale u pacientů koinfikovaných *B. miyamotoi* – *B. burgdorferi* nebyl dosud zaznamenán žádný významný nárůst komplikací onemocnění. (Burde, a další, 2023)

Vývoj in vivo modelů by mohl umožnit lepší náhled do lidské patogeneze. Pokračující studie jsou klíčem k lepšímu epidemiologickému porozumění a řízení intervenční strategie. (Cutler, a další, 2019) Důležité také zamyšlení, jak ostatní patogeny přítomné v klíšťatech (včetně jiných borelií) ovlivní přežití, perzistenci a přenosnost *B. miyamotoi*. Tyto informace by v jistých případech umožnily předpovědět rizika a pomohli k modelování cílených intervenčních přístupů.

Přestože se výzkum *B. miyamotoi* od jejího objevení poměrně rozšířil, zůstává mnoho neznámého v oblastech interakce hostitel-patogen, symptomů onemocnění, šíření a dalších různých mechanismů u klíšťat, zvířecích hostitelů a lidských pacientů. Je potřeba zvýšit povědomí o *B. miyamotoi* ve veřejnosti a ve zdravotnictví a je také třeba vyvinout standardizovanou diagnostickou metodu pro infekci *B. miyamotoi*. (Cleveland, a další, 2023) Chápání infekce vychází především z omezené série případů. U nich se lidské infekce většinou projevují jako onemocnění podobné chřipce, s recidivující horečkou a ve sporadických případech neurologickým onemocněním. (Cutler, a další, 2019)

Nespecifický klinický obraz, který může být ovlivňován příznaky lymeské boreliózy nebo jiné koinfekce, komplikuje diagnózu, což přispívá k nižšímu hlášení onemocnění. (Cutler, a další, 2019) Protože klinické projevy jsou nespecifické, diagnóza vyžaduje laboratorní potvrzení pomocí PCR nebo vyšetření krevního nátěru (sérologie). Dynamika přesného přenosu *B. miyamotoi* stále zůstává nejasná a existuje možnost, že případy infekce *B. miyamotoi* u lidí mohou zůstat neodhaleny nebo mohou být špatně diagnostikovány. Pokud známe regionální míru infekce klíšťat, můžeme také zjistit potenciální riziko expozice pro člověka.

Prevalence *B. miyamotoi* nalezená u nymf a dospělých jedinců se v této studii pohybovala od 5,79 % do 10,87 % v závislosti na studované oblasti. V Pardubickém kraji byla prevalence u sesbíraných klíšťat v průměru 7,67 % a v Královehradeckém kraji byla 10,63 %. Vyšší procento v lokalitě Mazurovy chalupy u samic (33,3 %; 1/3) a samců (33,3 %; 1/3) je pravděpodobně způsobeno kvůli malému počtu nalezených dospělých jedinců. Podle zjištěných údajů je výskyt *B. miyamotoi* u klíšťat nižší než *B. burgdorferi* s.l., u které bylo infikováno 20,45 % z celkového počtu sesbíraných klíšťat ze všech čtyř lokalit. Míra prevalence patogenů v klíšťatech odebraných z městských nebo příměstských lesoparků je srovnatelná s oblastmi v jiných částech České republiky. Výsledky této práce ukazují prevalenci u *B. burgdorferi* 20,5 % (117/572). Podobný výsledek a prevalenci 28,1 % v Praze ukazuje například nedávná publikace Richtrová (2022). U jednotlivých patogenů v rámci porovnání obou krajů v této studii pozorujeme vyšší výskyt *B. burgdorferi* s.l. v Pardubickém kraji o 5,56 %, naopak u *B. miyamotoi* je vyšší prevalence v Královehradeckém kraji o 2,96 %. *Anaplasma spp.* u zkoumaných klíšťat byla výrazně nejvyšší v lokalitě Pařížov, kde bylo infikováno 25 % samic (4/16). Ze všech vzorků se pak jedná o průměrnou prevalenci 1,05 %.

