

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2019

Júlia Hurníková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Molekulárna detekcia vybraných
vektormi-prenášaných pôvodcov
nákaz v kliešťoch *Ixodes ricinus***

Bakalárska práca

Júlia Hurníková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

Vedoucí práce: RNDr. Martin Kašný, Ph.D.

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne, pod vedením RNDr. Martina Kašného, Ph.D., s pomocou odborných konzultácií s RNDr. Bronislavou Víchovou, Ph.D. a s použitím zdrojov uvedených v závere práce.

V Olomouci dňa.....

Podpis:.....

SÚHRN

Bakalárska práca bola zameraná na štúdium sezónnej dynamiky a infikovanosť kliešťov *Ixodes ricinus* vybranými druhmi patogénov na modelovej lokalite Slanské vrchy. Kliešť obyčajný patrí medzi najvýznamnejšie druhy kliešťov na území Slovenska, ako aj celej Európy. V prírode zabezpečuje prenos a cirkuláciu patogénov a plní tým úlohu vektora a v niektorých prípadoch aj rezervoára pôvodcov ochorení.

V experimentálnej časti predloženej bakalárskej práce bol vykonaný zber kliešťov z vegetácie v období apríl–september 2016. Z kliešťov boli vytvorené pooly o zložení 5 dospelých jedincov alebo 10 ným. Následne z nich bola izolovaná RNA, ktorá potom bola prepísaná do cDNA pre PCR. Boli použité rodovo/druhovo špecifické primery pre detekciu patogénov *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp. a *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Vzorky celkovej RNA boli použité aj pre detekciu vírusu kliešťovej encefalitídy pomocou Real-time PCR.

Vyšetrených bolo 606 kliešťov, z ktorých bolo vytvorených 68 poolov. Na prítomnosť baktérií z komplexu *Borrelia burgdorferi* s. l. bolo pozitívnych 29,41 % poolov. Druhým najviac zastúpeným patogénom vo vzorkách bol vírus kliešťovej encefalitídy, 16,18 % pozitívnych poolov. *Anaplasma phagocytophilum* a *Babesia* spp. boli prítomné obe v približne 11 % vyšetrených poolov.

Sezónna dynamika výskytu kliešťa obyčajného na modelovej lokalite v roku 2016 bola jednovrcholová, s jarným vrcholom. Výskyt kliešťov bol potvrdený aj v najvyšších oblastiach zberu (870 m.n.m), kde sa v minulosti síce vyskytovali, avšak v oveľa nižších počtoch.

Príčinou posúvania hranice výskytu kliešťov a nimi prenosných patogénov je pravdepodobne zmena klímy, ktorá spôsobuje zvyšovanie teplôt a tým umožňuje prežitie kliešťov a ich hostiteľov v predtým neprístupných oblastiach. Výskum potvrdil dôležitosť pravidelného lokálneho monitoringu kliešťov ako prostriedku pre zvýšenie efektívnosti preventívnych opatrení.

SUMMARY

The bachelor thesis was focused on the study of seasonal dynamics and infection of *Ixodes ricinus* ticks with selected pathogen species on the Slanské vrchy model site. *Ixodes ricinus* is one of the most important tick species in Slovakia and Europe. In natural foci, ticks are responsible for transmission and circulation of pathogens and thereby act as a vectors and potential reservoirs of pathogenic agents.

Within the experimental part of the bachelor thesis, ticks were collected from the vegetation in April-September 2016. Ticks were pooled with 5 adults or 10 nymphs. Subsequently, RNA was isolated and then transcribed into cDNA for PCR. The genera/species specific primers were used for the detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp., and *Borrelia burgdorferi* sensu lato pathogens. RNA samples were also used for detection of tick-borne encephalitis virus by means of Real-time PCR.

In total 606 ticks were examined and 68 pools were created from them. For the presence of bacteria of the *Borrelia burgdorferi* s. l. complex 29.41 % of pools were positive. The second most prevalent pathogen in the samples was tick encephalitis virus detected in 16.18 % of pools. Both, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* spp. were present in approximately 11 % of examined pools.

The seasonal dynamics of the *Ixodes ricinus* occurrence on the model site in 2016 was single-headed with one spring peak. The shift of infected ticks to sites with higher altitudes, where their presence in the past was much less frequent, was also confirmed.

The cause of the increase in tick and pathogen transmission is most likely the climate change, which causes the rise of temperatures that allow the survival of ticks and their hosts in previously unavailable areas. Research has confirmed the importance of regular local tick monitoring as an important tool to improve the effectiveness of preventive measures.

Pod'akovanie:

Chcela by som sa poďakovať svojmu školiteľovi RNDr. Martinovi Kašnému, Ph.D. za odborné vedenie práce. Moje poďakovanie taktiež patrí RNDr. Bronislave Víchovej, Ph.D. za pomoc pri spracovaní experimentálnej časti a Parazitologickému ústavu Slovenskej akadémie vied za možnosť využívať laboratóriá. V neposlednom rade som vďačná svojej rodine za podporu pri spracovaní práce.

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 CIELE PRÁCE	2
3 LITERÁRNY PREHLAD	3
3.1 Epidemiologicky významné druhy kliešťov na našom území	3
3.1.1 Systematické zaradenie kliešťov	3
3.1.2 Morfológia kliešťov	3
3.1.3 Rozmnožovanie a životný cyklus	4
3.1.4 Kliešť obyčajný (<i>Ixodes ricinus</i>)	6
3.1.5 Pijak lužný (<i>Dermacentor reticulatus</i>)	7
3.2 Kliešťami prenosní pôvodcovia ochorení	8
3.2.1 Rod <i>Borrelia</i> – komplex <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	9
3.2.1.1 Etiológia a taxonómia <i>Borrelia burgdorferi</i>	9
3.2.1.2 Morfológia <i>Borrelia burgdorferi</i>	9
3.2.1.3 Životný cyklus <i>Borrelia burgdorferi</i>	10
3.2.1.4 Vektory <i>Borrelia burgdorferi</i>	10
3.2.1.5 Rezervoároví hostitelia <i>Borrelia burgdorferi</i>	10
3.2.1.6 Klinické príznaky lymskej boreliózy	11
3.2.2 Rod <i>Anaplasma</i>	12
3.2.2.1 Etiológia a taxonómia <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	12
3.2.2.2 Morfológia <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	12
3.2.2.3 Cirkulácia <i>A. phagocytophilum</i> v prírode	13
3.2.2.4 Vektory <i>A. phagocytophilum</i>	13
3.2.2.5 Hostitelia <i>A. phagocytophilum</i>	13
3.2.2.6 Genetická variabilita <i>A. phagocytophilum</i>	14
3.2.2.7 Klinické príznaky anaplazmózy	14
3.2.3. Rod <i>Babesia</i>	15
3.2.3.1 Etiológia a taxonómia <i>Babesia</i> spp.	15
3.2.3.2 Morfológia <i>Babesia</i> spp.	15
3.2.3.3 Životný cyklus <i>Babesia</i> spp.	16
3.2.3.4 Vektory <i>Babesia</i> spp.	16
3.2.3.5 Rezervoároví hostitelia <i>Babesia</i> spp.	17
3.2.3.6 Klinické príznaky babeziózy	17
3.2.4 Vírus kliešťovej encefalitídy	17

3.2.4.1 Klasifikácia a morfológia vírusu kliešťovej encefaliditídy	17
3.2.4.2 Epidemiológia a vektory	17
3.2.4.3 Patogenéza.....	18
3.2.4.4 Klinické prejavy kliešťovej encefaliditídy	18
4 MATERIÁL A METÓDY	20
4.1 Biologický materiál	20
4.1.1 Charakteristika územia	20
4.1.2 Zber biologického materiálu	22
4.2 Použité chemikálie, súbavy a roztoky	22
4.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení.....	23
4.4 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy	24
4.4.1 Izolácia RNA.....	24
4.4.2 Prepis do cDNA.....	25
4.4.3 Reťazová polymerázová reakcia – detekcia DNA patogénov.....	25
4.4.4 Elektroforetická vizualizácia PCR produktov	26
4.4.5 Real-time PCR.....	27
5 VÝSLEDKY.....	29
6 DISKUSIA	33
7 ZÁVER	38
8 LITERATÚRA	39

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. 1: Vývinové štádiá kliešťov.....	4
Obr. 2: Hallerov orgán.....	4
Obr. 3: Samica kliešť'a kladúca vajíčka.....	5
Obr. 4: Životný cyklus kliešť'a.....	5
Obr. 5: Samica kliešť'a obyčajného.....	6
Obr. 6: Samica pijaka lužného.....	7
Obr. 7: <i>Erythema migrans</i>	8
Obr. 8: Morfológia <i>Borrelia burgdorferi</i>	9
Obr. 9: Moruly <i>A. phagocytophilum</i> v cytoplazme neutrofilov, zv. 100x.....	12
Obr. 10: <i>Babesia canis</i> v psích erythrocytoch, mierka 10 µm.....	15
Obr. 11.: Mapa Slovenska s vyznačenou lokalitou zberu so súradnicami 48° 55' 25'' S.Z.Š., 21° 27' 44'' V.Z.D.....	19
Obr. 12: Fotografia lokality zberu 800 m.n.m.....	20
Obr. 13: Fotografia lokality zberu 700 m.n.m.....	20
Obr. 14: Fotografia lokality zberu 600 m.n.m.....	20
Obr. 15: Fotografia lokality zberu 600 m.n.m.....	21
Obr. 16: Elektroforetická separácia.....	26

ZOZNAM TABULIEK A GRAFOV

Tabuľka 1: Špecifické primery použité na PCR.....	25
Tabuľka 2: Teplotné programy použité pri PCR jednotlivých patogénov.....	25
Tabuľka 3: Pipetované objemy na prípravu Master mixu pre Real-time PCR....	27
Tabuľka 4: Teplotné programy použité pri Real-time PCR.....	27
Tabuľka 5: Počty pozitívnych poolov na jednotlivé patogény a percentuálne vyjadrenie.....	29
Tabuľka 6: Počty nazbieraných kliešťov v rôznych nadmorských výškach a počty poolov pozitívnych na testované patogény.....	30
Tabuľka 7: Počty nazbieraných kliešťov v jednotlivých mesiacoch a počty pozitívnych poolov s hodnotou MIR.....	31
Graf 1: Sezónna dynamika kliešťov na vegetácii v lokalite Slanské vrcholy v roku 2016.....	31

1 ÚVOD

Kliešte sú významnými krv cicajúcimi ektoparazitmi ľudí, voľne žijúcich a domácich zvierat. V prírode zohrávajú úlohu vektorov pôvodcov rôznych infekčných ochorení. Mnohé z patogénov vyvolávajúcich ochorenia u zvierat majú značný zoonózný potenciál a epidemiologický význam, keďže sú prenosné zo zvierat na ľudí. Pre niektoré z nich je charakteristický mozaikovitý výskyt a prírodná ohniskovosť.

Ixodes ricinus je epidemiologicky najrozšírenejším a najvýznamnejším vektorom na Slovensku, ako aj v celej strednej Európe, ktorý prenáša prvoky, baktérie aj vírusy. Z parazitárnych prvokov sú to babézie, napríklad *Babesia microti*. Z bakteriálnych pôvodcov baktérií sú najvýznamnejšie spirochéty z komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato, spôsobujúce ochorenie lymskú boreliózu a *Anaplasma phagocytophilum* z radu Rickettsiales. Z vírusov je najznámejší a epidemiologicky významný vírus kliešťovej encefalitídy.

V dôsledku globálnych zmien klímy a celého ekosystému, spôsobených kombináciou hospodárskych, socio-ekonomických a environmentálnych faktorov, dochádza k šíreniu a objavovaniu sa ochorení v lokalitách, kde sa v minulosti kvôli nehostinným podmienkam nevyskytovali. Areál výskytu kliešťov sa posúva do vyšších nadmorských výšok a severnejších oblastí. Zvýšenie teplôt v severných oblastiach a vyššie položených miestach vytvára vhodné prostredie pre život vektorov a taktiež umožňuje prežívanie zím väčšiemu počtu jedincov, následkom čoho rastie celková hustota populácie kliešťov. Výsledkom je vznik nových prírodných ohnísk, keďže s areálom výskytu kliešťov je úzko spojený výskyt kliešťami prenášaných mikroorganizmov.

2 CIELE PRÁCE

- Naštudovať dostupnú odbornú literatúru a vypracovať literárny prehľad súvisiaci s témou bakalárskej práce; zvládnuť metódy terénneho zberu a následného laboratórneho spracovania biologického materiálu (izolácia DNA/RNA, RT - PCR)
- Zistiť výskyt a sezónnu dynamiku kliešťov *Ixodes ricinus* a kliešťami prenášaných patogénov na vybranej modelovej lokalite na východnom Slovensku
- Zistiť druhovú diverzitu a prevalenciu DNA (*Borrelia* spp., *Babesia* spp., *Anaplasma* spp.) a RNA (vírus kliešťovej encefalitídy) patogénov v kliešťoch pomocou molekulo-geenetických metód na báze PCR

3 LITERÁRNY PREHĽAD

3.1 Epidemiologicky významné druhy kliešťov na našom území

Kliešte plnia v epidemiológii transmisívnych ochorení úlohu vektorov. Sú prenášačmi veľkého množstva baktérií a vírusov, spôsobujúcich závažné ochorenia ľudí aj zvierat (Jurášek, 1993). Na území Slovenska je známych 20 druhov kliešťov, z ktorých je 7 epidemiologicky významných pre človeka alebo domáce zvieratá (Černý, 1972).

3.1.1 Systematické zaradenie kliešťov

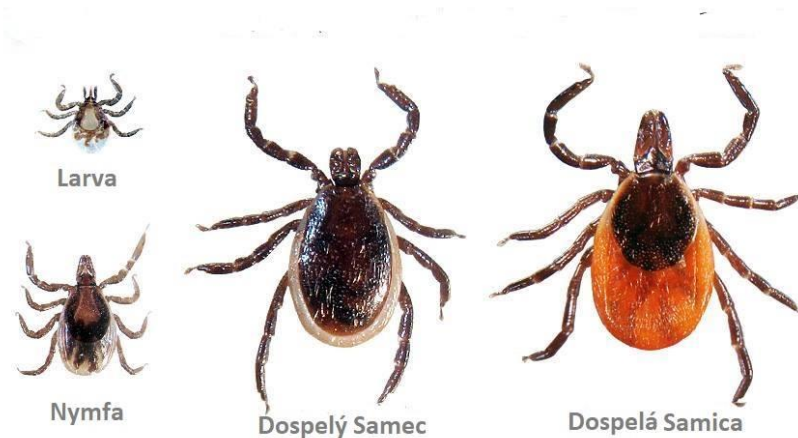
Kliešte patria do kmeňa Arthropoda, triedy Arachnida, podtriedy Acari a radu Ixodida, v rámci ktorého sa rozlišujú 3 rody: *Ixodes*, *Haemaphysalis* a *Dermacentor* (Černý, 1972).

