

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Monitoring prevalence borrelií u ještěrek
v České republice**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Lucie Musilová

Obor studia: Zájmové chovy zvířat

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

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Monitoring prevalence borrelií u ještěrek v České republice" 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26. 04. 2021 _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala mému vedoucímu práce Ing. Martinu Kulmovi PhD., který mi pomohl celou práci zkompletovat. Také bych ráda poděkovala RNDr. Kateřině Kybicové PhD. ze Státního zdravotního ústavu za pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě patří poděkování celé mé rodině a příteli za trpělivost a podporu.

Monitoring prevalence borrelií u ještěrek v České republice

Souhrn

Lymeská borelióza je v současnosti nejrozšířenější antropozoonózou přenášenou klíšťaty v Evropě, Asii a Severní Americe. Borrelie vykazují velkou schopnost přizpůsobit se různým prostředím, včetně vektorů - členovců a hostitelů - savců. Klíšťata rodu *Ixodes*, jsou ektoparazité, jež při sání lidské či zvířecí krve přenášejí různé druhy patogenních mikroorganismů. Ty jsou kromě boreliózy původci dalších závažných onemocnění jako je klíšťová encefalitida, anaplasmóza, babesióza a například tularémie.

Tato práce je zaměřena na objasnění role ještěrek zelených (*Lacerta viridis*) v přenosovém cyklu borrelií. Jelikož ještěrky slouží jako hostitelé pro nedospělá stádia klíšťat, mohou být dle předpokladů rezervoáry patogenů, které jsou následně klíšťaty dále přenášeny. Teoretická část práce poskytuje informace o ještěrkách zelených, životním cyklu klíšťat a přenosu borrelií. V rámci praktické části byly na dvou lokalitách v Tichém údolí ve Středočeském kraji provedeny terénní odběry vzorků ocasních tkání a klíšťat sajících na ještěrkách. Tyto vzorky byly následně analyzovány na přítomnost borrelií v Národní referenční laboratoři pro lymeskou boreliózu ve Státním zdravotním ústavu v Praze za využití polymerázové řetězové reakce a gelové elektroforézy. Za pozitivní byla ještěrka považována v případě detekce borrelií ze vzorku ocasní tkáně a/nebo z larev klíšťat sajících na dotyčném jedinci.

Výsledky výše uvedených analýz prokázaly, že *Borrelia lusitaniae* je u české populace ještěrek zelených přítomna a zároveň byla nejvíce zastoupeným druhem borrelií u tohoto druhu. Tato studie tak přináší první zprávu o výskytu *B. lusitaniae* na území České republiky. Celkem bylo v rámci výzkumu odchyceno 52 jedinců *Lacerta viridis*, z nichž bylo 12 ještěrek (23,1 %) pozitivních na přítomnost borrelií. Dále bylo odebráno 488 sajících klíšťat z 30 ještěrek (ostatní jedinci neměli žádné přisáté klíště). U většiny ještěrek (63,3 %), které měly alespoň jedno sající klíště, byla nalezena klíšťata pozitivní na borrelie. Nejčastěji detekovanou borrelií byla v přisátých larvách (91,9 %) a nymfách klíšťat (58,6 %) *B. lusitaniae*. Na základě statistického vyhodnocení bylo prokázáno, že průměrný počet sajících klíšťat na ještěrce se významně liší mezi lokalitami, což lze vysvětlit rozdíly ve vegetaci. Na lokalitě „Skály“ s převážně skalnatým povrchem bylo přisátých v průměru 5,3 klíšťat na ještěrku, zatímco na lokalitě „U lomu“ s hustou vegetací 12,7 klíšťat na ještěrku. Zároveň v této lokalitě bylo odebráno z jedné ještěrky nejvíce 67 klíšťat.

V rámci této studie bylo potvrzeno, že ještěrky *Lacerta viridis* v České republice jsou rezervoárem této bakterie, což vyplývá také ze zastoupení *B. lusitaniae* detekované v klíšťatech nasbíraných z vegetace metodou vlnkování, které bylo na sledovaných lokalitách výrazně vyšší než na lokalitách bez výskytu ještěrek. Podíl *B. lusitaniae* z celkového množství detekovaných borrelií v klíšťatech z vegetace se významně lišil mezi sledovanými lokalitami. Zatímco na lokalitě „U lomu“ byla majoritní *B. lusitaniae* (66,7 %), na lokalitě „Skály“ převládal druh

B. afzelii (57,1 %). Tento jev lze vysvětlit přítomností drobných hlodavců, kteří jsou typickým rezervoárem *B. afzelii*, na lokalitě „Skály“.

Kromě borrelií, přenáší klíšťata celou řadu dalších patogenů, které představují potenciální zdravotní rizika z hlediska humánní i veterinární medicíny. Proto je žádoucí další výzkum na toto téma, přičemž by budoucí studie měly být zaměřeny na přítomnost dalších patogenů (např. bakterie *Rickettsia*, *Anaplasma* a další) v ještěrkách (nejen *L. viridis*, ale také u ještěrek *L. agilis* a *Zootoca vivipara*).

Klíčová slova: *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia burgdorferi*, nemoci přenášené klíšťaty, Lacertidae, PCR

Monitoring of borrelia pathogens in the lizards of Czech Republic

Summary

Lyme borreliosis is currently the most frequent anthroozoonosis transferred by ticks in Europe, Asia and North America. *Borrelia* shows a great ability to adapt to different environments, including the arthropod vector, and the mammalian host. Ticks, especially species of *Ixodes* genus, are ectoparasites, which transmit various types of pathogenic microorganisms when bloodmeal on both humans and animals. Apart borreliosis, these microorganisms are agents of another serious diseases, such as tick-borne encephalitis, anaplasmosis, babesiosis and for instance tularemia.

This thesis aimed to reveal the role of green lizards (*Lacerta viridis*) in the transmission cycle of *Borrelia*. Generally, lizards are well known hosts of juvenile ticks and may thus potential to serve as reservoir animal for the tick-borne pathogens. In the theoretical part, the thesis provides an information on green lizards, life cycle of *Ixodes ricinus* ticks and the transmission of borrelia. The practical part was then focused on sampling in the field (Tiché údolí, Central Bohemian Region) and subsequent laboratory analysis. The tail tissue of lizards and engorged ticks were used for detection of *Borrelia* in the samples. All the analysis were conducted in the National Reference Laboratory for Lyme Borreliosis at the National Institute of Public Health Prague, using polymerase chain reaction and gel electrophoresis. The lizard was considered to be positive either when borrelia was detected in its tail tissue or when at least one of attached tick larvae was borrelia positive.

The obtained results showed that *Borrelia lusitaniae* is present in the Czech population of *L. viridis* and the species was even the dominant borrelia among the samples. Due to best of author's knowledge, this study brings the first report of occurrence of this pathogen in the Czech Republic. In total, 12 out of 52 (23.1 %) *L. viridis* individuals were tested positive for borreliae. Also, 488 engorging ticks were removed from 30 lizards (no attached parasites were found on the rest of captured lizard). Regarding the analysis of removed ticks, the majority (63.3 %) of lizards had at least one borrelia-positive tick. Furthermore, *B. lusitaniae* formed 91.9 % of totally detected borreliae in removed larvae and 58.6 % in nymphs. The statistical evaluation showed that the number of ticks attached on lizards were significantly different between the studied localities. This phenomenon may be explained by differences in vegetation. While approximately 5.3 of ticks per lizard were found at the first locality "Skály", which is rocky and covered with a minimum of vegetation, approximately 12.7 ticks were removed from lizards at the other locality "U lomu" overgrown by shrubs and bushes. Interestingly, the highest infestation was found on lizard from locality "U lomu", from which 67 ticks were removed.

Additionally, the hypothesis that *L. viridis* are reservoir for *B. lusitaniae* was confirmed by comparison of pathogen prevalence in tick collected by flagging at the studied localities and those collected at other sites. Regarding major pathogen at collected questing ticks, the significant difference was found between the studied localities. *Borellia lusitaniae* (66.7 %)

was the major pathogen at overgrown locality "U lomu", while *B. afzelii* was dominant (57.1 %) on locality "Skály" with no vegetation. Here, the abundant occurrence of rodents, common hosts of *B. afzelii*, on locality "Skály".

Apart borreliae, ticks transmit many other pathogens, which are important from both human and veterinary medicine. Therefore, the further research on lizards as hosts and reservoirs is highly needed. Special attention should be paid to other bacteria such as *Rickettsia*, *Anaplasma* as well as to sample other lizards inhabiting Czech Republic (*L. agilis*, *Zootoca vivipara*).

Keywords: *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia burgdorferi*, tick-borne diseases, Lacertidae, PCR

Obsah

1 Úvod	1
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	2
3 Literární rešerše.....	3
3.1 Klíšťata	3
3.1.1 Rod <i>Ixodes</i>	3
3.2 <i>Ixodes ricinus</i>	4
3.2.1 Morfologie	4
3.2.2 Aktivita	5
3.2.3 Životní cyklus	5
3.2.4 Sání krve	6
3.2.5 Interakce klíšťe hostitel	8
3.2.6 Přenos borrelií.....	9
3.2.7 Přehled patogenů, nemoci.....	10
3.3 Lymeská borelióza	11
3.3.1 Případy onemocnění LB	12
3.3.2 Borrelie - hostitelé	13
3.3.3 Vakcinace	14
3.4 <i>Borrelia lusitaniae</i>.....	15
3.5 Ještěrka zelená (<i>Lacerta viridis</i>)	17
3.5.1 Morfologie	18
3.5.2 Etologie.....	18
3.5.3 Parazité našich plazů.....	20
3.5.4 Ještěrka jako hostitel klíšťat	21
3.6 Charakteristika lokalit	22

4 Metodika	24
4.1 Lokality	24
4.1.1 Lokalita „Skály“	24
4.1.2 Lokalita „U lomu“	25
4.2 Sběr dat	26
4.2.1 Odchyt ještěrek	26
4.2.2 Výjimka ze zákona.....	27
4.2.3 Sběr klíšťat.....	27
4.3 Analýza vzorků.....	28
4.3.1 Uchování vzorků.....	28
4.3.2 Izolace DNA	28
4.3.3 PCR.....	29
4.3.4 Elektroforéza.....	30
4.3.5 Purifikace produktů po amplifikaci	31
4.3.6 Měření koncentrace DNA	32
4.3.7 Příprava vzorků na sekvenaci	33
4.3.8 Vyhodnocení.....	33
5 Výsledky	34
5.1 Odchyt ještěrek.....	34
5.2 Přisátá klíšťata	34
5.2.1 Lokalita „Skály“	35
5.2.2 Lokalita „U lomu“	36
5.2.3 Souhrn lokalit.....	39
5.3 Vlajkování.....	41
5.3.1 Lokalita „Skály“	41

5.3.2	Lokalita „U lomu“	41
5.3.3	Souhrn lokalit.....	42
6	Diskuze	43
6.1	Pozorování během odchytu	43
6.2	Vliv borrelií a klíšťat na ještěrky	43
6.3	Míra parazitace u ještěrek	43
6.4	Přisátá klíšťata, přítomnost borrelií	44
6.5	<i>Borrelia lusitaniae</i> v ještěrkách.....	45
6.6	<i>Borrelia lusitaniae</i> v navlajkových klíšťatech	45
7	Závěr	47
8	Literatura.....	48
9	Samostatné přílohy	I
9.1	Příloha 1 – Záznamový arch: Obecné informace o odchycených ještěrkáchI	
9.2	Příloha 2 – Informace klíšťatech sajících na ještěrkách	II

1 Úvod

Lymeská borelióza je multisystémové infekční onemocnění postihující nejčastěji kůži, klouby, srdce a nervový systém. Epidemiologický agens je bakterie – spirochéta *B. burgdorferi* s.l., která stejně jako většina známých druhů rodu *Borrelia*, cirkuluje v přírodě mezi divoce žijícími obratlovci a klíšťaty, která na nich sají. V Evropě jsou vektorem klíšťata rodu *Ixodes* a jejich vývojová stádia (larvy, nymfy), v USA dominují druhy *I. dammini* a *I. pacificus*, v Asii *I. persulcatus* a *I. ovatus* (Prokeš 2015).

Rod *Borrelia* zahrnuje přibližně 20 druhů v komplexu *Borrelia burgdorferi* (sensu lato), z nichž devět má potvrzené patogenní účinky na zvířata a / nebo člověka (tj. *Borrelia afzelii*, *Borrelia bavariensis*, *Borrelia bissettii*, *B. burgdorferi* (ss), *Borrelia garinii*, *Borrelia kurtenbachii*, *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia spielmanii* a *Borrelia valaisiana*) (Rudenko et al. 2011; Obiegala et al. 2017).

Většina výše uvedených borrelií má v přírodě preferované rezervoáry (např. *B. garinii* v ptácích nebo *B. afzelii* v hlodavcích). Ještěrky z čeledi Lacertidae jsou v Evropě potenciálními rezervoáry pro *Borrelia lusitaniae*, která byla detekována u klíšťat a ještěrek například v Tunisku v *Psammodromus algirus*, na Slovensku u druhů *Lacerta agilis*, *Lacerta viridis* a v Německu u *L. agilis* (Dsouli et al. 2006; Majláthová et al. 2006, 2008; Raileanu et al. 2017). Tento patogen byl již několikrát izolován u pacientů, s chronickými kožními lézemi a syndromem podobným vaskulitidě, nejprve v Portugalsku a poté v dalších středomořských oblastech (Collares-Pereira et al. 2004; Da Franca et al. 2005; de Carvalho et al. 2008).

Tato studie byla zaměřena na ještěrky *L. viridis* a jejím hlavním cíle bylo zjistit přítomnost a prevalenci borrelií u ještěrek na různých lokalitách. Vzhledem faktu, že do doby sepsání práce byla role ještěrek v přenosu těchto spirochét neznámá a *B. lusitaniae* v České republice nebyla popsána, výsledky práce mají potenciál významně přispět k rozšíření povědomí o distribuci epidemiologicky významných agens na území státu. Předpokládané využití získaných dat je v oboru humánní i veterinární medicíny.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce je popsat roli ještěrek *Lacerta viridis* ve vývojovém cyklu borrelií. Dále je práce zaměřena na detekci borrelií v klíšťatech na habitech obývaných výše uvedenými ještěrkami.

Vědecké hypotézy: Ještěrky *Lacerta viridis* v České republice jsou rezervoárem borrelií. Nejčastější borrelií v ještěrkách *L. viridis* je *Borrelia lusitaniae*, jejíž výskyt v České republice dosud nebyl popsán, a prevalence tohoto patogenu v ještěrkách a klíšťatech na lokalitě koreluje.

3 Literární rešerše

3.1 Klíšťata

Klíšťata jsou vícehostitelští krevsající členovci a vektory patogenů. Přenáší celou řadu nebezpečných patogenů, jako jsou *Flavivirus*, *Orbivirus*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia helvetica*, *Francisella tularensis*, *Bartonella henselae*, *Babesia microti*, *Babesia divergens* a *B. ovis* (Rudolf et al. 2009).

Podřád Ixodida obsahuje 3 čeledi: Ixodidae, Argasidae a Nuttalliellidae (Sonenshine et al. 2002).

Ekonomický dopad chorob přenášených klíšťaty je významný a každým rokem se zvyšuje. Vykázané náklady na pacienta s diagnostikovanou lymeskou boreliózou činí přibližně 281 US\$ na pacienta (Zhang et al. 2006; Rochlin & Toledo 2020).

Klíšťata a choroby přenášené klíšťaty (Ticks and Tick-borne diseases, TTBDs) mají významný vliv i ve veterinární medicíně. TTBDs postihují 80 % světové populace skotu a jsou distribuovány po celém světě, zejména v tropických a subtropických zemích, včetně Indie, Pákistánu a Bangladéše. Kontrola TTBDs je v těchto zemích prioritou (Ghosh et al. 2007).

3.1.1 Rod *Ixodes*

Mezi klíšťaty rodu *Ixodes* rozšířenými po celém světě existují druhy s vysokou specificitou hostitele. Taková klíšťata sají jen na určitých hostitelích. K nim patří například *Ixodes hexagonus*, který saje krev pouze u ježků, psů a koček. Vedle toho existují také generalisté, například *I. ricinus* nebo *I. dammini*. Tyto druhy vyhledávají různé hostitele, ať už se jedná o ještěrku, ptactvo, drobné až velké savce včetně člověka. Schopnost sát krev na větším počtu hostitelů je důvodem, proč jsou tato klíšťata významnými přenašeči chorob (Kimmig et al., 2003).

