

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Fakulta veterinární hygieny a ekologie



**Detekce patogenních mikroorganismů přenášených ornitofilními
klíšťaty**

Bakalářská práce

Autor práce:

Kateřina Havlíčková

Vedoucí práce:

Mgr. Ivo Papoušek, Ph.D.

Brno, 2015

PODĚKOVÁNÍ

Nejprve bych chtěla poděkovat Mgr. Ivo Papouškovi, Ph.D., vedoucímu své bakalářské práce, za věnovaný čas, ochotný přístup, trpělivost a také za množství cenných rad a informací, které mi byly poskytnuty v průběhu zpracování této práce.

Dále bych také chtěla poděkovat Mgr. Markétě Novákové, za její ochotu, rady a pomoc při zpracování praktické části a za sběr vzorků.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celému Ústavu biologie a chorob volně žijících zvířat, pracovníkům laboratoře molekulární biologie za jejich rady a ochotu. Především pak paní laborantce Evě Suchanové za pomoc při práci v laboratoři.

Velký dík patří také mé rodině a přátelům za jejich podporu a oporu po celou dobu studia.

PROHLÁŠENÍ STUDENTA

Prohlašuji, že jsem předkládanou bakalářskou práci vypracovala zcela samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a veškeré podkladové materiály, z nichž jsem vycházel, uvádím v seznamu literatury.

V Brně dne 25. 3. 2015

.....

(podpis studenta)

OBSAH

1. ÚVOD.....	6
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	7
2.1. Klíště jako biologická jednotka.....	7
2.1.1. Charakteristika klíšťat.....	7
2.1.2. Systematické zařazení klíšťat.....	7
2.1.3. Význam klíšťat.....	8
2.1.4. Životní cyklus klíšťat.....	8
2.1.5. Anatomie klíšťat.....	9
2.1.6. Rod <i>Ixodes</i> a další.....	10
2.2. Ptactvo coby hostitel klíšťat.....	11
2.3. Břehule říční (<i>Riparia riparia</i>).....	12
2.4. <i>Ixodes lividus</i> (klíště modravé).....	14
2.5. <i>Ixodes arboricola</i> (klíště stromové).....	17
2.6. Druhy onemocnění dle původce.....	19
2.6.1. Virové onemocnění.....	19
2.6.2. Bakteriální onemocnění.....	20
2.6.3. Protozoární onemocnění.....	21
2.7. Zástupci patogenních původců.....	22
2.7.1. <i>Rickettsia</i>	22
2.7.1.1. <i>Rickettsia rickettsii</i>	22
2.7.1.2. Vliv <i>Rickettsie</i> ve válce.....	24
2.7.2. <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	25
2.7.3. <i>Borrelia burgdorferi</i>	26
2.7.4. Rod <i>Babesia</i>	26
2.7.5. Arboviry.....	28
2.7.6. <i>Coxiella burnetti</i>	29
3. CÍL.....	30
4. MATERIÁLY A METODIKA.....	30
4.1. Původ vzorků.....	30
4.2. Izolace DNA.....	31
4.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	32
4.4. Gelová elektroforéza.....	36

4.4.1. Vizualizace gelu.....	37
4.4.2. Přístroje.....	38
4.4.3. Spotřební materiál.....	38
4.4.4. Použité chemikálie.....	38
4.4.5. Statistické metody.....	39
5. VÝSLEDKY.....	40
6. DISKUSE.....	44
7. ZÁVĚR.....	45
8. SEZNAM LITERATURY.....	46
9. ABSTRAKT.....	52
10. SEZNAM ZKRATEK.....	54

1. ÚVOD

Pro svou bakalářskou práci jsem si vybrala detekci patogenních mikroorganismů přenášených ornitofilními klíšťaty. Dle mého názoru je toto téma velmi důležité, protože jsou klíšťata spojována s některými virovými, bakteriálními či protozoárními infekcemi u zvířat i lidí. Proto budí u většiny populace negativní názor. Z důvodů možnosti přenosu infekce musí být klíšťata, a to nejen ornitofilní, sledována a testována na řadu původců onemocnění. Testování slouží nejen jako prevence proti šíření nemocí, ale také jako monitoring výskytu vážných i méně závažných onemocnění.

Tato bakalářská práce je zaměřena na ornitofilní klíšťata a patogeny s nimi spojené, tedy na klíšťata parazitující na ptácích se zaměřením na břehuli říční (*Riparia riparia*). V konkrétním případě se jedná o klíště modravé (*Ixodes lividus*) a klíště stromové (*Ixodes arboricola*) parazitující na již zmíněné břehuli říční. Většina klíšťat byla odebrána z nor (hnízd) tohoto ptáka. Po celém našem území se vyskytuje velké množství druhů klíšťat. Za nejčastěji se vyskytující klíště v České republice je označováno klíště obecné (*Ixodes ricinus*).

Zpracovala jsem přes 100 vzorků z různých míst České republiky. Před zpracováním vzorků proběhl sběr v předem vybraných lokalitách. Vzorky nebyly časově omezené, sběr však probíhal ve dvou etapách. Odběr vzorků provedla Mgr. Markéta Nováková. Lokality sběru byly zaměřeny především na místa hnízdění břehule říční, což jsou převážně staré pískovny. Získaná klíšťata byla uchována za specifických podmínek a dále jsem provedla izolaci DNA. Vyizolovanou DNA jsem poté použila pro PCR a elektroforézu. Vzorky byly testovány na přítomnost bakterií *Rickettsia spp.* Výsledky práce jsem dále vyhodnotila a zpracovala.

Klíšťata přenášejí celou řadu původců závažných onemocnění člověka a zvířat. K nejvýznamnějším patří na našem území klíšťová encefalitida, lymeská borrelióza a lidská granulocytární anaplazmóza (dříve lidská granulocytární ehrlichioza). U ornitofilních klíšťat se jedná především o patogenní mikroby, bakterie *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia spp.*, a jednobuněčného parazita *Babesia spp.*

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Klíště jako biologická jednotka

2.1.1. Charakteristika klíšťat

Klíště je roztoč (*Acari*), řadící se do čeledi klíšťatovitých (Ixodidae) jako je například klíště obecné (*Ixodes ricinus*), klíště modravé (*Ixodes lividus*) nebo klíště stromové (*Ixodes aricola*). Je to krev sající členovec (*Arthropoda*) či parazit přežívající na tělech savců, ptáků a plazů (Rosický aj., 1979). Klíšťata jsou rozšířena po celém světě. Ve světě je popsáno přes 850 různých druhů (Sonenshine, 1991). Tito cizopasníci figurují jako přenašeči infekčních chorob na člověka či zvíře. Velikost se pohybuje mezi 2 - 4,5 mm. Samička se vyznačuje většími rozměry a to mezi 3,5 a 4,5 mm, zatímco menší sameček měří 2,2 - 2,5 mm. Tělo klíštěte je složeno z hlavové části (*gnathosoma*) a těla (*idiosa*).

Pro výskyt klíšťat je směrodatný obsah vlhkosti v prostředí. Čím je vlhkost menší, tím je výskyt klíšťat zvýšený. Na polích se vyskytuje s malou pravděpodobností. Obvykle se vyskytují v listnatých lesích, křovinách a na zatravněných plochách (Šebková, 2014).

2.1.2. Systematické zařazení klíšťat

Říše	<i>Animalia</i> Linnaeus, 1758 - živočichové
Podříše	<i>Eumetazoa</i> Butschli, 1910
Oddělení	<i>Bilateria</i> Hatschek, 1888 - dvoustranně souměrní
Pododdělení	<i>Protostomia</i> Grobben, 1908 - prvoústí
Kmen	<i>Arthropoda</i> Latreille, 1829 - členovci
Podkmen	<i>Chelicerata</i> - klepítkatci
Třída	<i>Arachnida</i> Cuvier, 1812 - pavoukovci
Podtřída	<i>Micrura</i>
Infratřída	<i>Acari</i> Nitzsch, 1818 - roztoči
Nadřád	<i>Parasitiformes</i>
Řád	<i>Ixodida</i> - klíšťata
Podřád	<i>Ixodina</i>
Čeleď	<i>Ixodidae</i> Koch, 1844 - klíšťatovití
Podčeleď	<i>Ixodinae</i>
Rod	<i>Ixodes</i> Latreille, 1795 - klíště
Podrod	<i>Ixodes</i> Latreille, 1795
Druh	<i>Ixodes ricinus</i> (Linnaeus, 1758) - klíště obecné

Tabulka č. 1: Systematické zařazení klíštěte obecného

Upraveno dle: <http://www.biolib.cz/cz/taxonposition/id76144/>

2.1.3. Význam klíšťat

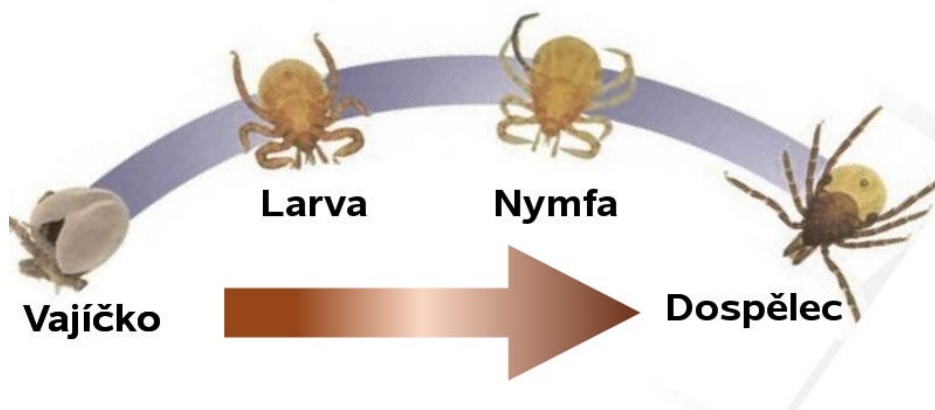
Význam tohoto parazita je především negativní, je to dáno pro jeho krev sající funkci. Škodí svému hostiteli ztrátou krve či možností nákazy choroboplodným patogenem. Pokud parazit přenáší jednu z nemocí, je označován jako vektor přenosu. Po komárech jsou klíšťata nejnebezpečnější ektoparazité. Larvy sají 2 - 3 dny, i tak krátká doba jim stačí. Nymfa saje 5 - 6 dnů, dospělá samice ještě déle 10 - 12 dnů. Přenos patogenů (tj. viry, bakterie či priony) probíhá pomocí slin. Tento jev zásadně ovlivňuje vnitřní prostředí hostitele. Existují tři čeledi klíšťat. Čeleď Ixodidae (tvrdá klíšťata) a Argasidae (měkká klíšťata) jsou dvě hlavní čeledi. Čeleď Nuttalliellidae, je samostatnou čeledí s jediným zástupcem *Nuttalliella spp.* (upraveno dle Sonenshine, 1991).

Klíšťata čeledi Ixodidae jsou nestálí ektoparazité, tzn., že stráví část života mimo hostitele (McCoy a kol., 2003; Chevillon a kol., 2007).

Klíště není schopno aktivně vyhledat svého hostitele, trpělivě čeká ve vysoké trávě či jiné vegetaci. Má na konci posledního článku prvního páru nohou jamku, ve které je umístěn Hallerův orgán, sloužící jako senzor pachových a chemický látek ze svého okolí, upozorňující na možného hostitele. Ve větší blízkosti pak tento parazit reaguje na otřesy.

2.1.4. Životní cyklus klíšťat

Samička klíštěte je schopna za svůj život vyprodukovat 2 500 až 4 000 vajíček. Je to velmi vysoká reprodukční schopnost. Jsou schopna odolávat a přežívat v chladných a suchých obdobích roku. To vysvětluje jejich sezonnost a aktivní výskyt na zvířatech. Klíšťata se vyznačují čtyřmi životními (vývojovými) stádii. První je stádium embryonální, další tři stádia se označují jako stádia aktivní (larva, nymfa, dospělec).



Obrázek č. 1: Vývojová stádia klíštěte

Upraveno dle: <https://www.kliste.cz/cz/vse-o-klistatech/clanek/zivotni-cyklus-klisat>

Klíšťata čeledi Ixodidae mají jednotný vývojový cyklus. Poté co samička naklade vajíčka, vylíhnou se larvy. Tyto larvy se dostávají do cizích hnízd, ve kterých vyčkají na svého hostitele. Pokud se přisají, mohou sát až několik dnů. Po nasání larvy vyhledají klidné, kryté prostředí, kde se přemění ve stádium nymf. Nymfy opět hledají hostitele a proces se opakuje. Nasáté nymfy vyhledají kryté prostředí, kde se svlečou a přemění v dospělé jako v předchozím stádiu. Samice dospělého jedince vypustí vajíčka a životní cyklus je dokončen. Délka vývojového cyklu je obvykle do tří let. Tomuto cyklu říkáme tříhostitelský (Sonenshine, 1991).

Dalším typem cyklu je dvouhostitelský. Tento typ je jen u některých druhů klíšťat. Naplněná larva zůstává na svém hostiteli *in situ* (tj. na místě) a nenaplněná nymfa se opět připojí na stejné místo. K odsátí dojde až po jejich překrvení, poté opustí hostitele a stanou se z nich dospělci. Tento typ se nazývá dvouhostitelský.

U jednohostitelského typu larva i nymfa zůstávají *in situ* (tj. na místě), po přeměně v dospělé se samice a samec spáří. Samice poté vypustí vajíčka do přírody (Sonenshine, 1991).

2.1.5. Anatomie klíšťat

Tento drobný členovec má dorzoventrální zploštělé tělo oválného tvaru. Tělo se skládá ze 2 částí, hlavohruď a zadečku. Nečlánekovaný zadeček srůstá s hlavohruďí v jeden celek. Hlavová část (*gnathosoma*) nese především ústní ústrojí (*hypostom*) a makadla (Sonenshine, 1991). *Hypostom* (česky chobotek) je hlavní součástí ústního

ústrojí. Jedná se o útvar pokrytý dozadu seskupenými zoubky. V rýhách po stranách *hypostomu* se nacházejí *pedipalpy* a *chelicer*y (tj. první a druhý pár příústních končetin). Při sání vypouští do rány sliny obsahující enzym *ixodin*, který zamezuje srážení krve (Lang, 1974).

