

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta tropického zemědělství



**Fakulta tropického
zemědělství**

Klošovité (Diptera, Hippoboscidae) a jimi přenášené patogeny

Bakalářská práce

Praha 2023

Vypracovala:

Žofie Marková

Vedoucí práce:

RNDr. Jirí Černý, Ph.D.

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Žofie Marková

Tropické zemědělství

Název práce

Klošovité (Diptera, Hippoboscidae) a jimi přenášené patogeny

Název anglicky

Keds (Diptera, Hippoboscidae) and keds-borne pathogens

Cíle práce

Klošovité (Diptera, Hippoboscidae) jsou krev sající skupinou hmyzu, která parazituje především na kopytnících, v ojedinělých případech se ale mohou pokusit sát i na lidech. Význam klošů jako přenašečů různých onemocnění byl v minulosti opomíjen, ale v posledních letech bylo prokázáno, že mohou přenášet mnoho důležitých patogenů (např. bakterie rodu Bartonella, Rickettsia nebo Borrelia). Cílem této práce je připravit literární přehled kloši přenášených nákaz a provést jejich experimentální detekci v kloši jelením (Lipoptena cervi) a kloši ovčím (Melophagus ovinus).

Metodika

Relevantní vědecké publikace budou vyhledávány v databázích PubMed, Web of Science, Scopus nebo Google Scholar za využití klíčových slov jako "keds", "Hippoboscidae", "pathogens" atd.

Experimentální část počítá se sběrem klošů v terénu v průběhu jara a časného podzimu 2022, jejich následné morfologické identifikaci pomocí entomologických klíčů a následná detekce vybraných skupin patogenů pomocí PCR ve vzorcích DNA vyizolované ze sebraných klošů.

Doporučený rozsah práce

cca 30 normostran

Klíčová slova

klošovité, Hippoboscidae, kloš jelení, Lipoptena cervi, patogeny

Doporučené zdroje informací

- Irma Razanske, Olav Rosef, Jana Radzijeuskaja, Kamile Klepeckiene, Indre Lipatova, Algimantas Paulauskas: Infections with Bartonella spp. in free-ranging cervids and deer keds (Lipoptena cervi) in Norway. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2018 Jun;58:26-30. doi: 10.1016/j.cimid.2018.06.003. Epub 2018 Jun 29.
- Marcos Antônio Bezerra-Santos, Domenico Otranto: Keds, the enigmatic flies and their role as vectors of pathogens. *Acta Trop*. 2020 Sep;209:105521. doi: 10.1016/j.actatropica.2020.105521. Epub 2020 May 21.
- Yvonne Regier, Cassandra Komma, Markus Weigel, Arto T Pulliainen, Stephan Göttig, Torsten Hain, Volkhard A J Kempf: Microbiome Analysis Reveals the Presence of Bartonella spp. and Acinetobacter spp. in Deer Keds (Lipoptena cervi). *Front Microbiol*. 2018 Dec 20;9:3100. doi: 10.3389/fmicb.2018.03100. eCollection 2018.

Předběžný termín obhajoby

LS 2022/23 – FTZ

Vedoucí práce

RNDr. Jiří Černý, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra chovu zvířat a potravinářství v tropech

Elektronicky schváleno dne 6. 12. 2022

Mgr. Barbora Černá Bolfíková, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 12. 4. 2023

prof. dr. ir. Patrick Van Damme

Děkan

V Praze dne 13. 04. 2023

Prohlášení

Čestně prohlašuji, že jsem tuto práci na téma Klošovití (*Diptera, Hippoboscidae*) a jimi přenášené patogeny vypracovala samostatně, veškerý text je v práci původní a originální a všechny použité literární prameny jsem podle pravidel Citační normy FTZ řádně uvedla v referencích.

V Praze dne 14.4.2023

.....
Žofie Marková

Poděkování

Na prvním místě bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Jiřímu Černému, Ph.D. za jeho podporu, trpělivost a rady při práci na této práci.

Dále bych chtěla poděkovat konzultantovi Jignesh Italiya, MVD za jeho asistenci a cenné rady při práci v laboratoři a vyhodnocování výsledků. Jeho ochota a pomoc jsou nedocenitelné.

Děkuji také Ing. Seyma Celina, která se mnou prošla začátky mé práce v laboratoři a pomohla mi s extrakcí DNA z nasbíraných vzorků.

Poděkování patří také Stanislavě Vrecionové za poskytnutí přístupu k jejímu chovu ovcí. Zároveň také děkuji za pomoc při sběru vzorků.

V neposlední řadě si mé díky zaslouží i můj partner, rodiče a přátelé, bez jejichž povzbuzování a morální podpory by psaní této práce bylo mnohem náročnější.

Na závěr bych chtěla poděkovat celému výzkumnému týmu E4 a Fakultě tropického zemědělství za poskytnutí finančních i materiálních zdrojů pro výzkum. Bez této podpory by tento výzkum nebyl možný.

Abstrakt

Klošovité (Diptera, Hippoboscidae) a jimi přenášené patogeny

Klošovité jsou hemofágními parazity savců (Mammalia) a ptáků (Aves). Díky jejich fyziologickým a behaviorálním vlastnostem jsou uzpůsobeni k přenosu patogenů v rámci druhů i mezidruhově. Mezi takto přenášené patogeny patří např. bakterie z rodů *Bartonella*, *Borrelia*, *Anaplasma* nebo *Rickettsia*. Je možné, že jsou schopni přenosu dalších patogenů. Potenciálně mohou být vektory například pro bakterii *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* nebo bakterie z rodu *Ehrlichia*.

Cílem této práce bylo vytvoření přehledu kloši přenášených patogenů a následná experimentální detekce bakterií z rodu *Bartonella*, *Rickettsia helvetica*, *Anaplasma phagocytophilum* a *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* v kloši ovčím (*Melophagus ovinus*) a kloši jelením (*Lipoptena cervi*).

Vzorky kloše ovčího pocházejí ze čtyř ovcí ve vesnici Hodkovice-Zlatníky v České republice (ČR), kloši jelení byli sbíráni ve smíšených lesích v blízkosti obce Dubá v ČR. Pomocí PCR testování byla provedena detekce patogenů, obsažených ve vzorcích. Výsledky byly následně zobrazeny za pomoci gelové elektroforézy.

Blíže neurčené bakterie rodu *Bartonella* byly detekovány u kloše ovčího v 64,29 % případů. *Rickettsia helvetica*, *Anaplasma phagocytophilum* ani *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* detekovány nebyly. U kloše jeleního nebyl detekován žádný ze sledovaných patogenů.

Klíčová slova: Kloši, *Lipoptena cervi*, *Melophagus ovinus*, *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia*, *Neoehrlichia*, PCR, zoonózy, choroby přenášené vektory

Author's abstract

Keds (Diptera, Hippoboscidae) and keds-borne pathogens

Keds are hemophagous parasites of mammals (Mammalia) and birds (Aves). Due to their physiological and behavioral characteristics, they are adapted to the transmission of pathogens within and between species. Such pathogens include for example *Bartonella* spp, *Borrelia* spp., *Anaplasma* spp. or *Rickettsia* spp. It is possible that they could be transmitting other pathogens as well. They could be potential vectors for pathogens such as *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* or *Ehrlichia* spp.

The aim of this work was a review on keds-borne pathogens and the subsequent experimental detection of *Bartonella* spp., *Rickettsia helvetica*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in sheep keds (*Melophagus ovinus*) and deer keds (*Lipoptena cervi*).

Sheep keds were collected from four sheep from the village Hodkovice-Zlatníky in the Czech Republic, deer keds were collected in mixed forests near Dubá in the Czech Republic.

Pathogens contained in the samples were detected using PCR. The results were displayed by gel electrophoresis.

Bartonella spp. had been detected in sheep keds in 64,29 % cases. The presence *Rickettsia helvetica*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* have not been detected. None of the targeted pathogens has been detected in the deer ked.

Key words: Keds, *Lipoptena cervi*, *Melophagus ovinus*, *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia*, *Neoehrlichia*, PCR, zoonotic diseases, vector-borne diseases

Obsah

| | |
|---|---------------|
| 1. Úvod | - 1 - |
| 1.1 Klošovité (Hippoboscidae) | - 1 - |
| 1.1.1 Kloš jelení (<i>Lipoptena cervi</i>) | - 2 - |
| 1.1.2 Kloš ovčí (<i>Melophagus ovinus</i>) | - 3 - |
| 1.2 Kloši přenášené patogeny | - 5 - |
| 1.2.1 Bakterie rodu <i>Bartonella</i> | - 5 - |
| 1.2.2 Bakterie rodu <i>Borrelia</i> | - 7 - |
| 1.2.3 Bakterie rodu <i>Rickettsia</i> | - 8 - |
| 1.2.4 <i>Candidatus</i> Neoehrlichia mikurensis | - 9 - |
| 1.2.5 Bakterie rodu <i>Anaplasma</i> | - 10 - |
| 1.2.6 Bakterie rodu <i>Ehrlichia</i> | - 11 - |
| 2. Cíle práce | - 13 - |
| 3. Metodika | - 14 - |
| 3.1 Sběr vzorků | - 14 - |
| 3.2 Postup zpracování | - 15 - |
| 3.2.1 Primery | - 15 - |
| 3.2.2 Reakční směs | - 15 - |
| 3.2.3 Podmínky PCR reakce | - 16 - |
| 3.2.4 Gelová elektroforéza | - 19 - |
| 4. Výsledky a diskuse | - 20 - |
| 5. Závěr | - 25 - |
| 6. Reference | - 26 - |

Seznam tabulek:

Tabulka 1 – seznam použitých primerů

Tabulka 2 – složení reakční směsi

Seznam obrázků (a grafů):

Obrázek 1 – životní cyklus kloše jeleního (*Lipoptena cervi* Linn. 1758)

Obrázek 2 – místa sběru kloše ovčího a kloše jeleního

Obrázek 3 – zobrazení podmínek PCR reakce pro bakterie rodu *Bartonella*

Obrázek 4 - zobrazení podmínek PCR reakce pro *Candidatus Neohrlichia mikurensis*

Obrázek 5 - zobrazení podmínek PCR reakce pro *Rickettsia helvetica*

Obrázek 6 - zobrazení podmínek PCR reakce pro *Anaplasma phagocytophilum*

Obrázek 7 – zobrazení výsledků PCR testu na přítomnost bakterií rodu *Bartonella* pro vzorky 1-13

Obrázek 8 – grafické znázornění prevalence bakterií rodu *Bartonella* u kloše ovčího

Obrázek 9 – grafické zobrazení výsledků testování klošů ovčích, pocházejících z ovce č. 1

Obrázek 10 - grafické zobrazení výsledků testování klošů ovčích, pocházejících z ovce č. 2

Obrázek 11 - grafické zobrazení výsledků testování klošů ovčích, pocházejících z ovce č. 3

Obrázek 12 - grafické zobrazení výsledků testování klošů ovčích, pocházejících z ovce č. 4