Rod *Dermacentor* je ve střední Evropě majoritně zastoupen pijákem stepním (*Dermacentor marginatus*) a pijákem lužním (*Dermacentor reticulatis*), kteří napadají hlavně ovce, hovězí dobytek, srny a zajíce. *D. marginatus* je přizpůsoben teplejšímu a suššímu podnebí v jižnějších zeměpisných šířkách a *D. reticulatus* mírně vlhkému podnebí v severnějších zeměpisných šířkách. Klíšťata rodu *Rhipicephalus* jsou poměrně dobře přizpůsobená pro život v suchých oblastech. Sehrávají velkou roli jako přenašeči rickettsiových nemocí, např. maltské horečky. Rod *Amblyomma* je rozšířen po celém světě. Velkou roli sehrává jako parazit kopytníků a přenašeč nemocí na člověka i zvíře. Klíšťata rodu *Hyalomma* parazitují především na kopytnících. Jsou přenašeči krymsko-konžské hemoragické horečky (Kimmig et al. 2003)

3.2 *Ixodes ricinus*

Zařazení do systému:

Říše: Animalia

Kmen: Arthropoda

Třída: Arachnida

Řád: Ixodida

Čeleď: Ixodidae

Rod: *Ixodes*

Druh: *Ixodes ricinus* Linnaeus 1758

Klíště *I. ricinus* je typický evropský přenašeč lymeské boreliózy. Živí se na nejrůznějších savcích, ptácích, plazech. Gern (2008) ve své studii uvádí, že jde o více než 230 živočišných druhů, které jsou zapojeny do vztahů klíště - hostitel. Nejvhodnějším biotopem pro klíšťata jsou listnaté lesy a nízké, husté keře. Hranice výskytu klíšťat je udávána mezi 600 – 800 m.n.m., ale s postupujícím fenoménem globálního oteplování byla aktivní klíšťata nalezena ve výškách nad 1 200 m.n.m. a například v Alpách i ve výškách blízcích se 2 000 m.n.m. (Prokeš 2015).

3.2.1 Morfologie

Tělo klíšťat se skládá z části gnathosoma (ústní část), idiosoma (zadní část) a z článkovaných končetin. Larvy mají 3 páry končetin, nymfy 4 páry. Vnitřní orgány jsou uloženy ve stále cirkulující hemolymfě (Sonenshine et al. 2002).

Pro vyhledávání hostitele jsou klíšťata vybavena složitým smyslovým ústrojím, tzv. Hallerovým orgánem. Nachází se na koncích předních končetin a dokáže zachytit mechanické, tepelné a chemické podněty. Klíště číhá s roztaženými předními končetinami a svého hostitele rozpozná na základě otřesů, vyzařovaného tepla a podle vydechovaného oxidu uhličitého (Kimmig et al. 2003).

Při sání dává toto klíště přednost místům, kde je kůže tenká a tělesná teplota vyšší. Aby se dostali ke zdroji potravy, použijí nejprve chelicery a poté hypostom (Obr. 1). Masivní hypostom sestávající z chitinu, který je opatřen mnoha zpětnými háčky a slouží k uchycení v pokožce (Kimmig et al. 2003).



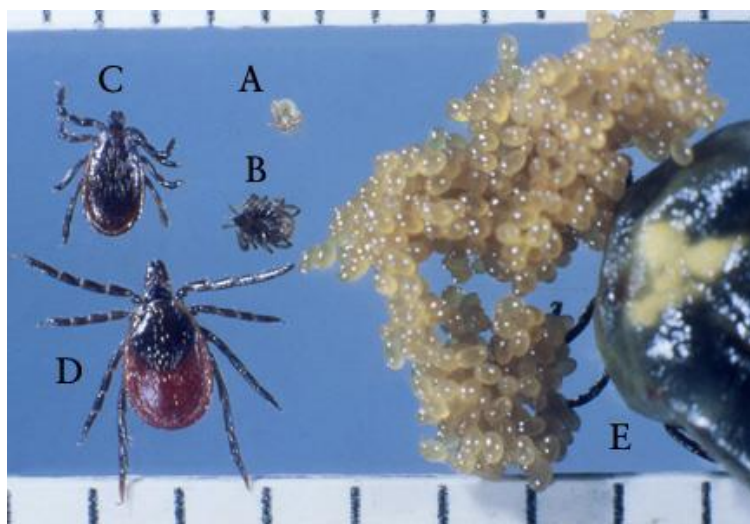
Obr.1: Snímek klíštěte s viditelnými chelicerami a hypostomem.
Převzato z: www.tickencounter.org

3.2.2 Aktivita

Ve střední Evropě, která má specifickou vlhkost i tepelné podmínky, začíná aktivita klíšťat přibližně 14 dnů po odtání sněhu a trvá až do listopadu, případně počátku prosince. Klíště *I. ricinus* má dva hlavní vrcholy aktivity, přičemž první z nich připadá na období jara a časného léta (Prokeš 2015).

3.2.3 Životní cyklus

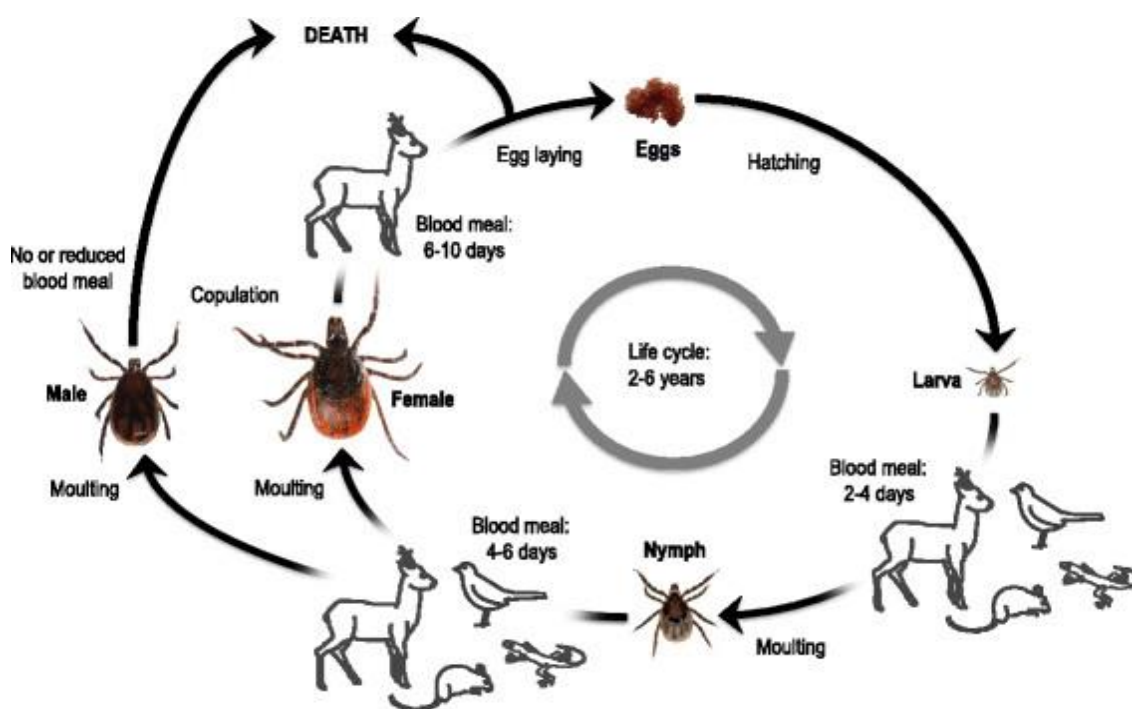
Každé stádium, tj. larva, nymfa a dospělá samice či samec (Obr. 2), sají na různých druzích obratlovců (Obr. 3). Klíšťata *I. ricinus* mají širokou škálu hostitelů. Larvy a nymfy sají zejména na hlodavcích, ptácích či ještěrkách. Dospělá klíšťata sají hlavně na větších savcích (Herrmann & Gern 2015).



Obr. 2: Larva (A), nymfa (B), dospělý samec (C), dospělá samice (D), nakladená vajíčka se samicí (E). Převzato z: <https://www.mcdinternational.org/>.

Klíště se vyvíjí z vajíčka, přes larvu, nymfu v dospělé. Samice klade vajíčka do trávy, z nich se vylíhne asi 0,8 mm velká larva. Larvy a nymfy obvykle zůstávají blíže k zemi, maximálně do 10–20 cm výšky nad zemí, pravděpodobně proto, že jsou vzhledem k velkému poměru povrchové plochy k objemu těla citlivější na vlhkost prostředí než dospělá stádia (Mejlon & Jaenson 1997; Herrmann & Gern 2015). Z larvy se metamorfózou vyvine nymfa, asi 1,2–1,5 mm velká. Nymfa se vyvine v dospělé – samec 2,5 mm velký, samice až 4,5 mm. Dospělí samci a samice bývají pozorováni výše na vegetaci, obvykle 60 až 80 cm nad zemí, ale lze je nalézt i ve výšce 1,5 m v závislosti na okolní vegetaci (Herrmann & Gern 2015). Dospělý samec již nepřijímá potravu, nýbrž pouze vyhledá zvíře, na kterém najde samici k páření. Při hledání partnera využívají feromony. Páření může trvat až jeden týden, poté samice vyhledá příznivé podmínky pro naklazení vajíček (Kiszewski et al. 2001). Samci po páření odpadnou a umírají. Dále sají jen samice, která je posléze schopna naklást až 2 500 vajíček. Po jejich naklazení samice umírá a larvy se vylíhnou přibližně o osm týdnů později (Kimmig et al. 2003).

Při tomto vývoji může docházet k dlouhým prodlevám, které však klíšťata díky své rozvinuté schopnosti hladovět dokážou přečkat bez jakékoliv újmy. Celý vývoj klíštěte od vajíčka až po pohlavně zralé stádium podléhá proto značným výkyvům a trvá od jednoho a půl roku do čtyř a půl let (Kimmig et al. 2003).



Obr. 3: Životní cyklus klíštěte *I. ricinus*. (Herrmann & Gern 2015).

3.2.4 Sání krve

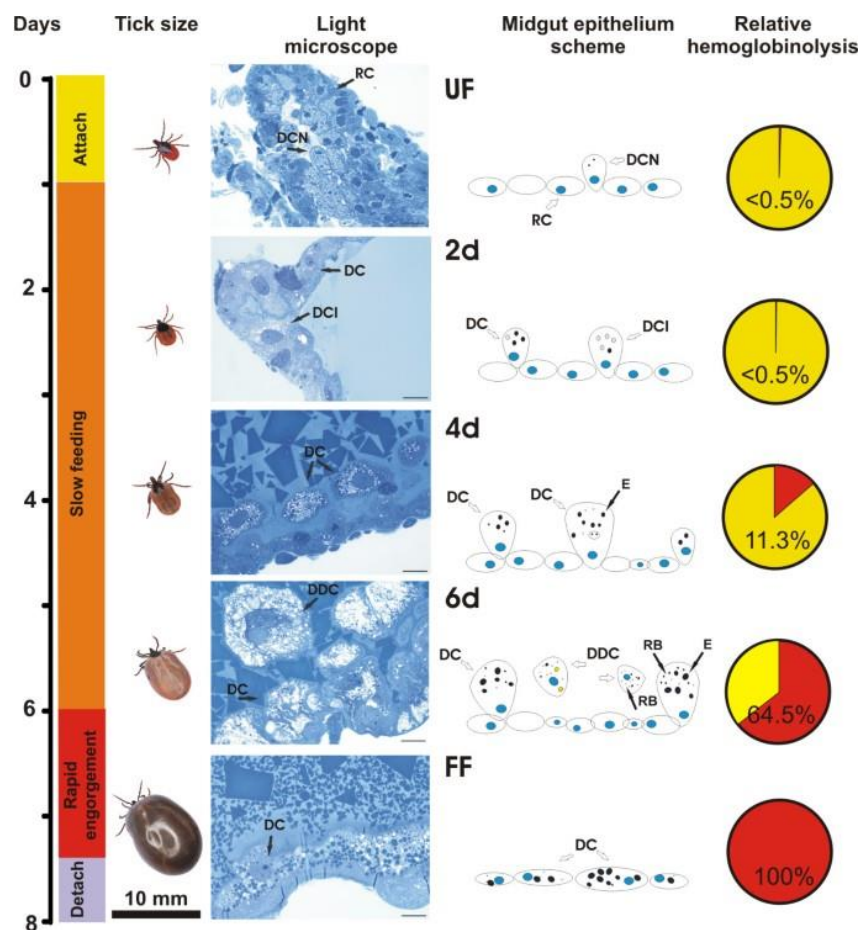
Ze všech popsaných druhů hmyzu a pavoukovců, kteří v současné době žijí na Zemi, pouze zhruba 14 000 druhů vyvinulo schopnost žít se krví obratlovců (Graça-Souza et al. 2006). Na rozdíl od jiných členovců, sajících krev přímo z kapilár hostitele, jsou klíšťata

telmofágové a sají krev z drobných hematomů, které se tvoří z krve vylité z poškozené cévy (tzv. „pool feeding“) (Vancová et al. 2020).

Úspěšný příjem potravy je životně důležitý pro dokončení vývojového cyklu klíštěte, přežití a naklazení vajíček samičkou. K průniku sacího orgánu, hypostomu, do kůže hostitele dochází pomocí chelicer klíštěte, což má za následek poškození epidermálních a dermálních buněk včetně místních cévek (Matějovská 2007).

Sání samic se skládá ze dvou fází, z pomalého sání, trvajícího zpravidla 6-9 dnů, a následného rychlého sání, k němuž dochází 12-24 hodin před odpadnutím z hostitele (Obr. 4). Fáze rychlého sání je podmíněna oplozením samic a nasají při ní více než dvě třetiny celkového objemu krve – u samic klíštěte obecného až 1 ml, tedy zhruba stonásobek jejich původní hmotnosti (Sojka 2016).

Příjem potravy plní u klíšťat dvojitou funkci. Larvy a nymfy využívají bílkovinu hostitele na energii a svlékání. (Kimmig et al. 2003). Zpracování proteinů hostitelské krve, zejména dvou hlavních komponent, hemoglobinu a sérového albuminu, je důležitým předpokladem k vytvoření velké snůšky (Sojka 2016).