3.1.2 Morfológia kliešťov

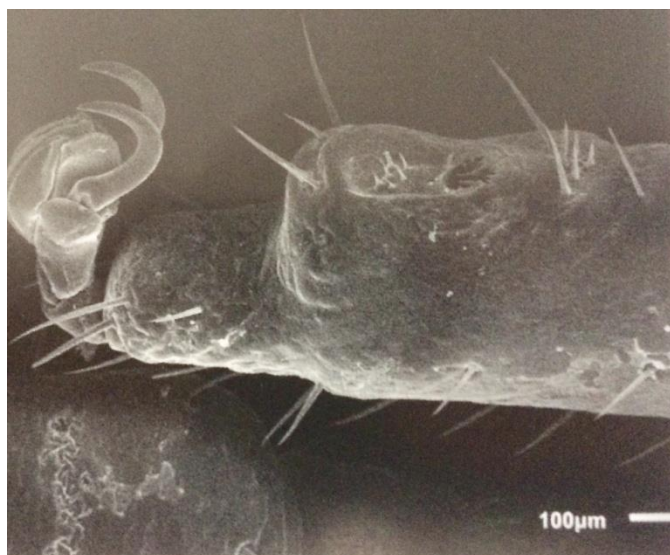
Telo je výrazne dorzoventrálne sploštené. Nie je členené na hlavu, hrud' a bruško ale na *gnatosomu*, ktorá nesie ústne ústroje a na vlastné telo *idiosomu*.

Gnatosomu tvorí *basis capituli* (chitínová základňa hlavičky), z ktorej vyrastá hypostóm (chobôtik) s radmi spätných zúbkov, slúžiaci na príjem krvi a fixáciu na hostiteľa. (Volf a kol., 2007). Z *gnatosomy* ďalej vyrastajú 4-článkované hmatadlá pedipalpy a párové klepietka chelicery, pomocou ktorých kliešť nastriháva kožu v mieste vpichu (Goldová a Letková, 2004).

Idiosoma (vlastné telo kliešťov) je pokrytá chitínovým štítkom (*scutum*). U samičiek a vývinových štádiách pokrýva len tretinu/polovicu tela, zatiaľ čo u samčekov pokrýva štítok celé telo. Štítok slúži ako identifikačný znak pri určovaní pohlavia kliešťa. Štítok samice je sfarbený do červena a u samcov je takmer čierny. Nymfy majú hnedé a larvy až svetlohnedé sfarbenie (Obr. 1). Časť *idiosomy* za štítkom sa nazýva *alloscotum* (bruško) a pri cicaní krvi sa mnohonásobne zväčšuje. Z vlastného tela nýmf a dospelých jedincov vyrastajú 4 páry kráčavých končatín, u lariev sa vyskytujú iba tri páry (Jurášek a kol., 1993). Na prednom páre nôh sa nachádza Hallerov orgán, ktorý predstavuje jamka s receptormi citlivými na teplotu, vlhkosť, pach, množstvo vydychovaného CO₂ a iné chemické látky (Obr. 2). Okrem toho deteguje pohyb, vďaka čomu slúži aj na orientáciu v priestore a na identifikovanie prítomnosti hostiteľa (Volf a kol., 2007).



Obr. 1: Vývinové štádiá kliešťov (prevzaté a upravené z www.tickencounter.org).



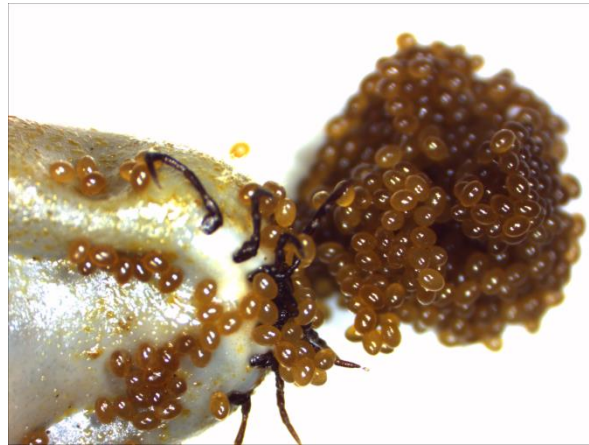
Obr. 2: Hallerov orgán – snímok zo SEM, zväčšené 250x (prevzaté a upravené z publikácie Majláth a Majláthová, 2015).

3.1.3 Rozmnožovanie a životný cyklus

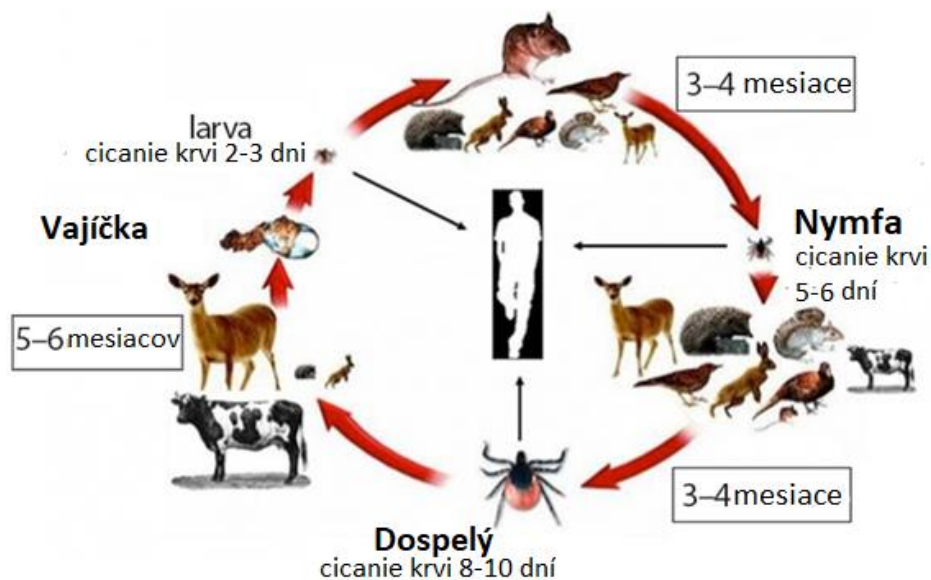
Kliešte sú obligátne krv cicajúce parazity zvierat a ľudí. V životnom cykle sa striedajú tri vývinové štádiá. Z oplodneného vajíčka sa vyľahne 6-nohá larva, ktorá po nacistaní opúšťa hostiteľa a metamorfuje vo vonkajšom prostredí na 8-nohú nymfu. Tá aktívne vyhľadáva hostiteľa a po približne týždni cicania odpadáva do okolia, kde metamorfuje na dospelého kliešťa.

Pohlavný dimorfizmus je veľmi výrazný, samec cicia krv len obmedzene a samica počas 5–14 dní. Kopulácia prebieha spravidla na hostiteľovi počas cicania. Kopulačným orgánom samca je hypostóm, ktorý zasunie do pohlavného otvoru samice.

Samica po plnom nacicaní zväčší svoj objem až 200-násobne. Po oplodnení sa presunie do vlhkého úkrytu (vrchná vrstva pôdy, hrabanka), kde sa v nej vyvíjajú vajíčka (ovogenéza). Znáša 2–5 tisíc vajíčok, z ktorých sa asi po mesiaci vyliahnú larvy. Samica po vykladení vajíčok hynie (Obr. 3). Limitujúcimi faktormi pre výskyt a vývoj kliešťov je primerané vonkajšie prostredie a dostatok vhodných hostiteľov. V našich podmienkach trvá životný cyklus kliešťa v závislosti od druhu 1–6 rokov (Obr. 4) (Kmety a kol., 1983, Goldová a Letková, 2004).



Obr. 3: Samica kliešťa kladúca vajíčka (autor: Víchová).



Obr. 4: Životný cyklus kliešťa (prevzaté z www.inra.fr).

3.1.4 Kliešť obyčajný (*Ixodes ricinus*)

Kliešť obyčajný (Obr. 5) je najrozšírenejším a epidemiologicky najvýznamnejším druhom na našom území ako aj v miernom pásme Európy. Areál výskytu sa tiahne takmer celou Európou, siaha do južných oblastí Škandinávie s výnimkou nezalesnených oblastí. Zasahuje tiež Veľkú Britániu, sever Iránu, juhozápadnú oblasť Turkmenistanu, sever Afriky a západnú časť Sibíri (Filippova, 1977)



Obr. 5: Samica kliešťa obyčajného (*Ixodes ricinus*) (autor: Víchová).

Uprednostňuje listnaté alebo zmiešané lesy a pasienky do nadmorskej výšky 600–800 m n. m.. Horná hranica jeho výskytu sa však vplyvom globálneho otepľovania posúva nad 1000 m n. m. (Bullová a kol., 2009; Peťko a Majláthová, 2005). Pre kliešťa obyčajného je typická nerovnomernosť, tzv. mozaikovitosť výskytu. Uprednostňuje okraje lesa v blízkosti lesných chodníkov a frekventovaných zvieracích ciest, kde je vyššia šanca na stretnutie s potenciálnym hostiteľom. Výskyt kliešťov na určitom území závisí od typu pôdy, geologického podložia, vegetačného krytu, klimatických podmienok (ideálna teplota 5–32 °C) a od vzdušnej vlhkosti (ideálna vlhkosť vzduchu je okolo 80 %). Najlimitujúcejším faktorom je však prítomnosť vhodných hostiteľov pre všetky vývinové štádiá (Peťko a Majláthová, 2005).

Sezónna aktivita druhu je v našich podmienkach dvojvrcholová. Prvý výraznejší vrchol sezónnej aktivity začína skoro na jar a vo všeobecnosti platí, že limitujúcou spodnou teplotnou hranicou pre aktivitu dospelých jedincov je 5 °C. V teplých letných mesiacoch aktivita výrazne klesá, dokonca môže byť úplne prerušená. Druhý, menej výrazný vrchol dosahuje v jesennom období, v závislosti na optimálnych faktoroch prostredia. V zimnom období sa aktivita znovu prerušuje, ale v prípade teplejších zím bez súvislej snehovej pokrývky a výrazných mrazov môže pretrvávajúť (Jurášek, 1993).

Ixodes ricinus má široké spektrum hostiteľov. Larvy a nymfy napádajú predovšetkým drobné cicavce, vtáky hniezdiace na zemi a taktiež plazy. Hostiteľmi dospelých jedincov sú okrem už spomínaných živočíchov aj veľké prežúvavce (dobytok, vysoká zver), domáce aj divo žijúce psovité a mačkovité šelmy a pod. Človek je hostiteľom pre všetky tri vývinové štádiá, no najčastejšie na ňom parazitujú larvy a nymfy (Peťko a Majláthová, 2005).

3.1.5 Pijak lužný (*Dermacentor reticulatus*)

Dermacentor reticulatus (Obr. 6) je jedným z našich najväčších kliešťov. Tento palearktický druh sa vyskytuje v miernom klimatickom pásme od Francúzska a juhozápadného Anglicka na východ až po rieku Jenisej na Sibíri a na juh po Rumunsko. Obľubuje teplé nížinné oblasti zarastené krovinami a stromami, zmiešané či lužné lesy a lesné čistiny (Peťko a Majláthová, 2005).



Obr. 6: Samica pijaka lužného (*Dermacentor reticulatus*) (prevzaté z publikácie Rieg a kol., 2011).

Aktivita druhu je u dospelých jedincov dvojvrcholová, s jarným a jesenným vrcholom. Vývinové štádiá majú iba jeden vrchol sezónnej aktivity, u lariev v júli a u nýmfov v auguste. Pijak lužný má jedno alebo dvoj – ročný vývinový cyklus, v závislosti od toho, kedy odpadne nácicaná samica z hostiteľa (Szymanski, 1987).

Hostiteľmi dospelých jedincov sú hospodárske aj voľne žijúce veľké kopytníky, divé svine, psy, líšky, ježe, zajace a pod. Tieto štádiá parazitujú hlavne v oblasti slabín, kolien, krku a uší. Larvy a nymfy sa zdržujú v norách drobných cicavcov a ich hlavnými hostiteľmi sú drobné hlodavce a hmyzožravce (Hillyard, 1996).

3.2 Kliešťami prenosní pôvodcovia ochorení

Kliešte prenášajú celé spektrum vírusov, baktérií a parazitov spôsobujúcich závažné ochorenia zvierat a ľudí. Infikované môžu byť súčasne viacerými patogénmi, ktoré prenášajú do svojich hostiteľov, čo značne komplikuje diagnózu aj liečbu.

Najdôležitejším vírusom prenášaným kliešťami v miernom pásme je vírus kliešťovej encefalitídy, napadajúci centrálny nervový systém. Ochorenie sa prejavuje ako encefalitída, meningitída alebo meningoencefalitída (Danielová, 2008a).

Z bakteriálnych ochorení je najvýznamnejšia lymská borelióza spôsobovaná baktériou z komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Je to multisystémové ochorenie postihujúce rôzne orgánové systémy. K typickým klinickým príznakom ochorenia patrí červená škvrna (*erythema migrans*), ktorá sa objaví v mieste kde bol kliešť prisatý a môže sa postupne zväčšovať (Obr. 7). Lymská borelióza je najčastejšou kliešťami prenášanou zoonózou v Európe, Severnej Amerike a Ázii (Burri, 2007).



Obr. 7: *Erythema migrans* (prevzaté z publikácie Shapiro, 2014).

Ďalším ochorením, pôvodcov ktorého prenášajú kliešte, je granulocytárna anaplazmóza vyvolaná gram-negatívnymi baktériami druhu *Anaplasma phagocytophilum*, ktoré infikujú biele krvinky (Víchová, 2014). Červené krvinky napadajú zas jednobunkové parazity z rodu *Babesia*. Pre človeka sú patogénne druhy *Babesia divergens*, *Babesia microti* či *Babesia venatorum*. Na území Slovenska je rozšírená predovšetkým *Babesia canis*, parazit psov, ktorej vektorom je pijak lužný, *Dermacentor reticulatus* (Criado-Fornelio, a kol. 2003).

3.2.1 Rod *Borrelia* – komplex *Borrelia burgdorferi* sensu lato

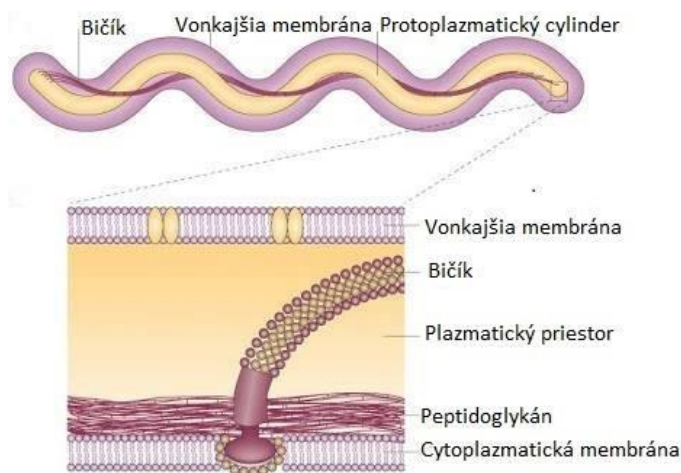
3.2.1.1 Etiológia a taxonómia *Borrelia burgdorferi*

Baktérie patriace do rodu *Borrelia* zaradujeme do čeľade Spirochetaceae, radu Spirochaetales a kmeňa Spirochaetes. Komplex *B. burgdorferi* sensu lato zahŕňa borélie vyvolávajúce multisystémové infekčné ochorenie, lymfskú boreliózu (LB). Toto ochorenie patrí medzi najčastejšiu kliešťami prenášanú zoonózu v Ázii, Severnej Amerike a Európe (Bartůnek a kol., 1996; Peťko a Majláthová, 2005). V súčasnosti je známych 22 genospeciev, vzájomne sa líšiacich genetickým a antigénnym profilom, geografickým rozšírením, okruhom vektorov a hostiteľov, orgánovou preferenciou, spektrom ochorení, ktoré spôsobujú a ich klinickými prejavmi (Postic a kol., 2007). Pre ľudí sú patogénne *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelli*, *B. garinii*, *B. bavariensis* a *B. spielmanii*.