Obrázek 13 – prevalence bakterií rodu *Bartonella* podle lokality

1. Úvod

1.1 Klošovítí (Hippoboscidae)

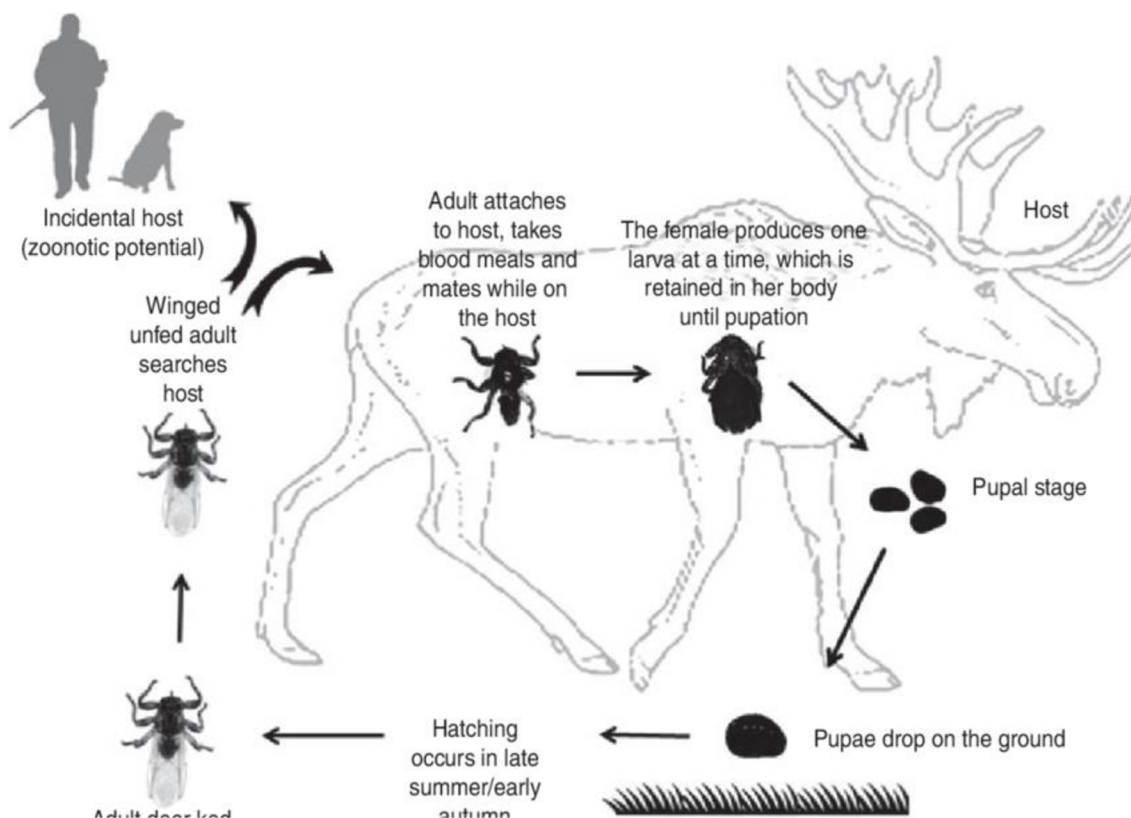
Klošovítí (Hippoboscidae) jsou čeledí, patřící do řádu dvoukřídlých (Diptera). Dělí se na tři podčeledi – Lipoptenae, Ornithomyinae a Hippoboscinae. Zástupci této čeledi jsou hemofágní živočichové, živící se krví savců (Mammalia) a ptáků (Aves). Jednotliví zástupci jsou přizpůsobeni různým druhům hostitelů. Například kloši, parazitující na ptácích, mají tenké a dlouhé končetiny, uzpůsobené pohybu v peří. Proti tomu druhy, živící se krví savců, mívají končetiny kratší, robustnější a někteří na nich mívají ještě výrůstky, které jim pomáhají se v srsti hostitele udržet. Některé druhy klošovitých si zachovávají křídla po celý život (např. *Hippobosca equina*, Linn. 1758), některé je v průběhu života ztrácí (např. *Lipoptena cervi*, Linn. 1758) a některé je nemají vůbec (např. *Melophagus ovinus*, Linn. 1758) (Small 2005). Jejich biologické i behaviorální vlastnosti, jako je závislost na hostiteli, sání krve a obligátně parazitický způsob života, je předurčují pro přenos a rozmnožování mnoha patogenů. Jejich význam z pohledu lidské medicíny také není zanedbatelný, protože v některých případech jsou schopni kousnutí, případně sání krve i na lidském hostiteli (Bezerra-Santos & Otranto 2020). Jejich zoonotický potenciál je tedy jedním z důvodů, proč by měla být tato problematika hlouběji prozkoumána.

U mnoha druhů klošovitých již byla dokázána přítomnost různých vektory přenášených patogenů. Například *Lipoptena capreoli* přenáší prvoka *Trypanosoma theodori* u koz, *Melophagus ovinus* přenáší *T. melophagium* u ovcí a *H. equina* přenáší *T. theileri* a *Corynebacterium pseudotuberculosis* u dobytka (Small 2005). Mezi další patogeny, přenášené zástupci čeledi Hippoboscidae patří například bakterie z rodů *Bartonella* (Halos et al. 2004), *Borrelia*, *Anaplasma*, *Rickettsia* (Dibo et al. 2023) nebo *Babesia* (Gałęcki et al. 2021). Kromě toho existuje ještě velké množství patogenů, které by klošovítí mohli přenášet, ale o kterých zatím není dostatek materiálů. Mezi ně spadá

např. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, protozoální parazité z rodu *Babesia* nebo bakterie z rodu *Ehrlichia*.

1.1.1 Kloš jelení (*Lipoptena cervi*)

Tento zástupce čeledi Hippoboscidae se vyskytuje zejména v oblastech Severní Ameriky, Evropy, Afriky a Asie (Madslien et al. 2012). Jeho životní cyklus je závislý na hostiteli z čeledi jelenovitých (Cervidae) - např. jelen evropský (*Cervus elaphus*) (Szewczyk et al. 2017), srnec obecný (*Capreolus capreolus*), daněk evropský (*Dama dama*) nebo los evropský (*Alces alces*) (Regier et al. 2018). Samice od podzimu do jara klade do srsti hostitele larvy ve 3. vývojovém stádiu. Zárodky po zakuklení ze srsti odpadnou na zem, kde zůstávají až do chvíle, kdy jim narostou křídla a stanou se z nich dospělí jedinci. To nastává v našich podmínkách od léta do začátku podzimu. V této fázi se ukrývají ve vegetaci a čekají na příchod hostitele (Härkönen & Kaitala 2013). Sice je kloš jelení primárně parazitem jelenovitých (Regier et al. 2018), nicméně když se přiblíží živočich, který s touto čeledí sdílí podobné znaky, může se stát, že tito kloši napadnou i jiný živočišný druh. Po přesunu na hostitele shodí kloš křídla a další fázi života tráví v srsti daného zvířete, kde se živí jeho krví. Příkladem dalších hostitelů jsou turovití (Bovidae), šelmy – psy, lišky (*Vulpes vulpes*) a jezevci (*Meles meles*), a prasatovití (Suidae) – prase divoké (*Sus scrofa*) (Kowal et al. 2016). Kromě toho může nastat i situace, kdy se kloš jelení zaměří na člověka.



Obrázek 2 – životní cyklus kloše jeleního (Korhonen et al. 2015)

Přímý vliv kloše jeleního na zdraví není jednoznačný. Např. v případě losů napadení jedinci nevykazují známky sníženého zdraví (Paakkonen et al. 2012), nicméně se u nich projevuje zvýšené vypadávání srsti (Madslie et al. 2012). Jeho funkce vektoru patogenů ovšem je již známá. V kloši jelením již byly detekovány např. spirochety *Borrelia burgdorferi* a bakterie z rodů *Bartonella*, *Anaplasma* nebo *Rickettsia*. (Dibo et al. 2023). Mnohé studie dokazují, že kloš jelení může být nositelem zoonóz, nemocí přenosných ze zvířat na lidi (de Bruin et al. 2015).

1.1.2 Kloš ovčí (*Melophagus ovinus*)

Tento bezkřídlý zástupce čeledi Hippoboscidae se nachází především na ovci domácí a to po celém světě. Mimo to je také možné ho nalézt například u koz (*Capra aegargus*), králíků (*Oryctolagus cuniculus*), psů (*Canis lupus f. familiaris*), tibetských antilop (*Pantholops hodgsonii*), zubrů (*Bison bonasus*) nebo lišek (*Vulpes vulpes*). Kromě toho se příležitostně nachází i na lidech (Zhang et al. 2021). Dříve byl považován za jeden z podstatných vektorů patogenů u ovcí, v poslední době už je tak ovšem vnímán čím dál méně, protože na něj působí běžné odčervovací prostředky, a tudíž přestává být tak

závažným problémem. Celý životní cyklus *M. ovinus* probíhá v srsti hostitele, kde samička naklade vždy jednu larvu, která se poté velmi rychle zakuklí a během následujících 19-30 dní se vyvine v dospělého jedince. Rychlost vývoje je ovlivněna teplotou, v ideálním případě by se měla pohybovat mezi 20° a 30° C (Small 2005).

Kloš u ovcí způsobuje problémy, jako je podráždění kůže a ztráta krve. Podráždění kůže vede k drbání a odírání srsti, ztráta krve způsobuje anémii, snížení růstu a pokles produkce. V minulosti byl kloš ovčí zkoumán kvůli jeho vlivu na welfare ovcí, nicméně v posledních letech přestává být jeho vliv tak významný. Podstatným důvodem je to, že byly vyvinuty antiparazitární přípravky v podobě repelentů i odčervovacích přípravků (Ivermectin), které proti kloši ovčímu zabírají (Small 2005).

Mezi patogeny, přenášené klošem ovčím, patří např. *Candidatus Bartonella melophagi*, bakterie z rodu *Anaplasma* nebo protozoání parazit *Theileria ovis*.

1.2 Kloši přenášené patogeny

Klošovité jsou známí jako přenašeči onemocnění v rámci jednotlivých druhů zvířat i mezidruhově. Jejich vliv na přenos bakterií z rodů *Anaplasma*, *Bartonella*, *Borrelia* a *Rickettsia* byl již dokázán (Dibo et al. 2023; Bezerra-Santos & Otranto 2020). Existuje ovšem řada dalších patogenů, nacházejících se v těle hostitelů, o kterých zatím výzkum neproběhl. Mnoho z těchto patogenů je přenášených klíšťaty (Ixodida) a jinými členovci (Arthropoda), kteří s kloši sdílí stejné hostitele. Dá se tedy předpokládat jejich výskyt i u klošovitých, případně také možnost přenosu pomocí klošovitých. Mezi tyto zatím nepotvrzené patogeny patří např. *Candidatus Neohrlichia mikurensis* nebo bakterie rodu *Ehrlichia*.

1.2.1 Bakterie rodu *Bartonella*

Tyto krví přenosné, intracelulární, gram-negativní bakterie, patřící do čeledi Brucellaceae, se ve velké míře vyskytují v krvi divoce žijících i domestikovaných obratlovců. Nejčastější výskyt je zaznamenán u hlodavců (Rodentia), přežvýkavců (Ruminantia) a šelem (Carnivora). U zvířat se vyskytují nejčastěji asymptomaticky v krvi, odkud mohou být pomocí vektorů (klíšťata, klošovité) přenášeny mimo jiné i na člověka. Ve vybraných populacích hlodavců, koček, jelenů a krav je prevalence bakterií rodu *Bartonella* až 95 % (Breitschwerdt & Kordick 2000). Zatím bylo izolováno skoro 20 druhů bartonell., pro člověka jsou nejvýznamnější *Bartonella henselae*, *B. quintana* a *B. baciliformis* (Mada et al. 2023).

Nemoci, způsobené bakteriemi z rodu *Bartonella* se obecně nazývají bartonelózy. Pod ně spadají např. zákopová horečka (*B. quintana*), nemoc z kočičího škrábnutí (*B. henselae*) (Mada et al. 2023), Carrionova choroba a její chronická podoba verruga perruviana, způsobená *B. baciliformis* (Minnick et al. 2014). Bakterie rodu *Bartonella* v lidském těle napadají hematopoetické kmenové buňky typu CD34+ (Mändle et al. 2005).

