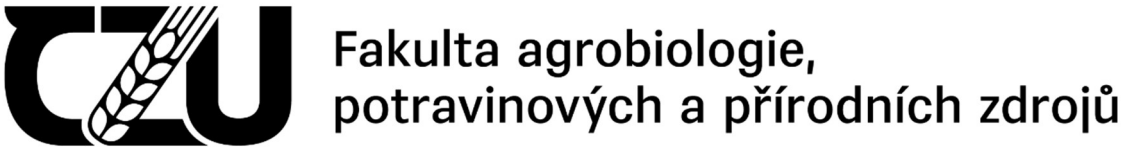
Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



Repelentní účinnost směsi esenciálních olejů ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) proti klíšťatům *Ixodes ricinus*

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Anna Březinová

Obor: Zájmové chovy zvířat

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

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Repelentní účinnost směsi esenciálních olejů ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) proti klíšťatům *Ixodes ricinus*" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12.4.2022 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala mému vedoucímu práce Ing. Martinu Kulmovi PhD., který mi pomohl celou práci zkompletovat a vždy mi byl ochotný pomoci. Chtěla bych také poděkovat Kateřině Imrichové a Terezii Bubové ze Státního zdravotního ústavu za pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě patří mé poděkovaní celé mé rodině a příteli, kteří mi byli po celou dobu velkou oporou a pomocí.

Repelentní účinnost směsi esenciálních olejů ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) proti klíšťatům *Ixodes ricinus*

Souhrn

Syntetické přípravky, jako jsou repelenty, obojky nebo pipety spot-on, bývají v současnosti nejrozšířenější prevencí proti přisátí klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) a následného přenosu patogenů u psů. Co se týče repelentních přípravků, nejčastěji se využívají přípravky na bázi diethyltoluamidu (deet).

Tato práce je zaměřena na zhodnocení repelentní účinnosti směsí esenciálních olejů ze smrku ztepilého (*Picea abies)* a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) jako alternativního nesyntetického repelentu. Směsi byly připraveny ve třech různých poměrech – 2:1, 1:2 a 1:1 a čtyřech různých koncentracích 5 %, 10 %, 15 % a 20 %. Pro srovnání byl použit syntetický repelent deet a to v koncentracích 5 % a 20 %. K testování byly použity nymfy klíštěte obecného (*I. ricinus*), které byly sesbírány pomocí vlajkování v Klánovickém lese na dvou stanovištích (nesečená tráva a opadané jehličí v okolí krmelce). Ke sběru docházelo v podvečerních hodinách od poloviny května do prvního týdne v říjnu roku 2020. Celkem bylo pro testování využito 2 100 nymf.

Testování probíhalo v Národní referenční laboratoři pro dezinsekci a deratizaci ve Státním zdravotním ústavu (SZÚ). Byly použity Petriho misky se třemi vrstvami filtračního papíru, kdy na jeho okraj bylo aplikováno 0,5 ml etanolového roztoku směsi esenciálního oleje v příslušném poměru a koncentraci. Nymfy byly umístěny doprostřed Petriho misky mimo aplikovaný repelent po 10 jedincích a ve třech opakování. Repelentní účinnost byla sledována v časech: 5 minut, 30 minut, 60 minut, 120 minut, 240 minut, 360 minut a 480 minut od aplikace. V případě, že repelence byla nižší než 33 %, test byl ukončen. Stejným způsobem byl testován syntetický repelent deet, a to v koncentracích 5 % a 20 %.

Hypotéza „Směs testovaných esenciálních olejů má repelentní účinek, není ovšem tak stabilní, jako u syntetických přípravků“ byla potvrzena. Deet v obou koncentracích vykazoval stabilní výsledky ve všech časových intervalech. Repelentní účinnost byla vždy vyšší kromě 20% směsi v poměru 2:1, kdy došlo ke stejnému výsledku po 480 minutách jako u deetu. Na základě statistického vyhodnocení bylo zjištěno, že repelentní účinnost byla ovlivněna koncentrací repelentu, a to po celou dobu testování. Od 240 minut po aplikaci byla účinnost ovlivněna také poměrem esenciálních olejů ve směsi. Z hlediska konečných výsledků, byla nejúčinnější směs esenciálních olejů ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) v poměru 2:1 a 20% koncentraci.

Na základě získaných výsledků lze říci, že všechny testované směsi měly určitý repelentní účinek, který je možné zvýšit vyšší koncentrací. V porovnání se syntetickým deetem nebyla repelence testovaných směsí stejně stabilní.

Pro budoucí použití esenciálních olejů jako alternativních prostředků proti přisátí klíštěte a následnému přenosu patogenů se jeví jako vhodná směs, která je ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) a to v poměru 2:1 a 20% koncentraci. Mohlo by se tak jednat o přírodní repelent, který by byl vhodný a účinný i na dlouhodobější pobyty v přírodě. Zároveň by nedocházelo ke kontaminaci životního prostředí či nežádoucím účinkům na těle psů. Pro potvrzení této teorie je však zapotřebí dalšího testování účinnosti *in-vivo* a také z hlediska toxikologické bezpečnosti.

Klíčová slova: laboratorní testy účinnosti, alternativní repelenty, deet, pes, klíště obecné

Repellency of the mixtures of spruce (*Picea abies*) and sage (*Salvia officinalis*) essential oil against *Ixodes ricinus*

Summary

Synthetic products such as repellents, collars or pipettes spot-on are currently the most widely used prevention against the attachment of the common tick (*Ixodes ricinus*) and subsequent transmission of pathogens in dogs. Diethyltoluamide (deet) based products are most commonly used.

This work aims to evaluate the efficacy of the mixtures of essential oils from *Picea abies* and *Salvia officinalis* as an alternative non-synthetic repelents. The mixtures were prepared in three different ratios of 2:1, 1:2 and 1:1 and four different concentrations of 5 %, 10 %, 15 % and 20 %. For comparison, the synthetic repellent deet was used at 5 % and 20 % concentrations. The nymphs of the common tick (*Ixodes ricinus*) for testing were collected by flaging in the Klánovice forest at two sites (unmown grass and fallen needles around the animal feeder) in the early evening from mid-May to the first week of October 2020. In total, 2 100 nymphs were used for the testing.

The bioassays were carried out at the National Reference Laboratory for Health Pest Control at the National Institute of Health. To test the repellent effect, the Petri dishes with three layers of filter paper were used, when 0.5 ml of an ethanolic solution of the essential oil mixtures in the appropriate ratio and concentration was applied around the inner dish rim. The nymphs were placed in the centre of the Petri dish (outside the treated area) in groups of 10 individuals and in triplicate. Repellent efficacy was monitored at intervals of 5 minutes, 30 minutes, 60 minutes, 120 minutes, 240 minutes, 360 minutes and 480 minutes after application. The test was terminated in case the repellency was lower than 33 %. The synthetic repellent deet was tested in the same manner at 5 % and 20 % concentrations.

The hypothesis "The mixture of essential oils tested has a repellent effect, but is not as stable as the synthetic products" was confirmed. Deet at both concentrations showed stable results at all the intervals. The repellent efficacy was always higher except for the 20 % mixture in a 2:1 ratio where the same result occurred after 480 minutes as with deet. Based on statistical evaluation, it was found that repellent efficacy was affected by repellent concentration, throughout the entire testing period. From 240 minutes after application, the efficacy was also affected by the ratio of the essential oil mixture. In terms of final results, the mixture of essential oils of *Picea abies* and *Salvia officinalis* at a ratio of 2:1 and 20 % concentration was the most effective natural repellent.

Based on the results obtained, we can say that all tested mixtures had some repellent effect, which can be increased by concentration increase. Compared to synthetic deet, none of the mixtures were equally stable.

For the future use of essential oils as alternative prevention of tick attachment and subsequent pathogen transmission, the mixture of *Picea abies* and *Salvia officinalis* essential

oils in a 2:1 ratio and 20 % concentration seems to be the most suitable of the tested mixtures. This could be a natural repellent that would be suitable and effective for longer stays in the countryside. At the same time, there would be no environmental contamination or adverse effects on the body of the dogs. However, further *in-vivo* and safety testing is needed to confirm this theory.

Keywords: repellency laboratory test, alternative repellents, deet, dog, tick

1 Obsah

2 Úvod 1

3 Vědecká hypotéza a cíle práce 2

4 Literární rešerše 3
4.1 Klíšťata 3
4.2 Klíště obecné (Ixodes ricinus) 3
4.2.1 Morfologie 4
4.2.2 Vývojový cyklus 4
4.2.3 Vyhledávání hostitele 6
4.2.4 Sání krve na hostiteli 7
4.2.5 Obranné reakce hostitele 8
4.2.6 Diapauza 8
4.3 Onemocnění přenášené klíšťaty na psy 8
4.3.1 Lymeská borrelióza 9
4.3.2 Ehrlichióza 9
4.3.3 Klíšťová encefalitida 10
4.3.4 Babesióza 10
4.4 Ochrana proti klíšťatům u zvířat 11
4.4.1 Repelence 12
4.4.2 Akaricidy 12
4.4.3 Pyrethriny a pyrethroidy 13
4.4.4 Repelenty 13
4.4.5 Studie zabývající se testováním esenciálních olejů na psech 17

5 Metodika 19
5.1 Klíšťata 19
5.1.1 Lokalita sběru klíšťat 19
5.1.2 Klíšťata 19
5.2 Esenciální oleje 21
5.3 In – vitro test 21
5.3.1 Příprava před testováním 21
5.3.2 Průběh testování 23
5.3.3 Ukončení testování 24
5.4 Vyhodnocení dat 24

6 Výsledky 25
6.1 Tabulky pro potvrzení synergického efektu 25
6.2 Statistické vyhodnocení pokusu 28
6.2.1 5% koncentrace 28

6.2.2 10% koncentrace 30
6.2.3 15% koncentrace 32
6.2.4 20% koncentrace 34
6.3 Chemické složení esenciálních olejů a jejich směsí 36
7 Diskuze 38
7.1 Esenciální oleje ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské 38
8 Závěr 40
9 Literatura 41
10 Samostatné přílohy I
10.1 Tabulky se směsí smrku a šalvěje v poměru 2:1 I
10.2 Tabulky se směsí smrku a šalvěje v poměru 1:2 IV
10.3 Tabulky se směsí smrku a šalvěje v poměru 1:1 VII
10.4 Tabulky s kontrolním repelentem DEET X

2 Úvod

Klíšťata patří mezi nejznámější hematofágní ektoparazity, kteří přenášejí velmi rozmanité, často zoonotické patogeny, které mohou způsobovat zdravotní problémy zvířat i lidí (Thompson 2008; De Meneghi et al. 2016; Adenubi et al. 2018; Higa et al. 2019). Nejčastěji se vyskytující druh klíštěte na území České republiky je *I. ricinus*, nebo-li klíště obecné. Nejvyšší pravděpodobnost přisátí klíštěte je v období od března do listopadu, s vrcholem aktivity od května do září. V tomto období je také největší riziko přenosu patogenů na psy. V České republice se jedná zejména o klíšťovou encefalitidu, lymeskou boreliózu, babeziózu a ehrlichiózu. Proto je v tomto období před vstupem do přírody doporučováno použití preventivních přípravků jako ochrany. U psů nejčastěji volíme syntetické repelenty, obojky či pipety spot-on (Gray 1991; Volf & Horák 2007).

Zatímco přípravky typu spot-on obsahují látky, které klíšťata eliminují, repelenty jsou látky, které mají zabránit klíštěti přisát se nebo přerušit sání na hostiteli. Ideálním repelentem by měl být přípravek, který je účinný alespoň po dobu 8 hodin a je netoxický, nedráždivý a bez zápachu (Fradin 1998).

Nejčastěji se proti klíšťatům používají syntetické repelenty na bázi deetu, u kterých se postupem času objevily různé nežádoucí účinky. Při vyšších koncentracích je toxický a dráždivý. Nedoporučuje se také používat u malých dětí, protože by mohlo dojít k narušení centrálního nervového systému. Dále u některých syntetických repelentů byla pozorována rezistence parazitů a znečišťování životního prostředí. Proto se v současnosti uvažuje o bezpečnějších, ekologičtějších a levnějších variantách (Frances 2007; Abdel-Ghaffar et al. 2015; Benelli et al. 2016).

Jako přírodní repelenty se nejčastěji využívají esenciální oleje. Výhodu představují především v šetrnosti k životnímu prostředí, nízké ekotoxicitě a může také jít o levnější variantu. Jedná se o sekundární metabolity rostlin a dnes je známo zhruba 3 000 různých esenciálních olejů (Mossa 2016). V současnosti je otestováno 51 esenciálních olejů s repelentními účinky proti ektoparazitům (Benelli & Pavela 2018).

Cílem této práce bylo zjistit repelentní a synergický účinek směsi esenciálních olejů ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) a vyhodnotit tak možné využití jako přípravků pro psy proti těmto ektoparazitům.

3 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce je pomocí laboratorního *in-vitro* testu zjistit repelentní a synergický účinek směsi esenciálních olejů ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské na klíště obecné a vyhodnotit jejich možné využití jako přípravků pro ochranu psů proti těmto členovcům. Pro srovnání bude identický test proveden i pro synteticky vyrobený repelent deet, účinnou látku obsaženou v komerčně dostupných repelentech pro psy. Výsledky budou zároveň porovnány i s výsledky testů účinnosti jednotlivých silic, aby byl zjištěn případný synergický efekt.

Vědecká hypotéza: Směs testovaných esenciálních olejů má repelentní účinek, není ovšem tak stabilní jako u syntetických přípravků.

4 Literární rešerše

4.1 *Klíšťata*

Klíšťata jsou obligátní ektoparaziti sající krev a známí jako přenašeči zoonotických patogenů, které mohou způsobit zdravotní potíže u lidí i zvířat (Thompson 2008; De Meneghi et al. 2016; Adenubi et al. 2018; Higa et al. 2019). Jsou tak původcem mnoha zoonotických onemocnění jako jsou např. klíšťová encefalitida nebo lymeská borrelióza (Rizzoli et al. 2014). U domácích zvířat může být původcem například *Babesie*, *Anaplasmy* a různých kmenů *Rickettsií* (Jennett et al. 2013). Nejčastěji se vyskytují na teplých a vlhkých místech při optimální teplotě, která se pohybuje mezi 18 – 25 °C (Thompson 2008). Většinu svého života (90 – 99 %) tráví mimo hostitele, a proto se u nich vyvinula řada adaptivních schopností, které umožňují přežití v různorodých klimatických podmínkách. Limitujícím faktorem v prostředí je především relativní vlhkost, která by neměla klesnout pod 80 % (Estrada-Peña et al. 2013), a zároveň také dostatečné množství hostitelů. Proto se klíšťata nejčastěji vyskytují v lesích, kde žijí především malí savci a spárkatá zvěř. Dále se hojně vyskytují na otevřených stanovištích (louky, rašeliniště), kde mohou sát na hospodářských zvířatech, která se zde pasou (Gray 1991).

4.2 *Klíště obecné (Ixodes ricinus)*

Říše: Animalia

Kmen: Arthropoda

Třída: Arachnida

Řád: Ixodida

Čeleď: Ixodidae

Rod: *Ixodes*

Druh: *Ixodes ricinus*, Linnaeus 1758

Jedná se o nejčastěji se vyskytující druh klíštěte v mírném pásu Evropy, s rozšířením od jižního Španělska po severní Skandinávii (Rizzoli et al. 2014). Na území České republiky se klíšťata vyskytují především v nížinách a pahorkatinách. Méně často se pak vyskytují ve vyšších polohách. V závislosti na počasí jsou obvykle aktivní v období od března do listopadu. Vrchol aktivity klíštěte obecného nastává od května do září. V tuto dobu je také nejvhodnější aplikovat různá protiklíšťová opatření, např. insekticidní a repelentní obojky u psů (Gray 1991; Volf & Horák 2007).

4.2.1 Morfologie

Ixodes ricinus (klíště obecné) má zploštělé oválné tělo a v dospělosti dosahuje velikosti zhruba 2,2 – 4,5 mm. Dospělci a nymfy mají čtyři páry končetin, larvy naproti tomu pouze tři páry (Thompson 2008; Svobodová et al. 2013). Dospělá klíšťata mají na hřbetní straně těla typický tvrdý štítek (scutum), který u samců kryje téměř celé tělo, u samiček pak v nenasátém stavu zasahuje do poloviny či třetiny jejich jinak velmi elastické idiosomy (zadní část těla). Díky tomu je samička schopná při sání mnohonásobně zvětšit svůj objem a dostatečně se tak nakrmit pro tvorbu vajíček. Nejnápadnější částí gnathosomy (ústního ústrojí) je hypostom (chobotek s řadou zahnutých zpětných háčků), díky kterému je klíště schopné se udržet během sání v ráně hostitele. Po přisátí klíštěte dochází k tzv. „zabetonování“, kdy klíště produkuje látku, která zpevňuje fixaci v ráně. Na hostiteli setrvá řadu dní a po odpadnutí nasátého klíštěte a strávení krve dochází k přeměně na vyšší vývojové stádium (z larvy se stává nymfa a z nymfy dospělec). V případě, že se jedná o samici, dochází k produkci početné snůšky vajíček. Tento proces uskuteční však pouze jednou za život. Ačkoliv samci rodu *I. ricinus* krev nesají, můžeme se s nimi na hostiteli setkat, protože zde dochází ke kopulaci se samicemi. Hostitelovo tělo je totiž nejpravděpodobnějším místem vzájemného setkání obou pohlaví (Sonenshine et al. 2002; Volf & Horák 2007).

4.2.2 Vývojový cyklus

Na většině území České republiky se ve volné přírodě setkáme především s klíštětem *I. ricinus*. Člověk může být hostitelem pro jakékoli jeho vývojové stádium. Každé stádium (larva, nymfa, dospělá samice a samec) (Obr. 1) potřebuje ke svému vývoji zpravidla jeden rok, takže celý vývoj klíštěte trvá obvykle tři roky. Klíště se tedy vyvíjí v typickém tříhostitelském cyklu (Obr.2) (Volf & Horák 2007).