Prevalencia borélií v kliešťoch z vegetácie sa pohybuje na území Slovenska v rozmedzí 3–30 %, v závislosti od dostupnosti hostiteľov a podmienok prostredia (Derdáková a kol., 2003).

3.2.1.2 Morfológia *Borrelia burgdorferi*

Borélie sú pohyblivé, extracelulárne, gramnegatívne baktérie charakteristické tenkým špirálovitým tvarom s dĺžkou tela 10–30 μm a s priemerom 0,2–0,3 μm (Obr. 8) (Bartůnek a kol., 2006).



Obr. 8: Morfológia *Borrelia burgdorferi* (prevzaté a upravené z www.spirochetesunwound.blogspot.com).

Pohyb je umožnený vďaka bičíkom, ktoré sa nachádzajú v periplazmatickom priestore pod vonkajšou membránou na oboch koncoch bunky. Vďaka flexibilnej membráne sa môžu zasúvať a vysúvať, čo je nevyhnutné pre inváziu do bunky hostiteľa (Comstock a Thomas, 1989).

3.2.1.3 Životný cyklus *Borrelia burgdorferi*

V prírodnom prostredí prebieha cirkulácia borélií v enzootickom cykle prostredníctvom kliešťov z rodu *Ixodes*, ktoré sú kozmopolitne rozšírené. Všetky vývinové štádiá kliešťov sa môžu nakaziť boréliami počas cicania krvi na infikovanom hostiteľovi, alebo prostredníctvom tzv. „co-feedingu“, keď na hostiteľovi bez systémovej infekcie cicajú vedľa seba infikovaný a neinfikovaný kliešť (Gern a Rais, 1996; Ogden a kol., 1997). Spirochéty sa prenášajú v kliešťovi transštadiálne. Transovariálny prenos bol tiež pozorovaný, avšak v prírode prebieha len výnimočne pri silných generalizovaných infekciách samičiek (Peťko a Majláthová, 2005).

3.2.1.4 Vektory *Borrelia burgdorferi*

Transmisiu a udržiavanie určitého genospecies *B. burgdorferi* s. l. zabezpečuje v Európe najrozšírenejší a epidemiologicky najvýznamnejší druh kliešťa *Ixodes ricinus*. Kliešť obyčajný predstavuje hlavného kompetentného vektora pre *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. lusitaniae*, *B. burgdorferi* s.s a *B. valaisiana* (Gern a Humair, 2002).

3.2.1.5 Rezervoároví hostitelia *Borrelia burgdorferi*

Medzi dôležité rezervoáre borélií patria drobné zemné cicavce, plazy a vtáky. Ako kompetentné rezervoáre, teda zvieratá schopné udržiavať patogény v krvi a dlhý čas vystupujúce ako zdroj infekcie v prírodnom ohnisku, boli potvrdené ryšavky: ryšavka obyčajná (*Apodemus sylvaticus*), ryšavka tmavopása (*Apodemus agrarius*), ryšavka žltohrdlá (*Apodemus flavicollis*); ďalej hrdziak lesný (*Myodes galeolus*), hraboš močiarny (*Microtus agrestis*) (Kurtenbach a kol., 1998; Tälleklint a kol., 1994) a iné. *B. lusitaniae* bola potvrdená v jaštericiach (Majláthová a kol., 2006). Vysoká zver, ako napr. jeleň lesný (*Cervus elaphus*), daniel škvrnitý (*Dama dama*), srnec lesný (*Capreolus capreolus*), los mokradňový (*Alces alces*), tur domáci (*Bos taurus*) a ovca domáca (*Ovis ovis*) patria medzi nekompetentné rezervoáre, ktoré slúžia len ako zdroj

krvi pre kliešte (Tälleklint a kol., 1994). K distribúcii borélií do väčších vzdialeností prispievajú mnohé druhy vtákov, patria medzi ne napríklad slávik červienka (*Erithacus rubecula*), slávik veľký (*Luscinia luscinia*), sýkorka veľká (*Parus major*), drozd čierny (*Turdus merula*), drozd plavý (*Turdus philomelus*) (Taragel'ová a kol., 2005).

3.2.1.6 Klinické príznaky lymskej boreliózy

Baktérie z komplexu *Borrelia burgdorferi* s. l. spôsobujú u zvierat i ľudí ochorenie známe ako lymská borelióza (LB). Jedná sa o multisystémové zápalové ochorenie s ťažkou klinickou diagnostikou. Heterogenita klinických prejavov LB súvisí s výraznou genetickou a antigénnou variabilitou typickou pre pôvodcu ochorenia (Stanek a kol., 2002).

Ochorenie u ľudí prebieha vo väčšine prípadov v troch štádiách. Najtypickejším prejavom prvého štádia je kožný erytém (*erythema migrans*), objavujúci sa približne po 7 dňoch od prisatia kliešťa v mieste vpichu (Bartůnek a kol., 2006). Erytém je škvrna oválneho alebo kruhového tvaru s červeným zafarbením s výrazným okrajom a vyblednutím uprostred (Braun a kol., 2001). Medzi ďalšie prejavy tohto štádia patria chrípku pripomínajúce príznaky ako bolesť svalov, hlavy, kĺbov. V druhom štádiu sa môže objaviť boréliový lymfocytóm. Ak dôjde k postihnutiu nervovej sústavy, ide väčšinou o neuroboreliózu. Tá sa prejavuje meningoradikuloneuritídou, ktorá zahŕňa bolesti hlavy, zápaly mozgových blán a mozgu, poruchy citlivosti a hybnosti, bolesti chrbta, končatín a periférne paralýzy faciálnych nervov (Burrascano, 2005). Posledné štádium ochorenia sa vyznačuje dlhou inkubačnou dobou a dlhodobou pretrvávajúcimi ťažkosťami (najmenej rok). Charakteristickým prejavom je postihnutie veľkých kĺbov a nervového tkaniva, ktoré sa prejavuje ako encefalitída. Ochorenie môže viesť až k presenilnej demencii (Bartůnek a kol., 2006).

Klinické prejavy LB u zvierat majú pestrý charakter. U psov sa najčastejšie stretávame s príznakmi ako anorexia, artritída, apatia, febrilita, lymfodenopatia, myokarditída, neochota k pohybu, nefritída (Appel a kol., 1993; McKenna a kol., 1995). U koní je to strnulosť, neochota k pohybu, únava, slabosť, febrilita, artritída, encefalitída, glomerulonefritída a laminitída. U mačiek sa často vyskytuje mierny až stredný stupeň nešpecifického krívania, anorexia, bolestivosť a febrilita. U hovädzieho dobytku sa stretávame s diagnostikou erytému ventrálnej časti vemena, s opuchmi kĺbov, febrilitou, ťažkosťami s pohybom, redukciiu hmotnosti a produkcie mlieka.

V niektorých prípadoch dôjde k poškodeniu obličiek a pľúc, dokonca aj k abortu (Parker a White, 1992; Škardová a kol., 2001; Štefančíková a kol., 2008a).

3.2.2 Rod *Anaplasma*

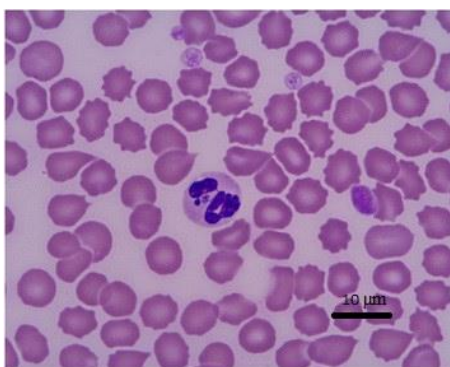
3.2.2.1 Etiológia a taxonómia *Anaplasma phagocytophilum*

Rod *Anaplasma* zaraďujeme spolu s rodmi *Aegyptianella*, *Ehrlichia*, *Cowdria*, *Neorickettsia* a *Wolbachia* do čeľade Anaplasmataceae a radu Rickettsiales. Sú to vnútrobunkové baktérie, parazitujúce vo vakuolách eukaryotických buniek. Na základe fylogenetických analýz génu pre 16S rRNA a groESL operónu, ktoré poukázali na takmer 100 % podobnosť medzi tromi predtým samostatnými druhmi, vznikol druh *Anaplasma phagocytophilum* zlúčením druhov *Ehrlichia equi* (spôsobujúca infekciu koní), *Ehrlichia phagocytophila* (vyvolávajúca ehrlichiozu prežuvavcov) a HGA agent (spôsobujúci humánnu granulárnu anaplazmózu) (Dumler a kol., 2001).

Anaplazmóza je závažné zoonózne ochorenie domácich/voľne žijúcich zvierat a ľudí. Pôvodcu ochorenia (*A. phagocytophilum*) prenášajú hlavne kliešte z rodu *Ixodes*. Táto gramnegatívna baktéria po prenose do hostiteľa napáda bunky mezodermálneho pôvodu a juvenilné aj dospelé štádiá hematopoetických buniek (Rikihisa, 1991).

3.2.2.2 Morfológia *Anaplasma phagocytophilum*

A. phagocytophilum je malá nepohyblivá baktéria s gram-negatívnou bunkovou stenou. Má kokovitý až elipsovité tvar a v priemer meria približne 0,2–1 µm. Vyskytuje sa vo vakuolách napadnutých buniek hostiteľa, kde môže vytvárať zhluky viacerých buniek, nazývané moruly (Obr. 9). (Chen a kol., 1994; Rikihisa a kol., 1991). Množí sa binárnym delením viazaná na membránu vakuoly hostiteľskej bunky. Následne dochádza k rozpadu bunky a baktérie sú uvoľnené do okolitého prostredia, čo umožňuje napádanie ďalších buniek (Dumler, 2005).



Obr. 9: Moruly *A. phagocytophilum* v cytoplazme neutrofilov, zv. 100x (prevzaté z publikácie Sainz a kol., 2015).

3.2.2.3 Cirkulácia *A. phagocytophilum* v prírode

Ochorenie granulocytárna anaplazmóza má charakter prírodnej ohniskovej nákazy. Jej výskyt v prírodnom ohnisku je limitovaný prítomnosťou kompetentného biologického vektora zo skupiny bezstavovcov (v tomto prípade kliešte), kompetentných rezervoárových hostiteľov (voľne žijúce hlodavce a prežúvavce) a nakoniec infekciu vnímajúcich hostiteľov (rôzne druhy voľne žijúcich aj domácich zvierat vrátane človeka). Ľudia v cirkulácii anaplazmiem predstavujú tzv. „dead-end“ hostiteľa, po ktorom už životný cyklus spravidla nepokračuje (Blanco a Oteo, 2002).

Infikované samičky kliešťa kladú sterilné vajíčka, keďže u *A. phagocytophilum* nedochádza ku transovariálnemu prenosu zo samice kliešťa na potomstvo. Anaplazmy sú prenášané transštádiálne. Z vajíčok sa liahnu larvy, ktoré sa infikujú anaplazmami počas cicania na rezervoárových hostiteľoch. Po nacicaní odpadnú do pôdy, kde metamorfujú na infikované nymfy. Tie počas ďalšieho cicania infikujú široké spektrum zvierat, vrátane človeka. Po nakŕmení opäť odpadnú a v pôde metamorfujú na dospelých jedincov, ktorí šíria infekciu ďalej (Dumler a kol., 2005).

3.2.2.4 Vektory *A. phagocytophilum*

Na Slovensku aj v celej Európe je najvýznamnejším vektorom *A. phagocytophilum* kliešť *Ixodes ricinus* (Strle, 2004). Do cirkulácie tohto patogéna sú však v prírodných ohniskách zapojené aj iné druhy kliešťov, napr. *Dermacentor marginatus* (De la Fuente a kol, 2005) a *Ixodes trianguliceps*, ktoré nájdeme aj na území Slovenska (Peťko a kol., 1991).

Prevalencia infekcie v kliešťoch v rôznych lokalitách je ovplyvnená biotickými (prítomnosť rezervoárových a infekciu vnímajúcich hostiteľov) a abiotickými (vlhkosť, teplota prostredia) faktormi prostredia. Hladina infikovanosti kliešťov *I. ricinus* sa pohybuje v priemere od <1 % do cca 6 % (Blaňarová, 2014).

3.2.2.5 Hostitelia *A. phagocytophilum*

Anaplazma je v prírodnom ohnisku udržiavaná prostredníctvom rezervoárových hostiteľov. Predstavujú ich zvieratá, ktoré po napadnutí infikovaným ektoparazitom

a transmisii dokázu patogény v krvi udržať a vytvoriť podmienky pre ich pomnoženie. V prírode predstavujú zdroj infekcie.

Hlavným kompetentným rezervoárovým hositeľom v Európe, ako aj na Slovensku je vysoká lesná zver. Sú to hlavne srnec lesný (*Capreolus capreolus*), jeleň hôrny (*Cervus elaphus*), kamzík vrchovský (*Rupicapra rupicapra*) a daniel škvrnitý (*Dama dama*) (Liz, 2000). Pomocou molekulárno-genetických metód bola bakteriálna DNA potvrdená aj u iných cicavcov, ako napríklad líška hrdzavá (*Vulpes vulpes*), vlk dravý (*Canis lupus*), medveď hnedý (*Ursus arctos*), kone, kozy, ovce, hovädzí dobytok a psy (Hulínska a kol., 2004; Štefančíková a kol., 2005; Vichová a kol., 2010). Aj keď vtáky nie sú považované za rezervoáre, bola u nich potvrdená prítomnosť DNA anaplaziem, napríklad u drozda sťahovavého (*Turdus migratorius*) (Daniels a kol., 2002).

3.2.2.6 Genetická variabilita *A. phagocytophilum*

Výskumy genetickej variability preukázali existenciu dvoch rozdielnych ekotypov, tzv. genetických variantov *A. phagocytophilum*. Varianty sa vzájomne geneticky aj antigénne líšia, majú odlišnú rezervoárovú kompetenciu, sú prenášané odlišnými druhmi vektorov a geograficky sú inak distribuované. Rozdiel môže byť dokonca aj v ochoreniach, ktoré vyvolávajú a v ich klinickom priebehu. Tieto genetické varianty môžu cirkulovať spoločne, alebo sa vo vektoroch a hositeľoch vyskytujú samostatne (Stuen, 2013).

3.2.2.7 Klinické príznaky anaplazmózy

Granulocytárna anaplazmóza koní je sezónne ochorenie je sprevádzané vysokými horúčkami, nechutenstvom, depresiou, anorexiou, opuchmi končatín a odmietaním pohybu. Ak sa neobjavia sekundárne infekcie alebo poranenia dôsledkom zhoršenej koordinácie, úmrtnosť koní je nízka (Madigan, 1993).

Príznaky granulocytárnej anaplazmózy u psov varírujú od subklinických infekcií až k akútnym horúčkovitým stavom sprevádzaným letargiou a anorexiou. Zaznamenané boli aj poruchy centrálného nervového systému a pohybového aparátu (bolesti kĺbov, svalov a krívanie) (Foley a kol., 2001).