Ohledně distribuce infekce *B. miyamotoi* v Evropě, Asii a Severní Americe, byla představena studie Hoornstra (2022), která analyzovala 101 různých studií o prevalenci *Borrelia miyamotoi* u klíšťat: 34 studií v Severní Americe, 60 v Evropě a 7 v Asii. Celkem bylo vyšetřeno 165 637 zkoumaných klíšťat. Jednalo se 49 436 (29,8 %) dospělých jedinců, 98 540 (59,5 %) nymf, 11 864 (7,2 %) larev a 5 797 (3,5 %) jedinců v nespecifikovaném životním stádiu. Z toho bylo 46441 (28,0 %) *I. scapularis*, 24461 (14,8 %) *I. pacificus*, 86488 (52,2 %) *I. ricinus* a 8247 (5,0 %) *I. persulcatus*. Prevalence *B. miyamotoi* u klíšťat *Ixodes* byla 0,7 % (0,6–0,8) v *I. pacificus*, 1,0 % (1,0–1,1) v *I. ricinus*, 1,1 % (1,0–1,2) u *I. scapularis* a 2,8 % (2,4–3,1).“ (Hoornstra, a další, 2022)

Také v rámci střední Evropy bylo vypracováno od roku 2012 do 2020 několik studií určující prevalenci *B. miyamotoi* u klíšťat. Přehled je zobrazen v tabulce č. 9.

Tabulka č. 9: Porovnání prevalence *B. miyamotoi* jiných studií v ČR a sousedních státech.

Autoři studie	Lokace	Rok sběru	Prevalence (%)	Počet klíšťat
Richter et al (2012)	Česká republika	2008-09	3,2	750
Honig et al (2017)	Česká republika	2010	2,1	435
Hamšíková et al (2017)	Slovensko	2011-14	1,7	1696
Vaculová et al (2019)	Slovensko	2011-12	1,0	932
Heglasová et al (2020)	Slovensko	2014-16	1,8	1260
Kiewra et al (2014)	Polsko	2009	2,0	599
Wodecka et al (2014)	Polsko	2014	0,7	880
Sytykiewicz et al (2015)	Polsko	2009-11	0,3	2153
Wodecka et al (2016)	Polsko	2016	0,9	325
Kowalec et al (2017))	Polsko	2012-15	0,3	2993
Kubiak et al (2019)	Polsko	2015	0,9	106
Szekeres et al (2017)	Německo	2014	2,5	714
Blazejak et al (2018)	Německo	2015	2,1	2100
Hauck et al (2019)	Německo	2010-15	1,1	3708
Răileanu et al (2020)	Německo	2018	1,2	2407

Diagnóza onemocnění se určuje potvrzením pomocí specifických laboratorních testů, které mohou zahrnovat krevní nátěr, polymerázovou řetězovou reakci (PCR) nebo stanovení protilátek *B. miyamotoi*. (Burde, a další, 2023) Komerční laboratoře již nabízejí standardní sérologické testy na tyto patogeny, ale stále jsou málo využívány a jejich spolehlivost není stoprocentní. Proto interpretace výsledků sérologických testů na patogeny *Borrelia spp.* přenášené *I. ricinus* by měla být provedena ve spojení s klinickými příznaky pacienta a anamnézou expozice klíšťatům.

V některých případech může být k potvrzení diagnózy lymeské boreliózy vyžadováno další testování. Zvyšování vědomí o nemocech přenášených klíšťaty, včetně rozvoje účinných strategií prevence a kontroly, jsou zásadní pro zmírnění dopadu na veřejné zdraví. Riziko, že se lidé nakazí patogeny přenášenými klíšťaty, je závislé na velkém množství genetických faktorů (na úrovni patogenu, klíšťat a hostitele), sociálních faktorech a dynamice hostitelů, což přidává další složitosti, které jsou důležité při pochopení principu interakcí, distribuce, početnosti a prevalenci klíšťat.