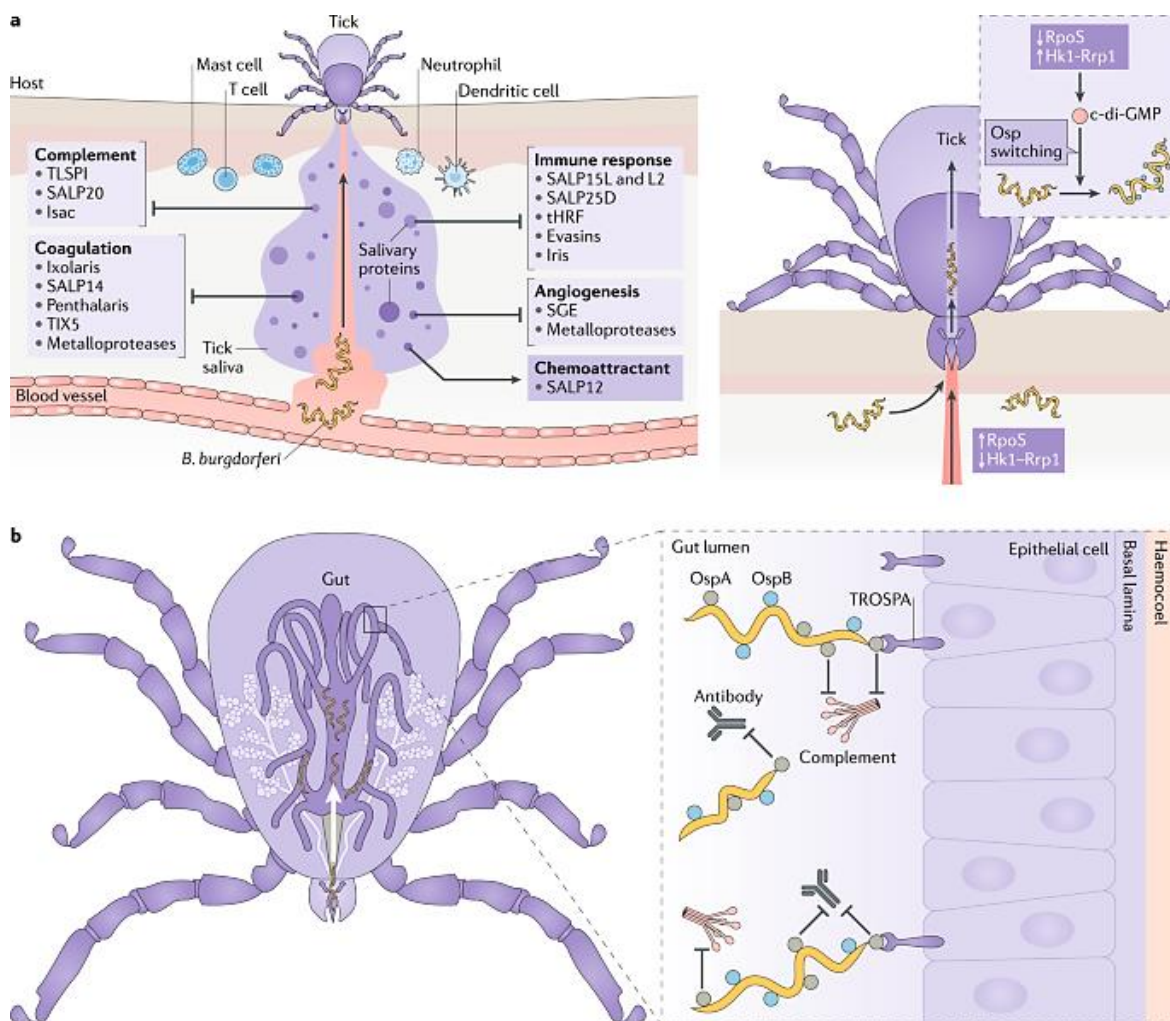
Obr. 4: Fáze sání samice klíštěte obecného, změny morfologie střev, hemoglobinóza. UF – nenakrmené klíště; 2d, 4d, 6d – počet dnů sání; FF – maximálně nakrmené, DC – buňky trávicího traktu. Převzato z Franta et al. (2010)

Proces trávení krve probíhá ve střevě, které u samice klíštěte představuje přes 80 % jejího těla. Jeho střední část (mezenteron), odpovědná za trávení, je rozčleněná do jednotlivých výběžků (caeca), které zvětšují celkový povrch a objem střeva (Horn et al. 2009). Tato část střeva se u klíšťat výrazně liší od stejného orgánu krevsajícího hmyzu, a to nejen anatomicky, ale především funkčně. U krevsajícího hmyzu probíhá (až na výjimky) trávení proteinů hostitelské krve rychle a mimo samotné buňky – v lumen střeva. Trávicí enzymy např. u mouchy tse-tse (*Glossina palpalis*) nebo komárů bývají většinou serinové proteázy podobné trypsinu s maximem aktivity v zásadité (alkalické) oblasti pH. Oproti tomu u klíšťat dochází v lumen střeva pouze k enzymatické lyzi (rozkladu) červených krvinek a rozpuštěné krevní proteiny jsou poté transportovány do střevních buněk a tráveny v kyselém prostředí vnitrobuněčných membránových váčků. Tento postupný a neobvyklý způsob trávení velkého množství nasáté hostitelské krve, kdy vnitřek střeva evidentně slouží i jako primární zásobník živin, umožňuje klíšťatům přežívat dlouhé časové intervaly (měsíce až roky) mimo hostitele samozřejmě velmi přispívá k jejich globálnímu rozšíření a úspěšné adaptaci k životu v nejrůznějších podmínkách na Zemi (Sojka 2016).

3.2.5 Interakce klíště hostitel

Sání klíšťat je dlouhodobý proces, během kterého se vyvíjí silná odpověď hostitele. Klíště čelí homeostáze hostitele (mechanismy obratlovců, které zabraňují ztrátě krve), zánětu (který může vyvolat svědění nebo bolest, a tím vyvolat obranné chování hostitelů), adaptivní imunitě (prostřednictvím buněčné i humorální odpovědi) (Francischetti et al. 2009).

Klíště se těmito mechanismům brání pomocí sekrece biologicky aktivních látek ze slinných žláz (lipidy, proteiny). Slinné žlázy patří v těle klíštěte mezi největší a jsou nezbytné pro úspěšný příjem krve. Zároveň jsou cestou přenosu mnoha patogenů do těla hostitele (Matějovská 2007). Nedávný pokrok v transkriptomovém výzkumu odhalil, že klíšťata mají stovky různých proteinů exprimovaných v jejich slinných žlázách (Francischetti et al. 2009) (Obr. 5).



Obr. 5: A) Během sání na infikovaném hostiteli dochází k přenosu *Borrelia burgdorferi* spolu s krví. Klíště uvolňuje do kůže hostitele slinný protein SALP25D, které tlumí zánět v místě přísátí. B) Spirochety požitě s krví přilnou ke střevu klíštěte a zůstanou v tomto orgánu až do dalšího sání. *B. burgdorferi* exprimuje proteiny OspA a OspB, které chrání spirochety před škodlivými složkami v krvi hostitele, včetně protilátek, a umožňují jim přilnout a přetrvávat ve střevě (Kurokawa et al. 2020).

Ihned po poranění cévy klíštětem dochází ke stažení cévy – vazokonstrikci. Ta je výsledkem nejen reflexivní činnosti svalové vrstvy cévy, ale i odpovědi na mnoho faktorů uvolňovaných z aktivovaných destiček nebo vznikajících během aktivace koagulační kaskády. Trombocyty dokážou zformovat krevní zátku během několika sekund. K jejich aktivaci dochází při styku s kolagenem během poranění cévy hypostomem klíštěte. Po této primární aktivaci se rychle mění tvar trombocytů a dochází k degranulaci jejich granul. Adenosindifosfát, tromboxan a trombin se vážou na povrch trombocytů, které jsou následně pospojovány a utvoří zátku (Matějovská 2007; Anderson & Magnarelli 2008).

3.2.6 Přenos borrelií

Spirochety žijí ve střevě klíštěte. Po přísátí migrují přes střevní stěnu do slinných žláz, odkud se dostanou do svého hostitele. Tento děj trvá obvykle několik hodin. Proto riziko nákazy

je tím větší, čím delší čas je klíště přisáto. Udává se, že odstranění klíštěte nejpozději do 24 hodin představuje minimální riziko nákazy. Větší riziko nákazy nesou i přisátá vývojová stadia – larva, nymfa – protože vzhledem ke svému malému rozměru unikají pozornosti (Prokeš 2015).

U *B. afzelii* bylo dokázáno, že borrelie putují při přisátí klíštěte na hostiteli ze střeva klíštěte rovnou do hostitele nejdříve aktivním pohybem proti proudu nasávané krve a pak i regurgitací. Spirochéty aktivované změnou teploty a pH krve hostitele mění expresi svého povrchový OspA proteinu na OspC protein, který se poté váže na klíštěcí slinný protein SALP. Díky tomu inhibuje aktivaci T lymfocytů hostitele a borrelie se tak dokáže vyhnout specifické buněčné imunitě. Tento proces trvá přibližně prvních 24 hodin sání klíštěte. Proto ačkoli borrelie pronikají do těla hostitele již od začátku, jsou zlikvidovány imunitním systémem a proto odstranění klíštěte v prvních 24 hodinách představuje jen nízké riziko nákazy (Pospíšilová et al. 2019)

Samotné projevy onemocnění jsou dány 3 mechanismy, jednak vlastním působením spirochét na postižené tkáně, dále autoimunitní reakcí organismu a v neposlední řadě se projevuje vliv vaskulitidy a ukládání imunokomplexů. Borrelie se šíří v extracelulárním vazivu, posléze lymfatickými cestami a krví. Cílovými orgány, kde jsou schopné uchycení, jsou především centrální a periferní nervový systém, klouby, myokard, kosterní svaly, některé struktury oka a kůže. Jsou primárně extracelulárními patogeny, ale díky bičíkům, které obtáčí tělo spirochét jsou pohyblivé a mohou se nalézat i intracelulárně, např. ve fibroblastech, neuroglii, endoteliích, buňkách synovie. Jsou schopny se různými mechanismy chránit před imunitou hostitele, především změnou povrchových antigenů, mohou odhodit své bičíky, aktivně unikat před fagocytózou, inaktivovat komplement a disregulovat imunitní systém (Bartůněk 2006).

3.2.7 Přehled patogenů, nemoci

Všechny patogeny se do klíštěte dostanou během sání na infikovaném hostiteli a při následujícím sání se přenášejí skrze slinné žlázy na dalšího hostitele. K nejznámějším virovým infekcím přenášeným klíšťaty patří klíšťová encefalitida způsobená virem TBE z čeledi *Flaviviridae*. V Evropě je ročně zaznamenáno 5 000 – 7 000 případů (Süss 2011). V letech 2016 – 2019 bylo v České republice hlášeno mezi 565 – 774 případů ročně (Orlíková et al. 2020) a v roce 2020 dokonce 854 případů (SZÚ 2020)

Nejznámějším zástupcem bakteriálních onemocnění přenášených klíšťaty je lymeská borelióza způsobená spirochétami komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) (Matějovská 2007). V Evropě je každoročně hlášeno více než 232 000 nových případů lymeské boreliózy u lidských pacientů (Lindgren & Jaenson 2006). Z literatury je známo několik konkrétních případů dvojité infekce klíšťové encefalitidy s lymeskou boreliózou (Logina et al. 2006; Bröker 2012). V České republice je ročně hlášeno kolem 4000 případů, konkrétně v letech 2018 - 4724, 2019 - 4102 a 2020 – 3710 případů (SZÚ 2020).

Klíšťata dále přenášejí např. bakterie způsobující tularémii (*Francisella tularensis*), intracelulární bakterie z čel. Rickettsiaceae (*Rickettsia helvetica* and *Rickettsia monacensis*). Dále může přenášet bakterie způsobující lidskou granulocytární anaplasmózu (*Anaplasma phagocytophilum*). V neposlední řadě je třeba uvést parazitární onemocnění z kmene Apicomplexa. Z těchto nemocí je známá babezióza (*Babesia divergens*, *Babesia microti*) a teilerióza (rod *Theileria*) (Matějovská 2007; Rizzoli et al. 2014).

3.3 Lymeská borelióza

Lymeská borelióza (LB) patří v ČR mezi nejčastější zoonózy s přírodní ohniskovostí, která je přenášena klíšťaty (Prokeš, 2015). Onemocnění dostalo jméno podle městečka Old Lyme v Connecticutu v USA, kde byly popsány v roce 1976 revmatologem dr. Steerem juvenilní epidemické artritidy u dětí ve spojitosti s přisátím klíštěte. Původce onemocnění byl izolován ze střevního traktu amerických klíšťat *Ixodes dammini* v roce 1982 Williamem Burgdorferem v USA a byl pojmenován *Borrelia burgdorferi*. Samotná nozologická jednotka – Lymeská borelióza – byla přijata až v roce 1987 na III. mezinárodní konferenci v New Yorku věnované této problematice (Burgdorfer et al. 1982; Valešová 1999).

Původcem LB je gramnegativní mikroaerofilní spirálovitá bakterie z kmene spirochét patřící do komplexu *Borrelia burgdorferi* s.l. Spirochéty si vyvinuly mnoho strategií k přizpůsobení se různým prostředím. Jediným prokázaným vektorem jsou klíšťata a hostiteli jsou obratlovci (Hovius et al. 2007). V České republice je vektorem borrelií klíště rodu *Ixodes*. Borrelie byly také nalezeny u komárů v ČR u komáru *Aedes vexans* (Halouzka et al. 1998), ve Spojených státech *Aedes canadensis* a *Aedes stimulans* (Magnarelli & Anderson 1988). V komárech, vzhledem k jejich životnosti, přežívají borrelie kratší dobu. Borrelie prokázány i v dalších druzích bezobratlých – roztoči (Acarina), dvoukřídli (Diptera), blechy (Aphaniptera) a ovádovití (Tabanidae) (Valešová 1999). U tohoto hmyzu však nikdy nebyl prokázán přenos borrelií na hostitele, tudíž nemohou být nazýváni vektorem.

Jednotlivé druhy borrelií se liší svou antigenní výbavou, afinitou k různým tkáním a vazbou na rezervoárového hostitele. *B. burgdorferi* sensu stricto napadá především kloubní a nervový systém člověka, *B. afzelii* je asociována s kožní manifestací a *B. garinii* je dávána do souvislosti s neurologickými projevy (Bartůněk 2006; Gern 2008). Tyto rozdíly ale nejsou z klinického hlediska zásadní, a proto může každý druh vyvolat různou orgánovou manifestaci (Gern 2008). V dnešní době jsou již známy další druhy borrelií patogenních pro člověka – *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. valaisiana*, *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. mayoni*, *B. kurtenbachii*. Další druhy byly zachyceny pouze v klíšťatech – *B. finlandensis*, *B. japonica*, *B. sinica*, *B. tanuki* a další (Prokeš 2015).

Borrelia burgdorferi s.l. má dlouhé spirálovitě vinuté tělo o délce 4-30 μm a průměru 0,2 μm, pohybuje se rotací kolem podélné osy nebo smršťováním a natahováním. Pohyb umožňují bičíky, kterých je 7-9, na rozdíl od ostatních patogenních borrelií (*B. hermsi*, *B. recurrentis*), které mají 15-20 bičíků. Bičíky se vypínají mezi oběma konci buňky z bazálních disků, umístěných v cytoplazmatické membráně, a obtáčí tělo borrelie pod vnější

buněčnou stěnou. Ta sestává ze tří vrstev, vnitřní peptidoglykanové, střední lipopolysacharidové a vnější lipoproteinové. Bičíky jim umožňují pohyb rychlostí až 2 mm za minutu (Bartůněk 2006; Vancová et al. 2017).

Putování borrelií mezi tkáněmi hostitele je podobné jako u leukocytů, mohou volně procházet nejen epitelem, ale i hematoencefalickou bariérou. Dobře se pohybují ve viskózním prostředí mezibuněčné hmoty, v pojivových tkáních, v mozkomíšním moku a v synoviální tekutině. Rozmnožují se relativně pomalu, příčným nebo podélným dělením, zhruba každých 7-20 hodin. Vzhledem k dlouhému generačnímu času je expanzivita infekce nízká. Spirochety jsou dle některých výzkumů schopny při nízkém pH a nedostatku nutrice vytvářet cystám podobné útvary a jiné morfologické non-spirální formy a za vhodných podmínek se zpětně transformovat do formy spirální (pohyblivé) (Vancová et al. 2017).

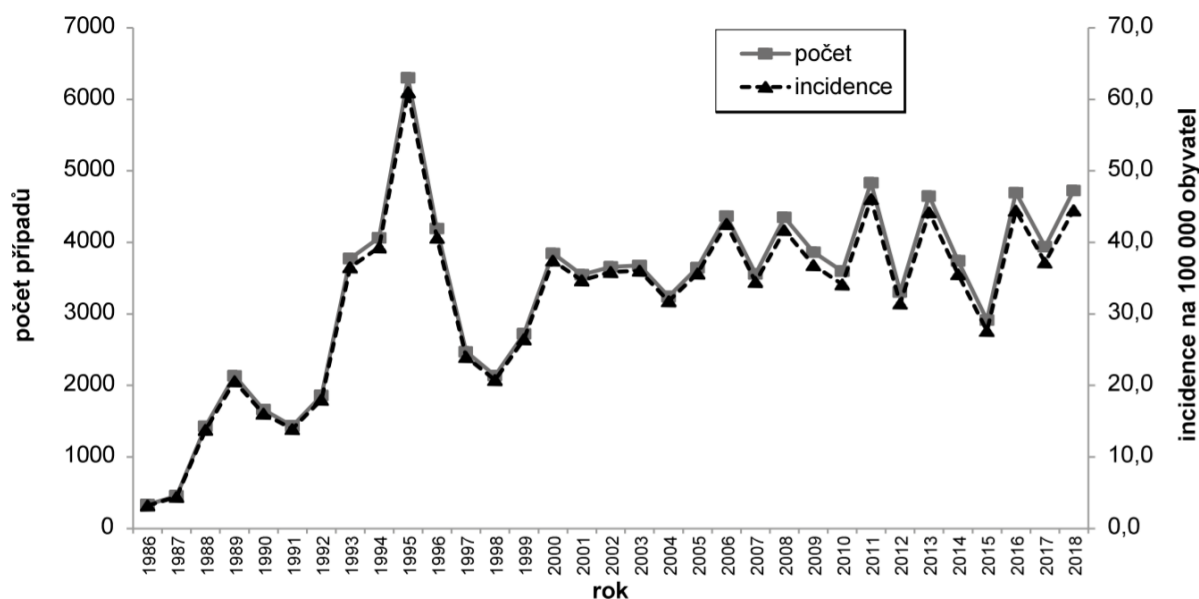
B. burgdorferi se vyznačuje mimořádnou schopností tvořit cysty (které mají charakteristiku endospor) a vylučovat vezikuly s plazmidy, mající stejnou stavbu jako buněčná stěna. V nepříznivém prostředí dokáže tento druh spirochét tvořit cysty v rekordním čase – už za 24 – 48 hodin. Borrelie na svém povrchu vystavují velké množství nejrůznějších antigenních struktur, které se obecně označují jako vnější povrchové či membránové proteiny (outer membrane/surface proteins, Omp/Osp) (Schwan et al. 1995). Fluidita vnější membrány *B. burgdorferi* s bičíkovými proteiny a vezikulárními útvary má výrazný vliv na adhezivitu borrelií s buňkami hostitele (Bartůněk 2006). Hostitelská obrana je spojená s tvorbou proteinů – protilátek třídy IgM. Avšak protilátky proti antigenům borrelií reagují i s nervovými vlákny (u lidí antigen HSP 60, myozin). To může spustit autoimunitní reakce v organismu hostitele (Buchancová et al. 2009).