Dospěle vyvinuté klíšťata mají sice šest páru nohou, avšak první dva páry prošli evolučními změnami. První pár se přeměnil v *chelicer*y, druhý pár v *pedipalpy*. *Idiosoma* nese čtyři páry kráčivých poměrně dlouhých končetin (Klimeš a kol., 2004). Na chodidlech předního páru končetin se nachází Hallerův orgán, který jim slouží k detekci CO₂, tepla, otřesů, tedy tento orgán slouží k detekci budoucího hostitele. Končetina se skládá z kyčle, chocholíku, stehna, holeně, nártu a chodidla (Sonenshine, 1991).

Tento cizopasník je přizpůsoben svému parazitickému životu. Na boku střev má postranní laloky, které slouží jako zásobárna krve. Klíště dýchá pomocí vzdušnic a cévní soustava chybí. Pohlavní soustava se nachází na břišní straně těla. Klíšťata jsou gonochoristé, což znamená oddělené pohlaví jednotlivých jedinců. Při sání na hostiteli dochází ke kopulaci a samec po kopulaci hyne, zatímco samice se mnohonásobně zvětší (Klimeš a kol., 2004).

Na hřbetní straně těla se nachází *scutum* (štít), překrývající přední část těla. Samice mají *scutum* v přední části těla, zbytek těla je pokryt zřasenou kožovitou kutikulou. Tato kutikula umožňuje klíštěti mnohonásobně zvětšit objem těla při sání. U samce pak *scutum* pokrývá celé tělo.

2.1.6. Rod *Ixodes* a další

Jedním z nejvíce rozšířeným rodem klíšťat je rod *Ixodes*. Tento rod je relativně průměrné velikosti ve srovnání s jinými rody, v rozmezí 3 - 4 mm na délku, když jsou nenakrmení. V České republice je nejvíce rozšířen *Ixodes ricinus* (klíště obecné). S tímto druhem klíštěte se můžeme setkat v listnatých a smíšených porostech s dostatečnou vlhkostí (Rosický a Weiser, 1952). Avšak tento rod zahrnuje kolem 250 druhů klíšťat. Například *Ixodes lividus*, *Ixodes arboricola*, *Ixodes apronophorus*, *Ixodes brunneus*, (*Scaph*)*Ixodes frontalis*, *Ixodes rothschildi*, *Ixodes trianguliceps*, (*Scaph*)*Ixodes unicavatus*, *Ixodes uriae*.

Jelikož hlavním předmětem této práce je *Ixodes lividus* (klíště modravé) a *Ixodes arboricola* (klíště stromové), budou ostatní vybrané druhy zmíněny jen krátce.

Ixodes apronophorus (klíště jarní) přetrvává převážně v mokřadech a v okolí

vodních ploch. V klidném stavu dosahuje délky 2,3 - 2,6 mm. Po nakrmení může jeho délka dosáhnout až 6 mm.

Ixodes brunneus (klíště ptákomorné) patří mezi typické ornitofilní ektoparazity s hojným výskytem ve východní části USA. Dalším typickým ornitofilním klíštětem je *Ixodes anatis* (klíště kachní).

(*Scaph*)*Ixodes frontalis* (klíště čelní) se běžně vyskytuje po celé Evropě. Lze ho spatřit v hnízdech ptáků, převážně v jehličnatých lesích. Tento druh je však specifický pro svůj výskyt v nižší vegetaci či v okolí polí a obydlí.

Ixodes rothschildi (klíště Rothschildovo) je lokalizováno ve Francii a Velké Británii. Jeho útočištěm jsou nory mořských ptáků.

Ixodes trianguliceps (klíště trojúhlé) setrvává ve vlhčích lesních oblastech, do nadmořské výšky 2 400 m.n.m. Vyhledává především hnízda ptáků. Může však napadnout i drobné savce. Jeho velikost je mezi 2,0 - 2,4 mm v klidném stavu, 8 mm může dosáhnout po dokončení krmení.

(*Scaph*)*Ixodes unicavatus* (klíště ptačí) se zdržuje ve skalních místech u pobřeží nebo v hnízdech mořských ptáků. Po nakrmení může mít až 10 mm.

Ixodes uriae je ornitofilní klíště, napadající hnízda mořských ptáků (McCoy a Tirard, 2000). Vyskytuje se v severní Evropě. Po nakrmení se může jeho délka zvětšit až na 12 mm. Toto klíště může být přenašečem bakterie *Borrelia burgdorferi* a 53 typů arbovirů.

2.2. Ptactvo coby hostitel klíšťat

Díky své geografické poloze je Česká republika velmi dobrým zázemím pro ty ektoparazity, kteří mezi své hostitele zahrnují i ptactvo. Klíště modravé (*Ixodes lividus*) obývá různé biotopy, najdeme ho na loukách, ale i ve světlých doubravách nebo v lužních lesích. Vyhýbá se pouze vysloveně mokřadním a stepním biotopům. Ptactvo se můžeme vůči tomuto cizopasníkovi bránit a to díky svému zobáku, kterým si je najde a odstraní. Avšak ani tento fakt nezabrání klíštěti se na ptákově udržet a díky tomu se stává jeho přenašečem. U ptáků bývají obvykle lokalizována kolem zobáku a očí. V případě, že hostitelem se stal tažný pták, může být klíště i se svým případným patogenem přenášeno velké vzdálenosti.

Dalším neméně důležitým druhem napadající ptactvo je piják lužní (*Dermacentor reticulatus*). Piják lužní se vyznačuje odlišným zbarvením svého štítu. Na rozdíl od rodu *Ixodes* má na svém štítu typické bílé skvrny. Dává přednost mokřadům

a životu ve vlhčích oblastech. V České republice se nejčastěji nachází na Jižní Moravě a Podyjí.

Dalším zástupcem z rodu *Dermacentor* je piják stepní (*Dermacentor marginatus*). Vyznačuje se spíše suššími oblastmi listnatých lesů (Klimeš a kol., 2004). Jeho odlišností je velikost. Piják stepní je větší než klíště obecné (*Ixodes ricinus*). Od pijáka lužního se liší barvou svého štítu. Štít je zbarvený do hněda s černými pásy.

Ptačí mohou také hostit další parazity rodu *Haemophysalis*, zástupce druhu *Haemophysalis concinna* (klíšť lužní), *Haemophysalis inermis* (klíšť lesostepní) či *Haemophysalis punctata* (klíšť stepní). Stejně jako piják lužní se tento rod nejčastěji vyskytuje na Jižní Moravě. Dospělci napadají velké savce, samičí nymfy mohou napadnout i člověka (Rosický a Weiser, 1952).

Ptačí krví se také živí klíšťák holubí (*Argas reflexus*). Jeho velikost je 6 - 9 mm. Vrchní strana těla je červenohnědě zbarvená. Dělo je dorzoventrálně zploštělé s absencí štítu (*scutum*). Nejčastěji parazituje na ptactvu v mírném pásu. Již podle názvu je patrné, že nejčastějším hostitelem se stává holub stěhovavý (*Ectopistes migratorius*) či holub domácí (*Columba livia* f. *Domestica*) (Rosický aj., 1979).

2.3. Břehule říční (*Riparia riparia*)

Tento pěvec (*Passeriformes*) je jedním druhem břehulí (*Riparia*) z čeledi vlaštovkovitých (*Hirundinidae*) hnízdící v České republice. Je pod ochranou zákona jako ohrožený druh (zákon o ochraně přírody a krajiny č. 114/1992 Sb. a vyhláška č. 395/1992 Sb., ve znění pozdějších předpisů). Mezi její hnízdiště patří celá severní polokoule. V našich zeměpisných šířkách hnízdí jeden až dvakrát ročně a můžeme se zde setkat s jejím poddruhem *Riparia riparia riparia*.

Vzhledem se samice a samec příliš neliší. Řadí se mezi menší ptáky a to díky své velikosti, která je okolo 12 centimetrů. Břehule říční má horní stranu těla hnědou, zatímco na spodní straně je bělavá s hnědým příčným proužkem na spodní straně hrdla. Její ocas je vykrojený ve tvaru vidlice.

Nejčastěji loví ve skupinách nad vodní hladinou. Je charakteristická pro svůj rychlý a obratný let obloukovitého tvaru (Hudec, 2011).

Břehule obývá místa vyznačující se hlinitými břehy či podobnými stěnami například v pískovnách, které se nacházejí v blízkosti řek, potoků nebo jiných vodních ploch. Tyto stěny bývají často příkré a slouží jako dobré místo pro budování svých hnízdicích nor. Toto hnízdo vyhrabávají svým zobákem a následně i nožkami, může

dosahovat délky až 1 metr. Dutina nory je vystlaná trávou, peřím, mechem, listy nebo jiným dostupným materiálem. Slouží jako ochrana před nebezpečím, jako je napadení predátory či nepřízní počasí. Snůška činí od 3 do 7 vajec, může být i vyšší. Mladé břehule jsou po vylíhnutí holé a jsou vyváděny ve stáří 16 až 20 dní (Bejček a Šťastný, 1999).

Pro naše nehostinné zimní počasí břehule odlétají zimovat do Afriky. Kde v početných hejnech společně s vlaštovkami a špačky přečkají část roku. Břehule odlétají na jih během září a vracejí se od poloviny dubna. Již zmíněný jev však probíhá v poměrně větším časovém rozpětí.

Tento náš nejmenší vlaštovkovitý pták vyhledává pouze živočišnou potravu. Loví hmyz nad hladinou vody, převážně komáry. Břehule byly také pozorovány, jak sbírají hmyz z vodní hladiny či dokonce při chůzi na zemi. Jsou schopny lovit zástupce hmyzu až z několika řádů.



Fotografie č. 1: Břehule říční (*Riparia riparia*)



Fotografie č. 2: Písečné nory břehule říční

Upraveno dle: www.birdphoto.cz

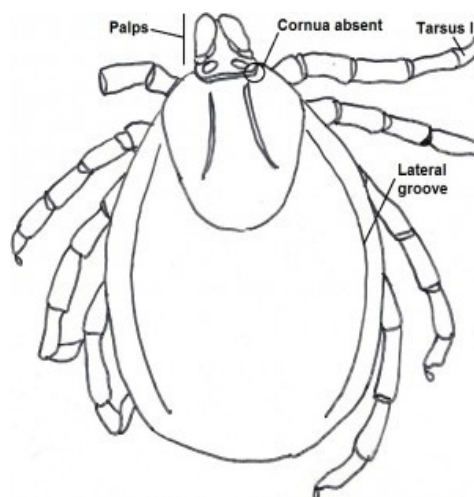
2.4. *Ixodes lividus* (klíště modravé)

Tento druh klíštěte se nejčastěji nachází v norách a hnízdech ptáků. Například u břehule říční (*Riparia riparia*) se vyskytuje po celý rok. Jelikož si tento pták buduje nory v písečných svazích, toto klíště se nejčastěji objevovalo zde. *I. lividus* je rozšířené po celé Evropě, nejvíce v Anglii, Irsku, Francii, Belgii, Holandsku, Německu, Norku, Švédsku a Polsku.

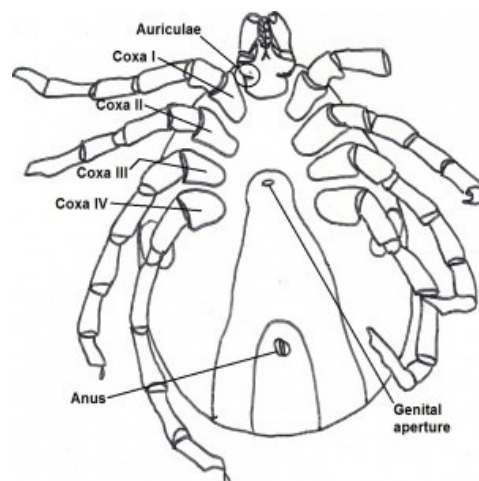
Klíště modravé bylo poprvé popsáno Robertem Kochem roku 1844.

Samec zůstává přes zimu v hnízdě. Larvy také přezimují v norách ale jen do doby než se břehule vrátí. S největší pravděpodobností samec zůstává přes zimu bez přísunu krve. Klíšťata *I. lividus* byla často spojována s jarní-letní encefalitidou v severním Rusku.

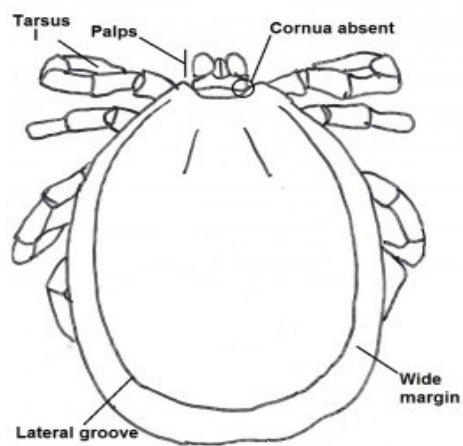
Samečci tohoto druhu jsou o něco menší než samičky. Liší se řádově o 1 - 2 mm. Samička má 2,6 - 2,9 mm. Po nasátí se může její délka zvětšit až na 7 mm. Samečci pak dosahují v klidném stavu délky 2,5 - 2,8 mm.



