

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra zoologie a rybářství**



**Vyhodnocení repelentní účinnosti vybraných esenciálních olejů na klíště obecné (*Ixodes ricinus*)**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Jesika Kinterová**

**Obor: Zájmové chovy zvířat**

**Vedoucí práce: Ing. Martin Kulma, Ph.D.**

© 2020 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vyhodnocení repelentní účinnosti vybraných esenciálních olejů na klíště obecné (*Ixodes ricinus*)" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22.7.2020

---

## **Poděkování**

Velmi ráda bych touto cestou poděkovala mému vedoucímu práce Ing. Martinu Kulmovi PhD., který mi pomohl celou práci zkompletovat a byl vždy velmi ochotný mi pomoci nebo poskytnout cenné rady. Také bych ráda poděkovala Kateřině Imrichové ze Státního zdravotního ústavu za pomoc při práci v laboratoři a panu Mgr. Václavu Ševčíkovi z Univerzity Karlovy za poskytnutí chromatografického rozboru esenciálních olejů. V neposlední řadě patří poděkování celé mé rodině a manželovi za trpělivost a podporu.

# Vyhodnocení repelentní účinnosti vybraných esenciálních olejů na klíště obecné (*Ixodes ricinus*)

## Souhrn

V rámci této práce byly zhodnoceny repelentní účinky třech esenciálních olejů proti nymfám klíštěte *Ixodes ricinus*. Silice z *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* a *Picea abies* byly testovány v koncentracích 5 %, 10 %, 15 % a 20 %. Klíšťata potřebná pro pokus byla sbírána v Praze v Kunraticko-michelském lese v okolí Kunratického potoka a v Rakovníku od června do září roku 2019.

Pro pokus byla celkem potřeba 2310 nymf, které byly po ukončení testu usmrceny mrazem při -30 °C. Samotný test repelentní účinnosti byl prováděn in-vitro v Petriho misce (Ø 90 mm) s třemi vrstvami filtračního papíru, kdy se na jeho okraj aplikovalo 0,5 ml etanolového roztoku esenciálních olejů o příslušné koncentraci. Po zaschnutí repelentu byla do experimentální arény vložena klíšťata vždy po 10 kusech a ve třech opakováních. Účinnost byla sledována v časech: 5 minut, 30 minut, 1 hodina, 2 hodiny, 4 hodiny, 6 hodin a 8 hodin od aplikace. Test byl ukončen také v případě, že repelence byla nižší než 33 %. Na závěr byly stejným postupem otestovány 5% syntetický repelent DEET a Alpa Francovka s hřebíčkem, tedy tzv. domácí repelent vyrobený dle návodu doporučeného českými elektronickými i tištěnými médii.

Vědecká hypotéza „Testované esenciální oleje mají určitý repelentní účinek, není ovšem tak stabilní jako u syntetických preparátů“ byla potvrzena, když 5% repelent DEET vykazoval po celou dobu testování signifikantně ( $\alpha = 0,05$ ) nejvyšší repelenci než testované esenciální oleje ve všech koncentracích. Na základě statistického hodnocení bylo také zjištěno, že na hladině  $\alpha = 0,05$  byla účinnost ovlivněna typem repelentu, a to po celou dobu testování. Od 1 hodiny po aplikaci pak byla účinnost signifikantně ovlivněna i koncentrací repelentu. Co se týče porovnání účinku esenciálních olejů, jako nejlepší se z testovaných jevil smrkový (*Picea abies*) olej v koncentraci 20 %.

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že všechny testované silice měly určitý repelentní účinek, který lze zvýšit zvýšením koncentrace. Tento účinek je ovšem v porovnání se syntetickým repelentem DEET nepříliš stabilní. Na druhou stranu se prokázalo, že zejména šalvějový a smrkový esenciální olej je při opakované aplikaci možné považovat za alternativu pro běžné syntetické repelenty.

**Klíčová slova:** alternativní repelenty, klíště obecné, esenciální oleje, laboratorní test účinnosti, osobní ochrana

# Evaluation of repellency effect of selected essential oils against sheep tick (*Ixodes ricinus*)

## Summary

In this work, the repellency effects of three essential oils against the nymphs of the tick *Ixodes ricinus* were evaluated. Essential oils from *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* and *Picea abies* were tested at the concentrations of 5%, 10%, 15% and 20%. The ticks for the experiment were collected in Prague in the Kunratice-Michle forest near the Kunratický stream and in Rakovník in the period of June to September 2019.

Totally, 2310 nymphs were required for the experiment. The ticks were killed by freezing at -30 ° C at the end of the test. The repellency was tested in-vitro in using Petri dishes (Ø 90 mm) with three layers of filter paper. The periphery of such arenas were treated by 0.5 ml of an ethanolic solution of essential oils. After the repellent had dried, 10 ticks were inserted into the experimental arena. Each trial was performed in three replicates. The efficiency was monitored 5 minutes, 30 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, 6 hours and 8 hours after the application. The test was also terminated if the repellency was less than 33 %. Finally, the 5% synthetic repellent DEET and solution of Alpa Francovka with clove (i.e. the so-called home repellent produced according to the instructions recommended by the Czech electronic and printed media) were tested in the same way.

The scientific hypothesis "Tested essential oils have a certain repellency effect, but not as stable as the synthetic products" was confirmed when 5% DEET repellent showed significantly ( $p < 0.05$ ) highest repellency than tested essential oils at all the concentrations. Based on the statistical evaluation, it was also found that (at the level of  $\alpha = 0.05$ ) the efficiency throughout the testing was affected by the repellent type. Excluding intervals of 5 and 30 minutes after the application, the efficiency was also significantly affected by repellent concentration. Regarding tested essential oils, spruce (*Picea abies*) oil in a concentration of 20 % seemed to be the best alternative repellent against tick nymphs.

Based on the obtained results, it can be concluded that all the tested essential oils had certain repellency effect, which can be improved by concentration increase. However, this effect is not very stable compared to the synthetic DEET repellent. On the other hand, it has been shown that particularly sage and spruce essential oils might be considered as an alternative to conventional synthetic repellents when applied repeatedly.

**Keywords:** alternative repellents, sheep tick, essential oils, laboratory efficiency test, personal protection

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b>	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Systematika</b>	<b>3</b>
3.1.1	Taxonomie <i>Ixodes ricinus</i>	3
3.1.2	Charakteristika řádu Ixodida	3
	Čeleď Ixodidae – Klíšťovití	3
	Čeleď Argasidae – Klíšťákovití	5
<b>3.2</b>	<b>Klíště obecné</b>	<b>7</b>
3.2.1	Výskyt a rozšíření	7
3.2.2	Morfologie a anatomie	8
	Morfologie a rozdíly mezi stádii	8
	Anatomie	11
3.2.3	Rozmnožování a životní cyklus	13
3.2.4	Medicinský význam klíšťat	14
<b>3.3</b>	<b>Ochrana proti klíšťatům</b>	<b>14</b>
3.3.1	Akaricidy	15
3.3.2	Repelenty	15
	Syntetické repelenty	16
	Přírodní repelenty	17
3.3.3	Metody hodnocení repelentní aktivity	20
<b>4</b>	<b>Metodika</b>	<b>23</b>
<b>4.1</b>	<b>Klíšťata</b>	<b>23</b>
4.1.1	Lokality pro odchyt klíšťat	23
4.1.2	Klíšťata	23
<b>4.2</b>	<b>Repelenty</b>	<b>24</b>
<b>4.3</b>	<b>In-vitro test repelentní účinnosti</b>	<b>25</b>
4.3.1	Příprava	25
4.3.2	Ukončení	27

4.4	Vyhodnocení dat.....	27
5	Výsledky.....	28
5.1	Tabulky s éterickým olejem ze smrku .....	28
5.2	Tabulky s éterickým olejem ze šalvěže .....	29
5.3	Tabulky s éterickým olejem z rozmarýnu .....	31
5.4	Tabulka se srovnávacím repelentem DEET.....	32
5.5	Tabulka s testovaným roztokem z Alpy a hřebíčku .....	33
5.6	Grafické porovnání všech testovaných repelentů .....	33
5.7	Statistické vyhodnocení pokusu .....	36
5.7.1	Ovlivnění účinnosti typem a koncentrací repelentu .....	36
5.7.2	Podrobné vyhodnocení účinnosti jednotlivých repelentů v čase.....	38
6	Diskuze.....	47
7	Závěr.....	50
8	Literatura .....	51
9	Samostatné přílohy .....	I

# 1 Úvod

Klíšťata jsou ektoparazitické roztoči, kteří slouží jako vektory mnoha onemocnění lidí i zvířat. Studium patogenů přenášených klíšťaty je v posledních několika desetiletích na vzestupu. Důraz na kvantifikaci rizik onemocnění u lidí vedl hlavně k nárůstu studia bionomie, ekologie a epidemiologie klíšťat. Největší zájem je zaměřen především na druhy, které hrají klíčovou roli v přenosu patogenů na člověka nebo zásadně ovlivňují zdraví produkčně chovaných zvířat. Nejvýznamnějším druhem v České republice je z tohoto pohledu klíště obecné (*Ixodes ricinus*). Tento druh klíštěte tvoří až 95 % všech klíšťat v této zemi a je přenašečem závažných bakteriálních a virových infekcí jako např. lymeská borelióza, rickettsiáza, anaplazmóza, babezióza či klíšťová encefalitida. Vlivem klimatické změny navíc dochází k rozšiřování klíšťat do oblastí, kde se dříve nevyskytovala, význam tohoto parazita tak z hlediska lidské i veterinární medicíny stále roste.

Proti většině nemocí přenášených klíšťaty neexistuje účinná profylaxe, jedinou možností osobní ochrany je proto využívání repelentů. Repelenty jsou látky, které zasahují do interakce mezi klíštětem a hostitelem s cílem členovce odradit od sání. Přestože jsou v současnosti nejvíce využívané syntetické repelenty, v poslední době roste zájem o alternativní produkty přírodního původu. Mezi hlavní důvody hledání takových repelentů patří to, že syntetické produkty jsou významnou zátěží pro životní prostředí. Mezi další negativa spojených s využíváním chemických repelentů, je skutečnost, že ačkoliv jsou prováděny toxikologické testy před jejich uvedením na trh a klasifikují se jako pro člověka minimálně toxické, u některých lidí mohou způsobovat zdravotní potíže různého charakteru. Navíc nejsou zcela vhodné pro použití u malých dětí do 2 měsíců nebo těhotných a kojících žen.

Jednou z nejčastěji zmiňovaných přírodních repelentů jsou esenciální oleje. Výhodou takových přípravků je jejich šetrnost k životnímu prostředí, nízká toxicita a cena. Esenciální oleje (silice, éterické oleje) jsou sekundární metabolity rostlin, které jsou syntetizovány v rámci obranného mechanismu proti fytofágům. V současnosti je známo více než 3000 silic, z nichž je pro mnohé popsán repelentní účinek proti různým druhům členovců. Cílem této práce bylo popsat laboratorní účinnost olejů z rostlin, které lze pěstovat na území České republiky – smrku ztepilého (*Picea abies*), šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) a rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*). Zároveň jsme se zaměřili na účinnost repelentu „podomácku“ vyrobeného dle receptury doporučené v několika českých médiích.



## **2 Vědecká hypotéza a cíle práce**

Cílem práce je zjistit repelentní účinek vybraných esenciálních olejů na klíště obecné a vyhodnotit jejich možné využití jako přípravků pro osobní ochranu proti těmto členovcům.

Hypotéza: Testované esenciální oleje mají určitý repelentní účinek, není ovšem tak stabilní jako u syntetických preparátů.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Systematika

#### 3.1.1 Taxonomie *Ixodes ricinus*

říše:	Animalia
kmen:	Arthropoda
třída:	Arachnida
infratřída:	Acarina
řád:	Ixodida
podřád:	Ixodina
čeleď:	Ixodidae
rod:	<i>Ixodes</i>
podrod:	<i>Ixodes</i>
druh:	<i>Ixodes ricinus</i> Linnaeus, 1758 – klíště obecné

#### 3.1.2 Charakteristika řádu Ixodida

Podřád Ixodida obsahuje 3 čeledě a to: Ixodidae, Amblyommidae a Nuttalliellidae. Nuttalliellidae je monospecifická čeleď, kterou reprezentuje pouze jediný druh klíštěte *Nuttalliella namaqua* Bedford, 1931. Amblyommidae obsahuje 11 rodů s 130 druhy. Čeleď Ixodidae obsahuje největší rod *Ixodes* s 243 druhy klíšťat a dále 14 rodů s 459 druhy (Guglielmone et al. 2010).

#### Čeleď Ixodidae – Klíšťovití

Jsou také nazývána jako tvrdá klíšťata, protože mají na hřbetní straně těla typický tvrdý štítek (scutum). Díky němu lze snadno rozeznat samce od samic, kdy samcům kryje celé tělo a samicím zasahuje pouze do poloviny či třetiny v nenasátém stavu viz Obr. 1.



Obrázek č. 1: Pohlavní dimorfismus klíštěte obecného (Zdroj: [www.scalibor.cz](http://www.scalibor.cz))

Gnathosoma neboli ústní část vyčnívá při pohledu z hřbetní části nad idiosomou (část těla za štítkem). Samci rodů *Ixodes*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis* krev nesají, ale mohou se na těle hostitele vyskytovat, protože zde hledají samice ke kopulaci. Většina klíšťat této čeledi potřebuje ke svému vývoji tři různé hostitele. Existují i klíšťata dvou či dokonce jen jednohostitelská, která setrvávají na hostiteli velice dlouho dobu. Tento aspekt je velmi důležitý z hlediska přenosu různých onemocnění. Dále jsou zde uvedeny významné druhy klíšťat z hlediska biologických agens nebo výskytu na území ČR (Volf & Horák et al. 2007).

### **Rod *Ixodes***

Pro druhy rodu *Ixodes* je typické, že nemají oči, anální rýhu mají před řitním otvorem a samci mají sklerotizované břišní destičky chybějící u jiných rodů. Tento rod je rozšířen celosvětově, včetně Antarktidy. Čtyři druhy tohoto rodu jsou významní přenašeči mikrobiálních agens pro člověka. *Ixodes scapularis* neboli klíště jelení Say, 1821 se vyskytuje na východě severní Ameriky. Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) je rozšířeno hlavně v Evropě a západní Asii. Dále klíště sibiřské (*I. Persulcatus*) Schulze, 1930 žijící v severovýchodní Evropě a severní Asii. Klíště tichomořské (*I. Pacificus*) Cooley & Kohls, 1943 je významným zástupcem klíšťat v západní části Spojených států (Guglielmone et al. 2010; Nicholson et al. 2020).

### **Rod *Dermacentor***

Klíšťata rodu *Dermacentor* jsou středně velká až velká klíšťata obvykle se zdobeným vzorováním. Ústa jsou krátká a tvar gnathosomy je obdélníkový. Oči jsou přítomny. Samcům chybí ventrální destičky a u dospělého samce je čtvrtý pár nohou značně zvětšený. Je to typické tříhostitelské klíště (Ghosh et al. 2017). Areál výskytu je především v Evropě, Asii, Africe a Severní a Střední Americe (Nicholson et al. 2020). Jeho typickým útočištěm jsou lužní lesy, pastviny s křovisky a lesní paseky (Ryšavý et al. 1989).

Celkový počet druhů tohoto rodu je 32 (Guglielmone et al. 2010). V Česku se vyskytuje piják lužní (*Dermacentor reticulatus*) Fabricius, 1794 žijící na jižní Moravě a na jižním Slovensku. Dalším našim významným druhem je piják stepní (*D. marginatus*) Sulzer, 1776 žijící na středním a jihovýchodním Slovensku. Hlavním přenašečem Horečky Skalistých hor je druh (*D. andersoni*) Stiles, 1908 žijícím na severoamerickém subkontinentu (Guglielmone et al. 2010; Nicholson et al. 2020; Ryšavý et al. 1989).

### **Rod *Haemaphysalis***

Klíšťata rodu *Haemaphysalis* obývají vlhká dobře vegetovaná stanoviště v Eurasii a tropické Africe. Jsou to tříhostitelská klíšťata, jejichž larvy a nymfy sají na malých savcích či ptácích a dospělí jedinci napadají větší savce včetně hospodářských zvířat (Ghosh et al. 2017). Celkový počet popsáných druhů v tomto rodě je 166, z čehož se asi 150 druhů vyskytuje v Africe a pouze dva druhy v Americe (Guglielmone et al. 2010; Ghosh et al. 2017). Většina druhů tohoto rodu je malá s krátkou ústní částí. U samců nejsou přítomny ventrální destičky a podobně jako u rodu *Ixodes* postrádají oči. Typickým rozlišovacím znakem je, že anální rýhu mají za řitním otvorem (Ghosh et al. 2017).

Druhem, se kterým se lze na území České republiky setkat je klíšť lužní (*H. concinna*) Koch, 1844. Žije ve vlhkých listnatých a smíšených lesích na jižní Moravě a na Slovensku (Guglielmone et al. 2010; Ryšavý et al. 1989).

### **Rod *Hyalomma***

Je to relativně malý rod s 27 druhy středních až velkých klíšťat žijících hlavně v Africe. Typickým místem výskytu jsou vyprahlé nebo polosuché stanoviště. Vyznačují se podlouhlými palpami a mají zřetelné oči. Epidemiologicky významným poddruhem je klíšť obroubený (*H. marginatum marginatum*) Koch, 1844, který je vektorem závažné virové infekce Krymsko-konžské hemoragické horečky (CCHF). Zásadní veterinární význam má ještě klíšť piroplasmový (*H. detritum*) Schulze, 1919 přenášející původce bovinní tropické theileriózy (Guglielmone et al. 2010; Nicholson et al. 2020).

### **Rod *Rhipicephalus***

Všechny druhy byly původně endemické v Africe (Ghosh et al. 2017). Dnes se tyto druhy klíšťat vyskytují po celém světě a rod obsahuje 84 popsaných druhů, které jsou snadno rozpoznatelné dle šestiúhelníkového tvaru gnathosomy (Nicholson et al. 2020). Většina druhů má tříhostitelský životní cyklus, existují ale i druhy tohoto rodu, kde jsou v cyklu přítomni pouze dva hostitelé. Parazitují hlavně na savcích, méně často i na ptácích či plazech (Ghosh et al. 2017)

### **Rod *Amblyomma***

Jsou to obvykle klíšťata dvouhostitelská a výjimečně tříhostitelská. Sání je nejčastěji lokalizováno na nohou, vemeni, ocasu nebo v perianální oblasti. Dospělci většiny druhů jsou střední nebo velké velikosti s různě barevnými vzory na štítku (Ghosh et al. 2017).

Rozšíření těchto klíšťat je celosvětové, ale jejich výskyt je především ve vlhkých tropických nebo subtropických oblastech. Rod obsahuje asi 130 druhů, z nichž nejvýznamnější se vyskytují na pobřeží Mexického zálivu (klíště skvrnité *A. maculatum* Koch, 1844), Severní Ameriky (klíště americké *A. americanum* Linnaeus, 1758) nebo Karibských ostrovech a Afriky (klíště různobarevné *A. variegatum* Fabricius, 1794) (Guglielmone et al. 2010; Sonenshine et al. 2008). Dokáží přežít i výjimečně chladné a suché podmínky (Ghosh et al. 2017).

Zbývající rody čeledě Ixodidae zahrnují relativně malé množství druhů, z nichž žádný není doposud známý jako významný přenašeč patogenů (Nicholson et al. 2020).

### **Čeleď Argasidae – Klíšťákovití**

Jsou to měkká klíšťata s koženým nesklerotizovaným tělem, která mají na povrchu těla charakteristickou texturu. Na jejich těle mohou být přítomny záhyby nebo drážky Obr. 2.

Gnathosomu mají při pohledu shora zcela skrytou pod idiosomou u nymf a dospělců. Pokud mají přítomny oči, nacházejí se v postranních záhybech nad kráčivými končetinami. Tato



**Obrázek č. 2: Charakteristická svatba těla této čeledě s typickým zástupcem klíšťákem zhoubným (*A. persicus*) (Autor: Jana Bulantová)**

klíšťata mají životní cyklus s více hostiteli. Od tvrdých klíšťat se liší v několika ohledech například, že jsou odolné vůči suchu, schopné žít několik let v suchých podmínkách či pouštích. Další rozdílem je způsob život, kdy se při sání na hostitelích zdržují jen krátkou dobu a většinu času žijí skrytě v okolí hostitelů (Ghosh et al. 2017). Tato čeleď obsahuje 5 rodů, z čehož rod *Nothoaspis* má pouze jediný druh klíštěte *N. reddelli* Keirans and Clifford, 1975 (Guglielmone et al. 2010)

### **Rod *Argas***

Klíšťáci tohoto rodu mají zploštělý tvar těla, postranní linii na těle se skládaným integumentem. Většina druhů parazituje na netopýrech nebo ptácích. Rod je celosvětově rozšířen většinou v polosuchých stanovištích nebo v suchých jeskyních (Sonenshine et al. 2008). Celkově tento rod obsahuje 61 popsanych druhů klíšťat (Guglielmone et al. 2010) U nás nejznámějším zástupcem je klíšťák holubí (*A. reflexus*) Fabricius, 1794, který byl do blízkosti člověka zavlečen při domestikaci holuba skalního. Vyskytuje se především v hnízdištích a nocovištích holubů, ale i jiných druhů ptáků (Guglielmone et al. 2010; Rosický et al. 1979). Znáám je též jako přenašeč některých patogenů. Dalším druhem vyskytující se v blízkosti České republiky (Slovensko) je například ještě klíšťák zhoubný (*A. persicus*) Oken, 1818, který je cizopasníkem drůbeže (Guglielmone et al. 2010; Ryšavý et al. 1989).