Podstatné je také klima, které nepochybně hraje roli ve změnách v distribuci a sezónním výskytu klíšťat. (Estrada-Peña, a další, 2012) Bohužel součástí tohoto výzkumu nebyl tento aspekt zhodnocen z důvodu malého množství lokalit. Podnebí, hojnost hostitelů a sociální faktory mohou společně vysvětlit vzestup epidemií přenášených klíšťaty na lidi. Několik spolehlivých modelů používá klimatické proměnné jako hnací síly k předpovědi současného a budoucího rozšíření klíšťat nebo dokonce jejich konkrétních fenologických vzorců. Nedávné výsledky potvrzují, že klima hraje klíčovou roli v šíření, sezónnosti a hojnosti několika druhů klíšťat s dopadem na zdraví lidí a zvířat. (Estrada-Peña, a další, 2012) Klíšťata tráví většinu svého životního cyklu v životním prostředí a všechny fáze jsou závislé na složité kombinaci klimatických proměnných pro vývoj a přežití. Dostupnost hostitelů a vegetace také významně modulují dynamiku populací klíšťat. Pravděpodobně mají menší podíl než klima, protože klima je pravděpodobně nejvíce důležité pro přítomnosti nebo nepřítomnosti druhu klíšťat na daném území. (Cumming, 2002) Další směry výzkumu zahrnují vývoj modelů, které by mohly zvládnout složité vztahy mezi kohortami nově narozených a dospělých rezervoárových hostitelů, integrujících vývojové poměry a úmrtnost klíšťat do dynamického rámce. (Estrada-Peña, a další, 2012)

5. Závěr

Tato studie ukazuje přítomnost spirochét *B. miyamotoi*, *B. burgdorferi* s.l a *Anaplasma spp.* v příměstských oblastech a lesoparcích v klíšťatech *I. ricinus* v Pardubickém a Královéhradeckém kraji. Konkrétně se jednalo o oblasti Hrádek u Nechanic, Koliba, Pařížov a Mazurovy chalupy. Přítomnost mnoha necharakterizovaných druhů bakterií a prvoků v klíšťatech a jejich nejistá patogenita podtrhují potřebu dalšího hledání a identifikace s cílem podpořit ochranu lidí a zvířat v těchto oblastech. Klíšťata mohou působit jako přenašeči identických nebo blíže příbuzných patogenů. Studie také poskytuje detekci *B. burgdorferi*, *B. miyamotoi* a *Anaplasma spp.* u klíšťat *I. ricinus* na regionální úrovni.

Výsledky ukazují, že pozitivní patogen z výše zkoumaných byl nalezen vždy alespoň u jednoho testovaného klíšťete *I. ricinus* ve všech zkoumaných lokalitách. Získaná data naznačují, že *B. miyamotoi* je pravděpodobně přítomna v jakékoli oblasti, kde se nacházejí klíšťata rodu *Ixodes*, ale míra prevalence se může v jednotlivých regionech značně lišit. Metoda detekce pomocí PCR využívala amplifikaci parciálního genu *glpQ* pro *Borrelia miyamotoi*, při detekci *Borrelia burgdorferi* s.l. se užíval gen *IGS* a při *Anaplasmataceae family* gen *EHR521*.

Lymeská nemoc (LD) je způsobena spirochétovou infekcí *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia garinii* a *Borrelia afzelii*, což jsou příklady jen několika asi 20 kmenů *Borrelia*, které mohou být přenášeny klíšťaty. Recidivující horečka (RF) je způsobena několika dalšími druhy *Borrelia*, jako jsou *Borrelia miyamotoi*, *Borrelia hermsii*, *Borrelia parkeri* a *Borrelia turicatae*. (Jernigan, a další, 2021) *Borrelia miyamotoi* byla poprvé pospána v Japonsku v roce 1995, když byly spirochéty izolovány ze středního střeva *Ixodes persulcatus* v krvi myšice japonské (*Apodemus argenteus*). (Fukunaga, a další, 1995) Patogenita *B. miyamotoi* byla zjištěna v Rusku v roce 2011, symptomy pacientů se projevovaly horečkou, bolestí hlavy, zimnicí, únavou a myalgií. (Platonov, a další, 2011)

Budoucí směry výzkumu zahrnují především umožnit lepší náhled do lidské patogenity. Pokračující studie jsou klíčem k lepšímu epidemiologickému porozumění a řízení intervenční strategie.