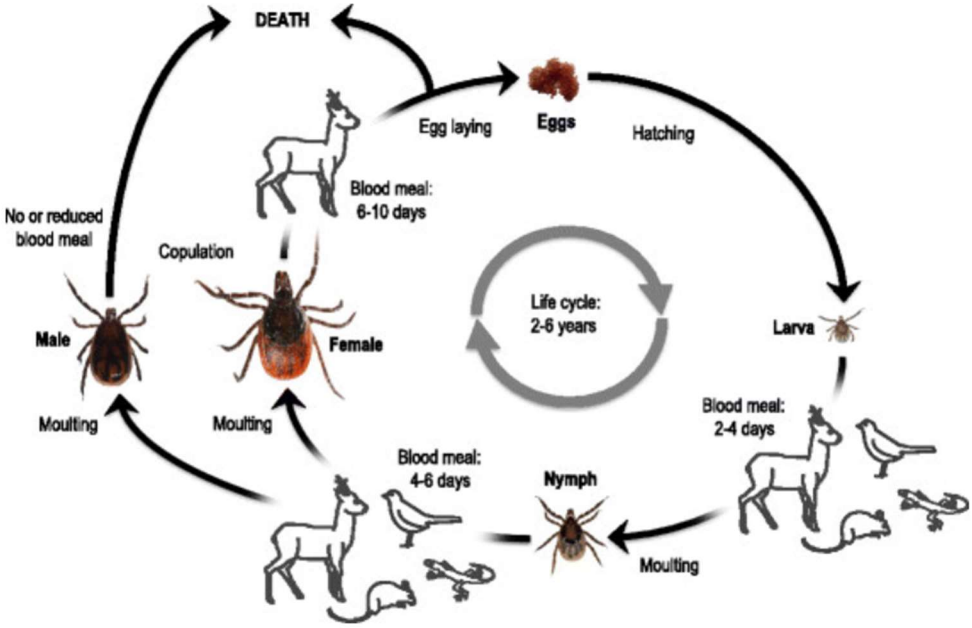
Obr. 1: z levé strany – larva, nymfa, dospělá samice, dospělý samec. Převzato z: https://www.researchgate.net/figure/Developmental-stages-of-Ixodes-ricinus-From-left-to-right-larva-nymph-adult-female_fig2_236120221

Oplozená samice odpadne po nasátí krve z hostitele a naklade do země několik tisíc vajíček (Stuchlý 1995). Je schopná naklást až 4 000 vajíček, průměrný počet bývá mezi 2 000 – 2 500 (Honzáková et al. 1975).

Z vajíček se vylíhnou larvy za 6 – 36 týdnů, dle podmínek prostředí, které jsou pouhým okem téměř neviditelné (Stuchlý 1995). Velikost larvy obvykle nepřesahuje 0,8 mm (Thompson 2008). Zdržují se nízko při zemi, kde čekají na hostitele, kterým nejčastěji bývají drobní hlodavci, ptáci a ještěrky (Volf & Horák 2007). Larvy se na hostitele přisají a po několika dnech od prvního přisátí samy odpadnou a dostávají se do stádia metamorfózy (přeměna larvy v nymfu) (Stuchlý 1995; Thompson 2008).

Druhým stádiem klíštěte je nymfa, která má již čtyři páry končetin a dosahuje velikosti přibližně 1 mm. Nymfy obvykle vyčkávají na koncích podrostu a čekají na větší hostitele (obratlovce), kterými mohou být např. ovce, jeleni nebo člověk (Volf & Horák 2007; Svobodová et al. 2013). Při čekání na vhodného hostitele je nymfa schopná vydržet bez potravy i rok a půl až dva roky (Stuchlý 1995). Nymfa se opět na hostitele přichytí, saje několik dní do maximální velikosti a poté opět odpadne. Poté dochází k přeměně nymfy na dospělce (Thompson 2008).

Posledním vývojovým stádiem je dospělec. Dospělé samičky sají především na lesní zvěři nebo na domácích kopytnících či psech (Volf & Horák 2007). Na hostiteli se přichytávají v místě, kde je kůže nejtenčí, nejjemnější a hodně prokrvená (Stuchlý 1995). Pokud je samička v hladovém stádiu, dosahuje délky přibližně 3,5 – 4,5 mm a je červenohnědá. V případě plného nasátí je zbarvena obvykle šedě a dosahuje velikosti fazole (Volf & Horák 2007). Po tomto sání v nich dozrávají oplozená vajíčka (Stuchlý 1995). Samec dosahuje délky 2,2 – 2,5 mm a potravu nepřijímá, na zvířeti ho nalezneme z důvodů vyhledávání samice k páření (Kiszewski et al. 2001; Svobodová et al. 2013).



Obr. 2: Vývojový cyklus klíštěte *Ixodes ricinus.* Převzato z: https://www.researchgate.net/figure/I-ricinus-life-cycle-I-ricinus-is-a-three-host-tick-of-which-each-stage-ie-larva_fig1_270652120

4.2.3 Vyhledávání hostitele

Při vyhledávání hostitele nenasátá klíšťata číhají nejčastěji na vegetaci (Sonenshine 1993; Volf & Horák 2007). Vyšplhají na vrcholy stonků/stébel nebo větví, kde se udržují pomocí končetin (Obr. 3). Díky citlivému Hallerovu orgánu, který je umístěn na článcích předního páru končetin a pomocí specifického pohybu, je klíště schopné přesně lokalizovat hostitele a přichytit se.

Obr.3: Dospělá samice čekající na hostitele.
Převzato z: https://www.insectservices.de/en/efficacy-studies/ticks/

Všechny olfaktorické receptory jsou u klíšťat soustředěny v Hallerovu orgánu (Leonovich 2004). Při přiblížení potenciálního hostitele dochází k natažení a rychlému pohybu končetin, kde jsou na konci umístěné jemné receptory tohoto orgánu. K této aktivitě dochází zaznamenáním vibrací, tepla a vydechovaného oxidu uhličitého zvířetem (Hess et al. 1986; Sonenshine 1993; Volf & Horák 2007; Braks et al. 2016). Rod *Ixodes* nemá oči. Při otření zvířete o vegetaci a kontaktu s klíštětem se nepřisaje hned, ale pomocí senzorických orgánů umístěných zejména na palpách si vyhledají nejvhodnější místo (Volf & Horák 2007). Na psy se klíšťata přisají především na místech s jemnou pokožkou, jako je: okolí očí, krku, uší, břicha a nosu. Při přichycení se objevují lokální zánětlivé kožní reakce. Sliny klíšťat obsahují neurotoxiny, které způsobují klíšťovou paralýzu u vnímavých jedinců (Svobodová et al. 2013).

Pro nedospělá stádia jsou nejdůležitějšími hostiteli hlodavci (myši, hraboši, plši, veverky atd.). Značné množství larev a nymf mohou přenášet také ptáci a ještěrky. U ptáků se jedná nejčastěji o druhy, které vyhledávají potravu na zemi s nízkou vegetací. Patří mezi ně především kos obecný (*Turdus merula*), drozd zpěvný (*Turdus philomelos*) a červenka obecná (*Erithacus rubecula*) (Rizzoli et al. 2014). Z ještěrek se nejčastěji jedná o druhy ještěrka zední (*Podarcis muralis*), ještěrka obecná (*Lacerta agilis*), a ještěrka zelená (*Lacerta viridis*) (Majláthová et al. 2006; Földvári et al. 2009).

Nejčastějšími hostiteli dospělců jsou teplokrevní savci, jeleni, srnci, daňci a divoká prasata či psovité šelmy, například lišky (Földvári et al. 2011).

Pro vyvinutí stabilní populace stačí *I. ricinus* pouze výskyt jednoho z hostitelů. Díky tomu jsou klíšťata schopná se udržet i na specifických stanovištích jako jsou ostrovy nebo městské parky (Rizzoli et al. 2014).

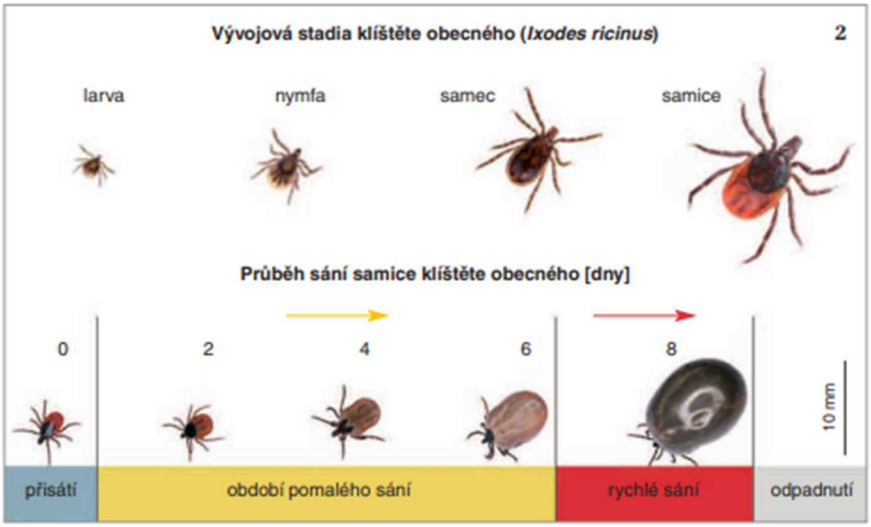
4.2.4 Sání krve na hostiteli

Hematofágní členovci figurují často jako vektoři nejznámějších infekčních nemocí a ti, kteří parazitují zejména na lidech nebo na zvířatech, pocházejí především z řádu klíšťata (*Ixodida*). Sání krve ektoparazity je ztíženo různými účinnými mechanismy hostitele, kteří se tak brání ztrátě krve a nasátí. Sliny ektoparazitů ovšem obsahují velké množství biologicky aktivních látek, které napomáhají k obejití obranných mechanismů daného hostitele.

Všechny druhy klíšťat sají krev, ale z celkového počtu zhruba 899 druhů, pouze 10 % disponuje schopností zároveň přenášet i patogeny na hostitele. Patogeny se do ektoparazita dostávají při sání na již infikovaném hostiteli a přes slinné žlázy se pak díky klíšťatům přenášejí na další jedince.

Aby mohlo klíště úspěšně dokončit svůj životní cyklus, přežít a dále se rozmnožovat, musí přijímat krev. Klíště při sání díky hypostomu proniká do kůže hostitele, což poškozuje epidermální a dermální buňky a zároveň způsobuje zánětlivé reakce (Matějovská 2007).

Klíšťata sají pouze jednou v každém životním cyklu. Sání samic může trvat několik dní, kdy dochází k pomalému sání (6 – 9 dní) a poté následuje rychlé sání, které probíhá 12 – 24 hodin před odpadnutím z hostitele (viz Obr. 4). Aby mohlo dojít k fázi rychlého sání, musí nejprve dojít k oplození samice. Při této fázi je schopná nasát zhruba stonásobek své původní hmotnosti. Důležitý předpoklad pro velkou snůšku je zpracování proteinů z hostitelské krve, a to zejména hemoglobinu a sérového albuminu. Samice hynou několik málo dní poté, co nakladou snůšku vajíček. U larev a nymf dochází k využití bílkoviny hostitele na svlékání a energii (Sojka 2016).



Obr. 4: Vývojová stádia klíštěte obecného a fáze sání samice
převzato z: https://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/krvemlynek-ve-streve-klistete.pdf

Trávení se u klíšťat odehrává ve střevě, které tvoří přes 80 % těla. Střední část (mezenteron) je odpovědná za trávení a rozčleněná do výběžků (cacea), které zvětšují objem a celkový povrch střeva (Horn et al. 2009). V lumen střeva dochází k enzymatickému rozkladu erytrocytů a rozpuštěné krevní proteiny se poté dostávají do střevních buněk, kde jsou tráveny. Díky tomuto způsobu trávení, kdy vnitřek střeva slouží i jako zásobník, jsou klíšťata schopná přežít dlouhé časové intervaly (měsíce až roky) mimo hostitele. Tato schopnost velmi přisívá k jejich globálnímu rozšíření a úspěšné adaptaci v nejrůznějších podmínkách a prostředí (Sojka 2016).

4.2.5 Obranné reakce hostitele

V místě průniku klíštěte do kůže hostitele dochází ke specifické i nespecifické imunitní reakci. Nespecifickou odpovědí je zánět, který se velmi rychle rozvíjí a podílejí se na něm makrofágy a NK buňky (přirození zabíječi), z leukocytů (hlavně basofily a neutrofily), žírné buňky a jejich produkty. Žírné buňky a některé typy leukocytů uvolňují histamin a další látky, které jsou zodpovědné za svědění a bolest v místě přisátí klíštěte. Zároveň omezují nasátí klíštěte, díky snížení produkce slin.

Specifická odpověď se projevuje po opakovaném nebo dlouhodobém sání parazita. Dendritické buňky kůže v okolí vpichu fagocytují sliny parazita a následně migrují do nejbližších lymfatických uzlin. Zde díky antigenům klíštěcích slin vznikají protilátky a vznikají tzv. paměťové buňky. Při další interakci klíštěcích antigenů s imunitním systémem hostitele vzniká sekundární imunitní reakce, kdy dochází v kratším čase k produkci většího množství protilátek (Matějovská 2008).

4.2.6 Diapauza

Život *I. ricinus* je ovlivněn mnoha různými faktory, přičemž jsou schopni přežít několik let. Umožňuje jim to specifická adaptace všech třech vývojových stádií (larva, nymfa, dospělec). V případě neoptimálních podmínek se klíšťata uvedou do neaktivního stavu zvaného diapauza. Diapauza se liší od klidového stavu a je definována jako neurohormonálně zprostředkovaný dynamický stav s nízkou metabolickou aktivitou (Sonenshine & Roe 2014). Klíčové faktory, které regulují diapauzu jsou: počasí, mikroklima a fotoperioda (délka dne-noci) (Gray et al. 2016).

4.3 *Onemocnění přenášené klíšťaty na psy*

V Evropských státech je *I. ricinus* vektorem především *Anaplasmy phagocytophilum* a *Borrelie burgdorferi*. Tyto bakterie způsobují granulocytární anaplazmózu a lymeskou borreliózu především u koček a psů (Geurden et al. 2018). Schopnost klíšťat přenášet patogeny představuje trvalé riziko infekce i pro lidi a další zvířata. Přestože jsou klíšťata běžně spojována s oblastmi na venkově, je již nyní zřejmé, že se přizpůsobila i městskému prostředí (Rizzoli et al. 2014).

4.3.1 Lymeská borrelióza

Lymeská borrelióza patří celosvětově mezi nejčastěji diagnostikovaná zoonotická onemocnění přenášená klíšťaty. Původcem je spirálovitá bakterie z kmene spirochét patřící do rodu *Borrelia* (Chomel 2015). K přenosu dochází při sání krve, kdy se slinami klíšťat se do těla dostávají také bakterie. Od proniknutí bakterií do organismu po objevení se prvních příznaků uplyne obvykle několik dnů. V oblasti přichycení klíštěte se po několika dnech objeví mírné zduření a zarudnutí kůže, které se může zvětšovat a dosáhnout průměru až 30 cm (Stuchlý 1995). Příznaky lymeské borreliózy u psů mohou zahrnovat horečku, celkovou malátnost, kulhání, zvětšení lymfatických uzlin a polyartritidu. Zhruba u třetiny jedinců s borrelií, může dojít k napadení nervového systému. Dochází poté k zánětům nervů a drobným ochrnutím, například lícního nervu.

Včasná léčba antibiotiky, jako jsou doxycyklin nebo amoxicilin, po dobu tří týdnů, obvykle snižuje riziko chronického onemocnění. Zatímco u lidí je jedinou aktuálně dostupnou prevencí používaní repelentů, u psů je možné aplikovat vakcínu proti lymeské borrelióze (Chomel 2015).

4.3.2 Ehrlichióza

Ehrlichióza neboli granulocytární anaplazmóza je infekční onemocnění způsobené bakterií *Anaplasmosa phagocytophilum*. Jedná se o zoonotické onemocnění, které je potenciálně smrtelné u psů. Vyžaduje rychlou a přesnou diagnózu, aby byla zahájena vhodná terapie vedoucí k příznivé prognóze. Bakterie infikuje a následně přežívá v neutrofilech, kde se vyhýbá specifickým imunitním reakcím. Jedná se o akutní horečnaté onemocnění charakterizované letargií, nechutenstvím, hubnutím a bolestmi pohybového aparátu. Absence specifických klinicko-patologických příznaků, rychlý vývoj a pozitivní prognóza i bez léčby představuje obtížnou diagnózu pro veterinárního lékaře. Pro správnou diagnózu je provedeno sérologické vyšetření krve. Vektorem jsou klíšťata rodu *Ixodes*. Existují tři stupně tohoto onemocnění: akutní, subklinické a chronické. Psi zůstávají po napadení touto bakterií infikováni po celý život, a to i v případě léčení antibiotiky (doxycyklinem). Léčba probíhá pomocí antibiotik po dobu až třiceti dnů. Účinnou prevencí mohou být různá antiparazitika a repelenty.

Ačkoli jsou psi vnímaví k tomuto druhu infekce, považují se spíše za náhodné hostitele a jejich role jako potenciálních rezervoárů je stále sporná. Důvodem je především krátká doba bakteriémie (Skotarczak 2003; Khatat et al. 2021).

4.3.3 Klíšťová encefalitida

Klíšťová encefalitida (TBE), onemocnění způsobené virem klíšťové encefalitidy (TBEV), představuje závažnou nervovou infekci lidí i zvířat v Evropě a Asii. Virus patří do rodu Flavivirus. Hlavními rezervoáry jsou klíšťata, hlodavci a hmyzožravci. Virem se mohou nakazit i psi a kočky u nichž se infekce může projevit klinickými příznaky podobnými těm, které jsou pozorovány u závažných případů u lidí.

Stejně jako u jiných obratlovců přenášejí klíšťovou encefalitidu na psy infikovaná klíšťata, která se živí na svých hostitelích. Podobné projevy jako u lidí se mohou vyskytovat i u psů v případě rozvoje závažného onemocnění, které má často těžký průběh, někdy i se smrtelným koncem. Délka inkubační doby klíšťové encefalitidy u psů se odhaduje na 1 až 2 týdny. Mezi běžné projevy TBE u psů patří: zvýšená teplota a změny v chování zvířat, jako je odmítání potravy, zvýšená agresivita, plachost a apatie. U nemocných zvířat se často vyskytují poruchy pohybového aparátu, přičemž nejčastější jsou abnormality pohybu předních a zadních končetin. Jako neurologické poruchy se objevují například: parézy předních nebo zadních končetin, kvadruplegie, záchvaty, křeče nebo ataxie. Všechny tyto projevy svědčí o závažném neurologickém poškození mozečku a mozkového kmene.