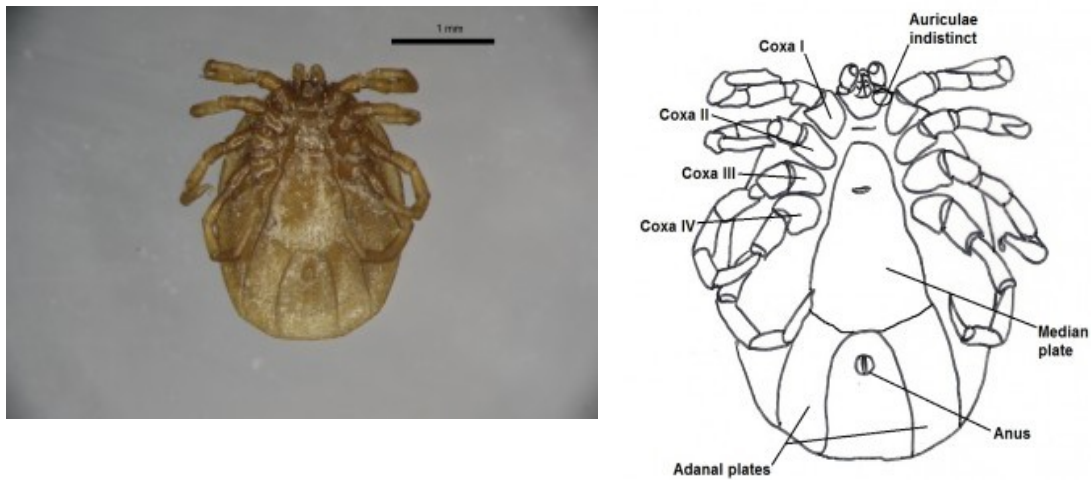
Obrázek č. 2: Dospělá samička *Ixodes lividus* dorzální strana



Obrázek č. 3: Dospělá samička *Ixodes lividus* ventrální strana



Obrázek č. 4: Dospělý sameček *Ixodes lividus* dorsální strana



Obrázek č. 5: Dospělý sameček *Ixodes lividus* ventrální strana

Upraveno: <http://bristoltickid.blogs.ilrt.org/specialized-ticks-of-the-uk/ixodes-lividus/>

Ixodes lividus a *Ixodes arboricola* jsou jedni z nejvýznamnějších ornitofilních klíšťat, expandovaných po celé Evropě. Jsou to také nejčastější přenašeči patogenů, jako je *Rickettsia rickettsii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, *Babesia*.

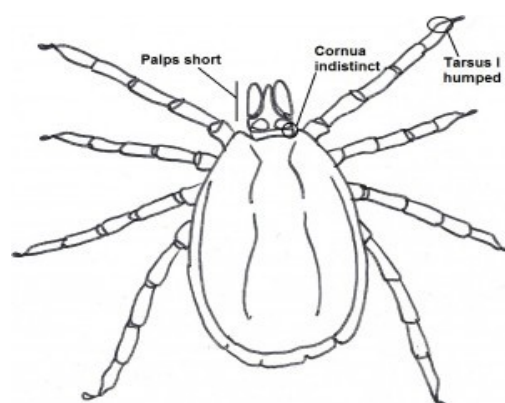
2.5. *Ixodes arboricola* (klíště stromové)

Tento druh klíštěte je expandován po celé Evropě (po celé severní polokouli). Běžně se vyskytuje v ptačích hnízdech, ve stromových otvorech či u vstupů do jeskyní. Největším zázemím pro toto klíště jsou však dutiny, převážně stromů, ve kterých se můžou vyskytovat. Proto je velmi nepravděpodobný přímý kontakt s člověkem. Může napadat mnoho druhů ptactva, nejčastěji však malé pěvce. Avšak díky svému výskytu u vstupů do jeskyní, může také napadat netopýry.

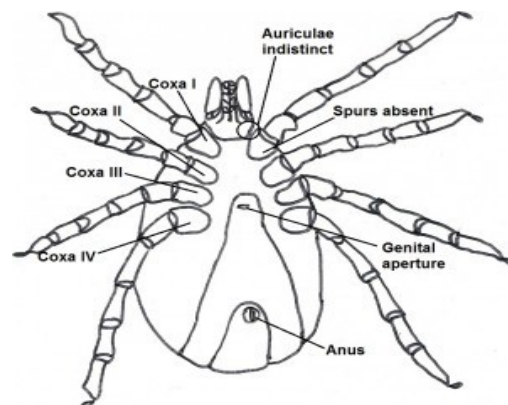
Po nakrmení může samička měřit až 6 mm, avšak při standardním nenakrmeném stavu má velikost 2,4 až 2,7 mm. Sameček měří okolo 2,5 mm.

Klíště stromové bylo poprvé popsáno roku 1929/1930 K. Schulzem a Schlottkem.

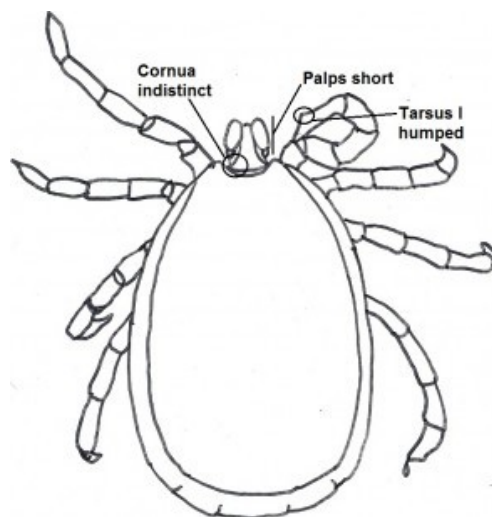
Toto klíště je přenašečem virové encefalitidy (ANONYM 1. Briston University tick ID: *Ixodes arboricola*. [online]. [cit. 2015-11-13]. Dostupné z: <http://bristoltickid.blogs.ilrt.org/specialized-ticks-of-the-uk/ixodes-arboricola/>).



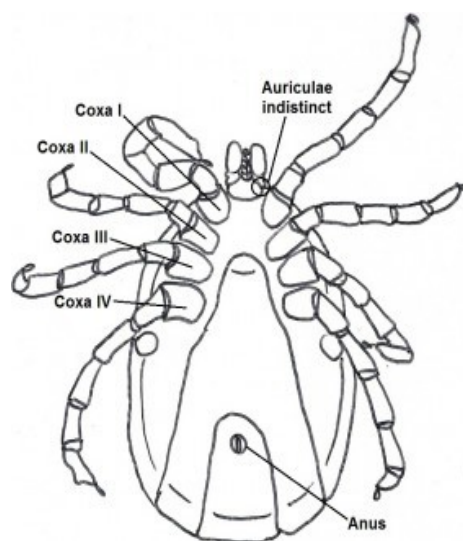
Obrázek č. 6: Dospělá samička *Ixodes arboricola* dorsální strana



Obrázek č. 7: Dospělá samička *Ixodes arboricola* ventrální strana



Obrázek č. 8: Dospělý sameček *Ixodes arboricola* dorsální strana



Obrázek č. 9: Dospělý sameček *Ixodes arboricola* ventrální strana

Upraveno: <http://bristoltickid.blogs.ilrt.org/specialized-ticks-of-the-uk/ixodes-arboricola/>

2.6. Druhy onemocnění dle původce

2.6.1. Virové onemocnění

Klíšťata jsou druhým nejčastějším hmyzím přenašečem patogenů. Nejčastějším vektorem je komár. Pokud se jedná o onemocnění přenosné ze zvířete na člověka, jde o zoonózu. Tento typ onemocnění je způsoben patogenními viry. U klíšťat se patogeny přenáší pomocí krve.

Viry jsou vnitrobuněční parazité, nebuněčné organismy, skládající se z bílkovinného obalu, ve kterém je ukryta genetická informace DNA nebo RNA (Cee, 2008). Genom viru, obsažený v nukleové kyselině, se replikuje za pomoci enzymatického aparátu hostitelské buňky. Buněčných ribozomů využívají viry k výrobě virových proteinů. Aby mohlo dojít k pomnožení viru, musí najít živého hostitele. Poté co se viry dostanou do organismu, vyhledají buňky s vhodnými receptory. Naváží se na povrch buňky (absorpce) a proniknou do ní (penetrace). Uvnitř buňky se začnou aktivovat enzymy, které začnou syntetizovat vir. Následně dojde k uvolnění nukleové kyseliny z kapsidu a k replikaci virové nukleové kyseliny. Replikace nukleových kyselin může probíhat na dvou místech, buď v jádře buňky nebo v cytoplazmě - nukleová kyselina RNA virů se replikuje v cytoplazmě, replikace DNA virů probíhá v jádře. Po syntéze virových bílkovin dochází k maturaci virů (tj. tvorba nových virionů a jejich dozrávání). Poté se viry z buňky uvolní. Viry se mohou dostat ven z buňky přes cytoplazmatickou membránu - obalené viry, nebo při prasknutí buňky - lýze buňky (Havelka, 2014).

Nejčastějším virovým onemocněním u klíšťat je klíšťová encefalitida. Toto infekční virové onemocnění je způsobeno viry ze skupiny *Flaviviridae* (Kříž a Beneš, 2014). Toto onemocnění na rozdíl od ostatních nákaz ptáci nerozlišují.

Obrázek č. 10: Struktura viru (Poxvirus)

Vnější membrána

Vnitřní membrána

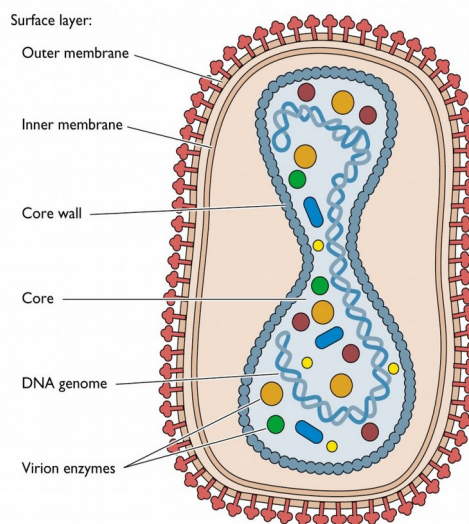
Stěna jádra

Jádro

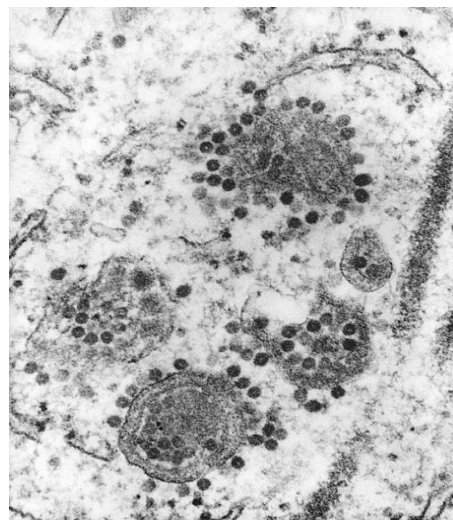
DNA genom

Virové enzymy

Upraveno dle: <http://www.twiv.tv/virus-structure>



Obrázek č. 11: Virus klíšťové encefalitidy



Upraveno dle:

<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Flaviviry>

2.6.2. Bakteriální onemocnění

Bakteriální onemocnění je způsobeno patogenními bakteriemi vyvolávající infekční reakce organismu, tj. průnik původce nákazy do organismu, jeho množení a nepříznivé působení na hostitele (bakterióza). Bakterie je prokaryotický organismus variabilního tvaru, může mít tvar například tyčinky, koků či spirály. Skládá se z peptidoglykanové buněčné stěny, nukleoidu (nukleová kyselina s DNA obalená proteinovou kapsidou), cytoplazmy, plazmidů a ribozomů. Dělí se binárně. Velikost se pohybuje mezi desetinami a desítkami mikrometrů. Bakterie jsou nejrozšířenější skupinou organismů na světě (Tremel a kol., 2014).

Bakterie se nejčastěji za pomoci klíštěte dostane do organismu hostitele přes kůži. Pokud se bakterie do organismu dostane, začne se binárně dělit. Inkubační doba je časový interval potřebný k pomnožení bakterií po vniknutí do organismu. Jak rychle se začne bakterie v organismu množit, záleží na funkčnosti imunitního systému. Živému organismu nemusí škodit jen samotná bakterie, ale i toxiny, které produkuje. Jak silně se bakteriální nákaza projeví záleží na mnoha faktorech. Například na imunitním systému, na druhu bakterie nebo na případném podání medikamentů. Bakteriální nákazy mohou být lehkého typu nebo naopak smrtelně nebezpečné.

Rozlišujeme dva typy patogenních bakterií. Prvním je striktní (obligátní) patogen, který způsobuje nemoc vždy. Druhým typem je oportunistický patogen. Tyto patogeny jsou běžně přítomné jako součást mikroflóry, bez kterých by docházelo k trávícím problémům. Mohou škodit jen za určitých podmínek (Murray a kol., 2012).

Nejvýznamnějšími bakteriemi přenášenými ornitofilními klíšťaty jsou *Rickettsia rickettsii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*. Jde převážně o gramnegativní bakterie. Tyto bakterie mají stěnu tvořenou liposacharidy a svrchu převrstvenou druhou buněčnou membránou (Fajfrlík a Kopecký, 2008).

2.6.3. Protozoární onemocnění

Protozoární onemocnění je onemocnění způsobené prvokem (protozoa). Prvok je jednobuněčný organismus, eukaryotního typu. Označení protozoa lze také přeložit jako „prvotní živočichové“.

Skládá se z cytoplazmatické membrány, která tvoří buněčný obal. Uvnitř se cytoplazma, ve které se nachází jádro prvoka. Cytoplazma se skládá ze dvou vrstev: ektoplazmy a endoplazmy. Ektoplazma je vnější, pevnější vrstva cytoplazmy, zatímco endoplazma je tekutější, vnitřní vrstva cytoplazmy. U některých druhů prvoků se může vyskytovat trichocysta, jsou to tyčinky reagující na podráždění. Každý prvok má ústa (cytostoma), buněčný hltan (cytopharynx), potravní vakuolu a buněčnou řiť (cytopyge). Také má kontraktilní vakuolu, sloužící pro regulaci vody tzv. osmoregulaci. V cytoplazmatické membráně jsou nejčastěji přítomny brvy (cilie), bičíky (flagella) či jiné pohybové mechanismy (Říhová - Ambrožová, 2007). Pokud prvok používá tyto pohybové aparáty, jedná se o pohyb aktivní. Potravu přijímají difúzí přes cytoplazmatickou membránu. Druhý způsob přijímání potravy je endocytóza. Endocytóza je dvojího typu: pinocytóza nebo fagocytóza. Pinocytóza se od fagocytózy liší ve velikosti pohlcovaných makromolekul, u pinocytózy jde o menší makromolekuly. Rozmnožování je pohlavní nebo nepohlavní cestou.