Riziko, že se lidé nakazí patogeny přenášenými klíšťaty, je závislé na velkém množství faktorů včetně genetických, klimatických, hostitelských, ale také sociálních. Další objasňování těchto faktorů je důležité pro pochopení principu interakcí hostitel-patogen, distribuce, početnosti a prevalence klíšťat. Tyto informace by v jistých případech umožnily předpovědět rizika a pomohli k modelování cílených intervenčních přístupů. Zvyšování vědomí o nemocech přenášených klíšťatech a rozvoj účinných strategií prevence a kontroly jsou zásadní pro zmírnění dopadu na veřejné zdraví.

Seznam použité literatury

- Baron, Ellen Jo. 1996.** Classification. [autor knihy] Samuel Baron. *Medical Microbiology*. Galveston : University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
- Baron, Samuel. 1996.** *Medical Microbiology*. 4. Galveston : University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. ISBN-10: 0-9631172-1-1.
- Bennet, Louise a Berglund, Johan. 2002.** Reinfection with Lyme borreliosis: a retrospective follow-up study in southern Sweden. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. Jan, 2002, Sv. 34, 3.
- Berglund, Johan, a další. 1995.** An Epidemiologic Study of Lyme Disease in Southern Sweden. *The New England Journal of Medicine*. Nov, 1995, Sv. 333, 20.
- Bhatia, Rajesh a Ichhpujani, Rattan Lal. 2008.** *Essentials of Medical Microbiology*. New Delhi : Jaypee Brothers Medical Publishers, 2008. ISBN 81-8448-154-3.
- Burde, Jed, a další. 2023.** Human *Borrelia miyamotoi* Infection in North America. *Pathogens*. Apr, 2023, Sv. 12, 4. PMID: 37111439.
- Burgdorfer, Willy, a další. 1982.** Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? *Science*. Jun, 1982, Sv. 216, 4552.
- Carr, Ann L. a Roe, Michael. 2016.** Acarine attractants: Chemoreception, bioassay, chemistry and control. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. July, 2016, Sv. 131, 60-79.
- Cleveland, Dawn W., Anderson, Cassidy C. a Brissette, Catherine A. 2023.** *Borrelia miyamotoi*: A Comprehensive Review. *Pathogens*. Feb, 2023, Sv. 12, 2.
- Coons, L. B., Rosell-Davis, R. a Tarnowski, B. I. 1986.** Bloodmeal digestion in ticks. [autor knihy] John R. Sauer a Alexander J. Hair. *Morphology, physiology and behavioral biology of ticks*. Chichester : Ellis Harwood, 1986.
- Coons, Lewis B. a Rothschild, Marjorie. 2008.** Ticks (Acari: Ixodida). [autor knihy] John L. Capinera. *Encyclopedia of Entomology*. Gainesville : Springer Science + Business Media B.V., 2008.
- Cumming, Graeme S. 2002.** Comparing climate and vegetation as limiting factors for species ranges of African ticks. *Ecology*. Jan, 2002, Sv. 83, 1.
- Cutler, Sally, a další. 2019.** A new *Borrelia* on the block: *Borrelia miyamotoi* – a human health risk? *Eurosurveillance*. May, 2019, Sv. 24, 18. PMID: 31064634.
- Della-Giustina, David, Duke, Charles a Goldflam, Katja. 2001.** Underrecognized Tickborne Illnesses: *Borrelia Miyamotoi* and Powassan Virus. *Wilderness & Environmental Medicine*. Jun, 2001, Sv. 32, 2.
- Diuk-Wasser, Maria A., Vannier, Edouard a Krause, Peter J. 2016.** Coinfection by the tick-borne pathogens *Babesia microti* and *Borrelia burgdorferi*: ecological, epidemiological and clinical consequences. *Trends in Parasitology*. Jan, 2016, Sv. 32, 1. PMID: 26613664.

