

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

***Ixodes holocyclus* - životní cyklus, toxicita a schopnost přenášet
borrelie**

Bakalářská práce

Kamila Bendová

Školitel: RNDr. Radek Šíma, Ph.D.

České Budějovice 2018

Bakalářská práce

Bendová, K., 2018: *Ixodes holocyclus* - životní cyklus, toxicita a schopnost přenášet borrelii. [*Ixodes holocyclus* - life cycle, toxicity and ability to transmit borrelia. Bc. Thesis, in Czech] - 60 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotation

Ixodes holocyclus is the most common species of blood-feeding arthropods along the whole eastern coast of Australia. The salivary secretions of engorged nymphs and adults contain neurotoxins, which cause paralysis and toxicoses to the hosts, especially cats, dogs, livestock, and even man, while native fauna appears to be immune. Despite its wide distribution, the role of paralytic toxins in disease transmission and the spectrum of pathogens carried by this tick are poorly understood. It is impossible to breed the ticks on animals because of their toxicity. However using an artificial feeding membrane helped us to establish a laboratory colony, which was necessary to perform our subsequent experiments. This study was focused on the ability of *I. holocyclus* to transmit *Borrelia afzelii*, a spirochete bacterium causing Lyme borreliosis. The next goal was to identify the paralytic neurotoxins.

Tato práce byla financována Grantovou agenturou České republiky, projekt číslo 17-27393S.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 12. 4. 2018

.....

Kamila Bendová

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem pracovníkům laboratoře Ondřeje Hajduška za jejich vlídné přijetí a ochotu mi s čímkoli i kdykoli pomoci. Děkuji Tereze Pospíšilové, že mne dovedla do tohoto přátelského a pro výzkum zapáleného prostředí a že mi byla spřízněnou duší.

Největší díky patří mému školiteli Radku Šimovi, který vedl veškeré experimenty, trpělivě mne učil všem technikám a díky kterému jsem mohla proniknout do problematiky a zároveň i kouzla světa klíšťat a jimi přenášených patogenů. Děkuji mu za jeho čas, ochotu, rady a neustálý optimismus.

Chtěla bych také poděkovat Janu Erhartovi a Matěji Kučerovi, bez kterých by tato práce nemohla být dokončena, neboť jejich zásluhou jsme mohli založit laboratorní chov klíšťat *I. holocyclus*. Děkuji také Zuzaně Zemanové, která mi poskytla svá data o klíštěti *I. ricinus*.

Velké poděkování patří mé rodině, které si velice vážím, za její podporu, lásku a důvěru, kterou ve mne vkládají.

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Klíšťata (Ixodida)	1
1.1.1	Argasidae (měkká klíšťata)	1
1.1.2	Ixodidae (tvrdá klíšťata).....	2
1.1.3	Sání krve.....	3
1.1.4	Trávení krve	4
1.1.5	Přenos patogenů klíšťaty.....	4
1.2	Rod <i>Borrelia</i>	6
1.2.1	Morfologie a fyziologie borrelií	6
1.2.2	Životní cyklus borrelií.....	7
1.2.3	Lymeská borrelióza.....	8
1.3	Austrálie	9
1.3.1	Austrálie v evoluci klíšťat	12
1.3.2	Australské druhy klíšťat	13
1.3.3	Klíšťaty přenášené patogeny v Austrálii.....	13
1.4	<i>Ixodes holocyclus</i>	15
1.4.1	Výskyt	15
1.4.2	Morfologie.....	16
1.4.3	Životní cyklus	17
1.4.4	Sezónnost	18
1.4.5	Toxicita	19
1.4.6	Hospodářský význam.....	21
1.4.7	Přenos patogenů klíštětem <i>I. holocyclus</i>	21
1.5	Membránové sání.....	22
2	Cíle práce.....	23
3	Materiál a metody	24
3.1	Laboratorní zvířata.....	24
3.2	Chov klíšťat	24
3.3	Membránové sání.....	25
3.3.1	Příprava hovězího parfému	25
3.3.2	Příprava krmítek	25
3.3.3	Příprava krve	26

3.3.4	Krmný roztok	26
3.3.5	Průběh krmení	26
3.4	Nákaza myši a klíšťat borreliemi.....	27
3.5	Společné sání larev <i>I. holocyclus</i> a <i>I. ricinus</i> – cofeeding	27
3.6	Identifikace a charakterizace paralytických neurotoxinů.....	27
3.7	Molekulární techniky	28
3.7.1	Izolace DNA.....	28
3.7.2	PCR.....	28
3.7.3	Gelová elektroforéza.....	28
3.7.4	Izolace RNA a přepis do cDNA	28
3.7.5	Kvantitativní PCR.....	29
3.8	Statistická analýza.....	31
4	Výsledky	32
4.1	Zavedení laboratorního chovu klíštěte <i>I. holocyclus</i>	32
4.1.1	Larvy	32
4.1.2	Nymfy	34
4.1.3	Dospělci	36
4.2	Srovnání <i>I. holocyclus</i> a <i>I. ricinus</i>	40
4.2.1	Nymfy	40
4.2.2	Dospělci	42
4.3	Testování schopnosti klíštěte <i>I. holocyclus</i> přenášet borreliie	43
4.3.1	Růstová kinetika <i>B. afzelii</i> v larvách <i>I. holocyclus</i>	43
4.3.2	Společné sání larev <i>I. holocyclus</i> a <i>I. ricinus</i> – cofeeding	43
4.4	Identifikace a charakterizace paralytických neurotoxinů.....	45
5	Diskuse.....	47
5.1	Zavedení chovu <i>I. holocyclus</i>	47
5.2	Srovnání s <i>I. holocyclus</i> a <i>I. ricinus</i>	48
5.3	Přenos borrelií	49
5.4	Toxiny	51
6	Závěr	52
7	Seznam použité literatury.....	53

1 Úvod

1.1 Klíšťata (Ixodida)

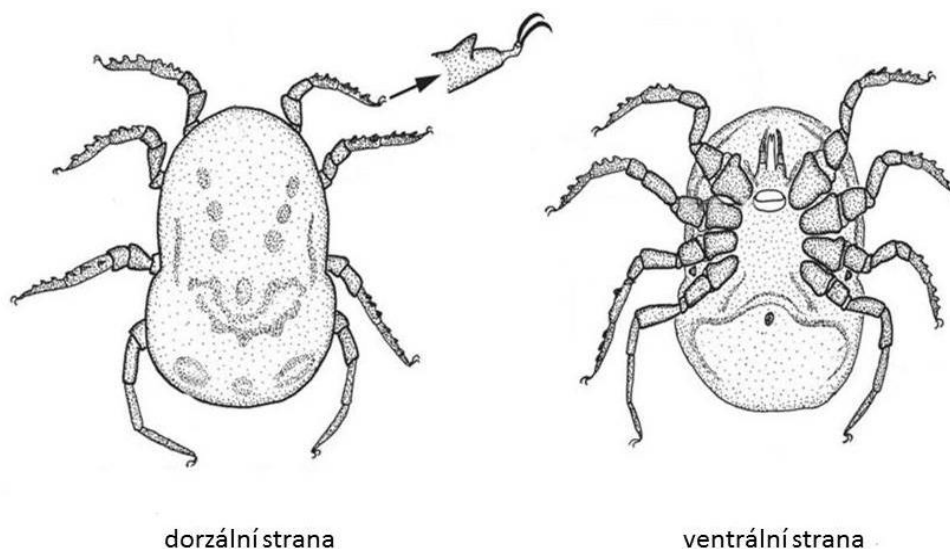
Klíšťata jsou celosvětově rozšíření hematofágní ektoparazité savců, plazů a ptáků. Svým hostitelům mohou škodit přímo i nepřímo. Často vyvolávají podráždění, alergie, paralýzy a toxikózy nebo v případě masivního zasažení způsobují i velké ztráty krve. Zároveň se stávají přenašeči širokého spektra patogenů (virů, bakterií, prvoků, hub), jež vyvolávají různá onemocnění zvířat i lidí. Na mnoho z nich stále neexistuje efektivní způsob léčby (Hajdušek et al. 2013) a stávají se tak příčinou znatelných hospodářských ztrát po celém světě.

Klíšťatovití (Ixodida) spadají do kmene členovců (Arthropoda), třídy pavoukoců (Arachnida) a řádu roztočů (Acari). Rozlišují se na tři čeledě: Ixodidae (tzv. tvrdá klíšťata), Argasidae (tzv. měkká klíšťata) a Nuttalliellidae (Alberto et al., 2010). Na celém světě bylo popsáno 896 druhů klíšťat (Guglielmone 2010). Čeleď Nuttalliellidae je monotypická a je zastoupena pouze jediným druhem *Nuttalliella namaqua*, žijícím v Africe. Čeleď Argasidae zahrnuje 193 druhů ve 4 rodech, čeleď Ixodidae 702 druhů ve 14 rodech (Guglielmone 2010).

1.1.1 Argasidae (měkká klíšťata)

Čeleď Argasidae (měkká klíšťata) se vyskytuje většinou v aridních či semiaridních oblastech po celém světě a její zástupci obvykle žijí celý život v hnízdech hostitelů, kterými jsou nejčastěji ptáci, netopýři nebo člověk (Roberts 1970). Bývají též nazýváni měkkými klíšťaty, neboť postrádají sklerotizovaný hřbetní štítek (scutum). Jejich ploché tělo je pokryto kožovitou kutikulou, která svrchní stranou kryje capitulum nesoucí ústní ústrojí (Obr. 1). To se obecně u klíšťat skládá z palp, hypostomu a chelicer. Párové palpy zůstávají během sání na povrchu kůže. Kůži hostitele pronikají ostré chelicery a hypostom pokrytý zpětnými háčky. Sání je u měkkých klíšťat rychlé a trvá obvykle v řádech minut či několika hodin. Přijímají menší množství krve než tvrdá klíšťata, ale mohou sát vícekrát v rámci jednoho vývojového stadia. Po stádiu larvy následuje několik stádií nymf (obvykle 3–4 v závislosti na objemu přijaté potravy), které se od dospělců liší pouze absencí pohlavního otvoru. Obě pohlaví přijímají v dospělosti potravu a příliš se od sebe morfologicky neliší (Roberts 1970). Páření probíhá i mimo hostitele a neovlivňuje úspěšnost dosátí. Dospělé

samice sají opakovaně a pokaždé kladou několik stovek vajíček (D. E. Sonenshine & Roe 2014). Celý vývojový cyklus trvá v řádech měsíců či let.

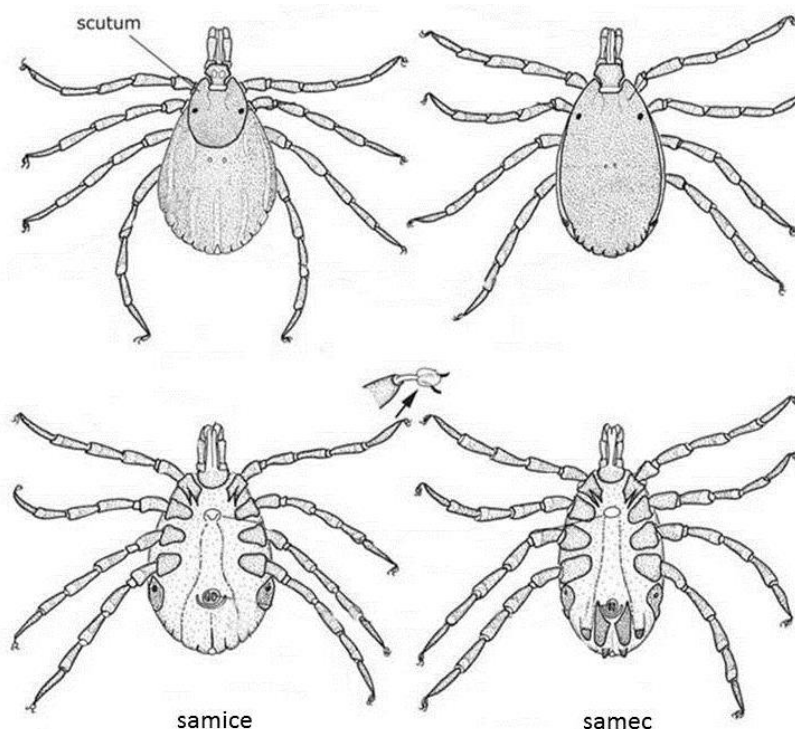


Obr. 1: Morfologické znaky měkkých klíšat (Argasidae). Dospělá samice rodu *Ornithodoros*. Převzato a upraveno (Barker & Walker 2014).

1.1.2 Ixodidae (tvrdá klíšata)

Pro klíšata z nejpočetnější čeledi Ixodidae (tvrdá klíšata) je typický sklerotizovaný hřbetní štítek (scutum), který u samců svrchu kryje celé tělo, u samic a nymf přibližně jednu třetinu (Obr. 2). Capitulum, které nese hypostom obklopený chelicerami a pedipalpami, je při pohledu shora dobře viditelné. Tvrdá klíšata prochází třemi vývojovými stadii: larva, nymfa, dospělec. Pro úspěšnou přeměnu z jednoho stadia do následujícího se potřebují jedenkrát nasát krve. Podle počtu hostitelů lze rozlišit druhy s jedno-, dvou- či tří-hostitelským životním cyklem. Sání, během kterého mnohonásobně zvětšují svou velikost, trvá několik dní (larvy sají 3–5 dní, nymfy 4–8 dní a dospělé samice 5–20 dní). Proto je i mechanismus přichycení k hostiteli složitější než u Argasidae. Příjem potravy dospělých samic lze rozdělit na dvě fáze. První fáze pomalého sání trvá zpravidla 1–4 dny, ale může se protáhnout až na 2 týdny. Během této doby dochází k růstu kutikuly zadečku a k zhruba 10násobnému nárůstu původní hmotnosti. Během druhé fáze rychlého sání, jež trvá 24–36 hodin, je přijato velké množství krve, což vede až k 100 násobnému zvětšení (Barker & Walker 2014). Samci většiny druhů nepřijímají potravu vůbec nebo pouze v malém množství, které je nutné ke spermatogenezi. Následně se mohou pářit s více samicemi. Kopulace samic probíhá pouze jednou a je nezbytně důležitá pro úspěšné dosátí. Po opuštění

hostitele samice klade několik tisíc vajíček v jedné snůšce a poté umírá (D. E. Sonenshine & Roe 2014).



Obr. 2: Morfologie tvrdých klíšťat (Ixodidae). Příklad dospělé samice a samce rodu *Hyalomma*. Dorsální a ventrální pohled. Převzato a upraveno (Barker & Walker 2014).

1.1.3 Sání krve

Hematofágie se v evoluci členovců vyvinula více než 20krát nezávisle na sobě. U klíšťat a obecně roztočů se její počátek odhaduje na období před 400–100 miliony let (Mans 2011).

Životně důležitým orgánem, jenž zabezpečuje celý průběh sání, jsou pro klíšťata slinné žlázy. Jedná se o alveolární struktury složené ze shluků granulárních a negranulárních buněk. Negranulární buňky se podílejí na osmoregulaci a hospodaření s vodou, jejíž přebytky aktivně vylučují (Kaufman 1989). V granulárních buňkách se produkují různé bioaktivní proteiny a lipidy, jež působí na hemostatický a imunitní systém. Tyto látky mají antikoagulační, protizánětlivé a imunosupresivní účinky a díky nim mohou klíšťata bez povšimnutí sát na hostiteli několik dní (D. E. Sonenshine & Roe 2014). Patří mezi ně například prostaglandiny potlačující vazokonstrikci, degranulaci žírných buněk a shlukování krevních destiček, dále pak antikomplementové proteiny, histamin vázající proteiny, kinázy tlumící bolest, inhibitory serinových proteáz, lipokaliny nebo cytokinové inhibitory (Hajdušek et al. 2013). Těchto imunosupresivních účinků slin mohou využívat také některé klíšťaty přenášené patogeny.

1.1.4 Trávení krve

Krev hostitele je pro klíš'ata jediným zdrojem potravy. Proces trávení krve je proto klíčový pro jejich následný vývoj a reprodukci (Sojka et al. 2013). Centrum metabolismu je střevo, které díky svým četným výběžkům (caeca) zaujímá u dospělé samice přes 80 % těla. Lze jej rozdělit na tři části: přední, střední a zadní. Z vnější strany je obklopeno vrstvou svalů zajišťujících peristaltické pohyby. Z vnitřní strany jednovrstevný epitel pokrývá peritrofická matrix. U většiny krev sajícího hmyzu je proces trávení krve rychlý a probíhá v alkalickém prostředí lumen střeva působením serinových proteáz podobným trypsinu. Oproti tomu u klíš'at je tento děj pomalý a z větší části se odehrává uvnitř střevních buněk (Sojka et al. 2013). V samotném lumen střední části střeva dochází pouze k enzymatické lýzi červených krvinek. Tato část střeva má především zásobní funkci, umožňuje klíš'atům vydržet dlouhé časové intervaly (měsíce až roky) bez sání na dalším hostiteli a přežít tak v rozmanitých podmínkách prostředí (Sojka et al. 2013).

Výzkumy ukazují, že hemoglobin představuje sice významný, ale ne však nezbytný zdroj proteinů pro další vývoj klíš'at (Sojka et al. 2013). Po hemolýze může hemoglobin vytvářet velké krystaly v lumen střeva. Rozpuštěné krevní proteiny, kterými jsou zejména rozpuštěný hemoglobin a sérový albumin, jsou následně endocytózou pohlceny do vnitrobuněčných trávicích váčků buněk epitelu, v nichž jsou v mírně kyselém pH dále zpracovány proteolytickými enzymy (Sojka et al. 2013). Poměrně složitá kaskáda enzymů (cysteinových a aspartových proteáz) postupně štěpí molekulu hemoglobinu na menší fragmenty ve specializovaných organelách střevních trávicích buněk (hemosomech). Hlavními peptidázami jsou různé formy katepsinů (C, B, D, L), legumain, serinová karboxypeptidáza, leucinová aminopeptidáza. Štěpení hemoglobinu je nutné přísně regulovat, neboť během rozkladu dochází k uvolňování řady potenciálně toxických sloučenin. Patří mezi ně například volná hemová skupina, fragmenty hemu (homocidiny), různé peptidy, inhibitory proteáz či reaktivní formy kyslíku. Samotná klíš'ata si vyvinula mechanismy, kterými se před působením těchto nebezpečných látek chrání. Naopak mohou využívat těchto metabolitů s antimikrobiální aktivitou proti patogenům přijatým spolu s potravou (Sojka et al. 2013).