Infekce se však klinicky projeví pouze u malé části infikovaných psů a závažné projevy se vyskytují pouze ve vzácných případech. Přesto by se na toto onemocnění mělo myslet u psů s neurologickými poruchami nebo abnormálními změnami chování.

Diagnostika TBE se opírá o sérologickou detekci specifických protilátek pomocí metody ELISA. Léčba TBE u psů je výhradně symptomatická. Doba rekonvalescence se u většiny případů TBE u psů pohybuje od 6 do 12 měsíců (Pfeffer & Dobler 2011).

Preventivní opatření k zamezení infekce TBEV u psů spočívají především v omezení napadení infikovanými klíšťaty. Na srst zvířat lze aplikovat přípravky s dlouhodobými repelentními a akaricidními účinky (Dryden 2009). Dlouhodobá aplikace repelentů se doporučuje především v oblastech s endemickým výskytem klíšťat, kde přínos jejich použití výrazně převažuje nad jejich možnými nepříznivými účinky. V současnosti dostupné vakcíny proti klíšťové encefalitidě používané v Evropě jsou licencovány pouze pro humánní použití (Salát & Ruzek 2020).

4.3.4 Babesióza

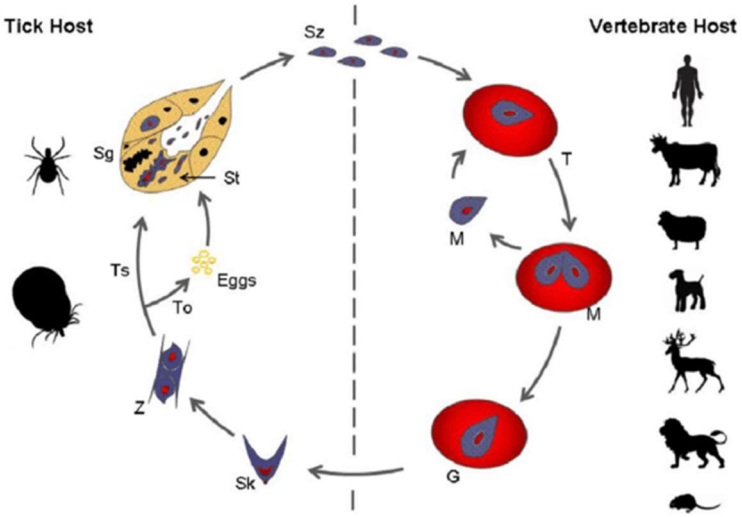
Jedná se o zoonotické onemocnění, které je způsobené krevními parazity. Tito parazité napadají červené krvinky (erytrocyty) a způsobují hemolytickou anémii. Původcem onemocnění je *Babesia canis*. Parazit, který se vyskytuje v Evropě, Americe a Africe. Geografické rozšíření závisí na vektorech, kterými jsou klíšťata. Hostiteli jsou především psi a ostatní zástupci čeledi *Canidae.* Merozoiti se množí v hostitelském erytrocytu, který po určité době praskne. Merozoti se poté uvolní a začnou napadat další buňky.

K pohlavnímu množení dochází uvnitř vektora, který nasaje infikovanou krev. Při přisátí na daného hostitele se parazité dostávají do slinných žláz vektora a následně do krve zvířete. Pokud infikovanou krev nasaje samička, pronikají prvotní stádia parazita do ovárií a zde vytvoří

drobná zakulacená stádia. Další vývoj probíhá v nymfálním stádiu a dospělcích. Vysoká produktivita vajíček klíšťaty napomáhá k rychlému šíření babesií. Přenos babesií je také možný mezi jednotlivými vývojovými stádii, z nymfy na dospělce. Jedná se tak o transstadiální přenos. Vektorem babeziózy u psů v České republice je především piják lužní (*Dermacentor reticulatus)*, ale také *Ixodes ricinus* může být vektorem. Babesie lze potvrdit pomocí krevního stěru.

Při akutních případech bývá prvním příznakem vysoká horečka a apatie. Postupně dochází k vyvinutí ikteru a anémie. Onemocnění může končit letálně. V případě chronického onemocnění psi celkově chřadnou a slábnou. Projevy nejsou tak výrazné, jako v akutních případech. Mozková forma babeziózy připomíná svými příznaky vzteklinu. I tato forma může pro psy končit letálně. V případě akutních příznaků se podává imidokarb a při včasném rozpoznání je prognóza příznivá.

Uzdravená zvířata získávají preimunitu. Parazité přežívají v hostiteli, při reinfekci může propuknout babezióza znovu. Pokud k reinfekci nedojde, zhruba po roce parazit spontánně hyne. Jako prevence slouží ochrana proti klíšťatům v podobě pipet spot-on, spreje nebo ve formě obojku. Možná je také vakcinace (Svobodová et al. 2013).



Obr. 4: Životní cyklus Babesie.
Převzato z: https://www.researchgate.net/figure/Generic-life-cycle-of-Babesia-spp-Babesia-sporozoites-Sz-are-injected-into-the_fig1_230632207

4.4 *Ochrana proti klíšťatům u zvířat*

Ektoparazitičtí členovci představují významnou skupinu organismů ve veterinární medicíně. Klíšťata a blechy jsou nejčastějšími ektoparazity domácích zvířat, kteří mohou přímo nebo nepřímo ovlivnit zdraví a zároveň jsou schopni přenášet patogeny, z nichž jsou některé zoonotické (Otrano et al. 2009). Nejčastěji se jako ochrana proti klíšťatům používají akaricidy. V závislosti na složení použité látky lze dosáhnout následujících účinků: přerušení kontaktu mezi parazitem a hostitelem, ochrana před přisátím nebo úhyn parazita. Přípravky proti

klíšťatům u psů by měly mít alespoň 90% účinnost, vyznačující se snížením počtu klíšťat 48 hodin po ošetření (Halos et al. 2012).

K nahrazování syntetických insekticidů dochází zejména kvůli rezistenci ektoparazitů na dané látky a zároveň se u některých látek (organochlory, organofosfáty a pyretroidy), vyskytly vedlejší účinky na zdraví lidí a životní prostředí. Rezidua syntetických insekticidů se hromadí např. ve vodě, potravinách, vzduchu a půdě, díky dlouhodobé aplikaci. Z tohoto důvodu se bioinsekticidy (např. esenciální oleje) objevily jako alternativa k syntetickým insekticidům v zemědělství (Ellse & Wall 2013; Mossa 2016).

4.4.1 Repelence

Jsou definovány dva typy repelence. Prvním typem je *sensu stricto*, aplikovaná látka vyvolává dráždivý účinek při přímém kontaktu, což způsobí vzdálení klíštěte od ošetřeného povrchu/zvířete nebo odpadnutí před přichycením k hostiteli. Účinek je krátkodobý a proměnlivý v závislosti na vývojovém stádiu a druhu klíštěte. Není také možné hodnotit dráždivý účinek již na zvířeti zamořeném klíšťaty, protože v takovém případě jsou klíšťata již pevně přichycena (Halos et al. 2012).

Druhým typem repelence je *sensu lato*, která způsobuje neschopnost klíštěte se přisát nebo dojde k přerušení přisátí. Kontakt s látkou způsobí narušení procesu přisátí klíštěte (tj. inhibici přisátí, stažení ústního ústrojí klíšťaty ve fázi přisávání nebo odpadnutí již přichycených klíšťat) (Dryden et al. 2006).

Většina doposud udělaných výzkumů byla zaměřena na *in-vitro* studie repelence *sensu stricto* (Cetin et al. 2010; Štefanidesová et al. 2017).

4.4.2 Akaricidy

Ochrana před nakažením a přichycením klíštěte z části závisí na použití chemických akaricidů. S používáním akaricidů se ovšem objevila řada nežádoucích účinků, jako je znečištění životního prostředí, možný výskyt reziduí v mase a mléce hospodářských zvířat, poměrně vysoké náklady a rozvoj rezistence na dané akaricidy (díky používání stále stejných látek) (Sonenshine 1993; Kaaya et al. 1996; Castro 1997; Ravindran et al. 2018). Proto se začalo uvažovat o bezpečnějších, ekologičtějších a variabilnějších alternativách. V posledních pár letech se jako slibné prostředky k aplikaci proti klíšťatům jeví použití rostlinných látek (Nwanade et al. 2020).

4.4.2.1 Organofosfáty

Jedná se o látky, které blokují enzymy nacházející se v nervových a svalových synapsích. Dojde ke štěpení neurotransmiteru acetylcholinu na dvě neúčinné části, acetát a cholin. Díky tomu dojde k ukončení nervového přenosu. U parazitů tak dochází ke křečím a následnému úhynu. Nepůsobí pouze proti klíšťatům, ale také proti vším, všenkám a blechám. S menším účinkem působí stejným způsobem také na savce, a proto při špatném dávkování může dojít

k otravě ošetřovaného zvířete. V dnešní době už se používají pouze jako pesticidy v zemědělství, jiné využití je v Evropské unii zakázáno (Svobodová et al. 2013).

4.4.2.2 Fipronil

Jedná se o látku, která blokuje pre- a postsynaptický přenos chloridových iontů přes buněčné membrány parazitů. Dochází tak k nekoordinované činnosti centrální nervové soustavy a následnému uhynutí parazita. Klíšťata obvykle po kontaktu s fiprinolem umírají do 48 hodin. Negativně působí na slinné žlázy klíšťat, což znemožňuje sání na zvířeti. U samic klíšťat dochází k reprodukční toxicitě (na oocytech se objevily ireverzibilní změny). Účinná látka proniká do svrchních vrstev kůže zvířete, kumuluje se v chlupových folikulech a tukové složce, uvolňuje se tak na kůži a srst a je tak zaručena dlouho přetrvávající účinnost. Do nižších vrstev kůže se tato látka nevstřebává. Velmi dlouho fipronil přetrvává na kůži (průměrně 52 dní) (Svobodová et al. 2013).

4.4.3 Pyrethriny a pyrethroidy

Pyrethriny patří mezi insekticidy obsažené v květech kopretin a používaly se jako insekticidy od 19. století. V dnešní době se používají syntetické pyrethroidy. Tyto látky ovlivňují repolarizaci a depolarizaci sodných kanálů a díky tomu dochází k okamžité paralýze a následnému úhynu parazita. Jsou účinné proti hmyzu sajícímu krev a mají také repelentní účinky, které snižují, ale neeliminují riziko přenosu transmisivních onemocnění (Svobodová et al. 2013).

4.4.4 Repelenty

Repelenty proti členovcům jsou definovány jako chemické látky, které způsobí, že se členovec začne pohybovat směrem od zdroje aplikované látky (Dethier et al. 1960).

Ideální repelent by měl poskytovat ochranu proti širokému spektru členovců, kteří se živí krví, po dobu alespoň 8 hodin. Dále by měl být netoxický, nedráždivý, bez zápachu a neměl by být mastný (Fradin 1998).

Podle pokynů EMA (European Medicine Agency) repelentní účinek znamená, že se na zvíře nepřichytí žádná klíšťata a ta, která jsou již na zvířeti (přisátá nebo nepřisátá) brzy po ošetření hostitele opustí. Obecně platí, že by 24 hodin po podání přípravku neměla být na zvířeti klíšťata detekována (Halos et al. 2012).

4.4.4.1 Moderní syntetické a rostlinné repelenty

K dispozici je řada komerčních repelentů proti klíšťatům, včetně syntetických a rostlinných sloučenin. Mezi nejčastěji používané syntetické látky k výrobě repelentů můžeme zařadit deet (N,N-diethyl-3-methylbenzamid), IR3535 (ethyl aminoproprionate) nebo picaridin.

Nejčastěji používaný přírodní derivát je z rostliny *Eucalyptus citriodora* (para-menthan-3,8-diol) (Abdel-Ghaffar et al. 2015; Benelli et al. 2016).

Deet

Deet (N, N-diethyl-3-methylbenzamide) je již více než pět desetiletí nejrozšířenějším repelentem proti členovcům a je dostupný v široké škále koncentrací a produktů, které mohou být aplikovány na pokožku či oděv (Frances 2007). Poprvé byl registrován jako repelent v roce 1957. Je aktivní složkou většiny komerčně dostupných repelentů proti klíšťatům, které se dnes používají na lidskou kůži, v repelentech pro psy a je účinný proti několika druhům klíšťat (Kulkarni & Naik 1985). Není ovšem účinný na všechny druhy klíšťat, například proti *A. hebraeum* není schopný poskytnout dlouhodobou ochranu ani při poměrně vysokých koncentracích (Jensenius et al. 2005). Bohužel má řadu nežádoucích účinků, jako jsou: toxicita a dráždivost (Iyigundongdu et al. 2019). Kromě toho bylo zaznamenáno i poškození centrálního nervového systému, zejména u dětí (Frances 2007). Mezi další známé komplikace spojené s vystavením se deetu, patří také kardiovaskulární a dermatologické reakce (Stajković & Milutinović 2013).

IR3535

Byl vyvinut v 70. letech v Evropě jako bezpečnější varianta repelentu, než je deet. Způsobuje menší podráždění sliznic a jeho akutní orální a dermální toxicita je znatelně lepší. Také neexistují žádné předchozí zprávy o jakýchkoliv vážných nežádoucích účincích (Iyigundongdu et al. 2019).

Picaridin

Picaridin je jednou z dalších alternativ deetu a představuje oproti němu několik výhod. Nepoškozuje a neleptá plasty, nezanechává zápach a není mastný ani lepivý (Katz et al. 2008). Podobně působí i při aplikaci na látku, kůži nebo srst zvířat. Je možné ho tak využít pro lidi i domácí zvířata (Abdel – Ghaffar et al. 2015). Ve 20% koncentraci zajišťuje delší dobu účinku proti klíšťatům ve srovnání s deetem (Frances 2007). Toxicita, která by měla vliv na vnitřní orgány, reprodukci nebo způsobovala dermatitidu, nebyla prokázána (Diaz 2016).

Repelenty s výtažky z rostlin

Naprostá většina látek, které byly testovány na repelenci proti klíšťatům, byly terpenoidy. Řada rostlin a esenciálních olejů také vykazuje repelentní vlastnosti proti hematofágním členovcům včetně klíšťat (Brooke et al. 2009). Z přehledu publikovaných studií vyplývá, že nejčastěji byly používány k testování repelence rostlinné látky z řádu *Lamiaceae* (hluchavkovití) (Tariq et al. 2016).

Terpenoidy

Terpenoidy jsou metabolity rostlin, které se podílejí na obraně proti členovcům a patogenům (Kappers et al. 2008). Dautel et al. (1999) ve svém výzkumu zjistili, že nymfy *I. ricinus* strávily podstatně méně času na filtračním papíře ošetřeném myrtenalem (bicyklický

terpen), který je obsažen v řadě rostlin jako např. v mátě peprné (*Mentha piperita*) nebo meduňce lékařské (*Melissa officinalis*) oproti neošetřenému.

Esenciální oleje

Esenciální oleje rostlinného původu jsou směsi přibližně 20 - 80 různých metabolitů rostlin. Tyto metabolity většinou obsahují dvě až tři hlavní terpenové nebo terpenoidní složky, které tvoří až 30 % oleje (Bakkali et al. 2008). Jsou lipofilní povahy a narušují základní metabolické, biochemické a fyziologické a behaviorální funkce hmyzu (Brattsten 1983). Oproti syntetickým insekticidům, jsou esenciální oleje cenově dostupnější po celém světě (Mossa 2016).

Z hlediska chemického jsou tvořeny uhlovodíky – terpeny a seskviterpeny a okysličenými sloučeninami jako estery, aldehydy, alkoholy, ketony, ethery, laktony, fenolethery a fenoly, které vytváří charakteristický zápach rostlin. Výrazně se oleje mohou lišit ve složení díky různým odrůdám a druhům rostlin, ze kterých jsou získávány a zároveň z hlediska oblasti původu rostliny (Tripathi et al. 2009).

Pokud je rostlina napadena plísní, hmyzem, býložravci nebo mikroorganismy začnou se uvolňovat esenciální oleje, které působí jako ochranné látky. Variabilní složení olejů se odvíjí od klimatických podmínek, ve kterých daná rostlina vyrostla, na půdním složení, věku rostliny a také na části, ze které byl daný olej získán. Z rostlin jsou obvykle extrahovány pomocí parní destilace a lze je získat ze stonků, listů, kořenů, květů a semen (Tripathi et al. 2009; Swany et al. 2016).

Esenciální oleje jsou používané např. jako přírodní pesticidy k hubení hmyzu. Pomáhají snižovat populaci škůdců a zvyšovat produkci potravin. Mají menší dopad na životní prostředí a lidské zdraví než většina syntetických pesticidů. Kromě zemědělství se také využívají ve farmaceutickém průmyslu, kosmetice a parfémech. Esenciální oleje se také používají v potravinářském průmyslu, kde slouží především k ochucení potravin. Díky svým antioxidačním, antinociceptivním, antibakteriálním a antivirovým účinkům se používají také v medicíně (Flanagan 2011). Nyní je známo přibližně 3 000 různých esenciálních olejů a z toho okolo 300 z nich je využíváno v průmyslu (Mossa 2016). Repelentní účinek proti klíšťatům je v současnosti znám pro 51 esenciálních olejů a stejně tak u dalších 39 čistých syntetizovaných látek z éterických olejů (Benelli & Pavela 2018).

Biocidní účinnost vůči hematofágním členovcům vykazují esenciální oleje z rostlin jako například šalvěj lékařská (*Salvia officinalis*), meduňka lékařská (*Melissa officinalis*), smrk ztepilý (*Picea abies*), máta peprná (*Mentha piperita*), skořice (*Cinnamomum*), levandule lékařská (*Lavandula angustifolia*), citrónová tráva (*Cymbopogon citratus*), bazalka pravá (*Ocimum basilicum*) a blahovičník (*Eukalyptus*) (Tripathi et al. 2009).