U klíšťat je nejznámějším prozotoárním onemocnění babesióza, kterou způsobuje *Babesia microti* v Americe a v Evropě *Babesia divergens*. Zmíněné onemocnění se vyznačuje hromadným rozpadem červených krvinek (hemolýza), únavou, nechutenstvím, bolestí kloubů a svalů. Často doprovází lymfskou borreliózu (Mlčoch, 2012).

Obrázek č. 12: *Babesia microti*



Upraveno dle:

<http://www.collectio-jav.estranky.cz/clanky/babesiosis/babesie-prvok-prenaseny-klistat.html>

2.7. Zástupci patogenních původců

2.7.1. *Rickettsia*

Rickettsia je rod bakterií z čeledi Rickettsiaceae. Jsou to gramnegativní nepohyblivé bakterie, kokovitého až tyčinkovitého tvaru (pleomorfni mikroorganismus). Velikost se pohybuje v řádů jednotek mikrometrů. Jedná se o intracelulární patogenní bakterie, tzn. že způsobují onemocnění a napadají vnitřní část buňky. Narušením cytoskeletu se dostanou dovnitř buňky, kde se rozmnožují. Vnější vrstva je tvořena z lipopolysacharidů. Nedokáží sami vyhledávat své hostitele, proto pro svůj přenos potřebují vektor. Vektorem může být například klíště, roztok, veš nebo blecha. Slouží i jako přenašeči této bakterie na člověka (Rosenauerová, 2014).

Ovšem jen některé druhy jsou pro člověka patogenní. Je známo okolo 12 druhů bakterie *Rickettsia*.

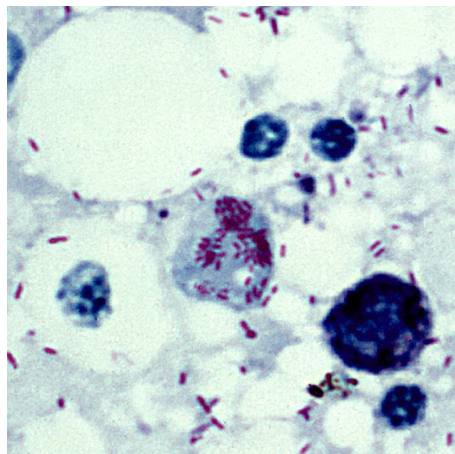
Rickettsiáza je jedna z nejčastějších cestovatelských chorob, kterou se lze nakazit v oblasti Středomoří, Blízkého východu a Afrického kontinentu. Jsou charakterizované náhlým vznikem, febriliemi, primární lézí a vysokými horečkami doprovázené bolestmi po celém těle.

Rickettsia je možno u laboratorních zvířat izolovat i za dlouhou dobu po vypuknutí akutní nákazy. U lidí byly přítomny v lymfatických uzlinách i po 1 - 2 letech od onemocnění. Tato pozorování se týkala především *R. tsutsugamushi*, *R. rickettsii*, *R. prowazekii*.

2.7.1.1. *Rickettsia rickettsii*

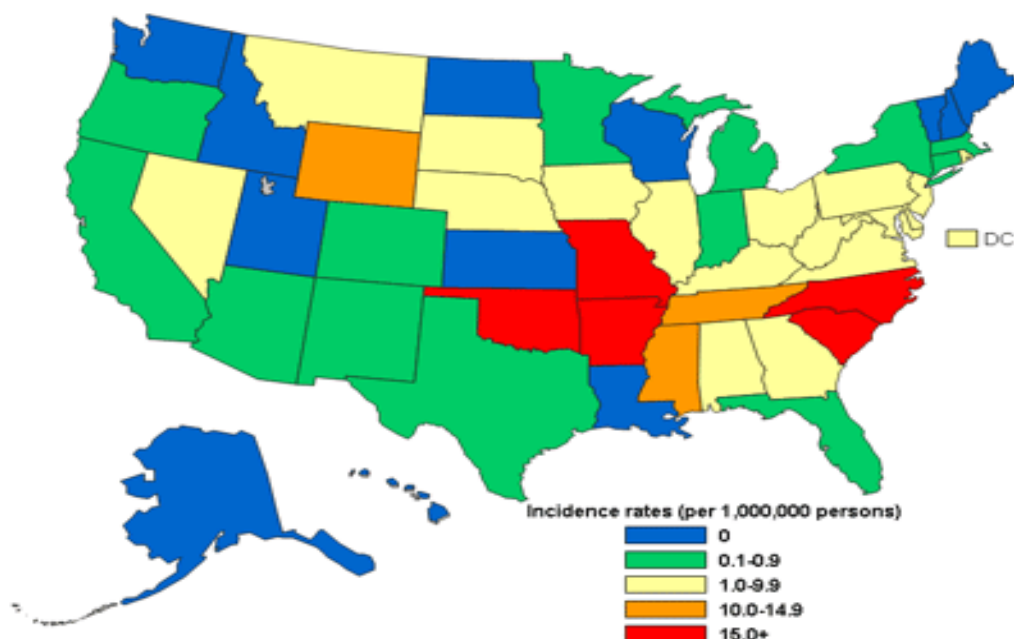
Poprvé byla popsána roku 1922. *Rickettsia rickettsii* patří mezi patogenní mikroorganismy. Tato bakterie způsobuje onemocnění zvané „Horečka Skalistých hor“. Toto onemocnění se vyskytuje především v Americe. Jde o infekční onemocnění přenášené vektorem, v tomto případě klíštětem. Projevem je vysoká horečka, jak je patrné z názvu, velkou bolestí svalů a hlavy. Objevuje se po 1 až 5 dni vyrážka, nejdříve na rukou a nohou, poté po celém těle s výjimkou obličeje. Často doprovázena horečkami. Vyrážka připomíná drobné, červené skvrny, které se však mohou v delším časovém intervalu podobat podlitinám. Nejčastěji k tomuto jevu dochází v souvislosti s porušením endotelu cév. Příznaky se objeví 1 až 2 týdny po kousnutí klíštětem. Poprvé byla tato nákaza objevena ve Skalistých horách. Jedná se o vzácné onemocnění, avšak velice závažné (Plesník, 2003).

Dalšími velice patogenními bakteriemi pro člověka jsou *Rickettsia prowazekii*, která způsobuje epidemický skvrnitý tyfus. *Rickettsia sibirica* způsobující severoasijský tyfus. *Rickettsia conorii*, původcem marseillské horečky (Africká klíšťová horečka). *Rickettsia tsutsugamushi* způsobující onemocnění jménem tsutsugamushi (japonská říční horečka). *Rickettsia slovaca* vyskytující se na Slovensku je také velmi patogenní bakterie (Kenneth, 2012).



Obrázek č. 13: *Rickettsia rickettsii*

Upraveno dle: http://www.infection-research.de/perspectives/view/detail/23/a_tick_too_close



Obrázek č. 14: Počet hlášených případů Horečky Skalistých hor v USA

Upraveno dle: http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/gibson_chel/Habitat.htm

2.7.1.2. Vliv *Rickettsie* ve válce

Je nutné si uvědomit, že tato bakterie se vyskytuje již několik století a výrazně ovlivnila klíčové momenty dějin. Předpokládá se například, že skvrnitý tyfus (původce *Rickettsia prowazekii*) devastující francouzské vojáky byl s velkou pravděpodobností hlavní příčinou porážky napoleonského tažení na Moskvu. Jelikož se toto onemocnění často šíří i ve věznicích, které poskytují vhodné prostředí pro vší šatní, říká se mu rovněž horečka vězeňská. Poslední velká epidemie skvrnitého tyfu na území Československa se vyskytla v roce 1945 právě ve věznici v Malé pevnosti v Terezíně a i po oficiálním ukončení druhé světové války si stále vybírala oběti na životech. Jméno skvrnitého tyfu je odvozeno z řeckého výrazu „*typhos*“, tedy kouřový či mlhavý, což souvisí s otupělostí příznačnou pro toto onemocnění. Přídavné jméno „skvrnitý“ odkazuje na typickou vyrážku především v oblasti trupu (odtud též „skvrnivka“).

Během první světové války řádil skvrnitý tyfus hlavně mezi vojáky na východní frontě. Jen v Rusku zabil více než tři miliony lidí, další pak v Polsku a na Balkáně, kde úmrtnost místy dosahovala neuvěřitelných čtyřiceti procent. Ani po skončení války nebylo nebezpečí zažehnáno a do roku 1922 zabil skvrnitý tyfus ještě další tři miliony lidí (Votýpka, 2014).

Hlavně období první světové války je znatelně spjato s výzkumem skvrnitého tyfu a objevem jeho původce ze strany českého rodáka Stanislava Provázka (Stanislaus Josef Mathias von Prowazek), který se roku 1913 - 1914 zabýval studiem a výzkumem této choroby. Při výzkumu v německé vězeňské nemocnici se však S. Provázek tyfem sám nakazil a brzy nato zemřel. Jeho brazilský kolega Henriquem da Rocha Lima však jeho práci dokončil a na počest svého přítele pojmenoval původce tohoto onemocnění *Rickettsia prowazekii*.

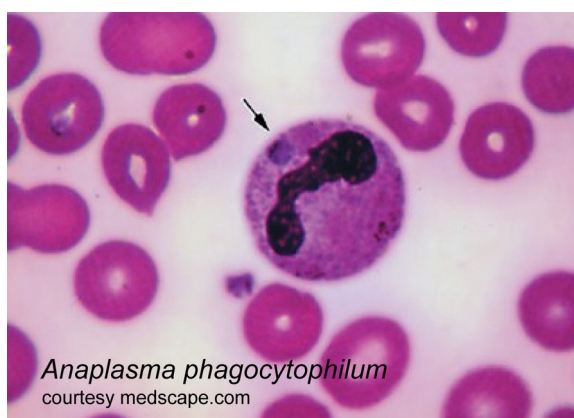
Na začátku 30. let 20. století bylo již možné odlišit epidemický skvrnitý tyfus, přenášený vší šatní, od endemického murinního skvrnitého tyfu, přenášeného blechami potkanů a krys. Původcem epidemické skvrnivky je *Rickettsia prowazekii*, původcem murinní skvrnivky je *Rickettsia mooseri* (Plesník, 2001).

2.7.2. *Anaplasma phagocytophilum*

Anaplasma phagocytophilum, dříve známá jako *Ehrlichia equi*, je gramnegativní bakterie, pleomorfního tvaru, tj. může mít tvar koků, ale i tyčinek. Tyto dva znaky má společné s bakterií *Rickettsia rickettsii*. Na rozdíl od této bakterie nemá *Anaplasma phagocytophilum* v buněčném obalu lipopolysacharidy, jen nízké množství peptidoglykanu (Votava, 2005). Velikost je 0,1 až 0,2 mikrometrů. Poprvé byla popsána roku 1996. Je to obligátně intracelulární bakterie.

Tento drobný mikroorganismus způsobuje horečnaté onemocnění zvané „Lidská granulocytární anaplazmóza“ (ehrlichioza) LGE - Human Granulocytic Ehrlichiosis (HGE). Vektorem tohoto patogenu je nejčastěji klíště, především rodu *Ixodes*. *Anaplasma phagocytophilum* přežívá u klíštěte ve slinných žlázách. Neprodleně poté, co klíště nalezne svého hostitele a začne sát, pomocí slin předá tuto bakterii hostiteli. Následně se bakterie šíří krví a lymfatickými cestami hostitele. Napadá buňky imunitního systému, tedy bílé krvinky zvané granulocyty, které jsou odpovědné za imunitní reakci organismu. Nejenom, že bílé krvinky napadá, také se v nich dále množí a následně je zničí. Způsobuje horečnaté stavy, zimnici, bolest svalů, hlavy a kloubů, pocení, malátnost či zvracení (Černý a kol., 2008). Tyto příznaky mohou také připomínat jiná onemocnění jako jsou mononukleóza či borelióza. Příznaky se projeví již pár dní po napadení klíštětem. Často bývá doprovázena leukémií. Jelikož se jedná o bakterii, léčba probíhá podáním antibiotik. Může způsobit smrtelná onemocnění, ale také druhotné infekce.

Obrázek č. 15: *Anaplasma phagocytophilum* v leukocyту (morula)



Upraveno dle:

http://www.vetmed.auburn.edu/anaplasmosis_canine/feline#.VFFXTniMxAX

2.7.3. *Borrelia burgdorferi*

Borrelia burgdorferi je gramnegativní bakterie spirálovitého tvaru (spirocheta). Velikost se pohybuje v řádů desítek mikrometrů. Jde o mikroorganismus, který pro svou existenci vyžaduje nižší obsah kyslíku než je v atmosféře, tj. méně než 21 %. Generační doba (tj. doba potřebná pro zdvojnásobení buněčné populace v hostitelském organismu) se pohybuje okolo 18 hodin a více. Tato bakterie je pojmenovaná po svém objeviteli Willym Burgdorferovi. Je přenášena přímým kontaktem s klíštětem, nebo přenosem z dospělé samičky na část jejich vajíček (Kimmig a kol., 2003). Způsobuje onemocnění jménem lym(e)ská borrelióza (Macháček, 2013).

Lymská borrelióza je infekční onemocnění přenášené klíšťaty, patogen se množí ve střevě klíštěte, a poté se dostává do jeho slinných žláz. Po přisátí ho klíště předá hostiteli. Závažnost tohoto onemocnění ve světě stoupá. Poprvé bylo popsáno Allenem Steerem roku 1975 v Lyme ve státě Connecticut. Případy výskytu této zoonózy stoupají u pacientů starších 40 let.