1.1.5 Přenos patogenů klíš'aty

Klíš'ata jsou přenašeči celé řady patogenů, jež mohou způsobovat různá onemocnění zvířat i lidí. Patří mezi ně prvoci, bakterie, viry či houby. Přenášené patogeny využívají účinků látek ze slinných žláz klíš'at, které tlumí složky imunitního systému obratlovců,

a snadno tak pronikají do těla hostitele, aniž by byly rozpoznány (D. E. Sonenshine & Roe 2014).

Mezi celosvětově nejrozšířenější bakteriální onemocnění přenášené klíšťaty patří rody *Anaplasma*, *Borrelia*, *Ehrlichia*, *Francisella* a *Rickettsia* (Loh et al. 2016).

1.2 Rod *Borrelia*

Bakterie rodu *Borrelia* se taxonomicky řadí do třídy Spirochaetes, řádu Spirochaetales a čeledi Spirochaetaceae (Aguero-Rosenfeld et al. 2005). Tento rod lze dále klasifikovat na dvě skupiny. První z nich zahrnuje komplex *B. burgdorferi* sensu lato (s.l.), spojovaný s Lymeskou borreliózou, jejíž vektory jsou klíšťata rodu *Ixodes* spp (D. Sonenshine & Roe 2014). Druhou skupinou jsou druhy způsobující návratný tyfus (návratnou horečku – relapsing fever RF) (Loh et al. 2016). Vyskytují se v mírném i tropickém podnebném pásu (D. Sonenshine & Roe 2014) a jejich přenašeči jsou primárně měkká klíšťata (Argasidae), dále několik druhů tvrdých klíšťat (Ixodidae) a případně i vši (Loh et al. 2016). Někdy se uvádí ještě třetí skupina, která se vyskytuje na plazech (Reptile-associated – REP). Doposud není známo, zdali může docházet i k přenosu tohoto typu borrelií na člověka (Loh et al. 2017).

Do komplexu *B. burgdorferi* s.l. se řadí 21 druhů (Loh et al. 2016), z nichž mezi nejčastější původce Lymeské borreliózy u lidí patří *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *B. afzelii*, *B. garinii* a *B. spielmanii* (D. E. Sonenshine & Roe 2014). Hlavními přenašeči těchto patogenů jsou klíšťata komplexu *Ixodes ricinus-persulcatus* (Tsao 2009): ve Spojených státech amerických jsou jimi *I. pacificus* a *I. scapularis*, v Evropě *I. ricinus* a v Asii *I. persulcatus* (Loh et al. 2016).

1.2.1 Morfologie a fyziologie borrelií

Borreliie mají spirálně tvarovanou buňku o délce 4–30 μm a s průměrem 0,2–0,3 μm , krytou dvojitou membránou (Krieg et al. 2010). Ta je tvořena vnitřní peptidoglykanovou a vnější lipoproteinovou vrstvou. Kvůli této unikátní stavbě buněčné stěny je nelze klasifikovat ani jako G^+ ani G^- bakterie. Na obou koncích těla vyrůstá 7–11 periplazmatických bičíků, které se táhnou mezi vnitřní a vnější buněčnou membránou a obtácejí protoplazmatický válec. Bičíky zajišťují těmto extracelulárním parazitům relativně rychlý pohyb viskózním prostředím (Aguero-Rosenfeld et al. 2005; Rosa et al. 2005; Barbour & Hayes 1986).

Na rozdíl od jiných bakterií nesou borreliie lineární chromozom o délce 911 kbp a několik cirkulárních (9) a lineárních (12) plazmidů (Aguero-Rosenfeld et al. 2005). Na plazmidech, u kterých často dochází k horizontálnímu transferu genů, leží geny kódující povrchové proteiny, díky kterým spirochéty unikají imunitnímu systému hostitele (Casjens et al. 2012).

Bakterie *B. burgdorferi* s.l. dokáže regulovat expresi různých povrchových proteinů v závislosti na podmínkách okolního prostředí (např. teplota, pH, přítomnost a koncentrace daných látek, druh hostitele či vektora) (Aguero-Rosenfeld et al. 2005). Například gen pro povrchový protein A (OspA) je nezbytný pro kolonizaci střeva doposud neinfikovaného klíštěte a jeho exprese je stimulována složkami imunitního systému hostitele, který jimi reaguje na sání klíštěte. Na stěnách střeva spirochéty přilnou díky OspA a jeho homologu OspB. Saje-li nakažené klíště na druhém hostiteli, borrelie potlačí prepis genu OspA/OspB a začne produkovat povrchový lipoprotein C (OspC). Ten hraje klíčovou roli v přenosu borrelií z klíštěte do hostitele (Aguero-Rosenfeld et al. 2005).

1.2.2 Životní cyklus borrelií

V tradičním přenosovém cyklu vystupují jako rezervoáry borrelií drobní savci, ptáci či ještěrky. Larvy se během sání nakazí spirochéty, které v jejich střevě přežívají metamorfózu do dalšího stadia (trans-stadiální přenos) a mohou se zde i množit. Nymfy, které následně sají na nenakaženém kompetentním hostiteli, se stávají vektorem borrelií, zvíře dalším rezervoárem a kruh se uzavírá. Dospělci se obvykle na koloběhu nepodílejí, neboť často sají na hostitelích, ve kterých borrelie nepřežívají (D. Sonenshine & Roe 2014). K transovariálnímu přenosu téměř nedochází. Obdobný proces, pouze s drobnými odchylkami, lze sledovat u *I. pacificus*, *I. scapularis*, *I. ricinus* a *I. persulcatus* (D. Sonenshine & Roe 2014).

Různé druhy borrelií se liší v druzích hostitelů a vektorů, jež využívají k dokončení svého životního cyklu (Tsao 2009). Například spirochéty *B. afzelii* se vyskytují v hlodavcích, *B. garinii* v ptácích a *B. burgdorferi* s.s. v hlodavcích i ptácích. Naopak velcí kopytníci/jelenovití bývají pro borrelie slepou uličkou (Tsao 2009). Většina známých druhů klíšťat schopných přenosu borrelií spadá do komplexu *Ixodes ricinus-persulcatus*. Ostatní druhy mohou sát na hostitelích infikovaných *B. burgdorferi* s.l., ale díky své vrozené nekompatibilitě spirochéty nepřenáší. Je tomu tak například u druhů *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis*, *D. andersoni*, *D. occidentalis*, *I. cookei*, *I. trianguliceps* (Tsao 2009).

1.2.3 Lymeská borrelióza

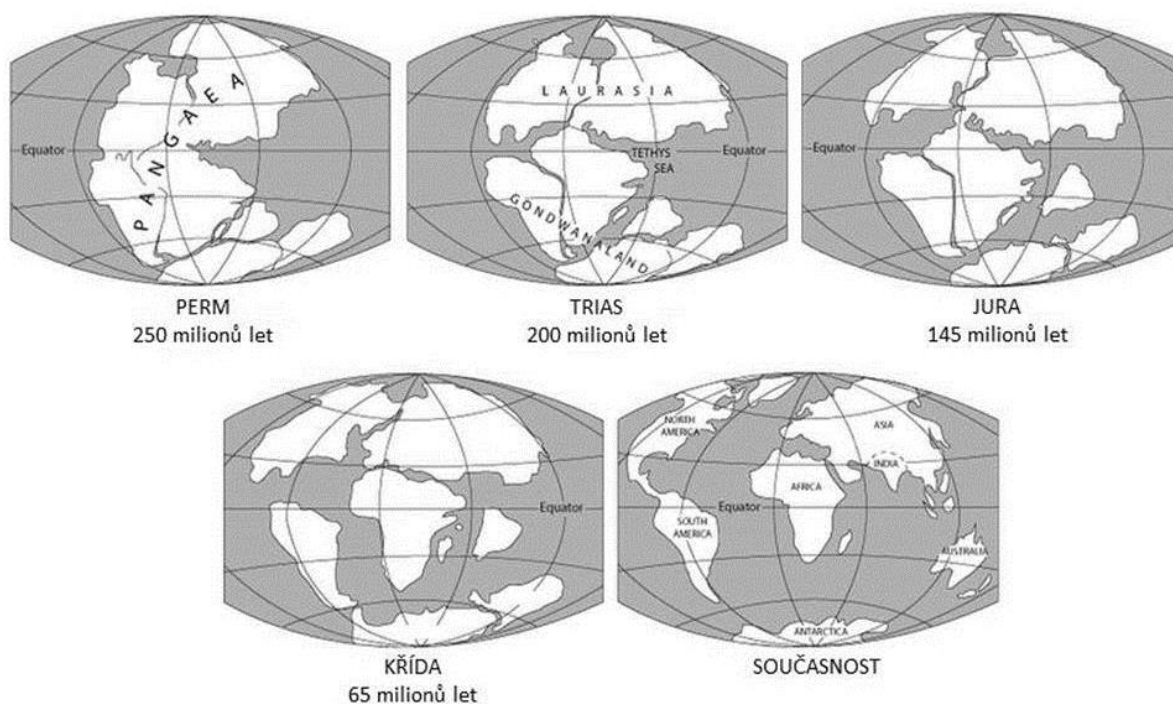
Lymeská borrelióza je nejčastější klíšťaty přenášené onemocnění v severním mírném pásu (D. Sonenshine & Roe 2014). Ročně jsou hlášeny statisíce případů. Na počátku 20. století švédský lékař Arvid Afzelius poprvé popsal jeden z jejích příznaků, erythema migrans, který dával do souvislosti se sáním klíštěte rodu *Ixodes* (Krieg et al. 2010). Ve Spojených státech amerických Dr. Allen Steere popsal Lymeskou boreliózu v roce 1977 a následně Dr. Willy Burgdorfer identifikoval jejího původce, spirochéty rodu *Borrelia* (Steere et al. 1977; Burgdorfer et al. 1982).

Jedná se o chronické, infekční, multisystémové onemocnění, jež vyvolávají bakterie komplexu *B. burgdorferi* s.l. Prvním typickým projevem je erythema migrans. Jedná se o červenou, koncentricky se rozšiřující skvrnu okolo místa přisátí klíštěte, která se objevuje u 80 % pacientů 1–2 týdny po nákaze (D. Sonenshine & Roe 2014). Není-li zahájena léčba antibiotiky, borrelie se mohou šířit dále po těle krevním oběhem, lymfou nebo podél nervových vláken. Zasahují srdce, klouby, centrální nervový systém a mozek (Cook 2015). Mohou se objevovat příznaky podobné chřipce (únava, bolest kloubů a svalů), artritidy, kožní, neurologické a srdeční komplikace či jejich kombinace (Krupka et al. 2007).

Imunitní odpověď na spirochéty *B. burgdorferi* s.l. byla prokázána také u psů, koček, skotu či koní, avšak nedochází u nich k rozvinutí nemoci (D. Sonenshine & Roe 2014).

1.3 Austrálie

V geologické minulosti byla Austrálie spolu s Jižní Amerikou, Afrikou, Arábií, Indií a Antarktidou součástí prakontinentu Gondwany (Obr. 3). Po oddělení od Antarktidy během paleocénu následovalo dlouhé období izolace, díky kterému se zde vyvinulo svébytné prostředí plné naprosto ojedinělých rostlinných i živočišných druhů (Culek et al. 2013).

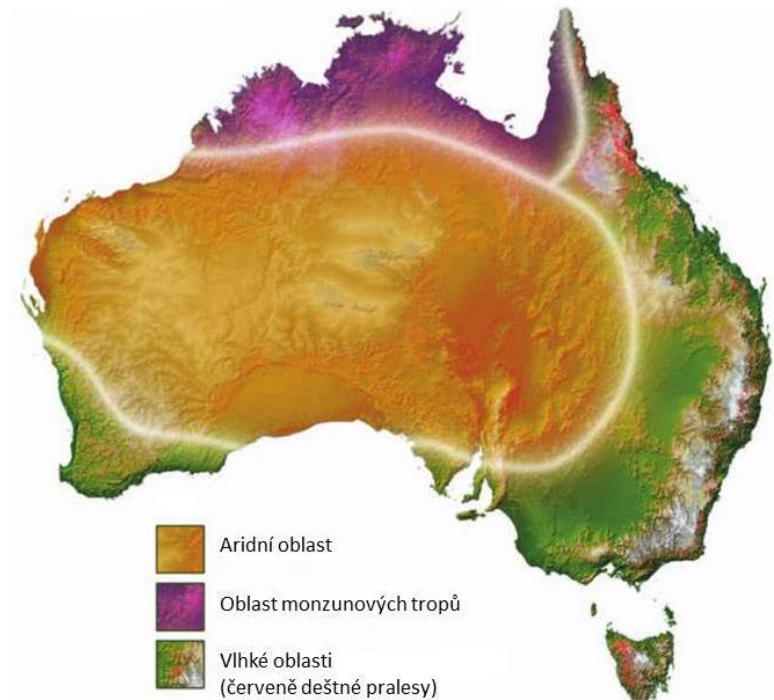


Obr. 3: Geologický vývoj. Převzato a upraveno (Historical perspective 2012).

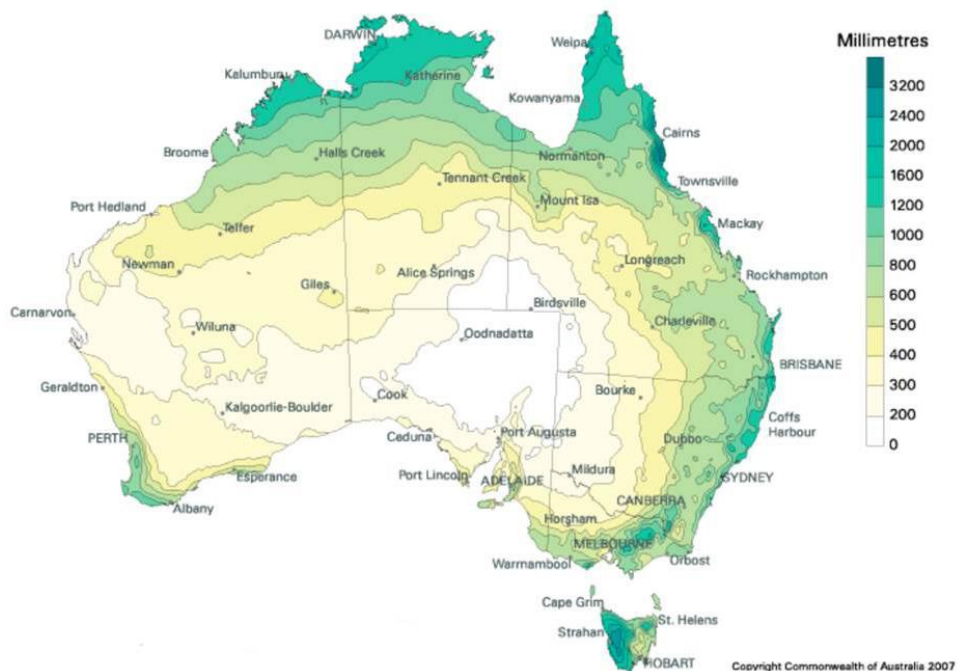
V současné době se tento nejmenší kontinent rozprostírá na jižní polokouli a zhruba v polovině jej protíná obratník Kozoroha. Největší rozlohu mají aridní, druhově chudé oblasti v centrální Austrálii (Culek et al. 2013). Mnohé důkazy však ukazují, že tato území bývala v minulosti dobře zásobená vodou a jejich vegetace se výrazně lišila od té dnešní. Na počátku kenozoika (před 65,5 miliony let) panovalo v kontinentální Austrálii teplé vlhké klima, pro něž byly charakteristické mikrotermální a mezotermální deštné lesy. Aridní oblasti se nalézaly pouze na severozápadě. Na přelomu středního a pozdního eocénu se v centrální Austrálii vyskytovaly nepřístupné sklerofytní pralesy. Nečekané ochlazení nastalo na přelomu eocénu a oligocénu, což mělo za následek pokles diverzity megatermálních krytosemenných rostlin. Chladné období bylo opět vystřídáno teplým vlhkým klimatem v časném miocénu, kdy se zde vyskytovala značná diverzita lesních typů. Prvním důležitým momentem, od kterého narůstala aridita ve středních částech Austrálie,

byla změna v pravidelném zavodňovacím režimu v západních oblastech datující se do středního miocénu. Pozdní miocén byl chladný a suchý, silně ubylo deštných lesů, které přetrvaly pouze podél východního pobřeží a v horách. Rozšířily se suché lesy spolu s křovinnou buší. Ubývání deštných lesů pokračovalo i v pliocénu, kdy se v severních oblastech začaly vyvíjet travnaté pláně a byl ustálen mírný klimatický režim. Přesto bylo množství srážek vyšší než dnes. Suché doby ledové, pro něž byly typické otevřené buše, travnaté a bylinné louky, byly střídány vlhkými dobami meziledovými. Poslední doba ledová byla obzvlášť krutá a současné klima je sušší než předchozí interglaciály (Martin 2006). Ubývání druhově bohatých deštných pralesů vedlo k odsouvání velkého množství jedinců na zbývající malá území s příhodnými podmínkami. Vznikal tak silný konkurenční tlak, docházelo ke speciaci a výrazné extinkci. Díky těmto procesům se u přeživších organismů vyvinula široká škála obranných mechanismů (Barker et al. 2014). Odhaduje se, že se v Austrálii nachází 50 % světových endemických druhů rostlin a 42 % všech endemických suchozemských obratlovců (Cresswell & Murphy 2016). Hranice, kterou tvoří Wallaceova linie, umožnila přežití vejcorodých savců (Prototheria) a vačnatců (Marsupialia) (Culek et al. 2013).