Zákopová horečka, způsobená *B. quintana*, se objevuje od začátku 20. století po celém světě. Přenášena je za pomoci hematofágních vektorů, hlavní roli zřejmě při přenosu hraje veš, *Pediculus humanus v. corporis*. Největší epidemie proběhly během 1. a 2. světové války, nyní se tato nemoc vyskytuje především u lidí bez domova, se špatnými hygienickými návyky a sklonem k alkoholismu. Byly zaznamenány čtyři

odlišné druhy projevů nemoci – jednodenní horečná epizoda, vícedenní horečné období, trvající většinou přibližně 5 dní, opakující se horečné periody, střídající se přibližně v pětidenních intervalech s bezpříznakovým obdobím a dlouhotrvající horečnaté období, trvající často několik měsíců. Dalšími příznaky jsou například zánět spojivek, myalgie, bolesti hlavy a další (Ohl & Spach 2000).

Carrionova choroba se vyskytuje pouze v jižní Americe, v oblasti Ekvádoru, Kolumbie a Peru. Projevuje se dvěma syndromy, které se mohou vyskytovat buď samostatně, nebo postupně. Jedním z nich je horečka Oroya při které napadení erytrocytů způsobuje hemolytickou anémii, s dalšími projevy jako je horečka, žloutenka a myalgie. V mnoha případech se přidružují ještě sekundární infekce, které jsou až v 88 % případů fatální, pokud je nemoc neléčená. Druhým syndromem je verruga peruviana, česky také nazývaná peruviánská bradavice. Ta se projevuje jako krví naplněné nádory v kůži. Tato varianta Carrionovy choroby bývá málokdy fatální, nicméně může způsobit krvácení a následné jizvy v místě nádoru. Takto postižení jedinci mohou v případě pokousání hmyzem fungovat jako přenašeči nákazy. Vektorem tohoto onemocnění je koutule z podčeledi z podčeledi Phlebotominae (Minnick et al. 2014).

Na rozdíl od Carrionovy choroby nemá nemoc kočičího škrábnutí geograficky omezené místo výskytu. Přenašeči tohoto celosvětově rozšířeného onemocnění jsou kočky a kočičí blechy (*Ctenocephalides felis*), kromě nich také klíšťata, vši, komáři a zástupci čeledi Tombiculidae. Kočky bývají bezpříznakovými přenašeči, *Bartonella* u nich ovšem může občas i způsobovat záněty. Mezi projevy u lidí patří infekce v místě rány a zduření okolních lymfatických uzlin. Mohou se vyskytnout také horečky, malátnost a napadení vnitřních orgánů, ovšem tyto projevy nejsou časté. Kromě lymfatického systému bývá často napadáno oko, případně také nervový systém (Mada et al. 2023).

1.2.2 Bakterie rodu *Borrelia*

Existují dvě nemoci, způsobené bakteriemi rodu *Borrelia*. Jednou z nich je Lymfská borelióza, způsobená bakteriemi ze skupiny *Borrelia burgdoferi* sensu lato. a druhou je návratná horečka (Cutler et al. 2017), způsobená např. *B. recurrentis*, *B. myanmotoi*, *B. hermsii*, *B. turicatae* a *B. parkeri* (Snowden et al. 2023). Zároveň mezi spirochety rodu *Borrelia* patří ještě dva intermediární druhy – *Borrelia turcica* a *Candidatus Borrelia tachyglossi*. Tyto dva druhy mají za hostitele primárně plazy (Reptilia) a ježury (Tachyglossidae) (Margos et al. 2018). Reakce lidského organismu na bakterie rodu *Borrelia* je pravděpodobně následkem imunopatologických mechanismů založených na imunologické křížové reakci mezi borreliemi a lidskými antigeny (Herrmann 1995).

Lymfská borelióza je nemocí, rozšířenou po celém světě. Je způsobena bakteriemi z komplexu *Borrelia burgdoferi* sensu lato, kam spadá 18 druhů borrelií, z nichž některé jsou spojovány pouze s Eurasií (např. *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. japonica*, *B. sinica*), některé pouze s Amerikou (*B. americana*, *B. andersonii* aj.) a pouze několik druhů, společných pro oba kontinenty – *B. burgdoferi* sensu stricto, *B. bissettii* a *B. carolinensis* (Rudenko et al. 2011). Hlavními rezervoáry jsou jeleni (Cervidae), hlodavci (Rodentia) a klíšťata (Ixodida). U člověka, jakožto nepůvodního hostitele, způsobují tyto bakterie multisystemickou infekci. Samotnou nákazu pak lze rozdělit na tři fáze. V první fázi se v místě bodnutí objevuje erythema migrans, kde se bakterie šíří pod kůží a odpovídají za lymfocytární infiltraci. V druhé fázi přestává být *Borrelia* spp. detekovatelná v krvi a v malém množství se nachází v myokardiu, sítnici, kloubním mazu, slezině, játrech, mozkových plenách a v mozku. Tato fáze se projevuje horečkami, slabostí a bolestmi svalů a kloubů. Poslední fáze již je trvalá, její projevy jsou artritida, neuroborelióza a Herxheimerova nemoc (acrodermatitis chronica atrophicans). Napadá při tom centrální i periferní nervovou soustavu (Herrmann 1995).

Návratná horečka je nemoc nejčastěji se vyskytující v chudých, přelidněných oblastech u lidí se špatnou osobní hygienou. Přenáší se díky hematofágním vektorům – např. klíšťatům a vším. Je považována za lidské onemocnění, ovšem vzhledem k přítomnosti patogenu u klíšťat se nedá vyloučit význam volně žijících obratlovců při přenosu. Má projevy podobné malárii. Vraccující se horečky, zimnice a malátnost jsou nejčastějšími problémy, které se při tomto onemocnění vyskytují. Vektory, přenášeující onemocnění a konkrétní druh borrelií se může lišit podle geografické polohy. *Borrelia*

recurrensis je typickým původcem tohoto onemocnění v oblastech severní a východní Afriky, zatímco *B. hermsii*, *B. turicatae* a *B. parkeri* bývají k nalezení zejména v oblasti Spojených Států Amerických (Snowden et al. 2023). Přítomnost spirochet *Borrelia myanmotoi* byla prokázána i u klíšťat (*Ixodes ricinus*) z oblasti Hradce Králové v České republice. Z toho vyplývá, že existuje riziko nakažení i v našich podmínkách, přestože zatím nebyl nahlášen žádný případ onemocnění (Bubanová et al. 2022).

1.2.3 Bakterie rodu *Rickettsia*

Bakterie rodu *Rickettsia* jsou obligátní, intracelulární, gram-negativní bakterie, jejichž výskyt je datován již do doby starověkého Řecka (Kulkarni 2011; Blanco & Oteo 2006). První pravděpodobná zmínka o epidemii rickettsiózy je již kolem roku 429 př. n. l., kdy vypukla epidemie tyfu (*Rickettsia prowazekii*) v Athénách. Rickettsiózy se dají rozdělit do tří skupin podle typu projevů – tyfové horečky, skvrnité horečky a křovinný tyf (Blanco & Oteo 2006). Obecně se dá říct, že mezi projevy rickettsióz patří horečky, bolesti hlavy a vyrážky (Kulkarni 2011).

Nejvýznamnějším onemocněním, které bakterie rodu *Rickettsia* způsobují, je horečka skalistých hor (Rocky Mountain spotted fever, RMSF). Původcem této choroby je bakterie *Rickettsia rickettsii*, výskyt je omezený na oblast Severní a Jižní Ameriky. Mezi její hlavní projevy patří horečky, bolesti hlavy a vyrážka. Vyrážka začíná kolem zápěstí a kotníků a postupně se rozšiřuje směrem k trupu. Nastupuje ovšem teprve po několika dnech s horečkou, většina pacientů se proto na začátku potýká s chybnými diagnózami. U přibližně 15 % nakažených se vyrážka neobjevuje vůbec. Kromě těchto projevů se mohou vyskytnout symptomy postihující například gastrointestinální, nervovou nebo dýchací soustavu. V pozdějším stádiu se může vyskytnout nekróza kůže a gangrény. Vektorem *R. rickettsii* jsou různé druhy klíšťat (*Dermacentor variabilis*, *Dermacentor andersoni*, *Ambylomma americanum*), která nemoc přenáší ze zvířat na člověka. Nákaza může být přenesena i nepřímo, například při styku s trusem přenašečů (Gottlieb et al. 2018).

Dalším významným onemocněním je skvrnitá horečka, známá také pod jmény epidemický tyfus nebo vši skvrnivka, vši tyf nebo skvrnitý tyf, která je způsobená bakterií *Rickettsia prowazekii*. Přenáší se za pomoci vši šatní (*Pediculus humanus v. corporis*). Tato nemoc je úzce spojována s válkou, chudobou, hladomorem a přírodními

katastrofami. Hlavním zdrojem nákazy je člověk (Blanco & Oteo 2006). Mezi hlavní příznaky skvrnitého tyfu patří horečka, bolesti hlavy a končetin a myalgie. U 20–60 % nakažených vzniká přibližně pátý den nemoci vyrážka v podpaží. V případě, kdy je nemoc neléčená, přechází horečka přibližně po dvou týdnech, nicméně kompletní rekonvalescence nastává až za několik měsíců. V 13-30 % případů bývá neléčená nemoc smrtelná (Kelly et al. 2010). Bakterie mohou po prodělání skvrnitého tyfu v těle člověka přežívat latentně celý život, v případě stresu nebo oslabení organismu se pak znovuobjeví v podobě Brill-Zinsserovy choroby. Ta se projevuje podobně, jako akutní forma tyfu, ale příznaky jsou mírnější. Protože se *R. prowazekii* vyskytuje bakteriemicky v populaci, hrozí nakažení vši od člověka a možnost propuknutí epidemie kdekoliv na světě. Možnost nakažení vyvstává také při kontaktu s mrtvými přenašeči, případně s jejich trusem (Blanco & Oteo 2006).

Rickettsia helvetica je emergentním patogenem z kategorie skvrnitých horeček. Je spojována s projevy jako je horečka, meningitida a u pacientů s chronickou perimyokarditidou může způsobit náhlé úmrtí. Mezi její přenašeče patří zejména klíšťata (*Ixodes ricinus*) a další krev sající živočichové (Scarpulla et al. 2018). Jako rezervoár v přírodě slouží primárně srnec obecný (*Capreolus capreolus*).

1.2.4 Candidatus Neoehrlichia mikurensis

Tato zatím nekultivovaná bakterie, která spadá do skupiny blízké ehrlichiiám, je významným patogenem přenášeným klíšťaty v Evropě a v Asii. Rezervoárem tohoto onemocnění jsou hlodavci. Je široce rozšířená mezi domestikovanými i divokými savci a ptáky (Portillo et al. 2018). U lidí způsobuje zánětlivé onemocnění neoehrlichiozu. Příznaky tohoto onemocnění mohou být horečky, bolesti hlavy, slabost, myalgie, ataralgie a vaskulární příhody. Bakterie podle všeho útočí na vaskulární endotelové buňky (Ondruš et al. 2020). U lidí s oslabeným imunitním systémem se vyskytují vážnější problémy jako je vysoká horečka nebo tromboembolie (Wennerås 2015). Kromě člověka se nemoc vyskytuje také u psů, ostatní zvířata jsou pouze bezpříznakovými přenašeči (Ondruš et al. 2020).