Lymská borrelióza má specifické příznaky. Nejdříve se objeví červená skvrna okolo místa, kde bylo přisáté klíště (první stádium). Skvrna se zvětšuje až má vybledlý střed. Většinou je větší jak 5 cm. Dalšími příznaky jsou horečka, zimnice, bolest hlavy, svalů a únava. Časté bývá i zeslabení imunity organismu. Pokud nepodstoupí infikovaný člověk léčbu, dostaví se v delším časovém intervalu příznaky druhého stádia. Dostaví se postižení nervového, kloubního a vaskulárního systému, poruchy citlivosti a hybnosti, které mohou přejít až v obrnu. Dále to mohou být zánětlivé projevy dalších částí pohybového aparátu. Jedná se tedy zejména o záněty šlach, vazů a kloubních pouzder (Kufner, 2012).

2.7.4. Rod *Babesia*

Babesia je jednobuněčný parazit, obligátně parazitující v krevních buňkách (intracelulárně), často známý pod českým názvem klíštěnka. Tento prvok pochází z kmene výtrusovců (*Apicomplexa*), třídy krvinkovky (*Aconoidasida*). Velikost se pohybuje v řádu mikrometrů. Přežívá uvnitř červených krvinek (erytrocytů), ve kterých vytváří své stádium zvané merozoit. Poté, co klíště nasaje krev infikovanou *Babesií*, začne se množit v trávicím traktu klíštěte a infikuje i jeho vajíčka. Po přisátí klíštěte se tento patogen dostane do dalšího hostitele (Mehlhorn a Schein, 1984).

Je známo přibližně 100 druhů tohoto parazita napadající jak domestikovaná tak divoká zvířata. Většina druhových jmen babesií je odvozena od latinských názvů jejich

hostitelů. Například *Babesia bovis* a *Babesia divergens* napadají skot, *Babesia ovis* a *Babesia matasi* napadají ovce a kozy, *Babesia caballi* napadá koně, *Babesia felis* kočky, *Babesia canis* psy, *Babesia microti* a *Babesia rodhaini* napadají hlodavce. *Babesia divergens* je nejčastějším parazitem napadajícím skot s nejvyšší mírou výskytu v Evropě střední a východní. Vektorem je především klíště obecné (*Ixodes ricinus*). Další *Babesií* přenášenou rodem *Ixodes* je *Babesia microti*, parazitující na hlodavcích. U člověka je tento patogenní prvek původcem infekčního onemocnění jménem babesióza.

Babesióza je velmi vzácné lidské onemocnění vyvolávané zpravidla v Americe *B. microti* a v Evropě *B. divergens* (Kimmig a kol., 2003), zřídka doprovázející lymskou borreliózu. Může mít imunodeficitní ale i smrtelné následky. Protilátky k *B. microti* se vyskytují i u lidí ve střední Evropě, proto je možné, že lehká infekce uniká pozornosti (Bednář aj., 1996).

První příznaky se dostaví do šesti týdnů po přisátí klíštěte. Zpravidla onemocnění začíná vysokou horečkou a silnou žízní. Může se projevit nechutenství, únava, nevolnost, zvracení, horečka a zimnice. Také často postihuje psychiku. U nemocných se také může dostavit žloutenka či tmavá moč.

Léčba probíhá pomocí antiprotozoik či antibiotik. V případě antiprotozoik se jedná o speciální antibabesiální přípravky určené jen pro tohoto prvoka. Další možná léčba je transfuze krve, která zmírní množství patogenu v krvi. V neposlední řadě je důležité dbát na dostatečnou prevenci proti napadení klíšťaty, jde tedy i o prevenci proti *Babesii*.

Obrázek č. 16: *Babesia canis*

Babesia psí, uvnitř červených krvinek



Babesia canis (arrow) within a red blood cell

Upraveno dle:

<http://www.capcvet.org/capc-recommendations/canine-babesiosis1/>

2.7.5. Arboviry

Arboviry se řadí do více čeledí virů, které mají společné přenašeče. Nejčastěji jsou to klíšťata a komáři. Poprvé byly arboviry popsány roku 1942 ve stepní části Krymu. „Arbovirus“ je překladem z anglického výrazu *arthropod-borne virus*, což lze přeložit jako virus přenášený členovci (Hubálek a Halouzka, 1996).

Je známo přibližně 500 arbovirů, z toho okolo 25 % druhů způsobuje závažná onemocnění člověka. V České republice je známo 8 zástupců.

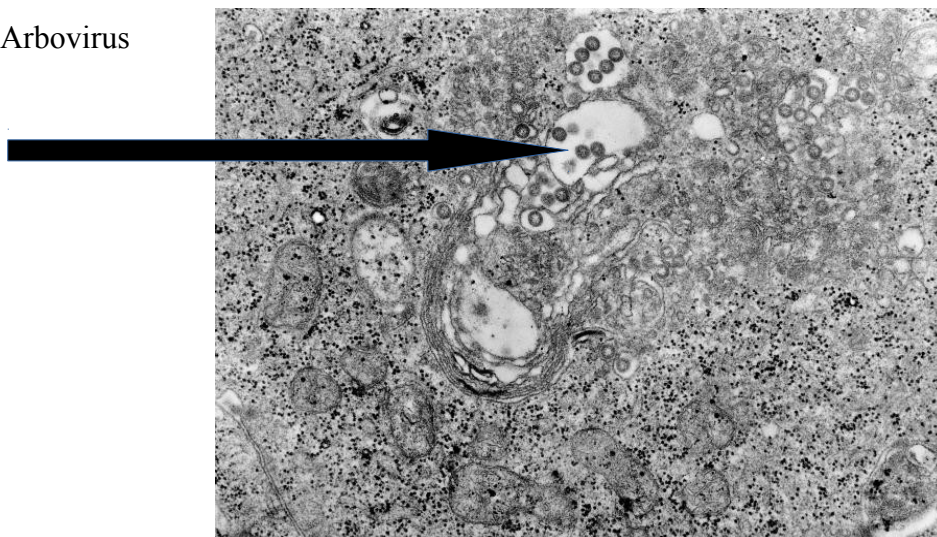
V našich zeměpisných podmínkách je nejvýznamnější arbovirózou stredo-evropská klíšťová encefalitida (Staňková, Marešová, Vaništa, 2008).

Přenos probíhá převážně přes krev infikovaného členovce. Díky změnám klimatu, rozvoji zemědělství a cestovního průmyslu se arboviry rozšiřují i do míst, kde nebyly nikdy nalezeny.

Tyto viry způsobují onemocnění jménem arbovirózy, zoonózy podobné klíšťové meningoencefalitidě. Mohou mít klidný průběh (únava, bolest hlavy) ale mohou i zahrnovat komplikace ohrožující lidský život. Onemocnění může mít různý charakter, jako například charakter febrilního onemocnění spojeného s vyrážkou nebo jako hemoragická horečka dengue. Arboviry mohou také vyvolávat akutní infekční onemocnění jménem žlutá zimnice (Plesník, 2003).

Prevence proti arbovirům je vyhnout se napadení klíšťaty a komáry, kteří jsou přenašeči.

Obrázek č. 17: Arbovirus



Upraveno dle:

http://en.wikipedia.org/wiki/Arbovirus#mediaviewer/File:Rift_Valley_fever_tissue.jpg

2.7.6. *Coxiella burnetti*

Coxiella burnetti (dříve *Rickettsia burnetii*) je infekční gramnegativní bakterie, řadící se mezi *Rickettsie*, do čeledi Rickettsiaceae. Množí se při nízkém pH, je velmi obávaným intracelulárním patogenem pro svou nízkou infekční dávku. Napadá monocyty a makrofágy. Jedná se o bakterii způsobující onemocnění zvané Q horečka.

Poprvé Q horečku popsal v roce 1937 Edward Holbrook Derrick (1898 - 1976) u zaměstnanců jatek v Brisbane v australském Queenslandu (Fabiánová, Beneš, 2010). V našich zeměpisných podmínkách je Q horečka rozšířena od 50. let tedy po 2. světové válce, avšak běžně se u nás nevyskytuje. První epidemie se objevila na pražských jatkách. Jde o zoonózu s přírodně ohniskovým charakterem. Přenos probíhá inhalační cestou, vdechnutí částic kontaminovaných *Coxiellou burnetti*, nebo může také probíhat za pomoci infikovaného klíštěte. Inkubační doba je 2 - 3 týdny. Většina infekcí u lidí je prostřednictvím kontaktu s dobyt看em, ovceci a kozami. Nejméně jsou ohroženy šelmy. U přežvýkavců se nejčastěji vyskytuje mastitida a u březích samic potraty.

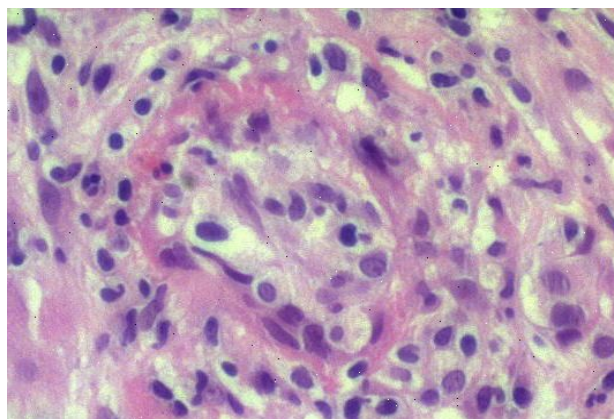
Q horečka zahrnuje řadu příznaků, ale může i probíhat asymptomaticky. Nejčastěji se projeví pneumonie, respirační infekce, kašel, bolest hlavy, svalů, kloubů, po delším časovém intervalu (několik dnů) se patogen může rozšířit do celého organismu (Pivoňková, 2004).

Anatomický nález nejčastěji vykazuje poškození plic v podobě „uzlíků“, které jsou rozpoznatelné na rentgenu.

Diagnostika probíhá makroskopickým a sérologickým vyšetřením, flotační metodou a zjištěním množství protilátek v těle – IgG nebo IgM (Fabiánová, Beneš, 2010).

Terapie probíhá při hospitalizaci především na infekčním oddělení, kde jsou podávána antibiotika jako tetracyklin nebo doxycyklin po dobu jednoho týdne (Havelka, 2003).

Obrázek č. 18: *Coxiella burnetti* původce Q horečky



Upraveno dle: <http://ec.cotot.com/q-horecka>

3. CÍL PRÁCE

Cílem této práce je laboratorní diagnostika sloužící k detekci patogenních mikroorganismů přenášených ornitofilními klíšťaty. Z vyizolovaných nukleových kyselin klíšťat se pomocí molekulárně-biologických metod (PCR, elektroforéza) detekují geny odpovídající danému patogenu. Tato práce je zaměřená na zpracování vzorků klíštěte *Ixodes lividus* a detekci patogenní *Rickettsie spp.* s ním spojené. Klíšťata byla odebrána z nor břehulí říčních (*Riparia riparia*). Detekce probíhá pomocí amplifikace *gltA* a *ompA* genů.

4. MATERIÁLY A METODIKA

4.1. Původ vzorků

Pro zjištění patogenní DNA ve vzorcích klíšťat *Ixodes lividus* byla použita klíšťata z písčitých nor břehulí říčních v lokalitách Pouzdřany, Vémyslice, Oleksovice, Božice MP (Martincova pískovna), Oslavany, Roudnice nad Labem, Cep, Liteň, Srbsko, Pňovice, Černuc - nová, Lžín. Vzorky byly odebrány Mgr. Markétou Novákovou a RNDr. Petrem Henebergem Ph.D. Sběr klíšťat probíhal v květnu a září roku 2013. Z nor byl odebrán písek, který byl přebrán a nalezená klíšťata byla odebrána a umístěna do 70% etanolu. Identifikaci klíšťat provedla Mgr. Markéta Nováková dle taxonomického klíče (Nosek a Sixl, 1972).

Z celkového počtu 144 klíšťat bylo nejvíce zastoupeno vývojové stádium larvy (122 vzorků), nymfy (11 vzorků) a v nejnižším počtu dospělci (10 vzorků).

Lokalita	GPS souřadnice
Pouzdřany	48.9245° N, 16.6248° E,
Vémyslice	49.0277° N, 16.2341° E
Oleksovice	48.8966° N, 16.2478° E
Božice – Martincova pískovna	48.8230° N, 16.2502° E
Oslavany	49.1137° N, 16.3374° E
Roudnice	50.4157° N, 14.2237° E
Cep	48.9162° N, 14.8830° E
Liteň	49.9189° N, 14.1589° E
Srbsko	49.9328° N, 14.1424° E
Pňovice	49.5866° N, 13.8953° E
Černuc - nová	50.3184° N, 14.2063° E
Lžín	49.2297° N, 14.7750° E

Tabulka č. 2: Souřadnice jednotlivých lokalit

Lokalita	Pouzdřany	Vémyslice	Oleksovice	Božice MP	Oslavany
Počet klíšťat	11	16	10	20	16
Počet nor	5	5	2	3	4
Okres	Břeclav	Znojmo	Znojmo	Znojmo	Brno – venkov
Datum sběru	květen	květen	květen	květen	květen

Roudnice n.L.	Cep	Liteň	Srbsko	Pňovice	Černuc–nová	Lžín
10	10	10	10	11	10	10
2	2	2	1	5	3	1
Litoměřice	Jind. Hradec	Beroun	Beroun	Příbram	Kladno	Tábor
květen	září	září	květen	květen	září	září

Tabulka č. 3: Lokality, počet klíšťat, počet nor, okres, datum sběru

4.2. Izolace DNA

Proces sloužící k získání celkové DNA ze vzorku, v našem případě z klíštěte *Ixodes lividus*. K izolaci DNA jsem použila metodu časově nenáročnou a méně obtížnou. Použila jsem metodu alkalické hydrolýzy. Nejprve jsem si nachystala 1,25% roztok hydroxidu amonného - NH₄OH (Penta s.r.o., Česká republika). Úkolem hydroxidu amonného je denaturace proteinů.