### **Rod *Antricola***

Jedná se o malou skupinu klíšťat, která obsahuje pouze 17 popsanych druhů (Guglielmone et al. 2010). Tito klíšťáci jsou velmi podobní jako u rodu *Argas*, ale liší se však strukturou jejich Hallerova orgánu na předních nohou. Stejně jako předchozí rod, *Antricola* spp. parazituje především na netopýrech a ptácích. Pro člověka z hlediska přenosu nemocí je

významný druh *C. kelleyi* Cooley & Kohls, 1941 jako přenašeč rickettsiázy a borreliózy (Guglielmone et al. 2010; Nicholson et al. 2020).

### **Rod *Ornithodoros***

V rámci tohoto rodu existuje 112 známých druhů, kdy se téměř všechny vyskytují v tropických a subtropických oblastech Afriky a Ameriky. Pouze nymfy a dospělci parazitují u savců a ptáků, přičemž mohou způsobit tak těžkou infestaci zvířete, že může docházet až k úmrtnosti ztrátou krve. Sají krátce a jsou považovány za hlavní vektory patogenů odpovědných za klíšťovou recidivující horečku (Guglielmone et al. 2010; Ghosh et al. 2017).

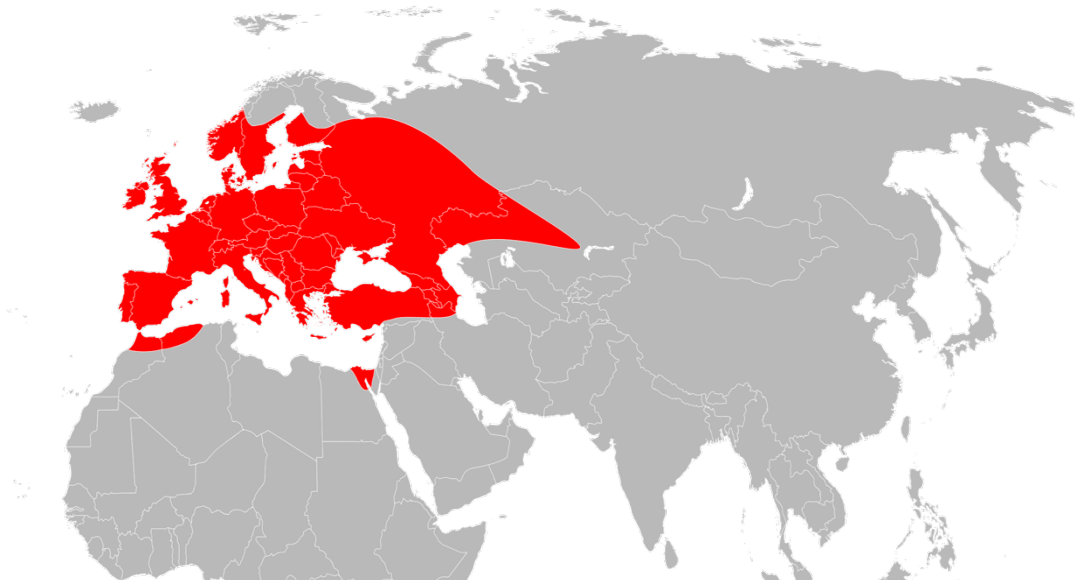
### **Rod *Otobius***

Tento nepřilíš početný rod se vyskytuje v Severní Americe a do Afriky a Asie byl neúmyslně zavléčen (Sonenshine et al. 2008). Obsahuje pouze dva druhy *O. megnini* Duges, 1883 a *O. lagophilus* Cooley & Kohls, 1940, který napadá ušní kanály savců (Guglielmone et al. 2010; Ghosh et al. 2017).

## **3.2 Klíště obecné**

### **3.2.1 Výskyt a rozšíření**

Klíště *I. ricinus* rozšířeno oblastech mírného pásu Evropy, Austrálie, jižní Afriky a Asie. V Severní Americe tento druh nebyl doposud zaznamenán. V Evropě jsou to oblasti celé západní, střední a jižní Evropy viz Obr. 3.



**Obrázek č. 3: Rozšíření klíštěte obecného v rámci Evropy (Zdroj: BlankMap-World.svg)**

Na jihu zasahuje až na sever Afriky (Alžírsko, Tunis). Oproti tomu na severu Evropy dosahuje jižních oblastí Skandinávie. Na východ se areál výskytu táhne zhruba do středního Povolží a

jižněji přes Gruzii, Arménii a Ázerbájdžán až do severního Íránu a Turecka (Rosický et al. 1979; Ghosh et al. 2017).

*Ixodes ricinus* je rozšířeno po celém území České republiky. Ke svému životu potřebují klíšťata vysokou vlhkost, proto jsou nejvíce rozšířená v listnatých a smíšených lesích. Přestože nejhojněji se klíště obecné vyskytuje v nižších oblastech s nadmořskou výškou do 600 m n. m., v současné době se vlivem klimatické změny klíšťata více rozšiřují i do vyšších nadmořských výšek, kdy se v některých oblastech mohou běžně vyskytovat až do 900 m n. m. (Ryšavý et al. 1989). Ojediněle byla nalezena ve výšce 1600 metrů nad mořem (Volf & Horák et al. 2007). Vysoká relativní vlhkost mikroklimatu okolo 90 % s delším obdobím s teplotami kolem 15°C jsou velice důležité pro úspěšný vývoj a rozmnožování. Nízká vlhkost je letální pro všechna stádia. Zrovna tak nejsou pro jejich vývoj příznivé extrémní teploty, které navíc mohou inhibovat kladení vajíček (Bonnet 1998). Larvy a nymfy vyžadují nejvyšší vlhkost, proto se vyskytují v těsné blízkosti půdy (hlína, hrabanka, listí). Dospělci se vyskytují ze všech stádií nejvýše, když ve snaze přichytit se na hostitele mohou vyšplhat až do výšky okolo 1 metru (Štork et. al 2013).

Imaga v aktivním stavu lze nalézt od dubna do října ve dvouvrcholové křivce výskytu s maximem v květnu a v září. Za příznivého počasí a teploty je klíště možno nalézt i v zimním období (Ryšavý et al. 1989).

### 3.2.2 Morfologie a anatomie

Morfologie a rozdíly mezi stádii

Samice klíštěte obecného je červeně zbarvená, po nasátí se barva těla změní na šedou, přední část těla je pokryta tmavým štítkem. Velikost se pohybuje okolo 3,5 – 4,5 mm, po nasátí může dosahovat až 1 cm. Samci jsou tmavě zbarvení ve velikosti 2,2 – 2,5 mm. Průhledné larvy dosahují velikosti okolo 0,8 mm a do hněda zbarvené nymfy mají něco přes 1 mm viz Obr. 4 (Ryšavý et al. 1989).



**Obrázek č. 4: Rozdíly mezi stádii klíštěte obecného** (zleva larva, nymfa, dospělá samice a napravo dospělý samec) (Autor: Franc Strle)

Tělo se skládá ze tří hlavních částí, a to z přední části gnathosoma neboli části ústní, zadní části tzv. idiosoma a článkovaných kráčivých končetin (Volf & Horák et al. 2007).

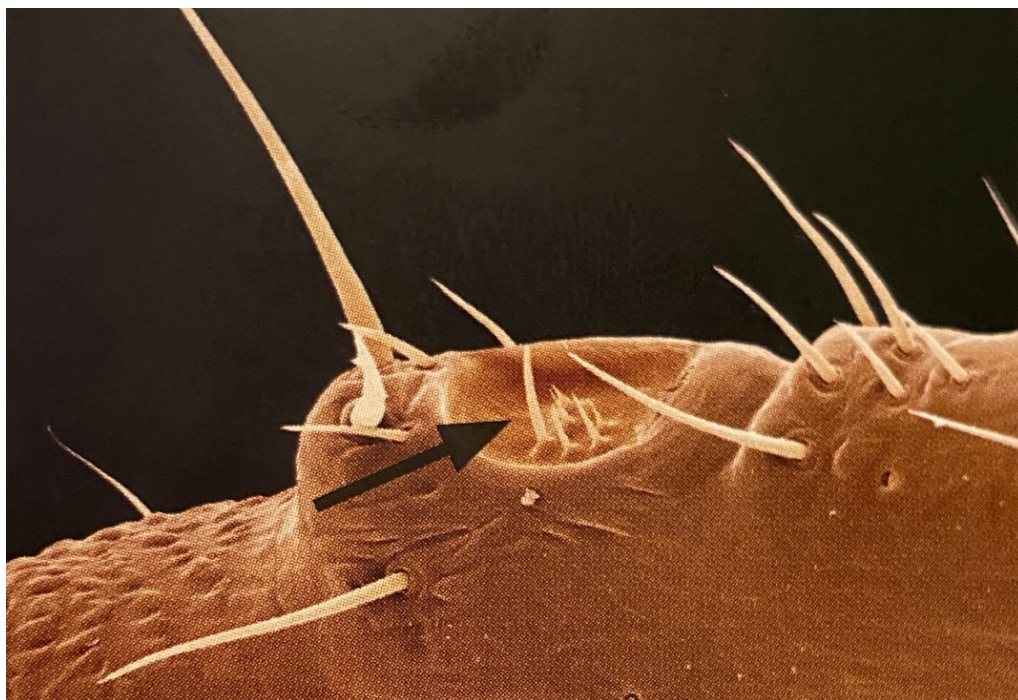
U všech stádií je dobře znatelná hlavička, která je umístěna terminálně, což je dobře viditelné při pohledu shora (Rosický et al. 1979). Ústní ústrojí klíšťat je tvořeno nepárovým, válcovitým hypostomem, který je opatřen zpětnými háčky. Tyto háčky nevytvářejí žádný závit, proto směr vytáčení klíštěte nemá žádný vliv na jeho odstranění (Votýpka et al. 2018). Hypostom může být u některých samců redukován. Z každé strany kolem hypostomu jsou umístěny párové chelicery (také s háčky), které slouží k naříznutí hostitelských tkání během přichycení klíštěte k hostiteli. Dále jsou na tomto místě umístěny palpy, které se skládají ze čtyř různých segmentů a zakrývají křehké části ústního ústrojí (Nicholson et al. 2020). Za pomoci všech těchto částí je klíště schopno být pevně uchyceno v pokožce hostitele viz Obr. 5.



**Obrázek č. 5: Stavba ústního ústrojí klíštěte (Autor: Jana Bulantová)**

Na přední část idiosomy nasedají mohutná makadla, která jsou prvním párem končetin. Na tarzálních člancích předního páru končetin se nachází zvláště důležitý orgán, který se nazývá Hallerův orgán (Obr. 6, viz šipka). Ten se skládá ze dvou částí, a to z přední jamky a proximální kapsle. Přední jamka obsahuje smyslové brvy (senzily), které jsou vzájemně propojeny kanálem. Lumen a kanál každé ze senzily je spojen se svaly a svazky nervových vláken, které vnímají teplo, CO<sub>2</sub> a další chemické sloučeniny, což je klíčové při vyhledávání hostitele (Ghosh et al. 2017). Makadla hrají důležitou roli i při výběru místa uchycení na hostiteli (Ryšavý et al. 1989).





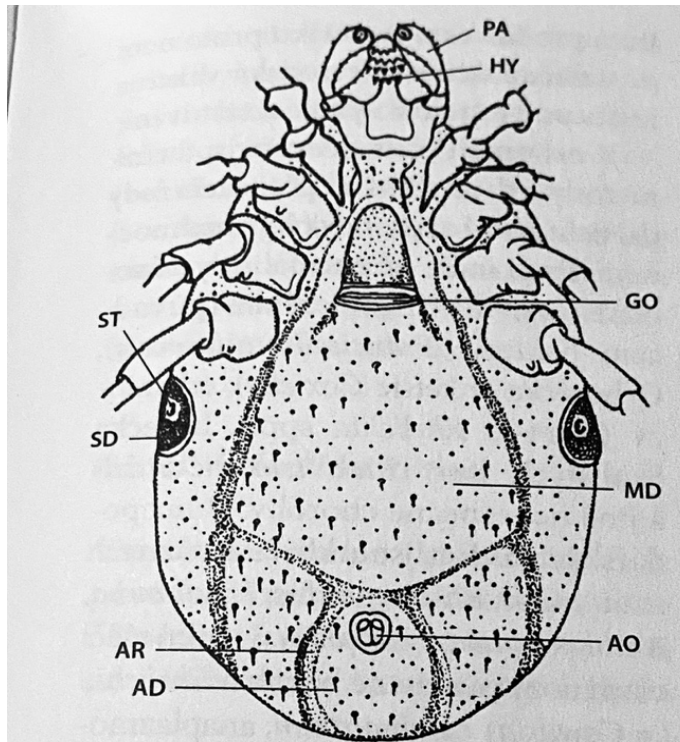
**Obrázek č. 6: Stavba Hallerova orgánu** (Autor: Jana Bulantová)

Tělo klíštěte je pokryto tvrdým hřbetním štítem zvaným scutum, podle jeho délky a tvaru lze dobře rozpoznat samce od samice a nedospělých stádií. U samců se hřbetní štít nachází po celém povrchu těla. Naproti tomu samice v nenasátém stavu a nedospělá stádia klíšťat mají tělo štítem pokryto pouze v přední třetině (Rosický et al. 1979). Díky tomuto upořádání těla je zadeček samice silně roztažitelný a je pro ni možné při sání mnohonásobně zvětšit svůj objem a získat tak dostatek potravy (Volf & Horák et al. 2007).

U rodu *Ixodes*, stejně jako například u rodu *Haemaphysalis*, chybí oči. Většina rodů klíšťat má jinak oči umístěny vzadu po stranách štítku (např. *Dermacentor*, *Amblyomma*, *Hyalomma* a *Rhipicephalus*) (Volf & Horák et al. 2007).

K přední části zadečku na břišní části těla jsou připojeny 4 páry kráčivých končetin s šesti články. Končetina je složena z kyčle, příkyčlí, stehna, holeně, příchodidla a chodidla. Na konci chodidel jsou vyvinuty polštářkovité přísavky se dvěma drápkami. Výjimkou jsou larvy, které mají pouze 3 páry končetin (Sonenshine & Roe et al. 2014).

Genitální otvor mají klíšťata v přední třetině břišní strany těla a je ve tvaru štěrbin. U nedospělých jedinců (larvy a nymfy) je genitální otvor uzavřen a zřetelný je tak až v dospělosti. Anální otvor se nachází na zadečku a je kryt dvěma chlopněmi. Dále je ještě obklopen anální rýhou, která je u *Ixodes ricinus* umístěna před řitním otvorem. Nymfy a larvy se neliší pouze



**Obrázek č. 7: Zjednodušená morfologie klíštěte** (PA – palpy, HY – hypostom, GO – genitální otvor, MD – mediální destička, AO – anální otvor, AD – anální destička, AR – anální rýha, SD – stigmální destička, ST – stigma) (Zdroj: Hoogstraal 1958)

vzhledem a velikostí, ale i tím, že nemají pohlavní otvor (Rosický et. al 1979). Celá morfologie viz Obr. 7.

## Anatomie

### 3.2.2.1.1 Trávicí soustava

Trávicí soustava je trubicovitá a má 3 hlavní oddíly – stomodeum, mesenteron proktodeum. Přední část zvaná stomodeum neboli ústní kanálek je členěna na dutinu ústní, hltan a jícen. Je ektodermálního původu, a proto je vystlána chitinovou kutikulou. Také je důležitá pro mechanické zpracování potravy. Dutina ústní obsahuje vývody slinných žláz (Sonenshine & Roe et al. 2014; Volf & Horák et al. 2007). Tyto velké žlázy, které připomínají shluky hroznů, jsou spojeny přes slinné kanály s ústy. Jejich sekrety jsou vyprazdňovány do salivária umístěného mezi chelicerami a hypostomem. Klíště má obsaženo ve slinách aktivní sloučeniny, které usnadňují spojení mezi klíštětem a hostitelem, a zároveň potlačují zánětlivé reakce hostitele. Díky tomu vznikne kanál, jímž se dostanou sliny od klíštěte do těla hostitele, a naopak (Nicholson et al. 2020). U samic slinné žlázy zcela degenerují díky látkám získaných od samců během páření (Bowman et al. 2008). Mesenteron neboli střední střevo je entodermálního původu a není vystláno kutikulou. Je hlavním orgánem, v němž probíhá vlastní intracelulární trávení krve (Lara et al. 2005; Anderson et al. 2008; Volf & Horák et al. 2007). Je pokrytý jednovrstevným epitelem, který směrem do lumenu střeva (vnitřní strana) obsahuje trávicí buňky a směrem do hemocoelu (vnější strana) je ohraničena bazální

membránou. Trávicí buňky slouží k pohlcování a zpracování potravy. Mesenteron je dále vybaven celou řadou postranních laloků, díky kterým může klíště pojmout co největší množství krve. Při plném nasátí se u samic tyto laloky rozšíří tak, že vyplňují celou hmotu jejího těla. V případě, že se tyto buňky opotřebí, jsou vypuzeny do lumenu střeva, degradovány a nahrazeny novými. Trávení probíhá intracelulárně, což je výhodné pro řadu mikroorganismů, včetně přenášených patogenů. Vnitřní prostředí střeva je chudé na proteázy a další trávicí enzymy, které by mohly mikroorganismy poškodit. Proktodeum neboli zadní střevo slouží pro uložení a odstranění odpadních látek, ústí do malpighických trubic a končí rektum (Sonenshine & Roe et al. 2014; Volf & Horák et al. 2007).

#### 3.2.2.1.2 Vylučovací a pohlavní soustava

Vylučovací ústrojí je tvořeno modifikovanými metanefridiemi, ale hlavní vylučovací funkci plní malpighická trubice. Dvě malpighické žlázy nasedají na konci zadního střeva (Sonenshine & Roe et al. 2014). Samčí pohlavní soustava je tvořena varlaty, semenným váčkem a ejakulačním kanálem, který je spojen s genitální trubicí. Do ejakulačního kanálu ústí pomocná žláza, která produkuje spermatofoxy. Reprodukční orgány samice jsou vaječníky, párové vejcovody, děloha a semenná nádoba. U neoplozených samic je vaječník malý a nenápadný, ale během příjmu potravy a zejména po páření se enormně rozšiřuje (Nicholson et al. 2020). Pro reprodukční úspěch klíšťat jsou důležité feromonové žlázy, protože vylučují fenolový pohlavní feromon, díky kterému jsou klíšťata schopna spolu komunikovat a spářit se (Sonenshine & Roe et al. 2014).

#### 3.2.2.1.3 Nervová soustava

Centrální nervový systém klíšťat má podobu synganglionu, což je jednodušší nervová hmota s nervy vystupujícími k jednotlivým částem těla. Je umístěn nad genitálním otvorem. Velké nervy inervují od synganglionu nohy. Menší nervy pak řídí palpy, chelicery, kutikulu a vnitřní orgány. Nervový systém také obsahuje nervové receptory pro neuropeptidy, a tím je umožněna vzájemná komunikace neuronů při regulaci fyziologických procesů (Bissinger et al. 2011; Sonenshine et al. 2008).

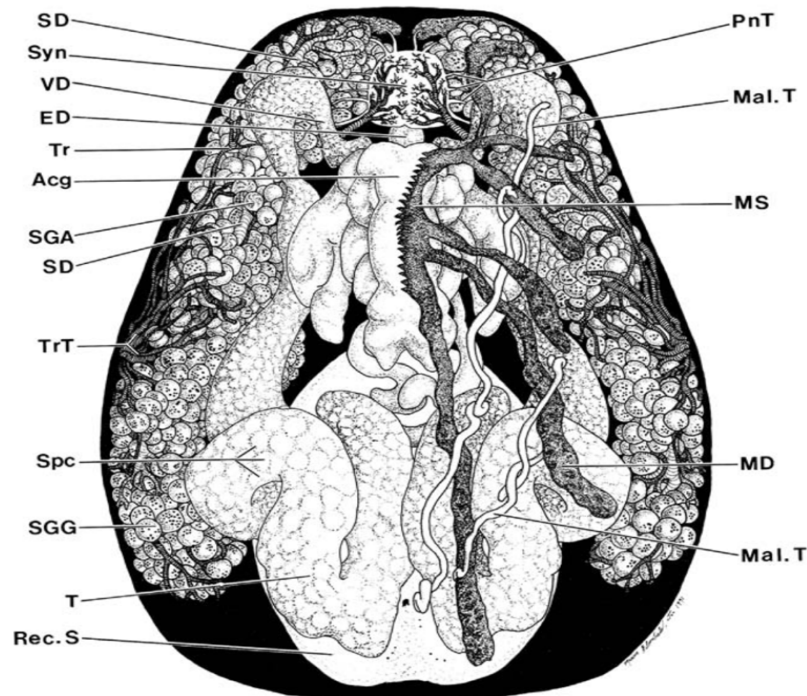
#### 3.2.2.1.4 Oběhová soustava

Klíšťata mají otevřenou oběhovou soustavu s typickou tekutinou – hemolymfou, což je vodné médium bohaté na soli, aminokyseliny, rozpustné proteiny a další rozpuštěné látky. Kromě toho obsahuje několik typů hemocytů, z nichž nejvýznamnější jsou plasmacyty a granulocyty. Tyto buňky často fungují při fagocytóze nežádoucích mikrobů (Matsuo et al. 2007). Uprostřed těla je přítomno jednoduché srdce ve tvaru trubice, a to plní důležitou funkci: filtruje a cirkuluje hemolymfu. Ta vyplňuje tělní dutinu, končetiny a některé další části těla. Vnitřní orgány a tkáně jsou v ní omývány (Sonenshine & Roe et al. 2014).

#### 3.2.2.1.5 Dýchací soustava

Dýchací otvory jsou umístěny za kyčlemi čtvrtého páru nohou. U dospělých klíšťat a nymf se pro absorpci kyslíku a odvodu CO<sub>2</sub> využívá systém tracheálních trubic. Ty u larválních stádií

chybí. Klíšťata dýchají za pomoci hydrostatického tlaku a jednoho páru vzdušnic (Sonenshine & Roe et al. 2014). Pro lepší přehled je celá vnitřní anatomie těla zobrazena na Obr. 8.