Diagnostika nemoci je vzhledem k nemožnosti kultivace *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* v laboratorním prostředí komplikovaná. Nejúčinnější metodou se ukázalo být testování pomocí PCR (polymerase chain reaction) a sekvenční analýzy

16S rRNA. K diagnostice se využívá krev a kostní dřeň, diagnostika z mozkomíšního moku není využitelná (Portillo et al. 2018).

1.2.5 Bakterie rodu *Anaplasma*

Rod *Anaplasma* zahrnuje obligátní, intracelulární, gram-negativní bakterie, které způsobují nemoci divokých i domestikovaných zvířat a člověka po celém světě. Jednotlivé druhy se liší podle projevů, vektorů, geografického rozšíření i hostitelů. Největším savcím hostitelem anaplasem je podle všeho pes, u kterého se našli zástupci mnoha různých druhů - *A. bovis*, *A. ovis*, *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *A. marginale*, *A. capra* (El Hamiani Khatat et al. 2022).

Nejvýznamnější anaplazmózou z hlediska lidské medicíny je pravděpodobně lidská granulocytární anaplazmóza (human granulocytic anaplasmosis, HGA). Je způsobena bakterií *Anaplasma phagocytophilum*, dříve nazývanou *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophyla*. Jejimi nejčastějšími přenašeči jsou různé druhy klíšťat (včetně *Ixodes ricinus*). Rezervoárem bakterie *A. phagocytophilum* jsou v Americe křeček bělonohý (*Peromyscus leucopus*), čipmank žlutolící (*Neotamias ochrogenys*) a hlodavci rodu *Neotoma*, zatímco v Evropě jsou to hlavně ježci (rod *Erinaceus*) a veverka obecná (*Sciurus vulgaris*). Nemoc je rozšířená po Evropě, Asii a Severní Americe. Mezi její symptomy patří horečky, bolesti hlavy, únava, ztráta chuti k jídlu a další bolesti. Projevy mohou být mírné, ale obzvláště u starších osob, nebo osob se sníženou imunitou může být průběh nemoci vážný, vedoucí v některých případech až ke smrti (MacQueen & Centellas 2022). Problémy může *Anaplasma phagocytophilum* způsobovat ovšem i u zvířat, například u psů, ovcí nebo koní. U psů se granulocytární anaplazmóza projevuje letargií, horečkou, nechutenstvím, muskuloskeletální bolestí, problémy s chůzí a kulháním. Tato nemoc v těle způsobuje autoimunitní reakci, jejímž důsledkem je rozpad červených i bílých krvinek a krevních destiček (Diniz & Moura de Aguiar 2022).

Druhou nemocí zvířat i lidí, způsobenou bakterií z rodu *Anaplasma* – *A. platys*, je trombocytotrofní anaplazmóza (infekční cyklická trombocytopenie). Napadá psy, kočky, kozy, koně, krávy a lidi. Stejně jako *A. phagocytophilum* i *A. platys* byla původně zařazena mezi bakterie z rodu *Ehrlichia*. Jejím nejčastějším přenašečem je *Rhipicephalus sanguineus*, kromě něj pak ještě např. *R. turanicus*, *Ixodes persulcatus*, *I. ricinus*. V organismu způsobuje vracející se trombocytopenii, která se navenek nemusí projevit,

nicméně častými projevy jsou letargie a nechutenství, horečky, lymfadenopatie a petechie (Diniz & Moura de Aguiar 2022).

1.2.6 Bakterie rodu *Ehrlichia*

Bakterie rodu *Ehrlichia* jsou intracelulární, gram-negativní bakterie, rozšířené po celém světě. Jejich hlavními přenašeči jsou klíšťata (Ixodida). Mezi nejdůležitější zástupce v oblasti lidské medicíny patří *E. chaffeensis* a *E. ewingii*, v oblasti veterinární medicíny je nejpodstatnějším zástupcem *E. canis* (Snowden et al. 2023).

Ehrlichia chaffeensis je známá jako původce lidské monocytické ehrlichiozy (human monocytic ehrlichiosis, HME). Tato nemoc se projevuje horečkou, trombocytopenií, leukopenií, změnami srážlivosti krve, hepatické a neurologické komplikace. Pro 1–3 % nakažených je nemoc smrtelná (Alcántara-Rodríguez et al. 2020). Za hlavní rezervoár tohoto patogenu je považován jelenec běloocasý (*Odocoileus virginianus*). Hlavním vektorem je klíště americké (*Amblyomma americanum*), nicméně *E. chaffeensis* byla detekována i u dalších druhů klíšťat (Yabsley 2010).

E. canis je bakterií, která napadá krevní destičky, monocyty a neutrofilní granulocyty psů domácích (*Canis lupus* f. *familiaris*) a způsobuje psí monocytickou ehrlichiozu. Je rozšířená po celém světě, nejčastěji se vyskytuje v oblasti tropů a subtropů (Skotarczak 2003). V divoké přírodě ji lze najít nejčastěji u medvídkovitých (Procyonidae) a lišek (*Vulpes vulpes*). Lišky fungují jako rezervoár v oblasti středozemního moře, v Severní Americe je to mýval severský (*Procyon lotor*) a v Jižní Americe nosál červený (*Nasua nasua*). Přenos *E. canis* na člověka způsobují především klíšťata (André 2018). Infekce má tři fáze – akutní, subklinickou a chronickou. V akutní fázi se mohou objevovat horečky, deprese, dušnost, anorexie a mírný úbytek váhy. Při laboratorním vyšetření bývá zjištěna trombocytopenie, leukopenie, mírná anémie a hypergammaglobulinémie. Subklinická fáze přichází po akutní fázi a jediným projevem je trombocytopenie při laboratorním vyšetření krve. Tato fáze trvá minimálně 40 dní, ovšem může trvat i roky. Klinické příznaky se žádné nevyskytují, nicméně bakterie se v těle stále vyskytuje. V poslední, chronické fázi se vyskytuje hemoragie a edém. Laboratorní výsledky jsou v chronické fázi podobné výsledkům akutní fáze. Mimo jiné v této fázi může nastat hypoplazie kostní dřeně, což u mnoha psů vede k postupnému zhoršování zdravotního stavu (Skotarczak 2003).

Patogen *Ehrlichia ewingii* může způsobovat nemoc, zvanou granulocytická ehrlichioza. Mezi její nejčastější příznaky patří horečky, zimnice, bolesti hlavy, malátnost, myalgie a nevolnosti. Při laboratorním vyšetření bývá častý výskyt leukopenie, trombocytopenie a zvýšená hladina aminotransferáz v krvi. Narozdíl od *E. chaffeensis* se u pacientů většinou nevyskytuje vyrážka a nemoc mívá mírnější průběh. Většina nakažených, u kterých se granulocytická ehrlichioza projevila, se řadí mezi jedince s oslabeným imunitním systémem – např. onkologičtí pacienti nebo osoby nakažené HIV (Drexler et al. 2016).

2. Cíle práce

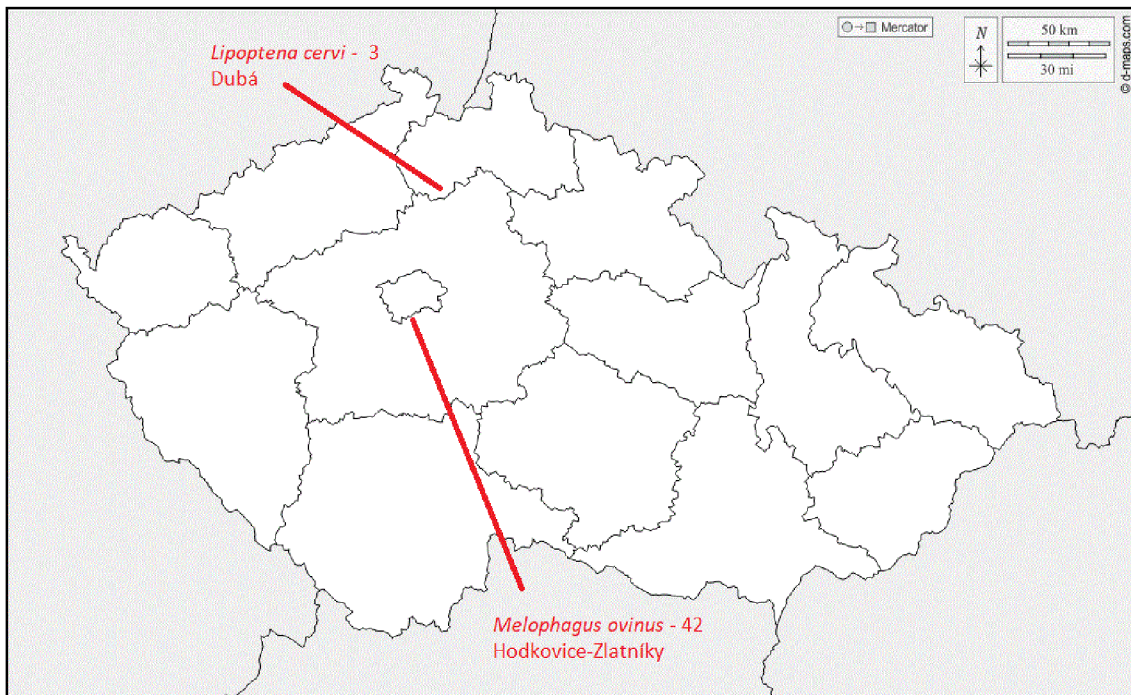
Klošovité (Diptera, Hippoboscidae) jsou krev sající skupinou hmyzu, která parazituje především na zvířatech (Mammalia, Aves), v ojedinělých případech se ale mohou pokusit sát i na lidech. Význam klošů jako přenašečů různých onemocnění byl v minulosti opomíjen, ale v posledních letech bylo prokázáno, že mohou přenášet mnoho důležitých patogenů (např. bakterie rodu *Bartonella*, *Rickettsia* nebo *Borrelia*). Cílem této práce bylo připravit literární přehled kloši přenášených nálezů a provést experimentální detekci bakterií z rodu *Bartonella*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia helvetica* a *Candidatus Neohhrlichia mikurensis* v kloši jelením (*Lipoptena cervi*) a kloši ovčím (*Melophagus ovinus*).

3. Metodika

3.1 Sběr vzorků

Sběr vzorků *Melophagus ovinus* probíhal 25. dubna 2022 ve vesnici Hodkovice-Zlatníky, v okrese Praha-Východ za asistence chovatelky. Ve stádě bylo 5 ovcí, vzorky klošů pocházejí ze 4 z nich. Na první ovci bylo 22 klošů, na druhé 9, na třetí 3 a na čtvrté 8. Všichni kloši byli sbíráni zaživa, lezoucí v srsti, případně během sání. Sběr vzorků probíhal před stříháním a odčervením ovcí, v ideálních podmínkách pro vývoj kloše ovčího.

Kloši jelení (*L. cervi*) se nacházeli ve smíšených lesích nedaleko obce Dubá v severních Čechách. Sbíráni byli 31. srpna 2022 volně v přírodě, ještě před nalezením vhodného hostitele. Jedinci byli všichni vylíhnutí, okřídlení dospělci.



Obrázek 3 – místa sběru kloše ovčího a kloše jeleního

Všechny vzorky byly do zpracování skladovány při teplotě přibližně -19 °C. Statistická data byla zpracována v aplikaci Microsoft Excel, kde byly vytvořeny potřebné tabulky a grafy, využité v této práci.