3.3.1 Případy onemocnění LB

V Evropě je nejvíce případů LB ve Skandinávii a v centrální Evropě, existují však značné výkyvy ve výskytu podle různých lokalit, např. v jižním Německu 111 případů na 100 000 obyvatel, ve Slovinsku 206 případů na 100 000 obyvatel. Ve Spojených státech výskyt dosahuje ročně k 160 případům na 100 000 obyvatel (Kamradt 2002).

Výskyt onemocnění LB vykazuje v ČR zvýšenou frekvenci v letech 1993 a 1994 (Graf 1), a vrcholí v roce 1995, kdy incidence LB dosáhla 61,2/100000 obyvatel (Bartůněk 2006). V poslední dekádě se tendence ustálila a nemocnost na LB v letech 2008-2018 se pohybovala mezi 27,6-46,1 na 100 000 obyvatel, ročně bylo hlášeno 2913 až 4834 onemocnění (Orlíková et al. 2019).

Graf 1: Lymeská borelióza v ČR, mezi lety 1986 - 2018, počet případů a incidence na 100 000 obyvatel (Orlíková et al. 2019).



Přestože v Evropě je hlášeno více než 200 tisíc případů ročně (Lindgren & Jaenson 2006), celkový počet může být výrazně vyšší, zejména kvůli pleomorfnímu klinickému projevu infekce, který sahá od nespecifických příznaků podobných chřipce po typické klinické příznaky lymeské boreliózy (např. *Erythema migrans* a jiné dermatologické příznaky, karditida, chronická artritida, meningitida a neurologické abnormality) (Rudenko et al. 2011).

3.3.2 Borrelie - hostitelé

Oblasti s výskytem lymeské nemoci v Evropě se udržují prostřednictvím komplexních interakcí mezi různými druhy klíšťat rodu *Ixodes*, řadou borrelií patřících do komplexu *B. burgdorferi* s.l. a velkým počtem hostitelů (obratlovců), na nichž klíšťata sají (Gern 2008).

Boreliózu přenášejí klíšťata, v Evropě *Ixodes ricinus*, v Americe *Ixodes scapularis* (dříve *I. dammini*) a *Ixodes pacificus*, ve východní Asii *Ixodes persulcatus*. Lymeská borelióza je rozšířená skoro po celém světě (Kimmig et al., 2003). Borrelie se vykytují dokonce i v polárním moři, kde byly prokázány u mořského ptactva napadeného klíštětem *Ixodes uriae* (Olsén et al. 1993; Smith et al. 2006).

Frekvence jednotlivých druhů borrelií v Evropě není rovnoměrná. Neurologické manifestace jsou častější v západní Evropě a s nimi spojená *B. garinii*. Ve střední Evropě a Skandinávii je nejčastější *B. afzelii*. *B. burgdorferi* s.s. není dominantní v žádném evropském regionu a nevyskytuje se v Rusku, Finsku a Asii (Bartůněk 2006).

Typickým hostitelem pro *Borrelia afzelii* jsou malí savci, především hlodavci (Hanincova et al. 2003), *B. spielmanii* je spojena s řadou hlodavců, např. plch zahradní (*Eliomys quercinus*) či plšík lískový (*Muscardinus avellanarius*) (Richter et al. 2004). V Německu byla

zjištěna *B. afzelii*, *B. spielmanii* a *B. garinii* i u ježka západního (*Erinaceus europaeus*) (Skuballa et al. 2007). Rezervoárem *B. bavariensis* jsou hlodavci (Margos et al. 2009). Ptáci jsou rezervoárem pro *B. garinii* a *B. valaisiana*. *B. valaisiana* byla izolována z klíšťat v Evropě a Asii, kde je značná diverzita tohoto druhu, je to nejobecnější genodruh u klíšťat v Irsku. *B. valaisiana* je často nacházena v duální infekci s *B. garinii* (Bartůněk 2006). *B. burgdorferi* sensu stricto je spjata jak s hlodavci, tak s ptáky (Hanincova et al. 2003; Gern 2008). Plazi mohou být důležitými hostiteli pro nymfy *I. ricinus* a konkrétně *Lacerta viridis* a *Podarcis taurica* mohou hrát roli v cirkulaci *B. burgdorferi* s.l. (Földvári et al. 2009). Další studie (Matuschka et al. 1992; Majláthová et al. 2006) potvrzují možný výskyt *B. lusitaniae* u plazů.

Přežití *B. burgdorferi*, stejně jako například v případě viru klíšťové encefalitidy, závisí na uskutečnění přenosu klíšťat na hostitele z řad obratlovců.

Během metamorfózy klíštěte přechází infekce postupně z jednoho stádia na druhé. Vertikální neboli transovariální přenos *B. burgdorferi* s.l. u klíšťat byl sice experimentálně prokázán, ale při generalizované infekci klíštěte dochází k degeneraci vajíček nebo poruše ovipozice. Proto nemá větší význam pro udržování borrelií v přírodním ohnisku (Bartůněk 2006; Prokeš 2015).

Klíčovým faktorem úspěšného přenosu je schopnost těchto patogenů využívat farmakologické vlastnosti slin jejich vektorových klíšťat. Proteiny a další látky vylučované ve slinách klíšťat regulují hemostatické, zánětlivé a imunitní reakce hostitele, s cílem usnadnit sání krve. Tyto bioaktivní molekuly slin zahrnují proteiny vázající imunoglobulin, proteiny vázající histamin, regulátory přirozených zabíječských buněk a interferonů a inhibitoru komplementu. Rozluštěním obsahu slin klíšťat a pochopením jejich interakcí s hostitelem a patogenem můžeme identifikovat nové strategie pro tlumení nemocí (Nuttall 1999).

3.3.3 Vakcinace

Přirozená odolnost proti borreliové infekci neexistuje, onemocnět může každý člověk, který přijde do styku s infikovaným klíštětem, i opakovaně (Buchancová et al. 2009).

Od roku 1998 byla v USA dostupná humánní vakcína LYMERix (Smith Kline Beecham) obsahující antigen jen proti *Borrelia burgdorferi* s.s., která byla po 4 letech výrobcem stažena (v roce 2002). Ani na evropském trhu ještě neexistuje humánní vakcína proti borelióze (důvodem je velká heterogenita antigenů borrelií). Situace na poli veterinárního lékařství není zdaleka tak beznadějná, vakcíny pro vnímavá domácí zvířata (zejména psy) jsou dostupné na českém i zahraničním trhu (Aronowitz 2012).

Některé druhy zvířat, zejména morčata, myši, králíci a hovězí dobytek, si na základě opakovaného kontaktu s klíšťaty ve svém přirozeném životním prostředí vytvořily proti těmto parazitům rezistenci (Wada et al. 2010). *B. burgdorferi* s.l. pravděpodobně přetrvává v infikovaných hlodavcích po celou dobu jejich života, aniž by vyvolala onemocnění. Naproti tomu u psů, skotu, koní vyvolává podobné spektrum symptomů jako u člověka (Bartůněk 2006). Klinické projevy u těchto zvířat se manifestují nekoordinovanými pohyby, letargií, někdy agresivitou, nechutenstvím, hubnutím, záněty očí. Výskyt u nevakcinovaných psů je 5-násobně

vyšší v porovnání s vakcinovanými Biocanon B (s antigeny *B. afzelii* a *B. garinii*). Člověk se může nakazit při neodborném vyndávání nakaženého klíštěte ze zvířete (Buchancová et al. 2009).

3.4 *Borrelia lusitaniae*

Kmen: Spirochaetae

Třída: Spirochaetes

Řád: Spirochaetales

Čeleď: Spirochaetaceae

Rod: *Borrelia*

Druh: *Borrelia lusitaniae* (Le Fleche et al. 1997)

Borrelia lusitaniae, patřící do komplexu patogenních bakterií *Borrelia burgdorferi* (sensu lato), využívá jako své rezervoáry ptáky, drobné savce a plazy, přičemž ptáci a hlodavci slouží pouze jako příležitostné rezervoáry, protože výskyt této borrelie je u nich vzácný (Poupon et al. 2006; Majláthová et al. 2006; Norte et al. 2015). *Borrelia lusitaniae* byla poprvé izolována z klíštěte *Ixodes ricinus* v Portugalsku v roce 1993 (Nuncio et al. 1993). V roce 1997 byla vymezena jako nový druh (Fleche et al. 1997). Mimo Portugalsko byla *B. lusitaniae* dále izolována z klíšťat rodu *Ixodes* žijících v lokalitách kolem pobřeží Středozemního moře. Následně bylo potvrzeno, že *B. lusitaniae* je z hlediska prevalence dominantním druhem borrelie přenášené klíšťaty v Portugalsku (Vieira et al. 2019), Srbsku (Ćakić et al. 2019) nebo Tunisku (Younsi et al. 2001). Dále je výskyt tohoto patogenu znám například z Itálie, kde detekovali tyto bakterie u larev a nymf klíšťat *I. ricinus* a ještěrek *Podarcis muralis*, *Podarcis siculus* a *Lacerta bilineata* (Mendoza-Roldan et al. 2019), nebo ze Slovenska (Majláthová et al. 2006), kde jsou hlavním rezervoárem ještěrky *Lacerta agilis* a *L. viridis*.

Patogenita pro člověka byla zpočátku považována za nepravděpodobnou. Kazuistiky však dokazují, že *B. lusitaniae* může u lidí způsobit různá onemocnění (kožní léze, kožní vaskulitida a artritida) (Collares-Pereira et al. 2004; Da Franca et al. 2005; Vieira et al. 2019). V roce 2001 byla *B. lusitaniae* izolována od pacienta s dlouhodobými a nespecifickými kožními projevy (Obr. 6). Pacientkou byla 46letá Portugalka s kožní lézí na levém stehně, která se během deseti let pomalu vyvíjela. Pacientka trpěla parestézií končetin, křeče, chronické bolesti hlavy a poruchy srdečního rytmu. Spirochaetální organismy byly kultivovány z biopsie kůže. Stav pacientky se zlepšil po 2 týdnech intravenózního podávání ceftriaxonu; kožní léze se dále nerozšiřovaly (Collares-Pereira et al. 2004; Da Franca et al. 2005).

```
TACTTTGACCATATTTTTATCTTCCATCTCTACTTTGCCAA
TTTGTTTATGCAACATAGAATAATATATATCTTTGTTTAATC
CATGTCAATATCTATTTTTATTTTTTATATTTTTTTAAATCAA
ACATTCAAAAAAATGAACATTTAAAAAACATAAAAAATAAA
TTCAAGATTTGAAGTATAAAATAAAAAACCCTGGCAATAA
CCTACTCTCCCGCGAACTCGCAGTACCATCAGCGAATAA
GAGCTTAACTTCTGTGTTCCGGAATGTTAACAGGTGTTTCC
TCTTTTCTTTAACCACCAGGGTTTTTATAAGGAAGACAAAA
ATATGGCCAAAGATACGGGTAA
```

Obr. 6: Sekvence lidského izolátu *Borrelia lusitaniae*. Převzato z (Collares-Pereira et al. 2004).

(de Carvalho et al. 2008) ve své studii představují izolaci *Borrelia lusitaniae* od 13leté ženy se syndromem podobným vaskulitidě. Přičemž svým výzkumem upozorňují lékaře na skutečnost, že *B. lusitaniae* může být u lidí patogenní, a je třeba zdůraznit, že pacienti mohou být séronegativní nebo mohou mít minimální množství protilátek a klinické příznaky, které nejsou specifické pro lymeskou boreliózu. Toto potvrzují i Vieira et al. (2019), kteří prováděli testy na imunoblotu a druhý ELISA, vždy s negativním výsledkem. Kdežto PCR zhodnotili jako vhodnější metodu detekce *B. lusitaniae*.

Z posledních případů popisují Vieira et al. (2019) 15letého chlapce z Portugalska trpící občasnými pulzujícími bolestmi hlavy spojené s nevolností. Pacient byl hospitalizován s těžkou bolestí hlavy, která přetrvávala několik hodin. Měl také potíže s mluvením a parestezie v pravé ruce. Nebyly patrné žádné kožní léze. PCR z mozkomíšního moku prokázala *Borrelia burgdorferi* sensu lato a následná sekvenace identifikovala genotyp *B. lusitaniae*. Po 21 dní mu byla podávána antibiotika ceftriaxon a bolesti hlavy brzy zmizely (Vieira et al. 2019).

3.5 Ještěrka zelená (*Lacerta viridis*)

Říše: Animalia

Kmen: Chordata

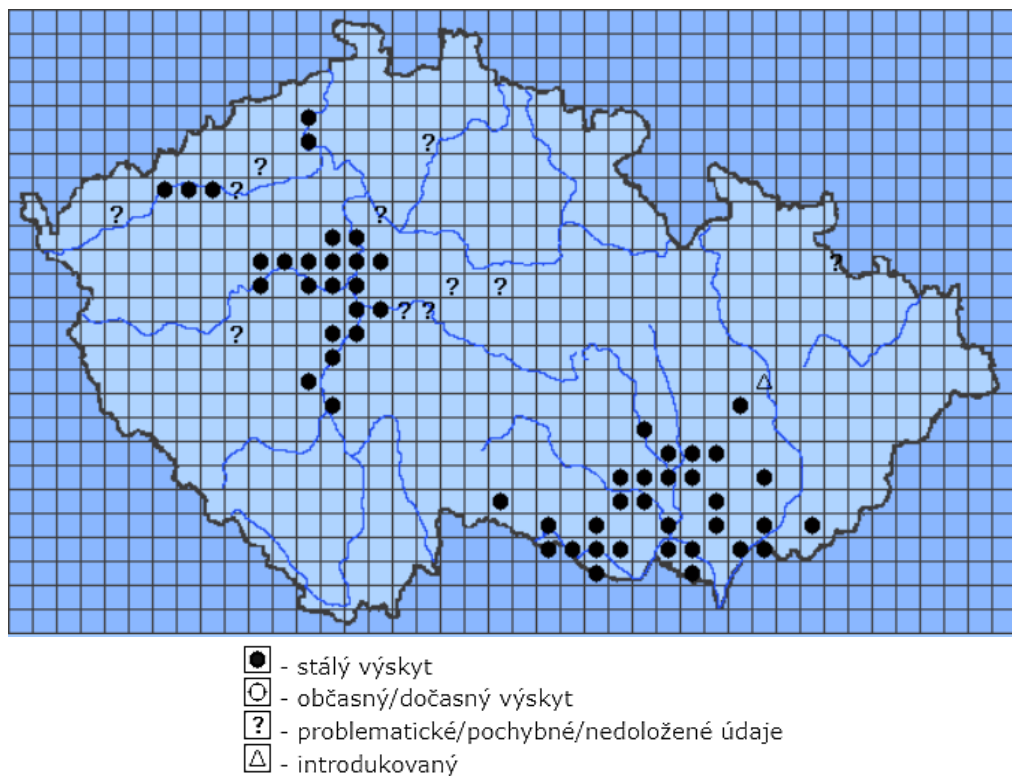
Řád: Squamata

Čeleď: Lacertidae

Rod: *Lacerta*

Druh: *Lacerta viridis* Linnaeus 1758

Ještěrka zelená je největším druhem ještěrky v České republice, vyskytuje se od nížin obvykle až do 450 m.n.m., výjimečně i výše. Taxonomicky patří české ještěrky zelené nominotypickému poddruhu (*Lacerta viridis viridis*). Co se týče distribuce, je zde rozšířena na řadě lokalit, spadajících do povodí Dunaje, které tvoří součást souvislého výskytu tohoto druhu, sahající dále na jih a jihovýchod (Obr. 7). Vedle toho je známa u z řad lokalit v Čechách z povolí Labe, které jsou však od souvislého druhového areálu geograficky izolovány a svou existencí jsou úzce svázány s tzv. říčním fenoménem (Zwach 2013).