**Obrázek č. 8: Vnitřní anatomie samce klíštěte** (Acg – pomocná žláza; ED – ejakulační kanál; MD – midgut diverticulum; MS – (žaludek); Mal.T – Malpighiho trubice; PnT – kmeny nervů pedálů; Rec. S, – rektální vak; SGA – slinná žláza, zóna agranulárních (typ I) acinů; SGG – slinná žláza, zóna granulovaných acinů (typy II a III); SD– slinný kanál; Spc – spermatocysty označené nepravidelnými tečkovanými liniemi; Syn – synganglion; T – varlata, TrT – tracheální kmeny; Tr – trachea; V.D – vas deferens (Zdroj: Sonenshine & Roe et al. 2014)

### 3.2.3 Rozmnožování a životní cyklus

Životní cyklus klíštěte obecného čítá vajíčko a tři aktivní stádia – larva, nymfa a dospělec. Všechna aktivní stádia klíštěte sají na hostiteli (Graca-Souza et al. 2006). Samice pro vývoj vajíček potřebuje krev od hostitele. Dospělá samice saje krev pouze jednou, ideálně co nejrychleji 24-48 hodin po páření a získat co nejvíce živin pro tvorbu vajíček (Sonenshine et al. 2002). Některé samice klíštěte *I. ricinus* jsou během sání schopné svoji hmotnost zvýšit na 5 až 10násobek (Graca-Souza et al. 2006). Nasáté a spážené samice po opuštění hostitele najdou chráněné místo pro naklazení 2500 až 4000 vajíček a poté umírají. Vhodným místem pro naklazení vajíček jsou mikrohabitaty jako půda, napadané listí nebo hnízdo hostitele. V mírném pásmu a subarktických oblastech klíšťata běžně podstupují diapauzu během

nejchladnějších měsíců. V důsledku toho může životní cyklus trvat dva i více let. Například u klíštěte obecného v severní části Evropy může trvat až 4 roky. Klíště obecné je typickým tříhostitelským klíštětem, což znamená, že dojde k hledání a sání na hostiteli ve třech parazitujících stádiích (Sonenshine et al. 2002). Larvy a nymfy cizopasí především na drobných zemních savcích a ptácích. Dospělci se vyskytují hlavně na velkých savcích volně žijících nebo i domácích (Rosický et al. 1979).

#### **3.2.4 Medicinský význam klíšťat**

Klíšťata přenášejí více druhů patogenů než kterákoliv jiná skupina členovců žijících se krví na celém světě (Benelli et al. 2016). Klíšťata mají význam ve veterinární a humánní medicíně především proto, že jsou přenašeči patogenů způsobujících onemocnění lidí, hospodářských zvířat nebo zvířat v zájmových chovech. Přichycení klíšťat v kůži může také způsobit různé druhy dermatóz nebo kožních problémů jako je zánět, bolest či otok. Zřídka pronikají i do zvukovodů. Některé druhy klíšťat mohou způsobit ochabnutí částí těla nebo dokonce ochrnutí. U jedinců, kteří jsou pravidelně napadáni klíšťaty se mohou vyskytnout alergické reakce či anafylaktický šok (Van Wye et al. 1991). V Severní Americe jsou klíšťata vektory velkého počtu patogenů způsobujících lidské choroby, včetně anaplasmózy, babesiózy, lymeské boreliózy, zimnice Colorado, horečky Skalisticích hor, ehrlichiozy, tularémie, rickettsiozy a dalších onemocnění. V Evropě jsou hlavními přenašeči patogenů způsobujících vážná onemocnění (nejčastěji lymeská borelióza, klíšťová encefalida) druhy *I. ricinus* a *I. persulcatus* (Benelli et al. 2016). Některé druhy klíšťat mohou být považovány také za domácí škůdce, například druh *R. sanguineus* Latreille, 1806 parazitující zejména na psech. Tento druh může žít a parazitovat v domech po celý rok na psech i lidech, zvláště, pokud je dům vytápěn (Sonenshine et al. 2002).

### **3.3 Ochrana proti klíšťatům**

Vzhledem k velkému medicínskému i veterinárnímu významu parazitických členovců jako nepříjemných trapičů nebo přenašečů nebezpečných onemocnění, byla vyvinuta řada metod k jejich potlačení. Snahou těchto metod je snížení jejich početnosti, redukce výskytu či odpuzení. Boj proti nebezpečným členovcům probíhá na řadě úrovní, které můžeme rozdělit na: mechanické, biologické a chemické. V neposlední řadě sem můžeme přiřadit také i genetickou modifikaci, díky které nejsou členovci schopni dále přenášet infekční onemocnění a zároveň tyto pozměněné geny šířit ve své populaci. Mechanicky se bojuje proti jiným druhům členovců (např. komáři, mouchy) a jde především o likvidaci jejich zdroje výskytu či využití moskytiér. V biologických metodách jsou využívány vysoce specifické patogeny, predátoři, parazité a parazitoidy určitých skupin parazitických členovců. Poslední jsou metody chemické, které zahrnují používání různých typů repelentů, insekticidů a akaricidů (Volf & Horák et al. 2007).

### 3.3.1 Akaricidy

Akaricidy jsou látky, které svým účinkem zabíjí roztoče, a tedy také klíšťata. Arzen byl první účinnou látkou pro hubení klíšťat a tím i nemocí přenášených klíšťaty. Postupem času byl arzen nahrazen organochlorovými, protože díky němu byla zaznamenána vysoká úmrtnost ve stádech skotu, a navíc se klíšťata stala na arzen rezistentní (George 2000). Nově vyvinuté akaricidy s nízkou toxicitou pro savce (např. pyretroidy, avermektiny) mají sice vysokou účinnost, ale jejich používání je vysoce nákladné (Sonenshine 2006; Sonenshine & Roe et al. 2014). S používáním akaricidů je navíc spojeno mnoho problémů, jako je znečištění životního prostředí, kontaminace masa a mléka hospodářských zvířat a výtaje, zejména v rozvojových státech (Sonenshine et al. 2002). Všechny tyto problémy vedly k hledání alternativních metod, které budou dobře účinné v zemědělství (Ghosh et al. 2006).

V poslední době roste proto zájem o možnost využití rostlinných akaricidů, zejména éterických olejů k regulaci některých druhů klíšťat (např. *R. microplus*, *R. annulatus*). Například éterický olej ze semen kmínu a nového koření u výše zmiňovaných klíšťat dosáhl 100 % úmrtnosti při koncentracích mezi 2,5 % až 20 %. Ovšem ne všechny éterické oleje jsou pro klíšťata toxické. Toxicita a odpudivost rostlinných éterických olejů či jejich terpenoidních složek je již nějakou dobu rozpoznána, ovšem přesný biochemický mechanismus účinku není zcela objasněn. Bylo navrženo několik mechanismů toxického působení, které zahrnují inhibici aktivity acetylcholinesterázy, aktivitu na receptoru kyseliny g-aminomáselné (GABAA), nikotinový acetylcholinový receptor, inhibici kanálů s přechodným receptorovým potenciálem, octopaminové receptory a tyraminové receptory (Gross et al. 2017). Nejčastěji používanou metodou ke studiu akaricidních účinků je ponoření larev, nymf nebo dospělců na několik sekund do extraktového roztoku. Pokud je klíště usmrceno za 24 až 72 hodin po aplikaci, je to hodnoceno jako akutní toxicita neboli jako akaricidní účinnost (Benelli et al. 2016).

### 3.3.2 Repelenty

Repelenty jsou látky, které svými vlastnostmi mají schopnost klíšťata odpuzovat (Adenubi et al. 2016). Pokud jde o člověka, nejúčinnějším prostředkem pro předcházení přichycení klíšťat a přenosu onemocnění je, vyhybat se místům s vysokou koncentrací klíšťat, důkladně se prohlédnout, pokud do takových míst vstoupí, nelehat si do trávy, nechodit ve vysoké trávě, nosit světlé oblečení, nosit dlouhé kalhoty zastrčené v obuvi a používat repelenty (Bissinger & Roe 2010; Lupi et al. 2013). Účinnost repelentů závisí především na jejich složení a koncentraci účinné látky (Benelli et al. 2016). Většina fytochemikálií, které byly testovány na repelentní účinky proti klíšťatům, jsou terpenoidy. Strukturálně to jsou rozmanité sloučeniny, které tvoří největší skupinu sekundárních rostlinných metabolitů a podílejí se na obranných mechanismech rostlin (Langenheim 1994; Kappers et al. 2008).

## Syntetické repelenty

Výčet běžně používaných sloučenin jako repelenty dle Benelli et al. (2016):

**IR3535** (= 3-N-acetyl-N-butylamino-propionový ethylester)

**DEET** (N, N-diethyl-m-toluamid)

**DEPA** (N, N-diethyl-2-fenyl-acetamid)

**icaridin** (1- 2-2 hydroxyethyl-1-methylester piperidinkarboxylové kyseliny)

### DEET

Nejpoužívanější repelentní účinnou látkou na světě je DEET (Frances 2007). Ukázalo se, že DEET je vysoce účinný proti komárům i klíšťatům. Například ve studii Carroll et al. (2008) bylo zjištěno, že krémové přípravky obsahující 33% DEET, poskytují účinnou ochranu před klíšťaty po dobu 12 hodin. Na druhou stranu je třeba zmínit, že jeho výroba a používání znamenají určitou zátěž pro životní prostředí. Dle některých autorů (Aquino et al. 2004; Costanzo et al. 2007) se jedná o častý kontaminant vodních systémů po celém světě. Navíc se dnes často pochybuje o jeho bezpečnosti a jako preventivní opatření by se neměl používat u dětí mladších 2 měsíců (Aquino et al. 2004). Mezi časté komplikace patří otrava po vdechnutí a oční problémy vlivem kontaktu se sliznicí oka (Goodyer & Behrens 1998). Dalšími zdravotními problémy mohou být různé kardiovaskulární a dermatologické reakce (Stajković & Milutinović 2013). Navíc jeho vlastnosti jako lepkavost, nepříjemný zápach a leptání plastů může být dalším důvodem pro hledání alternativních přípravků (Semmler et al. 2011). V současné době jsou pro použití na lidskou kůži proti klíšťatům doporučovány pouze dvě alternativy k DEETu registrované dle US EPA a to, IR3535 a picaridin. DEET je však i nadále komerčně nejrozšířenějším a nejnámějším produktem s nímž jsou ostatní repelenty porovnávány jako se standardem (Bissinger et al. 2011).

### Icaridin

Tento novější repelent má hned několik výhod oproti DEETu. Nezanechává po sobě žádný zápach, není lepivý nebo mastný, nepoškozuje oblečení a neleptá plasty (Katz et al. 2008).

Kromě toho působí podobně, když se aplikuje na kůži, látku či srst zvířat. Proto ho lze použít k ochraně nejen lidí, ale i psů, koček a koní (Abdel-Ghaffar et al. 2015). Bylo prokázáno, že 10% a 20% koncentrace icaridinu poskytuje velmi vysokou úroveň ochrany po dobu až 12 hodin před klíšťaty (*A. americanum*) (Carroll et al. 2008). Navíc přípravky s 20% koncentrací této látky mohou nabídnout delší dobu účinku proti klíšťatům než DEET (Frances 2007). Dále je důležité zmínit, že nebyla prokázána jeho toxicita, která by měla vliv na vnitřní orgány, reprodukci nebo způsobovala dermatitidu. I přes řadu výhod není doporučováno jeho užití u dětí mladších 2 let (Diaz 2016).

### IR3535

Původně byl IR3535 ve Spojených státech uveden na trh jako krém na pokožku pro jeho změkčující a zvlhčující vlastnosti. Později bylo zjištěno, že má také repelentní účinky (Diaz 2016). Jedná se o organickou sloučeninu odvozená od přirozené aminokyseliny  $\beta$ -alaninu a je

považována za velmi účinný repelent, který lze využívat i u dětí mladších než 6 měsíců. Při srovnání s DEETem je míra toxicity nižší. Ovšem vysoké koncentrace absorbované kůží a přeneseny do krve nejsou vhodné (Vilar et al. 2020).

### Přírodní repelenty

Mezi přírodní repelenty lze zařadit zejména esenciální oleje a synteticky vyrobené repelenty, jejichž hlavní repelentní složka pochází z rostlin. Vysoká repelentní účinnost je známá pro laboratorně vyráběné repelenty jako je menthoglycol (PMD) a pyrethrum které jsou komerčně dostupné na evropském trhu (Diaz 2016).

Přírodní repelenty mají oproti chemickým repelentům řadu výhod. Díky tomu, že jsou extrahované z rostlin, nezatěžují životní prostředí a nemají toxické účinky na necílové druhy. Dále při použití na hospodářských zvířatech nekontaminují jejich maso či mléko. Navíc jejich využití nemusí být finančně nákladné. Kromě lidí, kteří mají alergii na určité druhy rostlin, nepředstavují repelenty na bázi rostlin zdravotní rizika. Dalším důvodem je možnost rezistence klíšťat na chemické repelenty při jejich opakovaném použití (Benelli & Pavela 2018).

### PMD

PMD s chemickým názvem p-mentan-3, 8-diol je přírodní syntetická verze hlavní repelentní složky, která má původ v listech rostliny korymbie citroníková (*Corymbie citriodory*). Stejně jako icaridin může nabídnout lepší ochranu před klíšťaty než DEET. Je k dispozici v pumpičkách s roztokem o koncentracích od 10 % až 40 % (Carroll et al. 2008). V laboratorních testech Trigg & Hill (1996) bylo zjištěno, že při použití 50% účinné látky repelentu PMD se množství přisátých klíšťat (*I. scapularis*, *I. pacificus*, *D. andersoni*) snížilo o 77 %. Tyto výsledky byly porovnávány s 20% DEET, kdy produkt PMD byl mnohem lepší a zároveň poskytoval i lepší ochranu než esenciální olej z citronely.

### Esenciální oleje

Esenciální oleje jsou běžně používány v parfumerii, k ochucení potravin, lékařství, veterinářství, zemědělství či v dalších oborech. Přestože jsou éterické oleje považovány za bezpečné, pro vnitřní užívání se obvykle nedoporučují. Výjimečně mohou být orálně podávány jejich zředěné formy (např. hydrosoly) získané destilací olejů jakož vedlejší produkty. Lokální aplikace některých éterických olejů (např. oregano, levandule) do ran a popálenin přináší rychlé zhojení bez větších komplikací. Dále se éterické oleje využívají k inhalaci jako prostředek pro zlepšení nálady a na respirační obtíže. Esenciální oleje jsou známé jejich fungicidním, mikrobiálním, baktericidním, antioxidačním a pesticidním vlastnostem (Dubey et al. 2011; Bakkali et al. 2008). Nedávná studie odhalila také nový účinek esenciálních olejů a to ten, že ovlivňuje plodnost samic klíšťat, pokud jsou tyto samice vystaveny subletálním dávkám olejů (Ellse & Wall 2014).

Z chemického hlediska jsou esenciální oleje tvořeny uhlovodíky – terpeny a seskviterpeny a okysličenými sloučeninami jako alkoholy, estery, ethery, aldehydy, ketony, laktony, fenoly a fenolethery. V různých éterických olejích se také mohou vyskytovat například



mono a někdy i diterpeiny, fenypropanoidy, mastné kyseliny a jejich fragmenty, benzenoidy (Baser & Demirci et al. 2007; Guenther, 1972). Jejich složení se může výrazně lišit mezi jednotlivými druhy rostlin a jejich odrůdami, stejně jako dle oblastí původu (Zygadlo & Juliani 2003).

V posledních letech, zejména po zákazu používání antibiotik v krmivech v Evropské unii od ledna 2006, začalo testování různých éterických olejů jako potenciální alternativy k antibiotikům v krmivech pro zvířata (Hüsnü Can Baser & Chlodwig 2009). S výjimkou citrusových olejů získávaných lisováním za studena se všechny ostatní éterické oleje získávají destilací. Produkty získané extrakcí rozpouštědlem nebo superkritickou tekutinou nejsou technicky považovány za éterické oleje (Baser et al. 1995). Pro využití éterických olejů jako repelentů nebo akaricidů je nutné před použitím jejich rozpuštění v organických rozpouštědlech nebo v povrchově aktivních látkách jako například v hexanu, acetonu a etanolu. Za určitých podmínek lze využít i destilovanou vodu, mnoho rostlinných produktů má ale nízkou rozpustnost ve vodě (Domingues et al. 2013). Navíc, kutikula klíšťat je tvořena z vnějšku hlavně vosky a vnitřně proteiny, a proto nejlepší sloučenina je ta, která má největší schopnost proniknout do kutikuly, což jsou hlavně organická rozpouštědla (Chagas et al. 2002).

Dle Gonçalves et al. (2007) při testování na dospělých samicích a larvách bylo zjištěno, že aceton a metanol byly pro klíšťata toxičtější než etanol. Metanol může být ovšem bezpečně použit pro rozpuštění bylinných extraktů pro testování akaricidních vlastností, ale pro repeletní testy se díky jeho toxicitě nehodí (Ravindran et al. 2011). V současnosti jsou známy repeletní účinky proti klíšťatům u 51 esenciálních olejů a u dalších 39 čistých syntetizovaných látek z esenciálních olejů (Benelli & Pavela 2018). Rostlinné oleje byly používány pro osobní ochranu před různými členovci dlouho před objevením syntetických chemických repelentů (Novak & Gerberg et al. 2005). Na základě široké škály rostlinných extraktů nalezených v různých repelentních produktech, začínají být znovu tyto repelenty populární. To je částečně způsobeno pozitivním vnímáním přírodních látek ze strany veřejnosti (Novak & Gerberg et al. 2007). Bylo prokázáno, že řada éterických olejů má odpuzující účinky proti klíšťatům. Esenciální oleje jsou ale vysoce těkavé, proto se nevyznačují dlouhodobou repelencí. Obecně jsou méně účinné a poskytují přijatelnou úroveň ochrany před klíšťatou na kratší dobu po aplikaci než například DEET (Frandin & Day 2002; Moore et al. 2007). Použití vyšších koncentrací případně synergistický účinek směsi více silic může zvýšit repelentní účinnost. Na druhou stranu je třeba vzít v úvahu, že vysoké koncentrace éterických olejů mohou u senzitivních jedinců vést k až dermatitidám (Barnard 1999). Další možností vedoucí k prodloužení doby repelentní účinnosti se do esenciálních olejů často přidávají další specifické látky (Carroll et al. 2008). Takovou látkou jsou například cyklodextriny, což jsou netoxické makrocyclické oligosacharidy (CD). Vazba aromatických (hostujících) sloučenin éterických olejů na CD molekulu (hostitele) vede k vytvoření inkluzního komplexu. Ten zvyšuje stabilitu, zlepšuje rozpustnost ve vodě, chrání před oxidací, rozkladem vyvolaným teplem, redukuje fyziologické účinky a v neposlední řadě snižuje těkavost. Díky těmto vlastnostem jsou CD

vhodné pro použití v potravinářském a aromatickém průmyslu (Ciobanu et al. 2012). Další možností, jak tento problém řešit je využití některých postupů. Například mikroenkapsulace, což je „obalení“ kapek či pevných částic přírodním nebo syntetickým polymerem (Chagas et al. 2014; Bezzera et al. 2016).

Mezi metabolity, které jsou zodpovědně za repelentní účinnost patří některé monoterpeny, jako alfa-pinen, cineol, eugenol, limonen, terpinolen, citronellol, citronellal, kafr a tymol, které jsou běžnými složkami řady esenciálních olejů popsanych v literatuře pro jejich odpuzující aktivitu proti komárům (Jaenson et al. 2006; Park et al. 2005; Yang et al. 2004). Zejména potom oxidované sloučeniny fenyletylalkohol, b-citronellol, cinnamylalkohol, geraniol a alfa-pinen, izolované například z éterického oleje z *Dianthus caryophyllum* (karafiát), vykazují silné odpuzující účinky proti klíšťatům, zvláště proti *I. ricinus* (Tunón et al. 2006). Obecně lze říci, že esenciální oleje jsou tvořeny uhlovodíky (terpeny a seskviterpeny) a okysličenými sloučeninami (alkoholy, estery, étery, aldehydy, ketony atd.), které jsou zodpovědné za výrazný zápach rostlin. Hydroxylová skupina je vázána na primární, sekundární nebo aromatický uhlík. U některých metabolitů s hydroxylovou skupinou vázanou na terciální uhlík (linalool, a-terpineol a limonen), je repelentní aktivita potlačena. To znamená, že typy uhlíků se substitucí hydroxyly mění charakter odpudivosti pro některé druhy členovců. Dále terpenoidy obsahující dvě funkční skupiny jsou biologicky aktivní jako repelenty proti komárům (Nerio et al. 2010). Dle dalších studií Ma et al. (1999) a Wang et al. (2008) bylo zjištěno, že velikost pozitivního náboje mezi dvěma funkčními substitučními skupinami terpenoidů charakterizuje elektrofilní povahu. Díky tomu interakce repelentu s receptorem pravděpodobně souvisí s elektrofilními interakcemi.