3.2 Postup zpracování

K detekci patogenů, obsažených ve vzorcích kloše jeleního a kloše ovčího, byla využita metoda testování pomocí PCR (polymerase chain reaction). Aby bylo možné této metody využít, bylo potřeba nejdříve extrahovat genetický materiál ze vzorků za pomoci Geneaid genomic DNA mini kit. Postup probíhal podle instrukcí v manuálu výrobce, viz příloha 1 (Geneaid DNA mini kit – manuál).

3.2.1 Primery

Pro analýzu patogenů byly využity specifické primery, popsané v tabulce 1.

| | | | | |
|---------------------------|--------------------|------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| Patogen | Bartonella spp. | Candidatus Neoehrlichia mikurensis | Anaplasma phagocytophylum | Rickettsia helvetica |
| Gen | ITS | gltA | msp2 | gltA |
| Forward primer | QHVE1 | NMik fo-gltA | ApMSP2F | Rick_HelvgltA_F2 |
| Reverse primer | QHVE3 All species | NMik re-gltA | ApMSP2R | Rick_HelvgltA_R2 |
| Sekvence F primeru | TTCAGATGATGATCCCAA | aagtcgatgctttgctacatt | atggaaggtagtggttatggtatt | ATGATCCGTTTAGGTTAA TAGGCTTCGGTC |
| Sekvence R primeru | GATATATTCAGACATGTT | tcatgatctgatgtaaataaat | ttggtctgaagcgtcgta | TTGTAAGAGCGGATTGTT TTCTAGCTGTC |
| reference | Roux & Raoult 1995 | Jahfari et al. 2012 | Courtney et al. 2004 | de Bruin et al. 2015 |
| Očekávaná délka amplikonu | cca 1200-1500 bp | cca 200 bp | 77 bp | 123 bp |

Tabulka 1 – seznam použitých primerů

3.2.2 Reakční směs

Pro vytvoření reakční směsi bylo využito 2x PPP Master Mix (Top-Bio), obsahující Taq DNA polymerázu a optimalizovaný reakční pufr. Master Mix se přidal k templátu DNA, specifickým primerům pro daný patogen a k vodě bez obsahu nukleáz. Negativní kontrola byla vytvořena stejným způsobem, s tím rozdílem, že místo DNA byla do směsi přidána voda.

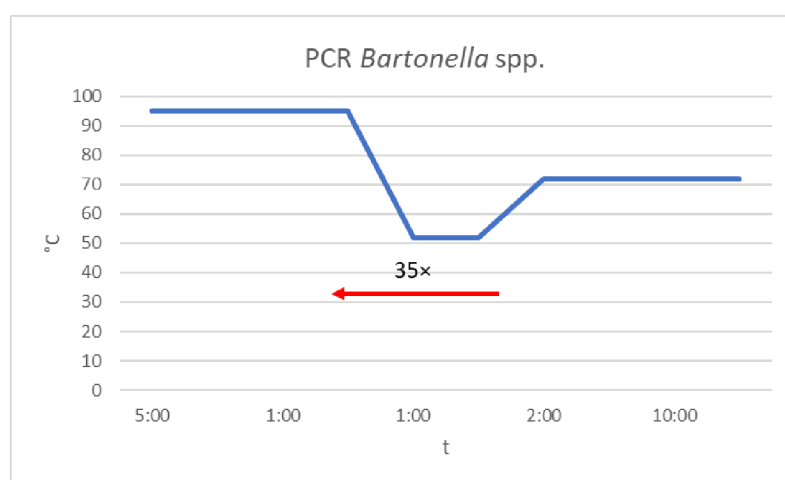
| | |
|-------------------|-----------|
| Sloupec1 | μl |
| 2x PPP Master Mix | 6 |
| Forward primer | 1 |
| Reverse primer | 1 |
| Voda | 12 |
| DNA | 5 |
| Celkem | 25 |

Tabulka 2 – složení reakční směsi

3.2.3 Podmínky PCR reakce

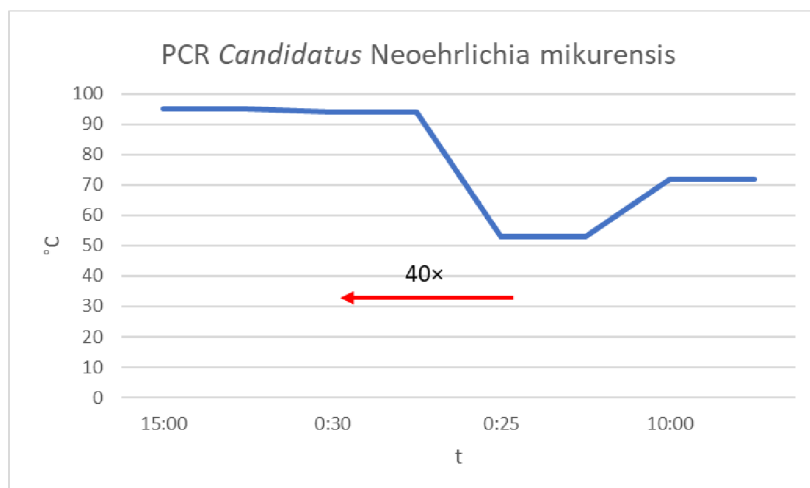
Reakce PCR probíhala v T100 thermal cycleru (BioRad) za podmínek specifických pro každý patogen.

Pro detekci bakterií rodu *Bartonella* probíhala úvodní denaturace 5 min při 95 °C, následně probíhalo 35 cyklů, kde se opakovala 1 min denaturace při 95 °C, annealing (nasedání primerů na řetěze DNA) 1 min při 52 °C a extenze (prodlužování DNA) 2 min při 72 °C. Závěrečná polymerační reakce probíhala 10 min při 72 °C (Roux & Raoult 1995).



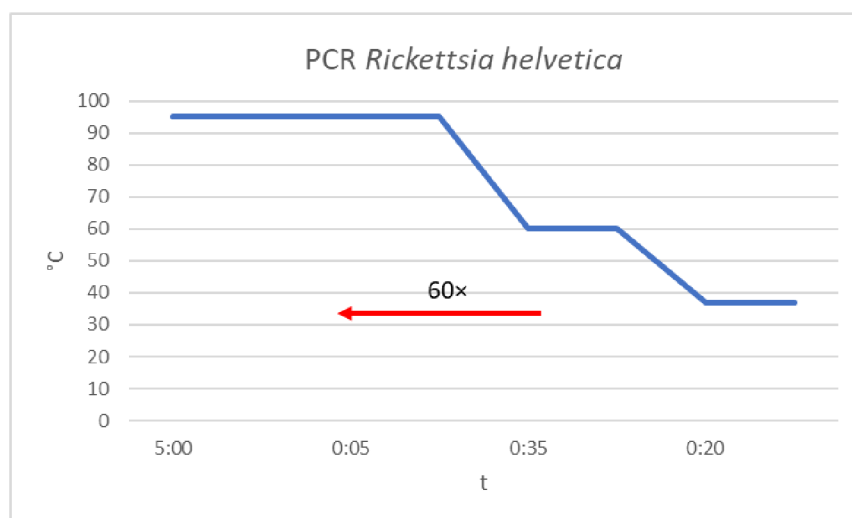
Obrázek 4 – zobrazení podmínek PCR reakce pro bakterie rodu *Bartonella*

U *Candidatus* *Neohrllichia mikurensis* probíhala počáteční denaturace 15 min při 95 °C, následně proběhlo 40 cyklů denaturace 30 s při 94 °C a annealing a extenze 25 s při 53 °C. Závěrečná polymerační reakce trvala 10 min při 72 °C (Jahfari et al. 2012).



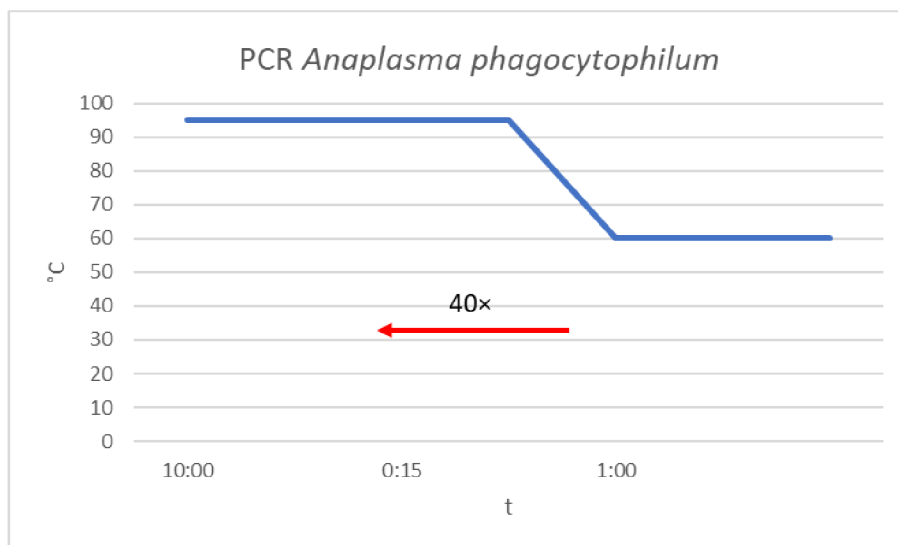
Obrázek 5 - zobrazení podmínek PCR reakce pro *Candidatus Neohrlichia mikurensis*

Počáteční denaturace pro *Rickettsia helvetica* trvala 5 min při 95 °C, následovalo 60 cyklů denaturace 5 s při 95 °C, annealing a extension 35 s při 60 °C a závěrečnou polymerační reakcí 20 s při 37 °C (de Bruin et al. 2015).



Obrázek 6 - zobrazení podmínek PCR reakce pro *Rickettsia helvetica*

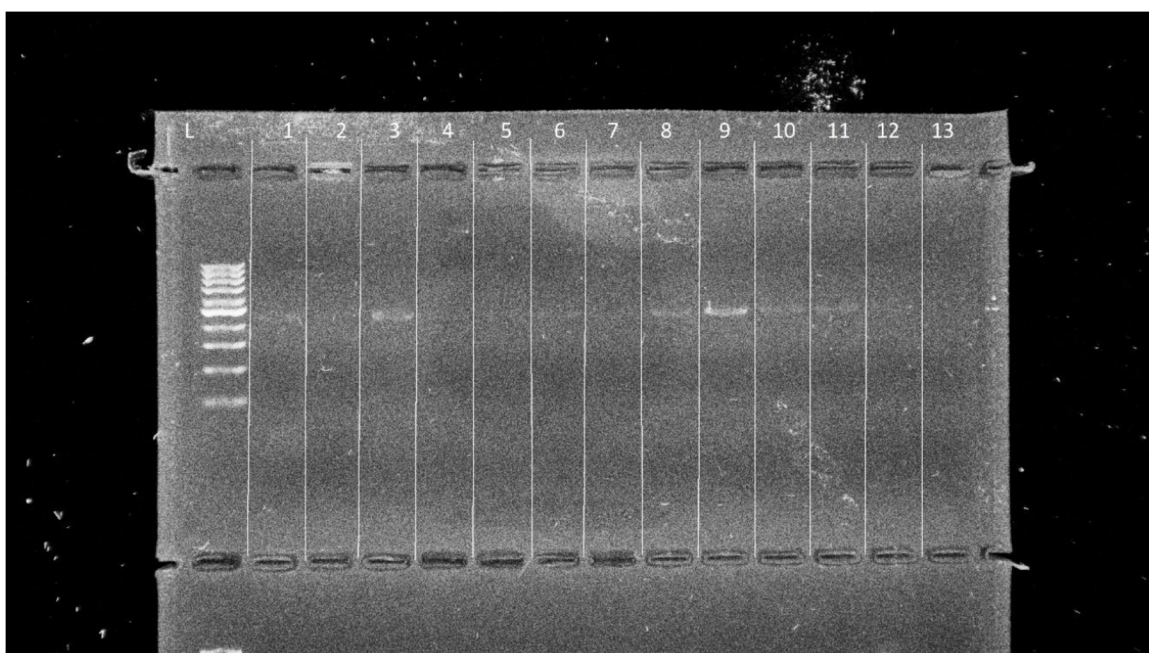
U *Anaplasma phagocytophilum* trvala počáteční denaturace 10 min při 95 °C a následovalo 40 cyklů denaturace 15 s při 95 °C a 1 min annealing s extenzí při 60 °C (Courtney et al. 2004).