Obr. 7: Mapa rozšíření *Lacerta viridis* v České republice. Převzato z Biolib.cz.

Přestože existují fosilní doklady (Dolnice u Chebu) o přítomnosti forem blízkých ještěrce zelené již z doby miocénu (Čerňanský 2010), recentní rozšíření ještěrky zelené

(*L. viridis*) je u nás výhradně výsledkem postglaciální holocenní expanze z jižnějších glaciálních refugií (Böhme et al. 2007).

Ještěrka zelená osídluje biotopy lesostepního charakteru a dobře osluněná místa s příhodnými úkryty a vhodnou vlhkostí (suché, slunečné křovinaté stráně, údolí okolo velkých řek, skály, příkopy cest, staré sady a zahrady, železniční náspy, extenzivně využívané pastviny). Preferuje lokality, jejichž terén nebo vegetace jsou členité (Véle 2018).

Vzhledem k okrajovému výskytu jsou jeho populace ohroženy i nepříznivým počasím. Nejčastěji je však tato ještěrka ohrožena změnami a zánikem vhodných biotopů či predací kočkami. V severních částech Turecka je tento druh místně ohrožen používáním pesticidů, což způsobuje absenci kořisti nebo požití kořisti přímo s pesticidy (Zwach 2013; Véle 2018).

V České republice patří ještěrka zelená podle přílohy č. III vyhlášky ministerstva životního prostředí ČR č. 395/1992 Sb. (upravující některá ustanovení zákona č. 114/1992 Sb.) mezi kriticky ohrožené druhy a její přežití je díky silnému narušení stanovišť nejisté. Na mnoha lokalitách ještěrky přežívají na hranici druhových možností, s čímž úzce souvisí i jejich značná zranitelnost (Fischer & Reháček 2010).

3.5.1 Morfologie

Zbarvení *L. viridis* není příliš proměnlivé. Samci mají hřbet zelený, žlutozelený až tmavě zelený, obvykle s černými tečkami. Břicho je běložluté až sytě žluté. Hrdlo je bělavě namodralé, na jaře (v období páření) se samcům zbarvuje do modra a někdy až do modrofialové barvy. Toto modravé zbarvení může přecházet i na tváře nebo krk. Samice jsou zbarveny buď celé zelenavě, nebo mohou mít 2 až 4 bělavé pruhy podél těla (Zwach 2013).

Samci tohoto druhu dosahují velikosti obvykle od 26 do 33 cm, ale v podmínkách České republiky může dorůst délky až 36 cm i více. Samice dorůstají délky od 22 do 29 cm, přes 30 cm jen zcela výjimečně (Zwach 2013). Šapovaliv (1987) zjistil u křivoklátské populace následující maximální hodnoty: samci 44,5 cm; samice 37 cm. Ocas je vždy nejméně dvakrát delší než tělo, pokud se nejedná o regenerát. Na hřbetě je 46 až 72 podélných řad zrnkovitých šupin. Stehenních pórů bývá 14 až 19. Končetiny jsou dobře vyvinuty a umožňují poměrně velké skoky a rychlý běh (Zwach 2013).

3.5.2 Etologie

Ještěrka zelená je denní, heliofilní stepní až lesostepní druh, což výrazně ovlivňuje její chování. Aktivuje zrána za rosy, aby se napila, ale nevzdaluje se příliš od svého nocoviště. Poté čeká při okraji svého úkrytu na slunce. Sluní se až po oschnutí rosy, obvykle po 8 hodině ranní. Má-li tu možnost, vyhřívá se na vyvýšených místech v rámci lokality jako jsou velké kameny, skalní útvary, keře či větve stromů. Z těchto míst zvláště osamělí samci velmi bedlivě pozorují své teritorium, které si důsledně brání (Obr. 5) (Zwach 2013).

Ještěrka zelená má většinou silně teritoriální chování, které však v případě maloplošného rozsahu výskytu nebo mimořádně silného výskytu může být potlačeno. Úzce to

souvisí s úživností území a s nabídkou vhodných úkrytů (Zwach 2013). Teritoriální chování bylo během odchyty zpozorováno především koncem dubna, začátkem května, kdy dochází k páření. Během tohoto období spolu samci urputně bojují jak o teritoria, tak i o samice. Fischer & Reháček (2010) uvádí že z 797 případů pozorování slunících se ještěrek, bylo 708 (88,8 %) právě ve vzdálenosti do cca 50 cm, 46 (5,8 %) ve vzdálenosti zhruba mezi 50 cm a 100 cm, 30 (3,8 %) ve vzdálenosti mezi zhruba 100 cm až 200 cm, 11 (1,4 %) ve vzdálenosti přibližně mezi 200 cm a 300 cm a pouze 2 (0,3 %) ve vzdálenosti nad 300 cm od nejbližšího možného úkrytu.

Většina adultních jedinců vykazuje v průběhu aktivní periody disperzi do individuálních domovských okrsků. K vyhledávání a obsazování prvních domovských okrsků dochází již krátce po opuštění zimních úkrytů. Největší domovské okrsky zaznamenali Fischer & Reháček (2010) u samců v období od opuštění zimních úkrytů do první ekdyse a v období prvního páření, tj. v době, kdy docházelo jednak k vyhledávání a obsazování vhodných okrsků popř. teritorií a hlavně k vyhledávání samic, uzavírání párů a k vlastnímu páření. Nejmenší domovské okrsky zaznamenali v průběhu lovecké periody a hlavně u samců v období gravidity samic a u samotných gravidních samic.

Při výběru domovských okrsků jsou preferována taková místa, která poskytují alespoň jeden, mnohem častěji pak větší počet vhodných úkrytů a v jejichž bezprostřední blízkosti se nachází vhodná místa ke slunění. Fischer & Reháček (2010) uvádí nejčastější úkryty: štěrbiny pod kameny a opuštěné nory hlodavců, a zcela výjimečně si ještěrky úkryty sami vyhrabávaly. Noční úkryty jsou v naprosté většině případů situovány do těsné blízkosti, popř. přímo do centra různých keřů (nejčastěji trnitých, jako jsou růže, ostružiníky, trnky a hlohy). Takovéto keře pak bývají také nejčastěji využívány jako příležitostné úkryty v rámci domovského okrsku i mimo něj.

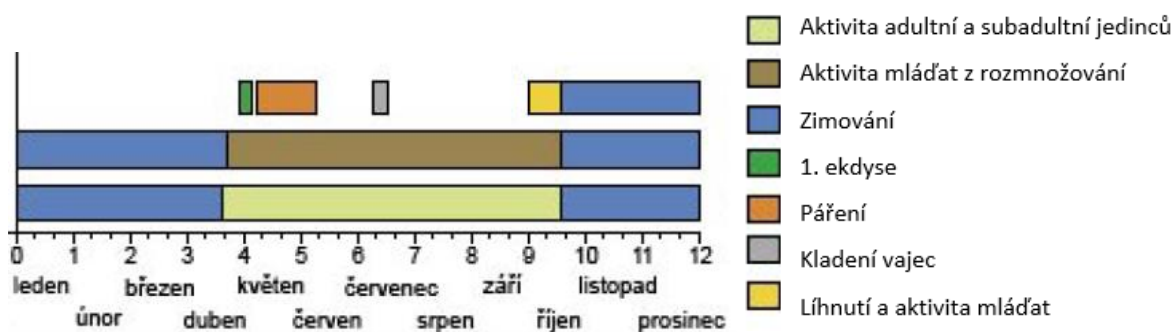
Po páření, koncem června až začátkem července, klade samice 4 až 18 vajíček do jamky hluboké 12 až 25 cm na výslunném místě. Hloubka jamky závisí hlavně na prohřátí a vlhkosti substrátu. Mláďata se líhnou z kožovitých vajec po 60 i více dnech, tedy koncem srpna až začátkem září, někdy ale až v říjnu (Obr. 8, Obr. 9). Dobu líhnutí ovlivňují venkovní teploty (Wrangel 1995).



Obr. 8.: Čerstvá mláďata ještěrky *Lacerta viridis*. Snímky pořízené v září 2020.
Autor: Lucie Musilová

Na jaře je aktivní až do 18 hodin. Během léta je vzhledem k vyšším teplotám aktivní ráno do 10 hodiny, poté zalézá do úkrytu. A pak od 16. - 17. hodiny, kdy vylézá lovit potravu. Ještěrka zelená se živí hlavně drobnými bezobratlými živočichy. Loví plže, červy a larvy hmyzu i dospělý hmyz, jako jsou brouci, motýli atd. (Zwach 2013).

Zimuje často hromadně s jinými jedinci svého druhu. Zimu tráví v děrách, ve skalních rozsedlinách či v kamenných zídkách, a to od října. Podle průběhu zimy a začátku jara na přelomu března a dubna opouštějí ještěrky zelené svá zimoviště (Obr. 9) (Zwach 2013).



Obr. 9: Grafické znázornění podrobného členění ročního cyklu aktivity a rozložení jednotlivých jeho částí v průběhu roku v oblasti Tichého údolí.
Převzato z Fischer & Reháček (2010).

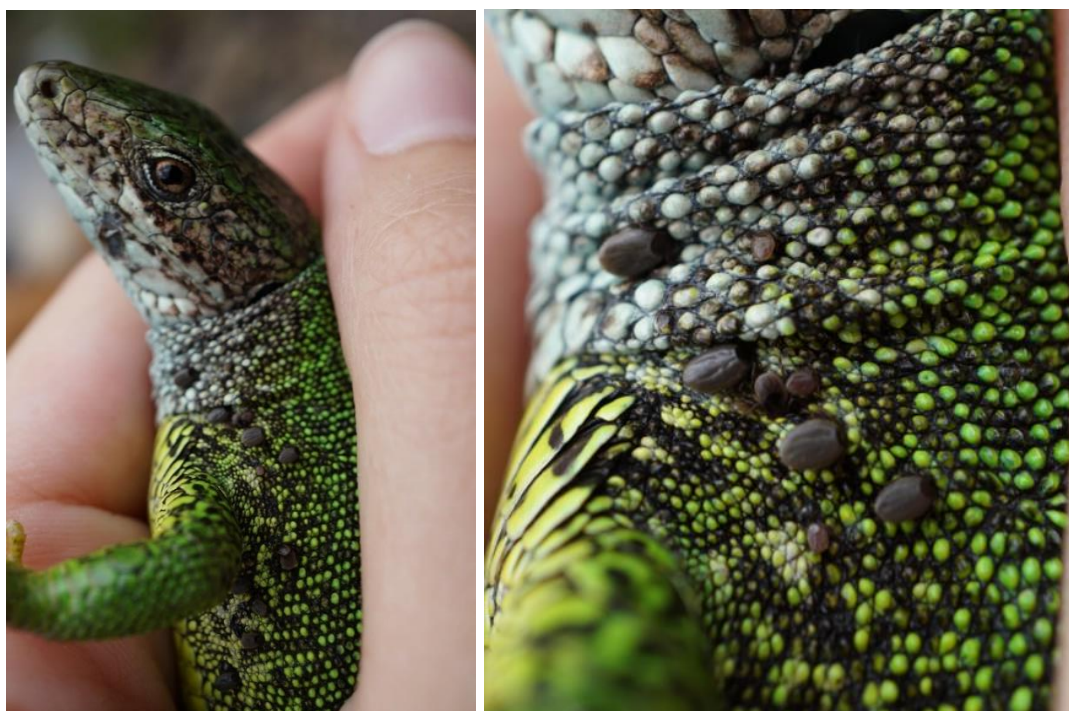
3.5.3 Parazité našich plazů

Vnitřními parazity plazů na území České republiky jsou nejčastěji oblí červi, hlavně škrkavky (Vojtková 1982). Z vnějších parazitů se u plazů často objevují roztoči, jako jsou sametky a klíšťata. Běžným druhem klíštěte u ještěrek a hadů je klíště obecné (*I. ricinus*).

Z dalších parazitů pak klíšť lesostepní (*Haemaphysalis inermis*), klíšť lužní (*H. concinna*), piják lužní (*Dermacentor reticulatus*) a piják stepní (*D. marginatus*) (Zwach 2013).

3.5.4 Ještěrka jako hostitel klíšťat

V České republice se této problematice věnoval Chmelař (2013), který zkoumal populaci ještěrek zelených v Tichém údolí na pomezí Středočeského kraje a hlavního města Prahy. Uvádí, že na většině odchycených jedinců (74 %) byly nalezeny larvy a nymfy klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*). Nejvyšší procento parazitace (93 %) a průměrný počet klíšťat na jedince (7,1) zjistil u adultních samců, nejnižší potom u mláďat. Klíšťata byla na zvířatech uchycena nejčastěji v kožních záhybech mezi krkem a předními končetinami (Obr. 10). Zřídka byla klíšťata nalézána i v okolí zadních končetin a přichycena na ušním tympanu.



Obr. 10: Vlevo, *Lacerta viridis* s velkým množstvím prisátých klíšťat. Vpravo, detailní záběr na nasátá klíšťata *Ixodes ricinus*. Autor: Lucie Musilová

Zbarvení, pohlavnímu výběru a parazitaci klíšťaty se detailně věnovali Václav et al. (2007), kteří na dvou nepřilíživě vzdálených lokalitách v Národním parku Slovenský kras zjistili negativní korelaci mezi počtem klíšťat na parazitovaném samci (rozptyl počtu klíšťat byl u samců 2 – 62 kusů) a saturací modrého zbarvení hrdla. Rovněž samci, kteří měli velmi vysokou hmotnost vztaženou k délce jejich ocasu (povětšinou regenerátu), byli parazitováni častěji. Naopak u samic míra parazitace korelovala se sytostí žlutého zbarvení břicha a parazitovány byly téměř výhradně malé samice. Na stejném území byla rovněž studována míra nakaženosti spirochetami rodu *Borrelia*, a to jak u ještěrek zelených, tak na nich nalezených larev a nymf klíšťat *Ixodes ricinus* (Majláthová et al. 2006). Ze 146 odchycených zvířat bylo odebráno celkem 469 klíšťat (199 larev, 270 nymf). Samci ještěrek byli zamořeni 363 klíšťaty (131 larev a 232 nymf), což představovalo 77,4 % všech sebraných klíšťat.

U ještěrek *L. viridis* a *L. agilis* je intenzita zamoření klíšťaty vyšší u samců než u samic. Což je pravděpodobně dáno tím, že samci jsou více aktivní a mají větší domovský okrsek než samice (Majláthová et al. 2006; Földvári et al. 2009).

Pozitivní korelace byla také zaznamenána při studiu parazitace populací u *Psammmodromus algirus* ve středním Španělsku (Salvador et al. 1996), a to konkrétně mezi krevní koncentrací testosteronu a sklonům k parazitaci klíšťaty. Větší množství klíšťat bylo na stejných samcích zjištěno i po umělém zvýšení hladin testosteronu. Podle tvrzení výše uvedených autorů jsou tedy samci s vyšší produkcí testosteronu obecně náchylnější k parazitaci.

Zamoření klíšťaty je ovlivněno mnoha biotickými (např. množství hostitelů na lokalitě, aktivita klíšťat) a abiotickými (např. množství vegetace, vlhkost vzduchu, teplota vzduchu) faktory, pro jejichž vysvětlení je nutné provést další srovnávací studie. Z tohoto důvodu jsme se v práci zaměřili na výše uvedené faktory, abychom mohli později porovnat obě sledované lokality mezi sebou, ale také vzhledem k předchozím provedeným studiím (Majláthová et al. 2006; Földvári et al. 2009).

3.6 Charakteristika lokalit

Odchyt probíhal na lokalitě Tiché údolí v okolí Únětického potoka. Značná část lokality je chráněna jakožto Přírodní rezervace Tiché údolí – Roztocký háj. Přírodní rezervace byla vyhlášena roku 1951 československým ministerstvem školství, věd a umění. Nachází se na jižním okraji města Roztoky u Prahy, v severním sousedství městských částí Sedlec a Suchdol hlavního města Prahy. Chráněné území o rozloze 111,4 ha, které je ve správě Krajského úřadu Středočeského kraje, tvoří zalesněné stráně Tichého údolí a Roztocký háj nad soutokem Únětického potoka a řeky Vltavy (Havránek et al. 2011).

Údolí má charakter soutěsky. Jeho významnými součástmi jsou fragmenty vřesovišť a skalních stepí s původní květenou na skalních výchozech, stanoviště drobné i větší fauny, louky a vodní tok. Nadmořská výška se pohybuje od 216 od 310 m.n.m. Nejnížší bod leží na centrálních loukách kolem vodního toku, nejvyšší body pak na skalách v jihozápadní části území (Němec & Slavík 2016).