Bylo prokázáno, že velké množství esenciálních olejů získaných z různých čeledí rostlin má vysokou repelentní účinnost vůči některým druhům členovců. Mezi rostlinami produkujícími esenciální oleje jsou některé rody jako je například *Cymbopogon* spp., *Eucalyptus* spp. a *Ocimum* spp., které byly široce studovány. Rostliny rodu *Cymbopogon* tradičně používají k odpuzování komárů v oblastech džungle v Amazonii (Moore et al. 2007). Tato rostlina je zdrojem nejpoužívanějších přírodních repelentů na světě, kdy byly její extrakty testovány na různých druzích členovců, kteří způsobují závažná onemocnění jako malárie, horečka dengue, žlutá zimnice, leishmanióza. Původci těchto onemocnění jsou hlavně komáři (např. rody *Anopheles*, *Aedes*, *Haemagogus*) nebo písečná moucha (Kimutai et al. 2017; Trongtokit et al. 2005). V některých testech měl významně lepší repelentní účinnost než DEET (Tawatsin et al. 2001; Ansari & Razdan, 1994)

Esenciální olej z citronely se před vznikem syntetických repelentů používal proti hmyzu běžně a dnes se často objevuje jako přísada v některých komerčních produktech proti klíšťatům pro své odpuzující účinky (Bissinger & Roe 2010; Semmler et al. 2011). Dalším druhem rostliny s odpuzujícími účinky je citrónová tráva. Její éterické oleje a výtažky odpuzují nymfy klíšťat *I. ricinus* a *A. cajennense*, navíc snižují zamoření skotu před *R. microplus* (Heimerdinger et al. 2006; Thorsell et al. 2006; Soares et al. 2010).

V nedávné studii Štefánidesová et al. (2017) shrnuje, že éterické oleje z bazalky, levandule, citronové trávy, máty peprné a bergamotu mají sice odpuzující účinky proti klíšťatům i při nízkých dávkách, ale nejsou tak účinné jako olej z plodu hřebíčku, mateřídoušky úzkolisté, tymiánu obecného a citronely.

Naproti tomu laboratorní in-vitro test na dospělých samicích *I. ricinus* prokázal, že éterický olej z levandule vykazoval zajímavý potenciál jako alternativní repelent pro venkovní krátkodobé aktivity. V této studii byly také zkoušeny další dva éterické oleje, a to pomerančový a eukalyptový, ale ty vykazovaly nízkou repelenci. Rovněž bylo zjištěno, že účinnost všech tří zkoumaných olejů se v průběhu času výrazně snížila, zatímco účinek DEETu zůstal po dobu testování téměř stejný (Kulma et al. 2017).

Ačkoliv repelentní aktivita éterických olejů je obecně připisována některým konkrétním sloučeninám, synergický jev mezi těmito metabolity může vést k vyšší biologické aktivitě ve srovnání s jednotlivě použitými oleji (Gillij et al. 2008). Tyto synergické účinky éterických olejů byly pozorovány už proti komárům (Reegan et al. 2014). Toto zjištění bylo vyzkoušeno například ve studii Štefánidesové et al. (2017), kteří testovali dvě směsi vždy dvou éterických olejů. Výsledkem bylo, že účinnost směsi éterických olejů jako repelentů se zvýšila oproti tomu, když byl éterický olej použit jednotlivě. Další studie naopak uvádí, že po smíchání více éterických olejů se repelentní aktivita směsi výrazně snížila, než když byly éterické oleje a další složky repelentu použity jednotlivě (Omolo et al. 2004). To znamená, že i minoritní složky, které jsou obsažené v repelentech, jsou velmi důležité pro celkové složení repelentu a jeho odpuzující aktivity. Pokud si vezmeme rostlinu, tak i ta představuje komplexní soubor sloučenin (minoritních a majoritních), které jsou zodpovědné za repelentní aktivitu proti patogenům fungující jako celek, nikoliv jednotlivě. V souladu s tím mohou menší složky, které se nacházejí v nízkých procentech, působit jako synergenty a zvyšovat účinnost hlavních složek prostřednictvím různých mechanismů (Berenbaum 1985). V případě klíšťat velmi záleží na odparu samotného éterického oleje, který většinou bývá účinný na relativně krátkou dobu. Proto by některé další látky přidané do repelentu mohly zlepšit výkon aktivní složky éterického oleje na kůži po delší dobu (Barnard et al. 2000; Nerio et al. 2010). Na identifikaci jednotlivých mechanismů synergických účinků probíhá mohou dalších studií (Omolo et al. 2004) a je zapotřebí tyto efekty i nadále v budoucnu sledovat.

### 3.3.3 Metody hodnocení repelentní aktivity

Proto, aby mohl být repelent proti klíšťatům pro účely osobní ochrany schválen, musí být v souladu s nařízením o biocidních přípravcích podle Evropské unie (528/2012), které vychází ze standardu platící pro většinu evropských laboratoří, které pracují na testování těchto přípravků. Ty vydává Evropská agentura pro chemické látky (ECHA) a jakákoliv odchylka od těchto pokynů vede k tomu, že nebude produkt zaregistrován v EU (Kulma et al. 2017). Repelent může být schválen, pokud je jeho účinnost  $\geq 90\%$  během doby uvedené na etiketě (ECHA 2018). Podobné pokyny uznávaných vědeckých metod jsou vydané v dokumentu EPA (2010) jako hlavní doporučení pro testování přípravků v USA.

Zkoušky účinnosti účinné látky nebo přípravku dle ECHA (2018) jsou rozlišovány do 4 kategorií: screeningové testy, laboratorní studie, simulační testy v laboratoři a polní testy. Screeningové testy obvykle nesouvisí s terénními podmínkami a často se neprovádějí s úplným produktem, ale pouze s účinnou látkou. Takový test slouží hlavně pro poskytnutí doplňujících informací (např. prokázání použité koncentrace jako za optimální). Laboratorní studie se provádějí za ověření účinnosti v laboratoři podle přesně definovaných kritérií. Simulační testy jsou více spojeny s terénními podmínkami a v některých případech mohou být dostatečné pro prokázání účinnosti. Polní testy poskytují představu, jak produkt funguje v praxi a je důležitý pro vyhodnocení, jak účinnost ovlivňují vnější faktory (počasí, kolísání populace, teplota). V těchto testech je důležité experimentální nastavení. Všechny výsledky by měly být porovnány s výsledky kontrolních testů, kdy nebyl předmět ošetřen testovanou látkou (ECHA 2018).

Důležitou vlastností klíšťat, které se často využívá v biologických testech je tzv. geotaktická odpověď. Negativní geotropie je reakce, kdy klíště přijde do kontaktu s potencionálním hostitelem a začne lézt po jeho těle směrem nahoru. Důvodem je najít správné místo pro sání. Pokud ale klíště přijde do kontaktu s repelentem, začne lézt směrem dolů od místa ošetření repelentu. Tato geotropie je potom nazývána jako pozitivní. Těchto reakcí klíštěte může být využito jak v laboratorní testech in vitro (např. nahřátá skleněná deska), tak v biologických testech in vivo na lidské noze nebo ruce (Kröber et al. 2013).

Obecně se k hodnocení repelentní aktivity používá několik metod závisících na druhu. V případě klíšťat jsou pro každý test vyžadovány čerstvé, nenasáté a patogenů prosté nymfy či samice. Využívá se jak hodnocení repelentní účinnosti v laboratoři in-vitro, tak na lidských dobrovolnících, kterých by mělo být testováno minimálně 10 s 5 klíšťaty na test (ECHA 2018).

Pro hodnocení repelentní aktivity jsou klíčovým nástrojem laboratorní zkoušky, které lze rozdělit do 3 kategorií: biologické testy in-vitro bez přítomnosti stimulace hostitele, biologické testy in vitro se stimulací hostitele a biologické testy in vivo na živých hostitelích (Dautel 2004).

Dle EPA (2010) je doporučováno testování odpudivosti klíšťat hlavně v laboratoři a pokud jsou prováděny polní zkoušky, měly by vycházet z metod často prováděných studií. Design metod využívaných v testech v laboratoři je různorodý, ale pro vyhodnocení a případné porovnání s jinými výsledky je vždy nejlepší vycházet z metod, které jsou často používány. Jejich seznam je uveden přímo v dokumentu EPA. Pokud se využívají lidské subjekty, tak ty nejlépe simulují repelentní skutečnost za využití negativní geotropie na paži.

V dokumentu ECHA (2018) a EPA (2010) je uvedena doporučovaná metoda, která je velice podobná u obou dokumentů. Ve výšce 3 cm nad zápěstí je nakreslena čára a paže je ošetřena testovaným repelentem. Druhá neošetřená paže stejné osoby se využívá jako kontrolní. Hodnocení repelentního účinku by mělo být zaznamenáváno nejlépe v časech po 5 minutách od aplikace, dále po 1 hodině a každou hodinu po dobu 4 hodin případně dle etikety. Klíště se považuje za neodpuzené, pokud překročí čáru nad 3 cm. Naopak za odpuzené se považuje jedinec, který spadne z paže nebo se okamžitě otočí zpět od místa ošetření a jde směrem dolů. Klíšťata by měla být před a v průběhu experimentu uchovávána v optimálních

podmínkách, tzn. relativní vlhkost > 90 %, teplota = 25 ° ± 3 ° C a fotoperioda přibližně 16 : 8 hodin (světlo : tma) (ECHA 2018).

Z hlediska laboratorních metod in-vitro je nejčastěji repelentní účinnost hodnocena pomocí testů na Petriho miskách s filtračním papírem. Jedna část filtračního papíru se ošetří roztokem s éterickým olejem a na druhou jsou pak vypuštěni členovci v předem daném počtu (obvykle 10–20 ks) a časovém intervalu. Během pokusu je zaznamenáván čas a počet jedinců, kteří zůstali a repelent byl pro ně překážkou. Také u každého laboratorního testu je použita i tzv. kontrola, kdy filtrační papír je ošetřen stejným množstvím látky (např. etanol) bez odpuzujícího účinku (Wang et al. 2006; Chaubey, 2007).

Kromě této metody s filtračním papírem lze využít test se skleněnou deskou, která je umístěna na termostatem kontrolovanou hliníkovou desku stejné velikosti. Na povrchu skla se udržuje teplota 34 °C a celá sestava je nakloněna pod úhlem 15 °. Dále je na sklo nakreslen kruh s průměrem 130 mm a vodorovná čára. Kruhový povrch je ošetřen testovaným produktem, na která jsou po 15 minutách od ošetření umístěna klíšťata a je pozorována jejich reakce po dobu 5 minut. Tento biologický test využívá jejich geotaktické reakce, a zároveň test in-vitro na skleněné desce také představuje spolehlivou alternativu k lidským subjektům pro počáteční hodnocení nových produktů. A zvláště ty produkty, u kterých nebyla ještě stanovena toxicita a dermatologické reakce. Tato metoda je také využitelná pro in vivo test na lidské holeni, kdy se s využitím předchozích postupů, celý test přenesou na lidské dobrovolníky. Obě metody poskytují velmi podobné hodnocení účinnosti pro testované repelentní produkty (Kröber et al. 2013).

Geotaxie lze také využít v biologickém testu s nařezanými proužky (10 cm x 100 cm) z bavlněného materiálu. Na takovém proužku je vyznačeno 5 různých ploch (10 cm x 10 cm), které mohou být impregnovány různými koncentracemi sledovaného repelentu ve vzdálenosti od sebe 1 cm (koncentrace u DEET například 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 % a 10 %). Celý systém je pak takto připevněn na svislý povrch pod úhlem 60° a klíšťata jsou umístěna vždy dolů na neošetřenou plochu pod nejnižší koncentrací. Celý test je prováděn po dobu 3 minut. Pro využití negativní geotaxie, je před klíšťaty umístěna ruka experimentátora jako návnada. Paralelně k tomu se na papír ručně zakresluje trajektorie klíštěte a zároveň se zaznamenává při jaké koncentraci klíště nepostupuje výše či odpadá. Tento test je zároveň metodou pro studium toleranci na DEET (Belova et al. 2012).

Jako vhodná metoda pro polní test je využití lidských dobrovolníků, kteří nosí ošetřené a neošetřené bílé ponožky v místech s výskytem klíšťat. Tato metoda je výhodná v tom, že představuje realistické použití odpuzujícího prostředku na oděvu, látková bariéra chrání dobrovolníky před přímým kontaktem s klíšťaty a klíšťata jsou dobře vidět (Bissinger et al. 2011). Nevýhodou je, že nezohledňuje absorpci repelentu do kůže nebo interakci repelentu s látkami přítomnými v kůži, a proto nemusí být zcela objektivní. Kromě toho ponožky nemusí být schopny chránit subjekt před přichycením larválními stádii klíšťat (Carroll et al. 2010).

## 4 Metodika

### 4.1 Klíšťata

#### 4.1.1 Lokality pro odchyt klíšťat

Klíšťata pro pokus byla sbírána v Praze v Kunraticko-michelském lese v okolí Kunratického potoka (50.02N, 14.47E), Rakovníku (50.10N, 13.73E) v období od června do září roku 2019 na území České republiky. Lokality byly vybírány na základě znalostí biologie klíštěte a jednalo se převážně o lesy nebo lesoparky, kde se vyskytovaly hojně listnaté stromy s vrstvou napadaného listí, vlhkou hlínou a nesekanou trávou.

#### 4.1.2 Klíšťata

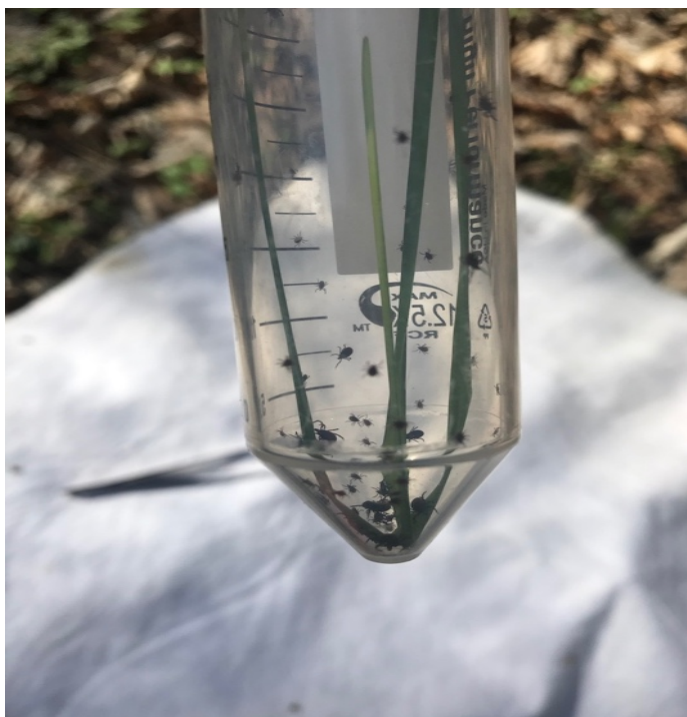
Sběr klíšťat byl prováděn převážně v ranních hodinách (5–8) případně podvečerních hodinách (17–20) v závislosti na denních teplotách a počasí. Samotný sběr byl prováděn za pomoci bílé vlajky připevněné na dřevěné tyči. Textilie vlajky byla z fleecového materiálu pro dobré zachycení klíšťat a měla velikost 70 cm × 100 cm (š × d). Bílá barva vlajky usnadňuje rychlé rozpoznání klíšťat. Odchyt nymf byl prováděn metodou vlajkování v blízkosti země, a to převážně na listí a hrabance (viz Obr. 9).



**Obrázek č. 9:** Vhodná lokalita a porost pro sběr klíšťat (Autorka práce)

Zachycené klíště bylo odebráno entomologickou pinzetou a vloženo do plastové zkumavky o objemu 15 ml nebo 50 ml s víčkem. Víčko zkumavky mělo 4–6 otvorů pro zajištění přívodu vzduchu a pod něj byla vložena jemná síťová látka proti hmyzu o velikosti zhruba 7 x 7 cm. Ta zajišťovala, aby klíšťata nemohla otvory prolézt. Při převozu z terénu do laboratoře bylo do

zkumavky vloženo stéblo travin případně části listu pro zajištění dostatečné vlhkosti, tak aby se předešlo mortalitě klíšťat vyschnutím (viz Obr. 10)



**Obrázek č. 10:** Klíšťata připravená pro převoz do laboratoře (Autorka práce)

Po převozu z terénu do laboratoře byly ze zkumavek s klíšťaty odstraněny zdroje vlhkosti. Všechny zkumavky s klíšťaty byly poté vloženy do exsikátoru, což je tlustostěnná dvoudílná nádoba o průměru 30 cm. Spodní část nádoby je oddělena perforovanou deskou z plastu a dole pod deskou je vložena Petriho miska s vlhkou vatou. Takto byly nymfy před testováním udržovány při teplotě  $26 \pm 1$  ° C a relativní vlhkosti (RH)  $95 \pm 5$  % a fotoperiodě 16 : 8 hodin (světlo : tma).

Celkově bylo pro všechny testy použito 2310 nymf klíštěte *I. ricinus*.

## 4.2 Repelenty

Všechny zkoumané éterické oleje byly získány z komerčních zdrojů (Roni Epam s. r. o., Praha) po 10 ml lahvičkách, jež byly uchovány v lednici při teplotě 5 ° C. Využité druhy silic pro laboratorní biotesty dle INCI obsahovaly tyto ingredience:

Rozmarýn – olej z listu *Rosmarinus officinalis*, limonen, linalool, benzyl-benzoát

Šalvěj –olej ze *Salvia officinalis*

Smrk – olej z listu *Picea abies*

Technický DEET s 97% aktivní složkou byl zakoupen od firmy (Leroy Cosmetics, Lednice). Všechny éterické oleje byly zředěny v 96% etanolu (Sigma Aldrich, Praha) v koncentracích: 5%, 10%, 15% a 20%. DEET v 5% koncentraci byl testován jako pozitivní kontrola pro srovnání repelentní účinnosti s éterickými oleji.

Dále byl dle návodu zveřejněného na internetových stránkách [www.styl-zivota.cz](http://www.styl-zivota.cz) publikovaný dne 8.7. 2019 autorem Lucií Cermanovou, připraven repelent z Alpy Francovky (Alpa a.s., Velké Meziříčí) a celých plodů hřebíčku (SONNENTOR s.r.o., Čejkovice). Alpa lihový bylinný roztok o objemu 60 ml obsahoval dle INCI: 60 % alkohol, mentol, voda, etyl-acetát, ethyl-formiát, parfém, cinnamal, eugenol. Do lahvičky s Alpou Francovkou o objemu 60 ml bylo přidáno 12 ks hřebíčku, které se v ní následně louhovaly po dobu 3 týdnů. Tento repelent byl testován zejména proto, že je mezi laickou veřejností velice uznávaným a často využívaným repelentem proti klíšťatům. Díky využití stejné metodiky testování je tak možné jeho porovnání s testovanými éterickými oleji i syntetickým DEETem.

### 4.3 In-vitro test repelentní účinnosti

Tento biologický test vychází z testu publikovaného ve studii Thorsella et al. (2003) s názvem „Repelling properties of some plant materials on the tick *Ixodes ricinus* L.“ na nymfách.

#### 4.3.1 Příprava

Pro lepší manipulaci a zamezení úniku nymf ze zkumavek, kde jsou umístěny ve větším počtu, byla klíšťata před pokusem přemístěna do mikrozkušavek typu eppendorf 1,5ML vždy po 5 ks. V mikrozkušavkách byla předpřipravena vlhká vata k udržování vysoké vlhkosti. Nymfy byly takto připravené nejdéle 1 hodinu před samotným otestováním. Dále byl připraven roztok s příslušným přípravkem (esenciálním olejem, deetem) a koncentrací, který se vždy připravoval nově pro každý započatý test. Připravený roztok byl naředěn v 10 ml odměrné baňce, jež byla ihned po smíchání utěsněna alobalovým víčkem proti odparu. Pro každou testovanou koncentraci bylo namícháno 2 ml roztoku. Přesné poměry jsou zobrazeny v Tabulce č. 1:

**Tabulka č. 1:** Poměry roztoků pro množství 2 ml

Koncentrace	etanol + EO/ (ml)
5 %	1,9 + 0,1
10 %	1,8 + 0,2
15 %	1,7 + 0,3
20 %	1,6 + 0,4

Dále do třech plastových Petriho misek o průměru 9,5 cm byly vloženy 3 vrstvy filtračního papíru typu Whatman 3 (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire). Každému testu předcházel negativní kontrolní test, kdy se na navrstvený filtrační papír aplikovalo 0,5 ml etanolu. Verifikovalo se tak, že rozpouštědlo nemá vliv na repelentní účinek.