Humánna granulocytárna anaplazmóza (HGA) má inkubačnú dobu v rozmedzí 1–3 týždňov. U zdravých pacientov má choroba väčšinou mierny priebeh bez klinických

príznakov alebo s chrípkou pripomínajúcimi príznakmi. Medzi najčastejšie prejavy HGA patrí malátnosť, horúčka, svalová bolesť, bolesť hlavy (Dumler a kol., 2005).

3.2.3. Rod *Babesia*

3.2.3.1 Etiológia a taxonómia *Babesia* spp.

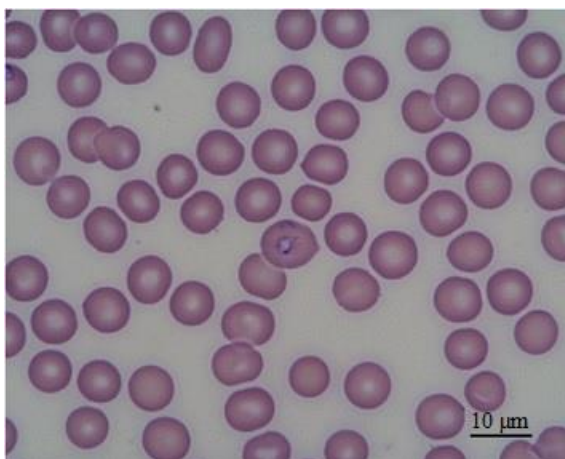
Babézie sa zaraďujú do podriše Protozoa, kmeňa Apicomplexa, triedy Hematozoa, podtriedy Piroplasmia, radu Piroplasmida a čeľade Babesiidae (Volf a Horák, 2007).

Sú to jednobunkové kokcidie, ktoré sa podľa spôsobu života radia medzi obligátne intracelulárne parazity erytrocytov a buniek retikuloendotelového systému. Známych je asi 100 druhov babézií asociovaných s rôznymi druhmi cicavcov a vtákov (Gray a Weiss, 2008). V rámci rodu je zaznamenaná morfológická, genetická a ekologická variabilita jednotlivých zástupcov. Všetky druhy sa binárne delia v cytoplazme buniek hostiteľa a sú prenášané prostredníctvom kliešťov z čeľade Ixodidae (Jurášek a kol., 1993).

Babezióza je prírodne ohnisková kliešťami prenášaná parazitárna infekcia s kozmopolitným rozšírením (Jurášek a kol., 1993). Je to najvýznamnejšie protozoárne ochorenie domácich a voľne žijúcich zvierat predstavujúce riziko aj pre ľudí (Gray a Weiss, 2008). Pre človeka sú patogénne dva druhy babézií, *B. microti* v USA a Európe a *B. divergens* v Európe (Jurášek a kol., 1993).

3.2.3.2 Morfológia *Babesia* spp.

Tvar babézií je väčšinou okrúhly/oválny, hruškovitý alebo améboidný (Obr. 10). Veľké babézie majú veľkosť 3 – 5 μm , spojené sú pod uhlom menším ako 90° a nachádzajú sa v strede erytrocytov. Malé babézie sú veľké 1 – 3 μm , spojené sú pod uhlom väčším ako 90° a lokalizované sú na periférii erytrocytov (Jurášek a kol., 1993; Homer a kol., 2000).



Obr. 10: *Babesia canis* v psích erythrocytoch, mierka 10 μm (prevzaté z publikácie Solano-Gallego a kol., 2016).

3.2.3.3 Životný cyklus *Babesia* spp.

V životnom cykle babézií sa strieda pohlavný a nepohlavný spôsob rozmnožovania. Merogónia/schizogónia (nepohlavné rozmnožovanie) prebieha v erythrocytoch hostiteľa. Vo vektoroch prebieha pohlavné i nepohlavné rozmnožovanie. Gametogónia/syngamia zahŕňa vznik a uvoľnenie gamét v čreve kliešťa a sporogónia zas v slinných žľazách kliešťa (Homer a kol., 2000).

Počas cicania krvi sa spolu so slinami infikovaného kliešťa dostávajú infekčné štádiá babézií (sporozoity) do krvi hostiteľa a infikujú erythrocyty (Rudzinska, 1982). Následne po prieniku do bunky sa z nich stávajú trofozoity, ktoré sa zväčšia, zaguľatia a schizogóniou/merogóniou sa binárne delia. Výsledkom je veľké množstvo merozoitov spôsobujúcich prasknutie a rozpad erythrocytu. Po uvoľnení z pôvodného erythrocytu napádajú ďalšie krvinky (Homer a kol., 2000).

3.2.3.4 Vektory *Babesia* spp.

Cirkuláciu babézií v Európe zabezpečujú hlavne kliešte z rodu *Ixodes* (Burkot a kol., 2001), *Rhipicephalus* (Jefferies a kol., 2003), *Dermacentor* (Battsetseg a kol., 2002), *Haemaphysalis*, *Boophilus* a *Hyalomma* (Luo a kol., 2003). Druhy ako *I. muris* či *I. tringuliceps* sa podieľajú na šírení tohto patogénu najmä medzi hlodavcami (Hünfeld a kol., 2008). Jediným kompetentným vektorom *Babesia microti* je kliešť z rodu *Ixodes*, zatiaľ čo druhy ako *B. bigemina* a *B. equi* môžu byť prenášané viacerými druhmi kliešťov (Goethert a Telford, 2003).

3.2.3.5 Rezervoároví hostitelia *Babesia* spp.

Rezervoároví hostitelia veľkých a malých babézií sa líšia. *B. divergens* cirkuluje najmä u dobytky, ale je schopná vyvolať infekciu aj u kopytníkov (Carcy a kol., 2006), hlodavcov (Phillips, 1984), primátov (Garnham a Bray, 1959) a ľudí (Cantu a kol., 2007). *B. microti* šíria hlavne zástupcovia z čeľade *Muridae* (myšovité), avšak bola už nájdená aj u iných druhov hostiteľov, u ktorých zatiaľ nie je jasná rezervoárová kompetencia (Goethert a Telford, 2003).

3.2.3.6 Klinické príznaky babeziózy

Klinické prejavy závisia od patogénnosti kmeňa, imunitného stavu hostiteľa a počtu kliešťov cicajúcich na hostiteľovi. Ochorenie môže prebiehať asymptomaticky, či byť sprevádzané chrípkou pripomínajúcimi príznakmi. Hlavnými klinickými príznakmi akútnej fázy ochorenia sú horúčka, zimnica a potenie, bolesť hlavy, svalov, žltacka, poškodenie CNS, hemoglobínúria, či srdcové poruchy (Goether a Telford, 2003).

Postihnuté zvieratá majú nízky stupeň parazitémie, môžu mať anorexiu a mierne zvýšenú teplotu. V akútnej fáze rýchlo stúpa horúčka (až do 41 °C), zviera trpí depresiou, anémiou, tachykardiou a slabosťou. Parazitémia môže vzrásť až na 30 – 45 % , čo spôsobuje rozsiahlu deštrukciu erytrocytov a vyplavovanie hemoglobínu v moči (krvomočenie) (Zintl a kol., 2003).

3.2.4 Vírus kliešťovej encefalitídy

3.2.4.1 Klasifikácia a morfológia vírusu kliešťovej encefalitídy

Vírus kliešťovej encefalitídy patrí do rodu Flavivirus a čeľade Flaviridae (Mandl a kol., 1997). Je to obalený RNA vírus s veľkosťou 50 nm, ktorý má cca 11 kb dlhý genóm s RNA pozitívnym vláknom, kódujúci jediný polyproteín, ktorý sa spracováva počas a po transkripcii do troch štruktúrálnych a sedem neštruktúrálnych proteínov (Grard a kol., 2007). Vírusová replikácia sa odohráva v blízkosti endoplazmatického retikula, do ktorého pučia nezrelé vírusové častice a tvoria sa zrelé, ktoré sú uvoľňované cez sekrečný systém bunky (Wengler a Wengler, 1989).

3.2.4.2 Epidemiológia a vektory

Flavivírusy sa môžu deliť na kliešťami prenášané flavivírusy (TBFV), komármi prenášané flavivírusy a tie, ktorých vektor nie je známy, čo je dôkazom dôležitosti

adaptácie vírusu na jeho špecifického hostiteľa zo skupiny bezstavovcov, ale aj stavovcov. Kliešťami prenášané flavivírusy môžu byť ďalej rozdelené na TBFV cicavcov, zahrňujúce všetky dôležité pre človeka patogénne druhy. Do tejto skupiny patria aj TBFV morských vtákov, ktoré nie sú pre človeka patogénne (Grard a kol., 2007).

V prírode sa TBEV šíri v cykle zahŕňajúcom trvalo infikované kliešte a malé cicavce, najčastejšie hlodavce. Prenos vírusu prebieha horizontálne medzi kliešťami (vektormi) a stavovcami (hostiteľmi). V transmisii vírusu zohráva hlavnú úlohu co-feeding infikovaných a neinfikovaných kliešťov na rovnakom hostiteľovi, ako aj transštadiálny a transovariálny prenos (Egyed a kol., 2012).

Hlavným vektorom európskeho subtypu je *Ixodes ricinus*. Epidemiológia TBE je ovplyvnená biológiou ixodidných kliešťov a ich ekológiou, počasím, podnebím, cestovaním a migráciou (Lambin a kol., 2010).

3.2.4.3 Patogenéza

Aby vírus spôsobil ochorenie po pricicaní kliešťa, musí prekonať prekážky, ktoré hostiteľ používa k obrane. Prvou bariérou je koža. Tá je porušená v okamihu prisatia kliešťa, kedy sa vírusové častice prenášajú do krvi hostiteľa spolu so slinami parazita (Wikel, 2013). Po inokulácii sa vírus lokálne replikuje v Langerhansových bunkách a neutrofiloch kože. Migrujúce monocyty/makrofágy produkujú infekčný vírus (Labuda a kol., 1996) a pravdepodobne slúžia ako vektory vírusových častíc do lymfatických uzlín. Druhá hlavná bariéra je imunitná reakcia vyvolaná samotnou vírusovou infekciou. Ak vírus prekoná túto prekážku, môže sa šíriť a spôsobiť virémiu. Treťou bariérou je hematoencefalitická bariéra, chrániaca CNS pred toxickými látkami a patogénmi. Mechanizmus využívaný vírusom pri prekonávaní poslednej bariéry zatiaľ nie je úplne známy. Len čo sú infikované endotelové bunky v mozgu, infekcia sa pozoruje v celej CNS (Růžek a kol., 2003; Gelpi a kol., 2005).

3.2.4.4 Klinické prejavy kliešťovej encefalitídy

Inkubačná doba ochorenia je najčastejšie 7–14 dní a prebieha väčšinou asymptomaticky. Viremická fáza sa manifestuje horúčkovitým stavom, trvajúcim 2–4 dni. Pridružujú sa nešpecifické príznaky ako nechutenstvo, bolesti svalov, hlavy, zvracanie, závraty či poruchy vedomia (Mickiene a kol., 2002). Následne sa stav

zdanlivo upraví a cca po 8 dňoch úľavy sa u 20–30 % pacientov prejaví druhá fáza choroby. Tá predstavuje zápal mozgu (encefalitídu) a zápal mozgových blán (meningitídu). Najčastejšie sa vyskytuje meningeálna foma, ktorá postihne až 2/3 pacientov. Choroba môže byť spojená s trvalým poškodením zdravia, ako napríklad poruchy spánku, zhoršená koncentrácia a obrny vedúce v niektorých prípadoch k trvalej invalidite (Kaiser, 1999).

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Biologický materiál

4.1.1 Charakteristika územia

Modelovým územím pre zber kliešťov na vegetácii boli Slanské vrchy. Pohorie Slanské vrchy sa nachádza vo východnej časti Slovenskej republiky. Začína východne od Prešova a tiahne sa smerom na juh až k hraniciam Maďarska. Toto sopečné pohorie je súčasťou karpatského vulkanického oblúka. Prevládajú tu listnaté porasty.

Modelové lokality pre zber kliešťov boli vybrané na základe prístupnosti a charakteru terénu, v stúpaní od dedinky Opiná a Červenica smerom hore k vysielacu Dubník (v nadmorskej výške 874 m.n.m).

Lokality boli zvolené v 100-metrových výškových transektoch, v nadmorskej výške 600, 700 a 800 metrov až tesne pod vysielac Dubník. Boli vlajkované prevažne lesné cestičky a ekotóny na rozhraní les - lúka.



Obr. 11: Mapa Slovenska s vyznačenou lokalitou zberu so súradnicami 48° 55' 25'' S.Z.Š., 21° 27' 44'' V.Z.D. (Prevzaté a upravené z www.wikimedia.org.)



Obr. 12: Fotografia lokality zberu 800 m.n.m (autor: Víchová)



Obr. 13: Fotografia lokality zberu 700 m.n.m (autor: Víchová)



Obr. 14: Fotografia lokality zberu 600 m.n.m (autor: Víchová)



Obr. 15: Fotografia lokality zberu 600 m.n.m (autor: Víchová).

4.1.2 Zber biologického materiálu

Kliešte boli zbierané z vegetácie takzvanou metódou vlajkovania. Na zber bola použitá vlajka z bielej flanelovej látky s rozmermi 1x1 m uchytená na palici. Vlajka sa ťahala súvislým pohybom po nízkej vegetácii a po niekoľkých metroch bola otočená ťahanou stranou nahor a skontrolovala sa prítomnosť kliešťov. Tie boli pozbierané entomologickou pinzetou a uchované v skúmavkách. Kliešte boli vlajkované pravidelne každý mesiac, od apríla do októbra počas jednej hodiny.

Po prinesení do laboratória boli živé kliešte triedené podľa druhu a pohlavia, príp. vývinového štádia a boli z nich vytvorené pooly (teda súbor: 5 samcov, prípadne samíc v jednej skúmavke a/alebo 10 nýmfv v jednej skúmavke). Následne boli pre zachovanie RNA uskladnené v hlbokom mraze pri teplote $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Za dané vegetačné obdobie bolo v modelovej oblasti Slanských vrchov nazbieraných spolu 606 kliešťov. Všetky kliešte patrili k druhu *Ixodes ricinus*, a to v skladbe 537 nýmfv a 69 dospelých jedincov, v zastúpení pohlaví 43 samíc a 26 samcov.