- Dworkin, Mark S., a další. 2008.** Tick-borne relapsing fever. *Infectious Disease Clinics of North America*. Sep, 2008, Sv. 22, 3, stránky 449-468.
- Dworkin, Martin, a další. 2006.** *The Prokaryotes, Volume 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. New York : Springer, 2006. ISBN: 978-0-387-30743-5.
- Eldridge, Bruce F. a Edman, John D. 2004.** *Medical Entomology*. Davis : Springer Science + Business Media, 2004. ISBN 978-94-007-1009-2.
- Engelkirk, Paul G. a Duben-Engelkirk, Janen. 2014.** *Burton's Microbiology for the Health Sciences*. Philadelphia : Wolters Kluwer Health, 2014. ISBN 978-1-4511-8632-1.
- Estrada-Peña, Agustín, Ayllón, Nieves a de la Fuente, José. 2012.** Impact of climate trends on tick-borne pathogen transmission. *Frontiers in Physiology*. Mar, 2012, Sv. 3, 64.
- Faltysová, Helena a Bárta, František. 2002.** *Pardubicko - Chráněná území ČR IV*. Praha : Artedit, 2002. str. 314. 80-86064-44-1.
- Faltysová, Helena, Mackovčín, Peter a Sedláček, Miroslav. 2002.** *Královehradecko - Chráněná území ČR V*. Praha : Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, 2002. str. 409. 80-86064-45-X.
- Fukunaga, Masahito, a další. 1995.** Genetic and Phenotypic Analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., Isolated from the Ixodid Tick *Ixodes persulcatus*, the Vector for Lyme Disease in Japan. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Oct., 1995, Sv. 45, 4.
- Golovchenko, Maryna, a další. 2016.** *Parasit Vectors*. Feb, 2016, Sv. 9, 68.
- Gray, Jeremy S., a další. 2016.** Diapause in ticks of the medically important *Ixodes ricinus* species complex. *Ticks and Tick-borne Diseases*. Jul, 2016, Sv. 7, 5.
- Gugliemone, Alberto A., a další. 2010.** The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*. January, 2010, Sv. ., 2528, stránky 1-28.
- Gullan, Penny J. a Cranston, Peter S. 2014.** *The Insects: An Outline of Entomology*. 3. Davis : Wiley-Blackwell, 2014. ISBN: 978-1-118-84615-5.
- Hogg, Stuart. 2006.** *Essential Microbiology*. West Sussex : John Wiley and Sons, 2006. str. 468. ISBN: 9780471497547.
- Hollar, Sherman. 2012.** *A Closer Look at Biology, Microbiology, and the Cell*. New York : Britannica Educational Publishing, 2012. ISBN 978-1-61530-563-6.
- Holmes, Randall K. a Jobling, Michael G. 1996.** Genetics. [autor knihy] Samuel Baron. *Medical Microbiology*. Galveston : University of Texas Medical Branch, 1996.
- Hoornstra, Dieuwertje, a další. 2022.** Prevalence and clinical manifestation of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes* ticks and humans in the northern hemisphere: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe*. Sep, 2022, Sv. 3, 10.