Obrázek 7 - zobrazení podmínek PCR reakce pro *Anaplasma phagocytophilum*

3.2.4 Gelová elektroforéza

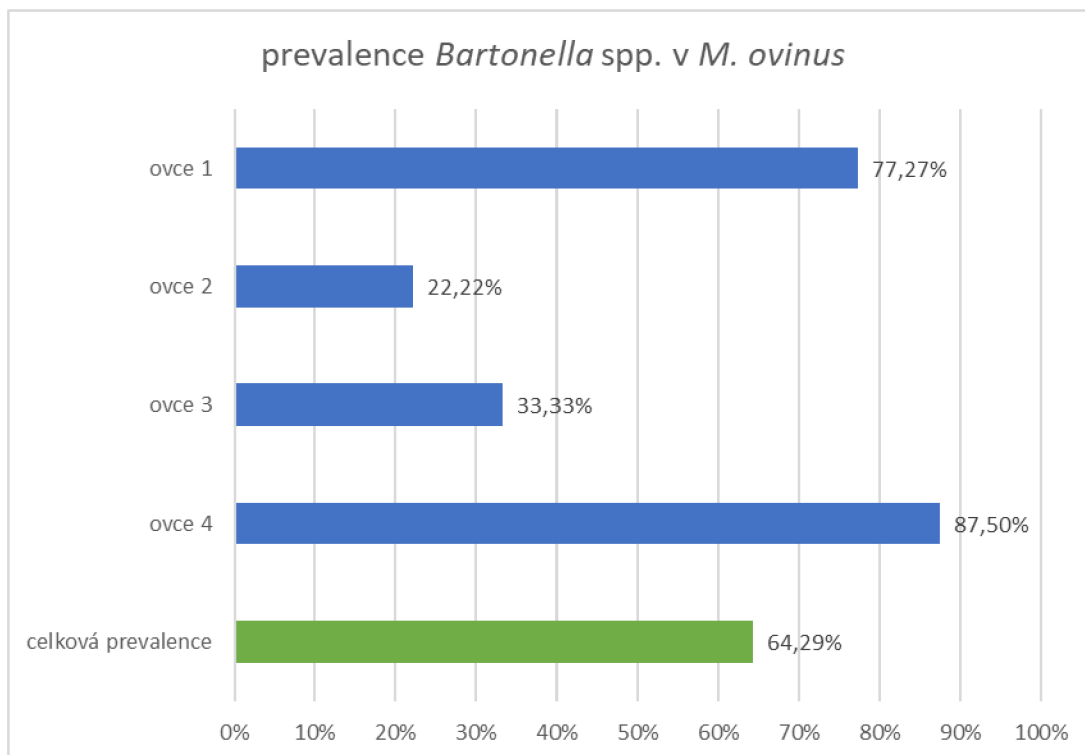
Zobrazení výsledků PCR proběhlo za pomoci gelové elektroforézy. Ve 100 ml TBE pufru bylo rozpuštěno 1,5 g agarózy. Do směsi bylo přidáno 2 μ l ethidium bromidu, aby bylo možné výsledky zobrazit. Elektroforéza probíhala pod napětím 95 V přibližně hodinu. Výsledky byly vizualizovány za pomoci UV transiluminátoru a vyfotografovány. Následná úprava a analýza fotografií probíhala na počítači v programech Photoshop a Malování.



Obrázek 8 – zobrazení výsledků PCR testu na přítomnost bakterií rodu *Bartonella* pro vzorky 1-13

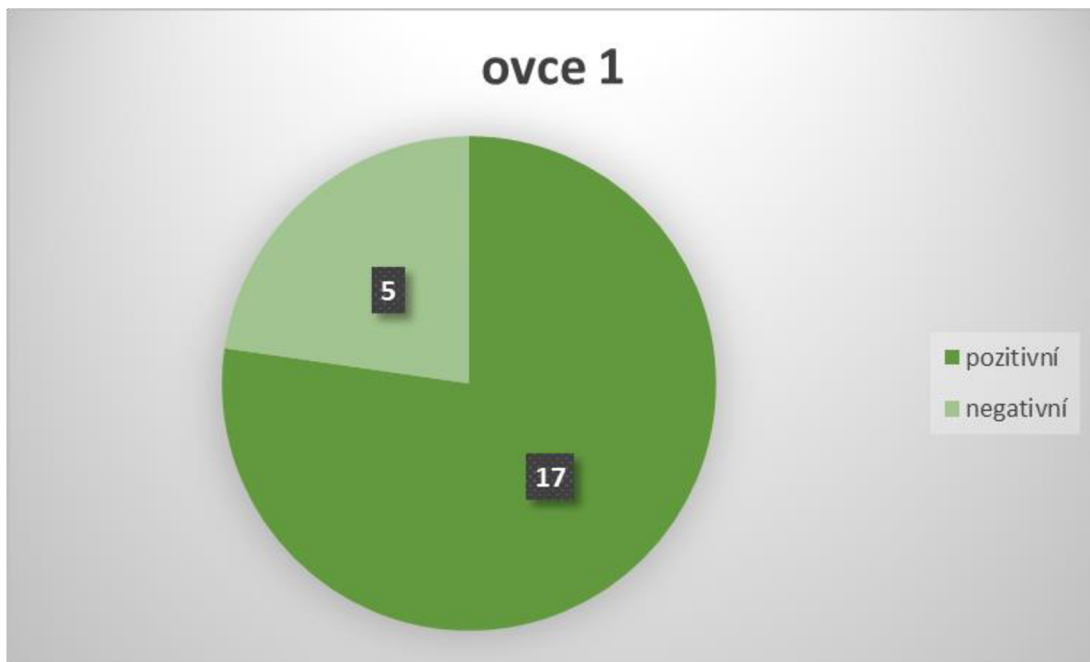
4. Výsledky a diskuse

Po zobrazení výsledků PCR bylo zřejmé, že žádný ze vzorků neobsahoval genom *Rickettsia helvetica*, *Anaplasma phagocytophilum* ani *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. Detekce bakterií rodu *Bartonella* byla úspěšná u 27 klošů ovčích. V případě *L. cervi* nebyl detekován žádný ze sledovaných patogenů.



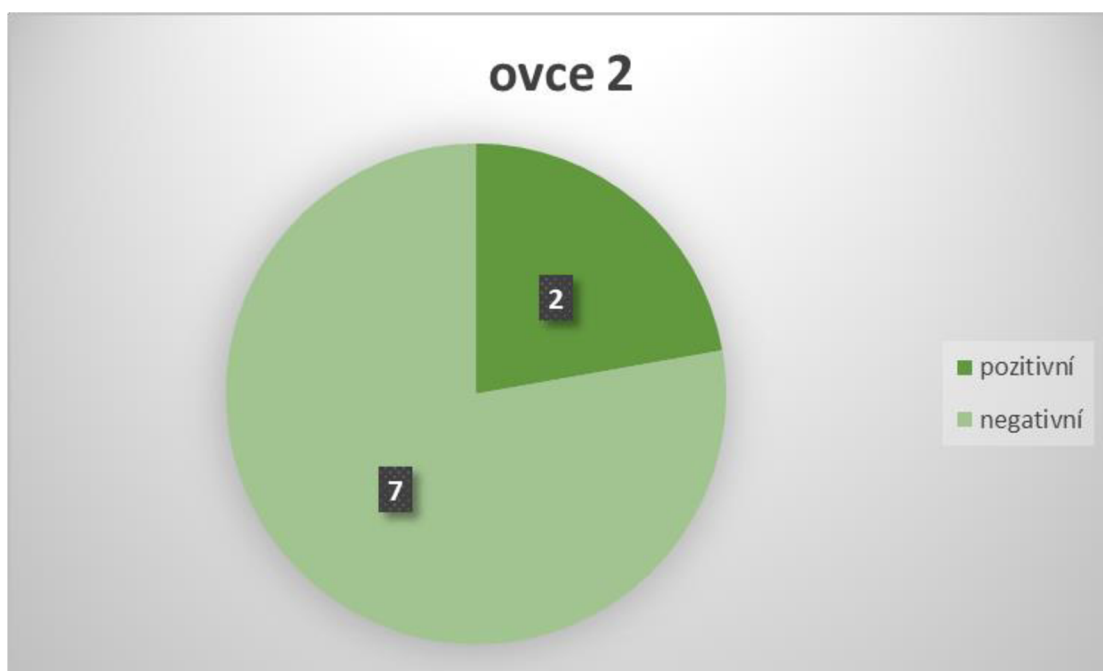
Obrázek 9 – grafické znázornění prevalence bakterií rodu *Bartonella* u kloše ovčího

Již u sběru vzorků byla zřejmá zhoršená kondice ovce č. 1, u které bylo nalezeno největší množství klošů ovčích. Pozitivně testovaných na přítomnost batronell bylo 17 z 22. Prevalence bartonell u těchto vzorků byla 77,27 %.



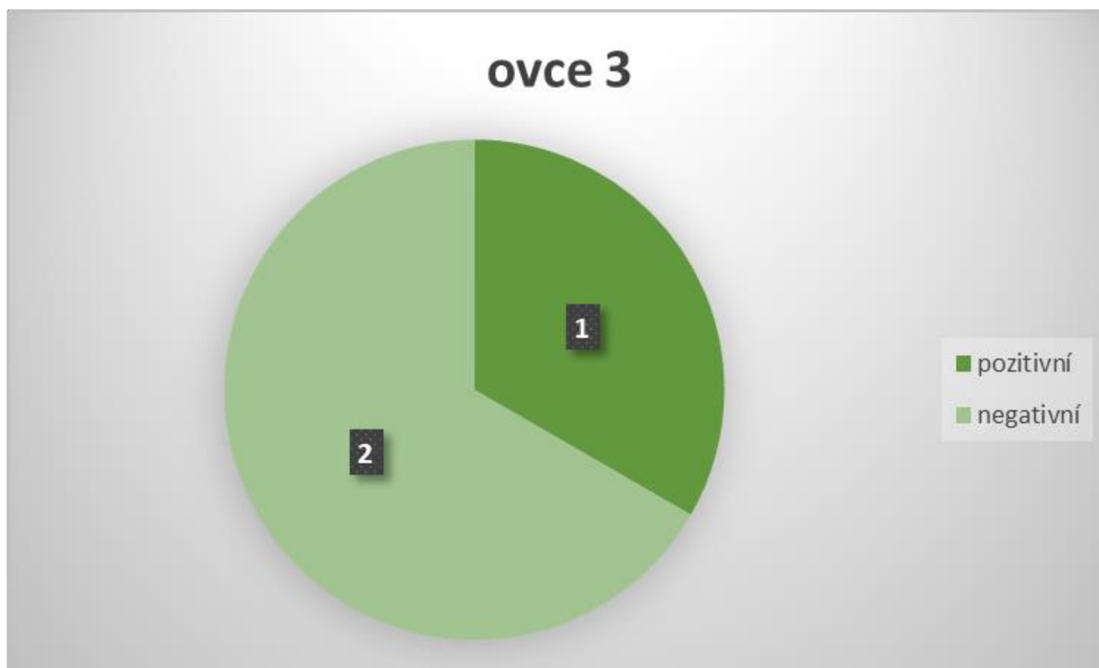
Obrázek 10 – grafické zobrazení výsledků testování klošů ovčích, pocházejících z ovce č. 1

U Ovce č. 2 z devíti klošů byli na přítomnost bartonell pozitivní pouze dva. Prevalence bartonell u této ovce je 22,22 %.