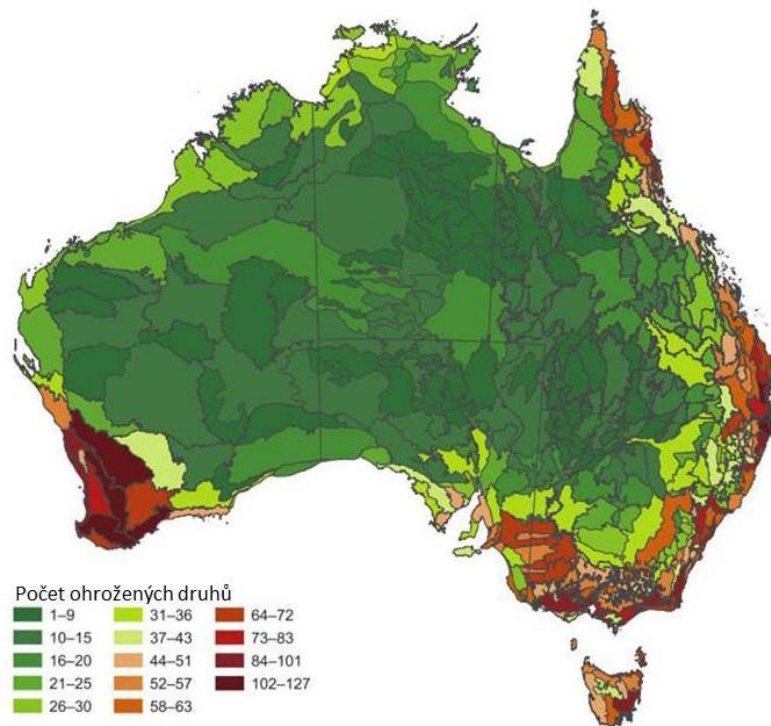
V dnešních dnech se aridní, druhově chudší oblasti rozprostírají v celé centrální a západní části kontinentu a jsou tvořeny savanami, stepními formacemi, polopouštěmi a pouštěmi (Culek et al. 2013) (Obr. 4). Ke střídání období sucha a dešťů dochází v monzunové tropické oblasti na severu Austrálie (Kimberley, Top End a Cape York Peninsula) (Morton et al. 2014). Srážkově i druhově nejbohatší jsou návětrné oblasti při pobřeží (Obr. 5). První z nich je několik desítek kilometrů úzký vlhký pás podél východního pobřeží, kde jsou postupně od severu k jihu zastoupeny všechny klimatické zóny: od tropické rovníkové po temperátní, od nížin až po alpská pásma (Culek et al. 2013). Druhou oblastí je izolovaný návětrný jihozápadní cíp. Pro obě tato místa je charakteristické husté zalidnění a velký počet rostlinných i živočišných druhů (Obr. 6).



Obr. 4: Biomy Austrálie. Nejrozšířenější aridní oblasti (oranžově), severní tropické oblasti (fialově), vlhké oblasti s tropickým a temperátním lesem (zeleně). Převzato a upraveno (Morton et al. 2014).



Obr. 5: Průměrné množství srážek v Austrálii v letech 1996–2005. Převzato a upraveno (Decadal and multi-decadal rainfall 2016).



Obr. 6: Počet ohrožených druhů v jednotlivých oblastech Austrálie. Převzato a upraveno (Morton et al. 2014).

1.3.1 Austrálie v evoluci klíšťat

Podle některých hypotéz sehrála Austrálie důležitou roli v evoluci klíšťat (Ixodida). Dobson a Barker předpokládají, že všechny tři čeledi klíšťat (Ixodidae, Argasidae, Nuttalliellidae) se vyvinuly během devonu (před 408–362 miliony lety) v části prakontinentu Gondwany, která se po oddělení stala dnešní Austrálií (Dobson & Barker 1999).

Tato teorie je založena na dvou hlavních důkazech. Za prvé, šest z osmi podčeledí klíšťat se na tomto kontinentu vyskytuje přirozeně. Jsou jimi: Amblyomminae, Argasinae, Bothriocrotinae, Haemaphysalinae, Ixodinae a Ornithodorinae. Pouze podčeď Nuttalliellidae a Rhipicephalinae původní nejsou. Zároveň z Austrálie pochází i první štěpící se linie podčeledi Ixodinae, australo-asijský rod *Ixodes*. Za druhé, za nejbližší žijící příbuzné klíšťat jsou považováni volně žijící roztoči řádu celoštítňikovci (Holothyrida), kteří jsou v Austrálii také přítomní. Avšak jsou nalézáni i v jiných částech formující se Gondwany (Barker et al. 2014).

Nicméně Mans et al. předpokládají, že počátek klíšťat (Ixodida) spadá do období karbonu (319±25 milionů let) do jihoafrické oblasti Karoo Basin (Mans et al. 2012).

1.3.2 Australské druhy klíšťat

V Austrálii bylo popsáno 70 druhů klíšťat: 14 druhů z čeledi Argasidae a 56 druhů čeledi Ixodidae (Barker et al. 2014). Čeleď Nuttalliellidae se zde pravděpodobně nevyskytuje. Zatímco je australská fauna bohatá na podčeledi klíšťat, je v porovnání s ostatními kontinenty poměrně chudá v počtu druhů, pouze 65 druhů z celkových 896 je původních (Barker & Walker 2014).

Ze všech popsanych 70 druhů jich 16 může napadat domácí zvířata a člověka. Ostatních 54 druhů parazituje pouze na divokých savcích, plazech a ptácích (Barker et al. 2014). Nejméně 12 australských druhů se vyskytuje také na Papui Nové Guinei.

Mezi nejpočetnější a také medicínsky a hospodářsky nejvýznamnější druhy patří *Ixodes holocyclus*, *Ixodes cornuatus* a *Rhipicephalus (Boophilus) australis* (Barker et al. 2014).

1.3.3 Klíšťaty přenášené patogeny v Austrálii

V současné době jsou v Austrálii známé tři klíšťaty přenášené choroby, jejichž vektorem jsou původní druhy klíšťat: Queenslandský klíštěcí tyfus, australská klíštěcí skvrnitá horečka (Flinders Island Spotted Fever) a Q horečka. Queenslandský klíštěcí tyfus a australskou klíštěcí skvrnitou horečku vyvolávají bakterie *Rickettsia australis* a *Rickettsia honei*. Přenašeči tohoto onemocnění mohou být *Bothriocroton hydrosauri*, *I. holocyclus*, a *I. tasmani*. Q horečka, kterou vyvolává *Coxiella burnetii*, byla nalezena v klíšťatech *Haemaphysalis humerosa* a *Amblyomma triguttatum* (Loh et al. 2016). Schopnost australských druhů klíšťat přenášet bakterie rodu *Borrelia* je velmi málo prostudovaná (Panetta et al. 2017).

Doposud bylo v Austrálii identifikováno 6 druhů bakterií rodu *Borrelia*. Prvním je druh *B. theileri* (Mulhearn 1946), jenž je celosvětově rozšířeným příležitostným původcem hovězí spirochetózy a jehož přenašečem je *Rhipicephalus (Boophilus) australis* (Callow & Hoyt 1961). Druhým druhem je *B. anserina* vyskytující se v drůbeži, přenášená měkkým klíštětem *Argas persicus* (Petney et al. 2004). Třetí *B. queenslandica* byla izolována z krysy (*Rattus villosissimus*) a jejím předpokládaným přenašečem je klíště *Ornithodoros gurneyi* (Carley & Pope 1962). Čtvrtým je 'Candidatus *Borrelia tachyglossi*' identifikovaný v klíšťatech *Bothriocroton concolor* a jednomu individui *I. holocyclus* sbíraných na jezuře australské (*Tachyglossus aculeatus*). Tento druh je blízké příbuzný skupině plazích borrelií a borrelií vyvolávajících RF (Loh et al. 2016).

Další dva vzdálené druhy plazích borrelií *Borrelia* sp. byly identifikované z klíštěte *Bothriocroton undatum*, které saje na volně žijících varanech (*Varanus varius*) a je v Austrálii endemické (Panetta et al. 2017).

Ani jeden z těchto 6 druhů však nespadá do komplexu *B. burgdorferi* s.l. a u žádného nebylo zaznamenáno, že by měl schopnost vyvolat Lymeskou borreliózu. Přítomnost bakterií komplexu *B. burgdorferi* s.l. na tomto kontinentu tak stále zůstává nezodpovězenou otázkou (Gofton et al. 2015).

1.4 *Ixodes holocyclus*

Klíště *Ixodes holocyclus* Neumann, 1899 je nazývané také jako australské paralytické klíště (Australian paralysis tick) či v Queenslandu jako křovinné klíště (scrub tick) (Barker & Walker 2014). V češtině má ekvivalent klíště pacifické (Kůrka 2005).

I. holocyclus patří mezi 28 australských druhů rodu *Ixodes* a je jedním ze 7 druhů z podrodu *Sternalixodes*, jež jsou všechny vázané na australský kontinent (Barker & Walker 2014). *I. holocyclus* je nejpočetnějším a také medicínsky a hospodářsky nejvýznamnějším druhem klíštěte v Austrálii.

1.4.1 Výskyt

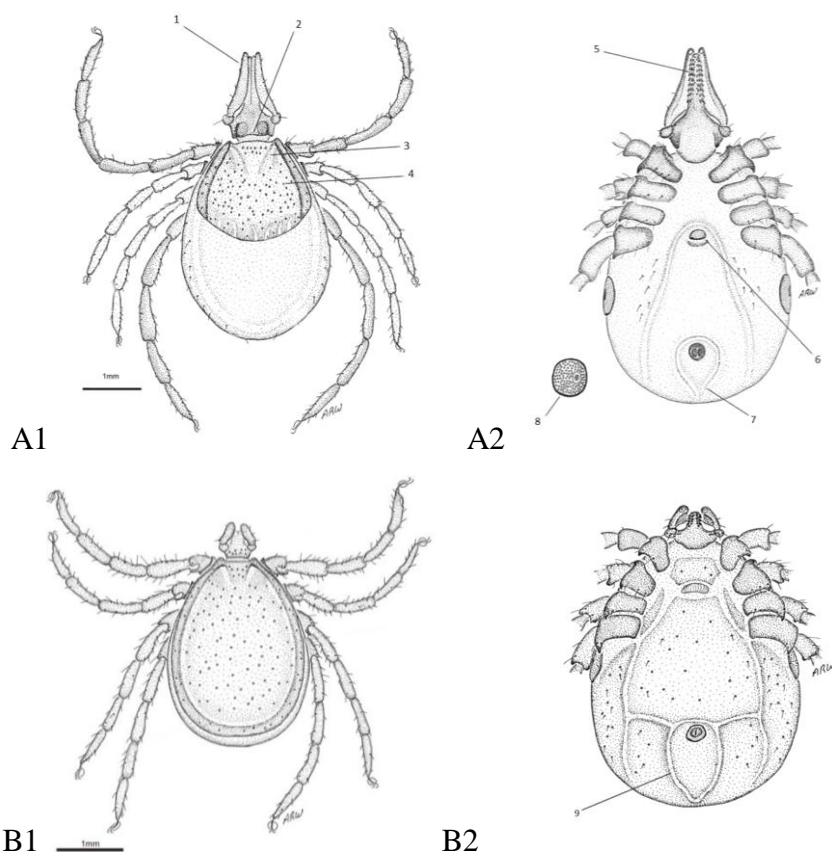
I. holocyclus se vyskytuje v pásu podél celého východního pobřeží, které je zároveň nejhustěji zalidněnou oblastí (Obr. 7). Hlavním habitatem jsou vlhké sklerofytní stálezelené lesy s vysokým úhrnem srážek a temperátní deštné lesy. V obou typech prostředí vyhledává husté bylinné a keřové patro, ve kterém je dostatečná vlhkost a početnost hostitelů (Barker & Walker 2014). Svým rozšířením zasahuje do států Queensland, Nový Jižní Wales, Victoria a Tasmánie a proniká i na přilehlé ostrovy (Barker & Walker 2014).



Obr. 7: Rozšíření klíštěte *I. holocyclus*. Převzato (Masina & Broady 1999).

1.4.2 Morfologie

I. holocyclus se řadí mezi tzv. tvrdá klíšťata (Ixodidae) (Sonenshine 1991) a vykazuje příslušné morfologické znaky (Obr. 8). Záměna je možná s blízkce příbuznými *I. cornuatus* a *I. myremcobi* či s *I. tasmani* a *I. hirsti*. *I. myremcobi* se však vyskytuje pouze v jihozápadní Západní Austrálii. Rozšíření *I. holocyclus* a *I. cornuatus* se překrývají a pouze dospělé samice jsou dobře morfologicky odlišitelné. Všechna stadia lze rozeznat geneticky srovnáním mitochondriálních (*cytochrom oxidáza I*) a jaderných (*ITS2*) sekvencí (Barker & Walker 2014). Na rozdíl od *I. tasmani* je scutum druhu *I. holocyclus* jen řídko, drobně tečkované a v zadní části zvrásněné, krční rýha je krátká. Ve srovnání s *I. hirsti* má *I. holocyclus* scutum širší než delší. Oproti *I. cornuatus* u *I. holocyclus* chybí cornua (zvlněná báze capitula). Charakteristickým znakem je kruhovitá anální rýha a zbarvení končetin. První a čtvrtý pár je tmavě hnědý, druhý a třetí béžový (Barker & Walker 2014).



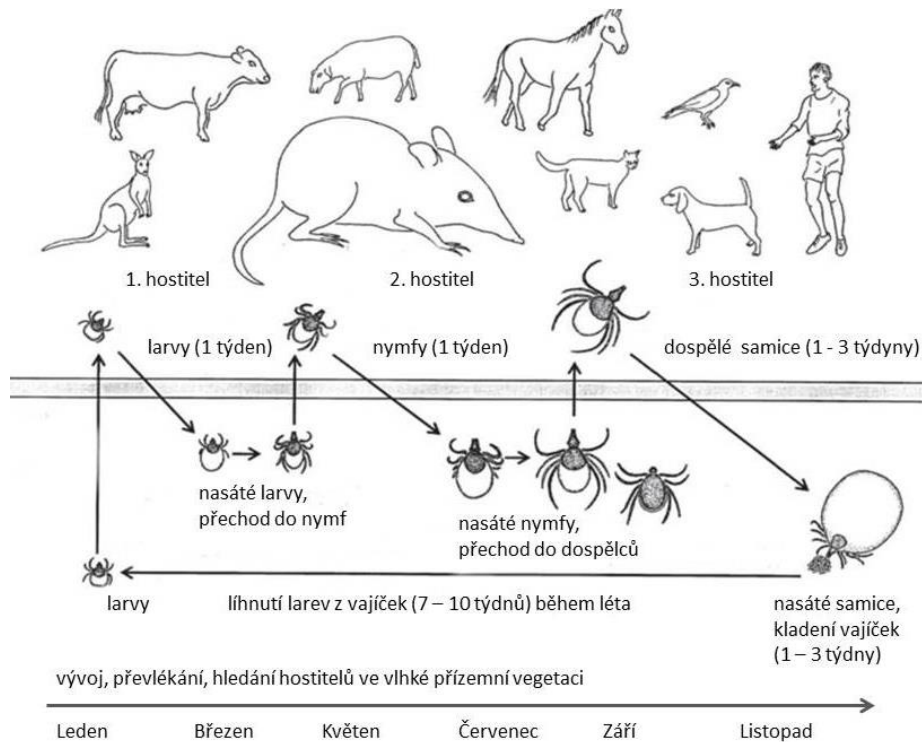
Obr. 8: Dospělci klíšťate *Ixodes holocyclus*. (A1 – samice, dorsální strana, A2 – samice, ventrální strana, B1 – samec, dorsální strana, B2 – samec, ventrální strana, 1 – palpy, 2 – cornua, 3 – krční rýha, 4 – scutum, 5 – hypostom, 6 – genitální otvor, 7,9 – anální rýha, 8 – spirakulum.) Převzato a upraveno (Barker & Walker 2014).

1.4.3 Životní cyklus

I. holocyclus se řadí mezi klíšťata s tříhostitelským životním cyklem (Obr. 9). Po 40–60 dnech se z vajíček uložených ve vlhké hrabance líhou šestinohé larvy, které šplhají na vrchol vegetace. Zde číhají na hostitele, které vnímají pomocí Hallerova orgánu na prvním páru končetin. Nejčastějšími hostiteli larev *I. holocyclus* bývají bandikuti, vačice, koaly nebo klokani. Po 4–6 dnech sání se pouští a metamorfují v osminohé nymfy, které hledají druhého hostitele. Těmi mohou být kromě původních druhů také psi, kočky nebo člověk. Nymfy sají 4–7 dní a přeměňují se v dospělé, u kterých je již možné rozlišit pohlaví. Samci jsou menší a drobnější než samice, stejně tak jejich ústní ústrojí je drobnější. Samci potravu nepřijímají, částečně ale mohou parazitovat na samici a sát její hemolymfu (Cooper & Spence 1976). Po kopulaci umírají. Samice sají na třetím hostiteli 1–3 týdny. Po dalších třech týdnech po dosátí kladou do vlhké vegetace 2500–3000 vajíček a následně umírají (Grattan-Smith et al. 1997). Délka metamorfózy jednotlivých stádií je silně ovlivněna podmínkami prostředí, zejména teplotou a vlhkostí, a dobou, za kterou je nalezen vhodný hostitel. Životní cyklus tak může trvat šest měsíců až několik let (Grattan-Smith et al. 1997).

Za hlavní hostitele se pokládají bandikut hnědý (*Isoodon macrourus*) a bandikut nosatý (*Perameles nasuta*), kteří jsou nezbytní pro udržení stabilní populace *I. holocyclus* (Doube 1975). Spektrum možných hostitelů je však mnohem pestřejší, *I. holocyclus* byl zaznamenán u 34 druhů savců a 7 druhů ptáků. Mohou jimi být další druhy bandikutů, vačice, klokani, koaly, původní i introdukovaní hlodavci, psi, kočky, drůbež, dobytek, ptáci i člověk (Barker & Walker 2014).