- Horn, Martin, a další. 2009.** Hemoglobin digestion in Blood-Feeding Ticks: Mapping a Multi-Peptidase Pathway by Functional Proteomics. *Chemistry & Biology*. Oct, 2009, Sv. 16, 10.
- Hubálek, Zdeněk a Halouzka, Jiří. 1998.** Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasitology Research*. Mar, 1998, Sv. 84, 3.
- Hubálek, Zdeněk. 2009.** Epidemiology of Lyme Borreliosis. [autor knihy] Dan Lipsker a Benoît Jaulhac. *Lyme Borreliosis: Biological and Clinical Aspects*. Basel : S. Karger, 2009.
- Hurych, Jakub a Štícha, Roman. 2021.** *Lékařská mikrobiologie - Repetitorium*. 3. Praha : Triton, 2021. str. 638. ISBN: 9788075539762.
- Chin, James. 2000.** *Control of communicable diseases*. Washington : American Public Health Association, 2000. ISBN: 978-0875532424.
- Jernigan, David A., a další. 2021.** Induced Native Phage Therapy for the Treatment of Lyme Disease and Relapsing Fever: A Retrospective Review of First 14 Months in One Clinic. *Cureus*. Nov, 2021, Sv. 13, 11. PMID: 34873551.
- Jongejan, F. a Uilenberg, G. 2004.** The global importance of ticks. *Parasitology*. 129, 2004, Sv. (S1), S3-S14.
- Jurtshuk, Peter. 1996.** Bacterial Metabolism. [autor knihy] Baron Samuel. *Medical Microbiology*. Galveston : University of Texas Medical Branch, 1996.
- Kapoor, Kiran. 2010.** *Illustrated Dictionary of Microbiology*. Jaipur : Oxford Book Company , 2010. ISBN: 978-93-80179-32-2.
- Koetsveld, Joris, a další. 2018.** Serodiagnosis of *Borrelia miyamotoi* disease by measuring antibodies against GlpQ and variable major proteins. *Clinical Microbiology and Infection*. Mar, 2018, Sv. 24, 12.
- Krantz, Gerald W. 2009.** *A manual of acarology*. 3. Lubbock : Texas Tech University Press, 2009. ISBN-13: 978-0896726208.
- Kříž, B., a další. 2018.** Comparison of the epidemiological patterns of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis in the Czech Republic in 2007-2016. *Epidemiology, Microbiology, Immunology*. Winter, 2018, Sv. 67, 3. PMID: 30602281.
- Labuda, M. a Nuttall, P.A. 2008.** Viruses transmitted by ticks. [autor knihy] Alan S. Bowman a Patricia A. Nuttall. *Ticks: Biology, Disease and Control*. Cambridge : Cambridge University Press, 2008.
- Lindgren, Elisabet a Jaenson, Thomas GT. 2006.** Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. *The World Health Organization*. [Online] 2006. [Citace: 28. Březen 2023.] <https://apps.who.int/iris/handle/10665/107800>. ISBN: 9789289022910.
- Maczulak, Anne. 2011.** *Encyclopedia of Microbiology*. New York : Facts On File, 2011. ISBN 978-1-4381-3406-2.

- Mahon, Connie R., Lehman, Donald C. a Manuselis, George. 2015.** *Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5. Maryland Heights : Saunders, an imprint of Elsevier, 2015. ISBN: 978-0-323-08989-0.
- Matsuo, Tomohide, a další. 2007.** Immunohistochemical examination of PDGF-AB, TGF-beta and their receptors in the hemocytes of a tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Journal of Veterinary Medical Science*. March, 2007, Sv. 69, 3.
- Mullen, Gary R. a Durden, Lance A. 2019.** *Medical and Veterinary Entomology*. Cambridge : Academic Press, 2019. ISBN: 978-0-12-814043-7.
- Murray, Patrick, Rosenthal, Ken a Pfaller, Michael. 2010.** *Medical Microbiology*. Philadelphia : Elsevier Mosby, 2010. ISBN: 9780323674508.
- Nava, Santiago, a další. 2017.** *Ticks of the Southern Cone of America*. Cambridge : Elsevier Inc, 2017. ISBN: 978-0-12-811075-1.
- Nicholson, William L., a další. 2019.** Ticks (Ixodida). [autor knihy] Gary R. Mullen a Lance A. Durden. *Medical and Veterinary Entomology*. Cambridge : Academic Press, 2019.
- Norris, Douglas E. 2008.** Lyme Borreliosis. [autor knihy] John L. Capinera. *Encyclopedia of Entomology*. Gainesville : Springer Science + Business Media B.V., 2008.
- Ochman, Howard. 2000.** Evolution of Bacterial Pathogens. [autor knihy] Eduardo A. Groisman. *Principles of Bacterial Pathogenesis*. St. Louis : Academic Press, 2000, str. 826.
- Paul, Eldor A. 2007.** *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. 3. Burlington : Elsevier Inc., 2007. ISBN 13: 978-0-12-546807-7.
- Peterson, Johnny W. 1996.** Bacterial Pathogenesis. [autor knihy] Samuel Baron. *Medical Microbiology*. Galveston : University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
- Piesman, Joseph a Gern, Lise. 2008.** Lyme borreliosis in Europe and North America. [autor knihy] Alan S. Bowman a Patricia A. Nuttal. *Ticks: Biology, Disease and Control*. New York : Cambridge University Press, 2008.
- Piesman, Joseph a Humair, Pierre-François. 2011.** The spirochetes and vector ticks of Lyme borreliosis in nature. [autor knihy] Sunil K. Sood. *Lyme borreliosis in Europe and North America*. New Jersey : John Wiley and Sons, 2011.
- Platonov, Alexander E., a další. 2011.** Humans Infected with Relapsing Fever Spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerging Infectious Diseases*. Oct, 2011, Sv. 17, 10.
- Pottinger, Paul, a další. 2018.** Pathogenic Bacteria. [autor knihy] Kenneth J. Ryan. *Sherris Medical Microbiology*. 7. New York : McGraw Hill / Medical, 2018.
- Prescott, Lansing M. 2002.** *Microbiology*. 5. New York : McGraw Hill, 2002. ISBN 9780072829051.