Esenciální oleje mají několik různých způsobů, jak na členovce působí. Může docházet k inhibici sání nebo syntézy chitinu, snižování růstu, vývoje nebo reprodukce a mohou ovlivňovat také chování klíšťat (Rosado-Aguilar et al. 2017).

Účinnost esenciálních olejů byla prokázána několika různými způsoby. Klíšťata byla ponořena do testovaného roztoku nebo vystavena fyzickému kontaktu s ošetřeným

povrchem. Bylo pozorováno působení výparů z olejů, kdy se ukázalo, že nemusí jít pouze o mechanický účinek, ale může docházet i k neurotoxicitě. Například terpin-4-ol, monoterpenoid, který se ve vysokých koncentracích nachází v tea tree oleji, inhibuje acetylcholinesterázu členovců. Jedná se o enzym, který je nezbytný pro přenos akčních potenciálů (Mills et al. 2004).

Esenciální oleje mají vysoce těkavou povahu a díky tomu se nevyznačují příliš dlouhou dobou repelence (Ellse & Wall 2013). Obecně můžeme říci, že jsou méně účinné a poskytují ochranu před klíšťaty po kratší dobu než například syntetický deet (Moore 2007). V případě použití vyšších koncentrací směsi různých silic se, díky synergickému účinku, může zvýšit repelentní účinnost. U senzitivních jedinců však vysoké koncentrace esenciálních olejů mohou vézt k projevu dermatitid (Barnard 1999).

Před vznikem syntetických repelentů se proti hmyzu běžně využíval esenciální olej z voňatky citrónové (*Cymbopogon citratus*), který se i v současnosti často vyskytuje jako přísada v některých komerčních produktech pro své repelentní účinky proti klíšťatům (Bissinger & Roe 2010). Výtažky a esenciální oleje z ní, jsou známé účinkem například proti nymfám klíšťat *A. cajennense* a *I. ricinus* (Soares et al. 2010).

V případě laboratorního *in-vitro* testu na dospělých samicích *I. ricinus* bylo prokázáno, že esenciální olej z levandule lékařské (*Lavandula angustifolia*) vykazuje zajímavý potenciál jako alternativní repelent pro venkovní, krátkodobé aktivity. Byly také zkoušeny další esenciální oleje, a to eukalyptový a pomerančový. Oba zmíněné oleje však vykazovaly nízkou repelenci. Ačkoliv účinnost všech tří testovaných olejů se v průběhu času snížila, účinek deetu po dobu testování zůstal téměř stejný (Kulma et al. 2017).

Insekticidní vlastnosti esenciálních olejů

Chemické složení esenciálních olejů je lipofilní povahy. Mohou způsobit biochemickou dysfunkci a následně smrt. Toxicita olejů nezávisí pouze na chemických sloučeninách, které působí jako toxiny, ale také na místě vstupu toxinu do těla, molekulové hmotnosti a mechanismu účinku. Do těla hmyzu se mohou dostat vdechnutím, požitím či absorpcí skrz pokožku (Mossa 2016). Díky mechanickému účinku na parazita, jako je např. narušení kutikulárních vosků, může dojít u hmyzu k smrti udušením (Burgess 2009).

Mechanismus účinku esenciálních olejů

Ukazuje se však, že aktivita esenciálních olejů jako insekticidů spočívá v působení jejich účinku na nervový systém hmyzu. Jeho narušení má za následek zastavení činnosti nervové soustavy. Receptor pro oktopamin nebyl u obratlovců nalezen. Proto mají esenciální oleje jako bioinsekticidy selektivní toxicitu pro savce. Pokud jde o anticholinesterázový účinek esenciálních olejů, mechanismus neurotoxického působení a symptomy jsou podobné těm, které vyvolávají organofosfátové a karbamátové insekticidy. Příznaky se projevují hyperaktivitou, křečemi, třesem a následně paralýzou (Mossa 2016).

4.4.4.2 Synergický efekt

Synergismus lze popsat jako účinek interakce biologických struktur nebo chemických látek, což vede k celkovému účinku, který je vyšší než součet jednotlivých účinků.

Synergický efekt byl pozorován také u složek esenciálních olejů. Například thymol a karvakrol v kombinaci s dalšími složkami esenciálního oleje vykazovaly zvýšený antibakteriální účinek. K ověření hypotézy, že u složek esenciálních olejů může docházet k synergickým účinkům, byly připraveny binární směsi 1:1 řady složek obsažených v esenciálních olejích a testovány na cytotoxickou aktivitu. Ve většině případů došlo ke zvýšení aktivity. To znamená, že cytotoxická aktivita směsi je vyšší, než by se dalo očekávat, pokud by aktivity obou látek byly aditivní (Wright et al. 2007).

Repelentní účinnost olejů je obvykle přičítána konkrétním sloučeninám, k vyšší biologické aktivitě může vést synergický jev mezi danými metabolity, ve srovnání s jednotlivými oleji (Gillij et al. 2008). Tyto synergické účinky esenciálních olejů byly účinně testovány proti komárům (Reegan et al. 2014). Štefanidesová (2017) ve své studii toto tvrzení vyzkoušela. Testovány byly dvě směsi, které obsahovaly vždy dva esenciální oleje. Výsledky ukázaly, že směsi esenciálních olejů jako repelentů byly účinnější, oproti použití oleje samostatně. Omolo et al. (2004) ve své studii naopak došli k závěru, že při testování směsi éterických olejů se výrazně snížila repelentní aktivita, což naznačuje, že i minoritní složky obsažené v repelentech jsou velice důležité v celkovém složení repelentu a jeho repelentní aktivity.

4.4.5 Studie zabývající se testováním esenciálních olejů na psech

4.4.5.1 In-vitro

Goode et al. (2018) zkoumali *in-vitro* schopnost řady esenciálních olejů nebo aktivních složek komerčně dostupných repelentů zamezit orientaci a pohybu klíštěte *I. ricinus* vůči kožnímu mazu extrahovanému ze psích chlupů. K testování látek byl využit filtrační papír, který byl ošetřen danou látkou, klíště na něj bylo přiloženo a pozorováno. Byly pozorovány značné rozdíly mezi oleji, ale kurkumový olej byl schopen zabránit pohybu klíšťat a měl delší zbytkovou aktivitu než jiné oleje.

Oleje v této studii byly vybrány na základě předchozích výzkumů o biologické aktivitě. Byly použity oleje z pelargónie vonné (*Pelargonium gravolens*), zázvoru lékařského (*Zingiber officinale*), grapefruitu (*Citrus paradisi*), levandule lékařské (*Lavendula angustifolia*), pomeranče (*Citrus sinensis*), máty rolní (*Mentha arvensis*), tymiánu obecného (*Thymus vulgaris*) a z kořene kurkumy (*Curcuma longa*). Oleje byly nejprve testovány v 5% koncentraci.

Jako atraktant byl použit mazový sekret extrahovaný z psích chlupů získaných od anglického špringršpaněla. Chlupy byly nasekány a umístěny do 50 ml roztoku methanolu a kontinuálně míchány po dobu 10 minut. Kádinka se poté nechala v místnosti o teplotě zhruba 21 °C po dobu 48 hodin. Poté byla zbývající kapalina přeceděna přes síto. Suspenze mazu byla rozdělena a skladována při teplotě -20 °C až do doby použití. Ethanol a suspenze olivového oleje byly použity jako negativní kontroly. Deet (N,N-diethyl-3-methylbenzamid) a PMD (p-

methan-3,8,-diol) poskytly pozitivní kontroly. Často se tyto složky objevují v repelentech proti hmyzu.

Maz extrahovaný z psích chlupů se ukázal jako silný atraktant. Z výsledků vyplynulo, že kurkumový olej má podobný účinek jako deet a pomerančový olej jako ethanol. Kurkumový olej dosahoval podobného výsledku i po čtyřech hodinách ve srovnání s deetem. Kurkumový olej byl znovu testován také v koncentraci 2,5 % a 1,25 %, aby se ukázala nejmenší účinná koncentrace. Nebyl pozorován žádný významný rozdíl mezi koncentracemi 5 %, 2,5 % a 1,25 %.

4.4.5.2 In-vivo

Pro testování olejů na psech bylo využité stejné prostředí, jako pro sběr nymf do *in- vitro* testování. Podmínkou pro vybrání daného psa do výzkumu bylo, aby měl alespoň jednou za život přisáté klíště a zároveň možnost docházet alespoň třikrát týdně na dané testovací místo v parku po dobu čtyř týdnů. Díky tomu byli psi vystaveni podobné úrovni rizika napadení klíštětem (Jennett et al. 2013).

Psi byli náhodně rozděleni do tří skupin. V každé skupině bylo 30 psů. Ošetření psa probíhalo vždy před vycházkou, a to zejména v oblasti končetin a břicha.

Dvě skupiny psů byly ošetřeny přípravkem a jedna, kontrolní, byla bez ošetření. Použily se dva typy esenciálních olejů, kurkumový a pomerančový. Oba oleje v koncentraci 2,5 %, byly zředěné ve vodě s 1% kokosovým glukosidovým excipientem a namíchány jednotlivě do 200 ml hliníkových lahviček s rozprašovačem. Pomerančový olej byl použit jako negativní kontrola, aby se vyvrátila možnost hydrofobní povahy olejů.

Výsledky ukázaly, že v oblastech ošetřených kurkumovým olejem se nacházela klíšťata pouze v 15 % ve srovnání s pomerančovým olejem, kde klíšťata byla u 85 % psů. V případě kontrolní skupiny byla klíšťata nalezena v 73 %.

5 Metodika

5.1 *Klíšťata*

5.1.1 Lokalita sběru klíšťat

Klíšťata, která byla předmětem testování na účinnost směsi esenciálních olejů, byla sesbírána v Praze v Klánovickém lese. Samotný sběr probíhal v období od poloviny května do prvního týdne měsíce října roku 2020. Konkrétní sběrná místa byla vybírána dle znalostí bionomie klíštěte obecného. Prvotní sběr byl proveden na nesečené trávě (50.0829N, 14.6598E) a později (při znepřístupnění dané lokality), bylo pokračováno na místech opadaného listí a jehličí v blízkosti krmelce pro lesní zvěř (50.0813N, 14.6584E) (viz Obr. 5).

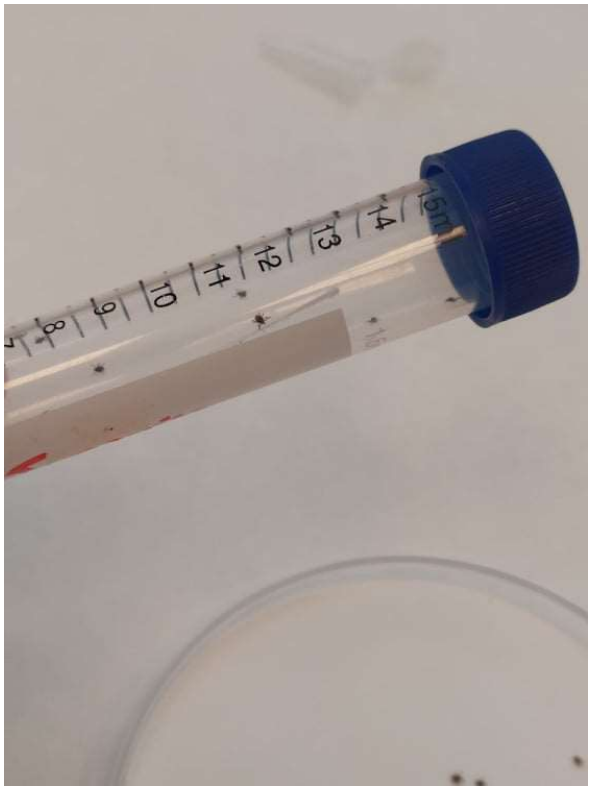
Obr. 5: Druhá z lokalit pro sběr nymf v Klánovickém lese (Autorka práce)

5.1.2 Klíšťata

Ke sběru klíšťat docházelo v podvečerních hodinách (16 – 20 h), výjimečně v dopoledních hodinách (9 – 11 h) dle denní teploty a počasí. Sběr byl prováděn metodou vlajkování, kdy byla použita vlajka z fleecového materiálu bílé barvy, která byla navlečena na dřevěnou tyč a pomalu vlečena po zvoleném prostředí. Bílá barva je zvolena z důvodu dobré viditelnosti jedinců (kontrast barev) a snadnějšímu rozpoznávání.

Předmětem sběru byly nymfy klíštěte, kterých se během jednoho sběru obvykle podařilo nasbírat sto až dvě stě padesát kusů. Jeden sběr trval přibližně hodinu a půl až tři hodiny. Nymfy byly z vlajky sebrány pomocí entomologické pinzety a vloženy do centrifugační plastové zkumavky s připraveným listem nebo stébly trávy pro udržení vlhkosti a předejití tak mortalitě

klíšťat z důvodu vyschnutí. Do jedné zkumavky bylo vloženo maximálně padesát nymf. Zkumavky byly o velikosti 15 nebo 50 ml, uzavřeny neprodyšným víčkem (viz Obr. 6)



Obr. 6: Klíšťata připravená k testování po převozu do laboratoře (Autorka práce)

Protože se sběr obvykle uskutečňoval v podvečerních hodinách a k testování v laboratoři docházelo až druhý den ráno, byla klíšťata přes noc uchovávána ve zkumavkách a vložena do krabičky s vlhkou vatou a ponechány v pokojové teplotě.

Po přivezení nymf do laboratoře jim byla ze zkumavek odstraněna rostlinná složka a nahrazena proužkem filtračního papíru. Nepropustná víčka zkumavek byla vyměněna za víčka s pěti až šesti otvory, která sloužila pro přístup vzduchu a vlhkosti. Mezi víčkem a hrdlem zkumavky byla umístěna neprostupná síťovina. Nymfy byly následně uloženy do exsikátoru, tlustostěnné dvoudílné nádoby o průměru 30 cm. Ve spodní části, pod perforovanou deskou, se nacházela Petriho miska s navlhčenou vatou, která udržuje relativní vlhkost 95 ± 5 % a teplotu 26 ± 1°C.

K testování bylo použito celkem 2 100 nymf klíštěte *Ixodes ricinus*.

5.2 *Esenciální oleje*

Pro testování byly použity esenciální oleje ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*). Esenciální oleje byly získány z komerčních zdrojů (Roni Epam s.r.o., Praha) v 10 ml lahvičkách a skladovány při 5 °C v lednici v Národní referenční laboratoři pro dezinsekci a deratizaci ve Státním zdravotním ústavu (SZÚ). Oleje byly naředěny lihem do koncentrací 5, 10, 15 a 20 %. Poměr esenciálních olejů ve směsi byl 1:1, 1:2 a 2:1 a tyto poměry byly využity ve všech testovaných koncentracích. Pro kontrolu účinnosti olejů a zjištění případného synergického účinku byl použit syntetický repelent (deet), který je jednou z hlavních účinných složek psích repelentů. Byl použit v koncentraci 5 % a 20 %.

5.3 *In – vitro test*

5.3.1 Příprava před testováním

Před každým testováním byly nymfy vyjmuty z exsikátoru a rozděleny po pěti jedincích do mikrozkumavek o velikosti 1,5 ml. Celkem bylo připraveno šest mikrozkumavek s celkovým počtem třiceti jedinců, a to maximálně jednu hodinu před samotným testováním. Pro zachování vlhkosti byla použita rostlinná složka (viz Obr. 7).

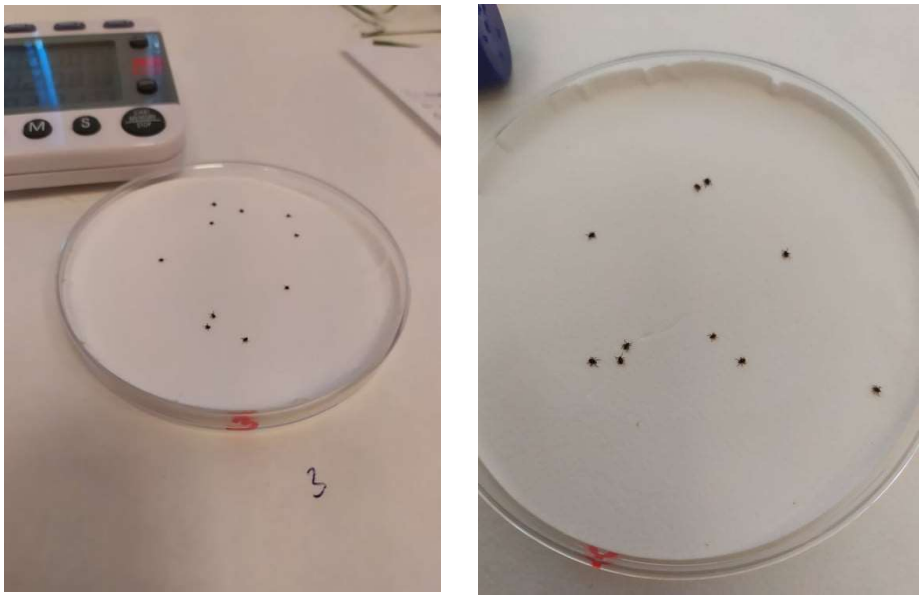
Obr. 7: Nymfy v mikrozkumavkách připravené na testování na Petriho miskách (Autorka práce)

Následně byl připraven roztok s esenciálním olejem nebo deetem v požadované koncentraci. Roztok byl naředěn do 10 ml skleněné lahvičky a utěsněn alobalovým víčkem, které sloužilo jako ochrana před vypařováním (viz Obr. 8).

Obr. 8: Naředěný roztok pro aplikaci na Petriho misky (Autorka práce)

Pro samotný *in–vitro* test esenciálních olejů byly použity čtyři Petriho misky (tři experimentální + jedna kontrolní) s průměrem 9 cm, přičemž pro následnou snadnější identifikaci byly misky vždy označeny číslem (viz Obr. 9a a 9b). Do každé misky byly vloženy tři vrstvy filtračního papíru Whatman (GE Healthcare, USA).