V přírodní rezervaci se na části plochy dochoval přirozený les a v něm se vyskytují významné druhy fauny bezobratlých. Žije tu i početná ptačí populace (asi 80 druhů ptactva, např. žluna zelená, žluna šedá, krutihlav obecný a další) (Havránek et al. 2011).

Chráněné území lze rozdělit na několik hlavních biotopů s odlišnými společenstvy bezobratlých živočichů. Xerothermní stráně, stepní trávníky, stepi a skalní výchozy, vřesoviště, listnaté lesy, nivu potoka s mokřady, močály a loukami. Z plžů zde žije vlahovka rezavá (*Pseudotrichia rubiginosa*) a dvojzubka lužní (*Perforatella bidentata*). Na xerothermních stanovištích skalních výchozů žijí reliktní a vzácné druhy hmyzu jako je střevlíček rákosní (*Odacantha melanura*) nebo český endemit váleček český (*Cylindromorphus bohemicus*) z čeledi krascovitých, dále zlatěnka modrá (*Stilbum cyanurum*), zlatěnka ohnivá (*Chrysis ignita*), stepník rudý (*Eresus kollari Rossii*). Na miříkovitých rostlinách v teplomilných

trávnících žijí housenky chráněného motýla otakárka fenyklového (*Papilio machaon*). Mezi častější druhy patří babočka kopřivová (*Aglais urticae*) a babočka admirál (*Vanessa atalanta*), objevující se jak na xerothermních stráních, tak i v listnatých lesích (Ložek & Kubíková 2005; Havránek et al. 2011).

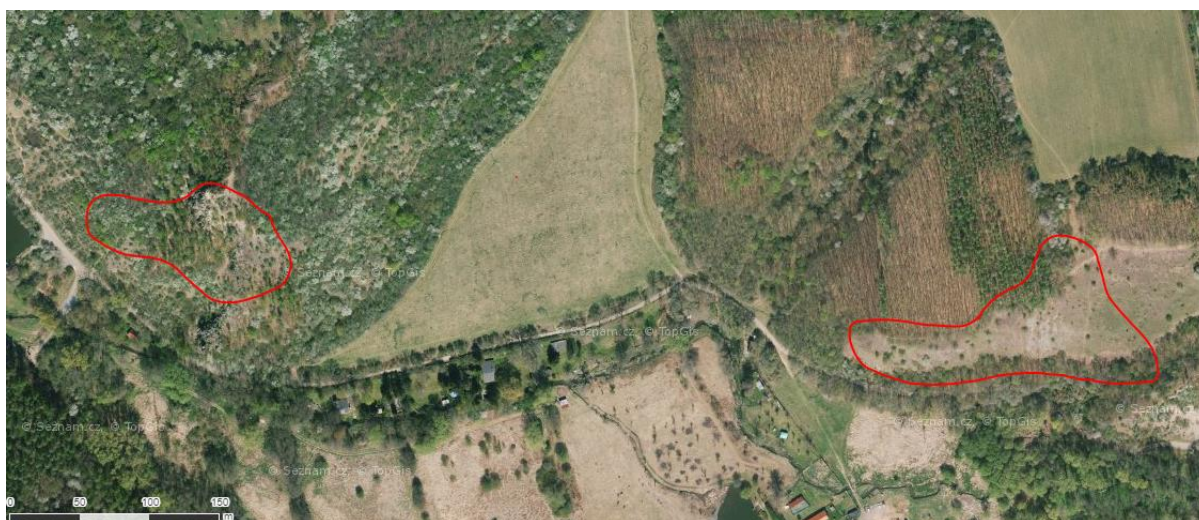
Území je druhově pestré. V rákosinách hnízdí řada vodních druhů ptáků, například rákosník obecný (*Acrocephalus scirpaceus*) a rákosník zpěvný (*Acrocephalus palustris*). V močálech nalezneme chřástala vodního (*Rallus aquaticus*), slípku zelenonohou (*Gallinula chloropus*) a strnada rákosního (*Emberiza schoeniclus*). Z plazů zde mimo ještěrky zelené žije ještěrka obecná (*Lacerta agilis*), slepýš křehký (*Anguis fragilis*) a ve vlhčích mokřadech užovka obojková (*Natrix natrix*), a také ropucha obecná (*Bufo bufo*). Jedním z nejvýznamnějších druhů je zde mlok skvrnitý (*Salamandra salamandra*), který je podobně jako ještěrka zelená silně ohrožený. Únětický potok je pstruhový revír, kam je vysazován pstruh potoční (*Salmo trutta*) a pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*). Ze savců na vlhkých místech žije rejsec vodní (*Neomys fodiens*) a náš nejmenší hlodavec, myška drobná (*Micromys minutus*). V okolí Roztok je hojným druhem srnec obecný (*Capreolus capreolus*). Méně častěji pak prase divoké (*Sus scrofa*) (Ložek & Kubíková 2005; Havránek et al. 2011).

Území přírodní rezervace je využíváno k pastvě hospodářských zvířat, hlavně koz a ovcí. Díky pestrému geologickému složení podkladu se zde prováděla těžba. Dnes jsou svahy údolí narušeny řadou lomů. Jižní stráně Tichého údolí sloužily od konce 19. století jako sady a vinice. Cílem ochrany je zde udržování a obnovení biotopů vřesovišť (koniklec luční), skalních stepí (ještěrka zelená) a listnatých lesů nutných pro druhově bohatá společenstva. Pro udržení strukturně bohatých prosvětlených porostů je nutné extenzivní hospodaření (Ložek & Kubíková 2005; Havránek et al. 2011).

4 Metodika

4.1 Lokality

V rámci Tichého údolí byly sledovány dvě lokality (Obr. 11). Lokality v Tichém údolí představují místo, kde se setkává velká škála hostitelů (potenciálních rezervoárů) a zároveň se nachází v příměstské zóně, kam chodí lidé odpočívat či venčit psy.



Obr. 11: Satelitní snímek lokalit, které byly předmětem sběru dat. Lokalita vlevo tzv. Holý vrch ozn. „Skály“, lokalita vpravo ozn. „U lomu“. Převzato z archivu www.mapy.cz.

4.1.1 Lokalita „Skály“

První lokalita dostala pracovní název „Skály“ (GPS: 50.148325, 14.367397). Zahrnuje oblast turistické vyhlídky Holý vrch, kamenitý svah včetně pěšin na kopec. Vrchní část lokality tvoří vyhlídka Holý vrch. Během letních měsíců byla velmi navštěvovaná turisty. I přesto bylo možné v odpoledních hodinách nalézt slunící se samce ještěrek zelených na kamenech u cesty na hřebenu kopce (Obr. 12).

Většinou byly ještěrky pozorovány ve svahu pod vyhlídkou nebo slunící se na pěšině na západním svahu. Celá lokalita má velmi náročný kamenitý terén s několika břízami a duby. Úkryty ještěrek zde nejčastěji představovaly díry při bázi kmene stromů, pařezů či štěrby ve skalách.



Obr. 12: Fotografie vlevo z lokality „Skály“ ukazující skalnatý svah porostlý vřesem. Fotografie vpravo pohled z vyhlídky Holý vrch. Autor: Lucie Musilová

4.1.2 Lokalita „U lomu“

Druhá lokalita má pracovní název „U lomu“ (GPS: 50.1476172N, 14.3745589E). Začíná u velkého lomu v údolí, přes vřesoviště k dubovému lesu v horní části svahu. Západní svah je více kamenitý, na kraji lesa s drobnou skalkou. Na skalce byly během léta pozorovány užovky hladké. Lokalita je velmi otevřená s pouze pár stromy, ale s velkým množstvím nízkých keřů (Obr. 13). Těchto keřů ještěrky zelené využívají především ke slunění. Díky svému zelenému zabarvení splývají s listy keřů.



Obr. 13: Pohled na část sledované lokality „U lomu“. Autor: Lucie Musilová

Tato lokalita bývá několikrát ročně využívána k pastvě koz a ovcí (vždy po dobu zhruba 2 - 3 týdnů). Ovce spásají travní porosty a kozy okusují především listy dřevin. Spásání porostů představuje tradiční a zároveň k přírodě šetrný a efektivní způsob obhospodařování pozemků, zejména v těžko přístupném terénu. Nicméně během pastvy se ještěrky stáhly do hustého porostu při cestě v údolí. S absencí vegetace nebylo možné jedince na lokalitě pozorovat. S mizejícími listy jsou keře více otevřené a zbývají téměř holé větvičky, které pro ještěrky nepředstavují dostatečně bezpečný úkryt.

Vřesoviště nabízí početné množství různých úkrytů, narozdíl od první lokality, která nemůže nabídnout tolik vegetace. Ještěrky z první lokality byly také méně plaché, pravděpodobně je to způsobené tím, že jsou na lidi více zvyklé, vzhledem k přilehlé turistické stezce na vyhlídku „Holý vrch“.

4.2 Sběr dat

4.2.1 Odchyt ještěrek

Odchyt ještěrek probíhal ručně nebo pomocí smyčky v souladu s metodikou dříve publikovaných prací (Majláthová et al. 2006; Taragel'ová et al. 2016) od dubna do září roku 2020. Smyčka, vytvořená ze silonového vlasce, byla připevněna na konci dřevěné tyče, pověšena před ještěrku a utažena, jakmile ještěrka vkročila do oka. Odchyt pomocí smyčky se osvědčil hlavně na lokalitě „U lomu“, kde se ještěrky sluní na vrcholcích nízkých keřů, tedy není možné rukou sáhnout mezi větve bez vyplašení ještěrky. Ruční odchyt byl více vhodný na lokalitě „Skály“, kde je méně vegetace a ještěrky odpočívají na velkých kamenech.

Odchycené exempláře byly umístěny do prodyšného látkového vaku na dobu nezbytně nutnou k přípravě náčiní k odběru tkáně a klíšťat. Přestože se hlavně během jara ještěrky (zejména samci) snažily bránit (kousáním) nebo ze sevření uvolnit prudkými mrskavými pohyby těla i ocasu, k autotomii ocasu nedošlo ani u jednoho z 52 odchycených jedinců. Odchycená zvířata byla dle věku a pohlaví rozdělena do tří skupin, (1) juvenilové, (2) samci (subadultní, adultní), (3) samice (subadultní, adultní).

Dále byla sledována přítomnost klíšťat *Ixodes ricinus*. Klíšťata byla šetrně odstraněna pinzetou a uložena ve 2 ml zkumavkách Eppendorf do 70% ethanolu a popsána příslušným kódem. Později byla v laboratoři rozdělena do dvou skupin: (1) larvy, (2) nymfy (Příloha 1).

Vzorek tkáně pro potvrzení přítomnosti *B. lusitaniae* byl odebírán z konce ocasu ještěrek sterilními nůžkami a vložen do samostatných zkumavek Eppendorf se 70% ethanolem a popsán příslušným kódem.

Do záznamových archů byly zanášeny následující údaje: Datum a čas odchytu (hodina, minuta), lokalita, pohlaví (JUV - mládě, M - samec, F - samice), poznámka k celkovému stavu jedince (zranění, ztráta ocasu) či charakteristický znak. Na závěr byly pořízeny fotografické snímky (Sony Alpha 6000, Sony Corporation) ještěrek pro budoucí zpětnou identifikaci

jedinců. Poté byly ještěrky vypuštěny zpět na lokalitě, kde byly odchyceny. Doba zachycení nikdy nepřekročila 15 minut.

4.2.2 Výjimka ze zákona

Vzhledem k tomu, že je druh *Lacerta viridis* chráněn zákonem č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny, který zahrnuje jakoukoli manipulaci s ohroženými druhy bez předchozího udělení výjimky, bylo nutné o tuto výjimku zažádat. Ještěrka zelená je druh zařazený dle č. III vyhlášky MŽP č. 395/1992 Sb. do kategorie kriticky ohrožený a zároveň je druh *Lacerta viridis* dále chráněn dle přílohy IV. (druhy živočichů a rostlin v zájmu společenství, které vyžadují přísnou ochranu) Směrnice Rady č. 92/43/EHS z 21. května 1992 o ochraně přírodních stanovišť, volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin.

Požadovanou výjimku je možné povolit pouze v případě, kdy jiný veřejný zájem převažuje nad zájmy ochrany přírody nebo je v zájmu ochrany přírody. Dále jelikož ještěrka zelená patří mezi druhy, které jsou předmětem ochrany podle práva Evropských společenství, lze výjimku navíc povolit pouze v případě neexistence jiného uspokojivého řešení.

Výjimka byla udělena Odborem životního prostředí a zemědělství z Krajského úřadu Středočeského kraje s platností od 7. 4. 2020 do 31. 12. 2021 pro oblasti Tiché Údolí v Úněticích u Prahy. Konkrétně bylo povoleno rušit, chytat druh *L. viridis* za účelem monitoringu patogenů rodu *Borrelia*.

4.2.3 Sběr klíšťat

Na obou sledovaných lokalitách byl také proveden sběr klíšťat z vegetace. První termín sběru klíšťat byl proveden ve dnech 27. – 30. 4. 2020. Tento termín sběru byl vybrán díky příznivým podmínkám pro klíšťata. Sběr klíšťat z lokalit probíhal metodou „vlajkování“. S pomocí bílé látky 80 x 100 cm a dřevěné tyče byla vytvořena „vlajka“ a následně tažena nad vegetací. Klíšťata z keřů a trávy se přichytila na látce. Klíšťata byla z vlajky sbírána entomologickou pinzetou, roztríděna na larvy, nymfy, samce a samice (Obr. 14). Z každé lokality bylo sebráno minimálně 50 klíšťat, která byla přímo na lokalitě usmrcena a uložena ve zkumavkách typu Falcon (25 ml) s 70% ethanolem.



Obr. 14: Navlajkovaná klíšťata – nymfy, samci, samice *Ixodes ricinus*.
Autor: Lucie Musilová

4.3 Analýza vzorků

4.3.1 Uchování vzorků

Klíšťata a vzorky ocasních tkání ještěrek byly uloženy v 2 ml zkumavkách Eppendorf v 70% ethanolu a skladovány při teplotě $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ v chladicím boxu.

4.3.2 Izolace DNA

Genomická a plasmidová DNA ze vzorků klíšťat a ocasní tkáně ještěrek byla extrahována pomocí komerční soupravy QIAamp DNA minikit (Qiagen) v souladu s pokyny výrobce. Izolace probíhala manuálně za použití kolonek podle protokolu výrobce s postupem níže.

- (1) Vzorek (ocasní tkáň či klíšťe) byl umístěn do sterilní mikrozkušavky (obsahující nerezové homogenizační kuličky) s 400 μl sterilní vody. Uzavřená zkumavka byla vložena do homogenizéru (MagNa Lyser) na 90 sekund při rychlosti 5000 rpm. Vzorek se mechanicky rozbil. Tekutý obsah byl přepipetován do 2 ml zkumavek Eppendorf.
- (2) V dalším kroku bylo přidáno do každé zkumavky 180 μl ATL pufru a 20 μl proteinázy. Zkumavky byly krátce zvortexované, aby došlo k dokonalému promíchání. Fragmenty tkáně byly inkubovány při $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ v lyzačním pufru po dobu 30 - 60 minut (podle velikosti templátu), dokud nebyla tkáň zcela zlyzovaná.
- (3) Po inkubaci byly zkumavky umístěny krátce do centrifugy, aby kapičky z víčka stekly a nedošlo při otevření zkumavek ke kontaminaci vzorků mezi sebou. Dále bylo přidáno 200 μl ethanolu (96 - 100%), krátce zvortexováno a inkubováno při $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut.
- (4) Opět po inkubaci centrifugováno a následně byl obsah zkumavek (v množství 600 μl) přepipetován do zkumavek s kolonkou. Centrifugováno $6000\text{ g} \times (8000\text{ rpm})$ po dobu 1 minuty. Sběrná zkumavka s tekutým obsahem byla vyhozena a nahrazena novou.

- (5) Na membránu kolonky bylo v dalším kroku napipetováno 500 μ l promívacího AW1 pufru. Opět zcentrifugováno 6000 \times g (8000 rpm) po 1 minutu a sběrná zkumavka nahrazena novou.
- (6) Druhé promývání pomocí 500 μ l AW2 pufru na pipetovaného na membránu kolonky. Centrifugováno při plné rychlosti 20000 \times g (14000 rpm) po dobu 3 minut. Sběrná zkumavka byla opět nahrazena novou.
- (7) Na střed membrány v kolonce bylo v posledním kroku napipetováno 100 μ l AE pufru, inkubováno 1 minutu při pokojové teplotě a následně centrifugováno 6000 \times g (8000 rpm) na 1 minutu. Po centrifugaci bylo na membránu napipetováno znovu 100 μ l AE pufru a znovu centrifugováno 6000 \times g (8000 rpm) po dobu 1 minuty.
- (8) Výsledný filtrát (v množství 200 μ l) byl přepipetován do zkumavek Eppendorf (aliquoty 100 μ l) a příslušně označen číslem a typem vzorku a datem izolace. Následně umístěna do mrazícího boxu (-25 °C).