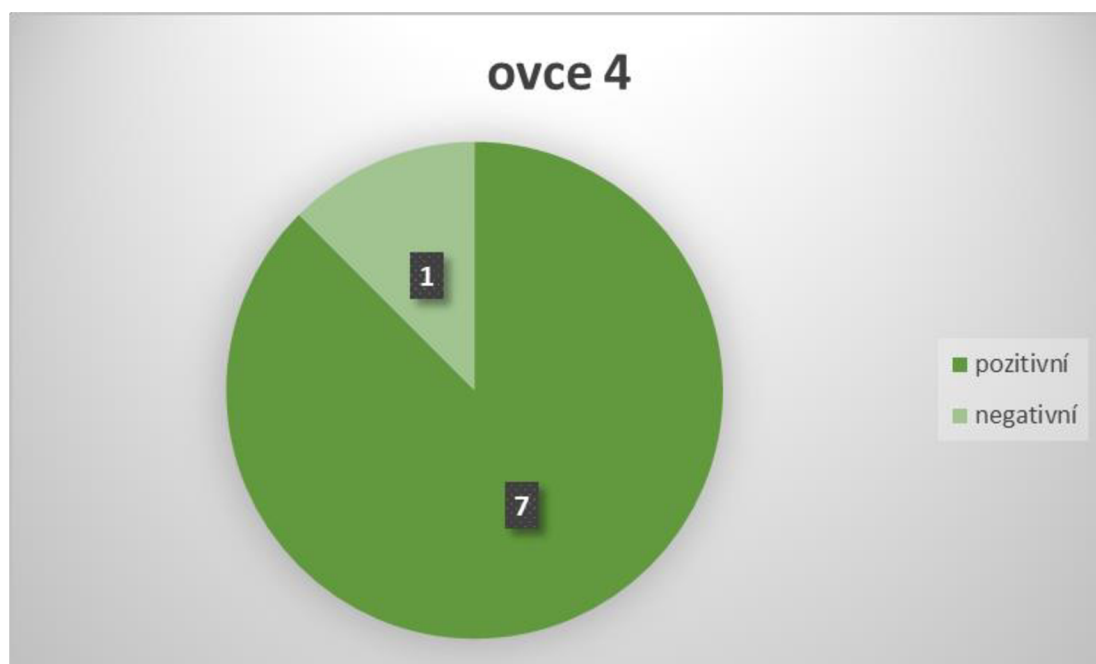
Obrázek 11 - grafické zobrazení výsledků testování klošů ovčích, pocházejících z ovce č. 2

U ovce č. 3 byly nasbírány pouze 3 vzorky, z nichž jeden vyšel na přítomnost bartonell pozitivní s hodnotou prevalence 33,3 %.



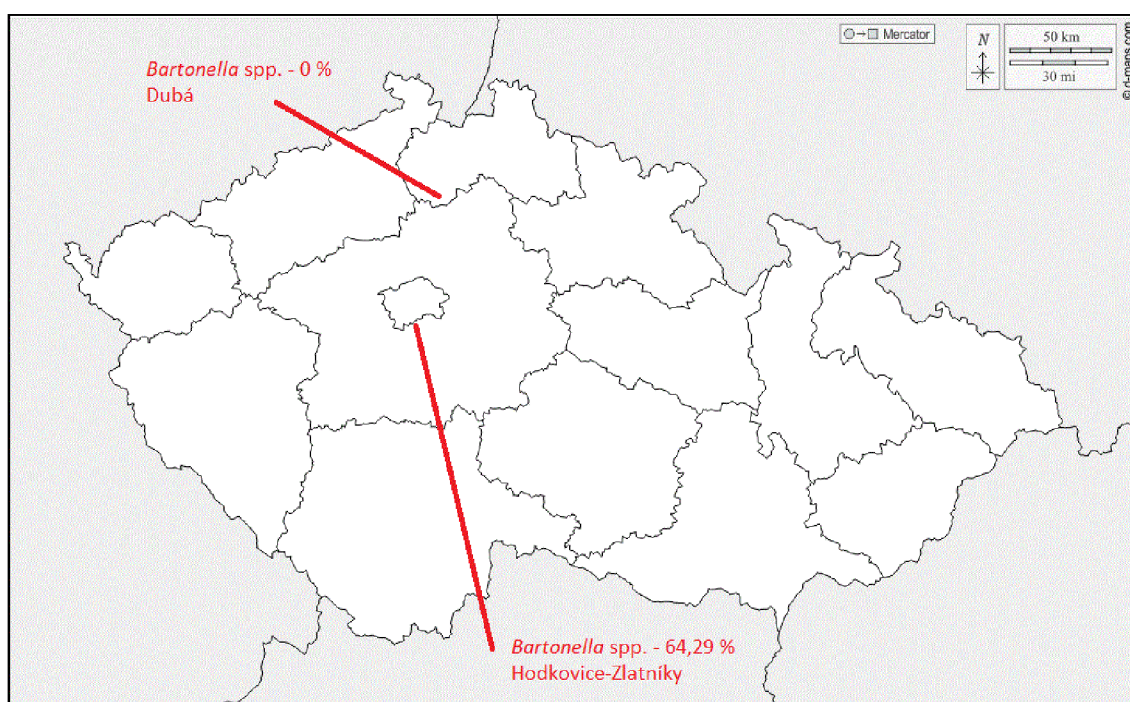
Obrázek 12 - grafické zobrazení výsledků testování klošů ovčích, pocházejících z ovce č. 3

Z ovce č. 4 bylo nasbíráno 8 vzorků kloše ovčího. Z tohoto počtu bylo 7 testovaných pozitivně na přítomnost bartonell. Prevalence tohoto patogenu zde je 87,5 %.



Obrázek 13 - grafické zobrazení výsledků testování klošů ovčích, pocházejících z ovce č. 4

Celková hodnota prevalence bartonell u *M. ovinus* je 64,29 %. Výzkum z roku 2014 z Etiopie uvádí prevalenci bartonell 88,6 % (Rudolf et al. 2016). Werszko et al. (2021) ve své práci na toto téma uvádí hodnotu 86,82 %. Jeho vzorky pocházely z ovčí, nacházejících se v Polsku. Rozdíl prevalence, naměřené v této práci, může být způsoben nízkým počtem vzorků kloše ovčího v porovnání s ostatními výzkumnými pracemi. Rudolf et al. (2016) ve své práci uvádí také, že jejich výzkum patogenů přenášených klošem ovčím neprokázal přítomnost *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, *Anaplasma phagocytophilum* a rickettsií. *A. phagocytophilum* nebyla prokázána ani v práci od Werszko et al. (2021), dá se tedy předpokládat, že tento patogen není pro kloše ovčího typický. Podle studie Hornok et al. (2011) se *Rickettsia helvetica* může u kloše ovčího vyskytovat, nicméně tento patogen se nachází primárně v krvi srnců, a tedy se objevuje častěji u kloše jeleního, který na daném hostiteli parazituje.



Obrázek 14 – prevalence bakterií rodu *Bartonella* podle lokality

Tento výzkum nepotvrdil, že by kloš jelení byl přenašečem bakterií z rodu *Rickettsia*, *Anaplasma* nebo *Bartonella*. Nicméně existují studie, které přítomnost těchto patogenů v kloši jelením potvrzují (Dibo et al. 2023; Bezerra-Santos & Otranto 2020). Patogen *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* u kloše jeleního v předchozích studiích detekován nebyl (de Bruin et al. 2015). Vliv na přítomnost patogenů ve vzorcích může

mít i to, že kloši byli sbíráni volně v přírodě, před tím, než stihli najít vhodného hostitele. Také by bylo užitečné získat větší množství vzorků pro zpřesnění statistických dat a ověření výsledků.

5. Závěr

Cílem této práce byla literární rešerše patogenů, přenášených zástupci čeledi Hippoboscidae a následná experimentální detekce vybraných z nich – bakterií rodu *Bartonella*, *Rickettsia helvetica*, *Anaplasma phagocytophilum* a *Candidatus Neohrlichia mikurensis*. Pro účely této studie byly vybrány dva druhy z čeledi Hippoboscidae, *Lipoptena cervi* a *Melophagus ovinus*.

U kloše ovčího byla detekována *Bartonella* spp. s celkovou prevalencí 64,29 %. Ostatní patogeny u *M. ovinus* detekovány nebyly. V kloši jelením nebyl detekovaný žádný ze sledovaných patogenů. Závěrem lze říci, že klošovití jsou vektory bakterií rodu *Bartonella*, a kvůli jejich schopnosti kousnutí člověka je možné je považovat za potenciální zoonotické vektory.

6. Reference

Alcántara-Rodríguez V, Sánchez-Montes S, Contreras H, Colunga-Salas P, Fierro-Flores L, Avalos S, Rodríguez-Rangel F, Becker I, Walker D. 2020. Human Monocytic Ehrlichiosis, Mexico City, Mexico. *Emerging Infectious Diseases* **vol. 26**:3016-3019. Available from http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/12/20-0520_article.htm (accessed 2023-04-07).

André M. 2018. Diversity of Anaplasma and Ehrlichia/Neoehrlichia Agents in Terrestrial Wild Carnivores Worldwide: Implications for Human and Domestic Animal Health and Wildlife Conservation. *Frontiers in Veterinary Science* **2018**:1. Available from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2018.00293/full> (accessed 2023-04-07).

Bezerra-Santos M, Otranto D. 2020. Keds, the enigmatic flies and their role as vectors of pathogens. *Acta Tropica* **2020**:1. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X20305027> (accessed 2023-04-07).

Blanco J, Oteo J. 2006. Rickettsiosis in Europe. *Annals of the New York Academy of Sciences* **vol. 1078**:26-33. Available from <http://doi.wiley.com/10.1196/annals.1374.003> (accessed 2023-04-03).

Breitschwerdt E, Kordick D. 2000. Bartonella Infection in Animals: Carriership, Reservoir Potential, Pathogenicity, and Zoonotic Potential for Human Infection. *Clinical Microbiology Reviews* **vol. 13**:428-438. Available from <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.13.3.428-438.2000> (accessed 2023-04-01).

Bubánová D, Fučíková A, Majláth I, Pajer P, Bjelková K, Majláthová V. 2022. The first detection of relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes ricinus* ticks from the northeast Czech Republic. *Ticks and Tick-borne Diseases* **vol. 13**. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X22001443> (accessed 2023-04-01).

Courtney J, Kostelnik L, Zeidner N, Massung R. 2004. Multiplex Real-Time PCR for Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Microbiology* **vol. 42**:3164-3168. Available from <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.42.7.3164-3168.2004> (accessed 2023-04-11).

Cutler S, Rudenko N, Golovchenko M, Cramaro W, Kirpach J, Savic S, Christova I, Amaro A. 2017. Diagnosing Borreliosis. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **vol. 17**:2-11. Available from <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2016.1962> (accessed 2023-03-28).

de Bruin A, van Leeuwen A, Jahfari S, Takken W, Földvári M, Dremmel L, Sprong H, Földvári G. 2015. Vertical transmission of *Bartonella schoenbuchensis* in *Lipoptena cervi*. *Parasites & Vectors* **vol. 8**. Available from <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-015-0764-y> (accessed 2023-03-26).