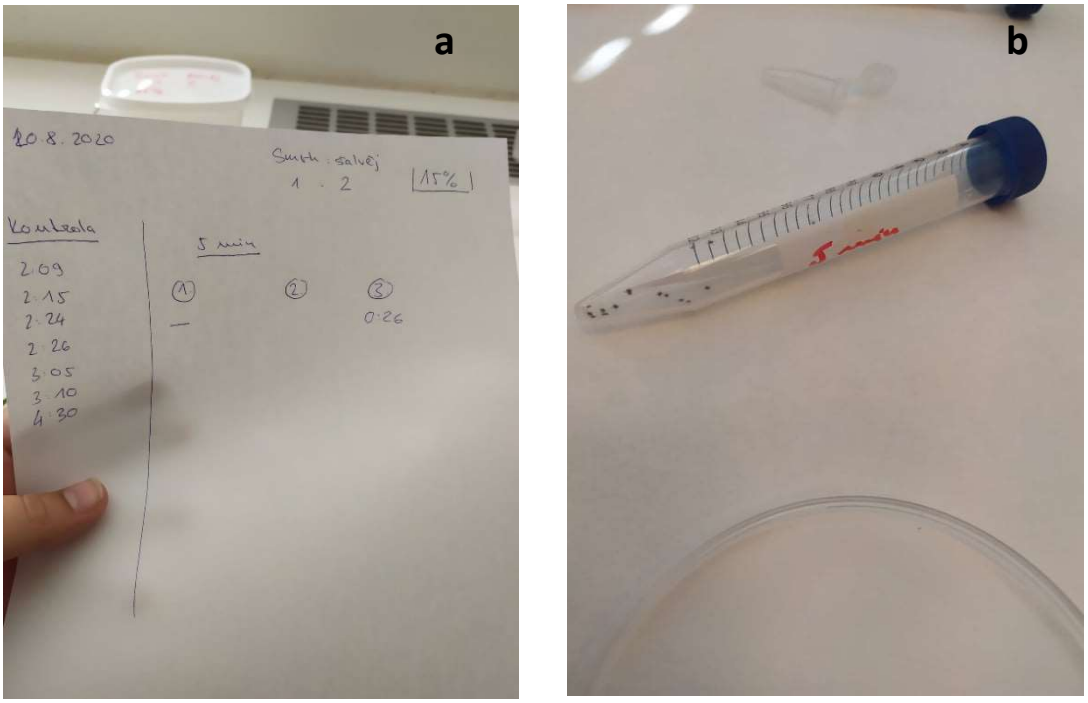
Dále byla připravena zkumavka pro klíšťata, která překonala filtrační papír napuštěný testovaným roztokem. K měření požadovaného času byly použity minutkové hodiny.



Obr. 9a a 9b: Označená Petriho miska s testovanými nymfami a minutkovými hodinami. Na druhé fotografii vidíme nymfy během pokusu na ošetřené Petriho misce (Autorka práce)

5.3.2 Průběh testování

Testování bylo provedeno v sedmi časových úsecích (5 min, 30 min, 60 min, 2 hod, 4 hod, 6 hod a 8 hod po aplikaci roztoku). Připravený roztok byl pomocí pipety nanesen na okraj filtračního papíru kolem vnitřního okraje Petriho misky v množství 0,5 ml. Kontrolní miska byla ošetřena ethanolem ve stejném množství, pro vyloučení vlivu rozpouštědla na repelentní účinek. Pro každé testování bylo použito deset nymf, které byly pomocí pinzety umístěny doprostřed Petriho misky. Vždy, když klíště roztok přelezlo, byl zaznamenán konkrétní čas a klíště bylo umístěno do zkumavky (viz Obr. 10a). Před prvním testováním byly nymfy umístěny do kontrolní misky a byly pozorovány po dobu pěti minut. Při kontrolním testování nymfy vždy přelezly ethanolovou bariéru. Po kontrole bylo do každé ošetřené misky vloženo pinzetou deset nymf a po dobu pěti minut bylo odečítáno množství jedinců, kteří tuto bariéru byli schopni překonat. Za překonání bylo považováno opuštění Petriho misky nebo pohyb po ošetřené části filtračního papíru delším než jedna minuta. V případě, že nymfa nebyla dostatečně aktivní, byla vyměněna za novou. Pro každý ze stanovených časů byly provedena tři opakování vždy s deseti nymfami v jedné Petriho misce. Jednotlivé nymfy byly použity pouze jednou pro daný čas a poté uloženy do zkumavky s konkrétním časem pro pozdější pozorování (viz Obr. 10b).



Obr. 10a a 10b: Zaznamenávání klíšťat, při testování na kontrolní Petriho misce a při 5minutovém testování na 15% koncentraci smrku a šalvěje v poměru 1:2. Na druhé fotografii vidíme zkumavku pro klíšťata, která během pětiminutového intervalu překonala Petriho misku s aplikovaným roztokem (Autorka práce)

5.3.3 Ukončení testování

Pokus byl ukončen po osmi hodinách nebo v případě, že repelentní účinnost připraveného roztoku byla nižší než 33,3 %. Všechny testované nymfy byly uloženy ve zkumavce s příslušným časem, a umístěny do krabičky s připravenou navlhčenou vatou. Po dvaceti čtyřech hodinách od zahájení testování byly tyto nymfy zkontrolovány a byla zaznamenána jejich případná mortalita. Dle ECHA (2018) nesmí být mortalita klíšťat vyšší než 10 %, aby přípravek odpovídal definici repelentu. Úmrtnost nymf mimo přirozené prostředí výskytu je vyšší, a zároveň se také zvyšuje při manipulaci, testování a obecně při vystavování stresu. Při vyhodnocování se na tyto faktory musel brát zřetel. Při přesáhnutí 10% úmrtnosti bylo nutné celý test zopakovat. Následně byla po ukončení testu klíšťata usmrcena mrazem při -30 °C a darována Národní referenční laboratoři pro Lymeskou boreliózu pro další analýzy.

5.4 *Vyhodnocení dat*

Repelentní účinnost byla vypočítána pomocí aritmetického průměru tří opakování pokusu. Výsledné hodnoty byly zaokrouhlené na jedno desetinné místo. Ke statistickému vyhodnocování byl použit program Statistica (StatSoft, Praha) za použití vícefaktorové Anovy a post-hoc Turkeyeho testu. Za účelem zjištění synergického efektu byla získaná data porovnána s daty paralelního pokusu provedeného identickou metodikou, ovšem s nesmíchanými esenciálními oleji (DP Jesiky Kinterové).

6 Výsledky

6.1 *Tabulky pro potvrzení synergického efektu*

Tabulka č. 1: Porovnání účinnosti 5% a 20% deetu v čase.

DEET	Koncentrace	Účinnost v čase (%)						
		5 min	30 min	60 min	120 min	240 min	360 min	480 min
	5%	100,0	100,0	96,7	83,3	80,0	80,0	76,7
	20%	100,0	100,0	100,0	96,7	96,7	86,7	80,0

Tabulka č. 2: Porovnání repelentní účinnosti v čase u roztoku z esenciálního oleje ze smrku ztepilého (převzato z práce Jesiky Kinterové).

Smrk	Koncentrace	Účinnost v čase (%)						
		5 min	30 min	60 min	120 min	240 min	360 min	480 min
	5%	76,7	30,0	3,3				
	10%	90,0	93,3	76,7	30,0			
	15%	86,7	90,0	86,7	53,3	43,3	20,0	
	20%	86,7	86,7	80,0	60,0	60,0	43,3	16,7

Tabulka č. 3: Porovnání repelentní účinnosti v čase u roztoku z esenciálního oleje z šalvěje lékařské (převzato z práce Jesiky Kinterové).

Šalvěj	Koncentrace	Účinnost v čase (%)						
		5 min	30 min	60 min	120 min	240 min	360 min	480 min
	5%	80,0	66,7	13,3				
	10%	86,7	86,7	63,3	26,7			
	15%	80,0	76,7	70,0	66,7	50,0	50,0	16,7
	20%	83,3	76,7	70,0	66,7	56,7	56,7	26,7

Tabulka č. 4: Porovnání repelentní účinnosti v čase u směsi esenciálních olejů ze smrku a šalvěje v poměru 2:1.

	Koncentrace	Účinnost v čase (%)						
		5 min	30 min	60 min	120 min	240 min	360 min	480 min
Smrk Šalvěj 2:1	5%	93,3	90,0	26,7				
	10%	96,7	93,3	90,0	26,7			
	15%	90,0	86,7	93,3	80,0	36,7	26,7	
	20%	86,7	90,0	83,3	83,3	86,7	86,7	83,3

Tabulka č. 5: Porovnání repelentní účinnosti v čase u směsi esenciálních olejů ze smrku a šalvěje v poměru 1:2.

	Koncentrace	Účinnost v čase (%)						
		5 min	30 min	60 min	120 min	240 min	360 min	480 min
Smrk Šalvěj 1:2	5%	86,7	80,0	76,7	16,7			
	10%	86,7	93,3	86,7	76,7	40,0	30,0	
	15%	93,3	80,0	73,3	80,0	33,3		
	20%	96,7	93,3	90,0	86,7	90,0	83,3	66,7

Tabulka č. 6: Porovnání repelentní účinnosti v čase u směsi esenciálních olejů ze smrku a šalvěje v poměru 1:1.

	Koncentrace	Účinnost v čase (%)						
		5 min	30 min	60 min	120 min	240 min	360 min	480 min
Smrk Šalvěj 1:1	5%	96,7	93,3	66,7	16,7			
	10%	96,7	96,7	90,0	96,7	76,7	33,3	
	15%	90,0	93,3	90,0	80,0	30,0		
	20%	93,3	90,0	93,3	86,7	76,7	66,7	60,0

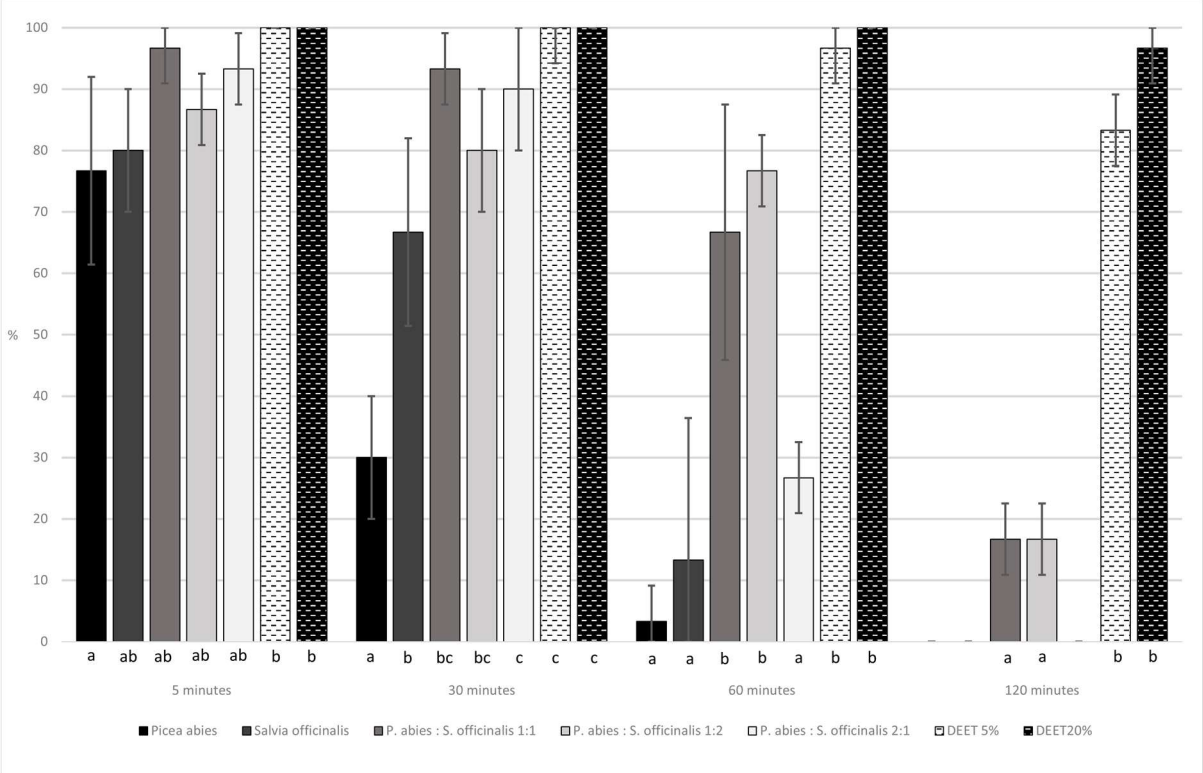
Při porovnání tabulek 2 a 3 s tabulkami 4 – 6 můžeme říci, že mezi esenciálními oleji ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské existuje synergický efekt. Při poměru směsi 2:1 byl synergický efekt pozorován u všech koncentrací s tím, že u 20% koncentrace byl pozorován po celou dobu testování a výrazně se zvýšila repelentní účinnost v porovnání s testováním samostatných olejů. Při poměru 1:2 byl pozorován synergický efekt ve všech koncentracích, kromě 15 %. Zde nebyl synergický efekt téměř pozorován. Nejvýraznější synergický efekt byl opět při 20% koncentraci. U posledního poměru 1:1 byl pozorován synergický efekt u všech koncentrací a stejně jako u předchozích dvou byl nejvýraznější při 20% koncentraci. Můžeme tedy říci, že synergický efekt mezi těmito esenciálními oleji existuje.

6.2 *Statistické vyhodnocení pokusu*

V následujících grafech jsou znázorněné výsledky statistického vyhodnocení pokusu.

6.2.1 5% koncentrace

Při testování 5% koncentrace všech esenciálních olejů byl mezi dobou testování a repelentní účinností zaznamenán statisticky významný rozdíl (viz Obr. 12 a Tabulka č. 7). Při porovnávání jednotlivých esenciálních olejů v 5% koncentraci nebyl statisticky významný rozdíl pozorován mezi esenciálním olejem ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské. Při porovnávání směsi ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 2:1, nebyl statisticky významný rozdíl pozorován pouze se směsí v poměru 1:2. V případě porovnávání směsi v poměru 1:2, nebyl statisticky významný rozdíl pozorován se směsmi v poměrech 2:1 a 1:1. V případě porovnávání deetu, nebyl pozorován statisticky významný rozdíl pouze mezi jeho koncentracemi, 5 % a 20 %. Při porovnávání s esenciálními oleji byl vždy zaznamenán statisticky významný rozdíl (viz Tabulka č. 8).



Obr. 12: Pomocí grafu vyjádřena post-hoc analýza účinnosti testovaných esenciálních olejů při 5% koncentraci. Oleje byly testovány samostatně i ve směsích a porovnány s kontrolním syntetickým repelentem deet a to v 5% a 20% koncentraci. Repelentní účinnost byla zaznamenána do 120 minut po aplikaci. Do této doby byla repelentní účinnost pozorována pouze u dvou směsí ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské, a to v poměrech 1:2 a 1:1. V rámci

připravovaného článku z dostupných výsledků, poskytl graf pan Ing. Martin Kulma, Ph.D., vedoucí této závěrečné práce.

Tabulka č. 7: Vliv doby testování 5% koncentrace všech esenciálních olejů na jejich repelentní účinnost.

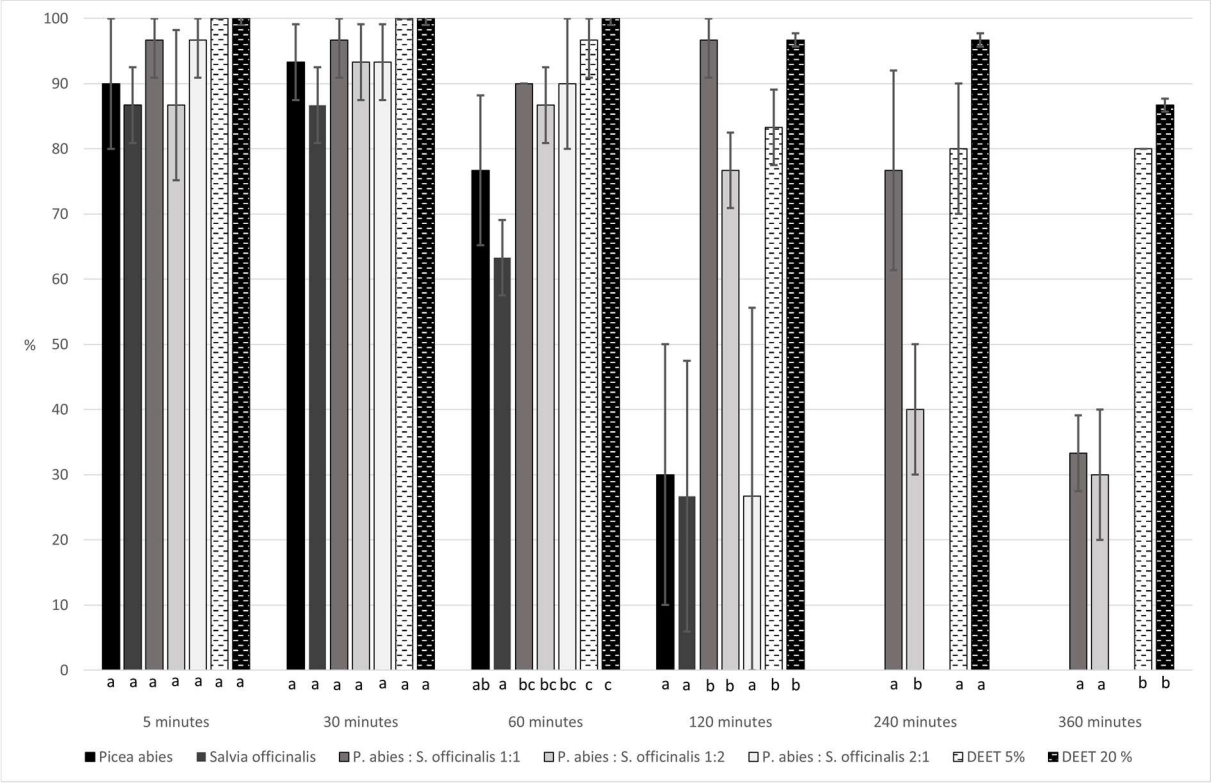
Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná Účinnost (Koncentrace) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 84,545, sv = 55,000				
	Čas	{1} 89,524	{2} 79,524	{3} 57,500	{4} 30,476
1	5		0,004766	0,000161	0,000161
2	30	0,004766		0,000161	0,000161
3	60	0,000161	0,000161		0,000161
4	120	0,000161	0,000161	0,000161	

Tabulka č. 8: Vliv typu esenciálního oleje v 5% koncentraci na jeho repelentní účinnost.