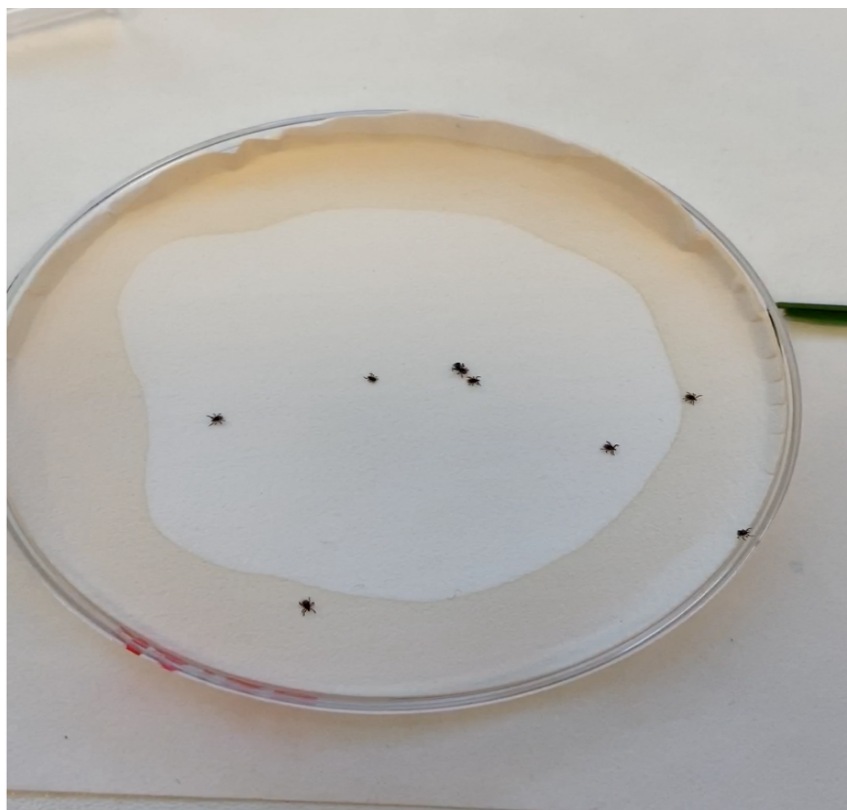
#### Průběh



Předem byly stanoveny časy 5 min, 30 min, 60 min, 2 hod, 4 hod, 6 hod a 8 hod, při kterých se test zopakoval. Do každé z Petriho misek bylo na okraj filtračního papíru aplikováno pipetou 0,5 ml repelentu. Po uplynutí výše uvedených intervalů doby, bylo doprostřed Petriho misky vloženo za pomoci jemného štětečku vždy 10 nymf. Ty byly pozorovány po dobu 5 minut. Na začátku každé zkoušky byly nymfy aktivovány do módu hledání hostitele pomocí dechu pozorovatele jakožto hostitelského podnětu. Všechny nymfy, které překonaly bariéru testovaného repelentu a opustily Petriho misku (nebo se po ošetřené ploše pohybovaly déle než 1 minutu), byly zaznamenány jako nerepelované. Jako odpuzená byla naopak považována klíšata, která zůstala na Petriho misce. Neaktivní klíšata byla z pokusu vyřazena a nahrazena. Pro každý čas byl test proveden ve 3 opakováních (vždy po 10 nymfách v jedné Petriho misce). Každá nymfa byla použita pouze jednou. Průběh pokusu ukazuje Obr. 11–12



**Obrázek č. 11:** Připraveny Petriho misky ve 3 opakování (Autorka práce)



**Obrázek č. 12:** Klíšťata v Petriho misce s ošetřeným krajem éterického oleje (Autorka práce)

#### 4.3.2 Ukončení

Test byl ukončen po 8 hodinách nebo když procentuální účinnost repelentu byla nižší než 33,3 %. Všechny nymfy byly po testu přemístěny do plastových zkumavek 5 ml, označeny a uloženy zpět do exsikátoru, určeného jen pro použité nymfy. Po 24 hodinách od zahájení testu byla zaznamenána mortalita nymf. Aby přípravek odpovídal definici repelentu dle ECHA (2018), mortalita nesměla být větší než 10,0 %. Při vyhodnocení úmrtnosti byl brán ohled na to, že úmrtnost nymf mimo jejich prostředí výskytu je vyšší, a zároveň se zvyšuje při jejich testování, manipulaci a obecně vystavování stresu. Pokud by mortalita přesáhla 10 % bylo by nutné test opakovat. Po ukončení testu byla klíšťata usmrcena mrazem při  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  a darována Národní referenční laboratoři pro Lymeskou boreliózu k dalším analýzám.

#### 4.4 Vyhodnocení dat

Repelentní účinnost byla vypočítána jako aritmetický průměr tří opakování pokusu. Vypočtené hodnoty byly zaokrouhleny na jedno desetinné místo. Statistické vyhodnocení bylo provedeno v programu Statistica (StatSoft, Praha) za použití vícefaktorové Anovy a případně Tukeyho post-hoc testem.

## 5 Výsledky

Všechny testované esenciální oleje i podomácku vyrobený repelent se chovaly repelentně vzhledem k nymfám klíštěte obecného. U roztoků esenciálních olejů se účinnost zvýšila společně se zvýšenou koncentrací. Výsledky pokusu ukázaly, že neúčinnějšími repelenty, co z testovaných esenciálních olejů byly silice ze smrku a šalvěje. Tyto dva repelenty v koncentraci 20 % vykazovaly po 4 hodinách účinnost 43,3 % a 56,7 % respektive. Bylo prokázáno, že repelence testovaných olejů klesá rychleji než u 5% syntetického DEETu (viz Tabulky 2–15).

### 5.1 Tabulky s éterickým olejem ze smrku

V následujících tabulkách jsou zaznamenány výsledky jednotlivých koncentrací vybraného éterického oleje ze šalvěje.

**Tabulka č. 2:** Repelentní účinnost smrkového (*Picea abies*) esenciálního oleje proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 5% koncentraci.

Opakování	Repelentní účinek (%)		
	5 min	30 min	60 min
1	60,0	20,0	0,0
2	80,0	40,0	10,0
3	90,0	30,0	0,0
Celkem (%)	76,7	30,0	3,3

**Tabulka č. 3:** Repelentní účinnost smrkového (*Picea abies*) esenciálního oleje proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 10% koncentraci.

opakování	Repelentní účinek (%)			
	5 min	30 min	60 min	2 hod
1	100,0	90,0	70,0	30,0
2	80,0	90,0	70,0	50,0
3	90,0	100,0	90,0	10,0
Celkem (%)	90,0	93,3	76,7	30,0

**Tabulka č. 4:** Repelentní účinnost smrkového (*Picea abies*) esenciálního oleje proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 15% koncentraci.

opakování	Repelentní účinek (%)					
	5 min	30 min	60 min	2 hod	4 hod	6 hod
1	80,0	90,0	80,0	60,0	40,0	30,0
2	90,0	90,0	80,0	60,0	60,0	20,0
3	90,0	90,0	100,0	40,0	30,0	10,0
Celkem (%)	86,7	90,0	86,7	53,3	43,3	20,0

**Tabulka č. 5:** Repelentní účinnost smrkového (*Picea abies*) esenciálního oleje proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 20% koncentraci.

opakování	Repelentní účinek (%)						
	5 min	30 min	60 min	2 hod	4 hod	6 hod	8 hod
1	100,0	100,0	70,0	80,0	70,0	60,0	20,0
2	80,0	90,0	80,0	90,0	70,0	30,0	20,0
3	80,0	70,0	90,0	70,0	40,0	40,0	20,0
Celkem (%)	86,7	86,7	80,0	80,0	60,0	43,3	20,0

## 5.2 Tabulky s éterickým olejem ze šalvěže

V následujících tabulkách jsou zaznamenány výsledky jednotlivých koncentrací vybraného éterického oleje ze šalvěže.

**Tabulka č. 6:** Repelentní účinnost šalvěžového (*Salvia officinalis*) esenciálního oleje proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 5% koncentraci.

opakování	Repelentní účinek (%)		
	5 min	30 min	60 min
1	70,0	50,0	0,0
2	90,0	70,0	0,0

3	80,0	80,0	40,0
Celkem (%)	80,0	66,7	13,3

**Tabulka č. 7:** 10 Repelentní účinnost šalvějového (*Salvia officinalis*) esenciálního oleje proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 10% koncentraci.

opakování	Repelentní účinek (%)			
	5 min	30 min	60 min	2 hod
1	90,0	80,0	60,0	10,0
2	90,0	90,0	70,0	20,0
3	80,0	90,0	60,0	50,0
Celkem (%)	86,7	86,7	63,3	26,7

**Tabulka č. 8:** Repelentní účinnost šalvějového (*Salvia officinalis*) esenciálního oleje proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 15% koncentraci.

opakování	Repelentní účinek (%)					
	5 min	30 min	60 min	2 hod	4 hod	6 hod
1	80,0	70,0	70,0	60,0	60,0	0,0
2	80,0	90,0	70,0	70,0	50,0	40,0
3	80,0	70,0	70,0	70,0	40,0	10,0
Celkem (%)	80,0	76,7	70,0	66,7	50,0	16,7

**Tabulka č. 9:** Repelentní účinnost šalvějového (*Salvia officinalis*) esenciálního oleje proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 20% koncentraci.

opakování	Repelentní účinek (%)					
	5 min	30 min	60 min	2 hod	4 hod	6 hod
1	80,0	70,0	80,0	70,0	60,0	30,0
2	80,0	80,0	50,0	70,0	50,0	10,0

3	90,0	80,0	80,0	60,0	60,0	40,0
Celkem (%)	83,3	76,7	70,0	66,7	56,7	26,7

### 5.3 Tabulky s éterickým olejem z rozmarýnu

V následujících tabulkách jsou zaznamenány výsledky jednotlivých koncentrací vybraného éterického oleje z rozmarýnu.

**Tabulka č. 10:** Repelentní účinnost rozmarýnového (*Rosmarinus officinalis*) esenciálního oleje proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 5% koncentraci.

opakování	Repelentní účinek (%)	
	5 min	30 min
1	70,0	10,0
2	50,0	0,0
3	70,0	0,0
Celkem (%)	63,3	3,3

**Tabulka č. 11:** Repelentní účinnost rozmarýnového (*Rosmarinus officinalis*) esenciálního oleje proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 10% koncentraci.

opakování	Repelentní účinek (%)			
	5 min	30 min	60 min	2 hod
1	70,0	70,0	60,0	0,0
2	60,0	40,0	40,0	0,0
3	60,0	60,0	40,0	10,0
Celkem (%)	63,3	56,7	46,7	3,3

**Tabulka č. 12:** Repelentní účinnost rozmarýnového (*Rosmarinus officinalis*) esenciálního oleje proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 15% koncentraci.

opakování	Repelentní účinek (%)			
	5 min	30 min	60 min	2 hod
1	50,0	70,0	60,0	30,0
2	70,0	60,0	50,0	20,0
3	70,0	50,0	60,0	20,0
Celkem (%)	63,3	60,0	56,67	23,4

**Tabulka č. 13:** Repelentní účinnost rozmarýnového (*Rosmarinus officinalis*) esenciálního oleje proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 20% koncentraci.

opakování	Repelentní účinek (%)			
	5 min	30 min	60 min	2 hod
1	70,0	60,0	60,0	30,0
2	50,0	60,0	40,0	20,0
3	80,0	50,0	30,0	40,0
Celkem (%)	66,7	56,7	43,3	30,0

#### 5.4 Tabulka se srovnávacím repelentem DEET

Následující tabulka znamená výsledek zkoušeného repelentního přípravku s 97% aktivní složkou DEET v 5% koncentraci.

**Tabulka č. 14:** Repelentní účinnost syntetického DEETu proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 5% koncentraci.

opakování	Repelentní účinek (%)						
	5 min	30 min	60 min	2 hod	4 hod	6 hod	8 hod
1	100,0	90,0	90,0	80,0	80,0	80,0	70,0

2	100,0	100,0	100,0	90,0	70,0	80,0	80,0
3	90,0	100,0	100,0	80,0	90,0	80,0	80,0
Celkem (%)	96,7	96,7	96,7	86,7	80,0	80,0	76,7

## 5.5 Tabulka s testovaným roztokem z Alpy a hřebíčku

Tabulka zobrazující zkoušený roztok z Alpy a hřebíčku za využití stejných postupů jako u předchozích roztoků.

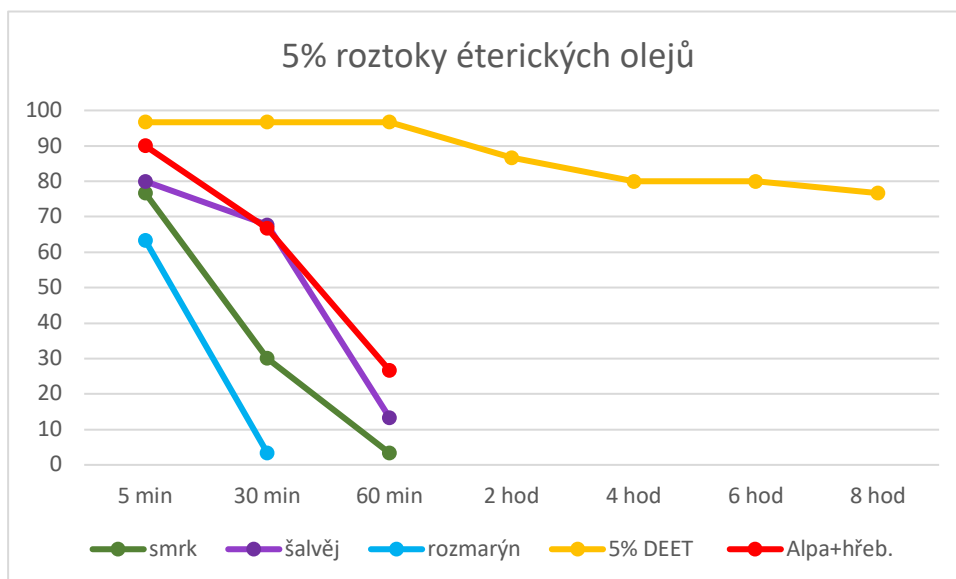
**Tabulka č. 15:** Repelentní účinnost roztoku z Alpy Francovky a hřebíčku proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*).

opakování	Repelentní účinek (%)		
	5 min	30 min	60 min
1	100,0	80,0	50,0
2	70,0	70,0	30,0
3	90,0	50,0	0,0
Celkem (%)	90,0	66,7	26,7

## 5.6 Grafické porovnání všech testovaných repelentů

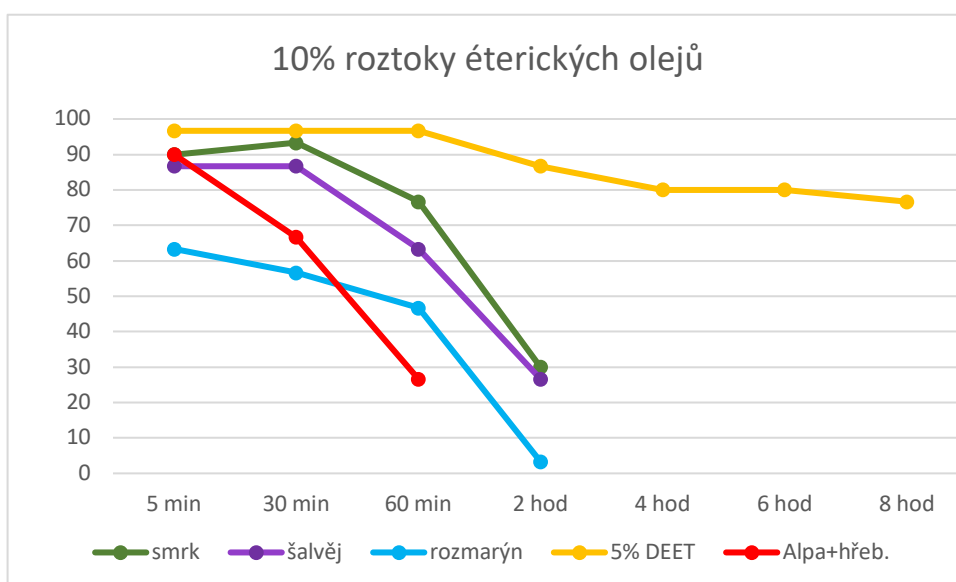
Výsledky uvedené výše, byly pro lepší přehled převedeny do grafické podoby. Všechny koncentrace roztoků éterických olejů byly zároveň porovnány s roztokem 5% DEET a roztokem z Alpy Francovky s hřebíčkem (Obrázek 13–16).





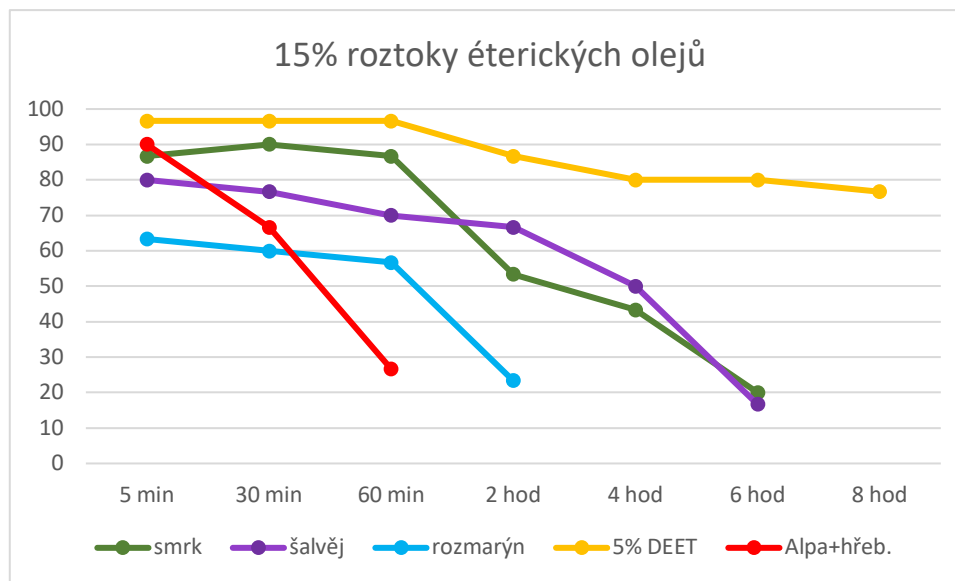
**Obrázek č. 13:** Porovnání účinnosti 5% roztoků éterických olejů se srovnávacím 5% DEET a Alpou Francovkou s hřebíčkem proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*).

Bylo zaznamenáno, že v 5% koncentraci roztoky éterických olejů nedokázaly odpuzovat více než 70 % klíšťat ani po dobu 30 minut. Pro srovnání, 5% DEET i při tak nízké koncentraci dokázal repelovat po dobu 60 minut více než 95 % klíšťat. Stejně neúčinný byl roztok z Alpy a hřebíčku, který sice po 5 minutách dokázal odpuzovat kolem 90 % klíšťat, ale jeho účinnost pak prudce klesla pod 70 % po 30 minutách a za 60 minut již nebyl účinný. Éterický olej z rozmarýnu byl v 5% koncentraci nejhorší ze všech testovaných produktů.



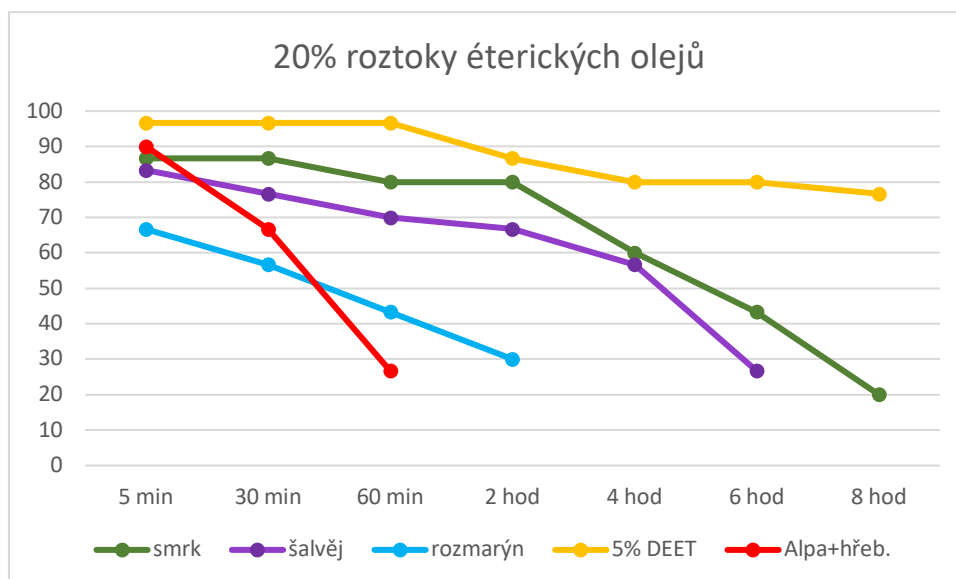
**Obrázek č. 14:** Porovnání účinnosti 10% roztoků éterických olejů ve srovnání s 5% DEETem a Alpou Francovkou s hřebíčkem proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*)

10% roztoky ze šalvěže a smrku dokázaly odpuzovat po 30 minut více než 85 % nymf, přičemž olej ze smrku byl ještě o něco více repelentní a bariéru nepřekonal 90 % klíšťat. Zároveň jejich repelentní účinek, který se téměř vyrovnal 5% DEETu trval pouze 30 minut. Jejich repelence začala klesat po 60 minutách a po 2 hodinách už nebyly účinné (účinnost byla nižší než 33,3 %). Nejslabším repelentem z testovaných esenciálních olejů byl rozmarýn, jehož účinnost po 30 minutách byla těsně pod 60 %. V tuto dobu byla lepší i Alpa s hřebíčkem, která repelovala 65 % klíšťat.



**Obrázek č. 15:** Porovnání účinnosti 15% roztoků éterických olejů se srovnávacím 5% DEETem a Alpou Francovkou s hřebíčkem proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*).

Roztok z éterického oleje ze smrku v 15% koncentraci dokázal repelovat téměř 90 % klíšťat po dobu 60 minut, poté jeho účinnost začala klesat. 5% DEET repeloval za stejnou dobu pouze o zhruba 10 % více klíšťat než olej ze smrku, ale jeho účinnost zůstala dále téměř konstantní. Všechny ostatní testované esenciální oleje v této koncentraci byly méně repelentní, přičemž roztok ze šalvěže byl jako druhý nejúčinnější.



**Obrázek č. 16:** Porovnání účinnosti 20% roztoků éterických olejů se srovnávacím 5% DEETem a Alpou Francovkou s hřebíčkem proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*).

Nejlepší odpuzující účinek byl zaznamenán u 20% roztoku éterického oleje ze smrku. Dokázal repelovat více než 80 % klíšťat po dobu 2 hodin a účinek po tu dobu byl poměrně stabilní. Ve 20% koncentraci byla účinnost proti klíšťatům po dobu 2 hodin pouze o zhruba 10 % menší než u 5% DEETu. Nejhorší výsledek z testovaných éterických olejů byl zaznamenán u rozmarýnu, který ani v nejvyšší testované koncentraci nerepeloval více jak 70 %. Často doporučovaný roztok z Alpy a hřebíčku se ostatním zkoušeným éterickým oleji, kromě rozmarýnu, nedokázal vyrovnat, když jeho účinnost byla již po hodině nižší než 30 %.