Dibo N, Yang Y, Wu X, Meng F. 2023. A brief review on deer keds of the genus *Lipoptena* (Diptera: Hippoboscidae). *Veterinary Parasitology* **vol. 313**:1. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401722002047> (accessed 2023-04-13).

Diniz P, Moura de Aguiar D. 2022. Ehrlichiosis and Anaplasmosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **vol. 52**:1225-1266. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195561622000894> (accessed 2023-04-05).

Drexler N, Dahlgren F, Nichols Heitman K, Behravesh C, Massung R. 2016. Increasing Incidence of Ehrlichiosis in the United States: A Summary of National Surveillance of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* Infections in the United States, 2008–2012. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **vol. 94**:52-60. Available from <https://ajtmh.org/doi/10.4269/ajtmh.15-0540> (accessed 2023-04-12).

El Hamiani Khatat S, Kachani M, Duchateau L, Elhachimi L, Sahibi H, Daminet S. 2022. *Anaplasma* spp in dogs: Is there a danger for humans?. *Revue Vétérinaire Clinique* **vol. 57**:1-15. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214567221000697> (accessed 2023-04-06).

Gałęcki R, Jaroszewski J, Bakula T, Galon E, Xuan X. 2021. Molecular Detection of Selected Pathogens with Zoonotic Potential in Deer Keds (*Lipoptena fortisetosa*). *Pathogens* **vol. 10**. Available from <https://www.mdpi.com/2076-0817/10/3/324> (accessed 2023-04-13).

Gottlieb M, Long B, Koyfman A. 2018. The Evaluation and Management of Rocky Mountain Spotted Fever in the Emergency Department: a Review of the Literature. *The Journal of Emergency Medicine* **vol. 55**:42-50. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0736467918302300> (accessed 2023-04-03).

Halos L, Jamal T, Maillard R, Girard B, Guillot J, Chomel B, Vayssier-Taussat M, Boulouis H. 2004. Role of Hippoboscidae Flies as Potential Vectors of Bartonella spp. Infecting Wild and Domestic Ruminants. *Applied and Environmental Microbiology* **vol. 70**:6302-6305. Available from <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.70.10.6302-6305.2004> (accessed 2023-04-13).

Härkönen L, Kaitala A. 2013. Months of Asynchrony in Offspring Production but Synchronous Adult Emergence: The Role of Diapause in an Ectoparasite's Life Cycle. *Environmental Entomology* **vol. 42**:1408-1414. Available from <https://academic.oup.com/ee/article-lookup/doi/10.1603/EN12147> (accessed 2023-03-25).

Herrmann J. 1995. Animal models and Lyme disease. *Clinical Microbiology and Infection* **vol. 1**:72-73. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X1465120X> (accessed 2023-04-01).

Hornok S et al. 2011. First Molecular Evidence of Anaplasma ovis and Rickettsia spp. in Keds (Diptera: Hippoboscidae) of Sheep and Wild Ruminants. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **vol. 11**:1319-1321. Available from <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2011.0649> (accessed 2023-04-13).

Jahfari S et al. 2012. Prevalence of Neoehrlichia mikurensis in ticks and rodents from North-west Europe. *Parasites & Vectors* **vol. 5**:1. Available from <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-5-74> (accessed 2023-04-11).

Kelly P, Angelakis E, Raoult D. 2010. Rickettsia and rickettsia-like organisms. Pages 1807-1816 in *Infectious Diseases*. Third Edition. Elsevier, Mosby. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323045797001763> (accessed 2023-04-03).

Korhonen E et al. 2015. Molecular detection of Bartonella spp. in deer ked pupae, adult keds and moose blood in Finland. *Epidemiology and Infection* **vol. 143**:578-585. Available from https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0950268814001411/type/journal_article (accessed 2023-04-03).

Kowal J, Nosal P, Kornaś S, Wajdzik M, Matysek M, Basiaga M. 2016. Biodiversity and importance of hippoboscids infection in cervids. *Medycyna Weterynaryjna* **vol. 72**:745-749. Available from <http://www.medycynawet.edu.pl/index.php/archives/388/5602-summary-med-weter-72-12-745-749-2016> (accessed 2023-03-26).

Kulkarni A. 2011. Childhood Rickettsiosis. *The Indian Journal of Pediatrics* **vol. 78**:81-87. Available from <https://link.springer.com/10.1007/s12098-010-0255-2> (accessed 2023-04-03).

MacQueen D, Centellas F. 2022. Human Granulocytic Anaplasmosis. *Infectious Disease Clinics of North America* **vol. 36**:639-654. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891552022000290> (accessed 2023-04-04).

Mada P, Zulfiqar H, Chandranesan A. 2023. Bartonellosis. *StatPearls* **2023**:1. StatPearls Publishing LLC. Available from https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430874/#_NBK430874_pubdet_ (accessed 2023-04-01).

Madslie K, Ytrehus B, Viljugrein H, Solberg E, Bråten K, Mysterud A. 2012. Factors affecting deer ked (*Lipoptena cervi*) prevalence and infestation intensity in moose (*Alces alces*) in Norway. *Parasites & Vectors* **vol. 5**. Available from <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-5-251> (accessed 2023-03-25).

Mändle T, Einsele H, Schaller M, Neumann D, Vogel W, Autenrieth I, Kempf V. 2005. Infection of human CD34+ progenitor cells with *Bartonella henselae* results in intraerythrocytic presence of *B. henselae*. *Blood* **vol. 106**:1215-1222. Available from <https://ashpublications.org/blood/article/106/4/1215/21539/Infection-of-human-CD34-progenitor-cells-with> (accessed 2023-04-02).

Margos G, Gofton A, Wibberg D, Dangel A, Marosevic D, Loh S, Oskam C, Fingerle V, Bergström S. 2018. The genus *Borrelia* reloaded. *PLOS ONE* **vol. 13**:1.

Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0208432> (accessed 2023-04-01).

Minnick M, Anderson B, Lima A, Battisti J, Lawyer P, Birtles R, Vinetz J. 2014. Oroya Fever and Verruga Peruana: Bartonelloses Unique to South America. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **vol. 8**:1. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002919> (accessed 2023-04-02).

Ohl M, Spach D. 2000. Bartonella quintana and Urban Trench Fever. *Clinical Infectious Diseases* **vol. 31**:131-135. Available from <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/313890> (accessed 2023-04-02).

Ondruš J, Balážová A, Baláž V, Zechmeisterová K, Novobilský A, Široký P. 2020. Candidatus Neoehrlichia mikurensis is widespread in questing Ixodes ricinus ticks in the Czech Republic. *Ticks and Tick-borne Diseases* **vol. 11**. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X19303152> (accessed 2023-04-04).

Paakkonen T, Mustonen A, Käkelä R, Laaksonen S, Solismaa M, Aho J, Puukka K, Nieminen P. 2012. The effects of an abundant ectoparasite, the deer ked (*Lipoptena cervi*), on the health of moose (*Alces alces*) in Finland. *Parasitology Research* **vol. 111**:1223-1232. Available from <http://link.springer.com/10.1007/s00436-012-2956-0> (accessed 2023-03-25).

Portillo A, Santibáñez P, Palomar A, Santibáñez S, Oteo J. 2018. ‘ Candidatus Neoehrlichia mikurensis’ in Europe. *New Microbes and New Infections* **vol. 22**:30-36. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2052297518300027> (accessed 2023-04-03).

Regier Y, Komma K, Weigel M, Pulliainen A, Göttig S, Hain T, Kempf V. 2018. Microbiome Analysis Reveals the Presence of Bartonella spp. and Acinetobacter spp. in Deer Keds (*Lipoptena cervi*). *Frontiers in Microbiology* **vol. 9**. Available from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.03100/full> (accessed 2023-03-25).

Roux V, Raoult D. 1995. The 16S-23S rRNA intergenic spacer region of Bartonella (Rochalimaea) species is longer than usually described in other bacteria. *Gene* **vol. 156**:107-111. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/037811199400919J> (accessed 2023-04-11).

Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver J. 2011. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks and Tick-borne Diseases* **vol. 2**:123-128. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X11000379> (accessed 2023-04-01).

Rudolf I, Betášová L, Bischof V, Venclíková K, Blažejová H, Mendel J, Hubálek Z, Kosoy M. 2016. Molecular survey of arthropod-borne pathogens in sheep keds (*Melophagus ovinus*), Central Europe. *Parasitology Research* **vol. 115**:3679-3682. Available from <http://link.springer.com/10.1007/s00436-016-5175-2> (accessed 2023-03-29).

Scarpulla M, Barlozzari G, Salvato L, De Liberato C, Lorenzetti R, Macrì G. 2018. *Rickettsia helvetica* in Human-Parasitizing and Free-Living *Ixodes ricinus* from Urban and Wild Green Areas in the Metropolitan City of Rome, Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **vol. 18**:404-407. Available from <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2017.2235> (accessed 2023-04-12).

Skotarczak B. 2003. Canine ehrlichiosis. *Ann Agric Environ Med* **2003**:5. Available from <https://www.aaem.pl/Canine-ehrlichiosis-,72824,0,2.html> (accessed 2023-04-13).

Small R. 2005. A review of *Melophagus ovinus* (L.), the sheep ked. *Veterinary Parasitology* **vol. 130**:141-155. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401705001044> (accessed 2023-03-30).

Snowden J, Bartman M, Kong E, Simonsen K. 2023. Ehrlichiosis. *StatPearls* **2023**:8. StatPearls Publishing LLC. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441966/> (accessed 2023-04-07).

Snowden J, Yarrarapu S, Oliver T. 2023. Relapsing Fever. *StatPearls* **2023**:1. StatPearls Publishing LLC. Available from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441913/> (accessed 2023-04-01).

Szewczyk T, Werszko J, Steiner-Bogdaszewska Ż, Jezewski W, Laskowski Z, Karbowski G. 2017. Molecular detection of *Bartonella* spp. in deer ked (*Lipoptena cervi*) in Poland. *Parasites & Vectors* **vol. 10**. Available from <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2413-0> (accessed 2023-03-26).

Wennerås C. 2015. Infections with the tick-borne bacterium *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. *Clinical Microbiology and Infection* **vol. 21**:621-630. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X15003249> (accessed 2023-04-03).

Werszko J, Asman M, Witecka J, Steiner-Bogdaszewska Ż, Szewczyk T, Kuryło G, Wilamowski K, Karbowski G. 2021. The role of sheep ked (*Melophagus ovinus*) as potential vector of protozoa and bacterial pathogens. *Scientific Reports* **vol. 11**. Available from <https://www.nature.com/articles/s41598-021-94895-x> (accessed 2023-04-13).

Yabsley M. 2010. Natural History of *Ehrlichia chaffeensis*: Vertebrate hosts and tick vectors from the United States and evidence for endemic transmission in other countries. *Veterinary Parasitology* **vol. 167**:136-148. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401709005482> (accessed 2023-04-13).

Zhang Q et al. 2021. Vector-Borne Pathogens with Veterinary and Public Health Significance in *Melophagus ovinus* (Sheep Ked) from the Qinghai-Tibet Plateau. *Pathogens* **vol. 10**. Available from <https://www.mdpi.com/2076-0817/10/2/249> (accessed 2023-04-12).

Přílohy

Seznam příloh:

Příloha 1: Geneaid genomic DNA mini kit – manuál