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná Účinnost (Koncentrace) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 84,545, sv = 55,000							
	Roztoky	{1} 30,000	{2} 40,000	{3} 52,500	{4} 63,333	{5} 68,333	{6} 94,167	{7} 99,167
1	smrk ztepilý		0,144411	0,000139	0,000135	0,000135	0,000135	0,000135
2	šalvěj lékařská	0,144411		0,024644	0,000136	0,000135	0,000135	0,000135
3	směs 2:1	0,000139	0,024644		0,076798	0,001810	0,000135	0,000135
4	směs 1:2	0,000135	0,000136	0,076798		0,833974	0,000135	0,000135
5	směs 1:1	0,000135	0,000135	0,001810	0,833974		0,000135	0,000135
6	deet 5%	0,000135	0,000135	0,000135	0,000135	0,000135		0,833974
7	deet 20%	0,000135	0,000135	0,000135	0,000135	0,000135	0,833974	

6.2.2 10% koncentrace

Při testování 10% koncentrace všech esenciálních olejů byl mezi dobou testování a repelentní účinností zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi časy 120 minut, 240 minut a 360 minut od aplikace. Mezi časy 5 minut, 30 minut a 60 minut od aplikace, nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl (viz Obr. 13 a Tabulka č. 9). Při porovnávání jednotlivých esenciálních olejů v 10% koncentraci nebyl statisticky významný rozdíl pozorován mezi esenciálním olejem ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské. Při porovnávání směsi ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 2:1, nebyl statisticky významný rozdíl pozorován při porovnání se samostatnými esenciálními oleji ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské. V případě porovnávání směsi v poměru 1:2, byl statisticky významný rozdíl pozorován se všemi esenciálními oleji. U směsi v poměru 1:1, nebyl statisticky významný rozdíl pozorován při srovnání s 5% koncentrací deetu. V případě porovnávání deetu, nebyl pozorován statisticky významný rozdíl mezi jeho koncentracemi, 5 % a 20 % a směsi v poměru 1:1 (viz Tabulka č. 10).



Obr. 13: Pomocí grafu vyjádřena post-hoc analýza účinnosti testovaných esenciálních olejů při 10% koncentraci. Oleje byly testovány samostatně i ve směsích a porovnány s kontrolním syntetickým repelentem deet a to v 5% a 20% koncentraci. Repelentní účinnost byla zaznamenána do 360 minut po aplikaci. Do této doby byla repelentní účinnost pozorována pouze u dvou směsí ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské, a to v poměrech 1:2 a 1:1. V rámci připravovaného článku z dostupných výsledků, poskytl graf pan Ing. Martin Kulma, Ph.D., vedoucí této závěrečné práce.

Tabulka č. 9: Vliv doby testování 10% koncentrace všech esenciálních olejů na jejich repelentní účinnost.

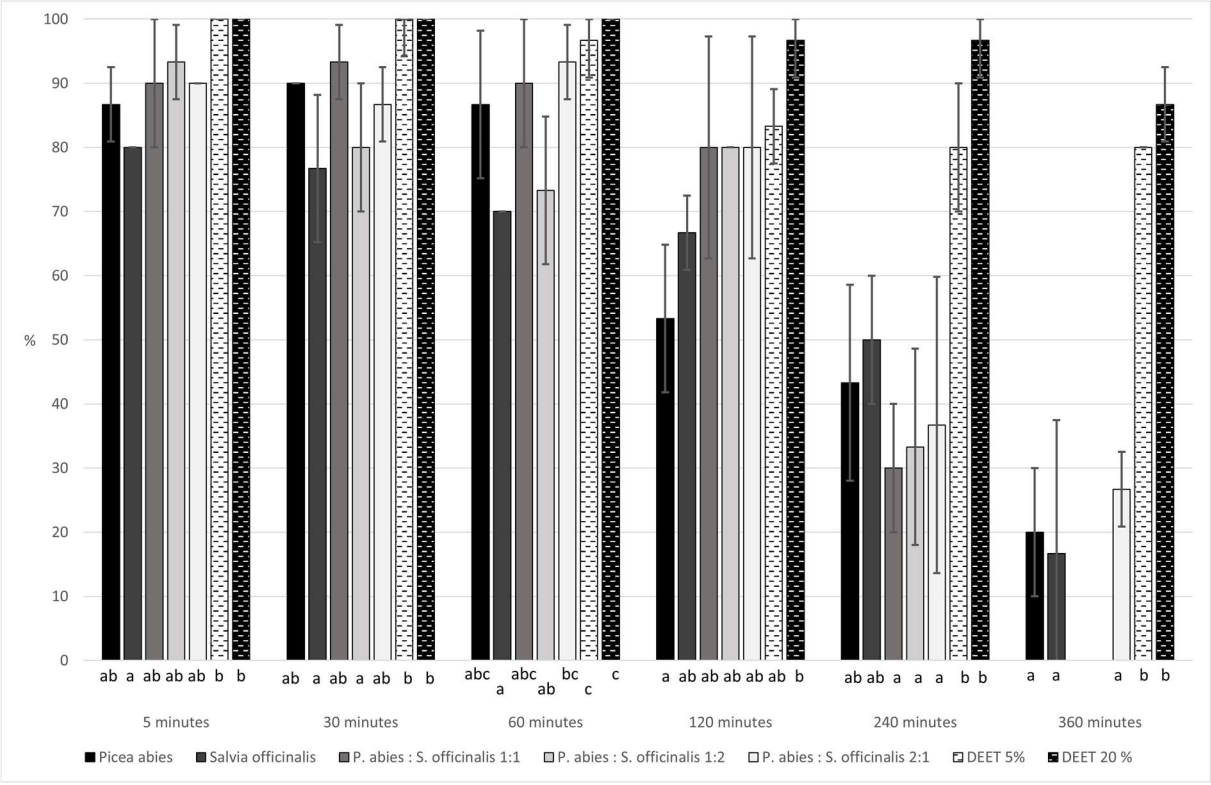
Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná Účinnost (Koncentrace) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 78,571, sv = 84,000						
	Čas	{1} 93,810	{2} 94,286	{3} 86,190	{4} 62,381	{5} 41,905	{6} 32,857
1	5		0,999979	0,069905	0,000124	0,000124	0,000124
2	30	0,999979		0,044767	0,000124	0,000124	0,000124
3	60	0,069905	0,044767		0,000124	0,000124	0,000124
4	120	0,000124	0,000124	0,000124		0,000124	0,000124
5	240	0,000124	0,000124	0,000124	0,000124		0,016964
6	360	0,000124	0,000124	0,000124	0,000124	0,016964	

Tabulka č. 10: Vliv typu esenciálního oleje v 10% koncentraci na jeho repelentní účinnost.

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná Účinnost (Koncentrace) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 78,571, sv = 84,000							
	Roztoky	{1} 48,333	{2} 43,889	{3} 51,111	{4} 68,889	{5} 81,667	{6} 89,444	{7} 96,667
1	smrk ztepilý		0,741597	0,964857	0,000123	0,000123	0,000123	0,000123
2	šalvěj lékařská	0,741597		0,193717	0,000123	0,000123	0,000123	0,000123
3	směs 2:1	0,964857	0,193717		0,000123	0,000123	0,000123	0,000123
4	směs 1:2	0,000123	0,000123	0,000123		0,000913	0,000123	0,000123
5	směs 1:1	0,000123	0,000123	0,000123	0,000913		0,129584	0,000173
6	deet 5%	0,000123	0,000123	0,000123	0,000123	0,129584		0,193717
7	deet 20%	0,000123	0,000123	0,000123	0,000123	0,000173	0,193717	

6.2.3 15% koncentrace

Při testování 15% koncentrace všech esenciálních olejů byl mezi dobou testování a repelentní účinností zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi časy 120 minut, 240 minut a 360 minut od aplikace. Mezi časy 5 minut, 30 minut a 60 minut od aplikace, nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl (viz Obr. 14 a Tabulka č. 11). Při porovnávání jednotlivých esenciálních olejů v 15% koncentraci nebyl statisticky významný rozdíl pozorován mezi esenciálním olejem ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské. Při porovnávání směsí ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské ve všech poměrech, byl statisticky významný rozdíl pozorován pouze při porovnávání se syntetickým deetem v koncentracích 5 % a 20 %. V případě porovnávání deetu, nebyl pozorován statisticky významný rozdíl mezi jeho koncentracemi (viz Tabulka č. 12).



Obr. 14: Pomocí grafu vyjádřena post-hoc analýza účinnosti testovaných esenciálních olejů při 15% koncentraci. Oleje byly testovány samostatně i ve směsích a porovnány s kontrolním syntetickým repelentem deet a to v 5% a 20% koncentraci. Repelentní účinnost byla zaznamenána do 360 minut po aplikaci. Do této doby byla repelentní účinnost pozorována u obou samostatně testovaných esenciálních olejů a u směsi ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské, v poměru 2:1. V rámci připravovaného článku z dostupných výsledků, poskytl graf pan Ing. Martin Kulma, Ph.D., vedoucí této závěrečné práce.

Tabulka č. 11: Vliv doby testování 15% koncentrace všech esenciálních olejů na jejich repelentní účinnost.

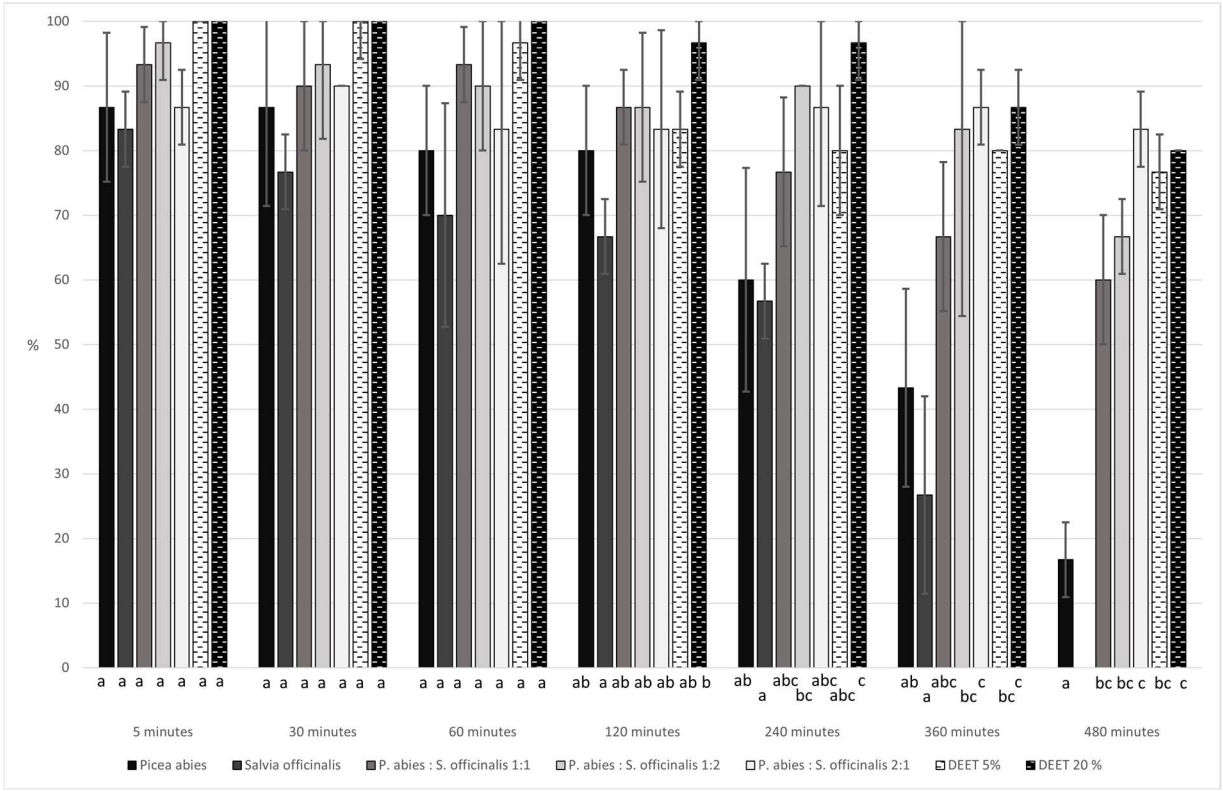
Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná Účinnost (Koncentrace) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 88,095, sv = 84,000						
	Čas	{1} 91,429	{2} 89,048	{3} 87,143	{4} 77,143	{5} 52,857	{6} 32,857
1	5		0,962722	0,678137	0,000175	0,000124	0,000124
2	30	0,962722		0,986038	0,001351	0,000124	0,000124
3	60	0,678137	0,986038		0,011019	0,000124	0,000124
4	120	0,000175	0,001351	0,011019		0,000124	0,000124
5	240	0,000124	0,000124	0,000124	0,000124		0,000124
6	360	0,000124	0,000124	0,000124	0,000124	0,000124	

Tabulka č. 12: Vliv typu esenciálního oleje v 15% koncentraci na jeho repelentní účinnost

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná Účinnost (Koncentrace) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 88,095, sv = 84,000							
	Roztoky	{1} 63,333	{2} 60,000	{3} 68,889	{4} 60,000	{5} 63,889	{6} 89,444	{7} 96,667
1	smrk ztepilý		0,936423	0,567974	0,936423	0,999997	0,000123	0,000123
2	šalvěj lékařská	0,936423		0,079268	1,000000	0,875150	0,000123	0,000123
3	směs 2:1	0,567974	0,079268		0,079268	0,683890	0,000123	0,000123
4	směs 1:2	0,936423	1,000000	0,079268		0,875150	0,000123	0,000123
5	směs 1:1	0,999997	0,875150	0,683890	0,875150		0,000123	0,000123
6	deet 5%	0,000123	0,000123	0,000123	0,000123	0,000123		0,252406
7	deet 20%	0,000123	0,000123	0,000123	0,000123	0,000123	0,252406	

6.2.4 20% koncentrace

Při testování 20% koncentrace všech esenciálních olejů byl mezi dobou testování a repelentní účinností zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi časy 240 minut a 360 minut od aplikace. Mezi časy 5 minut, 30 minut a 60 minut od aplikace, nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl. U času 120 minut byl statisticky významný rozdíl pozorován pouze při srovnání se 360 minutami a 480 minutami (viz Obr. 15 a Tabulka č. 13). Při porovnávání jednotlivých esenciálních olejů v 20% koncentraci byl statisticky významný rozdíl pozorován mezi esenciálním olejem ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské. Při porovnávání směsí ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské ve všech poměrech, byl statisticky významný rozdíl pozorován pouze při porovnávání se samostatnými esenciálními oleji ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské. Při srovnání se syntetickým deetem byl statisticky významný rozdíl pozorován pouze u směsi smrku ztepilého a šalvěje lékařské v poměru 1:1 a 5% koncentrace deetu. V případě porovnávání deetu, nebyl pozorován statisticky významný rozdíl mezi jeho koncentracemi (viz Tabulka č. 14).



Obr. 15: Pomocí grafu vyjádřena post-hoc analýza účinnosti testovaných esenciálních olejů při 20% koncentraci. Oleje byly testovány samostatně i ve směsích a porovnány s kontrolním syntetickým repelentem deet a to v 5% a 20% koncentraci. Repelentní účinnost byla zaznamenána do 480 minut po aplikaci. Do této doby byla repelentní účinnost pozorována u samostatně testovaného esenciálního oleje ze smrku ztepilého a u všech třech směsích ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské. V rámci připravovaného článku z dostupných výsledků, poskytl graf pan Ing. Martin Kulma, Ph.D., vedoucí této závěrečné práce.

Tabulka č. 13: Vliv doby testování 20% koncentrace všech esenciálních olejů na jejich repelentní účinnost.

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná Účinnost (Koncentrace) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 101,36, sv = 98,000							
	Čas	{1} 92,381	{2} 90,476	{3} 87,619	{4} 83,333	{5} 78,095	{6} 67,619	{7} 54,762
1	5		0,996322	0,724606	0,064846	0,000364	0,000120	0,000120
2	30	0,996322		0,968631	0,255149	0,002508	0,000120	0,000120
3	60	0,724606	0,968631		0,811482	0,043175	0,000120	0,000120
4	120	0,064846	0,255149	0,811482		0,627029	0,000166	0,000120
5	240	0,000364	0,002508	0,043175	0,627029		0,017957	0,000120
6	360	0,000120	0,000120	0,000120	0,000166	0,017957		0,001505
7	480	0,000120	0,000120	0,000120	0,000120	0,000120	0,001505	

Tabulka č. 14: Vliv doby testování 20% koncentrace všech esenciálních olejů na jejich repelentní účinnost.

Č. buňky	Tukeyův HSD test; proměnná Účinnost (Koncentrace) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 101,36, sv = 98,000							
	Roztoky	{1} 64,762	{2} 54,286	{3} 85,714	{4} 86,667	{5} 80,952	{6} 87,619	{7} 94,286
1	smrk ztepilý		0,017957	0,000120	0,000120	0,000137	0,000120	0,000120
2	šalvěj lékařská	0,017957		0,000120	0,000120	0,000120	0,000120	0,000120
3	směs 2:1	0,000120	0,000120		0,999936	0,724606	0,996322	0,095001
4	směs 1:2	0,000120	0,000120	0,999936		0,525342	0,999936	0,188753
5	směs 1:1	0,000137	0,000120	0,724606	0,525342		0,334908	0,000914
6	deet 5%	0,000120	0,000120	0,996322	0,999936	0,334908		0,334908
7	deet 20%	0,000120	0,000120	0,095001	0,188753	0,000914	0,334908	

6.3 *Chemické složení esenciálních olejů a jejich směsí*

V tabulce č. 15 je uvedené chemické složení testovaných binárních sloučenin. V šalvějovém oleji je nejvíce zastoupen bergamol (54,5 %) a linalool (25,5 %) a v oleji ze smrku ztepilého nalezneme zastoupený především bornyl acetát (33 %).