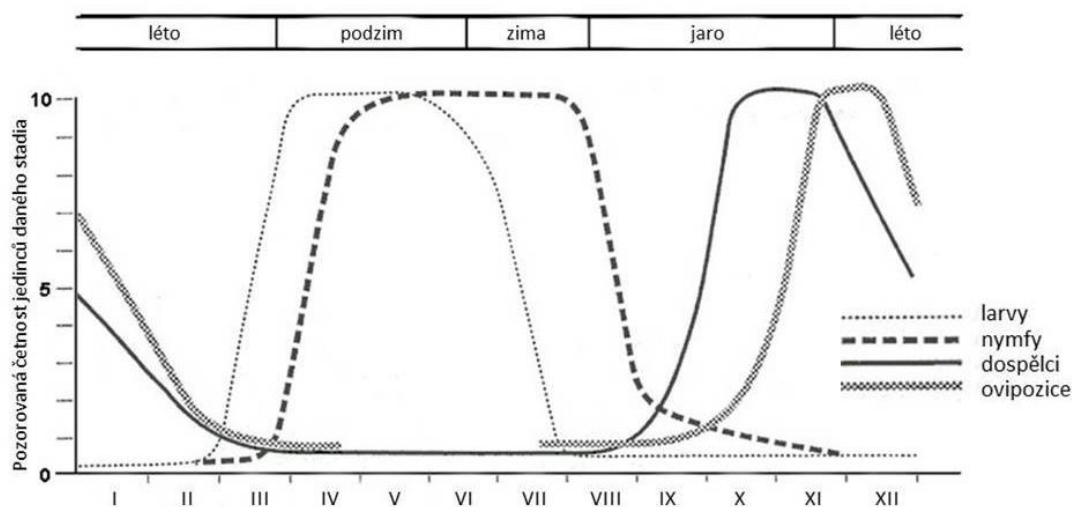
I. holocyclus nemá mnoho přirozených predátorů, mohou jimi být například hmyzožraví ptáci nebo vosy. Hlavními limitujícími faktory jsou sucho, vysoká či naopak příliš nízká teplota a nepřítomnost hostitele (Barker & Walker 2014).



Obr. 9: Životní cyklus klíštěte *I. holocyclus*. Převzato a upraveno (Barker & Walker 2014).

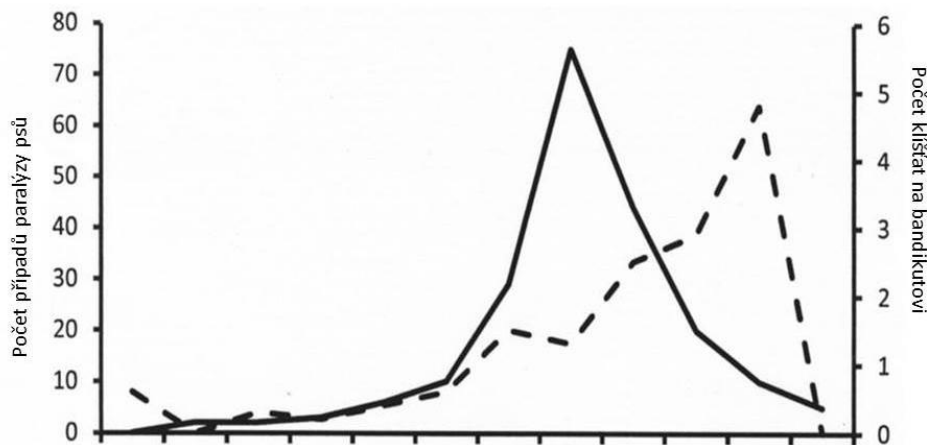
1.4.4 Sezónnost

V průběhu celého roku lze najít všechna vývojová stádia, nicméně od konce února do začátku května se objevují především larvy, od dubna do září jsou nejpočetnější nymfy, od října do prosince dospělé samice (Barker & Walker 2014) (Obr. 10).



Obr. 10: Sezónní změny v početnosti vývojových stádií klíštěte *I. holocyclus* v oblasti Pittwater severně od Sydney, 1995. Převzato a upraveno (Rees & Bear 2013).

Sezónní kolísání početnosti jednotlivých stadií klíšťat má i veterinární význam. Nejvíce případů paralýzy je zaznamenáno v září, což souvisí s vysokým výskytem snadno přehlédnutelných nymf (Obr. 11).



Obr. 11: Počet případů paralýzy u psů zaznamenaných Veterinární klinikou Queenslandské univerzity mezi lety 1970–1975 (souvislá linka) a průměrný počet dospělých samic *I. holocyclus* na jednom divokém bandikutovi v jihovýchodním Queenslandu v letech 1972–1974 (přerušovaná linka). Převzato a upraveno (Barker & Walker 2014).

1.4.5 Toxicita

Klíšťata škodí svým hostitelům nejenom sáním krve, ale mohou u nich vyvolávat další závažné zdravotní potíže – podráždění, alergie, paralýzu či toxikózu. Bylo popsáno 69 druhů klíšťat, jejichž sliny obsahují toxiny vyvolávající paralýzu hostitele. Většina z nich jsou zástupci čeledi Ixodidae, pouze 9 z nich je z čeledi Argasidae (Rodriguez-Valle, Moolhuijzen, et al. 2017). Největší škody na zdraví zvířat i lidí jsou zapříčiněny druhy *Dermacentor andersoni* a *Dermacentor variabilis* v Severní Americe, *Ixodes rubicundus*, *Rhipicephalus evertsi evertsi* a *Argas (Persicargas) walkerae* v Africe a *I. holocyclus* v Austrálii (Masina & Broady 1999). Dalšími druhy, které v Austrálii způsobují paralýzu, jsou *I. cornuatus* a *I. hirsti*. Předpokládá se, že všech sedm druhů z podrodu *Sternalixodes* může mít podobné vlastnosti (Barker & Walker 2014).

I. holocyclus vyvolává neurotoxickou klíštěcí paralýzu, která může končit až smrtí hostitele (Mayne et al. 2014). Během sání jsou slinnými žlázami produkovány toxiny působící na nervosvalových spojích hostitele, kde zabraňují sekreci neurotransmiteru acetylcholinu a způsobují tak ochabnutí svalů (Masina & Broady 1999). Bylo identifikováno

19 proteinů z multigenní rodiny tzv. holocyclotoxinů (HT) s vysoce konzervativním motivem osmi cysteinů (ICK inhibitor cystein knot). HT jsou dlouhé 68–79 aminokyselin jejich průměrná molekulová hmotnost je 5,9 kDa (Rodriguez-Valle, PauMoolhuijzenbla, et al. 2017). U 15 HT jsou známy i jejich nukleotidové sekvence.

Toxiny produkují všechna krev sající stadia. Dospělé samice způsobují obvykle silnou paralýzu. Paralýza vyvolaná nymfami má obvykle mírnější průběh (5 nymf může usmrtit laboratorní myš). Larvy mohou ojedinele způsobit paralýzu koček nebo myši, ale pouze ve větším množství (50 larev může usmrtit laboratorní myš, 200–300 larev paralyzuje kočku) (Barker & Walker 2014). Riek zjistil, že i vodný extrakt z vajíček a larev několika druhů může být toxický po injikování do laboratorních zvířat (Riek 1957). Síla působení toxinů závisí na teplotě (vyšší teplota urychluje a podporuje paralýzu), na velikosti zasaženého jedince a na jeho vrozené i získané imunitě. Odlišnosti v účincích jsou patrné i mezi jednotlivými sezónami a v jejich průběhu (Barker & Walker 2014).

Paralýza se obvykle projeví po třech dnech od přísátí klíštěte. V tuto dobu dochází u klíšťat ke zvětšování velikosti slinných žláz a vzrůstu jejich aktivity (Masina & Broady 1999). Mezi příznaky nastupující paralýzy patří svědění pokožky, slabost, zvracení, poruchy vidění a anizokorie, obtíže s mluvením a změny hlasu, ztráta chuti k jídlu, poruchy rovnováhy a pohybu, postupné ochrnutí svalů zadních a předních končetin a následně všech svalů těla. Smrt je způsobena zástavou dechu kvůli ochabnutí dýchacích svalů (Barker & Walker 2014). U člověka může mimo jiné vyvolat akutní anafylaktický šok. Projevy paralýzy se mohou zhoršit 24–48 hodin po odstranění klíštěte. Přesto, je-li tento zákrok proveden v čas, je možné plné zotavení. To je však pomalé a trvá několik týdnů (Barker & Walker 2014).

Nejčastěji bývají zasaženi psi, kočky, ovce, dobytek či drůbež. Postihováni bývají i ptáci a původní placentální savci. U přirozených hostitelů, bandikuta hnědého (*Isoodon macrourus*) a bandikuta nosatého (*Perameles nasuta*), se pravděpodobně vyvinula získaná imunita vůči neurotoxinům. Bez obtíží přežívají i větší počet sajících jedinců (Masina & Broady 1999). Tuto domněnku potvrzují i pokusy, při kterých byli bandikuti chyceni a drženi v zajetí. Pokud nebyly v kontaktu s klíšťaty, postupem času se jejich odolnost vůči toxinům snižovala (Masina & Broady 1999). U psů je možné vytvořit imunitu vůči HT pravidelným vystavováním postupně se zvyšující dávce těchto látek (Clunies-Ross 1935).

V současné době probíhá léčba paralýzy pomocí polyklonálního psiho antiséra. Nicméně tato metoda je drahá a účinná pouze v rané fázi paralýzy (Masina & Broady 1999). U lidí

navíc může psí antisérum vyvolávat alergické reakce, a proto se využívá pouze ve vážných případech u dětí (Barker & Walker 2014).

1.4.6 Hospodářský význam

I. holocyclus způsobuje značné ekonomické ztráty a je jednou z nejčastějších příčin úmrtnosti domestikovaných a hospodářských zvířat ve východní Austrálii (Masina & Broady 1999). Odhaduje se, že každým rokem je v Austrálii touto paralýzou postiženo 10 000–100 000 domestikovaných zvířat a 10 % jí podlehne (Atwell et al. 2001; Grattan-Smith et al. 1997)(Grattan-Smith et al. 1997)(Grattan-Smith et al. 1997).

Do roku 1999 bylo zaznamenáno 20 smrtelných případů paralýzy u lidí (Masina & Broady 1999). Každoročně je však hlášeno mnoho pacientů s příznaky paralýzy. Zvláště ohrožené jsou děti (Barker & Walker 2014).

1.4.7 Přenos patogenů klíštětem *I. holocyclus*

Navzdory širokému rozšíření klíštěte *I. holocyclus* je spektrum patogenů, pro něž se může stát vektorem, dosud málo prozkoumané. Byl prokázán přenos bakterií *R. australis* a *R. honei*, které u lidí způsobují Queenslandský klíštěcí tyfus. Jedná se obvykle o mírnou nemoc, avšak bylo zaznamenáno i jedno úmrtí. Mezi příznaky patří malátnost, nevolnost, zvětšení mízních uzlin, makulopapulární vyrážka, lehký kašel, bolest svalů, zimnice a horečka. Výskyt nemoci odpovídá areálu rozšíření klíštěte *I. holocyclus* (Barker & Walker 2014).

Doposud nebyl u klíštěte *I. holocyclus* zjištěn výskyt ani přenos virů (Russell 1995).

Často diskutovanou otázkou je schopnost přenosu bakterií komplexu *Borrelia burgdorferi* s.l., původců Lymeské borreliózy (Gofton et al. 2015). Každým rokem se ve východní Austrálii objevuje řada pacientů se symptomy připomínajícími Lymeskou borreliózu, avšak doposud se nikomu nepodařilo dát tyto příznaky do přímé souvislosti se sáním klíšťat *I. holocyclus* (Mayne et al. 2014).

1.5 Membránové sání

Chov klíšťat se neobejde bez vhodných hostitelů. Nicméně krmení na laboratorních zvířatech může být obtížně proveditelné, nákladné a eticky problematické. S rozvojem nových technologií proto roste snaha o vývoj vhodné alternativní metody. *In vitro* sání využívající umělých membrán se jeví jako vhodnou možností, která navíc umožňuje hlubší porozumění procesu sání a přenosu patogenů. Další výhodou jsou malé provozní náklady, snadná manipulace, možnost standardizace, přesné vymezení složení potravy a okolních podmínek (Kröber & Guerin 2007). V průběhu celého sání je možné přesně definovat složení potravy a sledovat látky, které jsou do ní sekretovány klíšťaty.

V historii, datující se od 50. let 20. století, bylo k výrobě membrán využíváno různých materiálů (Kröber & Guerin 2007). Byly jimi například Parafilm® (Hokama et al. 1987), vaječné membrány kuřecího embrya (Pierce & Pierce 1956), dobytčí kůže (Kemp et al. 1975), střevo (Waladde et al. 1991) nebo silikonová membrána (Habedank & Hiepe 1993). Roku 1995 na poslední zmíněné membráně dokázali Kuhnert et al. dokončit celý životní cyklus klíštěte *Amblyomma hebraeum* (Kuhnert et al. 1995). Kröber & Guerin uzpůsobili silikonovou membránu pro klíště *I. ricinus*, které má v porovnání s předchozím druhem kratší hypostom (Kröber & Guerin 2007).

K úspěšnému přichycení a dosátí je třeba náležitých chemických a fyzických stimulů, membrány z odolných a elastických materiálů, vhodné výživy, odpovídající teploty (37 °C) a vlhkosti prostředí (Kröber & Guerin 2007). Tyto faktory se liší v závislosti na druhu klíštěte, jeho vývojovém stádiu či zkoumaném problému.

2 Cíle práce

1. Zavedení laboratorního chovu klíštěte *I. holocyclus* a popis jeho životního cyklu.
2. Testování schopnosti přenášet původce Lymeské borreliózy.
3. Identifikace a charakterizace paralytických neurotoxinů.

3 Materiál a metody

3.1 Laboratorní zvířata

Dospělé, již nasáté samice *I. holocyclus* byly získány prostřednictvím profesora Jana Šlapety z Univerzity v Sydney. Sběry probíhaly v listopadu roku 2016 ve volné přírodě v okolí Sydney.

Pro krmení larev klíšťat a pro testování přenosu borrelií bylo využito laboratorních, imbredních myší BALB/c.

Se všemi laboratorními zvířaty bylo během experimentů zacházeno podle zákona České národní rady č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání.

3.2 Chov klíšťat

V laboratorních chovech Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd v Českých Budějovicích byla všechna vývojová stadia chována ve skleněných vialkách, v boxu se stálou vzdušnou vlhkostí (95 %), teplotou (23 °C a 28 °C) a fotoperiodou (14h den, 10h noc).

Dospělé, nasáté samice byly ponechány klást při teplotě 23 °C. Vajíčka byla následně přenesena do teploty 28 °C.

Larvy sály na laboratorních myších BALB/c v plastových, uzavíratelných komůrkách, připevněných na vyholená záda zvířete, a to v počtu 5, 10, 15, 20 či 25 jedinců na myš. Plně nasáté larvy byly následně rozděleny do dvou skupin chovaných při rozdílných teplotách (23 °C a 28 °C).

Nymfy a dospělce nebylo možné krmit na laboratorních zvířatech kvůli produkci paralytického neurotoxinu. Tato stadia byla krmena *in vitro* na umělých membránách.

U všech vývojových stadií (larva, nymfa, dospělec) byla měřena doba sání, hmotnost nenasátých a plně nasátých jedinců a délka metamorfózy. Hmotnost byla zjišťována na laboratorních vahách Sartorius CPA225D – OCE (Sartorius Weighing Technology GmbH, Německo).

Údaje o délce sání nymf a dospělých samic klíštěte *I. ricinus* a o jejich výsledné hmotnosti byly převzaty od Zuzany Zemanové (Zemanová 2018).

3.3 Membránové sání

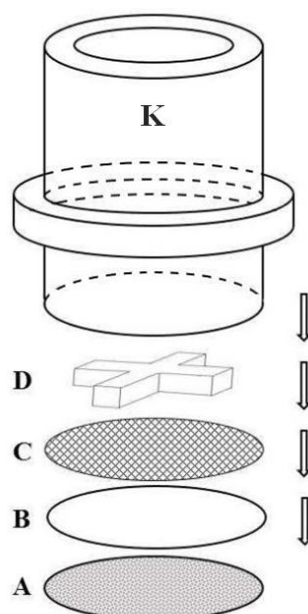
Nymfy a dospělé nebylo možné nechat sát na laboratorních zvířatech kvůli produkci paralytického neurotoxinu. Pro jejich krmení bylo proto využito metodiky vycházející z publikovaného protokolu in vitro krmení klíšťat *I. ricinus* (Kröber & Guerin 2007) s mírnými úpravami podle Pernerera a Kučery (Perner et al. 2016; Kučera 2015).

3.3.1 Příprava hovězího parfému

K 50 g kravských chlupů bylo přidáno 250 ml dichlorometanu (DCM) a stálým třepáním po dobu 20 minut při pokojové teplotě byly extrahovány lipidové sloučeniny. Následně byla odebrána horní polovina roztoku. Spodní část byla smíchána se 100 ml nového DCM a opět protřepávána 20 min. Celý proces byl dvakrát zopakován. Výsledný roztok byl přefiltrován a jeho koncentrace byla zjišťována vážením pevného podílu po odpaření 1 ml roztoku (Kučera 2015).

3.3.2 Příprava krmítek

Krmící komůrky byly připraveny podle publikovaného protokolu (Kröber & Guerin 2007), pouze sklo bylo nahrazeno plastem (Miroslav Kubík – Plexi, České Budějovice). Pro přípravu 10 membrán bylo smícháno 15 g silikonu ELASTOSIL E4 (Wacker, Německo), 5 g silikonového oleje DC 200 (Sigma-Aldrich, USA), 0,15 g barevné pasty (Wacker) a 2,9 g n-hexanu (VWR chemicals, Velká Británie). Směs byla špachtlí nanášena v tenké vrstvě na papírky pro čištění optických čoček (Tiffen, Kanada) a přes noc ponechána zaschnout. Membrány s tloušťkou 60–100 μm byly umístěny na spodní okraj krmících komůrek a přečnívající okraje byly seříznuty. Pro lepší přichycení klíšťat byla na membránu připevněna mřížka a plastový kříž ke zmírnění pružnosti (Obr. 12). Membrány byly napuštěny hovězím parfémem (Kučera 2015).