Prvním krokem byla příprava vzorků klíšťat. Klíšťata byla uchována po sběru

v malých uzavíratelných zkumavkách se 70% etanolem (Sigma - Aldrich, Německo). Dále jsme si připravila filtrační papír, na který jsem vyznačila kruhy (pro lepší orientaci, zabránění ztrátě vzorku), do jejichž středu sem následně pinzetou vyndala klíšťata z etanolu, osušila a očíslovala. V každém kruhu bylo jedno klíště s přiřazeným číslem.

Dávkování roztoku hydroxidu amonného lze volit dle vývojového stádia klíštěte. Pokud byl vzorek larva nebo nymfa, použila jsem objem 250 μ l roztoku, pokud se jednalo o dospělé klíště, použila jsem 500 μ l roztoku. Do nových, označených zkumavek s roztokem NH_4OH jsem za pomoci pipety vložila jedno klíště. Pro důkladné a snažší rozrušení buněk a uvolnění DNA do roztoku hydroxidu amonného bylo nutností klíšťata v roztoku jemně rozmělnit. Každé klíště jsem tedy čistou pipetovací špičkou rozmělnila o stěnu zkumavky. Dobré provedení bylo jasně zřetelné rozpadnutím klíštěte na více částí. Následně jsem pečlivě zkumavku uzavřela a utěsnila speciálním zámečkem pro tento druh zkumavek. Zámeček chrání víčko zkumavky, aby při vaření nedošlo k vystřelení víčka a možným komplikacím v podobě ztráty vzorku či kontaminaci ostatních vzorků. V tomto případě by došlo k znehodnocení vzorků.

Připravené zkumavky jsem umístila do termobloku (Mixing block MB 102, Bioer, Čína). Termoblok byl předehřát na 100 °C několik minut před umístěním zkumavek. Vzorky jsem nechala zahřívát 30 minut, poté jsem je vyjmula a nechala vychladnout ve stojanu. Z vychladlých zkumavek jsem odstranila zámečky. Následně se vzorky zcentrifugovaly při 3000 rpm, po dobu 1 - 2 minut.

Jako poslední krok jsem otevřené zkumavky opět umístila do termobloku předehřátého na 100 °C, přibližně na 20 minut. V tomto případě byly zkumavky otevřené, aby došlo k odpaření vzorku na poloviční objem, a tím došlo ke zkoncentrování obsahu DNA. Po odpaření vzorku na poloviční objem jsem nechala zkumavky vychladnout a s izolovanou DNA jsem je dále skladovala při teplotě -18 °C.

4.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Dalším krokem bylo namnožení (amplifikace) úseku DNA pomocí polymerázové řetězové reakce.

Úseky, které se mají amplifikovat, musí být ohraničeny na začátku a na konci tzv. primery. Pro detekci genu *gltA* kódující enzym citrátsyntázu jsem použila primery CS-78 a CS-323 (Labruna a kol., 2004) a pro detekci genu *ompA*, který kóduje protein OmpA, jsem použila primery Rr.190.70p a Rr.190.602n (Regnery a kol., 1991). Dále

jsem pro směs PCR použila MasterMix (TopBio s.r.o., Česká republika), PCR vodu (TopBio s.r.o., Česká republika), izolovanou DNA klíšťat. Všechny vzorky jsem nechala rozmrazit a následně umístila na vortex promíchat (Vortex MS 2 Minishaker IKA - WORKS, USA).

Dále jsem si nachystala zkumavky pro přípravu zásobního roztoku a potřebné množství mikrozkuvek tzv. stripů. Tyto stripy jsou od výrobce spojeny po 8 kusech. Vždy jsem stripy označila + (pozitivní kontrola), – (negativní kontrola) a dále čísla klíšťat, která se v daných stripech analyzovala. Popis jsem uvedla z boku a z horní strany stripu (na víčko). Pro každý vzorek jsem si připravila dle potřeby dané počtem momentálně analyzovaných vzorků určité množství zásobního roztoku s reakční směsí v odpovídajícím poměru, složené z dvojice primerů, MasterMixu a PCR vody.

Tento zásobní roztok jsem promíchala a rozpipetovala do předem popsáných stripů. Dále jsem do každého stripu přidala odpovídající izolovanou DNA (Tabulka č. 6, 7). Stripy jsem důkladně uzavřela a vložila do centrifugy, aby na víčku nezůstaly kapky reakční směsi. Následně jsem takto připravené vzorky umístila do termocycleru XP cycler (BIOER, Čína) a zvolila příslušný program a objem 25 µl (Tabulka č. 4, 5).

Tabulka č. 4: Program přístroje termocycler pro amplifikaci DNA (PCR)

Gen <i>gltA</i>	
Primery CS-78 a CS-323	
95 °C	5 min
95 °C	15 sec
50 °C	30 sec
72 °C	30 sec
72 °C	7 min
4 °C	∞

39x

Tabulka č. 5: Program přístroje termocycler pro amplifikaci DNA (PCR)

Gen <i>ompA</i>	
Primery Rr.190.70p a Rr.190.602n	
95 °C	5 min
95 °C	40 sec
58 °C	30 sec
72 °C	45 sec
72 °C	10 min
4 °C	∞

34x

Tabulka č. 6, 7: Množství jednotlivých složek v PCR směsi

Gen <i>gltA</i>		Gen <i>ompA</i>	
Primery CS-78 a CS-323		Primery Rr.190.70p a Rr.190.602n	
1 PCR směs 25 µl		1 PCR směs 25 µl	
MasterMix	12,5 µl	MasterMix	12,5 µl
Primer CS-78	1,25 µl	Primer Rr.190.70p	1,25 µl
Primer CS-323	1,25 µl	Primer Rr.190.602n	1,25 µl
PCR voda	7,5 µl	PCR voda	7,5 µl
Izolované DNA	2,5 µl	Izolované DNA	2,5 µl

Pro analýzu *Rickettsií* jsem použila již zmíněné dva geny. Gen *gltA*, který kóduje enzym citrátsyntázu a gen *ompA*, který kóduje protein OmpA. Gen *gltA* detekuje všechny druhy *Rickettsií*, gen *ompA* slouží k detekci SFG *Rickettsií* tzn., že tento gen slouží k detekci skupiny *Rickettsií* způsobujících skvrnitě horečky.

Tabulka č. 8: Přehled vybraných primerů při PCR amplifikaci genu a jejich oligonukleotidové sekvence ve směru 5' → 3'. Barevně zvýrazněné primery a jejich oligonukleotidové sekvence použity v této bakalářské práci.

Bakterie	Cílový gen	Primer	Oligonukleotidová sekvence (5' → 3')
<i>Rickettsia</i> spp.	<i>ompA</i>	Rr.190.70p	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA
		Rr.190.602n	AGTGCAGCATTGCTCCCCCT
	<i>gltA</i>	CS-78	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT
		CS-323	GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT

4.4. Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je druh elektroforézy, jejímž principem je využití gelu (za účelem vizualizace DNA) o odlišné velikosti pórů, přes které se fragmenty makromolekul pohybují.

Prvním krokem byla příprava 1,5% agarózového gelu. Připravila jsem si vhodnou vaničku a vhodný „hřeben“, který jsem umístila do speciálních úchytek ve vaničce. Ke zjištění, zda je vanička ve správné vodorovné poloze, slouží vodováha, která odhalí případné odchylky od roviny. V tomto případě by došlo k nežádoucímu nerovnoměrnému rozložení gelu.

Pro zhotovení agarózového gelu jsem si připravila Erlenmayerovu baňku, do které jsem odměřila 80 ml TBE pufru (tris-EDTA-borátový), 1,2 g agarózy (SeaKem® LE Agarose, Rockland, ME USA) a promíchala. Gel jsem dala do mikrovlnné trouby rozvařit při výkonu 450 - 500 W po dobu 2 - 3 minut, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění agarózy. Během rozvaření gelu je nutné občasné promíchání. Po důkladném rozpuštění agarózy v pufru jsem za stálého míchání směs ochladila pod tekoucí vodou přibližně na 45 °C. Do rozvařeného a ochlazeného gelu jsem za pomoci pipety přidala 80 µl barviva Midori Green Advance-product zředěného 50x (MG04, Elisabeth Pharmacon, spol. s.r.o, Česká republika).

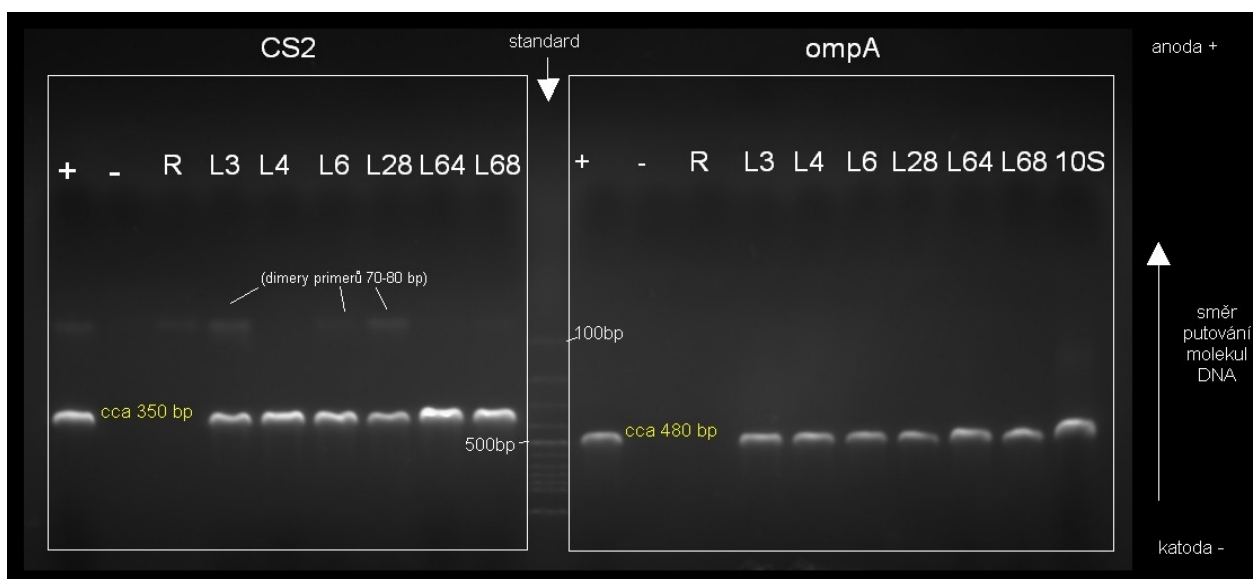
V tomto složení jsem gel promíchala a nalila do vaničky s připraveným hřebem. Bylo nutné gel nalévat opatrně, ale také dost rychle, aby nezačal tuhnout již v baňce. Poté jsem zkontrolovala, zda nejsou v gelu nevhodné bublinky, který by mohly elektroforézu znehodnotit. Gel jsem nechala ztuhnout 30 - 35 minut za pokojové teploty.

Po uplynutí doby jsem zkontrolovala, zda je gel dostatečně ztuhlý a vyjmula jsem hřeben. Gel s vaničkou jsem přesunula do elektroforetické vany s pufrem TBE. Zkontrolovala jsem množství pufru a v případě nedostatku jsem jej doplnila, aby byl gel v pufru ponořen. Do prostřední jamky jsem napipetovala 3 µl DNA markeru tzv. žebříku (Quick-load® 100 bp DNA Ladder, BioLabs, Velká Británie) a do jednotlivých jamek jsem napipetovala po 5 µl PCR produktů.

Elektroforetickou vanu jsem přiklopila jejím víkem a ujistila se, že odpovídající elektrody jsou správně zapojené. Jelikož má DNA záporný náboj, DNA molekuly putují tedy k anodě (kladný náboj). Vanu jsem připojila ke zdroji napětí PowerPac 3000 (BioRad, USA) a nastavila příslušné parametry. Elektroforéza probíhá při napětí 120 V a proudu 400 mA po dobu 20 - 30 minut.

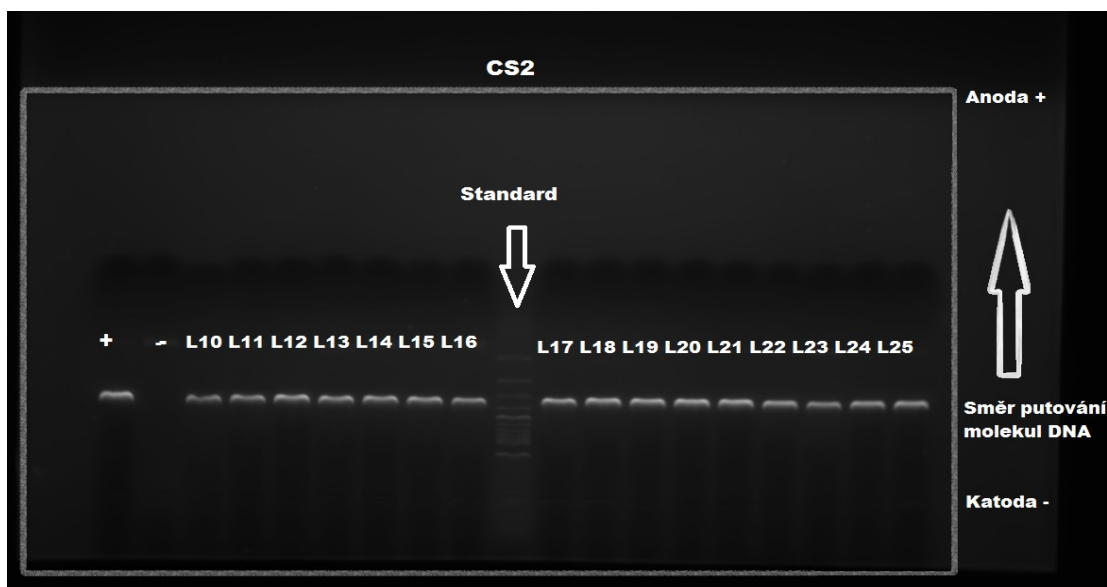
4.4.1. Vizualizace gelu

Po provedení gelové elektroforézy je nutné provést vyhodnocení výsledků a zhodnotit průběh elektroforézy. Gel jsem vyjmula z elektroforetické vany a umístila jsem ho do fotografického přístroje s UV osvětlením - fotoluminátoru (MF - ChemiBIS 3.2, BioImaging Systems, Izrael). Gel bylo nutné při přesunu do přístroje nepoškodit. Přístroj je připojen k PC. Pro odpovídající zobrazení jsem nastavila v programu Gel Capture příslušné parametry (gain 1, resolution 1, čas expozice 400 ms) pro focení a gel vyfotila při UV osvětlení zdola. Získaná fotografie byla uložena a patřičně popsána (čísla vzorků klášťat, jaký gen/primer, standard, pozitivní a negativní zkouška).