- Radolf, Justin D. a Samuels, Scott D. 2021.** *Lyme Disease and Relapsing Fever Spirochetes : Genomics, Molecular Biology, Host Interactions and Disease Pathogenesis*. Poole : Caister Academic Press, 2021. ISBN: 978-1-913652-61-6.
- Rauter, Carolin a Hartung, Thomas. 2005.** Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Applied and Environmental Microbiology*. Nov, 2005, Sv. 71, 11.
- Richtrová, Eva, a další. 2022.** *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in *Ixodes ricinus* ticks in urban green areas in Prague. *Ticks and Tick-Borne Diseases*. Nov, 2022, Sv. 13, 6.
- Roberts, Larry a Janovy Jr., John. 2008.** *Foundations of Parasitology*. 8. New York : McGraw-Hill, 2008. ISBN-13: 978-0073028279.
- Ryan, Kenneth J., a další. 2018.** *Sherris Medical Microbiology*. New York : McGraw Hill / Medical, 2018. str. 1056. 978-1259859809.
- Salton, Milton R.J. a Kim, Kwang-Shin. 1996.** Structure. [autor knihy] Samuel Baron. *Medical Microbiology*. 4. Galveston : University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
- Seinost, Gerald, a další. 1999.** Four clones of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto cause invasive infection in humans. *Infection and Immunity*. Jul, 1999, Sv. 67, 7.
- Service, Mike. 2012.** *Medical Entomology for Students*. 5. Cambridge : Cambridge University Press, 2012. ISBN 978-1-107-66818-8.
- Shin, Ok Sarah. 2014.** Insight into the Pathogenesis of Lyme Disease. *Journal of Bacteriology and Virology*. Mar, 2014, Sv. 44, 1.
- Singh, Rajendra. 2007.** *Elements of Entomology*. Meerut : Rastogi Publications, 2007. ISBN: 9788171336777.
- Siński, Edward, Welc-Falęciak, Renata a Zajkowska, Joanna. 2016.** *Borrelia miyamotoi*: A human tick-borne relapsing fever spirochete in Europe and its potential impact on public health. *Advances in Medical Sciences*. Sep, 2016, Sv. 61, 2.
- Sonenshine, Daniel E. a Roe, Michael R. 2014.** *Biology of Ticks*. New York : Oxford University Press, 2014. ISBN: 978-0-19-974405-3.
- Sood, Sunil K. 2011.** *Lyme Borreliosis in Europe and North America: Epidemiology and Clinical Practice*. New Jersey : Wiley-Blackwell, 2011. ISBN: 978-0470647523.
- Stanek, Gerold a Strle, Franc. 2003.** Lyme borreliosis. *The Lancet*. Nov, 2003, Sv. 362, 9396.
- Steere, Allen C., a další. 2016.** Lyme borreliosis. *Nature Reviews. Disease Primers*. Dec, 2016, Sv. 2, 16090.
- Steere, Allen C., Coburn, Jenifer a Glickstein, Lisa. 2004.** The emergence of Lyme disease. *Journal of Clinical Investigation*. Apr 15, 2004, Sv. 113, 8, stránky 1093–1101.