4.2 Použité chemikálie, súpravy a roztoky

- RNeasy® Plus Mini Kit Qiagen, Hilden, D (Kat. č. 74134 a 74136)
- RevertAid Reverse Transcriptase (200 U/ μL) (5x10.000 units) ThermoFisher (Kat. č. EP0442)
- RiboLock RNase Inhibitor (4x2500 U; 40U/ μl) ThermoFisher (Kat. č. EO0382)

- Random Primer Hexamers 3ug/ul; Invitrogen, (Kat. č. 48190-01)
- iTaq™ Universal Probes One-Step Kit, 500 x 20 µl rxns, 5 ml (5 x 1 ml) (Kat. č. 1725141)
- 5x HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load with 10 mM MgCl₂, Solis Biodyne, (Kat. č. 04-25-02020)
- oligonukleotidy (Merck)
- QIAquick PCR Purification Kit (250) (Kat. č. 28106)

4.3 Zoznam použitých prístrojov a zariadení

- 2 ml SafeLock Eppendorf skúmavky s kónickým dnom (Kat.č. EP0030120094)
- 0,2 ml PP mikroskúmavky pre PCR 8 ks spojených v stripe (kompaktnej sérii) (Kat.č. 33100000478)
- Mikropipety research 200; 100; 20; 10; 2,5 µl (Eppendorf, Hamburk, D)
- DNA/RNA UV-cleaner box, UVC/T-AR (Biosan, Riga, LV)
- digestor s odsávaním a UVsvetlom
- Tissue Lyser Bead Homogenizer (Qiagen, Kat.č. 85210)
- laminárny box biohazard (Telstar BioUltra)
- hlbokomraziaci box (Ultra Low Freezer, Ing. Climas)
- výrobník ľadu
- chladiaca centrifúga (Hettich, Universal 320R)
- RT cyklér, CFX Connect™ Real-Time PCR Detection Systém (BioRad)
- termocyklér MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad)
- NanoPhotometer P-Class P 300 – Implen (Biotech)

4.4 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy

4.4.1 Izolácia RNA

Na izoláciu RNA z kliešťov *Ixodes ricinus* bol použitý RNeasy Kit Quiagen podľa protokolu odporúčaného výrobcom. Pred začiatkom práce bolo vyčistené celé laboratórium 70 % etanolom, dekontaminačným roztokom RNaseZap a vyžiarené spolu s pomôckami silným zdrojom germicídneho UV žiarenia. Následne bol v digestore pripravený roztok RLT pufru s β -merkaptóetanolom na 30 vzoriek na jednu izoláciu, pričom na 12 ml RLT pufru bolo pridaných 120 μ l β -merkaptóetanolu.

Vzorky kliešťov boli vybrané z hlbokomraziaceho boxu a homogenizované v 2ml RNase-free mikroskúmavke s homogenizačnou guľôčkou 1,5 minúty v homogenizátore pri frekvencii 25 Hz /s. V prípade vzoriek obsahujúcich stabilizačný roztok RNA later, bol tento odsatý a potom sa prešlo k homogenizácii. Homogenizované vzorky boli poukladané do mraziacich stojanov a ku každej vzorke bolo pridaných 400 μ l roztoku RLT pufru s β -merkaptóetanolom. Vzorky boli opäť homogenizované 1,5 minúty pri frekvencii 25 Hz/s. Mikroskúmavky s homogenátmi boli centrifugované po dobu 3 minút pri rýchlosti 14000 rpm. K homogenátom bolo pridaných 400 μ l 70 % etanolu *p.a.* (*per analysis*). Obsah mikroskúmavky bol pomocou špičky s filtrom premiešaný a celý prepipetovaný na RNA kolónu umiestnenú v 2ml mikroskúmavke. Vzorky boli následne centrifugované 15 s pri rýchlosti 10 000 rpm. Obsah spodnej mikroskúmavky bol vyliaty a skúmavka osušená. Do každej kolónky bolo pridaných 700 μ l RW1 pufru a kolónky s mikroskúmavkami boli centrifugované 15 sekúnd pri rýchlosti 10 000 rpm. Obsah mikroskúmavky bol opäť vyliaty a mikroskúmavka osušená. Do kolóniek bolo pridaných 500 μ l RPE pufru a boli centrifugované 15 s pri rýchlosti 10 000 rpm. Obsah spodnej mikroskúmavky bol vyliaty a mikroskúmavka osušená ako v predchádzajúcich krokoch. Do kolóniek bolo pridaných ešte raz 500 μ l RPE pufru a vzorky boli centrifugované 2 minúty pri rýchlosti 10 000 rpm. Spodná skúmavka bola vyhodnená a kolónka bola premiestnená do novej suchej mikroskúmavky. Následne boli vzorky nasucho centrifugované 1 minútu pri rýchlosti 14 000 rpm. Kolónka bola premiestnená do sterilnej 1,5ml RNA-free mikroskúmavky. Špičkou bez filtra bolo pridaných priamo na membránu kolónky 60 μ l vody zbavenej RNáz. Vzorky boli centrifugované 1 minútu pri rýchlosti 10000 rpm. Po ukončení izolácie bola stanovená koncentrácia izolovanej RNA spektrofotometricky

pomocou Nanodropu (Implen Biotech), kde bol meraný pomer vlnových dĺžok 260/280 nm. Vzorky izolovanej RNA boli uchovávané pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.2 Prepis do cDNA

Prepis izolovanej RNA do cDNA bol uskutočnený pomocou iTaqTM Universal Probes One Step kitu podľa protokolu odporúčaného výrobcom.

Najprv bola pripravená zmes Random Hexameruov, dNTP Mixu a vody zbavenej nukleáz. Na 32 vzoriek bolo použitých 48 μl Random Hexamérov, 96 μl dNTP Mixu a 312 μl vody zbavenej nukleáz. Pripravená zmes bola rozpipetovaná po 14,25 μl do pripravených označených PCR-mikroskúmaviek umiestnených v mraziacom stojane. Do každej mikroskúmavky bolo pridaných 7,5 μl izolovanej RNA. Vzorky boli prenesené do termocykléra, kde bola zmes templát-primer denaturovaná pri teplote $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minút a potom rýchlo schladená na ľade. Následne bola pripravená PCR zmes pre 32 vzoriek obsahujúca 192 μl R pufru, 24 μl Ribolocku a 48 μl RevertAid Reverse transkriptázy. Zmes bola rozpipetovaná do mikroskúmaviek po 8,25 μl a krátko scentrifugovaná. V termocykléri bol nastavený program pre reverznú transkripciu. Zmes bola inkubovaná 10 min. pri teplote $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 60 min. pri teplote $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ a napokon 10 min. pri teplote $70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prepísaná cDNA bola skladovaná do 24 hod. v chladničke pri teplote $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$, v prípade dlhodobjšieho skladovania bola uložená do mrazničky kde bola teplota $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.3 Reťazová polymerázová reakcia – detekcia DNA patogénov

Na PCR amplifikáciu fragmentov génových markerov špecifických pre jednotlivé patogény: baktérie a jednobunkovce bol používaný pripravený PCR Master mix (5x FIREPol® Master Mix - s 12,5 mM MgCl_2 , Solis BioDyne, Estonia), ktorý pozostáva z FIREPol® DNA polymerázy, reakčného pufru 5x Reaction Buffer B 0,4 M Tris-HCl, 0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 % w/v Tween-20, 12,5 mM roztoku MgCl_2 na 1x PCR solution – 2,5 mM MgCl_2 a zmesi nukleotidov 1 mM dNTPs z každého na 1x PCR solution – 200 μM dATP, 200 μM dCTP, 200 μM dGTP a 200 μM dTTP. Do každého PCR stripu bolo napipetovaných 5 μl Master mixu, 1 μl špecifických reverse a forward primerov (Tabuľka č. 1) a 13 μl deionizovanej vody. Následne bolo pridaných 5 μl testovanej vzorky vo forme cDNA do každého stripu. V prípade negatívnej kontroly bolo do reakčnej zmesi namiesto cDNA pridaných 5 μl deionizovanej vody. Ako pozitívna kontrola boli použité vzorky, v ktorých už bola potvrdená prítomnosť

daného patogénu, ktoré boli napipetované do stripov namiesto cDNA v objeme 5 µl. Výsledný objem pre PCR amplifikáciu bol teda 25 µl. Všetky PCR reakcie prebiehali v termocykléroch pri špecifických teplotných programoch (Tabuľka č. 2).

Tabuľka 1: Špecifické primery použité na PCR

Patogén	Primery	Sekvencia DNA (5'-3')	Gén	Dĺžka fragmentu	Zdroj
<i>A. phagocytophilum</i>	msp2R	ATGGAAGGTAGTGTGGTTATGGTATT	Membrane surface protein 2 <i>msp2</i>	334 bp	Eberts a kol., 2011
	msp2F	TTGGTCTTGAAGCGCTCGTA			
<i>Babesia spp.</i>	Bn2	TAGTTTATGGTTAGGACTACG	18S rRNA	450 bp	Casati a kol., 2006
		GTCTTGTAATTGGAATGATGG			
<i>B. burgdorferi</i> s.l.	Bj1				
	IgSa	CGACCTTCTTCGCCTTAAAGC	<i>rrfA-rrlB</i>	222–255 bp	Derdáková a kol., 2005
	IgSb	AGCTCTTATTCGCTGATGGTA	intergénový medzerník 5S-23S		

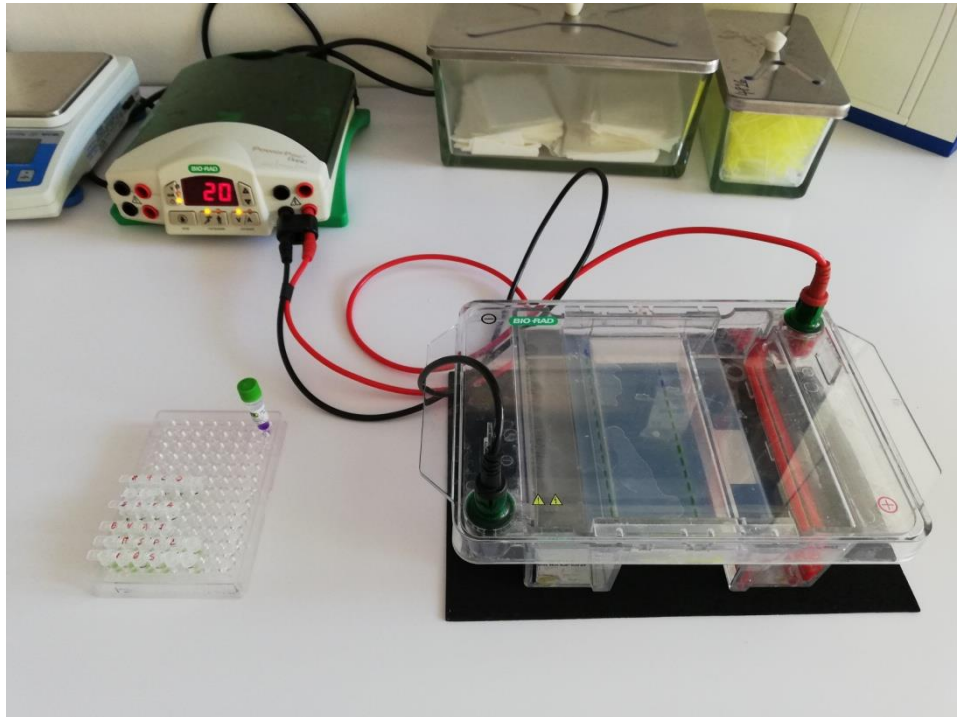
Tabuľka 2: Teplotné programy použité pri PCR jednotlivých patogénov

Patogén	Iniciálna denaturácia	Denaturácia	Anealing	Predĺžovanie DNA vlákna	Konečná polymerizácia	Stabilizácia DNA
<i>A. phagocytophilum</i>	95°C/5 min	95°C/30 s (35x)	55°C/30 s (35x)	72°C/1 min (35x)	72°C/5 min	4°C/∞
<i>Babesia spp.</i>	95°C/5 min	94°C/30 s (35x)	54°C/30 s (35x)	72°C/40 s (35x)	72°C/5 min	4°C/∞
<i>B. burgdorferi</i> s.l.	94°C/5 min	94°C/15 s (35x)	45°C/50 s (35x)	65°C/90 s (35x)	65°C/5 min	4°C/∞

4.4.4 Elektroforetická vizualizácia PCR produktov

Na prípravu 1,5 % agarózového gélu boli navážené 3 g agarózy, ktoré sa rozpustili v 200 ml 1x TAE pufru. Zmes bola v mikrovlnnej rúre ohrievaná až

do vyčírenia roztoku. Po miernom vychladnutí bolo do roztoku pridaných 7 μ l farbiva GoodView. Pripravený gél bol vyliaty do elektroforetickej vaničky a boli doň umiestnené hrebienky. Po stuhnutí gélu boli hrebienky opatrne vyiahnuté a gél bol zaliaty 1x TAE pufrom. Do každej jamky bolo nanosených 5 μ l vzorky a na koniec každého riadku boli nanosené 3 μ l DNA rebríka (DNA Ladder 100 bp). Elektroforetická migrácia bola spustená pri 120 V a trvala približne 20 minút. Výsledok bol vizualizovaný s použitím UV transluminátora.



Obrázok 16: Elektroforetická separácia

4.4.5 Real-time PCR

Vzorky izolovanej RNA boli testované na prítomnosť vírusu kliešťovej encefalitídy metódou Real-time PCR. Použitý bol protokol pre Real-time amplifikáciu TBEV podľa Schweigera a Cassinottiho z roku 2003 s použitím komerčného kitu pre Real-time PCR iScript universal Probes 1 step kit (Bio-Rad). Pripravený bol master mix obsahujúci iTaq universal Probes reaction mix, RT Mix, F-TBEV primer, R-TBEV primer, TBEV próbu a RNase-free vodu. Pipetované objemy a koncentrácie jednotlivých látok sú uvedené v tabuľke č. 3. Do každého stripu bolo napipetovaných 20 μ l pripraveného mixu a následne pridaných 5 μ l RNA. Do negatívnej kontroly bolo miesto RNA napipetovaných 5 μ l deionizovanej vody. Pripravené stripy boli vložené to

real-time termocykléra, kde bol nastavený špecifický teplotný program (viď tabuľka č. 4).

Tabuľka 3: Pipetované objemy na prípravu Master mixu pre Real-time PCR

Chemická látka	Pipetovaný objem pre 1 vzorku
Reaction mix	12,5 μ l
RT Mix	0,625 μ l
F-TBEV primer	1 μ l
R-TBEV primer	1 μ l
TBEV próba	1 μ l
Template RNA	5 μ l
RNA-free voda	3,875 μ l
Výsledný objem	25 μ l

Tabuľka 4: Teplotné programy použité pri Real-time PCR

Proces	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklov
Iniciálna denaturácia	50	10 min	1
Denaturácia	95	2 min	1
Hybridizácia	95	15 s	40–45
Elongácia	60	60 s	40–45

5 VÝSLEDKY

V modelovej lokalite Slanské vrchy bolo za rok 2016 nazbieraných metódou vlnkovania vegetácie 606 kliešťov, roztriedených do 68 poolov. Zber prebiehal počas vegetačnej sezóny v období od apríla do septembra v nadmorských výškach od 600 m.n.m do 870 m.n.m. Všetky pozbierané kliešte patrili do druhu *Ixodes ricinus* v zastúpení 537 nýmí a 69 dospelých jedincov. Z kliešťov boli vytvorené pooly (5 dospelých jedincov, resp. 10 nýmí spolu), ktoré boli uchované v hlbokom mraze pri teplote -80 °C do ďalšieho spracovania.

V experimentálnej časti práce bola z poolov izolovaná RNA s použitím komerčného kitu (Quiagen Rnase Mini Kit). Následne bola izolovaná RNA prepísaná pomocou enzýmu reverznej transkriptázy do cDNA, potrebnej pre PCR detekciu DNA patogénov. S použitím druhovo-špecifických primerov pre jednotlivé patogény boli amplifikované vybrané úseky génov, ktoré boli následne vizualizované s pomocou horizontálnej elektroforézy a vyhodnotené v UV transluminátore.