Fotografie č. 3: Příklad vyfoceného gelu s odpovídajícím popisem (bp = páry bází).

Fotografie č. 4: Příklad vyfoceného gelu s odpovídajícím popisem.



4.4.2. Přístroje

Termoblok (Mixing block MB 102, Bioer, Čína)

PCR - box UV4 PCR (SCIE - PLAS, Velká Británie)

Vortex (MS 2 Minishaker IKA - WORKS, USA)

Termocycler XP cycler (BIOER, Čína)

Mikrocentrifuga MC 6400 (Chemos, Česká republika)

Zařízení pro gelovou elektroforézu a zdroj elektrického napětí Power Pac 3000 (BioRad, USA)

Fotografický přístroj s UV osvětlením - fotoluminátor (MF - ChemiBIS 3.2, BioImaging Systems, Izrael)

Elektroforetická vana (BioRad, USA)

Mikrovlnná trouba (Hitachi, Japonsko)

Digitální váhy (AND, Japonsko)

4.4.3. Spotřební materiál

Tenkostěnné PCR mikrozkušavky

Zkušavky typu Eppendorf

Nastavitelné mikropipety

Jednorázové pipetovací špičky

Erlenmayerova baňka

Ochranné rukavice

Filtrační papír

Zámečky na zkušavky typu Eppendorf

4.4.4. Použité chemikálie

1,25% roztok hydroxidu amonného - NH_4OH (Penta s.r.o., Česká republika)

70% etanol (Sigma - Aldrich, Německo)

Primery CS-78 a CS-323 (Labruna a kol., 2004)

Primery Rr.190.70p a Rr.190.602n (Regnery a kol., 1991)

MasterMix (TopBio s.r.o., Česká republika)

PCR voda (TopBio s.r.o., Česká republika)

TBE pufr (tris-EDTA-borátový)

Agaróza (SeaKem® LE Agarose, Rockland, ME USA)

Barvivo Midori Green Advance-product (MGO4, Elisabeth Pharmacon, spol. s.r.o.,

Česká republika)

DNA marker (Quick-load ® 100 bp DNA Ladder, BioLabs, Velká Británie)

4.4.5. Statistické metody

V této bakalářské práci jsou statisticky vyhodnocené výsledky v přehledných tabulkách. Pro sestavení tabulky jsem použila program LibreOffice (Calc). Jako výchozí data sloužily výsledky z gelové elektroforézy.

5. VÝSLEDKY

Z celkového počtu 144 vzorků klíšťat *Ixodes lividus* byla detekována patogenní *Rickettsie spp.* v každé lokalitě. Pro průkaz tohoto patogena v lokalitě stačí nalézt jediné infikované klíště. Díky tomuto faktu jsme vybrali minimálně 5 libovolných klíšťat z každé lokality, u kterých pokud se prokázala *Rickettsie spp.*, nebylo nutné u další klíšťat provádět detekci.

Tabulka č. 9: Tabulka výsledků průkazu *Rickettsie spp.*

Rickettsie spp. - Ixodes lividus					
				PCR	
Lokalita	Označení klíštěte	Vývoj. Stadium	Izolace n.k.	Gen gltA	Gen ompA
				Primery CS-78 a CS-323	Primer Rr.190.70p a Rr.190.602n
Pouzdrňany	L1	M	Ano	+	+
	L8	L	Ano	+	+
	L9	L	Ano		+
	L10	L	Ano	+	+
	L11	L	Ano	+	+
	L12	L	Ano	+	+
	L48	N	Ano		
	L49	N	Ano		
	L50	L	Ano		
	L51	L	Ano		
L52	L	Ano			
Vémyslice	L4	M	Ano	+	+
	L5	N	Ano		+
	L13	L	Ano	+	+
	L14	L	Ano	+	+
	L15	L	Ano	+	+
	L16	L	Ano	+	+
	L17	L	Ano	+	+
	L53	N	Ano		
	L54	M	Ano		
	L55	F	Ano		
	L56	F	Ano		
	L57	F	Ano		
	L58	N	Ano		
	L59	F	Ano		
	L61	L	Ano		
L62	L	Ano			
Oleksovice	L18	L	Ano	+	+
	L19	L	Ano	+	+
	L20	L	Ano	+	+
	L21	L	Ano	+	+
	L22	L	Ano	+	+
	L73	L	Ano		
	L74	L	Ano		
	L75	L	Ano		
	L76	L	Ano		
	L77	L	Ano		

Božice MP	L23	L	Ano	+	+
	L24	L	Ano	+	+
	L25	L	Ano	+	+
	L26	L	Ano	+	+
	L27	L	Ano	+	+
	L33	L	Ano		+
	L34	L	Ano		+
	L35	L	Ano		+
	L36	L	Ano		+
	L37	L	Ano		+
	L78	N	Ano		
	L79	L	Ano		
	L80	L	Ano		
	L81	L	Ano		
	L82	L	Ano		
	L83	L	Ano		
	L84	L	Ano		
	L85	L	Ano		
	L86	L	Ano		
	L87	L	Ano		
Oslavany	L3	F	Ano	+	+
	L28	L	Ano	+	+
	L29	L	Ano	+	+
	L30	L	Ano	+	+
	L31	L	Ano	+	+
	L32	L	Ano		+
	L88	F	Ano		
	L89	L	Ano		
	L90	L	Ano		
	L91	L	Ano		
	L92	L	Ano		
	L93	L	Ano		
	L94	L	Ano		
	L95	L	Ano		
	L96	L	Ano		
	L97	L	Ano		
Roudnice n.L.	L38	L	Ano	+	+
	L39	L	Ano	+	+
	L40	L	Ano	+	+
	L41	L	Ano	+	+
	L42	L	Ano	+	+
	L98	L	Ano		
	L99	L	Ano		
	L100	L	Ano		
	L101	L	Ano		
	L102	L	Ano		
Cep	L43	L	Ano	+	+
	L44	L	Ano	+	+
	L45	L	Ano	+	+
	L46	L	Ano	+	+
	L47	L	Ano	+	+
	L103	F	Ano		
	L104	L	Ano		
	L105	L	Ano		
	L106	L	Ano		
	L107	L	Ano		

Liteň	L108		Ano	+	+
	L109	L	Ano	+	+
	L110	L	Ano	+	+
	L111	L	Ano	+	+
	L112	L	Ano	+	+
	L113	L	Ano		
	L114	L	Ano		
	L115	L	Ano		
	L116	L	Ano		
Srbsko	L117	L	Ano		
	L118	L	Ano	+	+
	L119	L	Ano	+	+
	L120	L	Ano	+	+
	L121	L	Ano	+	+
	L122	L	Ano	+	+
	L123	L	Ano		
	L124	L	Ano		
	L125	L	Ano		
Přovice	L126	L	Ano		
	L127	L	Ano		
	L7	N	Ano	+	+
	L129	N	Ano	+	+
	L130	N	Ano	+	+
	L131	N	Ano	+	+
	L132	N	Ano	+	+
	L133	L	Ano		
	L134	L	Ano		
Černuc-nová	L135	L	Ano		
	L136	L	Ano		
	L137	L	Ano		
	L138	L	Ano		
	L139	L	Ano	+	+
	L140	L	Ano	+	+
	L141	L	Ano	+	+
	L142	L	Ano	+	+
	L143	L	Ano	+	+
Lžín	L144	L	Ano		
	L145	L	Ano		
	L146	L	Ano		
	L147	L	Ano		
	L148	L	Ano		
	L149	L	Ano	+	+
	L150	L	Ano	+	+
	L151	L	Ano	+	+
	L152	L	Ano	+	+
	L153	L	Ano	+	+
	L154	L	Ano		
	L155	L	Ano		
	L156	L	Ano		
	L157	L	Ano		
	L158	L	Ano		

Z této výsledné tabulky lze vyčíst počet klíšťat, u kterých byla provedená detekce genu *gltA*, a u kterých detekce genu *ompA*. Gen *gltA* byl detekován u 61 klíšťat a gen *ompA* u 69 klíšťat. Vždy bylo nejméně 5 klíšťat z určité lokality detekováno jako pozitivní jak pro gen *gltA*, tak i pro gen *ompA*. Pokud detekce byla pozitivní, další klíšťata už se neanalyzovala a v dané lokalitě byla prokázána *Rickettsia spp.* jako pozitivní. U všech vzorků byla provedena izolace DNA. Dále lze z tabulky vyčíst jednotlivé lokality sběru vzorků s přiřazenými čísly klíšťat v Čechách a na Moravě, vývojová stadia klíšťat, zda byla provedena izolace DNA a výsledky detekce za pomoci PCR.

Mezi zpracovávanými vzorky bylo nejvíce zastoupeno vývojové stádium larvy.

V jednom případě dospělé samice klíštěte *Ixodes lividus* byla detekce negativní, proto jsem musela amplifikovat mitochondriální 16S rDNA klíštěte. Díky tomuto kroku se ukázalo, že vzorek neobsahoval žádnou DNA. Pro tento fakt jsem klíště vyřadila z detekce a místo něj analyzovala jiný vzorek z odpovídající lokality.

Tabulka č. 10: Průkaz *Rickettsie spp.*

Lokalita	Průkaz <i>Rickettsie spp.</i>
Pouzdřany	POZITIVNÍ
Vémyslice	POZITIVNÍ
Oleksovice	POZITIVNÍ
Božice MP	POZITIVNÍ
Oslavany	POZITIVNÍ
Roudnice n.L.	POZITIVNÍ
Cep	POZITIVNÍ
Liteň	POZITIVNÍ
Srbsko	POZITIVNÍ
Pňovice	POZITIVNÍ
Černuc-nová	POZITIVNÍ
Lžín	POZITIVNÍ

6. DISKUSE

Klíšťata jako parazité sami o sobě nejsou příliš nebezpeční. Nebezpečí představují spíše infekce, ve kterých klíště funguje jako přenašeč. Klíšťata mohou totiž ve svém zažívacím ústrojí a svém chobotu roznášet mezi hostitele patogenní viry a bakterie. Přenos onemocnění prostřednictvím klíšťat je jedním z nejběžnějších způsobů přenosu nemocí v České republice, tato onemocnění představují také vážná zdravotní rizika. Nejvíce diagnostikovaným onemocněním přenášeným prostřednictvím klíštěte je v naší republice lymeská borrelióza a klíšťová encefalitida. Nižší výskyt pak vykazuje onemocnění způsobené bakterií *Anaplasma phagocytophilum*. Odborné studie ukázaly, že ve srovnání se séroprevalencí jiných klíšťatý přenosných zoonóz u nás je zjištěný výskyt protilátek *Anaplasma phagocytophilum* nejvyšší. Dá se tedy říct, že riziko nákazy způsobené touto bakterií je u nás vysoké.

Cílem této bakalářské práce byl průkaz patogenní *Rickettsie spp.* ve vzorcích ornitofilních klíšťat *Ixodes lividus* u břehulí říčních. Myslíme si, že to je specifický endosymbiont toho druhu klíštěte, klíšťata mají různé bakterie ve svém těle, mikroflóru (viz. Noda a kol., 1997). Ve Velké Británii chytali migrující ptáky, mezi kterými byly břehule říční a na nich parazitující *I. lividus* a v těch detekovali rickettsie se 100% prevalencí (Graham a kol., 2010). Pro tento fakt jsme předpokládali, že průkaz této bakterie bude i v našich vzorcích 100%. Tento předpoklad se laboratorními analýzami potvrdil, jelikož v každé lokalitě byl 100% průkaz *Rickettsie spp.*

Přenos některých, již zmíněných patogenů se děje v rámci klíšťové populace převážně mezi jednotlivými vývojovými stádii. Například z larvy na nymfu, z nymfy na dospělého jedince. Může se však vyskytnout i transovariální přenos (vertikální nebo-li přímý), jako v případě *Babesia canis*, který se může opakovat v následujících 3 - 5 generacích daného parazita. Toto jsme však u našich vzorků prokázat nemohli, protože jsme nesledovali dlouhodobý vývoj jednotlivých klíšťat a případný výskyt zmíněných patogenů ve všech vývojových stádiích či dokonce v jejich potomstvu.

7. ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo izolovat a následně prokázat patogenní *Rickettsii spp.* ve vzorcích klíšťat *Ixodes lividus* sesbíraných v norách břehulí říčních roku 2013. Z celkového počtu 144 vzorků klíšťat, z 12 lokalit v Čechách a na Moravě byl průkaz této patogenní bakterie pozitivní. Vyhodnocené výsledky však mohou být možným východiskem pro navazující studie, které budou probíhat ve většího rozsahu.

Tato práce poukazuje také na další patogenní mikroorganismy přenášené ornitofilními klíšťaty jako jsou *Rickettsia rickettsii*, která je pro člověka nejpatogennější, způsobující onemocnění zvané „Horečka Skalistých hor“, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, *Babesia* či *Coxiella burnetti*. Pro potvrzení onemocnění či jednotlivých bakterií a virů je nezbytné laboratorní vyšetření.