Obr. 12: Stavba krmící komůrky. A – papírek k čištění optiky, B – silikonová membrána, C – plastová mřížka, D – plastový kříž, K – krmící komůrka. Převzato a upraveno (Kučera 2015).

3.3.3 Příprava krve

Hovězí krev byla získána na jatkách v Jihočeské masně s.r.o., v Českých Budějovicích. Krev byla zchlazena na ledu a ručním mícháním defibrinována. Zbylý fibrinogen byl odstraněn filtrací přes sterilní plastové síto. Krev byla obohacena sterilní glukózou, jejíž konečná koncentrace byla 2 g/l, a skladována při 4 °C.

3.3.4 Krmný roztok

Jedna jamka v krmítku obsahovala 3,1 ml hovězí defibrinované krve, 31 μ l adenosin trifosfátu (konečná koncentrace 1 mM), 3,1 μ l gentamicinu (konečná koncentrace 5 μ m/ml) a 3,1 μ l nystatinu (100 jednotek/ml) (Kröber & Guerin 2007), (Perner et al. 2016).

3.3.5 Průběh krmení

Krmné komůrky byly umístovány do destiček s šesti jamkami naplněnými obohacenou krví. Krmítko byla po celou dobu sání inkubována ve vodní lázni s teplotou 37 °C. Do jedné komůrky bylo první den umístěno 10–15 dospělých samic. Druhý den k nim byli přidáni samci v počtu odpovídajícím počtu přisátých samic a případně i nymfy. Krev byla měněna

každých 12 hodin a destičky byly před každým dalším použitím vymyty saponátem, etanolem (70%) a sterilizovány UV světlem. Komůrky byly před umístěním do čerstvého roztoku očišťovány sterilním fyziologickým roztokem (0,9% NaCl). Plně nasátí jedinci byli zváženi a uloženi do boxu se stálou teplotou (28 °C) a vlhkostí (95 %).

3.4 Nákaza myši a klíšťat borreliemi

Kultura *Borrelia afzelii* CB43 byla kultivována 5–7 dní v BSK-H mediu (Barbour-Stoenner-Kelly H medium, Sigma-Aldrich) při teplotě 33 °C. Laboratorním myším BALB/c bylo pod kůži inokulováno 100 µl narostlé kultury (10^7 spirochét). Úspěšnost nákazy byla ověřena po třech týdnech pomocí PCR detekce borrelií v biopsii ucha. Poté byly na myši nasazeny larvy v počtu 5, 10, 15, 20 či 25 jedinců na myš. Plně nasáté larvy byly sesbírány a uloženy běžným způsobem do chovných boxů. Přítomnost spirochét byla zjišťována v larvách ihned po dosátí a poté v týdenních intervalech pomocí PCR.

3.5 Společné sání larev *I. holocyclus* a *I. ricinus* – cofeeding

Bylo testováno, zdali se zvýší podíl nakažených larev *I. holocyclus* v případě společného sání nenakažených larev *I. ricinus*. Na dvě infikované myši BALB/c byly do společné komůrky nasazeny larvy *I. holocyclus* a *I. ricinus* v přibližném poměru 1:1. Přítomnost borrelií v plně nasátých larvách obou druhů ihned po dosátí byla zjišťována pomocí PCR.

3.6 Identifikace a charakterizace paralytických neurotoxinů

U nymf klíštěte *I. holocyclus* byla sledována míra exprese genů pro holocyclotoxiny HT1–HT15 v průběhu 3 dnů sání na myších BALB/c. Z nenasátých nymf a poté z nymf po 1, 2 a 3 dnech sání byla izolována RNA (5 nymf na vzorek) a převedena do cDNA. Pro geny toxinů HT1–HT15 byly navrženy genově specifické primery, které byly ověřeny pomocí PCR. Pro geny toxinů, jejichž exprese byla prokázána, byly vypracovány expresní profily pomocí qPCR.

3.7 Molekulární techniky

3.7.1 Izolace DNA

Izolace DNA z klíšťat a myších tkání probíhala podle stanoveného protokolu laboratorního kitu NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel, Germany).

3.7.2 PCR

K detekci borrelií byla využita PCR, kdy byl amplifikován úsek genu pro flagellin. Reakční směs obsahovala 12,5 µl FastStart PCR MasterMix (Roche, Švýcarsko), 10 pmol FlaF1A primeru, 10 pmol FlaR1 primeru (Tab. I), 4 µl DNA, 6,5 µl PCR vody. Amplifikační program byl zahájen denaturací při 96 °C po dobu 10 min, následovalo 40 cyklů sestávajících z denaturace při 94 °C 30 s, hybridizace při 60 °C 30 s a elongace při 72 °C 40s. Program byl zakončen 7min inkubací při 72 °C.

Tab. I: Primery k detekci borrelií.

	Název	Sekvence 5'→3'	Velikost produktu	Zdroj
<i>Borrelia</i> flagellin	FlaF1A	AAGCAAATTTAGGTGCTTTCCAA	154 bp	Schwaiger et al. 2001
	FlaR1	GCAATCATTGCCATTGCAGA		

3.7.3 Gelová elektroforéza

K vizualizaci PCR produktů bylo využito gelové elektroforézy. Vzorčky byly smíchány s DNA 6x Loading Dye (Top-Bio, Česká republika) a naneseny na 2% agarózový gel obohacený o Ethidium bromid (Sigma-Aldrich). Elektroforéza probíhala v 1x TAE pufru při napětí 100 V po dobu 20 minut. Pro kontrolu velikosti produktů byl do první jamky aplikován DNA Ladder (Thermo Scientific, USA).

3.7.4 Izolace RNA a přepis do cDNA

Izolace RNA z klíšťat probíhala podle stanoveného protokolu laboratorního kitu NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel, Německo). Koncentrace získané RNA byla měřena na spektrometru NanoDrop™ 1000 (NanoDrop, USA).

K reverzní transkripci byl použit 1 µg vyzolované RNA, který byl přepsán do cDNA za využití kitu Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche).

3.7.5 Kvantitativní PCR

Relativní exprese paralytických neurotoxinů byla stanovena pomocí kvantitativní Real-time PCR. Reakční směs pro každý vzorek obsahovala 12,5 µl FastStart Universal SYBR Green Master, Rox (Roche), 10 pmol F-primeru, 10 pmol R-primeru (Tab. II), 5 µl cDNA (10x zředěné), 5,5 µl PCR vody. Kvantitativní PCR probíhala v přístroji LightCycler® 480 (Roche) podle programu, který se skládal z preinkubace (95 °C / 10 min) a následné amplifikace probíhající v 50 cyklech (denaturace 95 °C / 10 s, hybridizace 60 °C / 10 s a elongace 72 °C / 10 s. Poté byla vykreslena křivka tání (95 °C / 5 s, 65 °C / 1min, 97 °C /do konce). Program byl zakončen zchlazením na 40 °C / 30 s. Referenčním genem pro normalizaci testovaných vzorků byl gen pro klíčecí aktin (Tab. II). Primery pro holotoxiny byly navrženy v programu Primer3 (v. 0.4.0) (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>). Vzájemné podobnosti genů byly ověřeny pomocí programu BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tab. II: qPCR primery pro identifikaci a kvantifikaci paralytických neurotoxinů.

Toxin	GenBank kód	Sekvence 5'→3'	Velikost produktu	Zdroj
HT1	AY766147	GCACTGGTCCTGCTCCTACT	79 bp	Tato práce
		AGCACTTAGCGTTGCACCTT		
HT2	KP096302	GTAATGACCCGTGCCGTACT	81 bp	
		TTTGGCATAAGACCAAACCA		
HT3	KP096303	GGCAGACGGAAGTGTAAATCAA	114 bp	
		TCCCAGGGGATAAGTACACG		
HT4	KP963966	TGTACCAAACCCGGAAAAAG	116 bp	
		ACTTCGCATGTTTTGCAGTG		
HT5	KP096304	ATGGTGAGGAGCACGACAAT	86 bp	
		TTTGCAGTAACCTACTGTTTTTCC		
HT6	KP096305	AAACGGAAGTGTAAATGCCGAC	100 bp	
		ACGTGCATTTTTGGCATAAG		
HT7	KP096306	GACGGAAGTGTAAATGACCCG	98 bp	
		CGTGCATTTTTGGCATAAGA		
HT8	KP096307	CGAAAATCTTCCTCTGCACG	93 bp	
		ACTCAGCGTTGCACCTTTTT		
HT9	KP096308	GGCAGACGGAAGTGTAAATCAA	114 bp	
		TCCCAGGGGATAAGTACACG		
HT10	KP096309	GACCCACTCGCGATTTCCGGC	82 bp	
		TGTTTACAGTAAGCTCCACCTTTG		
HT11	KP096310	AGAACGGTTTCGCGTGCAG	93 bp	
		AATTGTGAGTCGGTCCATCC		
HT12	KP963967	TCTTCGCACTCATCATCCTG	105 bp	
		TGCAGTCGCAGTGTGTGTAG		
HT13	KP963968	GTGGCGGCTACAGTTGTCTC	121 bp	
		CGCAATCGCAGTGTGTGTAG		
HT14	KP963969	ATTATCTTGCCATCGTTTCG	119 bp	
		CCAAAATCATGTGCCTTTCC		
HT15	KP963970	TCGTTTTGGCCATTGTTTCAG	119 bp	
		CCAAAATCGTGTGCCTTT		
Klíšťačí aktin	AJ889837	CGACATCAAGGAGAAGCTCTG	103 bp	
		GTCGGGAAGCTCGTAGGAC		

3.8 Statistická analýza

Analýza dat probíhala v programu Microsoft Excel a následná tvorba grafů v programu GraphPad Prism 6 (verze 6.01 pro Windows, GraphPad Software, USA). Chybové úsečky v grafech znázorňují standardní chybu průměru (SEM).

4 Výsledky

4.1 Zavedení laboratorního chovu klíštěte *I. holocyclus*

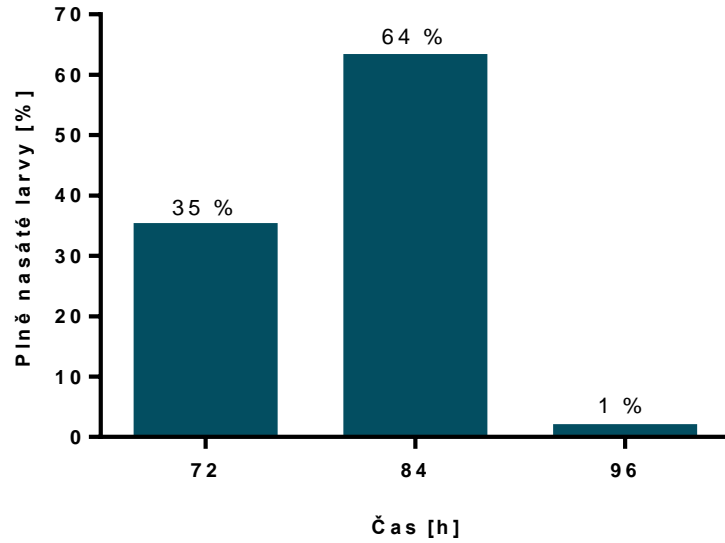
4.1.1 Larvy

Dvě dospělé, nasáté samice *I. holocyclus* zaslané v listopadu roku 2016 z Austrálie byly uloženy do boxu se stálými podmínkami. Po uplynutí 1–2 týdnů začaly klást vajíčka.

Vajíčka byla zpočátku inkubována při teplotě 23 °C po dobu 7 týdnů. Poté byla teplota zvýšena z 23 °C na 28 °C, což iniciovalo líhnutí larev (Obr. 13a). První larvy se objevily 9 týdnů po naklazení vajíček. Po 3 týdnech od vylíhnutí byly larvy nasáty na myších (Obr. 13b). Délka sání larev byla 72–84 hodin (Obr. 14). Během této doby na myších nebyly pozorovány žádné příznaky paralýzy.



Obr. 13: Larvy *I. holocyclus*. Nenasátá larva (A), nasátá larva (B).

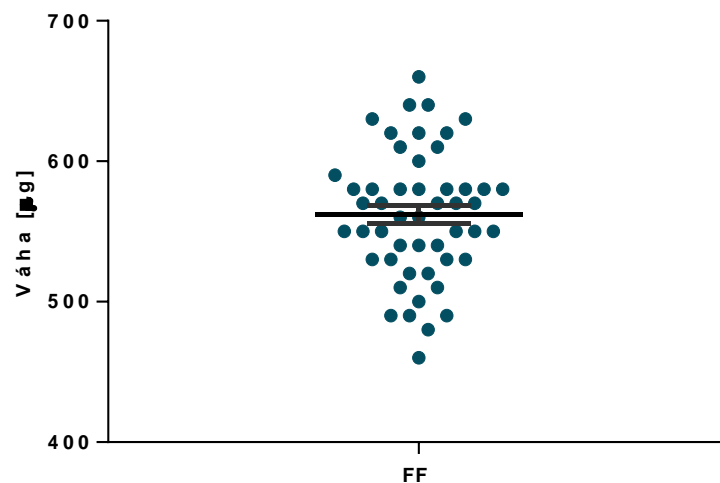


Obr. 14: Délka sání larev *I. holocyclus* na laboratorních myších BALB/c.

Průměrná váha plně nasátých larev byla $562 \mu\text{g} \pm 6,5 \mu\text{g}$. Podrobněji jsou získané hodnoty hmotnosti zaznamenány v tabulce (Tab. III) a v grafu níže (Obr. 15).

Tab. III: Hmotnost plně nasátých (FF) larev *I. holocyclus*.

	m [μg]					
	průměr	medián	min	max	SD	SEM
FF larvy	562	565	460	660	46	6,5



Obr. 15: Hmotnost plně nasátých (FF) larev *I. holocyclus*. (Chybová úsečka znázorňuje SEM.)

Larvy byly následně rozděleny na dvě skupiny chované při rozdílných teplotách (23 °C a 28 °C). Vyšší teplota urychlila vývoj a zkrátila dobu potřebnou k přechodu do dalšího stadia. Z larev držných při 23 °C se nymfy začaly líhnout po 28 dnech, z larev z 28 °C po 21 dnech.

4.1.2 Nymfy

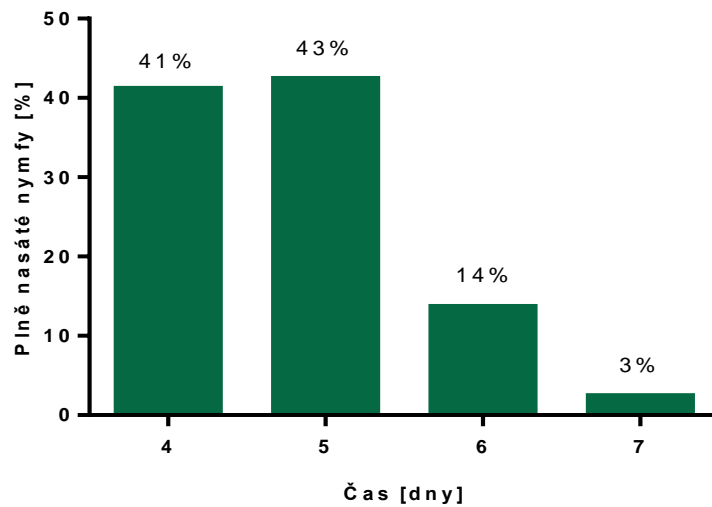
Nymfy (Obr. 16a) byly po 4 týdnech od vylíhnutí zváženy a dány sát na myši v počtu 5 či 10 jedinců. Po dvou dnech sání se u myši začala projevovat paralýza, jejíž intenzita se v průběhu třetího dne stupňovala, pokus byl proto ukončen. Z důvodu rychlého nástupu paralýzy u laboratorních zvířat bylo v následujících experimentech využito umělých krmítek (Obr. 17), kde nymfy sály do plného dosátí 4 až 7 dní (Obr. 16b, 18).



Obr. 16: Nymfy *I. holocyclus*. Nenasátá nymfa (A), nasátá nymfa (B).



Obr. 17: Nymfy a dospělec *I. holocyclus* sající na umělé membráně.

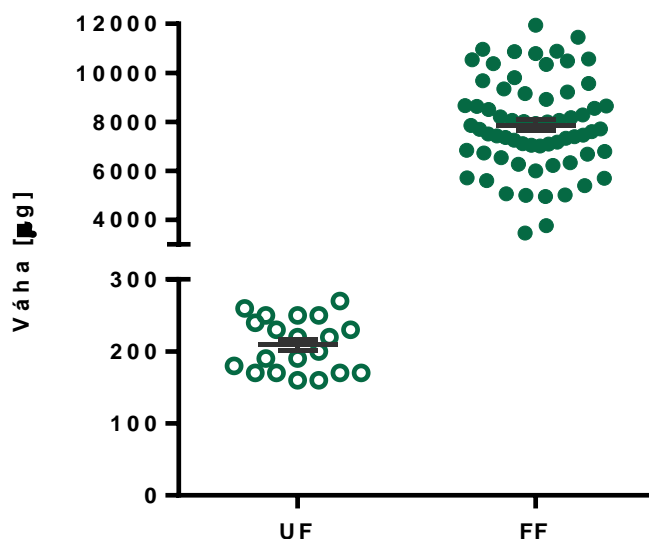


Obr. 18: Doba sání nymf *I. holocyclus* na umělých membránách.