## 5.7 Statistické vyhodnocení pokusu

### 5.7.1 Ovlivnění účinnosti typem a koncentrací repelentu

V následujících tabulkách jsou zaznamenány výsledky statistického vyhodnocení pokusu. Tabulky č. 16–22 zobrazují, čím byla repelence ovlivněna, zda typem repelentu nebo koncentrací roztoku.

**Tabulka č. 16:** Vliv koncentrace a typu repelentu na repelentní účinek v čase 5 minut

5 minut			
	df	F	P
koncentrace	3	0,82	0,493
repelent	3	16,04	0,0001
repelent*koncentrace	6	0,24	0,957

V tabulce č. 16 po pěti minutách byla repelence signifikantně ( $p < 0,001$ ) ovlivněna typem repelentu, zatímco významný vliv koncentrace na účinnost testovaných přípravků nebyl zaznamenán ( $p = 0,493$ ).

**Tabulka č. 17:** Vliv koncentrace a typu repelentu na repelentní účinek v čase 30 minut

30 minut			
	df	F	P
koncentrace	3	10,93	0,0001
repelent	3	11,07	0,0001
repelent*koncentrace	6	0,33	0,915

**Tabulka č. 18:** Vliv koncentrace a typu repelentu na repelentní účinek v čase 60 minut

60 minut			
	df	F	P
koncentrace	3	61,43	0,0001
repelent	3	27,63	0,0001
repelent*koncentrace	6	0,54	0,841

**Tabulka č. 19:** Vliv koncentrace a typu repelentu na repelentní účinek v čase 2 hodiny

2 hodiny			
	df	F	P
2 hod			
koncentrace	3	76,42	0,0001
repelent	3	44,76	0,0001
repelent*koncentrace	6	3,8	0,007

**Tabulka č. 20:** Vliv koncentrace a typu repelentu na repelentní účinek v čase 4 hodiny

4 hodiny			
	df	F	P
koncentrace	3	20,91	0,0001
repelent	3	25	0,0001
repelent*koncentrace	6	228,55	0,0001

**Tabulka č. 21:** Vliv koncentrace a typu repelentu na repelentní účinek v čase 6 hodin

6 hodin			
	df	F	P
koncentrace	3	13,88	0,0001
repelent	3	23,34	0,0001
repelent*koncentrace	6	9,35	0,002

**Tabulka č. 22:** Vliv koncentrace a typu repelentu na repelentní účinek v čase 8 hodin

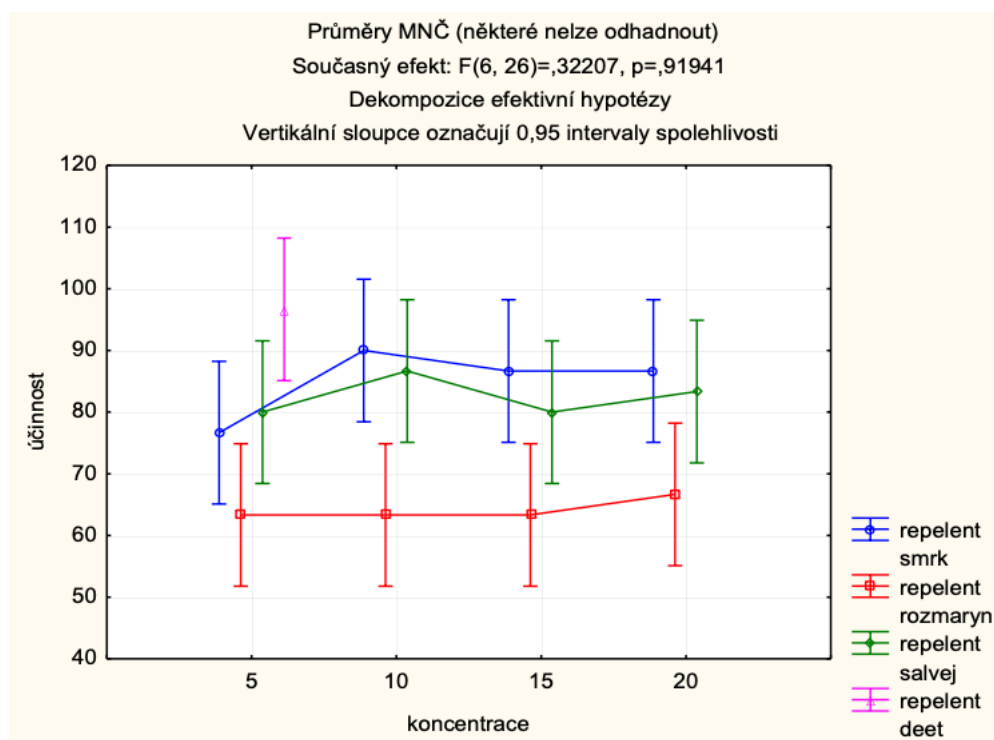
8 hodin			
	df	F	P
koncentrace	3	5,33	0,004
repelent	3	37,07	0,0001
repelent*koncentrace	6	490,7	0,0001

V tabulkách č. 17–22 s časy od 30 minut do 8 hodin od aplikace byla repelence prokazatelně ovlivněna ( $p < 0,001$ ), jak typem esenciálního oleje, tak jeho koncentrací.

V těchto následujících Grafech (17–23) je statisticky vyhodnocena účinnost testovaných esenciálních olejů a syntetického repelentu DEET.

### 5.7.2 Podrobné vyhodnocení účinnosti jednotlivých repelentů v čase

Po pěti minutách od aplikace byla nejslabší účinnost zjištěna u rozmarýnového esenciálního oleje (Obrázek č. 17), který ani ve 20% koncentraci nebyl tak účinný jako ostatní testované repelenty a na hladině  $\alpha = 0,05$  se od nich významně lišil (Tabulka č. 23). Mezi zbývajícimi repelenty nebyl statisticky významný rozdíl. Jak už bylo uvedeno výše, koncentrace v tomto čase repelenci významně neovlivňovala (Tabulka č. 24).



**Obrázek č. 17:** Graficky vyjádřená post hoc analýza účinnosti testovaných repelentů po 5 minutách.

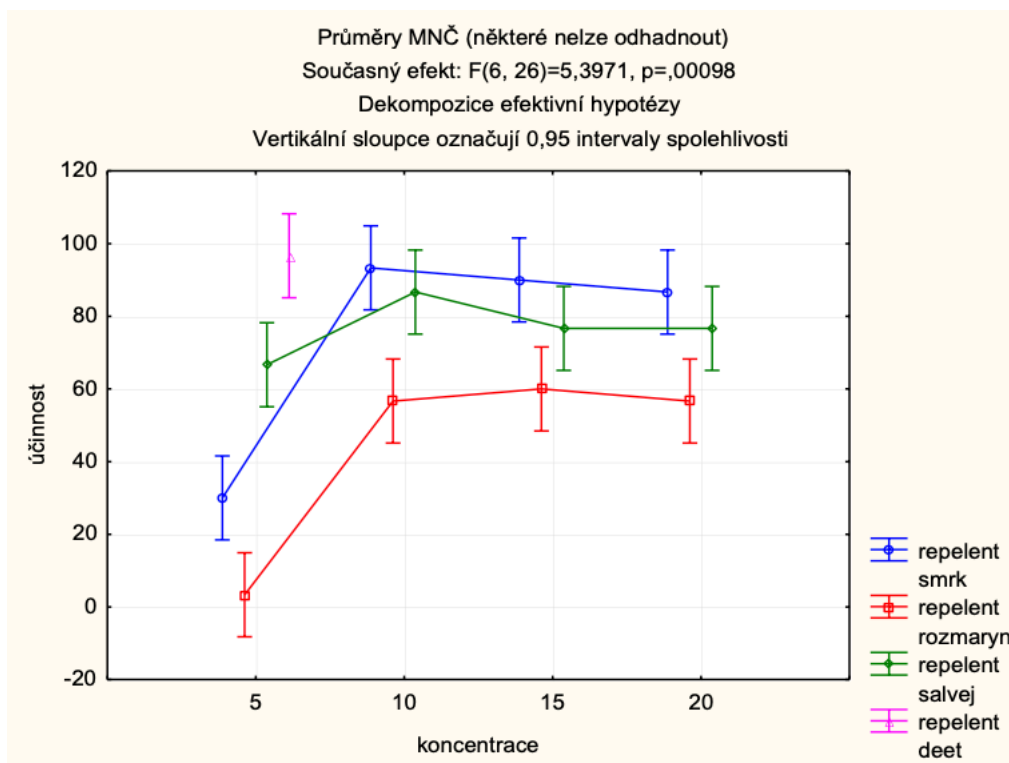
**Tabulka č. 23:** Vliv typu repelentu na účinnost testovaných přípravků, 5 minut po aplikaci.

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná účinnost (EO) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 94,872, sv = 26,000				
	repellent	{1}	{2}	{3}	{4}
		85,000	64,167	82,500	96,667
1	smrk		0,000252	0,921955	0,271438
2	rozmaryn	0,000252		0,000645	0,000270
3	salve	0,921955	0,000645		0,135683
4	deet	0,271438	0,000270	0,135683	

**Tabulka č. 24:** Vliv koncentrace repelentu na účinnost testovaných přípravků, 5 minut po aplikaci.

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná účinnost (EO) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 94,872, sv = 26,000				
	koncentrace	{1}	{2}	{3}	{4}
		79,167	80,000	76,667	78,889
1	5		0,997404	0,936659	0,999911
2	10	0,997404		0,885887	0,994966
3	15	0,936659	0,885887		0,962038
4	20	0,999911	0,994966	0,962038	

Po 30 minutách byla významně nejnižší účinnost zjištěna, stejně jako v předchozím sledovaném čase, u rozmarýnového esenciálního oleje, který se v 5% koncentraci významně lišil od všech ostatních testovaných přípravků (viz Příloha 1). Syntetický deet se již od dalších esenciálních olejů signifikantně odlišoval (Tabulka č. 25). Z grafu je patrný také významný vliv koncentrace na repelenci, kdy byla účinnost 5% roztoků silic ze smrku a rozmarýnu významně nižší než u dalších koncentrací stejných olejů (Tabulka č. 26). Naopak, účinek 5% roztoku šalvějového esenciálního oleje se staticky neodlišoval od ostatních olejů s vyšší koncentrací. Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými repelenty v příslušných koncentracích jsou uvedeny v Příloze 2.



**Obrázek č. 18:** Graficky vyjádřená post-hoc analýza účinnosti testovaných repellentů po 30 minutách.

**Tabulka č. 25:** Vliv typu repellentu na účinnost testovaných přípravků, 30 minut po aplikaci.

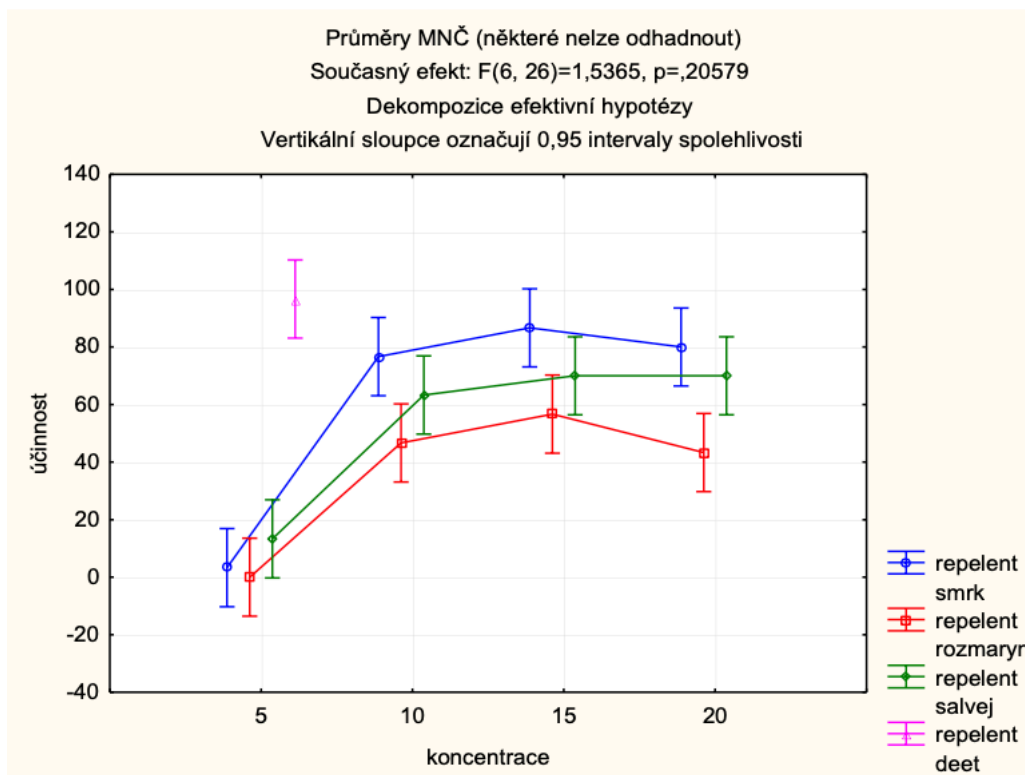
		Tukeyův HSD test; proměnná účinnost (EO) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 94,872, sv = 26,000		
Č. buňky	repellent	{1}	{2}	{3}
			75,000	44,167
1	smrk		0,000169	0,974772
2	rozmaryn	0,000169		0,000169
3	salve	0,974772	0,000169	
4	deet	0,009946	0,000169	0,018657

**Tabulka č. 26:** Vliv koncentrace na účinnost testovaných přípravků, 30 minut po aplikaci.

		Tukeyův HSD test; proměnná účinnost (EO) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 94,872, sv = 26,000			
Č. buňky	koncentrace	{1}	{2}	{3}	{4}
			49,167	78,889	75,556
1	5		0,000170	0,000175	0,000196
2	10	0,000170		0,885887	0,626317
3	15	0,000175	0,885887		0,962038
4	20	0,000196	0,626317	0,962038	

Po 60 minutách byla statisticky významně nejnižší účinnost zjištěna u skupiny 5% esenciálních olejů (Obrázek č. 19). Typ repellentu významně ovlivnil repelenci s jedinou výjimkou, a to

šalvějovým a smrkovým olejem, jež se mezi sebou statisticky nelišily (Tabulka č. 27). Všechny repelenty v 5% koncentraci již repelovaly významně nižší množství nymf (Tabulka č. 28) než ostatní koncentrace. Rozdíly mezi jednotlivými repelenty v příslušných koncentracích jsou uvedeny v Příloze 3.



**Obrázek č. 19:** Graficky vyjádřená post hoc analýza účinnosti testovaných repelentů po 60 minutách.

**Tabulka č. 27:** Vliv typu repelentu na účinnost testovaných přípravků, 60 minut po aplikaci.

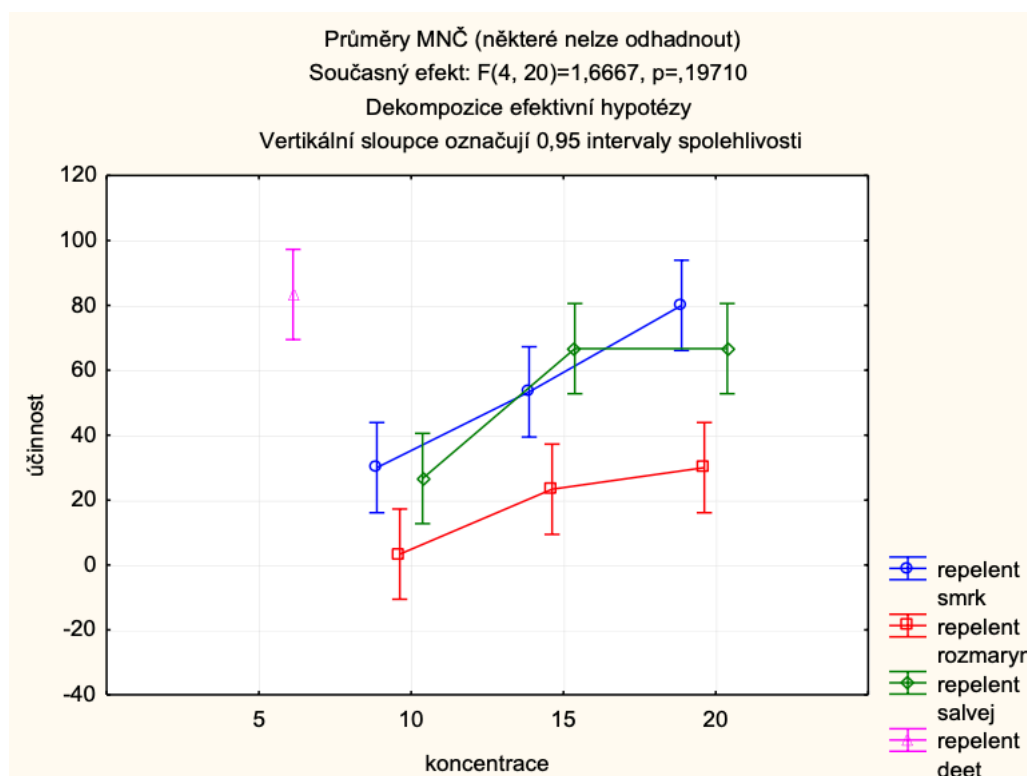
		Tukeyův HSD test; proměnná účinnost (EO) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 130,77, sv = 26,000			
Č. buňky	repellent	{1}	{2}	{3}	{4}
		61,667	36,667	54,167	96,667
1	smrk		0,000228	0,392703	0,000502
2	rozmaryn	0,000228		0,004778	0,000169
3	salvej	0,392703	0,004778		0,000187
4	deet	0,000502	0,000169	0,000187	



**Tabulka č. 28:** Vliv koncentrace repelentu na účinnost testovaných přípravků, 60 minut po aplikaci.

		Tukeyův HSD test; proměnná účinnost (EO) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 130,77, sv = 26,000			
Č. buňky	koncentrace	{1} 28,333	{2} 62,222	{3} 71,111	{4} 64,444
1	5		0,000170	0,000169	0,000169
2	10	0,000170		0,370224	0,975951
3	15	0,000169	0,370224		0,609957
4	20	0,000169	0,975951	0,609957	

Po dvou hodinách od aplikace nastal statisticky významný pokles účinnosti 10% esenciálních olejů (Obrázek č. 20, Tabulka č. 30 a Příloha 1–3). Co se týče statisticky významného rozdílu v použitém typu repelentu, křivka účinnosti olejů z šalvěje a smrku měla v tomto čase shodný průběh (Tabulka č. 29 a Příloha 2–3). Repelentní účinek rozmarýnu byl statisticky nejnižší, když se ani v 15 i 20% koncentraci statisticky nelišil od 5% olejů z šalvěje a smrku (Příloha 2–3).



**Obrázek č. 20:** Graficky vyjádřená post hoc analýza účinnosti testovaných repelentů po 2 hodinách.

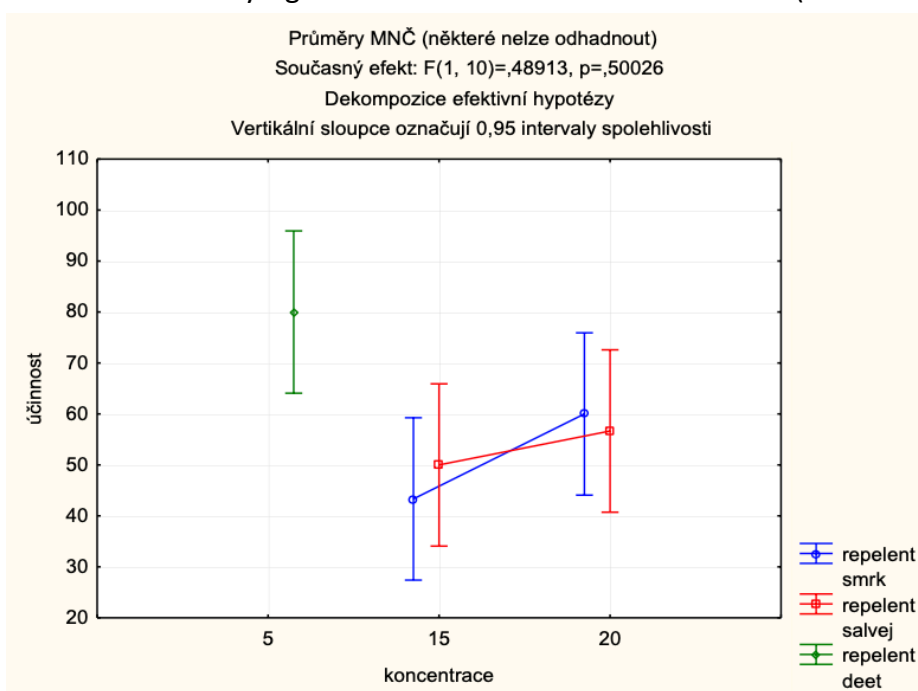
**Tabulka č. 29:** Vliv typu repelentu na účinnost testovaných přípravků, 2 hodiny po aplikaci.

		Tukeyův HSD test; proměnná účinnost (EO) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 133,33, sv = 20,000			
Č. buňky	repellent	{1}	{2}	{3}	{4}
		54,444	18,889	53,333	83,333
1	smrk		0,000183	0,996954	0,006436
2	rozmarnyn	0,000183		0,000188	0,000175
3	salvej	0,996954	0,000188		0,004681
4	deet	0,006436	0,000175	0,004681	

**Tabulka č. 30:** Vliv koncentrace repelentu na účinnost testovaných přípravků, 2 hodiny po aplikaci.

		Tukeyův HSD test; proměnná účinnost (EO) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 133,33, sv = 20,000			
Č. buňky	koncentrace	{1}	{2}	{3}	{4}
		83,333	20,000	47,778	58,889
1	5		0,000175	0,001012	0,022747
2	10	0,000175		0,000443	0,000177
3	15	0,001012	0,000443		0,206732
4	20	0,022747	0,000177	0,206732	

Po 4 hodinách od aplikace repelentu se průběh křivky účinnosti esenciálních olejů statisticky neliší (Obrázek č. 21, Tabulka č. 31). Mezi jednotlivými silicemi v koncentracích 15 a 20% nebyl nalezen statisticky významný rozdíl, ovšem oba testované repelenty v obou koncentracích měly signifikantně nižší účinnost než 5% DEET (Tabulka č. 32, Příloha 1–3).