Jednotlivé druhy klíšťat mají vymezené okruhy hostitelů. Některé druhy parazitují na plazech, jiné na hlodavcích nebo na netopýrech či ptácích. S výjimkou klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*), který má velmi široký okruh vyhledávaných hostitelů. Larvy tohoto klíštěte nejčastěji napadají lesní hlodavce, ptáky a savce. Dospělá klíšťata pak napadají častěji větší zvířata.

Ornitofilní klíšťata napadají ptactvo brodivé, vodní, hrabavé či jiné. Mají velký vliv na rozšíření patogenních mikroorganismů po celém světě. Je tomu tak dáno u určitých druhů ptáků sezóně migrujících, kteří překonávají velké vzdálenosti a tím rozšiřují tyto cizopasníky a s nimi i jejich patogeny.

Detekce těchto mikroorganismů je velice důležitá nejen pro diagnostiku a léčbu, ale také jako monitoring jednotlivých onemocnění u určitých druhů ptactva.

Snížení počtu klíšťat a boj proti nim je náročný vzhledem k jejich lokalizaci v prostředí a u ornitofilních klíšťat je boj komplikovanější vzhledem k migračním schopnostem jejich hostitelů. Z těchto důvodů potřebujeme proti těmto parazitům vhodný integrovaný program, který bude šetrný k necílovým organismům. Je také nutno se zamyslet nad případnou větší vhodností pravidelné léčby ve srovnání s jednorázovou aplikací příslušných přípravků.

8. SEZNAM LITERATURY

BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA J., 1996. *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Marvil, 558 s.

BOULINIER, T., McCOY, K. D., SORCI, G., 2001. *Dispersal and parasitism*. In: Clobert J., Danchin E., Dhondt A. A., Nichols J. D. (eds) *Dispersal*. New York: Oxford University Press, 480 s.

BROUQUI, P., RAOULT, D., 1999. *Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the third millenium*. Paris: Elsevier, 455 s.

CELER, V., 2006. *Praktika z veterinární virologie*, Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 71 s., ISBN 80-86895-02-5.

ČERNÝ, Z. a kol., 2008. *Infekční nemoci, Jak pečovat o pacienty s infekčním onemocněním*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 288 s., ISBN 978-80-7013-480-1.

ČÍŽEK, A., 2006. *Praktika z veterinární bakteriologie a mykologie*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 134 s., ISBN 80-86895-05-X.

GAYLE, A., RINGDAHL, E., 2001. Tick-borne Diseases. *American Family Physician*, vol. 64, no. 3, p. 461-467.

HUBÁLEK, Z., HALOUZKA, J., 1996. *Arthropod-borne viruses of vertebrates in Europe*. Brno: Academiae scientiarum, 95 s.

HUDEC, K., BALÁT, F., ŠŤASTNÝ, K., 2011. *Ptáci: Aves*. 2. přepracované a doplněné vyd. Praha: Academia, 1196 s., ISBN 978802001834232.

KIMMIG, P., HASSLER, D., BRAUN, R., 2003. *Klíšťata - Nepatrné kousnutí s neblahými následky*. Praha: Pragma, 114 s., ISBN 80-7205-881-9.

- KLIMEŠ, J. a kol., 2004. *Zoologie pro veterinární mediky*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 197 s., ISBN 80-7305-489-2.
- LANG, J., 1974. *Zoologie*. 3. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 381 s.
- MARTYN, K. P., 1988. *Provisional atlas of the ticks (Ixodoidea) of the British Isles*. Grange-over-Sands: Institute of Terrestrial Ecology, 62 s.
- McCOY, K. D., BOULINIER, T., CHARDINE, J. W., DANCHIN, E., MICHALAKIS, Y., 1999. Dispersal and distribution of the tick *Ixodes uriae* within and among seabird host populations: the need for a population genetic approach. *Journal of Parasitology*, vol. 85, no. 2, p. 196–202.
- McCOY, K. D., BOULINIER, T., TIRARD, C., MICHALAKIS, Y., 2003. Host-dependent genetic structure of parasite populations: differential dispersal of seabird tick host races. *Evolution*, vol. 57, no. 2, p. 288-296.
- McCOY, K. D., TIRARD, C., 2000. Isolation and characterization of microsatellites in the seabird ectoparasite *Ixodes uriae*. *Molecular Ecology*, vol. 9, no. 12, p. 2213-2214.
- MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., PFALLER, M. A., 2012. *Medical Microbiology*, Fifth edition. Elsevier, 835 s., ISBN-13: 978-0323086929
- NOSEK, J., SIXL, W. a kol., 1972. *Central European Ticks (Ixodoidea). Key for determination*. Graz: Universität Graz, 247 s.
- ROSICKÝ, B., 1979. *Roztoči a klíšťata škodící zdraví člověka*. Praha: Academia, 208 s.
- ROSICKÝ, B., WEISER, J., 1952. *Škůdci lidského zdraví*. Praha: Přírodovědecké vydavatelství, 830 s.
- SAUER, F., 1995. *Ptáci lesů, luk a polí*. 1. vyd. Praha: Knižní klub, 286 s., ISBN 8071762067.

SNUSTAD, D., SIMMONS, M. J. S., 2009. *Genetika*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 894 s., ISBN 9788021048522.

SONENSHINE, D. E., 1991 - 1993. *Biology of ticks*. část 1. New York: Oxford University Press, 560 s., ISBN 0195059107.

SONENSHINE, D. E., 1991 - 1993. *Biology of ticks*. část 2., New York: Oxford University Press, 496 s., ISBN 0195084314.

STEERE, A. C., 2000. *Borrelia burgdorferi (Lyme disease, Lyme Borreliosis)*. In: Mandell, Douglas and Bennett's Principle and Practice of Infectious Diseases. 5. vyd. Philadelphia: Churchill Livingstone, 3263 s.

TREML, F., LÁNY, P., POSPÍŠIL, Z., ZENDULKOVÁ, D., 2014. *Infekční choroby zvířat I., Bakteriální, mykotické a protozoární infekce*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 88 s., ISBN 978-80-7305-704-6

VOTAVA, M., 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun, 351 s., ISBN 10-80-86850-00-5.

INTERNETOVÉ ZDROJE:

ANONYM 1. Briston University tick ID: Ixodes arboricola. [online]. [cit. 2014-11-13]. Dostupné z: <http://bristoltickid.blogs.ilrt.org/specialized-ticks-of-the-uk/ixodes-arboricola/>

CEE, J. *Virus*. [online]. 20.04.2008 [cit. 2015-02-22]. Dostupné z: <http://doktor.webnode.cz/news/hepatitida-c/>

FABIÁNOVÁ, K., BENEŠ, Č. *Q horečka - epidemický výskyt v Nizozemí*. [online]. 2010 [cit. 2015-03-20]. Dostupné z: http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/19_2010/04_duben/111_113_q_horecka.pdf

FAJFRLÍK, K., KOPECKÝ, J. *Molekulární ekologie virů klíšťové encefalitidy*. [online]. Praha, 1.04.2008 [cit. 2015-02-22]. Dostupné z: <http://parazitologie.cz/akce/seminar-2008/Sbornik.doc>

HAVELKA, P. *Viry*. [online]. 2009 [cit. 2015-02-22]. Dostupné z: http://vnl.xf.cz/bich/Biochemie_Viry.pps

HAVELKA, R. *Válka.cz: Q horečka*. [online]. 2003 [cit. 2015-03-20]. Dostupné z: http://www.valka.cz/clanek_1103.html

KENNETH, T. *Todar's online textbook of bacteriology: Rickettsial Diseases, including Typhus and Rocky Mountain Spotted Fever*. [online]. 2012 [cit. 2015-03-19]. Dostupné z: <http://textbookofbacteriology.net/Rickettsia.html>

KŘÍŽ, B., BENEŠ, Č. *Situace ve výskytu klíšťové encefalitidy do roku 2011 v České republice*. In: Státní zdravotní ústav[online]. 2012 [cit. 2015-02-22]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/klistova-encefalitida>

KUFNER, P. *Lymeská borelióza*. [online]. 2012 [cit. 2015-03-20]. Dostupné z: <http://petr-kufner.blog.cz/1209/lymska-borelioza>

MACHÁČEK, T. *Přírodovědci.cz: Ze života klišťat, 2. díl.* [online]. 2014 [cit. 2015-03-20]. Dostupné z: <https://www.prirodovedci.cz/biolog/clanky/ze-zivota-klistat-2-dil>

MEHLHORN, H., SCHEIN, E. *Babesia.cz: Babesia canis.* [online]. 1984 [cit. 2015-03-20]. Dostupné z: <http://www.babesia.cz/?what=texy&f=bcanis>

MLČOCH, Z. *Příznaky a projevy: Babesioza - příznaky, projevy, symptomy, příčina, léčba.* [online]. 2012 [cit. 2015-03-11]. Dostupné z: <http://www.priznaky-projevy.cz/infekcni-nemoci/babesioza-priznaky-projevy-symptomy-pricina-lecba>

PIVOŇKOVÁ, E. *Příznaky a projevy: Q horečka - příznaky, projevy, symptomy.* [online]. 2014 [cit. 2015-03-20]. Dostupné z: <http://www.priznaky-projevy.cz/infekcni-nemoci/q-horecka-priznaky-projevy-symptomy>

PLESNÍK, V. *Návrat Brill-Zinsserovy nemoci?* [online]. [cit. 2015-03-20]. Dostupné z: http://www.khsova.cz/01_odborna_cinnost/files/smd084.pdf

PLESNÍK, V. *Zdravotní prohlídky po návratu z ciziny - část I.* [online]. č.165. 2003 [cit. 2015-03-11]. Dostupné z: http://www.khsova.cz/01_odborna_cinnost/files/smd165.pdf

ROSENAUEROVÁ, A. L. *Detoxikace.org: Bakterie - chlamydie a rickettsie.* [online]. Brno, 27.01.2014 [cit. 2015-03-11]. Dostupné z: <http://www.detoxikace.org/media/bakterie-chlamydie-a-rickettsie-2/?page=3>

ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J. *Encyklopedie hydrobiologie: Protozoa, prvoci, jednobuněční.* [online]. Praha, 2007 [cit. 2015-03-11]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=P039

STAŇKOVÁ, M., MAREŠOVÁ, V., VANIŠTA, J. *Medicabaze.cz: Arbovirózy.* [online]. Praha, 2008 [cit. 2015-03-20]. Dostupné z: http://medicabaze.cz/index.php?sec=term_detail&categId=16&cname=Infek%C4%8Dn%C3%AD+l%C3%A9ka%C5%99stv%C3%AD&termId=1535&tname=Arbovir%C3%B3zy&h=empty#jump

VOTÝPKA, J. *Technet.cz: Hlavní zabijáci první světové války: vši, tetanus a „zákopová noha“*. [online]. 2014 [cit. 2015-03-20]. Dostupné z:
[http://technet.idnes.cz/prvni-svetova-valka-nemoci-a-umrti-dt1-/veda.aspx?
c=A140805_131212_veda_mla](http://technet.idnes.cz/prvni-svetova-valka-nemoci-a-umrti-dt1-/veda.aspx?c=A140805_131212_veda_mla)

9. ABSTRAKT

Detekce patogenních mikroorganismů přenášených ornitofilními klíšťaty

Havlíčková, K.

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Fakulta veterinární hygieny a ekologie

Abstrakt

Klíšťata jsou hlavními přenašeči bakteriálních, virových a protozoárních původců onemocnění. Nejčastěji přenášené zoonózy jsou lymeská borrelióza, klíšťová encefalitida, rickettsiózy, babesiízy, anaplasmozy či arbovirózy. Mezi nejvýznamnější druhy klíšťat přenášející patogenní mikroorganismy řadíme klíště obecné (*Ixodes ricinus*), které je zároveň nejvíce rozšířeným druhem.

První část této práce je zaměřena na teoretickou stránku dané problematiky a druhá část je zaměřena na stránku praktickou. Praktická část v této práci objasnila, zda patogenní *Rickettsie spp.* byla nalezena u klíšťat břehulí říčních. Celkem jsem testovala 144 klíšťat z 12 lokalit v České republice, nalezených v norách již zmíněné břehule říční. Detekce probíhala pomocí *gltA* a *ompA* genů. Tato patogenní bakterie byla prokázána ve všech lokalitách za pomoci molekulárně-biologických metod (PCR, elektroforéza) detekujících zmíněné geny a tedy i tyto mikroorganismy.

Detection of pathogens transmitted by ticks on birds

Havlíčková, K.

University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology

Abstract

Ticks belong among main vectors of bacterial, viral and protozoal diseases. The lyme borreliosis, tick encephalitis, rickettsioses, babesioses, anaplasmoses and arboviroses are the most frequent zoonoses transmitted by ticks. The castor bean tick (*Ixodes ricinus*) is one of the most important tick species transmitting pathogenic microorganisms, and at the same time it is the most frequent species.

The first part of this thesis focuses on theoretical portion of given problematics, while the second part focuses on the practical portion. The practical portion uncovers findings of pathogenic *Rickettsia* spp. in ticks parasiting on sand martins (*Riparia riparia*). Altogether, 144 ticks from 12 localities in the Czech Republic, found in nesting burrows, were tested. The detection was based on *gltA* and *ompA* genes. These genes, and therefore this pathogenic bacterium was, based on molecular-biologic methods (PCR, electrophoresis), detected in all tested localities.

10. SEZNAM ZKRATEK

spp. – species – množné číslo – uvedený rod má více druhů

m. n. m. – metrů nad mořem

mm – milimetr

μl – mikrolitr

č. – číslo

IgG – imunoglobulin G

IgM – imunoglobulin M

s.r.o. – společnost s ručením omezeným

W – watt

mA – miliampér

° C – stupeň Celsia

DNA – deoxyribonukleová kyselina

rDNA – ribozomální DNA