Dosáté nymfy byly zváženy a rozděleny na dvě skupiny, chované při rozdílných teplotách (23 °C a 28 °C). Naměřené hmotnosti nenasátých i plně nasátých nymf byly zaneseny do tabulky (Tab. IV) a grafu (Obr. 19). Průměrná váha nenasátých nymf byla $209 \mu\text{g} \pm 8 \mu\text{g}$, průměrná váha plně nasátých nymf byla $7861 \mu\text{g} \pm 225 \mu\text{g}$. Během sání se jejich průměrná hmotnost zvýšila 38x.

Tab. IV: Průměrná hmotnost nenasátých (UF) a plně nasátých (FF) nymf *I. holocyclus*.

	m [μg]					
	průměr	medián	min	max	SD	SEM
UF nymfy	209	210	160	270	37	8
FF nymfy	7861	7780	3470	11950	1857	225
zvětšení	38x					



Obr. 19: Hmotnost nenasátých (UF) a plně nasátých (FF) nymf *I. holocyclus*. (Chybová úsečka znázorňuje SEM.)

4.1.3 Dospělci

Doba potřebná k metamorfóze nymf v dospělé (Obr. 20) se lišila v závislosti na teplotě podobně jako u larev. Vývoj ve 28 °C trval 23 dní, ve 23 °C se doba prodloužila na 27 dní.

Po jednom měsíci od převlečení byli dospělci zvázeni a nasazeni na umělé membrány (Obr. 21). K páření samců a samic docházelo jak ve skleněných chovných boxech před sáním, tak i na krmítku v průběhu sání. Délka sání samic byla 6–11 dní (Obr. 22, 23).



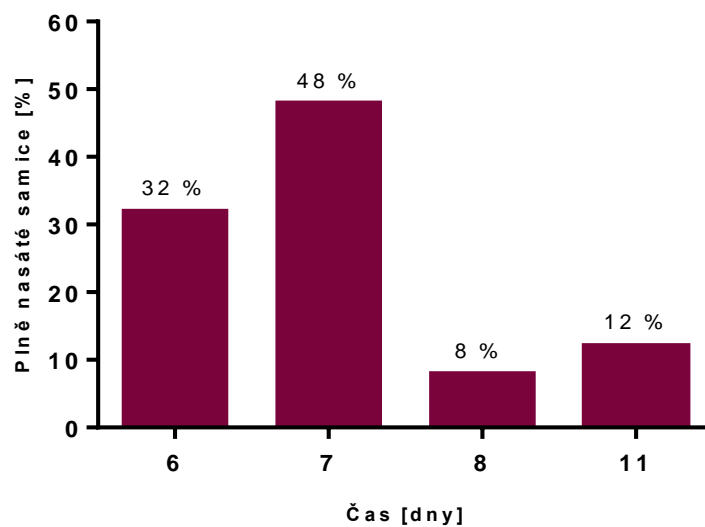
Obr. 20: Dospělci *I. holocyclus*. Samec (A), nenasátá samice (B).



Obr. 21: Dospělci *I. holocyclus* sající na umělé membráně.



Obr. 22: Plně nasátá dospělá samice klíštěte *I. holocyclus*.

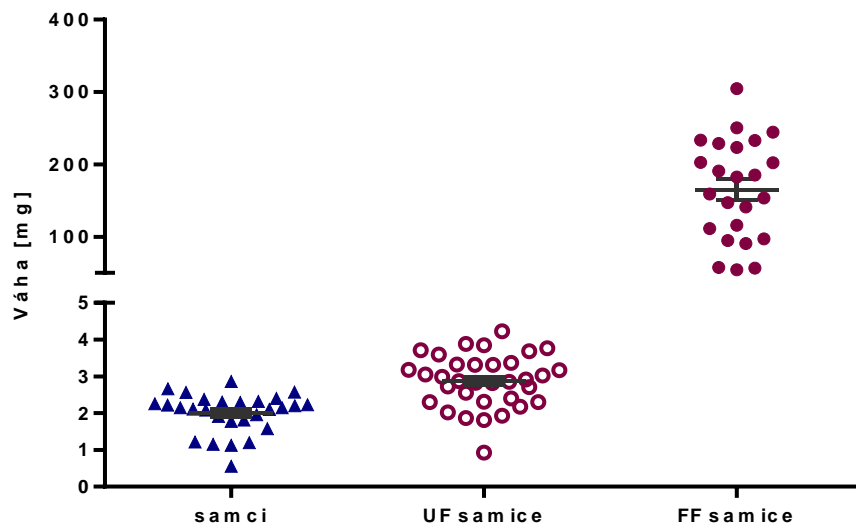


Obr. 23: Délka sání dospělých samic *I. holocyclus* na umělých membránách.

Naměřené hmotnosti jsou zaneseny v tabulce (Tab. V) a grafu (Obr. 24). Průměrná váha samců byla $2,0 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$. Průměrná váha samic byla před nasátím $2,9 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg}$ a po nasátí $165,0 \text{ mg} \pm 14,2 \text{ mg}$. Průměrná hmotnost dospělých samic se po nasátí zvýšila 57x.

Tab. V: Hmotnosti nenasátých (UF) a plně nasátých (FF) dospělců *I. holocyclus*.

	m [μg]					
	průměr	medián	min	max	SD	SEM
samci	2,0	2,2	0,6	2,9	0,5	0,1
UF samice	2,9	2,9	0,9	4,2	0,7	0,1
FF samice	165,0	170,9	54,3	304,9	69,5	14,2
zvětšení samic	57x					



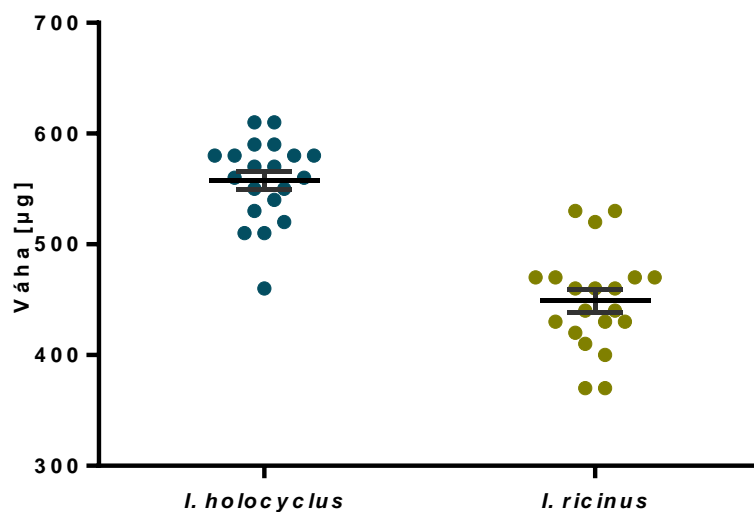
Obr. 24: Hmotnost dospělců *I. holocyclus*. (UF - nenasáté samice, FF - plně nasáté samice, chybová úsečka znázorňuje SEM.)

Na umělých membránách se podařilo nakrmit 25 samic, které byly uloženy do 23 °C. Ovipozice nastala 11. až 22. den po dosátí. Počet vajíček se v jednotlivých snůškách pohyboval od 500 do 1000. Snůšky byly uchovávány při dvou různých teplotách (23 °C a 28 °C). Vajíčka umístěná ve 23 °C zčernala a nevyklíhly se z nich žádné larvy. Vajíčka držená v teplotě 28 °C pouze lehce ztmavla a po 50 dnech se z nich začaly líhnout larvy, jejichž konečný počet byl v řádu stovek.

4.2 Srovnání *I. holocyclus* a *I. ricinus*

4.2.1 Larvy

Průměrná váha plně nasátých larev *I. holocyclus* byla ve srovnání s klíštětem *I. ricinus* 1,3x vyšší (Obr. 25, Tab. VI).



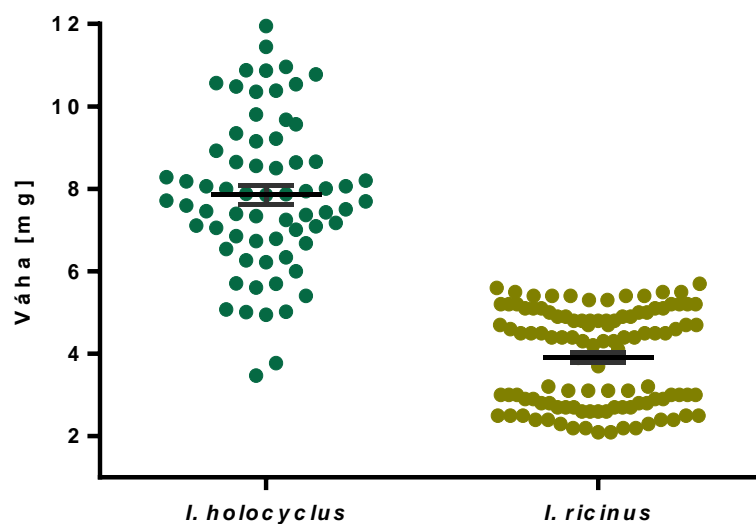
Obr. 25: Srovnání hmotnosti plně nasátých larev *I. holocyclus* a *I. ricinus*. (Chybová úsečka znázorňuje SEM.)

Tab. VI: Srovnání hmotnosti plně nasátých larev *I. holocyclus* a *I. ricinus*.

	m [µg]			
	průměr	median	min	max
<i>I. holocyclus</i>	562	565	460	660
<i>I. ricinus</i>	449	450	370	530

4.2.2 Nymfy

Průměrná váha plně nasátých nymf *I. holocyclus* byla ve srovnání s klíšťětem *I. ricinus* 2x vyšší (Obr. 26, Tab. VII). U nasátých nymf *I. ricinus* bylo dobře patrné rozdělení do dvou hmotnostně odlišných kategorií. Klíšťata s nižší hmotností odpovídala samcům, klíšťata s vyšší hmotností odpovídala samicím. U nymf *I. holocyclus* nebylo možné rozlišit samce a samice na základě hmotnosti.



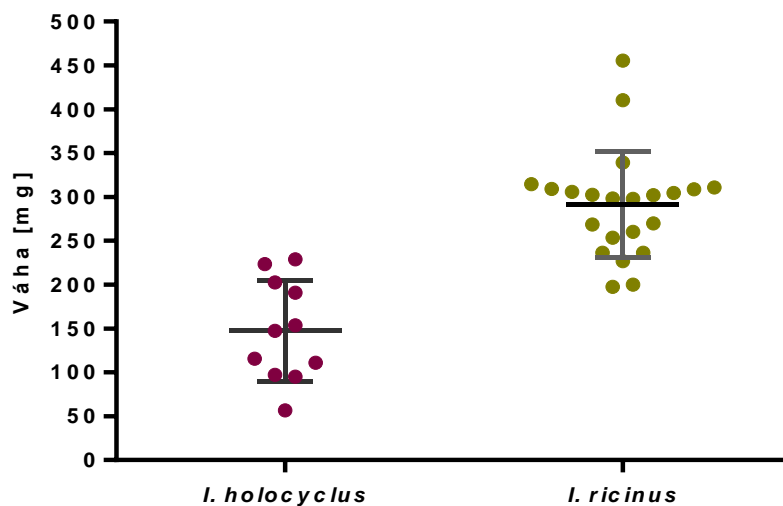
Obr. 26: Srovnání hmotnosti plně nasátých nymf *I. holocyclus* a *I. ricinus*. (Chybová úsečka znázorňuje SEM.)

Tab. VII: Srovnání hmotnosti plně nasátých nymf *I. holocyclus* a *I. ricinus*.

	m [mg]			
	průměr	median	min	max
<i>I. holocyclus</i>	7,9	7,8	3,5	12,0
<i>I. ricinus</i>	3,9	5,4	3,9	5,2

4.2.3 Dospělci

Hmotnost plně nasátých dospělých samic druhu *I. holocyclus* byla 2x nižší než u druhu *I. ricinus* (Obr. 27, Tab. VIII).



Obr. 27: Hmotnost plně nasátých samic *I. holocyclus* a *I. ricinus*. (Chybová úsečka znázorňuje SEM.)

Tab. VIII: Srovnání hmotnosti plně nasátých dospělců *I. holocyclus* a *I. ricinus*.

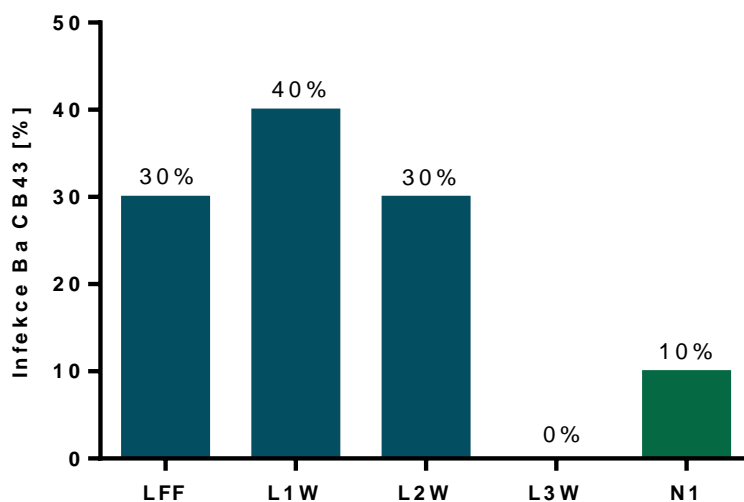
	m [mg]			
	průměr	median	min	max
<i>I. holocyclus</i>	147,5	147,2	56,5	228,7
<i>I. ricinus</i>	291,3	300,1	197,7	455,3

4.3 Testování schopnosti klíštěte *I. holocyclus* přenášet borrelie

4.3.1 Růstová kinetika *B. afzelii* v larvách *I. holocyclus*

Byl testován přenos spirochét *B. afzelii* (kmen CB43) do larev *I. holocyclus* v průběhu sání na infikovaných myších. Přítomnost borrelií v klíšťatech byla prověřována ihned po dosátí a poté v týdenních intervalech až do metamorfózy larev do stadia nymf.

Procentuální zastoupení nakažených larev v daných časových bodech zobrazuje graf níže (Obr. 28). Ihned po dosátí se borrelie vyskytovaly pouze ve 3/10 (30 %) testovaných larev (LFF), po 1 týdnu ve 4/10 (40 %) larev (L1W). S postupem času se počet nakažených jedinců snižoval. Po 2 týdnech byly infikovány 3/10 (30 %) larev (L2W) a po 3 týdnech se nákaza nevyskytovala v žádné z testovaných larev 0/10 (0 %) (L3W). Po 4 týdnech, kdy se už larvy převlékly do nymf, byly spirochéty přítomny pouze v 1/10 (10 %) nymf (N1).

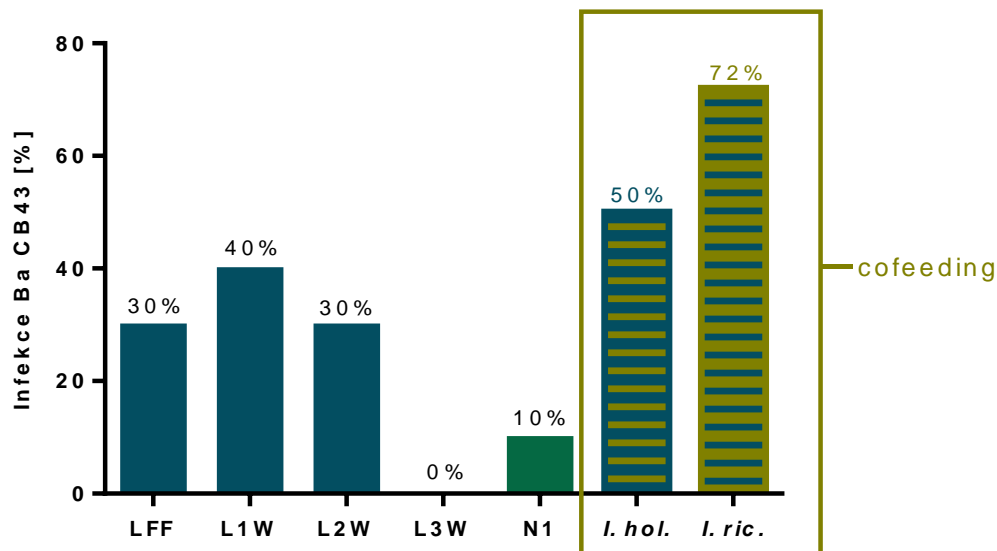


Obr. 28: Růstová kinetika *B. afzelii* CB43 v průběhu vývoje larev *I. holocyclus*. (LFF – plně nasáté larvy, L1W – larvy po 1 týdnu od dosátí, L2W - larvy po 2 týdnech, L3W – larvy po 3 týdnech, N1 – nymfy po 4 týdnech od dosátí.)

4.3.2 Společné sání larev *I. holocyclus* a *I. ricinus* – cofeeding

Byl sledován vliv přítomnosti klíštěte *I. ricinus*, jež je nejčastějším přenašečem Lymeské borreliózy v České republice, na množství nakažených larev *I. holocyclus*. Larvy obou druhů sály zároveň na jedné myši nakažené spirochéty *B. afzelii* (kmen CB43).

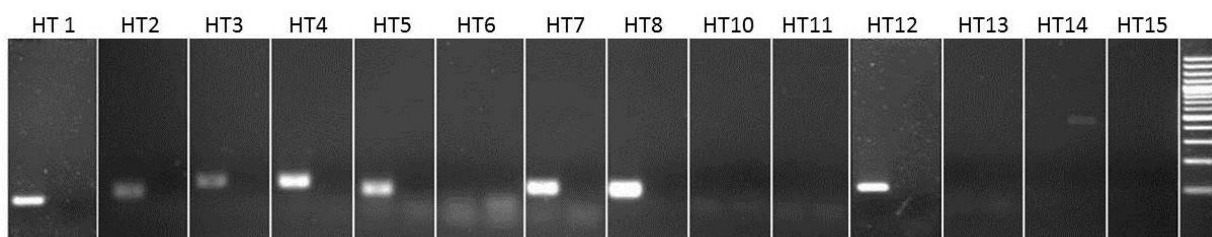
Prokázalo se, že u 19/38 (50 %) testovaných larev *I. holocyclus* došlo k přenosu borrelií Ba CB43 (Obr. 29). Oproti samostatnému sání se tak podíl nakažených jedinců zvýšil o 20 %.