Tabulka č. 15: Chemické složení esenciálních olejů ze smrku ztepilého (S) a šalvěje lékařské (Š) a jejích směsích v daných poměrech – výsledky analýzy kapalinovou chromatografií. (Rt = retenční čas). V rámci spolupráce na projektu, poskytl naměřené hodnoty pan Mgr. Václav Ševčík. Podle poměru jednotlivých esencí bylo dopočítáno složení binárních směsí.

		Smrk ztepilý (S)	**Šalvěj lékařská (Š)**	**S:Š, 1:1**	**S:Š, 1:2**	**S:Š, 2:1**
Rt (min)	Sloučenina	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
6,02	Tricyklen	0,40		0,20	0,10	0,30
6,53	α-pinen	23,50		11,75	7,80	15,70
6,94	Kamfen	5,10		2,55	1,70	3,40
7,74	o-Cymen	0,70		0,35	0,20	0,50
7,97	β-pinen	2,50		1,25	0,80	1,70
8,64	Myrcen		0,30	0,15	0,20	0,10
9,34	3-Caren	4,70		2,35	1,60	3,10
9,91	m-Cymen	2,20		1,10	0,70	1,50
10,1	D-limonen	2,50	0,60	1,60	1,20	1,90
12,94	α-pinenoxid	0,30		0,15	0,10	0,20
13,46	Linalool		25,50	12,75	17,00	8,50
13,75	Verbenol	0,20		0,10	0,10	0,10
15,05	Kafr	8,50		4,25	2,80	5,70
15,12	Isopulegol		0,40	0,20	0,30	0,10
16,08	Borneol	4,50		2,25	1,50	3,00
16,97	p-Cymen-8-ol	1,00		0,50	0,30	0,70
17,21	Terpineol	1,10	3,70	2,40	2,80	2,00
17,9	Verbenone	0,60		0,30	0,20	0,40
18,59	Carveol	0,30		0,15	0,10	0,20
18,74	Bornyl-formát	0,70		0,35	0,20	0,50
19,44	Citronellol		3,80	1,90	2,50	1,30
20,51	Bergamol		54,50	27,25	36,30	18,20
20,96	Geranial		0,20	0,10	0,10	0,10
21,16	Citronellyl-formát		0,20	0,10	0,10	0,10

		Smrk ztepilý (S)	**Šalvěj lékařská (Š)**	**S:Š, 1:1**	**S:Š, 1:2**	**S:Š, 2:1**
Rt (min)	Sloučenina	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
21,64	Bornyl-acetát	33,10		16,55	11,00	22,10
24,94	Neryl-acetát	0,20	1,30	0,80	0,90	0,60
25,13	α-Kopeen		0,60	0,30	0,40	0,20
25,46	β-Bourbonen		0,20	0,10	0,10	0,10
25,76	Geranyl-acetát		2,20	1,10	0,70	1,50
26,19	Junipene	0,50		0,25	0,20	0,30
26,53	Methyleugenol	0,30		0,15	0,10	0,20
26,88	Karyofenyl		1,40	0,70	0,90	0,50
29,34	β-Cubebene		0,20	0,10	0,10	0,10
30,23	α-muurolen	0,40		0,20	0,10	0,30
33,22	Karyofylenoxid	1,00	1,10	1,10	1,10	1,00
33,09	Spathulenol		0,40	0,20	0,30	0,10
53,85	Sclareol		0,40	0,20	0,30	0,10
	Celkem identifikované sloučeniny	94,30	97,00	95,70	95,40	95,90
	Součet neidentifikovatelných slouč.	5,70	3,00	4,40	4,60	4,10

7 Diskuze

V rámci této závěrečné práce byly zkoumány tři směsi esenciálních olejů ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) v poměrech 2:1, 1:2 a 1:1. Byla sledována jejich repelentní účinnost proti nymfám klíštěte obecného (*I. ricinus*). Účinek těchto směsí byl testován v laboratoři *in-vitro* metodou v Petriho miskách. Testování probíhalo ve třech opakováních a bylo pozorováno chování nymf *I. ricinus* vůči aplikovanému roztoku na filtračním papíru v Petriho misce. Při vyhodnocování repelentní účinnosti byla počítána klíšťata, která byla schopná během 5minutového intervalu bariéru překonat. Buď souvislým pohybováním se po ní, anebo opuštěním Petriho misky. Testování probíhalo maximálně po dobu 8 hodin nebo při poklesu účinnosti pod 33,3 %. Podle získaných výsledků můžeme říci, že všechny směsi vykazovaly repelentní účinek.

7.1 *Esenciální oleje ze smrku ztepilého a šalvěje lékařské*

Repelentní účinky esenciálních olejů jsou způsobené především monoterpeny (Nerio et al. 2010). Jejich repelentní účinnost je již známá a popsána ve výzkumu Pavela (2014). Tyto monoterpeny se také nacházejí v esenciálních olejích testovaných v této závěrečné práci. Proti nymfám *I. ricinus* zatím nebyly testovány repelentní účinky esenciálního oleje ze šalvěje lékařské.

Schubert et al. (2017) testovali ve své studii sloučeniny s repelentními vlastnostmi vůči klíštěti obecnému (*I. ricinus*), které byly izolovány ze sulfátového terpentýnu sestávajícího se z 80 % ze smrku ztepilého a z 20 % z borovice lesní. Terpentýn byl pomocí destilace rozdělen na části tak, aby vznikla jedna monoterpenová uhlíková a zbylou část tvořili terpenoidy. Monoterpenová část byla dále oxidována za účelem získání okysličených monoterpenů s potenciálními odpuzujícími vlastnostmi proti klíšťatům. Sloučeniny s nejvyššími odpuzujícími vlastnostmi byly identifikovány pomocí plynové chromatografie. Obsahovaly především borneol a směsi 1-terpineolu a terpinen-4-ol. Nymfy byly testovány v lahvičce Falcon™ (odstředivá zkumavka o objemu 50 ml). Na hrdlo lahvičky byla připevněna látka, která byla napuštěna testovací látkou a jako kontrola byl využit aceton. Stěny lahvičky byly perforovány otvory, aby nedocházelo k nasycení vzduchu testovanou látkou, kontrolní látkou nebo pachem experimentátora. Každé testování bylo prováděno ve 20 opakováních. Nanášeno bylo vždy 100 µl testované látky a probíhalo 5 minut. Pokud se klíšťata přichytila na látku, byla zaznamenána jako „přilákána“, klíšťata, která se nepřichytila jako „repelovaná“ a pokud se nacházela pod úrovní 3 cm (celková velikost zkumavky je 11,5 cm), byla označená jako „silně repelovaná“. Látky byly použité v 10% koncentraci a jako nejúčinnější se projevil borneol, mezi dalšími nalezenými látkami byl např. α- a β-pinen. Všechny tyto látky můžeme najít také v testovaném esenciálním oleji ze smrku ztepilého v této závěrečné práci. Ačkoliv se v esenciálním oleji ze smrku ztepilého objevuje především bornyl acetát, z této studie vyplývá, že jako nejúčinnější látka se jeví borneol a v případě testování ve vyšší koncentraci je dle výsledků poměrně stejně stabilní, jako 20% deet, který ve svém výzkumu použili pro srovnání repelentní účinnosti proti klíšťatům obecným.

Esenciální olej ze šalvěje lékařské proti klíštěti obecnému zatím nebyl testován. Tabari et al. (2017) se ve své studii zaměřovali na testování více monoterpenoidů a jedním z nich byl i linalool, který se v šalvěji lékařské nachází. Byl testován na repelentní účinnost proti *I. ricinus* a zároveň také na ovicidní a larvicidní účinky. Výsledky ukázaly, že linalool vykazuje pouze repelentní účinek, a to pouze v 50 % případů v 5% koncentraci. Dále byly testovány koncentrace 0,25; 0,5; 1 a 2 %. V žádné z těchto koncentrací se repelentní účinek neprojevil.

Araújo et al. (2016) ve své studii testovali synergický efekt u monoterpenů thymolu, eugenolu a karvakrolu proti larvám pijáka hnědého (*Rhipicephalus sanguineus*) a pijáka tropického (*Rhipicephalus micropulus*) z čeledi Ixodidae. Thymol můžeme najít např. v tymiánu, karvakrol v dobromysli obecné a eugenol v hřebíčku, skořici nebo bobkovém listu. U všech těchto látek byla již dříve repelentní účinnost prokázána. Při kombinaci těchto tří látek bylo dosaženo synergického efektu proti larvám u obou druhů.

Wright et al. (2007) ve své práci také došli k výsledkům, že karvakrol a thymol společně vytvářejí synergický efekt, ale např. při kombinaci α-pinenu a β-karyofylenu, došlo k antagonickým účinkům. Je tedy důležité kombinovat látky správně tak, aby nedocházelo k jejich vzájemnému vyrušení.

V této práci na synergický efekt nebyly testované konkrétní složky jednotlivých esenciálních olejů, ale při srovnání esenciálních olejů samostatně a ve směsi, pozorujeme synergické účinky ve všech koncentracích. Výrazněji se projevují u vyšších koncentracích, kde významně prodlužují délku účinnosti.

8 Závěr

Výsledky práce prokázaly, že všechny tři testované směsi (poměry 2:1, 1:2, 1:1) ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) vykazují repelentní účinnost proti nymfám klíštěte obecného *I. ricinus*. Při porovnávání jednotlivých směsích mezi sebou, jsou však podstatné rozdíly. Při nižších koncentracích (5 % a 10 %) nebyly směsi příliš účinné. Všechny směsi v 15% koncentraci dosahovaly 80% repelentní účinnost do 120 minut od aplikace, a proto by mohly být vhodnou alternativou k syntetickým repelentům na kratší pobyty v přírodě.

Nejúčinnější byla směs ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) v poměru 2:1 a 20% koncentraci. Dosahovala i po 480 minutách 83% repelentní účinnost a během celého procesu testování vykazovala poměrně stabilní výsledky ve všech časových intervalech.

Na základě získaných výsledků lze říci, že vědecká hypotéza „Směs testovaných esenciálních olejů má repelentní účinek, není ovšem tak stabilní, jako u syntetických přípravků“, byla potvrzena. Ve srovnání se syntetickým deetem nebyla žádná z daných směsí stejně stabilní.

V případě hodnocení synergického efektu mezi jednotlivými esenciálními oleji můžeme říci, že existuje. Nejvýrazněji byl pozorován u všech třech směsí při 20% koncentraci, kdy zvýšil repelentní účinnost u směsí v poměru 1:2 a 1:1 o 30 – 40 % a v případě poměru 2:1 o 50 – 60 %.

Jedním z cílů práce bylo posoudit, zda by některá z testovaných směsí mohla být využita jako alternativa k syntetickým repelentům a jiným preventivním opatřením (obojky, spot-on) pro psy na dlouhodobější pobyty v přírodě. Dle výsledků z *in-vitro* testování by touto alternativou mohla být směs ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) v poměru 2:1 a 20% koncentraci. Výsledky dosahují podobné účinnosti jako syntetický repelent deet a po čas testování byla tato směs i poměrně stabilní. Tato alternativa by byla vhodná především pro svůj přírodní charakter, kdyby nedocházelo ke kontaminaci životního prostředí a nemusely by se projevovat nežádoucí účinky na těle, jako tomu občas bývá u syntetických přípravků. Pro potvrzení této směsi jako vhodné alternativy pro psy, bude ovšem potřeba *in-vivo* testování, aby se výsledná repelentní účinnost této směsi potvrdila či vyvrátila.

9 Literatura

Abdel-Ghaffar F., Al-Quraishy S., Mehlhorn H. 2015. Length of tick repellency depends on formulation of the repellent compound (icaridn=saltidin): tests on *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ricinus* placed on hands and clothes. Parasitology Research. **114:** 3041 - 3045

Adenubi O.T., McGaw L.J., Eloff J.N., Naidoo V. 2018. *In vitro* bioassays used in evaluating plant extracts for tick repellent and acaricidal properties: A critical review. Veterinary Parasitology. **254**: 160 – 171

Araújo LX., Novato T.P.L., Zeringota V., Maturano R., Melo D., Da Silva B.C., …Monteiro C.M.O. 2016. Synergism of thymol, carvacrol and eugenol in larvae of the cattle tick, Rhipicephalus micropulus, and brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus. Medical and Veterinary Entomology. **30** (4): 377 - 382

Balashov YS. 1972. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) – vectors of diseases of man and animals. Entomological Society of America. Miscellaneous publication. **8**: 163 – 376

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils – a review. Food and Chemical Toxicology. **46:** 446 – 475

Barnard DR. 1999. Repellency of essential oils to mosquitoes (*Diptera: Culicidae*). Journal of Medical Entomology. **36:** 625 - 629

Benelli G., Pavela R., Canale A., Mehlhorn H. 2016. Tick repellents and acaricides of botanical orogin: a green roadmap to control tick-borne diseases? Parasitology Research. **115:** 2545-2560

Benelli G., Pavela R. 2018. Repellence of essential oils and selected compounds againts ticks – A systematic review. Acta Tropica. **179:** 47 – 54

Bissinger BW, Donohue KV, Khalil SM, Grozinger CM, Sonenshine DE, Zhu J. 2011. Synganglion transcriptome and developmental global gene expression in adult females of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (*Acari: Ixodidae*). Insect Molecular Biology. **20:** 465 - 491

Braks M.A.H., Wieren S.E., Takken W., Sprong H. 2016. Ecology and Prevention fo Lyme Borreliosis.

Brattsen LB. 1983. Cytochrome P-450 involvement in the interaction between plant terpenes and insect herbivores. Plant resistance to insects. American Chemical Society. **208:** 173 - 195

Brooke W., Bissinger R., Roe M. 2009. Tick repellents: Past, present, and future. Pesticide Biochemistry and Physiology. **96**: 63-79

Burgess L.F. 2009. The mode of action of dimeticone 4% lotion against head lice, *Pediculus capitis.* BioMed Central Pharmacology. **9:** 3

Castro J.J. 1997. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. Veterinary Parasitology. **71**: 77 – 97

Cetin H., Cilek J.E., Oz E., Aydin L., Deveci O., Yanikoglu A. 2010. Acaridical activity of Satureja thymbra L. essential oil and its major components, carvacrol and gamma-terpine againts adult Hyalomma marginatum (Acari Ixodidae). Veterinary Parasitology. **170:** 287 - 290

Dautel H., Kahl O., Siems K., Oppenrieder M, Müller-Kuhrt L., Hilker M. 1999. A novel test system for detection of tick repellents. Entomologia Experimentalis et Applicata. **91**: 431-441

De Meneghi D., Stachurski F., Adakal H. 2016. Experiences in tick control by akaricide in the traditional cattle sector in Zambia and Burkina Faso: possible environmental and public health implications. Front Public Health. **4**:239

Dethier V.G., Browne L.B., Smith C.N. 1960. The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects. Journal od Economic Entomology. **53**: 134 -136

Diaz JH. 2016. Chemical and plant-based insect repellents: Efficacy, safety, and toxicity. Wilderness & Environmental Medicine. **27:** 153 - 163

Dryden M.W., Payne P.A., Smith V., Hostetler J. 2006. Evaluation of an imidacloprid (8·8%w/w)-permethrin (44·0% w/w) topical spot-on and a fipronil (9·8% w/w)-(S)-methoprene (8·8% w/w) topical spot-on to repel, prevent attachment, and kill adult *Rhipicephalus sanguineus* and *Dermacentor variabilis* ticks on dogs. Veterinary Therapeutics. **7:** 187 – 198

Ellse L., Wall R. 2013. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: a review. Veterinary Parasitology and Ecology Group. **28**: 233 - 243

Estrada-Peña A., Gray JS., Kahl O., Lane RS., Nijhof AM. 2013. Research on the ecology of ticks and tick-borne pathogens-methodological principles and caveats. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. **3**:29

Flanagan J. 2011. Preserving Cosmetics with Natural Preservatives and Preserving Natural Cosmetics. John Wiley & Sons, Inc. Publication. New York. 169 - 179

Földvári G., Rigó K., Majláthová V., Majláth I., Farkas R., Pet'ko B. 2009. Detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in lizards and their ticks from Hungary. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. **9**: 3

Földvári G., Rigó K., Jablonszky M., Biró N., Majoros G., Molnár V., Tóth M. 2011. Ticks and the city: ectoparasites of the Northern white-breasted hedgehog (*Erinaceus roumanicus*) in an urban park. Ticks and Tick-borne Diseases. **2**(4): 231-4

Frances S., Strickman D. 2007. Insect Repellents: Principles, Methods, and Uses. CRC Press. Boca Raton. 337 – 340

Fradin M.S. 1998. Mosquitoes and mosquito repellents: a clinician's guide. Annals of Internal Medicine. **128**: 931-940

Geurden T., Becskei C., Six RH, Maeder S., Latrofa MS, Otranto D., Farkas R. 2018. Detection of tick-borne pathogens in ticks from dogs and cats in different European countries. Ticks and Tick-borne Diseases. **6:** 1431 – 1436

Goode P., Ellse L., Wall R. 2018. Preventing tick attachment to dogs using essential oils. Ticks and Tick-borne Diseases. **9**: 14

Gray JS. 1991. The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. Review of Medical and Veterinary Entomology. **79**: 323 – 333

Gray JS., Kahl O., Lane RS., Levin ML., Tsao JI. 2016. Diapause in ticks of the medically importaant Ixodes ricinus species complex. Ticks and Tick-borne Diseases. **7**: 992 – 1003

Halos L., Baneth G., Beugnet F., Bowman A.S., Chomel B., Farkas R., Franc M., Guillot J., Inokuma H., Kaufman R., Jongejan F., Joachim A., Otranto D., Pfister K., Pollmeier M., Sainz A., Wall R. 2012. Defining the concept of „Tick repellency" in veterinary medicine. Parasitology. **139:** 419 - 423

Hess E., Vlimant M. 1986. Leg sense organs in ticks, in: J.R. Sauer, J.A. Hair (Eds.), Morphology, Physiology, and Behavioral Biology of Ticks, Halstead Press, New York. 361 – 390

Higa LDOS., Garcia MV., Rodrigues VDS., Junior PB., Barradas Pina FT., Barros JC., Andreotti R. 2019. Effects of cypermethin, chlorpyrifos and piperonyl butoxide-based pour-on and spray acaricides on controlling the tick *Rhipicephalus micropolus*. Systematic and Applied Acarology **24**: 278-286

Horn M, Nussbaumerová M, Šanda M, Kovářová Z, Srba J, Franta J, Sojka D, Bogyo M, Caffrey CR, Kopáček P, Mareš M. 2009. Hemoglobin digestion in Blood-Feeding Ticks: Mapping a Multi-Peptidase Pathway by Functional Proteomics. Chemistry & Biology. **16** (10): 1053 - 1063

Chomel B. 2015. Lyme disease. Revue Scientifique et Technique. **34** (2): 569 - 76

Iyigundogdu Z., Kalayci S., Asutay AB, Sahin F. 2019. Determination of antimicrobial and antiviral properties of IR3535. Molecular Biology Reports. **46:** 1819 – 1824

Jennett A.L., Smith F.D., Wall R. 2013. Tick infestation risk for dogs in peri-urban park. Parasites and Vectors. **6**: 358

Jensenius M., Pretorius A., Clarke F., Myrvang B. 2005. Repellent efficacy of four commercial DEET lotions againts *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae), the principal vector of *Rickettsia africae* in southern Africa. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. **99**: 708-711

Kaaya G.P., Mwangi E.N., Ouna E.A. 1996. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauvaria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, Journal of Invertebrate Pathology. **67**: 15 – 20

Kappers I.F., Dicke M., Bouwmeester H.J. 2008. Terpenoids in plant signaling, chemical ecology. Wiley Encyclopedia of Chemical Biology. 1-8

Katz T, Miller J, Hebbert A. 2008. Insect repellents: historical perspectives and new developments. Journal of the American Academy of Dermatology. **58:** 865 - 871

Kiszewski AE, Matuschka FR, Spielman A. 2001. Mating strategies and spermiogenesis in ixodid ticks. Annual Review of Entomology. **46:** 167-182

Kinterová J. 2020. Vyhodnocení repelentní účinnosti vybraných esenciálních olejů na klíště obecné (*Ixodes ricinus*) [Diplomová práce]. Česká zemědělská univerzita, Praha.