4.3.3 PCR

Pro detekci borrelií byl amplifikován ~ 222-255 bp dlouhý úsek *rrfA-rrfB* intergenového mezeríku *B. burgdorferi* s.l..

Na jednu reakci bylo použito 12,5 μ l HotStart Taq (Qiagen), 5 μ l sterilní vody, 1,25 μ l primeru IGSa (10 μ M) a 1,25 μ l primeru IGSb (10 μ M). Použité primery (Generi Biotech) jsou 21- mery:

IGSa: 5' CGA CCT TCT TCG CCT TAA AGC 3'

IGSb: 5' AGC TCT TAT TCG CTG ATG GTA 3'

Připravená reakce o celkovém objemu 20 μ l byla důkladně promíchána a přepipetována v PCR boxu do připravených PCR zkumavek (stripů, o objemu 0,25 ml), do kterých bylo přidáno 5 μ l testované DNA. Mimo testovaných vzorků byla vytvořena pozitivní a negativní kontrola. Negativní kontrola se skládá z připravené reakce výše (o objemu 20 μ l) a 5 μ l sterilní vody. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA kultivátu *B.lusitaniae* ze sbírky kultur NRL pro lymeskou borreliózu. Připravené zkumavky byly popsány a vloženy do termocykleru (Bio-Rad PTC-200).

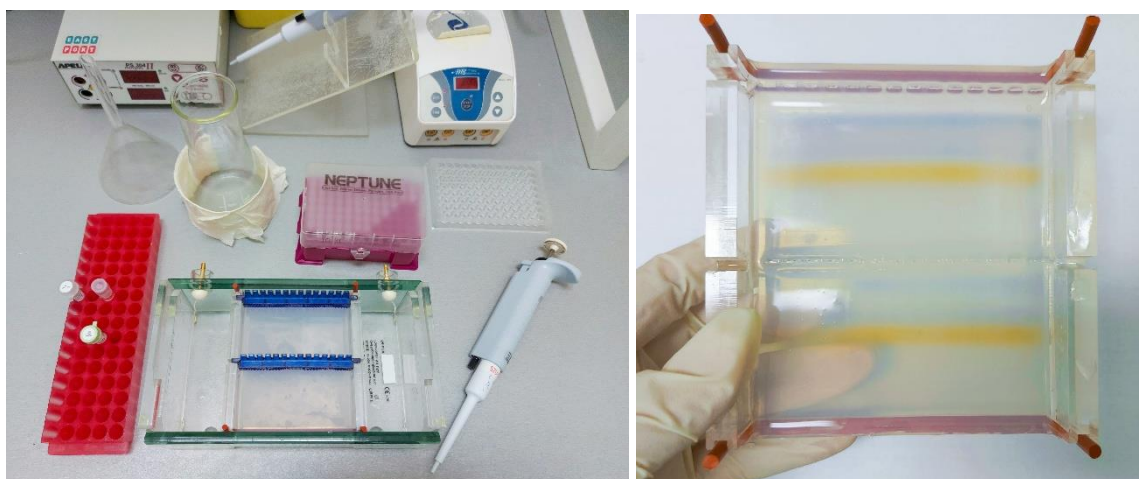
V termocykleru byla zvolena forma „touch down“ PCR (TD-PCR), aby se zamezilo amplifikaci nespecifických sekvencí. Při TD-PCR je počáteční annelační teplota vyšší než optimální teplota tání primerů (T_m) a postupně se v následujících cyklech snižuje, dokud není dosaženo T_m . Průběh amplifikace, přehled navoleného programu viz Tab. 1.

Tab. 1: Průběh využívaného „touch down“ PCR.

PRG: RRFAB		
95°C.....15min		
94°C.....60s	5x (↓0,2°C / cyklus)	94°C.....60s
61°C.....25s		60°C.....25s
72°C.....60s		72°C.....60s
72°C.....10min	5x (↓0,4°C/cyklus)	94°C.....60s
4°C.....forever		58°C.....30s
		72°C.....60s

4.3.4 Elektroforéza

Produkty PCR byly podrobeny elektroforéze na agarózovém gelu. Pro přípravu malého gelu (28 jamek) bylo použito 10 ml 10X TAE puftru, 90 ml destilované vody, 1,2 g agarózy (CondaLab Pronadisa) a 10 µl GelRed (Biotium). Majláthová a kol. (2006) použili k obarvení ethidiumbromid (EB), v této práci byl EB nahrazen barvivem GelRed. GelRed (Nucleic Acid Stain 0,5 ml) je ultra citlivé, extrémně stabilní a ekologicky bezpečné fluorescenční barvivo využívané místo vysoce toxického EB pro barvení dsDNA, ssDNA nebo RNA v agarózových nebo polyakrylamidových gelech. GelRed je mnohem citlivější než EB a mají prakticky stejná spektra, tudíž může být EB nahrazen GelRed.

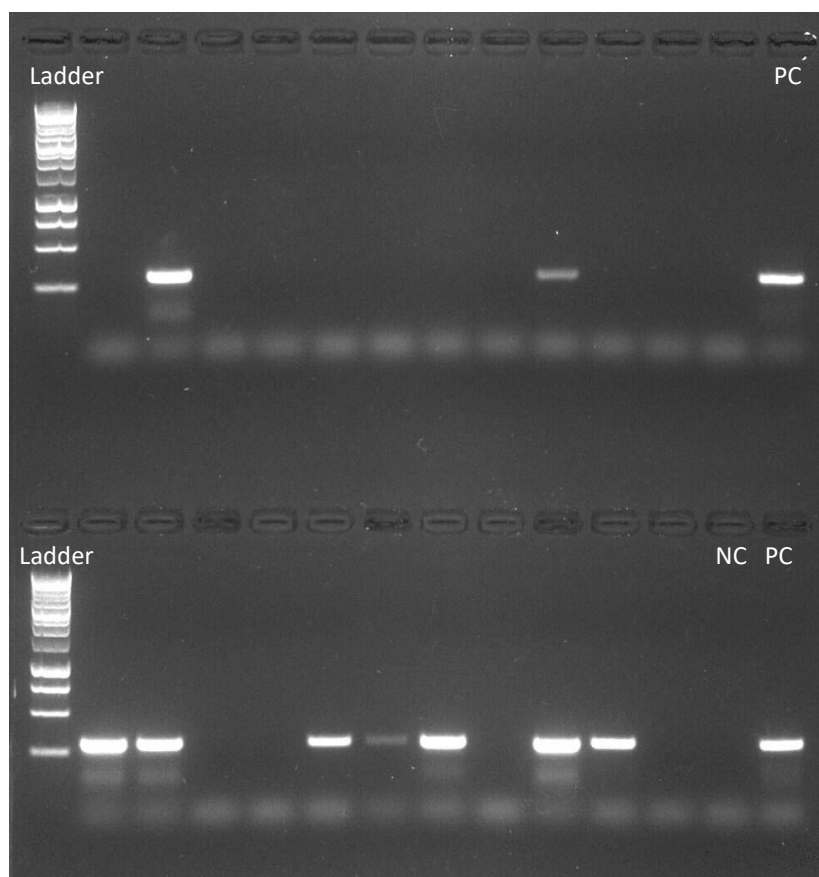


Obr. 15: Příprava agarózového gelu v horizontální vaně. Vpravo gel po elektroforéze.

Autor: Lucie Musilová

Připravená směs pro gel byla nalita do horizontální vany s připravenými hřebínky na jamky a ponechána 20 minut tuhnout (Obr. 15). Ztuhnutý gel byl zalit 1X TAE pufrem, hřebínky byly vyjmuty. Do jamek byla pipetována směs, skládající se z 1,5 µl Blue/Orange Loading Dye 6X (Promega) a 5 µl amplifikované DNA. Barvivo „loading dye“ se používá pro zavedení vzorků DNA do jamek pro gelovou elektroforézu a sledování migrace během elektroforézy. Do prvních jamek v obou řádcích bylo napipetováno 3 µl 1kb DNA Ladder (Promega). Do poslední jamek vždy pipetování pozitivní kontrola, do předposlední jamky negativní kontrola.

Elektroforéza byla spuštěna na konstantní napětí 100 V (při malém gelu, 28 reakcí) po dobu 45 minut. Po skončení elektroforézy byl gel vyjmut z vany a opatrně přemístěn na plochu UV transluminátoru (Vilber, BIO-PRINT CX4 Edge).



Obr. 16: Ukázka gelu z transluminátoru. Gel s dvěma hřebínky po 14 jamkách. V první jamce napipetován 1kb DNA Ladder. V jamkách 2 až 12 jednotlivé templáty. V předposlední jamce negativní kontrola, v poslední jamce pozitivní kontrola. Pozitivní bandy (proužky) mezitím jsou templáty.

V počítačovém programu Vilber byl gel následně vyhodnocen podle přítomnosti bandů (proužků) (Obr. 16). Negativní vzorky byly z další analýzy vyloučeny. Slabé bandy byly znovu podrobeny opětovné PCR amplifikaci. Reamplifikace méně výrazných proužků prokázala přítomnost borreliové DNA. Pozitivní vzorky byly dále analyzovány pomocí sekvenace amplifikovaného úseku 5S (rrfA) - 23S (rrlB) rDNA intergenetického mezerníku. Pozitivní amplifikované vzorky byly tedy dále skladovány při teplotě -25 °C.

4.3.5 Purifikace produktů po amplifikaci

Čištění produktů po PCR probíhalo v Clean Air boxu za použití kitu High Pure PCR Produkt Purification Kit (výrobce Roche).

- (1) Pozitivní produkty z amplifikace (o objemu 20 μ l) byly po rozmražení krátce zcentrifugovány. Přidáno 80 μ l sterilní vody a celý obsah přepipetován do 2 ml zkumavek Eppendorf. Přidáno bylo ještě 500 μ l „Binding Buffer“, krátce zvortexováno

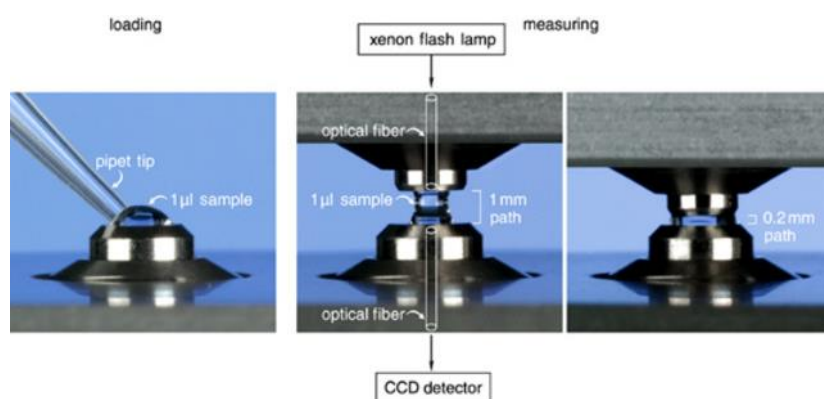
a přepipetováno na zkumavku s kolonkou a následně centrifugováno při plné rychlosti (13000 rpm) po dobu 1 minuty.

- (2) Sběrná zkumavka byla včetně obsahu vyhozena a nahrazena novou. Na kolonku bylo napipetováno 500 μl „Washing Buffer“ a zcentrifugováno při 13000 rpm po dobu 1 minuty.
- (3) Pro druhé promývání byla znovu vyměněna sběrná zkumavka a napipetováno 200 μl „Washing Buffer“ na membránu kolonky. Po zcentrifugování při 13000 rpm po dobu 1 minuty byla sběrná zkumavka s filtrátem vyhozena, opět nahrazena novou a zkumavka s kolonkou byla umístěna do centrifugy na 1 minutu při plné rychlosti (13000 rpm) naprázdno. Poté zůstaly kolonky 5 minut otevřené.
- (4) Po výměně sběrných zkumavek bylo napipetováno do kolonky 20 μl sterilní vody a následně 5 minut inkubováno při pokojové teplotě. Na závěr centrifugováno při plné rychlosti (13000 rpm) 1 minutu. Výsledný filtrát byl přepipetován do zkumavek Eppendorf a příslušně označen číslem a typem vzorku.

4.3.6 Měření koncentrace DNA

Dalším krokem je orientační spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA. Měření koncentrace DNA probíhalo na spektrofotometru NanoDrop 1000 s vizualizací v počítačovém programu ND-1000. Tento přístroj měří vzorek v mikrolitrových objemech (Obr. 17).

Při spuštění byl spektrofotometr NanoDrop ND-1000 připojen k počítači, optické plochy byly očištěny vlhkým ubrouskem a následně na ně bylo pipetováno 4 μl vody. Program ND-1000 byl spuštěn a přístroj inicializován. Ve výběru metod byla zvolena varianta měření „Nucleic Acid“. Poté byla na optické části opět aplikována voda a měřena jako slepý vzorek („blank“).



Obr. 17: Napipetování vzorku a měření na spektrofotometru NanoDrop.

Převzato z (Gallagher & Desjardins 2006).

Následně byly měřeny jednotlivé vzorky. K měření na spektrofotometru NanoDrop bylo vždy použito 1,5 μl vzorku. Změřené vzorky byly otírány ubrouskem. Data byla na konci měření zapsána do protokolu.

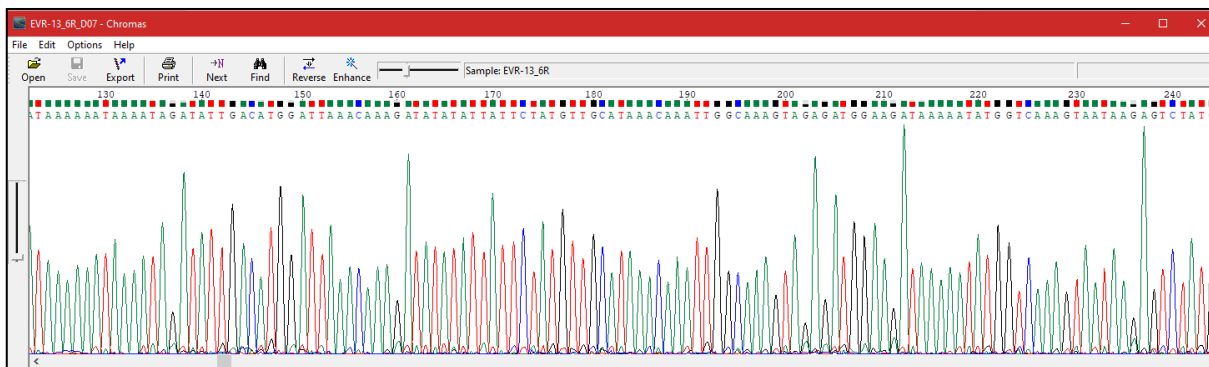
4.3.7 Příprava vzorků na sekvenaci

Po změření koncentrací jednotlivých templátů došlo k ředění vzorků s vysokými koncentracemi. Testovaná DNA byla rozpipetována do dvou zkumavek (stripy 0,25 ml) po objemu 1 µl vzorku. Do jedné zkumavky bylo přidáno 2 µl sterilní vody a 5 µl primeru IGSa. Do druhé zkumavky s 1 µl DNA bylo přidáno 2 µl sterilní vody a 5 µl primeru IGSb.

Zkumavky byly popsány pořadovým číslem a písmenným kódem. K připraveným vzorkům byl sestaven průvodní protokol a vše bylo odesláno na Přírodovědeckou fakultu University Karlovy v Praze, kde v laboratoři Biocev OMICS Genomika byly vzorky sekvenovány. Sekvence proběhla na přístroji ABI 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

4.3.8 Vyhodnocení

Získané sekvence byly nejprve prohlédnuty v programu Chromas (Obr. 18) a poté exportovány ve formátu Fasta.