Na zistenie prítomnosti *Babesia* spp. boli použité primery Bn2 a Bj1 (Cassati a kol., 2006) amplifikujúce fragment 18S rRNA. Z celkového počtu 68 poolov bol patogén detegovaný v 8 pooloch, čo predstavuje 11,76 % pozitivitu. Baktérie z komplexu *B. burgdorferi* s.l. boli potvrdené v 20 pooloch, čo je 29,41 %. Ich prítomnosť bola zistená s použitím primerov IgSa a IgSb amplifikujúcich 222–255 bp dlhý fragment DNA (Derdáková a kol., 2003). Posledným patogénom, na prítomnosť ktorého boli kliešte v pooloch testované, je intracelulárna baktéria *A. phagocytophilum*. Na jej detekciu boli použité primery msp2R a msp2F viažuce sa na oblasť msp2 génu, kódujúceho povrchový proteín (Elberts a kol., 2011). Pozitívnych poolov bolo 7, čo predstavuje 10,29 % z celkového počtu testovaných poolov. Výsledky sú zhrnuté v tabuľke č. 1.

Vzorky izolovaných RNA boli testované aj na prítomnosť vírusu kliešťovej encefalitídy pomocou metódy Real-time PCR s použitím komerčného kitu pre Real-time PCR. Ako pozitívne vzorky sa počítali tie, ktorých vrchná treshold hodnota bola 38. Z vyšetrených 68 poolov bolo na vírus kliešťovej encefalitídy pozitívnych 11 poolov, čo predstavuje 16,18 %. V prípade percentuálneho vyhodnotenia pozitivitu poolov na prítomnosť TBEV prezentujeme výsledky ako hodnotu MIR (minimum

infection rate), teda minimálna infekčná dávka, kde predpokladáme, že v každom poolu je vírusom infikovaný (minimálne) jeden kliešť.

Tabuľka 5: Počty pozitívnych poolov na jednotlivé patogény a percentuálne vyjadrenie.

Patogén	Počet vyšetrených poolov	Počet pozitívnych poolov	Percentuálne vyjadrenie počtu pozitívnych poolov
<i>B. microti</i>	68	8	11,76 %
<i>B. burgdorferi</i> s. l.	68	20	29,41 %
<i>A. phagocytophilum</i>	68	7	10,29 %
TBEV	68	11	16,18 %

V súvislosti s nadmorskou výškou bolo najviac kliešťov nazbieraných vo výške 600 m.n.m (372 kliešťov) a ich počet klesal so stúpajúcou nadmorskou výškou, najmenej kliešťov bolo nazbieraných v nadmorskej výške 700 m.n.m (16 kliešťov). V najvyššej nadmorskej výške, kde bol uskutočňovaný zber (870 m.n.m) bolo nazbieraných 37 kliešťov a potvrdila sa prítomnosť dvoch patogénov, *Babesia* spp. a *Borrelia burgdorferi* s.l. Vo výške 600 m.n.m boli prítomné všetky testované patogény, z toho najviac *B. burgdorferi* s.l. a TBEV, a to v množstve po 8 pozitívnych poolov. Vo výške 700 m.n.m neboli potvrdené žiadne patogény, čo môže byť dôsledkom nízkeho počtu nazbieraných kliešťov v danej lokalite. O 50 m vyššie, v nadmorskej výške 750 m.n.m, však bolo nazbieraných až 78 kliešťov, čo je tretí najvyšší počet a prítomné boli aj všetky skúmané patogény v zložení: 3 pooly pozitívne na prítomnosť *Babesia* spp. a *Borrelia burgdorferi* s.l., jeden pool pozitívny na *A. phagocytophilum* a 2 pooly pozitívne na vírus kliešťovej encefalitídy. Výsledky sú zaznamenané v tabuľke 2.

V niektorých pooloch sme zistili prítomnosť viacerých patogénov súčasne, konkrétne sa jednalo o nasledujúce kombinácie: 3 pooly pozitívne na prítomnosť *Babesia* spp. a vírus kliešťovej encefalitídy, 3 pooly pozitívne na prítomnosť *Babesia* spp. a *Borrelia burgdorferi* s.l., 3 pooly pozitívne na prítomnosť *B. burgdorferi* a *Anaplasma phagocytophilum*. Najpočetnejšia kombinácia bola vírus kliešťovej encefalitídy s baktériami z komplexu *Borrelia burgdorferi* s.l., ktorými boli koinfikované kliešte až v 4 pooloch. V 1 poolu sa potvrdila prítomnosť *Babesia* spp. spolu s *A. phagocytophilum*. Podarilo sa nám zaznamenať v 2 pooloch dokonca

koinfekciu tromi patogénmi: *Borrelia burgdorfferi* s.l., *Babesia* spp. a vírus kliešťovej encefalitídy.

Tabuľka 6: Počty nazbieraných kliešťov v rôznych nadmorských výškach a počty poolov pozitívnych na testované patogény.

Nadmorská výška [m.n.m.]	Počet nazbieraných kliešťov	Počet pozitívnych poolov na <i>Babesia</i> sp.	Počet pozitívnych poolov na <i>Borrelia burgdorfferi</i> s.l.	Počet pozitívnych poolov na <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Počet pozitívnych poolov na TBEV
600	372	4	8	3	8
700	16	0	0	0	0
750	78	3	3	1	2
770	41	0	4	2	0
790	62	0	2	1	1
870	37	1	3	0	0

Sezónna dynamika kliešťov na vegetácii bola jednovrcholová, s jarným vrcholom v máji (Graf 1), kedy bolo nazbieraných spolu 268 kliešťov. Menej výrazný nárast početnosti kliešťov na vegetácii sledujeme v mesiacoch júl a september, kedy bolo nazbieraných 79 a 81 kliešťov. Naopak najmenej kliešťov bolo nazbieraných v júni, v počte iba 29 jedincov, čo s najvyššou pravdepodobnosťou súvisí s extrémne suchým a teplým počasím. Vyššia prítomnosť patogénov v kliešťoch bola zaznamenaná v prvých mesiacoch vegetačného obdobia (apríl–máj), výnimku ale tvorí vírus kliešťovej encefalitídy. Najviac pozitívnych kliešťov bolo nazbieraných v septembri, v počte 6 pozitívnych poolov. Kliešte nazbierané v najteplejších mesiacoch, v júli a v auguste, boli infikované menším počtom patogénov. Výsledky sú zobrazené v tabuľke č. 3.

Graf 1: Sezónna dynamika kliešťov na vegetácii v lokalite Slanské vrcholy v roku 2016.



Tabuľka 7: Počty nazbieraných kliešťov v jednotlivých mesiacoch a počty pozitívnych poolov s hodnotou MIR (%)

Mesiace zberu	Počet nazbieraných kliešťov	Počet poolov	Počet pozitívnych poolov na <i>Babesia</i> spp. (MIR*)	Počet pozitívnych poolov na <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. (MIR)	Počet pozitívnych poolov na <i>Anaplasma phagocytophilum</i> (MIR)	Počet pozitívnych poolov na TBEV (MIR)
Apríl	111	14	0/14 (0 %)	7/14 (50 %)	4/14 (28,6 %)	0/14 (0 %)
Máj	268	28	4/28 (14,3 %)	10/28 (35,7 %)	2/28 (7,1 %)	4/28 (14,3 %)
Jún	29	3	1/3 (33,3 %)	1/3 (33,3 %)	1/3 (33,3 %)	0/3 (0 %)
Júl	79	9	0/9 (0 %)	0/9 (0 %)	0/9 (0 %)	1/9 (11,1 %)
August	38	4	1/4 (25 %)	1/4 (25 %)	0/4 (0 %)	0/4 (0 %)
September	81	10	2/10 (20 %)	1/10 (10 %)	0/10 (0 %)	6/10 (60 %)

*MIR (minimal infection rate) – minimálne percento nakazených kliešťov v poole. Tento percentuálny podiel sa vypočíta ako (počet pozitívnych poolov / celkový počet testovaných poolov) x 100. MIR predpokladá, že pozitívny pool obsahuje iba jedného nakazeného kliešťa (www.msosquito.com)

6 DISKUSIA

V predloženej bakalárskej práci sme sa zamerali na sledovanie sezónnej dynamiky kliešťov na vegetácii na vybranej lokalite Slanských vrchov, v rôznych nadmorských výškach a monitoring výskytu vybraných DNA a RNA patogénov, ktoré tieto krv cicajúce článkonožce prenášajú. Cieľom bolo zhodnotiť mieru infekčného rizika pre človeka, počas pohybu na území, ktoré je turisticky zaujímavou oblasťou.

V literatúre sa uvádza, že v podmienkach strednej Európy je krivka sezónnej aktivity kliešťov z druhu *I. ricinus* dvojrcholová (bimodálna) s maximami v jarných a jesenných mesiacoch (Jurášek a kol., 1993). V posledných rokoch sa však vo viacerých prípadoch potvrdzuje jednovrcholová (unimodálna) krivka. Najpravdepodobnejšie vysvetlenie je zvyšovanie priemerných ročných teplôt a hlavne teplejšie a suchšie letá. To spôsobuje, že jesenný vrchol aktivity postupne mizne a výraznejšie sa zachováva ten jarný. Na nami skúmanej lokalite sme zaznamenali taktiež iba jarný vrchol sezónnej dynamiky kliešťov na vegetácii. V jesenných mesiacoch bola dynamika výskytu vyššia ako v lete, ale nebola ani zďaleka tak vysoká ako na jar. Môžeme teda konštatovať, že na jeseň bol viditeľný určitý nárast výskytu a aktivity kliešťov na vegetácii, avšak nepokladáme ho za vrchol.

Zmeny v početnosti populácií ľudí a zvierat, v spôsoboch využívania pôdy, v poľnohospodárskych postupoch, zmeny charakteru biotopov a podnebí sú hlavnými hnacími silami vzniku a šírenia infekčných chorôb (Ogden a kol., 2016).

V kliešťoch z vegetácie sme sa zamerali na molekulárny skríning prítomnosti bakteriálneho pôvodcu novo sa objavujúceho ochorenia, granulocytárnej anaplazmózy, majúceho zoonózný potenciál. Ochorenie spôsobujú baktérie z rodu *Anaplasma*, ktoré sú prenášané práve kliešťom obyčajným a cirkulujú v prostredí v dvoch samostatných enzootických cykloch.

Po prvýkrát na Slovensku bola *A. phagocytophilum* detegovaná v kliešťoch *I. ricinus* Špitálskou a Kociánovou (2002). Odvtedy bolo na Slovensku publikovaných niekoľko desiatok prác, pojednávajúcich o biologických a epidemiologických aspektoch *A. phagocytophilum*. Vo všeobecnosti sa uvádza, že prevalencia baktérií v kliešťoch na vegetácii sa pohybuje od 0–6 % v závislosti od lokality, prítomnosti hostiteľov mikro- a makro-klimatických podmienok prostredia. Kompetentnými hostiteľmi *A. phagocytophilum* v prírode sú drobné cicavce a vysoká (hlavne srnčia a jelenia) zver.

Podľa štúdie Víchovej a kol. (2014) kde testovali jeleniu a srnčiu zver na prítomnosť *A. phagocytophilum*, bola pozitivita 17,5 % u jelenej a 61,5 % u srnčej zveri, čo poukazuje na významnú úlohu vysokej zveri ako prirodzeného rezervoára baktérií.

V štúdiu Pangrácovej a kol. (2013), kde testovali kliešte nazbierané na 10 lokalitách východného Slovenska, bolo z celkového množstva 670 vyšetrených kliešťov 2,69 % kliešťov *I. ricinus*, pozitívnych na *A. phagocytophilum*. Podľa štúdie Víchovej a kol. (2014) sa prevalencia *A. phagocytophilum* v kliešťoch zbieraných v rokoch 2006 – 2011 na lokalite východného Slovenska pohybovala v rozmedzí 1,4% - 5,5 %. Svitáľková a kol. (2015) sa zamerali na porovnanie počtu infikovaných kliešťov na dvoch vybraných lokalitách v okolí Bratislavy, mestskej a prírodnej. Podľa ich výsledkov bol počet kliešťov infikovaných *A. phagocytophilum* výrazne vyšší v mestskej časti. Celková prevalencia *A. phagocytophilum* bola 5,1 %. V porovnaní s výskumom Vaculovej a kol. (2019) sa prevalencia *A. phagocytophilum* zvyšuje. Ich výsledky ukazujú 5,9 % prevalenciu v rekreačných oblastiach Bratislavy.

Keďže sme v našej práci kvôli veľkému počtu vzoriek netestovali jednotlivé kliešte, ale pracovali sme s poolmi, výsledky boli vyhodnotené v percentuálnych hodnotách pozitívnych poolov, ako hodnota MIR (minimum infection rate), kde sa predpokladalo, že minimálne jeden kliešť v poole bol infikovaný (www.msosquito.com). V nami testovanom súbore bolo pozitívnych na *A. phagocytophilum* 10,29 % poolov (n = 68). V porovnaní s minulými rokmi sledujeme nárast prevalencie *A. phagocytophilum* na území Slovenska.

Prvý humánný prípad granulocytárnej anaplazmózy na Slovensku bol zaznamenaný Novákovou a kol. (2010) u 54-ročného muža, ktorý sa zúčastnil štúdie zameranej na vyšetrenie slovenských poľovníkov a lesníkov ako rizikovej skupiny populácie v súvislosti s granulocytárnou anaplazmózou. Potvrdilo sa, že *A. phagocytophilum* je baktéria so zoonóznym potenciálom, ktorá môže vyvolať závažné ochorenia ľudí a zvierat. Monitoring výskytu a prevalencie vo vektoroch je významný z hľadiska odhadu rizika pre človeka a následných preventívnych opatrení.

Baktérie z rodu *Babesia* sú vnútrobunkové krvné parazity prenášané kliešťami, ktoré spôsobujú ochorenie babeziózu. Druhy v rámci *Babesia* sa líšia svojou virulenciou aj zoonóznym potenciálom a môžu spôsobiť babeziózu u ľudí aj zvierat. Na Slovensku boli od roku 1991 zaznamenané tri prípady humánnej babeziózy a viaceré prípady

nakazených psov (Majláth a Majláthová, 2015). V posledných rokoch sa objavujú publikácie s popismi nových druhov, ktoré doposiaľ neboli zaznamenané, prípadne sa šíria z iných oblastí, napríklad *Babesia gibsoni*, *Babesia microti* a i. Zároveň však sledujeme aj miznutie niektorých druhov, ktoré sa v minulosti vyskytovali na našom území omnoho častejšie. Za všetky môžeme spomenúť napríklad *Babesia divergens*, pôvodcu babeziózy/krvomočenia hovädzieho dobytká, ktorá bola veterinárnym problémom hlavne v 50tych rokoch minulého storočia, avšak postupne pozorujeme jej úbytok na území Slovenska (Víchová, osobné zdedenie). Z toho dôvodu je nevyhnutný lokálny monitoring na zaznamenanie výskytu nových parazitov a možného ochorenia zvierat aj ľudí.

Blaňárová a kol. (2016) potvrdili prítomnosť babézií v hlodavcoch odchytených na území východného Slovenska, čo značí že drobné cicavce zohrávajú dôležitú úlohu v životnom cykle niektorých druhov babézií (*Babesia microti*), ako rezervoároví hostitelia. Podľa výsledkov výskumu Hamšíkovej a kol. z roku 2016, kde vyšetřovali kliešte nazbierané počas rokov 2011–2013 v pohorí Malých Karpát na západnom Slovensku, bola prevalencia *Babesia* spp. v kliešťoch *I. ricinus* nazbieraných počas dvoch rokov 6,6 %. V pohorí Slanských vrchov v roku 2016 sme zaznamenali 11,76 % *Babesia* spp. pozitívnych poolov.