Obr. 29: Růstová kinetika *B. afzelii* v klíštěti *I. holocyclus* a při sání spolu s *I. ricinus* (cofeeding). (LFF – plně nasáté larvy, L1W – larvy po 1 týdnu od dosátí, L2W – larvy po 2 týdnech, L3W – larvy po 3 týdnech, N1 – nymfy po 4 týdnech od dosátí, *I. hol.* – plně nasáté larvy *I. holocyclus*, *I. ric.* – plně nasáté larvy *I. ricinus*)

4.4 Identifikace a charakterizace paralytických neurotoxinů

Během sání larev na myších BALB/c nebyly pozorovány známky paralýzy, a to ani v případě, kdy sálo 25 larev na jedné myši. Známky byly patrné až při sání nymf, kdy se po 3 dnech u myši projevila výrazná paralýza. K vyvolání paralýzy stačila přítomnost 5 nymf na jedné myši. U stadia nymf byla sledována míra exprese genů pro holocyclotoxiny, jež byly prokázány pomocí PCR (Obr. 30). Těmi byly geny toxinů HT1–HT5, HT7, HT8 a HT12. Expresní profily daných genů jsou zaznamenány na grafech níže (Obr. 31). U všech studovaných genů byl patrný nárůst exprese v průběhu 3 dnů sání nymf klíštěte *I. holocyclus* na myších.

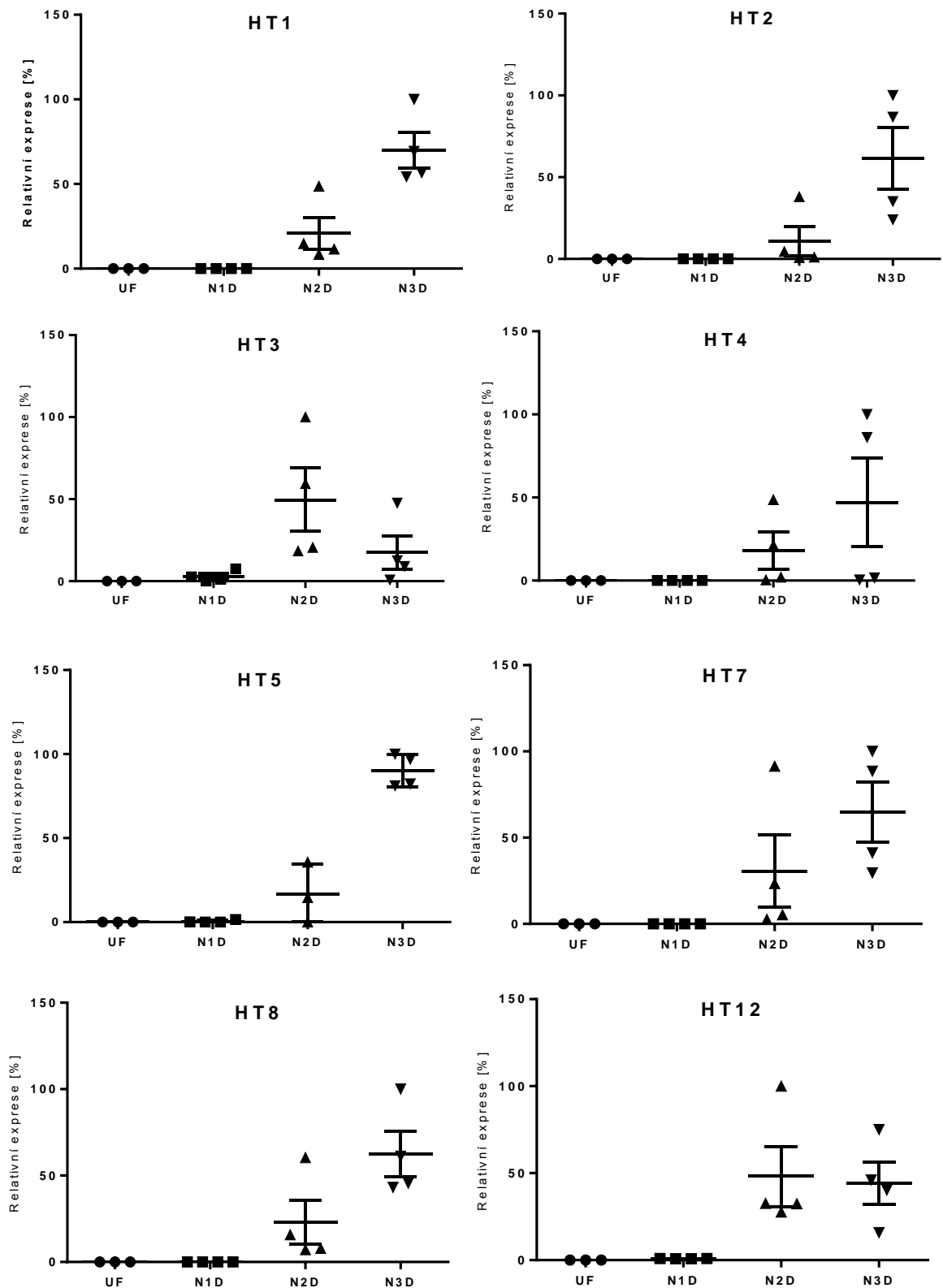


Obr. 30: Exprese holocyclotoxinů (HT1–HT15) v plně nasátých nymfách *I. holocyclus*.

Exprese genů pro holocyclotoxiny HT6, HT9, HT10, HT11, HT13, HT14 a HT15 nebyla u nymf zjištěna.

Bylo zjištěno, že některé geny jsou si vzájemně velmi podobné. Geny HT1 a HT10 jsou v nukleotidové sekvenci shodné z 92 % (202/219 nukleotidů), geny HT1 a HT11 jsou shodné z 93 % (203/219 nukleotidů). Geny HT6 a HT7 jsou shodné z 97 % (231/237 nukleotidů), geny HT14 a HT15 jsou shodné z 89 % (198/222 nukleotidů).

Gen HT9 je zcela shodný s genem HT3 (159/159 nukleotidů).



Obr. 31: Míra exprese holocyclotoxinů HT1–HT5, HT7, HT8 a HT12 v průběhu sání nymf *I. holocyclus*. (UF - nenasáté nymfy, N1D–N3D – nymfy po 1–3 dnech sání, chybová úsečka znázorňuje SEM.)

5 Diskuse

5.1 Zavedení chovu *I. holocyclus*

I. holocyclus je v Austrálii nejpočetnějším druhem klíštěte. Znamé je také pod názvem paralytické klíště, neboť jeho sliny obsahují toxiny způsobující paralýzu a případně i smrt hostitele. Stává se tak příčinou mnoha úmrtí psů, koček či chovného dobytka, ale může ohrozit také člověka. Jeho areál rozšíření se překrývá s nejhustěji zalidněnými oblastmi a stává se tak medicínsky a hospodářsky nejvýznamnějším druhem klíštěte v Austrálii. I přesto že je *I. holocyclus* tak významným škůdcem, zůstává i v dnešní době poměrně málo prozkoumaným druhem klíštěte. Jedním z důvodů, proč je tomu tak, je právě jeho toxicita a s tím spojené obtíže s jeho odchovem na běžných laboratorních zvířatech.

Pro studium klíšťat *I. holocyclus* bylo nezbytné zavést jeho laboratorní chov. S využitím dříve vyvinutého sání klíšťat na umělých membránách (Perner et al. 2016) se úspěšně podařilo dosát nymfy a dospělé *I. holocyclus* a díky tomu také dokončit celý životní cyklus tohoto klíštěte bez nutnosti využití živých zvířat.

V naší laboratoři jsme dokázali nastavit vhodné podmínky pro chov klíštěte *I. holocyclus*. Díky tomu se podařilo dokončit celý životní cyklus v průběhu 8–10 měsíců. Teplota spolu s dostatečnou vlhkostí byly klíčovými faktory, které měly vliv na vývoj klíšťat. U vajíček zvýšení teploty z 23 °C na 28 °C indukovalo líhnutí larev. Doba nutná k metamorfóze u nasátých larev i nymf byla v teplejších podmínkách zkrácena oproti délce vývoje za nižších teplot. Stejná tendence byly pozorovány i v jiných studiích zabývajících se životním cyklem *I. holocyclus*. Ross pozoroval, že v teplejších podmínkách (24–27 °C) líhnutí larev z vajíček nastalo po 49 dnech, při pokojové teplotě (10–20 °C) se první larvy objevily po 61 dnech. V teplejších podmínkách se první nymfy z plně nasátých larev vylíhly za 19 dní, při pokojové teplotě byla doba metamorfózy prodloužena až na 41 dní. První dospělci se z plně nasátých nymf vylíhly v teplejších podmínkách za 21 dní, při nižších teplotách nastalo líhnutí dospělců až po 53–65 dnech. Ovipozice v teplejších podmínkách nastala za 11 dní, při pokojové teplotě až za 20 dní. Všechna nenasátá stadia přežívala déle, pokud byla uchovávána v nižších teplotách (Ross 1924).

Délka sání a metamorfózy jednotlivých vývojových stadií byla za daných podmínek srovnatelná s dosud publikovanými informacemi o druhu *I. holocyclus* (Ross 1924), (Ross 1926), (Barker & Walker 2014), (Grattan-Smith et al. 1997). Larvy sály 3–5 dní, nymfy 4–7 dní, dospělé samice 6–11 dní. Přeměna do dalšího stadia trvala v závislosti na teplotě u larev 21–28 dní a u nymf 23–27 dní. Ovipozice u dospělých samic nastala 11. až 22. den

po dosátí. Ross uvádí, že během jeho studie larvy sály 4–6 dní, nymfy 4–7 dní, dospělé samice 6–21 dní. Kladení vajíček nastalo 11. až 20. den v závislosti na okolní teplotě.

Ve srovnání s dříve publikovanými informacemi se naše data lišila ve velikosti snůšek. Počet nakladených vajíček byl v Rossově studii 1800–2500 (Ross 1924). Nám se podařilo získat snůšky o velikosti 500–1000 vajíček. V přirozených podmínkách je obvyklý počet 2000–3000 vajíček (Masina & Broady 1999).

Menší počet vajíček mohl být zapříčiněn typem stravy a způsobem krmení klíšťat. Uvádí se, že pro udržení stálé populace *I. holocyclus* je nezbytná přítomnost hlavních přirozených hostitelů, bandikuta hnědého (*Isoodon macrourus*) a bandikuta nosatého (*Perameles nasuta*) (Barker & Walker 2014). Ross ke krmení klíšťat využíval kromě jiných právě druhého zmíněného bandikuta (Ross 1924). V našich podmínkách ovšem nebylo možné zajistit sání na těchto vačnatcích. Larvy byly krmeny na laboratorních myších, nymfy a dospělci na umělých membránách hovězí krvi.

Při pokusech, které prováděl Stone v roce 1983, byly umísťovány dospělé samice *I. holocyclus* na silikonovou membránu. Byl sledován nárůst hmotnosti jedinců krmených na umělých membránách ve srovnání s hmotností jedinců krmených na krysách. Klíšťata krmená na umělých membránách dosahovala menších hmotností, než tomu bylo u jedinců krmených na zvířatech (< 50 % předpokládané hmotnosti) (Stone et al. 1983).

Barker a Walker uvádí, že v přirozených podmínkách může hmotnost plně nasátých samic vzrůst oproti nenasátému stavu až 100x (Barker & Walker 2014). Pozorovaný nárůst hmotnosti dospělých samic krmených na umělých membránách v naší laboratoři byl 57x, tedy zhruba poloviční, což by korespondovalo s výsledky Stona (Stone et al. 1983).

Přestože byla klíšťata držena ve stálých podmínkách, byl u nich patrný vliv sezónních změn na celkovou aktivitu a abundanci, jež odpovídaly australskému vzoru. V našich letních měsících (červenec, srpen), kdy je v Austrálii zima, byl vývoj larev a nymf zpomalen. U vajíček, nakladených v červenci, nedošlo k líhnutí larev. Naopak z vajíček nakladených v lednu se larvy vylíhly. Nymfy a dospělci krmení v listopadu a prosinci prospívali lépe, jejich hmotnost byla vyšší a vývoj byl rychlejší.

5.2 Srovnání s *I. holocyclus* a *I. ricinus*

Při srovnání *I. holocyclus* s klíštětem *I. ricinus*, nejčastěji se vyskytujícím druhem klíštěte v České republice, byla délka sání jednotlivých stadií obou druhů srovnatelná. Odlišnosti byly patrné v hmotnosti plně nasátých jedinců. Průměrná hmotnost plně nasátých larev

i nymf *I. holocyclus* byla vyšší ve srovnání s klíštětem *I. ricinus*. Podle hmotnosti plně nasátých nymf *I. holocyclus* nebylo možné určit pohlaví jedinců, jako je to možné u *I. ricinus* (Dusbábek 1996). Naopak průměrná váha plně nasátých dospělců *I. holocyclus* byla 2x nižší.

5.3 Přenos borrelií

Doposud bylo v Austrálii identifikováno 6 druhů borrelií. Pouze jediný druh byl nalezen v klíštěti *I. holocyclus*, a to jen v jediném jedinci (Loh et al. 2016; Loh et al. 2017). Žádný z těchto 6 druhů však nespádá do komplexu *B. burgdorferi* s.l. a nebylo u nich zaznamenáno, že by měly schopnost vyvolat Lymeskou borreliózu. Přítomnost bakterií komplexu *B. burgdorferi* s.l. na tomto kontinentu tak stále zůstává nezodpovězenou otázkou (Gofton et al. 2015).

Přestože jsou ročně na celé severní polokouli hlášeny statisíce případů pacientů s Lymeskou borreliózou, podle australského ministerstva zdravotnictví je Austrálie zcela bez výskytu tohoto onemocnění (Smith & Psych 2012). Za posledních 25 let bylo v Austrálii hlášeno více než 500 případů pacientů se symptomy připomínajícími Lymeskou borreliózu, žádný však nebyl vědecky potvrzen (Chalada et al. 2016).

Léčba těchto pacientů pomocí antibiotik je stejná jako u skutečných případů Lymeské boreliózy. To s sebou ovšem může přinášet řadu nežádoucích zdravotních účinků a vytvářet resistenci k antibiotikům (Collignon et al. 2016).

Do Austrálie bylo introdukováno množství druhů hostitelů, kteří v původních oblastech rozšíření mohou sloužit jako rezervoáry onemocnění. Výrazným disperzním činitelem se mohli stát i migrující ptáci (D. Sonenshine & Roe 2014). Nicméně v australské přírodě nebyly doposud spirochéty *B. burgdorferi* s.l. nalezeny (Collignon et al. 2016). Je možné, že se zde vyskytuje endemický kmen (Barker & Walker 2014), (Gofton et al. 2015) nebo jiné patogeny vyvolávající podobné příznaky (Panetta et al. 2017). Bakterie spirochétovitého tvaru bez přesnějšího určení byly pozorované v krevním roztěru bandikutů, dobytka, klokanů a hlodavců a v klíštěti *I. holocyclus* a *Haemaphysalis* spp. sbíraných na domácích a hospodářských zvířatech (Loh et al. 2016).

V Austrálii není původní žádný z dosud známých kompetentních vektorů (Piesman & Stone 1991). Klíště *I. holocyclus* je hojně rozšířeným druhem, často napadá člověka a domácí zvířata, a pokud se zde vyskytuje Lymeská borrelióza, byl by nejpravděpodobnějším přenašečem tohoto onemocnění (Piesman & Stone 1991). Sání klíšťat

I. holocyclus se však doposud nepodařilo dát do přímé souvislosti s výskytem příznaků u domnělých pacientů (Mayne et al. 2014).

Jedním z hlavních příznaků Lymeské borreliózy je erythema migrans. Podobně vypadající léze je však v místě přisátí klíštěte *I. holocyclus* docela běžná a obecně se může objevit díky širokému spektru různých bakterií zahrnujících *Rickettsia* spp., *Bartonella* spp., *Coxiella burnetii*, *Spiroplasma* spp. a *Borrelia* spp (Barker & Walker 2014).

Schopnost přenosu bakterií rodu *Borrelia* klíštětem *I. holocyclus* zůstává málo prozkoumaným tématem a stále neexistuje jasná odpověď (Gofton et al. 2015). Experimentálně bylo zjištěno, že klíště *I. holocyclus* může nasát severoamerický kmen *B. burgdorferi* s.s. (kmen JD1), ale nedokáže jej zpětně přenést na dalšího hostitele, protože spirochéty nepřežívají metamorfózu larev do nymf (Piesman & Stone 1991). Toto zjištění ovšem nevylučuje schopnost *I. holocyclus* přenášet jiné kmeny *B. burgdorferi* s.l. (Chalada et al. 2016).

V naší laboratoři jsme testovali schopnost přenosu spirochét *B. afzelii* (kmen CB43) do larev *I. holocyclus* v průběhu sání na nakažených myších. Schopnost přenosu spirochét *B. afzelii* z nakažených myší do larev se ukázala jako poměrně nízká. Pouze 30–40 % plně nasátých larev bylo PCR pozitivních na borrelie a toto procento dále prudce klesalo v čase v porovnání s druhem *I. ricinus*, u něhož dochází k přenosu u 80–100 % larev a množství spirochét v klíšťatech se v průběhu převlékání do nymf ještě zvyšuje (Pospíšilová 2016). Přenos spirochét *B. afzelii* (kmen CB43) klíštětem *I. holocyclus* tedy nebyl potvrzen.

Zajímavý byl nárůst podílu nakažených larev *I. holocyclus* až na 50 % v případě společného sání larev *I. holocyclus* s larvami *I. ricinus*. Tyto změny mohly být způsobeny látkami ve slinách klíšťat *I. ricinus*, které chemotakticky ovlivňují migraci spirochét do místa přisátí (Shih et al. 2002). Zároveň však došlo ke snížení podílu nakažených jedinců *I. ricinus* na 70 %. Nezodpovězenou otázkou zůstává, zdali byl tento pokles způsoben přítomností *I. holocyclus*.