Tortora, Gerard J., Funke, Berdell R. a Case, Christine L. 2019. *Microbiology: an introduction*. 13. Boston : Pearson, 2019. ISBN: 9780134605180.

Trivedi, Pravin Chandra, Pandey, Sonali a Bhadauria, Seema. 2010. *Text Book of Microbiology*. Jaipur : Aavishkar Publishers, Distributors, 2010. ISBN 978-81-7910-306-7.

Wikel, Stephen K. 2014. Tick–Host Interactions. [autor knihy] Daniel E. Sonenshine a Michael R. Roe. *Biology of ticks*. New York : Oxford University Press, 2014.

Zdroje obrázků

Obrázek 1: Stavba prokaryotické buňky

Engelkirk, Paul G. a Duben-Engelkirk, Janen. 2014. *Burton's Microbiology for the Health Sciences*. Philadelphia : Wolters Kluwer Health, 2014. ISBN 978-1-4511-8632-1.

Obrázek 2: Jednotlivé kroky Gramova barvení

Engelkirk, Paul G. a Duben-Engelkirk, Janen. 2014. *Burton's Microbiology for the Health Sciences*. Philadelphia : Wolters Kluwer Health, 2014. ISBN 978-1-4511-8632-1.

Obrázek 3: Genový transfer – Transdukce, Konjugace, Transformace

Engelkirk, Paul G. a Duben-Engelkirk, Janen. 2014. *Burton's Microbiology for the Health Sciences*. Philadelphia : Wolters Kluwer Health, 2014. ISBN 978-1-4511-8632-1.

Obrázek 4: Růstová křivka bakterií

Maczulak, Anne. 2011. *Encyclopedia of Microbiology*. New York : Facts On File, 2011. ISBN 978-1-4381-3406-2.

Obrázek 5: Buněčný energetický metabolismus

Prescott, Lansing M. 2002. *Microbiology*. 5. New York : McGraw Hill, 2002. ISBN 9780072829051.

Obrázek 6: *Ixodes ricinus* – larva, nymfa, samec, samice

Ticksafety.com. 2023. *Ixodes ricinus*. *Ticksafety.com* [Online] 2023. [Citace: 10. červenec 2023.] <https://ticksafety.com/tick-identification/international-tick-species/castor-bean-tick/>

Obrázek 7: Vnější anatomie *Ixodes ricinus* (samice)

Nicholson, William L., a další. 2019. Ticks (Ixodida). [autor knihy] Gary R. Mullen a Lance A. Durden. *Medical and Veterinary Entomology*. Cambridge : Academic Press, 2019.

Obrázek 8: Interní anatomie klíštěte (samice)

Nicholson, William L., a další. 2019. Ticks (Ixodida). [autor knihy] Gary R. Mullen a Lance A. Durden. *Medical and Veterinary Entomology*. Cambridge : Academic Press, 2019.

Obrázek 9: Tříhostitelský životní cyklus klíštěte

Nicholson, William L., a další. 2019. Ticks (Ixodida). [autor knihy] Gary R. Mullen a Lance A. Durden. *Medical and Veterinary Entomology*. Cambridge : Academic Press, 2019.

Obrázek 10: Navrhovaný enzootický přenosový cyklus pro *Borrelia miyamotoi*

Cleveland, Dawn W., Anderson, Cassidy C. a Brissette, Catherine A. 2023. *Borrelia miyamotoi*: A Comprehensive Review. *Pathogens*. Feb, 2023, Sv. 12, 2.