**Obrázek č. 21:** Graficky vyjádřená post hoc analýza účinnosti testovaných repelentů po 4 hodinách.

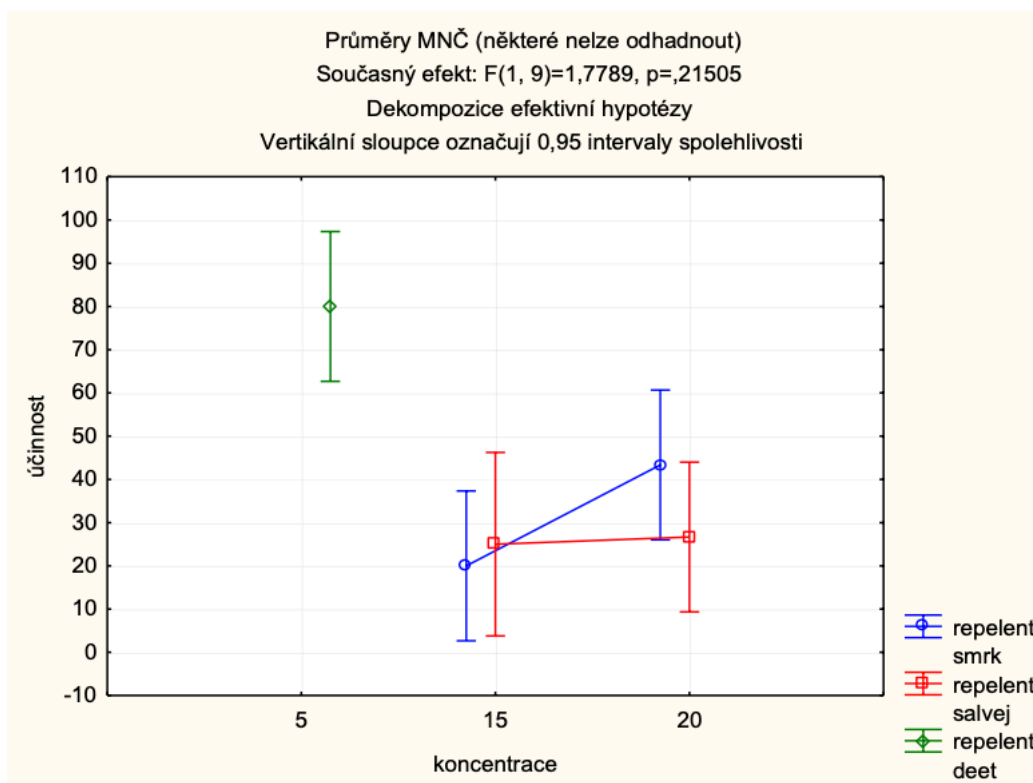
**Tabulka č. 31:** Vliv typu repelentu na účinnost testovaných přípravků, 4 hodiny po aplikaci.

Tukeyův HSD test; proměnná účinnost (EO) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 153,33, sv = 10,000				
Č. buňky	repelent	{1}	{2}	{3}
		51,667	53,333	80,000
1	smrk		0,970651	0,022331
2	salvej	0,970651		0,030475
3	deet	0,022331	0,030475	

**Tabulka č. 32:** Vliv koncentrace repelentu na účinnost testovaných přípravků, 4 hodiny po aplikaci.

Tukeyův HSD test; proměnná účinnost (EO) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 153,33, sv = 10,000				
Č. buňky	koncentrace	{1}	{2}	{3}
		80,000	46,667	58,333
1	5		0,008931	0,077285
2	15	0,008931		0,277706
3	20	0,077285	0,277706	

V časovém intervalu 6-ti hodin od aplikace repelentu (Obrázek č. 22) byl test ovlivněn typem (Tabulka č. 33) i koncentrací (Tabulka č. 34) repelentu, přičemž smrkový a šalvějový esenciální olej se mezi sebou statisticky nelišily. Oba dva esenciální oleje, v koncentraci 15 i 20 %, se signifikantně lišily od 5% DEETu (Příloha 2-3).



**Obrázek č. 22:** Graficky vyjádřená post hoc analýza účinnosti testovaných repellentů po 6 hodinách.

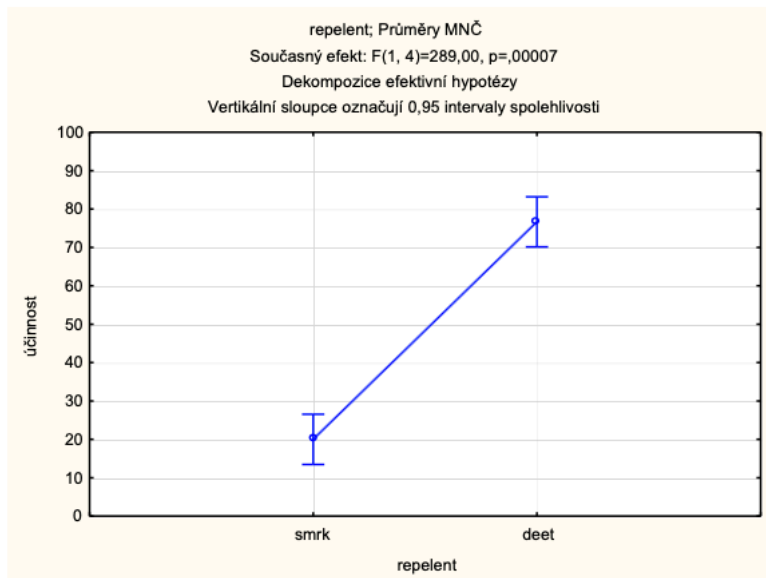
**Tabulka č. 33:** Vliv typu repellentu na účinnost testovaných přípravků, 6 hodin po aplikaci.

Tukeyův HSD test; proměnná účinnost (EO) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. $P\check{C} = 175,93$ , $sv = 9,0000$				
Č. buňky	koncentrace	{1} 80,000	{2} 22,000	{3} 35,000
1	5		0,000693	0,002646
2	15	0,000693		0,287389
3	20	0,002646	0,287389	

**Tabulka č. 34:** Vliv koncentrace repellentu na účinnost testovaných přípravků, 6 hodin po aplikaci.

Tukeyův HSD test; proměnná účinnost (EO) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. $P\check{C} = 175,93$ , $sv = 9,0000$				
Č. buňky	koncentrace	{1} 80,000	{2} 22,000	{3} 35,000
1	5		0,000693	0,002646
2	15	0,000693		0,287389
3	20	0,002646	0,287389	

Po 8 hodinách byl testován pouze smrk o koncentraci 20 %. Oproti syntetickému 5% DEETu byla jeho repelentní účinnost významně nižší.



**Obrázek č. 23:** Graficky vyjádřená post hoc analýza účinnosti testovaných repelentů po 8 hodinách.

**Tabulka č. 35:** Porovnání repelentní účinnosti smrkového esenciálního oleje (20 %) a DEETu (5 %) 8 hodin po aplikaci.

Tukeyův HSD test; proměnná účinnost (EO) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 16,667, sv = 4,0000			
Č. buňky	repellent	{1}	{2}
1	smrk	20,000	76,667
2	deet	0,000331	0,000331

## 6 Diskuze

V rámci této práce byla zkoumána repelentní účinnost rozmarýnového, šalvějového a smrkového esenciálního oleje proti nymfám klíštěte *I. ricinus*. Samotný účinek éterických olejů byl testován v pomoci in-vitro testu na Petriho misce za využití lidského dechu jako stimulu pro chování při hledání hostitele. Dále bylo pozorováno chování klíšťat, kdy se kontrolní klíšťata ihned po umístění začala pohybovat po celé ploše Petriho misky anebo z ní vylézala ven. Když byly na okraj filtračního papíru aplikovány éterické oleje, klíšťata se chovala zcela odlišně. Pokud došla na hranici ošetřené repelentem: začala couvat, změnila směr, otočila se směrem do středu Petriho misky nebo zvedala přední končetiny. Pro hodnocení repelentního účinku byla počítána klíšťata, která bariéru repelentu během intervalu 5 minut překonala. Účinnost testovaného repelentu byla zaznamenávána po dobu 8 hodin, nebo dokud neklesla pod hranici 33 %. Výsledky ukazují, že esenciální oleje ze smrku a šalvěje mají významně vyšší repelentní účinek proti klíšťatům než olej z rozmarýnu. Zároveň se také potvrdil předpoklad, že esenciální oleje nemají tak silný a stabilní efekt jako syntetický repelent DEET. Na základě chemického rozboru jednotlivých složek éterických olejů byly zaznamenány sloučeniny, které vysvětlují jejich odpuzující účinek.

### Rozmarýnový esenciální olej

Dle chemického rozboru tohoto esenciálního oleje (Příloha 1) je hlavní složkou eukalyptol (33,6 %), což je monoterpenoidový éter (1,8-cineol), který je dominantní složkou zejména eukalyptového oleje (63,6 %) (Tampe et al. 2020). Eukalyptový esenciální olej byl zkoušen například ve studii Yoon et al. (2011), kde byla prokázána repelentní aktivita proti komárům pisklavým, a kdy repeloval hmyz po dobu 7 h při koncentraci 50 %. Tato složka má velmi významnou repelentní účinnost nejen proti hmyzu, ale i klíšťatům, což potvrzuje studie Elmhalli et al. (2019), kteří testovali přímo esenciální olej z rozmarýnu na nymfách klíštěte obecného. Ten při koncentraci 1 a 0,5  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  odpuzoval nymfy klíštěte obecného po dobu 5 hodin, což je odlišný výsledek ve srovnání se závěry této práce. Lze to vysvětlit odlišnými postupy při testování repelentní účinnosti, kdy nymfy s repelentem byly v uzavřené nádobě, díky čemuž se snížila těkavost repelentu a mohl fungovat déle.

Druhou nejvíce zastoupenou látkou rozmarýnového esenciálního oleje je kafr (22,6 %), který je původem ze stromu kafrovníku (*Cinnamomum camphora*), ale nachází se i v jiných silicích (např. bazalka, šalvěj, rozmarýn). Esenciální olej z kafru byl jako repelent použit například proti skladovým škůdcům (pilous černý) a také vykazoval larvicidní účinky proti střečkům ovčím (Mazyad & Soliman 2001).

Předchozí práce také ukázaly, že látka alfa-pinen izolovaná z éterického oleje hvozdíku karafiátu (*Dianthus caryophyllus*) vykazuje silný repelentní účinek proti *I. ricinus* (Tunón et al. 2006). Tato složka se nachází v testovaném rozmarýnovém esenciálním oleji ze 16,2 %, což je třetí nejvíce zastoupená látka. Ačkoliv rozmarýnový olej obsahuje látky, které by mohly být

účinné proti klíšťatům, samotný účinek esenciálního oleje z rozmarýnu byl v porovnání s dalšími testovanými repelenty v této studii významně nižší, když ani v nejvyšší testované koncentraci, tedy 20 %, odpuzoval méně než 70 % klíšťat během první hodiny pokusu.

### **Smrkový a šalvějový esenciální olej**

Repelentní účinky esenciálních olejů ze šalvěže a smrku proti *I. ricinus* nebyly dosud testovány. Nejlepší odpuzující účinky ze všech testovaných esenciálních olejů má smrkový (*Picea abies*), který vykazuje nejvyšší repelenci proti nymfám *I. ricinus* v 15% a 20% koncentraci. Lze konstatovat, že obě koncentrace smrkového esenciálního oleje během první hodiny od aplikace repelují 90 % klíšťat. Ve vyšší 20% koncentraci se jeho účinnost sice signifikantně nezvyšovala, ale na druhou stranu se například prodloužila doba účinnosti vyšší než 80 % až na 2 hodiny. Účinek smrkového oleje o 20% koncentraci byl dokonce srovnatelný se syntetickým 5% DEETem, a to po dobu 2 hodin, kdy repeloval o cca. 10 % klíšťat méně. I když tento repelent nikdy nedosáhl takových účinků jako DEET, nejvíce se k nim přiblížil. Za smrkovým esenciálním olejem následoval, co se týče účinnosti, esenciální olej ze šalvěže lékařské (*Salvia officinalis*). Jeho repelentní účinky byly sice horší o zhruba 10 % než u smrkového esenciálního oleje, ale účinnost neklesala tak strmě jako u rozmarýnového esenciálního oleje. Křivky účinnosti v měřených časech se mezi smrkovým a esenciálním olejem v průběhu testování mezi sebou příliš významně nelišily, což může být i níže uvedeným podobám chemického složení.

Dle chemického rozboru jednotlivých složek éterických olejů (Příloha 2–3) byly zaznamenány sloučeniny, které vysvětlují odpuzující účinek těchto dvou esenciálních olejů. Je známo, že některé monoterpeny přítomné v šalvějovém anebo ve smrkovém éterickém oleji jsou účinnými sloučeninami odpuzující klíšťata. Takovou významnou látkou převažující v kompozici éterického oleje ze šalvěže jsou například linalool (25,5 %) nebo bornyl acetát (33,1 %) ve smrkovém éterickém oleji. Ty jsou také stabilnější ve srovnání s vysoce těkavým alfa-pinenem (16,2 %), který se nachází v rozmarýnovém oleji a mohou tak vysvětlit dlouhodobější účinek šalvějového a smrkového oleje (da Silva & Ricci-Júnior 2020)

Látka linalool nacházející se v šalvějovém oleji je velmi významnou složkou, která také převažuje například v levandulovém esenciálním oleji. Ten má významnou biologickou aktivitu zahrnující repelenci a významné akaricidní či insekticidní účinky proti různým hmyzím škůdcům (Papachristos & Stamopoulos 2004). V testu provedeném Kulmou et al. (2017) byl testován levandulový esenciální olej proti *I. ricinus*. Ten měl nejsilnější a nejstabilnější účinek, kdy velmi dobře fungoval proti klíštěti obecnému ve vysokých koncentracích (15 %) a krátce po aplikaci (15 minut). Další autoři (Semmler et al. 2011; Thorsell et al. 2006) v podobných testech s esenciálním olejem z levandule uvádějí, že ochrání *proti I. ricinus* řádově desítky minut. Tato účinnost je velmi podobná testovaným esenciálním olejům ze šalvěže a smrku.

### **Roztok Alpa Francovka s hřebíčkem**

Tento podomácku vyrobený repelent byl otestován stejnými postupy jako předchozí esenciální oleje, ale přestože je mnohdy velice doporučován, při hodnocení dosáhl v porovnání s oleji i DEETem výrazně horšího účinku. Jeho účinky by se daly porovnat pouze s esenciálním olejem z rozmarýnu, kdy do 30 minut od aplikace fungoval lépe než rozmarýnový olej i v té nejvyšší koncentraci 20 %. Po 60 minutách nefungoval již vůbec, a díky tomu se nejedná o spolehlivý repelent, který lze doporučit jako dlouhodobě fungující ochranu proti klíšťatům. Na druhou stranu esenciální olej z hřebíčku byl nedávno navržen jako alternativní repelent proti hmyzu (Shapiro 2012). Dále je také hřebíčkový esenciální olej hodnocen jako repelent proti nymfám *I. ricinus*, *R. microplus* a larvám *D. nitens*. Vysokou repelenci lze vysvětlit přítomností eugenolu, který je hlavní složkou hřebíčkového oleje (73,5 – 96,9 %) (Del Fabbro & Nazzi 2008; Zeringóta et al. 2013; Tisserand a Young 2013). Repelentní účinky hřebíčkového éterického oleje byly zkoušeny také ve studii Štefánidesové et al. 2017, kdy bylo zjištěno, že 3% roztok z hřebíčkového oleje odpudil 82,9 % dospělých *D. reticulatus* po dobu 2 hodin. Je tedy patrné, že louhování v lihu, není nejefektivnějším způsobem, jak využít hřebíček v osobní ochraně proti klíšťatům.



## 7 Závěr

Všechny testované esenciální oleje vykazovaly určitou repelentní účinnost, což znamená, že nymfy klíštěte na testované přípravky reagovaly a byly jimi po určitou dobu odpuzovány. Doba účinnosti ovšem nebyla tak stálá jako v případě syntetického repelentu DEET, který i v 5% koncentraci vykazoval vysoký repelentní účinek. Jako nejlepší z testovaných esenciálních olejů byl hodnocen olej ze smrku pichlavého (*Picea abies*) následován silicí z šalvěže lékařské (*Salvia officinalis*). Bylo také potvrzeno, že zvýšením koncentrace esenciálního oleje lze zvýšit a prodloužit účinek repelentu.

Na základě dosažených výsledků lze tak tedy konstatovat, že vědecká hypotéza „Testované esenciální oleje mají určitý repelentní účinek, není ovšem tak stabilní jako u syntetických preparátů“ byla potvrzena.

Ukázalo se také, že šalvějový a zejména smrkový esenciální olej jsou vhodnou alternativou pro použití jako repelenty. Jejich účinnost není sice tak stabilní jako u syntetických repelentů, ale při krátkém pobytu v přírodě nebo při jejich opakované aplikaci po 1–2 hodinách je lze využít jako repelenty proti klíšťatům *Ixodes ricinus*.

## 8 Literatura

- Abdel-Ghaffar F, Al-Quraishy S, Mehlhorn H. 2015. Length of tick repellency depends on formulation of the repellent compound (icaridin = Saltidin®): tests on *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ricinus* placed on hands and clothes. *Parasitology Research* **114**:3041–3045.
- Adenubi OT, Fasina FO, McGaw, LJ, Eloff, JN, Naidoo V. 2016. Plant extracts to control ticks of veterinary and medical importance: A review. *South African Journal of Botany* **105**:178–193.
- Anderson JM, Sonenshine DE, Valenzuela, JG. 2008. Exploring the mialome of ticks: an annotated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *BMC Genomics* **9**:552.
- Ansari, MA, Razdan RK. 1994. Repellent action of *Cymbopogon martini* Stapf. var. *Sofia* against mosquitoes. *Indian Journal of Malariology* **31**: 95–102.
- Aquino M, Fyfe M, MacDougall L, Remple V. 2004. West Nile virus in British Columbia. *Emerging Infectious Disease* **10**:1499–1501.
- Bakkali FS, Averbeck D, Averbeck, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oil. *Food Chemistry and Technology* **46**:446–475.
- Barnard DR. 1999. Repellency of essential oils to mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* **36**:625–629.
- Barnard D. 2000. Repellents and toxicants for personal protection. Pages 34–116 In: World Health Organization, Department of Control, Prevention and Eradication, Programme on Communicable Diseases, WHO Pesticide Evaluation Scheme (WHOPES), WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/2000.5, WHO, Geneva.
- Benelli G, Pavela R, Canale A, Mehlhorn H. 2016. Tick repellents and acaricides of botanical origin: a green roadmap to control tick-borne diseases? *Parasitology Research* **115**:2545–2560.
- Benelli G, Pavela R. 2018. Repellence of essential oils and selected compounds against ticks—A systematic review. *Acta Tropica* **179**:47–54.
- Baser KHC. 1995. Analysis and quality assessment of essential oils. Pages 155–177 in De Silva KT, editors. *A Manual on the Essential Oil Industry*. UNIDO, Vienna.

- Baser KHC, Demirci F. 2007. Chemistry of Essential Oils. Pages 43–86 in Berger RG, editors. *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability*. Springer, Berlin.
- Belova OA, Burenkova LA, Karganova GG. 2012. Different tick-borne encephalitis virus (TBEV) prevalences in unfed versus partially engorged ixodid ticks—evidence of virus replication and changes in tick behavior. *Ticks and Tick-borne Diseases* **3**:240–246.
- Berenbaum M. 1985. Allelochemical interactions in plants. *Recent Advances in Phytochemistry* **19**: 139–169.
- Bezzera FM, Carmona OG, Carmon, CG, Lis MJ, de Moraes FF. 2016. Controlled release of microencapsulated citronella essential oil on cotton and polyester matrices. *Cellulose*. Available from <http://dx.doi.org/10.1007/s10570-016-0882-5>.
- Bissinger BW, Donohue KV, Khalil SM, Grozinger CM, Sonenshine DE, Zhu J. 2011. Synganglion transcriptome and developmental global gene expression in adult females of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Insect Molecular Biology* **20**:465–491.
- Bissinger BW, Roe MR. 2010. Tick repellents: past, present, and future. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **96**:63–79.
- Bonnet MS. 1998. Toxicology of *Ixodes ricinus*, the European tick. *British Homeopathic Journal* **87**:22–27.
- Bowman, AS, Ball A, Sauer JR. 2008. Tick salivary glands: the physiology of tick water balance and their role in pathogen trafficking and transmission. Pages 73–91 in Bowman AS, Nuttall PA, editors. *Ticks: Biology, Disease and Control*. New York: Cambridge University Press **3**:73–91.
- Hüsnü Can Baser K, Chlodwig F. 2009. Essential Oils Used in Veterinary Medicine. Pages 881–894 in Buchbauer G, Hüsnü CB, editors. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. CRC Press, New York.
- Carroll JF, Benante JP, Klun JA, White CE, Debboun M, Pound JM, Dheranetra W. 2008. Twelve-hour duration testing of cream formulations of three repellents against *Amblyomma americanum*. *Medical and Veterinary Entomology* **22**:144–151. Available from <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2915.2008.00721.x>.