Podobný efekt byl pozorován i při společném sání *Ixodes scapularis* a *Amblyomma americanum* (Soares et al. 2006). Když sály larvy druhu *A. americanum* na infikovaných myších samostatně, téměř v nich nebyly spirochéty kmene *B. burgdorferi* nalezeny. Avšak v případě společného sání s druhem *I. scapularis* příjem borrelií larvami *A. americanum* prokazatelně vzrostl, po 14 dnech však z klíšťat zcela vymizely (Soares et al. 2006).

Je známo, že některé druhy klíšťat mohou sát na hostitelích infikovaných kmenem *B. burgdorferi* s.l., ale díky své vrozené imunitě spirochéty nepřenáší. Je tomu tak například u druhů *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis*, *Dermacentor andersoni*,

Dermacentor occidentalis, *Ixodes cookei*, *Ixodes tranguliceps* (Tsao 2009). Podobné procesy by se mohly vyskytovat i u *I. holocyclus*.

Bylo by vhodné otestovat i přenos dalších kmenů borrelií, jako jsou *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* či *B. valaisiana* (Bettridge et al. 2013). V Austrálii se však mohou vyskytovat zcela jiné endemické kmeny, které nebyly doposud identifikovány (Barker & Walker 2014).

5.4 Toxiny

Klíště *I. holocyclus* produkuje během sání na hostiteli ve slinných žlázách neurotoxiny. Funkční význam toxinů není dosud jasný. Předpokládá se, že klíštěcí toxiny jsou pozůstatky vlastností, které měla klíšťata ještě v době, kdy nebyla parazitická (Masina & Broady 1999). Genová sekvence HT1, prvního popsaného toxinu, je homologní s neurotoxickými geny škorpiónů a obecně mají sekvence aminokyselin v toxinech podobné množství a uspořádání cysteinových zbytků, což poukazuje na silnou strukturální homologii (Masina & Broady 1999). Paralyza je nyní pravděpodobně nezáměrným vedlejším efektem sání klíšťat. *I. holocyclus* nemá žádnou očividnou výhodu z úmrtí svého hostitele během sání (Barker & Walker 2014). Na vymizení tohoto pozůstatku není vyvíjen evoluční tlak, neboť přirození hostitelé si k toxinům vytvořili odolnost. V současnosti se mohou tyto látky během sání klíštěte na hostiteli podílet na imunomodulaci a následně ovlivňovat přenos patogenů. Jejich konkrétní účinky v těchto souvislostech však nejsou doposud příliš prozkoumány.

V plně nasátých dospělých samicích klíštěte *I. holocyclus* bylo identifikováno 19 toxinů, u nichž byly zjištěny nukleotidové sekvence (Rodriguez-Valle, Moolhuijzen, et al. 2017).

V průběhu sání nymf na myších jsme prokázali aktivitu 8 genů pro holocyclotoxiny (HT1-HT5, HT7, HT8 a HT12). Z jejich expresních profilů bylo patrné, že produkce všech těchto genů v průběhu sání stoupala, což odpovídalo nastupující paralyze myší. Exprese dalších genů pro holocyclotoxiny (HT6, HT9, HT10, HT11, HT13, HT14, HT15) nebyla u nymf prokázána. To mohlo být způsobeno tím, že původní identifikace všech toxinů byla prováděna u dospělých samic (Rodriguez-Valle, PauMoolhuijzenbla, et al. 2017) a u stádia nymf nejsou tyto geny přepisovány v detekovatelném množství. Proto by bylo vhodné vypracovat ještě expresní profily toxinů v průběhu sání dospělců za využití stejných primerů. Může se také jednat o varianty stejných genů, neboť v nukleotidových sekvencích jsou si některé geny vzájemně velmi podobné. Tomu je tak u genů pro toxiny HT1 a HT10, HT1 a HT11, HT6 a HT7 a u genů HT14 a HT15. Gen pro toxin HT9 je zcela shodný s genem HT3.

6 Závěr

V naší laboratoři byl díky metodě sání na umělých membránách zaveden laboratorní chov klíštěte *I. holocyclus*.

Přenos spirochét *B. afzelii* (kmen CB43) klíštětem *I. holocyclus* nebyl potvrzen. Procentuální promořenost larev byla nízká (30–40%) a v průběhu metamorfózy do nymf ještě klesala. Společné sání s klíštětem *I. ricinus*, jenž je běžným přenašečem borrelií, zvýšilo podíl nakažených larev o 20 %.

V sajících nymfách *I. holocyclus* byla potvrzena produkce 8 holocyclotoxinů, jejichž exprese v průběhu sání stoupala, což odpovídalo nastupující paralýze myší.

7 Seznam použité literatury

- Aguero-Rosenfeld, M. et al., 2005. Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(3), pp.484–509.
- Atwell, R.B., Campbell, F.E. & Evans, E.A., 2001. Prospective survey of tick paralysis in dogs. *Australian Veterinary Journal*, 79(6), pp.412–418. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035380163&partnerID=tZOtx3y1>.
- Barbour, A.G. & Hayes, S.F., 1986. Biology of *Borrelia* species. *Microbiological reviews*, 50(4), pp.381–400.
- Barker, S.C. & Walker, A.R., 2014. *Ticks of Australia. The species that infest domestic animals and humans*, Auckland, New Zealand: Magnolia Press. Available at: <https://biotaxa.org/Zootaxa/article/view/zootaxa.3816.1.1>.
- Barker, S.C., Walker, A.R. & Campelo, D., 2014. A list of the 70 species of Australian ticks; diagnostic guides to and species accounts of *Ixodes holocyclus* (paralysis tick), *Ixodes cornuatus* (southern paralysis tick) and *Rhipicephalus australis* (Australian cattle tick); and consideration of the place. *International Journal for Parasitology*, 44(12), pp.941–953. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.08.008>.
- Bettridge, J. et al., 2013. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* Populations Across Central Britain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13(3), pp.139–146. Available at: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/vbz.2012.1075>.
- Burgdorfer, W. et al., 1982. Lyme disease – a tick-borne spirochetosis? *Science*, 216, pp.1317 – 1319.
- Callow, L.L. & Hoyt, H.M.D., 1961. Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia* sp. and the cattle tick. *The Australian Veterinary Journal*, 37, pp.381–390.
- Carley, J. & Pope, J., 1962. A new Species of *Borrelia* (*B. Queenslandica*) from *Rattus villosissimus* in Queensland. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 40(4), pp.255–261. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/icb.1962.29>.

- Casjens, S.R. et al., 2012. Genome stability of lyme disease spirochetes: Comparative genomics of borrelia burgdorferi plasmids. *PLoS ONE*, 7(3), pp.1–24.
- Clunies-Ross, I., 1935. Tick paralysis: a fatal disease of dogs and other animals in eastern Australia. In: *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research*, 8, pp.8–13.
- Collignon, P.J., Lum, G.D. & Robson, J.M.B., 2016. Does lyme disease exist in Australia? *Medical Journal of Australia*, 205(9), pp.413–417.
- Cook, M.J., 2015. Lyme borreliosis: a review of data on transmission time after tick attachment | IJGM. , pp.1–8. Available at: http://www.dovepress.com/articles.php?article_id=19690.
- Cooper, B.J. & Spence, I., 1976. Temperature-dependent inhibition of evoked acetylcholine release in tick paralysis. *Nature*, 263(5552), pp.326–28. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1264226>.
- Cresswell, I. & Murphy, H., 2016. *Biodiversity: Biodiversity. In: Australia state of the environment 2016*, Canberra. Available at: <https://soe.environment.gov.au/theme/biodiversity>, DOI 10.4226/94/58b65ac828812.
- Culek, M. et al., 2013. *Austrálie 1.*, Brno: Masarykova univerzita. Available at: <http://is.muni.cz/elportal/?id=1111034>>.
- Dobson, S.J. & Barker, S.C., 1999. Phylogeny of the Hard Ticks (Ixodidae) Inferred from 18S rRNA Indicates That the Genus Aponomma Is Paraphyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11(2), pp.288–295.
- Dusbábek, F., 1996. Nymphal sexual dimorphism in the sheep tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). *Folia Parasitologica*, 43(1), pp.75–79.
- Gofton, A. et al., 2015. Inhibition of the endosymbiont “Candidatus Midichloria mitochondrii” during 16S rRNA gene profiling reveals potential pathogens in *Ixodes* ticks from Australia. *Parasites & Vectors*, 8(1), p.345. Available at: <http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/345>.
- Grattan-Smith, P.J. et al., 1997. Clinical and neurophysiological features of tick paralysis. *Brain*, 120(11), pp.1975–1987.

- Guglielmone, A. a, 2010. Zootaxa, The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world:... *Zootaxa*, 2528, pp.1–28.
- Habedank, B. & Hiepe, T., 1993. In-vitro-Fütterung von Zecken, *Dermacentor nuttalli*, Olenov 1928 (Acari: Ixodidae) über eine Silikonmembran. *Dermatol Monatsschr*, 179, p.292.
- Hajdušek, O. et al., 2013. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3(July), p.26. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3712896&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hokama, Y., Lane, R.S. & Howarth, J.A., 1987. Maintenance of Adult and Nymphal *Ornithodoros coriaceus* (Acari : Argasidae) by Artificial Feeding Through a Parafilm Membrane. *J. Med. Entomol.*, 24, pp.319–323.
- Chalada, M.J., Stenos, J. & Bradbury, R.S., 2016. Is there a Lyme-like disease in Australia? Summary of the findings to date. *One Health*, 2, pp.42–54. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.onehlt.2016.03.003>.
- Kaufman, W.R., 1989. Tick-host interaction: A synthesis of current concepts. *Parasitology Today*, 5(2), pp.47–56.
- Kemp, D.H. et al., 1975. Feeding of *Boophilus microplus* larvae on a partially defined medium through thin slices of cattle skin. *Parasitology*, 70(2), pp.243–254. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1128926>.
- Krieg, N.R. et al. eds., 2010. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd ed., New York: Springer-Verlag New York.
- Kröber, T. & Guerin, P.M., 2007. In vitro feeding assays for hard ticks. *Trends in Parasitology*, 23(9), pp.445–449.
- Krupka, M. et al., 2007. Biological aspects of Lyme disease spirochetes: unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, 151(2), pp.175–186.

- Kučera, M., 2015. *Influence of dietary components and redox enzymes on intestinal microbiota proliferation in the tick Ixodes ricinus*. University of South Bohemia in České Budějovice Faculty of Science Influence.
- Kuhnert, F., Diehl, P.A. & Guerin, P.M., 1995. The life-cycle of the bont tick *Amblyomma hebraeum* in vitro. *International Journal for Parasitology*, 25(8), pp.887–896.
- Kůrka, A., 2005. *České názvy živočichů: II. roztoči (Acari)*, Praha: Národní muzeum.
- Loh, S.-M. et al., 2016. Novel *Borrelia* species detected in echidna ticks, *Bothriocroton concolor*, in Australia. *Parasites & Vectors*, 9(1), p.339. Available at: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1627-x>.
- Loh, S.M. et al., 2017. Molecular characterization of “*Candidatus borrelia tachyglossi*” (family Spirochaetaceae) in echidna ticks, *Bothriocroton concolor*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(4), pp.1075–1080.
- Mans, B.J., 2011. Evolution of vertebrate hemostatic and inflammatory control mechanisms in blood-feeding arthropods. *Journal of Innate Immunity*, 3(1), pp.41–51.
- Mans, B.J. et al., 2012. The Mitochondrial Genomes of *Nuttalliella namaqua* (Ixodoidea: Nuttalliellidae) and *Argas africanus* (Ixodoidea: Argasidae): Estimation of Divergence Dates for the Major Tick Lineages and Reconstruction of Ancestral Blood-Feeding Characters. *PLoS ONE*, 7(11), pp.1–12.
- Martin, H.A., 2006. Cenozoic climatic change and the development of the arid vegetation in Australia. *Journal of Arid Environments*, 66(3 SPEC. ISS.), pp.533–563.
- Masina, S. & Broady, K.W., 1999. Tick paralysis: Development of a vaccine. *International Journal for Parasitology*, 29(4), pp.535–541.
- Mayne, P. et al., 2014. Evidence for *Ixodes holocyclus* (Acarina: Ixodidae) as a vector for human lyme borreliosis infection in Australia. *Journal of Insect Science*, 14, pp.2–4.
- Morton, S. et al., 2014. *Biodiversity : science and solutions for Australia*,
- Mulhearn, C.R., 1946. A note on two blood parasites of cattle (*Spirochaeta theileri* and *Bartonella bovis*) recorded for the first time in Australia. *The Australian Veterinary Journal*, 22(4), pp.118–119.

- Panetta, J.L. et al., 2017. Reptile-associated *Borrelia* species in the goanna tick (*Bothriocroton undatum*) from Sydney, Australia. *Parasites and Vectors*, 10(1), pp.1–13.
- Perner, J. et al., 2016. Acquisition of exogenous haem is essential for tick reproduction. *eLife*, 5(MARCH2016).
- Petney, T.N. et al., 2004. *Argas persicus* sensu stricto does occur in Australia. *Parasitology Research*, 93(4), pp.296–299. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00436-004-1141-5>.
- Pierce, A.E. & Pierce, M.H., 1956. A note on the cultivation of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Ixodidae: Acarina) on the embryonated hen egg. *The Australian Veterinary Journal*, 32(6), pp.144–146.
- Piesman, J. & Stone, B.F., 1991. Vector competence of the Australian paralysis tick, *Ixodes holocyclus*, for the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *International Journal for Parasitology*, 21(1), pp.109–111.
- Pospíšilová, T., 2016. Growth kinetics and transmission dynamics of *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus*. *Bachelor thesis*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/41427>.
- Rees, L. & Bear, V., 2013. *Ticks and tick-borne diseases protecting yourself* 1st ed., Australia: Australian Association of Bush Regenerators Inc.
- Riek, R.F., 1957. Studies on the reactions of animals to infestation with ticks. II. Tick toxins. *Australian Journal of Agricultural Research*, 8(2), pp.215–223.
- Roberts, F.H.S., 1970. *Australian ticks*, Melbourne: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization.
- Rodriguez-Valle, M., Moolhuijzen, P., et al., 2017. Transcriptome and toxin family analysis of the paralysis tick, *Ixodes holocyclus*. *International Journal for Parasitology*, (October). Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.07.007>.
- Rodriguez-Valle, M., PauMoolhuijzenbla, et al., 2017. Transcriptome and toxin family analysis of the paralysis tick, *Ixodes holocyclus*. *International Journal for Parasitology*.

- Rosa, P.A., Tilly, K. & Stewart, P.E., 2005. The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1), pp.129–143.
- Ross, C.I., 1926. An Experimental Study of Tick Paralysis in Australia. *Parasitology*, 18(4), pp.410–429.
- Ross, C.I., 1924. The Bionomics of *Ixodes holocyclus* Neumann, with a redescription of the Adult and Nymphal Stages and a description of the Larvae. *Parasitology*, 16(4), pp.365–381. Available at: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182000020254.
- Russell, R.C., 1995. ?Lyme disease in Australia - still to be proven! *Emerging Infectious Diseases*, 1(1), pp.29–31. Available at: <http://www.lowchensaustralia.com/pests/paralysis-tick/vector-competence.htm>.
- Shih, C.-M., Chao, L.-L. & Yu, C.-P., 2002. Chemotactic migration of the Lyme Disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) to salivary gland extracts of vector ticks. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(5), pp.616–621.
- Smith, K. & Psych, B., 2012. Lyme Disease : A Counter Argument to the Australian Government ' s Denial. Available at: http://www.lymedisease.org.au/wp-content/uploads/2014/02/attachment_two_lyme_disease_a_counter_argument_of_the_australian_governments_denial.pdf.
- Soares, C.A.G. et al., 2006. Kinetics of *Borrelia burgdorferi* Infection in Larvae of Refractory and Competent Tick Vectors. *Journal of Medical Entomology*, 43(1), pp.61–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16619611>.
- Sojka, D. et al., 2013. New insights into the machinery of blood digestion by ticks. *Trends in Parasitology*, 29(6), pp.276–285.
- Sonenshine, D. & Roe, R.M., 2014. Biology of ticks (volume 2). *Biology of ticks*, 2, pp.278–312.
- Sonenshine, D.E., 1991. *Biology of Ticks, Volume 1*, Oxford University Press.
- Sonenshine, D.E. & Roe, R.M., 2014. *Biology of ticks* 2nd ed., New York: Oxford University Press.

- Steere, A.C. et al., 1977. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. *Arthritis Rheum*, 20(1), pp.7 – 17.
- Stone, B.F., Commins, M.A. & Kemp, D.H., 1983. Artificial feeding of the Australian paralysis tick, *Ixodes holocyclus* and collection of paralysing toxin. *International Journal for Parasitology*, 13(5), pp.447–454.
- Tsao, J.I., 2009. Reviewing molecular adaptations of lyme borreliosis spirochetes in the context of reproductive fitness in natural transmission cycles. *Veterinary Research*, 40(2).
- Waladde, S.M., Ochieng, S.A. & Gichuhi, P.M., 1991. Artificial-membrane feeding of the ixodid tick, *Rhipicephalus appendiculatus*, to repletion. *Experimental & Applied Acarology*, 11, pp.297–306.
- Zemanová, Z., 2018. *Charakterizace genu ureázy v klištěti Ixodes ricinus*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

7.1 Zdroje obrázků

Historical perspective. In: *U.S. Geological Survey* [online]. 8. 7. 2012 [cit. 16. 3. 2018]. Available: <https://pubs.usgs.gov/gip/dynamic/historical.html>

Decadal and multi-decadal rainfall: Rainfall Annual 10-year average (1996-2005), In: *Australian Government: Bureau of Meteorology* [online]. Melbourne, 2016 [cit. 16. 3. 2018]. Available: http://www.bom.gov.au/jsp/ncc/climate_averages/decadal-rainfall/index.jsp?maptype=1&period=9605&product=totals#maps