Kliešťová encefalitída je vírusová nákaza človeka prenášaná kliešťami, ktorá postihuje centrálnu nervovú sústavu. Pôvodcom nákazy je RNA arbovírus, patriaci do čeľade Flaviridae. Počet ochorení kliešťovej encefalitídy na Slovensku sa pohyboval v rokoch 1976–1993 medzi 20 a 75 prípadmi ročne. Od roku 1993 má však chorobnosť stúpajúci trend. Čoraz častejšie sú pozorované prípady alimentárnej nákazy, keď sa ľudia nakazili konzumáciou nepasterizovaného kravského, kozieho i ovčieho mlieka. Vírus sa u dojných zvierat objaví v mlieku na druhý až tretí deň po napadnutí infikovaným kliešťom a jeho vylučovanie trvá 3 až 7 dní (Kerlik a kol. 2018). V súčasnosti je pomerne málo dát o cirkulácii vírusu kliešťovej encefalitídy v kliešťoch, čomu by mohol pomôcť monitoring výskytu kliešťov v oblastiach s vysokým počtom prípadov kliešťovej encefalitídy.

Posledným patogénom, na ktorého prítomnosť boli testované nami nazbierané kliešte boli gramnegatívne baktérie z komplexu *Borrelia burgdorferi* s. l., spôsobujúce

vážne multisystémové ochorenie nazývané lymská borelióza. Táto infekčná choroba je najčastejšou chorobou prenášanou kliešťami v Európe.

Nárast výskytu lymskej boreliózy a kliešťovej encefalitídy je s veľkou pravdepodobnosťou čiastočne spôsobený šírením a zväčšovaním sa populácií *I. ricinus*. Podľa Spronga a kol. (2018) rozširovanie a vytváranie ekologických sietí naprieč Európou nie je výhodné iba pre zver a rastlinstvo, ale taktiež pre ektoparazity a s nimi spojené patogény a parazity, umožňujúce im ľahšie udržanie sa v prírode a šírenie do nových lokalít. Výskum Schuchinovej a kol. (2015) dokazuje, že nadmorská výška je dôležitým faktorom pri vývoji epidemiologickej situácie kliešťovej encefalitídy: čím vyššia je nadmorská výška, tým menšia je početnosť/abundancia vektorov. Avšak v posledných rokoch sa so zmenami klímy zvyšuje prirodzená hranica výskytu kliešťov, aj nimi prenosných patogénov, a ich prítomnosť bola dokázaná aj v nadmorskej výške nad 1000 m.n.m (Taragel'ová a kol., 2016). Podľa našich výsledkov bolo 16,18 % (n=11/68) poolov pozitívnych na prítomnosť vírusu kliešťovej encefalitídy. Najviac pozitívnych poolov, až 8, bolo nazbieraných v najnižšej nadmorskej výške zberu (600 m.n.n). S nadmorskou výškou klesal počet pozitívnych vzoriek, čo sa zhoduje s výsledkami publikácie od Schuchinovej a kol. (2015).

Je jednoznačné, že epidemiológia niektorých chorôb spôsobených vektormi prenášanými patogénmi a parazitmi sa v posledných desaťročiach zmenila. Niektoré klimatické modely poukazujú na možný geografický posun vektorov chorôb a patogénov v spojení s otepľovaním klímy (Andersen, 2017).

Zaujímavé dáta boli publikované českými kolegami. Distribúcia *I. ricinus* v horských regiónoch Českej republiky bola študovaná na rovnakých lokalitách od roku 1950. Zber kliešťov z rokov 1950 a 1981 dokázal, že kliešte neboli prítomné na miestach položených vyššie ako 700 m.n.m. Keď bol zber vykonaný na rovnakých lokalitách v rokoch 2001, 2002 a 2003, výskyt kliešťov bol potvrdený až do výšky 1250 m.n.m (Materna a kol., 2005). Podľa prieskumu Vonesch a kol. (2016) sa geografická distribúcia kliešťami prenášaných chorôb od roku 1980 zmenila. Kliešte sú teraz nachádzané vo vyššie položených miestach, kde pred tým ročné obdobia boli príliš krátke alebo chladné pre ich prežitie. Na Slovensku Majláthová zaznamenala kliešte *I. ricinus* vo Veľkej Fatre v nadmorskej výške nad 1400 m nad morom (osobné zdelenie).

Monitorovanie vektorov šíriacich patogény, ktoré spôsobujú vážne ochorenia má globálny význam a to nie len pre ľudské zdravie, ale aj z hľadiska zdravia zvierat (Tomassone 2018). Z toho dôvodu sú lokálne výskumy nevyhnutné na posúdenie výskytu, druhovej diverzity a abundancie nových parazitov a možného rizika vzniku a šírenia chorôb ľudí a zvierat.

7 ZÁVER

Bakalárska práca bola zameraná na štúdium výskytu a sezónnej dynamiky kliešťov *Ixodes ricinus* na modelovej lokalite Slanské vrchy na východnom Slovensku s dôrazom na detekciu výskytu a druhovej diverzity kliešťami prenášaných patogénov s použitím molekulovo-genetických metód na báze PCR. Naše výsledky potvrdili, že v študovanej lokalite má výskyt kliešťov *I. ricinus* jednovrcholovú sezónnu dynamiku s vrcholom v máji, pričom najvyšší bod s výskytom kliešťov bol v nadmorskej výške 870 m. n. m.

Výskyt kliešťami prenášaných patogénov s narastajúcou nadmorskou výškou klesá, ale oproti minulým rokom sa hranica ich výskytu posúva do vyšších polôh. V nami vyšetrených kliešťoch *I. ricinus* sme potvrdili prítomnosť *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp. a baktérií z komplexu *Borrelia burgdorferi* s. l., ako aj vírusu kliešťovej encefalitídy. Na študovanej modelovej lokalite boli najviac rozšírenými kliešťami prenosnými patogénmi práve pôvodcovia lysmskej boreliózy a kliešťovej encefalitídy, ktoré sú veľmi významné z epidemiologického hľadiska. Výskyt pôvodcov boreliózy a anaplazmózy v tejto oblasti je tiež významný z hľadiska možného prenosu na ľudí a zvieratá. Keďže Slanské vrchy sú obľúbenou turistickou lokalitou s veľkým pohybom ľudí, existuje riziko ich nakazenia sa týmito patogénmi. Vyššia prítomnosť patogénov v kliešťoch bola zaznamenaná v prvých mesiacoch vegetačného obdobia (apríl–máj) s výnimkou vírusu kliešťovej encefalitídy, ktorého výskyt kulminoval v septembri.

Z hľadiska ochrany zdravia ľudí a zvierat pred nakazením je v endemických oblastiach výskytu kliešťov nevyhnutné pravidelne aplikovať repelentné a akaricídne prípravky počas celého obdobia aktivity kliešťov. Veľmi dôležitá je správna aplikácia prípravku podľa odporúčania výrobcu a pravidelná reaplikácia počas pobytu v prírode. Je vhodné voliť tiež správne oblečenie, ktoré zabráni preniknutiu kliešťá na kožu a dôkladná kontrola tela po návrate z prírody spojená s včasným odstránením kliešťá, ktoré znižuje riziko prenosu patogéna do hostiteľa.

Bakalárska práca poukazuje na dôležitosť a potrebu neustáleho monitorovania kliešťov a nimi prenášaných pôvodcov chorôb v ohniskách s endemickým výskytom. Molekulovo-genetické metódy na báze PCR sú vhodným nástrojom na určenie druhovej skladby kliešťami prenosných patogénov, čím poskytujú dôležité epidemiologické údaje, ktoré môžu prispieť k zefektívneniu programu prevencie pre ochranu zdravia zvierat a ľudí.

8 LITERATÚRA

ANDERSEN L. K., DAVIS M. D. (2017): Climate change and the epidemiology of selected tick-borne and mosquito-borne diseases: update from the International Society of Dermatology Climate Change Task Force. *International Journal of Dermatology* 56(3): 252-259

APPEL, M.J.G., ALLAN, S., JACOBSON, R.H., LAUDERDALE, T.L., CHANG, I.F., SHIN, S.J., THOMFORD, J.W., TODHUNTER, R.J., SUMMERS, B.A. (1993): Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *Journal of Infectious diseases* 167: 651-664

BARTUNEK P. (1996): *Lymeská borelióza*. Praha: Grada Publishing

BATTSETSEG B., LUCERO S., XUAN X., CLAVERIA F., BYAMBAA B., BATTUR B., BOLDBAATAR D., BATSUKH Z., KHALIUNAA T., BATTSETSEG G., IGARASHI I., NAGASAWA H. , FUJISAKI K. (2002): Detection of equine *Babesia* spp. gene fragments in *Dermacentor nuttalli* Olenov 1929 infesting mongolian horses, and their amplification in egg and larval progenies. *Journal of Veterinary Medical Science* 64: 727-730

BLAŇAROVÁ L., STANKO M., CARPI G., MIKILISOVÁ D., VÍCHOVÁ B., MOŠANSKÝ L., BONA M., DERDÁKOVÁ M. (2014): Distinct *Anaplasma phagocytophilum* genotypes associated with *Ixodes trianguliceps* ticks and rodents in Central Europe. *Ticks and Tick Borne Diseases* 5(6): 928-938

BLAŇAROVÁ L., STANKO M., MIKILISOVÁ D., VÍCHOVÁ B., MOŠANSKÝ L., KRAJLÍK J., BONA M., DERDÁKOVÁ M. (2016): Presence of *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* and *Babesia microti* in rodents and two tick species (*Ixodes ricinus* and *Ixodes trianguliceps*) in Slovakia. *Ticks Tick Borne Dis* 7(2): 319-326

BLANCO J.R., OTEO J.A. (2002): Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 8: 763-772

BRAUN F.O., PLEWIG G., WOLFF H. (2001): *Dermatológia a venerológia*. Osveta 151

- BULLOVÁ E., LUKÁN M., STANKO M., PEŤKO B. (2009): Spatial distribution of *Dermacentor reticulatis* in Slovakia in the beginning of 21th century. *Veterinary Parasitology* 165: 357-360
- BURKOT T.R., MAUPIN G.O., SCHNEIDER B.S., DENATALE C., HAPP C.M., RUTHERFORD J.S., ZEIDNER N.S. (2001) Use of a sentinel host system to study the questing behavior of *Ixodes spinipalpis* and its role in the transmission of *Borrelia bissettii*, human granulocytic ehrlichiosis, and *Babesia microti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65: 293-299
- BURRASCANO J.J. (2005): Diagnostic hints and treatment guidelines for lyme and other tick borne illnesses. *Advanced topics in Lyme disease* 33
- BURRI C., CADENAS M., DOUET V., GERN L. (2007): *Ixodes ricinus* density and infection prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a North-facing altitudinal gradient in the Rhône Valley (Switzerland). *Vector borne zoonotic diseases* 7(1): 50-58
- CANTU A., ORTEGA S. J.A., MOSQUEDA J., GARCIA-VAZQUEZ Z., HENKE S.E., GEORGE J.E. (2007): Immunologic and molecular identification of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in free-ranging white-tailed deer in northern Mexico. *Journal of Wildlife diseases* 43: 504-507
- CARCY B., PRÉCIGOUT E., SCHETTERS T., GORENFLOT A. (2006): Genetic basis for GPI-anchor merozoite surface antigen polymorphism of *Babesia* and resulting antigenic diversity. *Veterinary Parasitology* 138: 33-49
- CASATI S., SAGER H., GERN L., PIFFARETTI J. C. (2006) Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 13(1): 65-70
- COMSTOCK L. E., THOMAS D. D. (1989) Penetration of endothelial cell monolayers by *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity* 57: 1626-1628
- CRÍADO-FORNELIO A., MARTÍNEZ-MARCOS A., BULING-SARA ŇA A., BARBA-CARRETERO J.C. (2003): Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part I. Epizootiological aspects. *Veterinary parasitology* 113(3-4): 189-201
- ČERNÝ, V. (1972): The tick fauna of Czechoslovakia. *Folia Parasitologica* 19: 87-92

- DANIELOVÁ V., KLIEGROVÁ S., DANIEL M., BENES C. (2008a): Influence of climate warming on tickborne encephalitis expansion to higher altitudes over the last decade (1997-2006) in the Highland Region (Czech Republic). *Central European Journal of Public Health* 16(1): 4-11
- DANIELS T.J., BATTALY G.R., LIVERIS D., FALCO R.C., SCHWARTZ I. (2002): Avian reservoirs of the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Emerging Infectious Diseases* 8: 1524-1525
- DE LA FUENTE J., TORINA A., NARANJO V., CARACAPPA S., DI MARCO V., ALONGI A., RUSSO M., MAGGIO A.R., KOCAN K.M. (2005): Infection with *Anaplasma phagocytophilum* in a seronegative patient in Sicily, Italy: Case report. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobial* 4: 15
- DERDÁKOVÁ M., HALÁNOVÁ M., STANKO M., ŠTEFANČÍKOVÁ A., ČISLÁKOVÁ L., PEŤKO, B. (2003b): Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from eastern Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 10: 269-271
- DERDÁKOVÁ M., LENCÁKOVÁ D. (2005): Association of genetic variability within the *Borrelia burgdorferi* sensu lato with the ecology, epidemiology of Lyme borreliosis in Europe. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 12(2): 165-172
- DUMLER J. S., BARBET A. F., BEKKER C. P. J., DASCH G. A., PALMER G. H., RAY S. C., RIKIHISA Y., RURANGIRWA F. R. (2001): Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 2145-2165
- DUMLER J.S., CHOI K.S., GARCIA-GARCIA J.C., BARAT N.S., SCORPIO D.G., GARYU J.W., GRAB D.J., BAKKEN J.S. (2005): Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerging Infectious Diseases* 11: 1828-1834
- EBERTS M. D., VISSOTTO DE PAVIA DINIZ P. P., BEALL M. J., STILLMAN B. A., CHANDRASHEKAR R., BREITSCHWERDT E. B. (2011): Typical and atypical

manifestation of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs. Journal of the American Animal Hospital Association 47(6):86-94

EGYED L., ELO P., STRETER L. (2012): Seasonal activity and tick-borne pathogen infection rates of *Ixodes ricinus* in ticks in Hungary. Ticks and tick-borne diseases 3: 90-94

FILIPPOVA N. A. (1977): Ixodid ticks of subfamily Ixodinae. Fauna SSSR

FOLEY J.E., FOLEY P., MADIGAN J.E. (2001): Spatial distribution of seropositivity to the causative agent of granulocytic ehrlichiosis in dogs in California. American Journal of Veterinary Research 62: 1599-1605

GARNHAM P.C.C., BRAY R.S. (1959): The susceptibility of the higher primates to piroplasms. Journal of Protozoology 6: 352-355

GELPI E., PREUSSER M., GARZULY F., HOLZMANN H., HEINZ F. X., BUDKA H (2005): Visualization of Central European tick-borne encephalitis infection in fatal human cases. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 64(6): 506-512

GERN L., HUMAIR.F. (2002): Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. In GRAY, KAHL J.S., LANE O., STANEK R.S: Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control, Wallingford: CABI International, 2002. 149-174