- Carroll JF, Paluch G, Coats J, Kramer M. 2010. Elemol and amyris oil repel the ticks *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in laboratory bioassays. *Experimental and Applied Acarology* **51**:383–392.
- Ciobanu A, Mallard I, Landy D. 2012. Inclusion interactions of cyclodextrins and crosslinked cyclodextrin polymers with linalool and camphor in *Lavandula angustifolia* essential oil. *Carbohydrate Polymers* **87**:1963–1970.
- Costanzo S, Watkinson A, Murby E, Kolpin D, Sandstrom M. 2007. Is there a risk associated with the insect repellent DEET (N, N-diethyl-m-toluamide) commonly found in aquatic environments. *Science of the Total Environment* **384**:214-220. Available from <http://10.1016/j.scitotenv.2007.05.036>.
- Dautel H. 2004. Test systems for tick repellents. *Journal of Medical Microbiology* **293**:182–188.
- Del Fabbro S, Nazzi F. 2008. Repellent effect of sweet basil compounds on *Ixodes ricinus* ticks. *Experimental and Applied Acarology* **45**:219–228. Available from <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-008-9182-6>.
- Diaz JH. 2016 Chemical and plant-based insect repellents: Efficacy, safety, and toxicity. *Wilderness & Environmental Medicine* **27**:153–163.
- Domingues LF, Giglioti R, Feitosa KA, Fantatto RR, Rabelo MD, de Sena Oliveira MC, Bechara GH, de Oliveira GP, de Souza Chagas AC. 2013. In vitro and in vivo evaluation of the activity of pineapple (*Ananas comosus*) on *Haemonchus contortus* in Santa Inês sheep. *Veterinary Parasitology* **197 (1)**:263–270.
- Dominguez-García D, Rosario-Cruz R, García C, Oaxaca J, De la Fuente J. 2010. *Boophilus microplus*: aspectos biológicos y moleculares de la resistencia a los acaricidas y su impacto en la salud animal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* **12**:181–192.
- Dubey, N.K., 2011. *Natural Products in Pest Management*. CAB International, London, UK.
- ECHA. 2017. *Guidance on the Biocidal Products Regulation Volume V, Guidance on Disinfection By-Products*. vol. II.
- Ellse L, Wall R. 2014. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: a review. *Medical and Veterinary Entomology* **28(3)**:233–243.

- Elmhalli F, Garboui SS, Borg-Karlson AK, Mozūraitis R, Baldauf SL, Grandi G. 2019. The repellency and toxicity effects of essential oils from the Libyan plants *Salvadora persica* and *Rosmarinus officinalis* against nymphs of *Ixodes ricinus*. *Experimental and Applied Acarology*, **77(4)**:585–599. Available from <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00373-5>.
- Environmental Protection Agency, (EPA). 2010. EPA product Performance test Guidelines. OPPTS 810.3700. Insect Repellents to be applied to human skin.
- Frances SP, Debboun M, Frances S, Strickman D. 2007. Efficacy and safety of repellents containing DEET. CRC Press Taylor and Francis Group, USA.
- Fradin MS, Day JF. 2002. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *The New England Journal of Medicine* **347**:13–18. Available from <https://10.1056/NEJMoa011699>.
- Gerberg EJ, Novak RJ. 2007 Considerations on the use of botanically-derived repellent products. Pages 305–310 in Debboun M, Frances S, Strickman D, editors. *Insect repellents: principles, methods, and uses*. CRC Press, Boca Raton.
- George, DR. 2000. Present and future technologies for tick control. *Annals of the New York Academy of Sciences* **916**:583–588.
- Gillij YG, Gleiser RM, Zygodlo JA. 2008. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technology* **99**:2507–2515.
- Ghosh S, Azhahianambi P, de la Fuente J. 2006. Control of ticks of ruminants, with special emphasis on livestock farming systems in India: present and future possibilities for integrated control. *Experimental and Applied Acarology* **40**:49–66.
- Ghosh HS, Roy S, Sanyal AK, Misra KK. 2017. Microscopic anatomy of the Haller's organ of snake ticks. *International Journal of Acarology*, **43(1)**:1–9. Available from <https://doi.org/10.1080/01647954.2016.1229813>.
- Gonçalves K, Toigo E, Ascoli B, von Poser G, Ribeiro VLS. 2007. Effects of solvents and surfactant agents on the female and larvae of cattle tick *Boophilus microplus*. *Parasitology Research* **100 (6)**:1267–1270.
- Goodyer L, Behrens RH. 1998. Short report: The safety and toxicity of insect repellents. *American journal of tropical medicine and hygiene* **59**:323-324.

- Graca-Souza A, Maya-Monteiro C, Paiva-Silva GO, Braz, GRC, Paes MC, Sorgine MHF, Oliveira MF, Oliveira PL. 2006. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **36**:322–335.
- Gross AD, Temeyer K, Day T. 2017. Interaction of plant essential oil terpenoids with the southern cattle tick tyramine receptor: A potential biopesticide target. *Chemico-Biological Interactions* **263**:1–6.
- Guenther E. 1972. *The Essential Oils*. Krieger Publishing Company. *Phytotherapy Research* **17**:202205.
- Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich DA, Petney TN, Estrada-Pena A, Horak IG. 2010. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: A list of valid species names. *Zootaxa* **2528**:1–28.
- Heimerdinger A, Olivo CJ, Molento MB, Agnolin CA, Ziech MF, Scaravelli LF, Skonieski FR, Both JF, Charao PS. 2006. Alcoholic extract of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) on the control of *Boophilus microplus* in cattle. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria* **15**:37–39.
- Chagas ACS, Passos WM, Prates HT, Leite RC, Furlong J, Fortes ICP. 2002. Acaricide effect of *Eucalyptus* spp. essential oils and concen-trated emulsion on *Boophilus microplus*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal* **39**:247–253.
- Chagas AC, Domingues LF, Fantatto RR, Giglioti R, Oliveira MCS, Oliveira DH, Mano RA, Jacob RG. 2014. In vitro and in vivo acaricide action of juvenoid analogs produced from the chemical modification of *Cymbopogon* spp. and *Corymbia citriodora* essential oil on the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Veterinary Parasitology* **205**:277–284. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.06.030>.
- Chaubey MK. 2007. Insecticidal activity of *Trachyspermum ammi* (Umbelliferae), *Anethum graveolens* Umbelliferae) and *Nigella sativa* (Ranunculaceae) essential oils against stored-product beetle *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *African Journal of Agricultural Research* **2**:596–600.
- Jaenson TGT, Garboui S, Pålsson K. 2006. Repellency of oils of lemon eucalyptus, geranium, and lavender and the mosquito repellent MyggA natural to *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in the laboratory and field. *Journal of Medical Entomology* **43**:731–736.

- Kappers IF, Dicke M, Bouwmeester HJ. 2008. Terpenoids in plant signaling, chemical ecology. Pages 1–8 in Begley TP editors. Wiley encyclopedia of chemical biology. Wiley, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Katz T, Miller J, Hebert A. 2008. Insect repellents: historical perspectives and new developments. *Journal of the American Academy of Dermatology* **58**:865–871.
- Kimutai A, Ngeiywa M, Mula M, Njagi PGN, Ingonga J, Nyamwamu LB, Ombati C, Ngumbi P. 2017. Repellent effects of the essential oils of *Cymbopogon citratus* and *Tagetes minuta* on the sandfly, *Phlebotomus duboscqi*. *BMC Research Notes* **10(1)**:1–9. Available from <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2396-0>.
- Kröber T, Bourquin M, Guerin PM. 2013. A standardised in vivo and in vitro test method for evaluating tick repellents. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **107(2)**:160–168. Available from <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.06.008>.
- Kulma M, Bubova T, Kopecky O, Rettich F. 2017. Lavender, eucalyptus, and orange essential oils as repellents against *Ixodes ricinus* females. *Scientia Agriculturae Bohemica* **48**:76–81.
- Langenheim JH. 1994. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* **20(6)**:1223–1280.
- Lara FA, Lins U, Bechara GH, Oliveira PL. 2005. Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Journal of Experimental Biology* **16**:3093–3101.
- Lupi E, Hatz C, Schlagenhauf P. 2013. The efficacy of repellents against *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* and *Ixodes* spp. *Travel Medicine and Infectious Disease* **11**:374–411.
- Ma D, Bhattacharjee AK, Gupta RK, Karle JM. 1999. Predicting mosquito repellent potency of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET) analogs from molecular electronic properties. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **60**:1–6.
- Matsuo T, Cerruto Noya CA, Taylor D, Fujisaki K. 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* **69**:317–320.
- Mazyad SA, Soliman M. 2001. Laboratory evaluation of the insecticidal activity of camphor on the development of *Oestrus ovis* larvae. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* **31(3)**:887–892.

- Moore SJ, Lenglet A, Hill N. 2007. Plant-based insect repellents. Pages 276–304 in Debboun M, Frances S, Strickman D, editors. *Insect repellents: principles, methods, and uses*. CRC Press, Boca Raton.
- Nerio LS, Olivero-Verbel J, Stashenko E. 2010. Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresource Technology* **101(1)**:372–378.
- Nicholson WL, Sonenshine DE, Noden BH, Brown RN. 2020. Ticks (*Ixodida*). Pages 603–672 in Gary R, Mullen A, Lance A, editors. *Medical and Veterinary Entomology*. Academic Press, United States of America.
- Novak RJ, Gerberg EJ. 2005. Natural-based repellent products: efficacy for military and general public uses. *Journal of the American Mosquito Control Association* **21**:7–11. Available from [https://10.2987/8756-971X\(2005\)21\[7:NRPEFM\]2.0.CO;2](https://10.2987/8756-971X(2005)21[7:NRPEFM]2.0.CO;2).
- Omolo MO, Okinyo D, Ndiege IO, Lwande W, Hassanali A. 2004. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochemistry* **65**:27972802.
- Papachristos DP, Stamopoulos DC. 2004. Fumigant toxicity of three essential oils on the eggs of *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research* **40**:517–525. Available from <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2003.07.002>.
- Park BS, Choi WS, Kim JH, Lee SE. 2005. Monoterpenes from thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents. *Journal of the American Mosquito Control Association* **21**:80–83.
- Ravindran R, Juliet S, Sunil AR, Ajith Kumar KG, Nair SN, Amithamol KK, Ghosh S. 2011. Eclosion blocking effect of ethanolic extract of *Leucas aspera* (Lamiaceae) on *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. *Veterinary Parasitology* **179 (1)**:287–290.
- Rosický B, Daniel M, Dusbábek F, Palička P, Samšiňák K. 1979. Roztoči a klíšťata škodící zdraví člověka. Československá akademie věd, Praha.
- Reegan AD, Kannan RV, Paulraj MG, Ignacimuthu S. 2014. Synergistic effects of essential oil-based cream formulations against *Culex quinquefasciatus* Say and *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* **17**:327–331. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.aspen.2014.02.008>.
- Ryšavý B, Černá Ž, Chalupský J, Országh I, Vojtek J. 1989. *Základy parazitologie. Státní pedagogické nakladatelství, Praha.*



- Semmler M, Abdel-Ghaffar F, Al-Rasheid KAS, Mehlhorn H. 2011. Comparison of the tick repellent efficacy of chemical and biological products originating from Europe and the USA. *Parasitology Research* **108(4)**:899–904. Available from <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2131-4>.
- Shapiro R. 2012. Prevention of vector transmitted diseases with clove oil insect repellent. *Journal of Pediatric Nurse* **27**:346–349. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.pedn.2011.03.011>.
- da Silva MRM, Ricci-Júnior E. 2020. An approach to natural insect repellent formulations: from basic research to technological development. *Acta Tropica* 105419. Available from <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105419>.
- Soares SF, Borges LMF, Braga RD, Ferreira LL, Louly CCB, Tresvenzol LMF, de Paula JR, Ferri, PH. 2010. Repellent activity of plant-derived compounds against *Amblyomma cajennense* (Acari: ixodidae) nymphs. *Veterinary Parasitology* **167**:67–73. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.047>.
- Sonenshine, D.E., Lane, R.S., Nicholson, W.L., 2002. Ticks (Ixodida). Pages 517–558 in Mullen G, Durden L, editors. *Medical and veterinary entomology*. Academic San Diego.
- Sonenshine D.E. 2006. Tick pheromones and their use in tick control. *Annual Review Entomology* **51**:557–580.
- Sonenshine DE. 2008. Pheromones and other semiochemicals of ticks and their use in tick control. *Ticks: Biology, Disease and Control*, 470–491. Available from <https://doi.org/10.1017/CBO9780511551802.022>.
- Sonenshine DE, Roe RM. 2014. External and Internal Anatomy of Ticks. *Biology of Ticks* **1**:74–98.
- Stajković N, Milutinović R. 2013. Insect repellents: Transmissive disease vectors prevention. *Vojnosanitetski preglad* **70**:854-860.
- Štefanidesová K, Škultéty Ľ, Sparagano OAE, Špitalská E. 2017. The repellent efficacy of eleven essential oils against adult *Dermacentor reticulatus* ticks. *Ticks and Tick-borne Diseases* **8**:780–786.
- Štork J, Arenberger P, Pizinger K, Semrádová V, Vosmík F. 2013. *Dermatovenerologie*. Galén, Praha.
- Tampe J, Pacheco B, Bardehle L, Fuentes E, Salas L, Quiroz A. 2020. Attractant Effect of *Eucalyptus globulus* (Labill) and *Foeniculum vulgare* (Mill.) Essential Oils on *Aegorhinus*

- superciliosus (Guérin) (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* **20(2)**:775–783. Available from <https://doi.org/10.1007/s42729-019-00164-2>.
- Tawatsin A, Wratten SD, Scott RR, Thavara U, Techandamrongsin Y. 2001. Repellency of volatile oils from plants against three mosquito vectors. *Journal Vector Ecology* **26**:76–82.
- Thorsell W, Mikiver A, Tunon H. 2006. Repelling properties of some plant materials on the tick *Ixodes ricinus* L. *Phytomedicine* **13**:132–134. Available from <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2004.04.008>.
- Tisserand, R., Young, R. 2013. *Essential Oil Safety*. Livingstone, Churchill.
- Trigg JK, Hill N. Laboratory evaluation of a eucalyptus- based repellent against four biting arthropods. *Phytotherapy Research* **1996**:10313–10316.
- Trongtokit Y, Rongsriyam Y, Komalamisra N, Apiwathnasorn C. 2005. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. *Phytother* **19**:303–309.
- Tunón H, Thorsell W, Mikiver A, Malander I, 2006. Arthropod repellency, especially tick (*Ixodes ricinus*), exerted by extract from *Artemisia abrotanum* and essential oil from flowers of *Dianthus caryophyllum*. *Fitoterapia* **77**:257–261.
- Van Wye, JE, Hsu YP, Terr AI, Lane RS, Moss RB. 1991. Anaphylaxis from a tick bite. *New England Journal of Medicine* **324**:777–778.
- Vilar WTS, Barbosa MF, Pinto L, de Araújo MCU, Pontes MJC. 2020. Determination of N, N-diethyl-3-methylbenzamide and ethyl-butyl-acetylaminopropionate in insect repellent using near infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Microchemical Journal* **152**:104285. Available from <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104285>.
- Volf P, Horák P. 2007. *Paraziti a jejich biologie*. Triton, Praha.
- Votýpka J, Klářová I, Horák P, Modrý D, Lukeš J, Kodým P, Stejskal F, Fajfrlík K, Kopecký J, Chalupský J, Kolář M. 2018. *O parazitech a lidech*. Triton, Praha.
- Wang J, Zhua F, Zhoua XM, Niua CY, Lei CL. 2006. Repellent and fumigant activity of essential oil from *Artemisia vulgaris* to *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products* **42**:339–347.

- Wang Z, Song J, Chen J, Song Z, Shang S, Jiang Z, Han Z. 2008. QSAR study of mosquito repellents from terpenoid with a six-member-ring. *Bioorg. Medicinal Chemistry Letters* **18**:2854–2859.
- Yang YC, Lee EH, Lee HS, Lee DK, Ahn YJ. 2004. Repellency of aromatic medicinal plant extracts and a steam distillate to *Aedes aegypti*. *Journal of American Mosquito Control Association* **20**:146–149.
- Yoon C, Moon SR, Jeong JW, Shin YH, Cho SR, Ahn KS, Yang JO, Kim GH. 2011. Repellency of lavender oil and linalool against spot clothing wax cicada, *Lycorma delicatula* (Hemiptera: Fulgoridae) and their electrophysiological responses. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **14(4)**:411–416. Available from <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2011.06.003>.
- Zygadlo JA, Juliani HR. 2003. Recent progress in medicinal plants. In: Majundar, D.K., Govil, J.N., Singh, V.K., Shailaja, M.S., Gangal, S.V. *Phytochemistry and Pharmacology II, VIII*. Studium Press LLC Texas 273–281.
- Zeringóta V, Senra TO, Calmon F, Maturano R, Faza AP, Catunda-Junior FE, Monteiro CM, de Carvalho MG, Daemon E 2013. Repellent activity of eugenol on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: ixodidae). *Parasitology Research* **112**:2675–2679. Available from <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-013-3434-z>.

## 9 Samostatné přílohy

**Příloha č. 1:** Chemické složení rozmarýnového éterického oleje (Autor: Mgr. Václav Ševčík)

Chemické složení éterického oleje <i>Rosmarinus officinalis</i>			
Maximální číslo	Rt <sup>1</sup> [min]	Sloučenina	Obsah [rel.%] <sup>2</sup>
1	6,03	Tricyklen	0,7
2	6,50	Alfa-pinen	16,2
3	6,99	Kamfen	8,0
4	7,97	Beta-pinen	4,0
5	10,30	Eukalyptol	33,6
6	12,96	Alfa-pinen oxid	1,0
7	13,43	Linalool	1,5
8	14,62	-	0,2
9	15,18	Kafr	22,6
10	15,62	Isoborneol	0,8
11	16,11	Borneol	3,6
12	17,19	-	0,2
13	17,32	Myrtenal	0,2
14	17,43	Myrtenol	0,3
15	17,91	Verbenon	0,2
16	18,46	Carveol	0,2
17	19,46	Carvone	0,2
18	21,39	Bornyl-acetát	2,0
19	21,97	-	0,9
20	22,26	-	0,6
21	22,74	-	0,7
22	23,04	-	0,6
23	23,71	-	0,1
24	25,75	-	0,2
25	32,06	-	0,1
26	33,24	Karyofylen oxid	1,3
Celkem identifikované sloučeniny			96,3
Součet neidentifikovaných sloučenin			3,7

1 Retenční čas

2 procentní údaje byly získány normalizací vrcholu plochy FID

**Příloha č. 2:** Chemické složení šalvějového éterického oleje (Autor: Mgr. Václav Ševčík)

Chemické složení éterického oleje <i>Salvia sclarea</i>			
Maximální číslo	Rt <sup>1</sup> [min]	Sloučenina	Obsah [rel.%] <sup>2</sup>
1	4,22	-	0,2
2	8,64	Myrcen	0,3
3	10,05	D-limonen	0,6
4	11,97	-	0,2
5	12,69	-	0,2
6	13,46	Linalool	25,5
7	15,12	Isopulegol	0,4
8	16,50	-	0,2
9	17,24	Terpineol	3,7
10	17,77	-	0,3
11	18,82	-	0,2
12	19,02	-	0,2
13	19,44	Citronelol	3,8
14	20,51	Bergamol	54,5
15	20,96	Geranial	0,2
16	21,16	Citronellyl-formiát	0,2
17	22,26	-	0,2
18	23,91	-	0,4
19	24,39	-	0,4
20	24,50	-	0,3
21	24,94	Neryl-acetát	1,3
22	25,13	Alfa-copaene	0,6
23	25,46	b-Bourbonen	0,2
24	25,76	Geranyl-acetát	2,2
25	26,88	Caryophyllene	1,4
26	29,34	b-Cubeben	0,2
27	30,35	-	0,5
28	33,09	Spathulenol	0,4
29	33,26	Karyofylenoxid	1,1
30	53,85	Sclareol	0,4
Celkem identifikované sloučeniny			96,8
Součet neidentifikovaných sloučenin			3,2

1 Retenční čas

2 procentní údaje byly získány normalizací vrcholu plochy FID

**Příloha č. 3:** Chemické složení smrkového éterického oleje (Autor: Mgr. Václav Ševčík)

Chemické složení éterického oleje <i>Picea abies</i>				
Maximální číslo	Rt <sup>1</sup> [min]	Sloučenina	Obsah [rel. %] <sup>2</sup>	
1	6,02	Tricyklen	0,4	
2	6,53	Alfa-pinen	23,5	
3	6,94	Kamfen	5,1	
4	7,74	o-Cymen	0,7	
5	7,97	Beta-pinen	2,5	
6	9,34	3-caren	4,7	
7	9,91	m-Cymen	2,2	
8	10,10	D-limonen	2,5	
9	12,66	-	0,1	
10	12,94	Alfa-pinen oxid	0,3	
11	13,34	-	0,2	
12	13,75	Verbenol	0,2	
13	14,68	-	0,3	
14	15,05	Kafr	8,5	
15	16,08	Borneol	4,5	
16	16,52	-	0,5	
17	16,97	p-Cymen-8-ol	1,0	
18	17,12	-	0,7	
19	17,21	Terpineol	1,1	
20	17,90	Verbenon	0,6	
21	18,59	Carveol	0,3	
22	18,74	Bornyl-formát	0,7	
23	19,81	-	0,2	
24	21,64	Bornyl-acetát	33,1	
25	21,89	-	0,3	
26		-	0,6	
27		-	0,2	
28		-	0,3	
29		25,44	-	0,3
30		-	-	0,4
31		-	-	0,2
32	25,72	Neryl-acetát	0,2	
33	26,19	Junipene	0,5	
34	26,53	Methyleugenol	0,3	

35	26,64	-	0,2
36	29,21	-	0,3
37	30,23	Alfa-muurolene	0,4
38	33,22	Karyofylenoxid	1,0
39	34,22	-	0,6
40	36,54	-	0,2
Celkem identifikované sloučeniny			94,4
Součet neidentifikovaných sloučenin			5,6

1 Retenční čas

2 procentní údaje byly získány normalizací vrcholu plochy FID