Khatat SEH, Daminet S, Duchateau L, Elhachimi L, Kachani M, Sahibi H. 2021. Epidemiological and Clinicopathological Features of *Anaplasma phagocytophilum* Infection in Dogs: A Systematic Review. Frontiers in Veterinary Science. **8**: 686644

Kulkarni S.M., Naik V.M. 1985. Laboratory evaluation of six repellents againts some Indian ticks. The Indian Journal of Medical Research. **82**: 14-18

Kulma M, Bubova T, Kopecky O, Rettich F. 2017. Lavender, eucalyptus, and orange essential oils as repellents againts *Ixodes ricinus* females. Scientia Agriculturae Bohemica. **48:** 76 - 81

Labuda M., Nuttall PA., Kozuch O., Eleckova E., Williams T., Zuffova E., Sabo A. 1993. Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature. Experientia. **49**: 802 – 805

Leonovich S.A. 2004. Phenol and lactone receptors in the distal sensilla of the Haller's organ in *Ixodes ricinus* ticks and their possible role in host perception. Experimental and Applied Acarology. **32**: 89-102

Lupi E., Hatz C., Schlagenhauf P. 2013. The efficacy of repellents againts *Aedes Anopheles*, *Culex* and *Ixodes* spp. a literature review. Travel Medicine and Infectious Disease. **11**: 374 - 411

Majláthová V., Majláth I., Derdáková M., Vichová B., Petko, B. 2006. *Borrelia lusitaniae* and green lizards (*Lacerta viridis*), Karst Region, Slovakia. Emerging Infectious Diseases**. 12:** 1895-1901

Matějovská T. 2007. Interakce klíště-hostitel I. Sání krve a přenos patogenů. Živa **6:** 247 – 249

Matějovská T. 2008. Interakce klíště-hostitel II. Obranné reakce hostitele. Živa **1:** 5 - 6

Mills C., Cleary B.J., Gilmer J.F., Walsh J.J. 2004. Inhibition of acetylcholinesterase by tea tree oil. Journal of Pharmacy and Pharmacology. **56:** 375 - 379

Mendes MC., Duarte FC., Martins JR., Klafke GM., Fiorini LC., de Barros ATM. 2013. Characterization of the pyrethroid resistence profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations from the states of Rio Grande do Sul and Mato Grosso do Sul, Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria. **22**: 379 – 384

Mossa ATH. 2016. Green Pesticides: Essential Oils as Biopesticides in Insect-pest Management. Journal of Environmental Science and Technology. **9 (5):** 354 - 378

Moore SJ, Lenglet A, Hill N. 2007. Plant-based insect repellents. In Debboun M, Frances S, Strickman D – Insect repellents: principles, methods, and uses. CRC press. 276 – 304

Neiro LS., Olivero-Verbel J., Stashenko E. 2010. Repellent activity of essential oils: A review. Bioresource Technology. **101** (1): 372 - 378

Nwanadem CHF., MinWang, TianhongWang, Zhijun Yu, Jingze Liu. 2020. Botanical acaricides and repellents in tick control: current status and future directions. Experimental and Applied Acarology. **81** (1): 1 - 35

Otranto D., Dantas-Torres F., Breitschwerdt E.B. 2009. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. Trends in Parasitology. **25:** 157 – 163

Perez-Perez D., Bechara G.H., Machado R.Z., Andrade G.M., Del Vecchio R.E., Pedroso M.S., Hernández M.V., Farnós O. 2010. Efficacy of the BM86 antigen againts immature instars and adults of the dog tick Rhicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: ixodidae). Veterinary Parasitology. **167**: 321 - 326

Ravindran R., Juliet S., Kumar KGA., Sunil AR., Nair SN., Amithamol KK., Rawat AKS., Ghosh S. 2011. Toxic effects of various solvents againts *Rhicephalus (Boophilus) annulatus*. Ticks and Tick-borne Diseases. **2**:160 -162

Rizzoli A., Silaghi C., Obiegala A., Rudolf I., Hubalek Z., Földvári G., Plantard O., Vayssier-Taussat M., Bonnet S., Spitalska E., Kazimítová. 2014. Ixodes ricinus and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: New hazards and relevance for public health. Frontiers in Public Health. **2**:26.

Rosado-Aguilar JA., Arjona-Cambranes K., Torres-Acosta J.F.J., Rodriguez-Vivas R.I., Bolio-González M.E., Ortega-Pacheco A., Alzina-López A., Gutiérrez-Ruiz E.J., Gutiérezz-Blanco E., Aguilar-Caballero A.J. 2017. Plant products and secondary metabolites with acaricide activity againts ticks. Veterinary Parasitology. **238:** 66 – 76

Salát J., Ruzek D. 2020. Tick-borne encephalitis in domestic animals. Acta virologica. **64:** 223 - 229

Schubert F., Palsson K., Santangelo E., Borg-Karlson A-K. 2017. Sulfate turpentine: a resource of tick repellent compounds. Experimental and Applied Acarology. **72:** 291 - 302

Soares SF, Borges LMF, Braga RD, Ferreira LL, Louly CCB, Tresvenzol LMF, de Paula JR, Ferri PH. 2010. Repellent activity of plant-derived compounds againts *Amblyomma cajennense* (*Acari: ixodidae*) nymphs. Veterinary Parasitology. **167:** 67 – 73

Sojka D. 2016. „Krvemlýnek“ ve střevě klíštěte. Živa **1:** 10 – 13.

Skotarczak B. 2003. Canine ehrlichiosis. Annals of Agricultural and Environmental Medicine. **10:** 137 - 41

Sonenshine D. 1993. Biology of ticks, Vol 2. Oxford University Press, New York, USA.

Sonenshine DE, Lane RS, Nicholson WL. 2002. Ticks (Ixodida). Medical and Veterinary Entomology. **2:** 517 - 558

Sonenshine D. and Roe, R. 2014. Biology of ticks. Oxford University Press, New York, USA.

Stajković N, Milutinović R. 2013. Insect repellents: transmissive disease vectors prevention. Vojnosanitetski pregled. **70:** 854 - 860

Stuchlý I. 1995. Nemá váš pes cizopasníky? Nutricyon, Praha.

Svobodová V., Svoboda M., Vernerová E. 2013. Klinická parazitologie psa a kočky. Brno.

Swany MK, Akhtar MS, Sinniah UR. 2016. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. **16:** 1-21

Štefanidesová K., Škultéty L., Sparaganob O.A.E., Špitalská E. 2017. The repellent efficacy of eleven essential oils againts adult *Dermacentor reticulatus* ticks. Ticks and Tick-Borne Diseases. **8:** 780 – 786

Tabari M. A., Youssefi M. R., Maggi F., Benelli G. 2017. Toxic and repellent activity of selected monoterpenoids (thymol, carvacrol and linalool) againts the castor bean tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). Veterinary Parasitology. **245:** 86 - 91

Tariq A., Adnan M., Amber R., Pan K., Mussarat S., Shinwari ZK. 2016. Ethnomedicines and anti-parasitic activities of Pakistani medicinal plants againts *Plasmodia* and *Leishmania* parasites. Annals of Clinical Microbiolology and Antimicrobials. **15**:52

Thomson C. 2008. Ticks (Ixodes Ricinus). Journal of Visual Communication in Medicine. **31**: 22 -23

Triphathi AK, Upadlhyay S, Bhuiyan M, Bhattacharya PR. 2009. A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy. **14:** 052 - 063

Volf P., Horák P. 2007. Paraziti a jejich biologie. Triton, Praha.

Wright BS, Bansal A, Moriarity DM, Takaku S, Setzer WN. 2007. Cytotoxic Leaf Essential Oils from Neotropical *Lauraceae*: Synergistic Effects of Essential Oil Components. Natural Product Communications. **2:** 12

10 Samostatné přílohy

Samostatné přílohy znázorňují podrobné výsledky jednotlivých směsích v koncentracích 5 %, 10 %, 15 % a 20 % v čase a jejich repelentní účinnost ve třech opakování. Poslední řádek značí průměrný repelentní účinek v daném čase.

10.1 *Tabulky se směsí smrku a šalvěje v poměru 2:1*

Tabulka č. 16: Repelentní účinnost směsi esenciálního oleje ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 5% koncentraci a v poměru 2:1.

Opakování	Repelentní účinek (%)		
	5 min	30 min	60 min
1	90,0	100,0	20,0
2	100,0	90,0	30,0
3	90,0	80,0	30,0
Celkem (%)	93,3	90,0	26,7

Tabulka č. 17: Repelentní účinnost směsi esenciálního oleje ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 10% koncentraci a v poměru 2:1.

Opakování	Repelentní účinek (%)			
	5 min	30 min	60 min	120 min
1	90,0	100,0	100,0	60,0
2	100,0	90,0	80,0	10,0
3	100,0	90,0	90,0	10,0
Celkem (%)	96,7	93,3	90,0	26,7

Tabulka č. 18: Repelentní účinnost směsi esenciálního oleje ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 15% koncentraci a v poměru 2:1.

Opakování	Repelentní účinek (%)		
	5 min	30 min	60 min
1	90,0	90,0	90,0
2	90,0	90,0	90,0
3	90,0	80,0	100,0
Celkem (%)	90,0	86,7	93,3

Pokračování tabulky č. 18

Opakování	Repelentní účinek (%)		
	120 min	240 min	360 min
1	90,0	50,0	30,0
2	60,0	50,0	20,0
3	90,0	10,0	30,0
Celkem (%)	80,0	36,7	26,7

Tabulka č. 19: Repelentní účinnost směsi esenciálního oleje ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 20% koncentraci a v poměru 2:1.

Opakování	Repelentní účinek (%)			
	5 min	30 min	60 min	120 min
1	90,0	90,0	60,0	100,0
2	80,0	90,0	90,0	70,0
3	90,0	90,0	100,0	80,0
Celkem (%)	86,7	90,0	83,3	83,3

Pokračování tabulky č. 19

Opakování	Repelentní účinek (%)		
	240 min	360 min	480 min
1	100,0	90,0	80,0
2	70,0	90,0	90,0
3	90,0	80,0	80,0
Celkem (%)	86,7	86,7	83,3

10.2 *Tabulky se směsí smrku a šalvěje v poměru 1:2*

Tabulka č. 20: Repelentní účinnost směsi esenciálního oleje ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 5% koncentraci a v poměru 1:2.

Opakování	Repelentní účinek (%)			
	5 min	30 min	60 min	120 min
1	80,0	80,0	70,0	20,0
2	90,0	70,0	80,0	10,0
3	90,0	90,0	80,0	20,0
Celkem (%)	86,7	80,0	76,7	16,7

Tabulka č. 21: Repelentní účinnost směsi esenciálního oleje ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 10% koncentraci a v poměru 1:2.

Opakování	Repelentní účinek (%)		
	5 min	30 min	60 min
1	80,0	90,0	90,0
2	80,0	90,0	80,0
3	100,0	100,0	90,0
Celkem (%)	86,7	93,3	86,7

Pokračování tabulky č. 21

Opakování	Repelentní účinek (%)		
	120 min	240 min	360 min
1	70,0	30,0	20,0
2	80,0	40,0	40,0
3	80,0	50,0	30,0
Celkem (%)	76,7	40,0	30,0

Tabulka č. 22: Repelentní účinnost směsi esenciálního oleje ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 15% koncentraci a v poměru 1:2.

Opakování	Repelentní účinek (%)				
	5 min	30 min	60 min	120 min	240 min
1	100,0	70,0	80,0	80,0	20,0
2	90,0	80,0	80,0	80,0	50,0
3	90,0	90,0	60,0	80,0	30,0
Celkem (%)	93,3	80,0	73,3	80,0	33,3

Tabulka č. 23: Repelentní účinnost směsi esenciálního oleje ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 20% koncentraci a v poměru 1:2.

Opakování	Repelentní účinek (%)			
	5 min	30 min	60 min	120 min
1	90,0	80,0	90,0	80,0
2	100,0	100,0	80,0	100,0
3	100,0	100,0	100,0	80,0
Celkem (%)	96,7	93,3	90,0	86,7

Pokračování tabulky č. 23

Opakování	Repelentní účinek (%)		
	240 min	360 min	480 min
1	90,0	100,0	60,0
2	90,0	50,0	70,0
3	90,0	100,0	70,0
Celkem (%)	90,0	83,3	66,7

10.3 *Tabulky se směsí smrku a šalvěje v poměru 1:1*

Tabulka č. 24: Repelentní účinnost směsi esenciálního oleje ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 5% koncentraci a v poměru 1:1.

Opakování	Repelentní účinek (%)			
	5 min	30 min	60 min	120 min
1	100,0	90,0	50,0	20,0
2	100,0	90,0	60,0	20,0
3	90,0	100,0	90,0	10,0
Celkem (%)	96,7	93,3	66,7	16,7

Tabulka č. 24: Repelentní účinnost směsi esenciálního oleje ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 10% koncentraci a v poměru 1:1.

Opakování	Repelentní účinek (%)		
	5 min	30 min	60 min
1	90,0	90,0	90,0
2	100,0	100,0	90,0
3	100,0	100,0	90,0
Celkem (%)	96,7	96,7	90,0

Pokračování tabulky č. 24

Opakování	Repelentní účinek (%)		
	120 min	240 min	360 min
1	100,0	90,0	40,0
2	100,0	80,0	30,0
3	90,0	60,0	30,0
Celkem (%)	96,7	76,7	33,3

Tabulka č. 25: Repelentní účinnost směsi esenciálního oleje ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 15% koncentraci a v poměru 1:1.

Opakování	Repelentní účinek (%)				
	5 min	30 min	60 min	120 min	240 min
1	90,0	100,0	100,0	70,0	30,0
2	80,0	90,0	90,0	70,0	40,0
3	100,0	90,0	80,0	100,0	20,0
Celkem (%)	90,0	93,3	90,0	80,0	30,0

Tabulka č. 26: Repelentní účinnost směsi esenciálního oleje ze smrku ztepilého (*Picea abies*) a šalvěje lékařské (*Salvia officinalis*) proti nymfám klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v 20% koncentraci a v poměru 1:1.

Opakování	Repelentní účinek (%)			
	5 min	30 min	60 min	120 min
1	100,0	80,0	100,0	90,0
2	90,0	100,0	90,0	80,0
3	90,0	90,0	90,0	90,0
Celkem (%)	93,3	90,0	93,3	86,7

Pokračování tabulky č. 26

Opakování	Repelentní účinek (%)		
	240 min	360 min	480 min
1	70,0	60,0	70,0
2	90,0	60,0	60,0
3	70,0	80,0	50,0
Celkem (%)	76,7	66,7	60,0

10.4 *Tabulky s kontrolním repelentem DEET*

Následující tabulky ukazují výsledky kontrolního testování repelentního přípravku s 97% aktivní složkou deet v 5% a 20% koncentraci.

Tabulka č. 27: Repelentní účinnost syntetického přípravku deet proti nymfám klíštěte obecného (Ixodes ricinus) v 5% koncentraci.

Opakování	Repelentní účinek (%)			
	5 min	30 min	60 min	120 min
1	100,0	90,0	90,0	80,0
2	100,0	100,0	100,0	90,0
3	100,0	100,0	100,0	80,0
Celkem (%)	100,0	96,7	96,7	83,3

Pokračování tabulky č. 27

Opakování	Repelentní účinek (%)		
	240 min	360 min	480 min
1	80,0	80,0	70,0
2	70,0	80,0	80,0
3	90,0	80,0	80,0
Celkem (%)	80,0	80,0	76,7

Tabulka č. 28: Repelentní účinnost syntetického přípravku deet proti nymfám klíštěte obecného (Ixodes ricinus) v 20% koncentraci.

Opakování	Repelentní účinek (%)			
	5 min	30 min	60 min	120 min
1	100,0	100,0	100,0	90,0
2	100,0	100,0	100,0	100,0
3	100,0	100,0	100,0	100,0
Celkem (%)	100,0	100,0	100,0	96,7

Pokračování tabulky č. 28

Opakování	Repelentní účinek (%)		
	240 min	360 min	480 min
1	100,0	90,0	80,0
2	100,0	80,0	80,0
3	90,0	90,0	80,0
Celkem (%)	96,7	86,7	80,0