GERN L., RAIS O. (1996) Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between co-feeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). Journal of Medical Entomology 33: 189 - 192

GOETHERT H. K., TELFORD S. R. (2003): What is *Babesia microtii*? Journal of Parasitology 4: 301-309

GOLDOVÁ M., LETKOVÁ V. (2004): Ektoparazity zvierat a človeka. Základy veterinárnej parazitológie. 12-17

GRARD G., MOREAU G., CHARREL R. (2007): Genetic characterization of tick-borne flavivirus : New insights into evolution, pathogenic determinants and taxonomy. Virology 361: 80-92

GRAY J.S., WEISS L.M. (2008): *Babesia microti*. In Emerging protozoan pathogens. Taylor and Francis, Abingdon. UK. 303-349

HAMŠÍKOVÁ Z., KAZIMÍROVÁ M., HARUŠTIAKOVÁ D., MAHRÍKOVÁ L., SLOVÁK M., BERTHOVÁ L., KOCIANOVÁ E., SCHNITTGER L. (2016): *Babesia* spp. in ticks and wildlife in different habitat types of Slovakia. Parasits and vectors 9(1): 292

HILLYARD P.D. (1996): Ticks of North-West Europe. In Synopses of the British Fauna BARNES, R.S.K., CROTHERS J.H. Field Studies Council. Shrewsbury. 52: 178

HOMER M.J., GUILAR-DELFIN I., TELFORD S.R., KRAUSE P.J., PERSING D.H. (2000): Babesiosis. Clinical Microbiology 13: 451-469

HULÍNSKA D., LANGEROVA K., PEJČOCH M., PAVLÁSEK I. (2004): Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in animals by real-time polymerase chain reaction. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica 112: 239-247

HUNFELD K.P., HILDEBRANDT A., GRAY J.S. (2008): Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. International Journal of Parasitology 38:1219-1237

CHEN S.M., DUMLER J.S., BAKKEN J.S., WALKER D.H. (1994): Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. Journal of Clinical Microbiology 32: 589-595

Inra Science and Impact. [online] [navštívené 28.2.2019] Dostupné z <http://www.inra.fr/en/Scientists-Students/Animal-biology/All-reports/Tick-fighting-tactics>

JEFFERIES R., RYAN U.M., MUHLNICKEL C.J., IRWIN P.J. (2003): Two species of canine *Babesia* in Australia: detection and characterization by PCR. Journal of Parasitology 89: 409 - 412

JURÁŠEK V., DUBINSKÝ P. (1993): Veterinárna parazitológia. 382 ISBN 80-07-00603-6: 382

KAISER R. (1996): Tick-borne encephalitis in southwestern Germany. Infection 24(5): 398-399

- KERLÍK J., AVDIČOVÁ M., ŠTEFKOVIČOVÁ M., TARKOVSKÁ V., PÁNTIKOVÁ M., MOLČÁNYI T., MEZENEC R (2018): Slovakia reports highest occurrence of alimentary tick-borne encephalitis in Europe: Analysis of tick-borne encephalitis outbreaks in Slovakia during 2007-2016. *Travel Medicine and Infectious Disease* 26: 37-42
- KMETY E. (1983): *Epidemiológia*. Martin: Osveta
- KURTENBACH K., PEACEY M., RIJKEMA G., HOODLES A.N., NUTTALL P.A., RANDOLPH S.E. (1998): Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1169-1174
- LABUDA M., AUSTYN J. M., ZUFFOVA E., KOZUCH O., FUCHSBERGER N., LYSY J., NUTTALL P. A. (1996): Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology* 219(2):357-366
- LAMBIN E., TRAN A., VANWAMBEKE S. (2010): Pathogenic landscapes: Interactions between land, people, disease vectors and their animal hosts *International journal of health geographics* 9: 54
- LUO J., CHEN F., LU W., GUAN G., MA M., YIN H. (2003): Experimental transmission of an unnamed bovine *Babesia* by *Hyalomma* spp., *Haemaphysalis longicornis* and *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* 116: 115-124
- MADIGAN J.E. (1993): Equine ehrlichiosis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 9: 423–428
- MAJLÁTH A MAJLÁTHOVÁ (2015): *Atlas kliešťov Slovenska, vydanie prvé*, Parazitologický ústav Košice
- MAJLÁTHOVÁ V., MAJLÁTH I., DERDÁKOVÁ M., VÍCHOVÁ B., PEŤKO B. (2006): *Borrelia lusitaniae* and Green lizards (*Lacerta viridis*), Karst region, Slovakia. *Emerging Infectious Diseases* 12: 1895-1901

MANDL C. W., ECKER M., HOLZMANN H., KUNZ C., HEINZ F. X. (1997): Infectious cDNA clones of tick-borne encephalitis virus European subtype prototypic strain Neudoerfl and high virulence strain Hypr. *Journal of General Virology* 5: 1049-1057

Marin/Sonoma Mosquito and vector control district. [online] [navštívené 28.3.2019]
Dostupné
z https://www.msosquito.com/sites/default/files/documents/Helig_PCRBorrelia.pdf

MATERNA J., DANIEL M., KRIZ B., DANIELOVA V., RUDENKO N., HOLUBOVA J., SCHWARZOVA L., GOLOVCHENKO M. (2005): Occurrence of ticks infected by tickborne encephalitis virus and *Borrelia* genospecies in mountains of the Czech Republic. *Euro surveillance* 10(3)

MC KENNA P., CLEMENT J., VAN DIJCK D., LAUWERIS M., CAREY D., VAN DEN BOGAARD T., BIGAIGNON G. (1995): Canine Lyme disease in Belgium. *The Veterinary Record* 136: 244-247

MICKIENE A., LAISKONIS A., GUNTHER G., VENE S., LUNDKVIST A., LINQUIST L. (2002): Tickborne encephalitis in area of high endemicity in Lithuania: disease severity and long-term prognosis. *Clinical Infectious Diseases* 35(6): 650-658

NOVÁKOVÁ M., VÍCHOVÁ B., MAJLÁTHOVÁ V., LESNAKOVA A., POCHYBOVA M., PEŤKO B. (2010): First case of human granulocytic anaplasmosis from Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 17(1): 173-175

OGDEN N. H. (2016): Vector-borne disease, climate change and urban design. *Canada Communicable Disease Report* 42(10): 202

OGDEN N.H., NUTTALL P.A., RANDOLPH S.E. (1997): Natural Lyme disease cycles maintained via sheep by co-feeding ticks. *Parasitology* 115: 591-599

PANGRÁCOVÁ L., DERDÁKOVÁ M., PEKÁRIK L., HVIŠČOVÁ I., VÍCHOVÁ B., STANKO M., HLAVATÁ H., PEŤKO B. (2013): *Ixodes ricinus* abundance and its infection with the tick-borne pathogens in urban and suburban areas of Eastern Slovakia. *Parasites and Vectors* 6(1): 238

- PARKER J.L., WHITE K.K. (1992): Lyme borreliosis in cattle and horses: a review of the literature. *Cornell Veterinarian* 82: 253 – 274
- PEŤKO B., MAJLÁTHOVÁ V. (2005): Kliešte v podmienkach globálnych zmien. Kapitola z :Vybrané kapitoly zo všeobecnej parazitológie. Dubinský P. a kol., ŠPAKULOVÁ M. (ed): Košice. Parazitologický ústav SAV. 115–133
- PEŤKO B., ČERNÝ V., JURÁŠEK V. (1991): Parasite-host relationship of the tick *Ixodes trianguliceps* and coincidence of its ecological niches with those of *Ixodes ricinus*. *Modern Acarology*. Academia Prague: 455-460
- PHILLIPS R.S. (1984): *Babesia divergens* in splenectomised rats. *Research in Veterinary Science* 36: 251-255
- POSTIC D., GARNIER M., BARANTON G. (2007): Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates – Description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genospecies. *Journal of Medical Microbiology* 4: 263-271
- RIEG S., SCHMOLDT S., THEILACKER CH., DE WITH K., WÖLFEL S., V KERN W., DOBLER G. (2011): Tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA) acquired in Southwestern Germany. *BMC Infectious Diseases* 11: 167
- RICHTER D., SCHLEE D.B., ALLGOWER R., MATUSCHKA F.R. (2004): Relationship of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in central Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 6414-6419
- RIKIHISA Y. (1991): The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 4: 286-308
- RUDZINSKA M.A., SPIELMANA., LEWENGRUB S., PIESMAN J., KARAKASHIAN S. (1982): Penetration of the peritrophic membrane of the tick by *Babesia microti*. *Cell and Tissue Research* 221: 471-481
- RUZEK D. (2015): Tick-borne encefalitis - pathogenesis and -therapeutic approaches. *Epidemiologie, Mikrobiologie a Imunologie (czech review)* 64(4): 204-209
- SAINZ Á., ROURE X. MIRÓ G., ESTRADA-PEÑA A., KOHN B., HARRUS S., SOLANO-GALLEGO L. (2015): Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites and Vectors* 8:75

SHAPIRO (2014): *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease). *Pediatrition revue*. 35(12): 500-509

SCHUCHINOVA L. D., KOZLOVA I. V., ZLOBIN V. I.(2015): Influence of altitude on tick-borne ecephalitis infection risk in the natural foci of the Altai Republic, Southern Siberia. *Ticks and Tick Borne Diseases* 6(3): 322-329

SOLANO-GALLEGO L., SAINZ Á., ROURA X., ESTRADA-PEÑA A., MIRÓ G. (2016): A review of canine babesiosis: the European perspective. *Parasites and Vectors* 9:336

Spirochetes unwound. [online] [navštívené 28.2.2019] Dostupné z <http://spirochetesunwound.blogspot.com/2009/02/viewing-arrangement-of-borrelia.html>

SPRONG H., AZAGI T., HOOMSTRA D., NIJHOF AM., KNORR S., BAARSMA ME., HOVIUS JW. (2018): Control of Lyme borreliosis and other Ixodes ricinus-borne diseases. *Parasites and Vectors* 11(1): 145

STANEK G., STRLE F., GRAY J., WORMSER G.P. (2002): History and characteristics of Lyme borreliosis. In Gray J, Kahl O, Lane RS, Stanek G (Hrsg) *Lyme borreliosis biology, epidemiology and control* 5-16

STRLE F. (2004) Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *International Journal of Medical Microbiology* 293: 27-35

STUEN S. (2013): *Anaplasma phagocytophilum*-the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Veterinary Research Communications* 31:79-84

SVITÁLKOVÁ Z., HARUŠTIAKOVÁ D., MAHRÍKOVÁ L., BERTHOVÁ L., SLOVÁK M., KOCIANOVÁ E., KAZIMÍROVÁ M. (2015): *Anaplasma phagocytophilum* prevalence in ticks and rodents in an urban and natural habitat in South-Western Slovakia. *Parasites and Vectors* 8: 276

SZYMANSKI S. (1987): Seasonal activity of *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) (Acarina, Ixodidae) in Poland. *Acta Parasitologica Polonica*. 29: 247-255

ŠKARDOVÁ I., ŠKARDA J., SESZTÁKOVÁ E., ŠTEFANČÍKOVÁ A., DERDÁKOVÁ M., PEŤKO B. (2001): Aktuálne problémy v diagnostike lymsej

boreliózy u zvierat. In Kliešťami prenášané infekčné choroby a iné zoonózy, Zborník z konferencie so zahraničnou účasťou. Košice. ed. PEŤKO B., JURIŠ P. 50-52

ŠPITALSKÁ E., KOCIANOVÁ E. (2002): Agents of *Ehrlichia phagocytophila* group and other microorganisms co-infecting tick in southwestern Slovakia. *Acta Virologica* 46(1): 49-50

ŠTEFANČÍKOVÁ A., ADASZEK L., PEŤKO B., WINIARCZYK S., DUDIŇÁK V. (2008a): Serological evidence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in horses and cattle from Poland and diagnostic problems of Lyme borreliosis. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*.15: 37-43

ŠTEFANČÍKOVÁ A., DERDÁKOVÁ M., MAJLÁTHOVÁ V., LENČÁKOVÁ D., BOLDIŽÁR M., STANKO M., PEŤKO B. (2005): Coincidence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma* in free-living, domestic and farm animals from eastern Slovakia,. In Venglovský J. (eds), *Ecology and Veterinary Medicine VI.*, Proceeding, Košice. 51-57

TARAGELOVÁ V., KOČI J., HANINCOVÁ K., OLEKŠÁK M., LABUDA M. (2005): Songbirds as hosts of ticks (Acari:Ixodidae) in Slovakia. *Biologia* 60: 529-537

TARAGELOVÁ V., MAHRÍKOVÁ L., SELYEMOVÁ D., VÁCLAV R., DERDÁKOVÁ M. (2016): Natural foci of *Borrelia lusitaniae* in mountain region of Central Europe. *Ticks and Tick Borne Diseases* 7(2): 350-356

TÄLLEKLINT L., JAENSON T.G. (1994): Transmission of *Borrelia burgdorferi* s.l. from mammal reservoirs to the primary vector of Lyme borreliosis, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), in Sweden. *Journal of Medical Entomology* 31: 880-886

Tickencounter resource center. [online] [navštívené 28.2.2019] Dostupné z https://tickencounter.org/tick_identification/tick_species

TOMASSONE L., BERRIATUA E., DE SOUSA R., DUSCHER GG., MIHALCA AD., SILAGHI C., SPRONG H., ZINTL A. (2018): Neglected vector-borne zoonoses in Europe: Into the wild. *Veterinary Parasitology* 251: 17-26.

- VACULOVÁ T., DERDÁKOVÁ M., ŠPITALSKÁ E., VÁCLAV R., CHVOSTÁČ M., RUSŇÁKOVÁ TARAGELOVÁ V. (2019): Simultaneous Occurrence of *Borrelia miyamotoi*, *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* Ticks in Urban Foci in Bratislava, Slovakia. Acta Parasitologica 64(1): 19-30
- VÍCHOVÁ B. MAJLÁTHOVÁ V., NOVÁKOVÁ M., STRAKA M., PEŤKO B. (2010): First Molecular Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in European Brown Bear (*Ursus arctos*). Vector-borne and zoonotic diseases 10: 543-545
- VÍCHOVÁ B., MAJLÁTHOVÁ V., NOVÁKOVÁ M., STANKO M., HVIŠČOVÁ I., PANGRÁCOVÁ L., CHRUDIMSKÝ T., ČURLÍK J., PEŤKO B. (2014): Anaplasma infections in ticks and reservoir host from Slovakia. Infection, Genetics and Evolution. 22: 265-272
- VOLF P., HORÁK P. (2007): Paraziti a jejich biologie. 318 ISBN 978-80-7387-008-9
- VONESCH N, D'OVIDIO MC, MELIS P, REMOLI ME, CIUFOLINI MG, TOMAO P. (2016): Climate change, vector-borne diseases and working population. Annali dell Istituto Superiore di Sanita 52(3): 397-405.
- WENGLER G., WENGLER G. (1989): Cell-associated west Nile Flavivirus is covered with E+pre-M protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release. Journal of virology 63: 987-992
- WIKEL S. (2013): Tick and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment. Frontiers in Microbiology 4:337
- ZINTL A., MULCAHY G., SKERRETT H.E., TAYLOR S.M., GRAY J.S. (2003): *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. Clinical Microbiology Reviews 16: 622-636