Obr. 18: Ukázka sekvence *B. lusitaniae* v programu Chromas.

```
TGCCCTAATTTGACTACGACGACGGGTGTTTTGCAGGGTTTTTTTTTTACTTCAAATC
TTGAATTTATTTTTATGTTTTTAAATGTTCATTTTTTGAATGTTTGATTTAAAAAAA
TATAAAAAATAAAATAGATATTGACATGGATTAACAAAGATATATATTATTCTATGTTG
CATAAACAAATTGGCAAAGTAGAGATGGAAGATAAAAATATGGTCAAAGTAATAAGAGTC
TATGGTGAATGCCTAGGAGCTTTAAGGCGAAGAAGGTCGA
```

Obr. 19: Připravená sekvence *B. lusitaniae* pro zaslání do databáze BLAST pro vyhodnocení.

Výsledky sekvenace (Fasta formát) byly odeslány do databáze BLAST za účelem identifikace podobností se známými sekvencemi (Obr. 19). Zkratka BLAST znamená „Basic Local Alignment Search Tool“, tedy nástroj používaný v bioinformatice za účelem srovnávání primárních sekvenčních informací, např. nukleotidů DNA z různých sekvencí nebo sekvencí aminokyselin z různých proteinů.

Detekované druhy borrelií z ještěrek a sajících klíšťat byly zaneseny do záznamového archu (Příloha 2).

5 Výsledky

5.1 Odchyt ještěrek

Celkem bylo odchyceno 52 ještěrek *Lacerta viridis* (19 juvenilních jedinců, 17 samic, 16 samců), z první lokality „Skály“ celkem 23 ještěrek (9 juvenilní jedinců, 6 samic, 8 samců), z druhé lokality „U Lomu“ celkem 29 jedinců (10 juvenilních ještěrek, 11 samic, 8 samců) (Tab. 2).

Tab. 2: Přehled odchycených ještěrek a odebraných nasátých klíšťat.

Věkové kategorie / počty	mláďata	samice	samci	celkem
Ještěrky z lokality A	9	6	8	23
Ještěrky z lokality B	10	11	8	29
Součet lokalit	19	17	16	52

Nejčastěji byly ještěrky odchyťované při slunění - ve větvích keřů či na kamenech (Obr. 20). Ještěrky ze sledovaných lokalit se při výběru místa ke slunění vyhýbaly velkým otevřeným plochám bez vegetace, přestože podmínky ke slunění na takovýchto místech byly zdánlivě velmi dobré. Jako noční úkryty preferovaly ještěrky různé štěrbiny pod kameny, opuštěné nory hlodavců. Zároveň se tyto úkryty většinou nacházely ve vrchní části svahu na pomezí dubového lesa. Projevy teritoriálního chování byly v průběhu výzkumu zpozorovány pouze u adultních samců během jara (duben, květen).



Obr. 20: Snímek samec ještěrky zelené na okraji svého úkrytu. Autor: Lucie Musilová

5.2 Přísátá klíšťata

Dále byla sledována přítomnost klíšťat *Ixodes ricinus* na ještěrkách. Nejčastěji byla klíšťata přísátá v oblasti krku a kolem předních končetin ještěrek (Obr. 21), výjimečně na hlavě, například na okraji tlamy nebo přichycená na ušním tympanu.



Obr. 21: Detailní snímek levého boku ještěrky *L. viridis* s přísátými klíšťaty. Vlevo nymfa, vpravo larva klíštěte *Ixodes ricinus*. Autor: Lucie Musilová

5.2.1 Lokalita „Skály“

Na první lokalitě bylo odchyceno 23 jedinců *L. viridis* (9 juvenilních ještěrek, 6 samic, 8 samců) (Tab. 3). Největší počet odebraných klíšťat z jedné ještěrky (dospělá samice) byl 40. U juvenilních jedinců byl nejvyšší počet 27 klíšťat na mladé ještěrce, a od samců bylo odebráno nejvíce 6 klíšťat.

Tab. 3: Přehled odchycených ještěrek a odebraných nasátých klíšťat na první lokalitě.

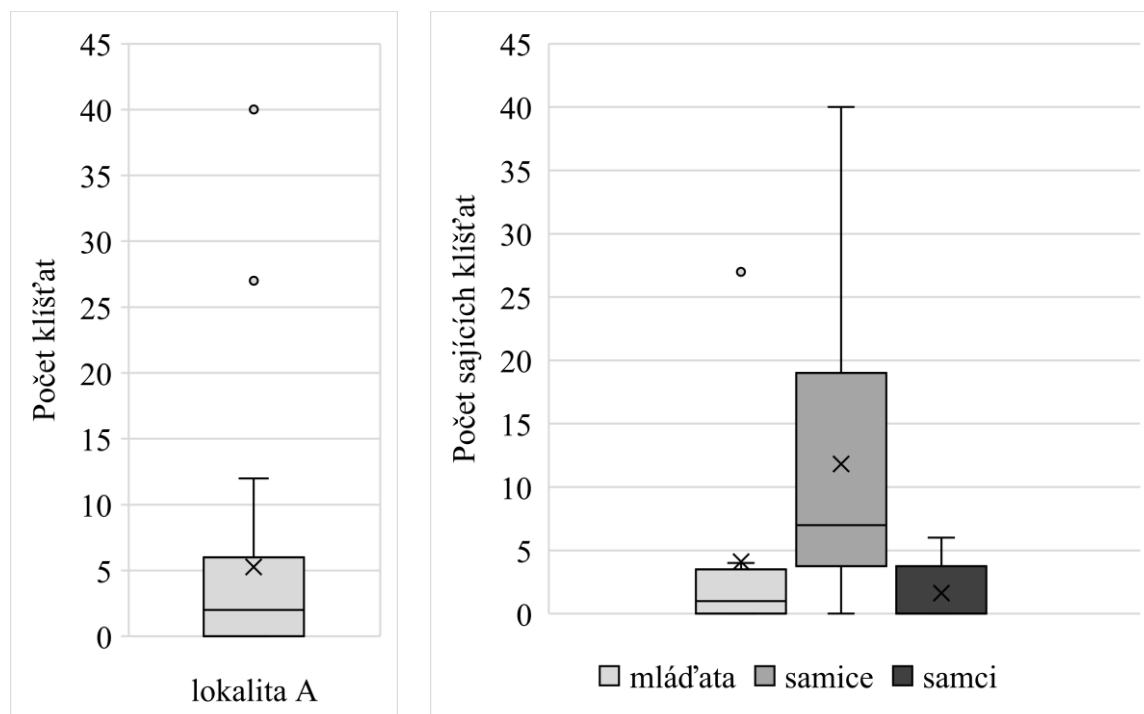
Lokalita A	Mlád'ata	Samice	Samci	Celkem
Odchycené ještěrky	9	6	8	23
Odebraná sající klíšťata	37	71	13	121
Max. počet klíšťat na ještěrce	27	40	6	-

Z 23 ještěrek bylo odebráno celkem 121 klíšťat. V průměru 5,3 klíšťat na ještěrku (Tab. 4, Graf 2). Nejvíce klíšťat bylo odebráno ze samic (v průměru 11,8 sajících klíšťat na ještěrce), nejméně ze samců (1,6 klíšťat na ještěrku).

Tab. 4: Počet klíšťat na ještěrku vyjádřený pomocí aritmetického průměru a mediánu.

	Všechny kategorie	Mlád'ata	Samice	Samci
Průměr (\bar{x})	5,26	4,11	11,83	1,63
Medián (\tilde{x})	2	1	7	0

Graf 2: Krabicový graf vlevo znázorňuje počty sajících klíšťat na ještěrkách v lokalitě A, kde „X“ značí aritmetický průměr hodnot, podélná čára v krabici značí medián a krabice 25-75 % hodnot. Druhý krabicový graf porovnává počty přísátých klíšťat mezi jednotlivými kategoriemi ještěrek (mláďata, samice, samci).



Na lokalitě „Skály“ nebyly borrelie zjištěny u žádného vzorku z ocasní tkáně ještěrek. U 4 jedinců *L. viridis* (3 samice, 1 samec), s negativním vzorkem z ocasní tkáně, byla prokázána *B. lusitaniae* u sajících larev, a proto tyto ještěrky budou brány jako pozitivní (více v kapitole 6.4).

U 16 klíšťat z celkového počtu 121 sajících klíšťat byly detekovány borrelie (Tab. 5). V 15 klíšťatech (tj. 93,8 % ze všech pozitivních klíšťat) byla zjištěna *Borrelia lusitaniae* (9 larev a 6 nymf). V jednom klíšťeti (nymfa) byla zjištěna *Borrelia afzelii* (6,2 %).

Tab. 5: Variabilita *B. burgdorferi* s.l. v klíšťatech odebraných z ještěrek.

	Počet odebraných klíšťat	Počet pozitivních klíšťat (%)	<i>Borrelia lusitaniae</i>	<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.
Larvy	97	9 (9,3)	9 (100)	0	0
Nymfy	24	7 (29,2)	6 (85,7)	1 (14,3)	0
Celkem	121	16 (13,2)	15 (93,8)	1 (6,2)	0

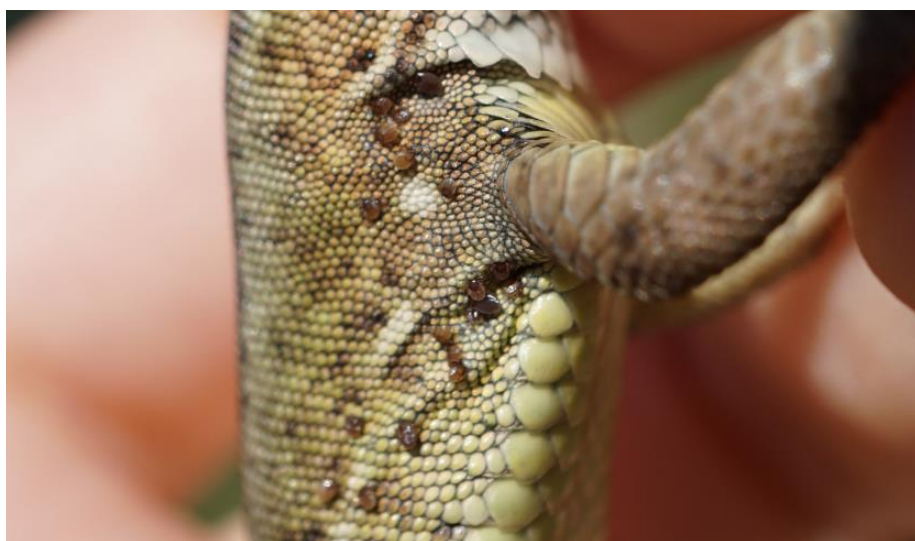
5.2.2 Lokalita „U lomu“

Na druhé lokalitě bylo odchyceno 29 ještěrek *L. viridis* (10 juvenilních jedinců, 11 samic, 8 samců) (Tab. 6).

Tab. 6: Přehled odchycených ještěrek a odebraných nasátých klíšťat na druhé lokalitě.

Lokalita B	Mlád'ata	Samice	Samci	Celkem
Odchycené ještěrky	10	11	8	29
Odebraná sající klíšťata	54	156	157	367
Max. počet klíšťat na ještěrce	40	67	58	x

Největší počet odebraných klíšťat z ještěrky (dospělá samice) byl 67. Dále u samců nejvyšší počet sajících klíšťat 58 na jedné ještěrce. A u juvenilních ještěrek nejvyšší počet 40 klíšťat na jedné ještěrce (Obr. 22).



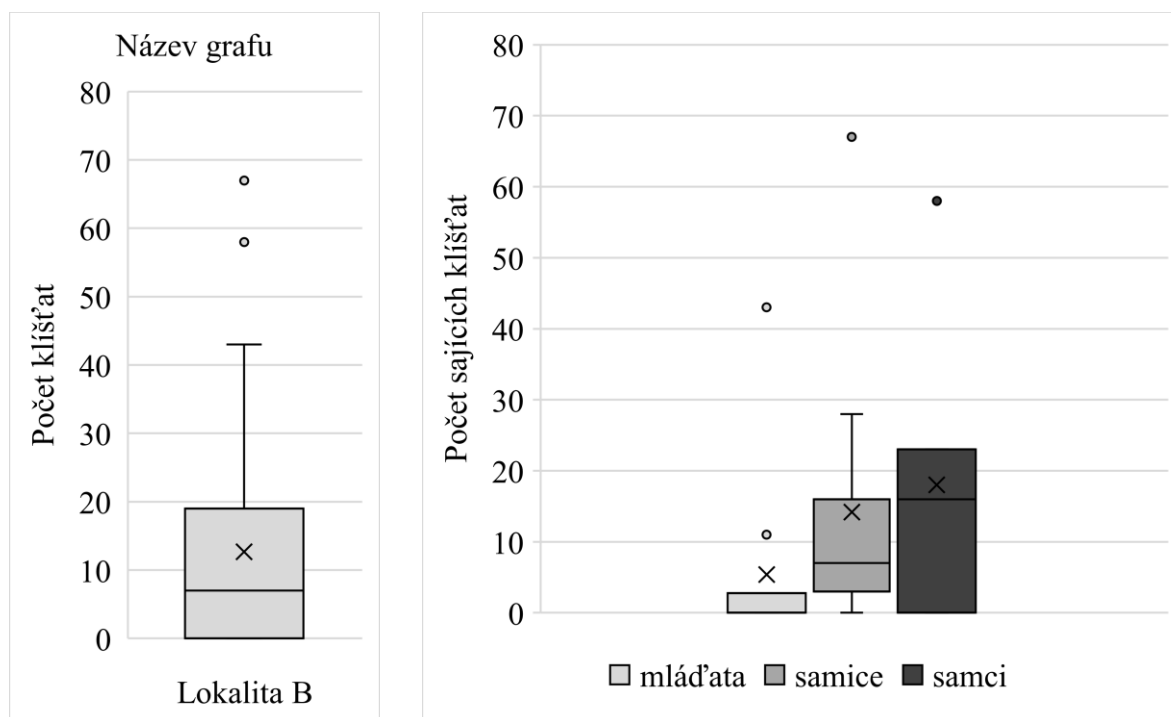
Obr. 22: Snímek ukazující velké množství přísátých larev klíšťat na mláděti ještěrky zelené. Celkem měla tato juvenilní ještěrka 40 klíšťat. Autor: Lucie Musilová

Z 29 ještěrek bylo odebráno celkem 367 klíšťat. V průměru 12,7 klíšťat na ještěrku (Tab. 7, Graf 3). Nejvíce sajících klíšťat bylo odebráno ze samců ještěrek, v průměru 19,6 klíšťat na ještěrce samčího pohlaví. Nejméně klíšťat bylo odebráno u juvenilních jedinců *L. viridis*, a to v průměru 5,4 klíšťat na ještěrku.

Tab. 7: Počet klíšťat na ještěrku vyjádřený pomocí aritmetického průměru a mediánu.

	Všechny kategorie	Mlád'ata	Samice	Samci
Průměr (\bar{x})	12,66	5,4	14,18	18,0
Medián (\tilde{x})	7	0	7	16

Graf 3: Krabicový graf vlevo znázorňuje počty sajících klíšťat na ještěrkách v lokalitě B. Druhý krabicový graf porovnává počty přisátých klíšťat mezi jednotlivými kategoriemi ještěrek (mláďata, samice, samci).



Na této lokalitě byly zjištěny borrelie u 3 vzorků z ocasní tkáně ještěrek (1 juvenilní ještěrka a 2 samice) (Tab. 8). Zároveň u 5 ještěrek v této lokalitě (s negativním vzorkem z ocasní tkáně) byly prokázány pozitivní larvy klíšťat na *Borrelia lusitaniae* (1 juvenilní ještěrka, 3 samice a 1 samců). Celkem z této lokality 8 pozitivních ještěrek (5 samic, 2 juvenilní jedinci a 1 samec).

Tab. 8: Přímá a nepřímá pozitivní ještěrky.

	Mláďata	Samice	Samci	Celkem
Přímá pozitivní ještěrky	1	2	0	3
Nepřímá pozitivní ještěrky	1	3	1	5
Celkem pozitivních ještěrek	2	5	1	8

Borrelie byly zjištěny u 50 klíšťat z celkového počtu 367 sajících klíšťat (Tab. 9). V 36 klíšťatech (tj. 72 % ze všech pozitivních klíšťat) byla zjištěna *Borrelia lusitaniae* (25 pozitivních larev a 11 nymf). Druhou detekovanou borrelií je zde *Borrelia afzelii* (zastoupena v 22 %), která je přítomna pouze v sajících nymfách *I. ricinus*. A u 3 larev byla zjištěna také *Borrelia burgdorferii* s.s. (tj. 6 % ze všech pozitivních klíšťat).

Tab. 9: Variabilita *B. burgdorferi* s.l. v klíšťatech odebraných z ještěrek.

	Počet odebraných klíšťat	Počet pozitivních klíšťat (%)	<i>Borrelia lusitaniae</i>	<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.
Larvy	277	28 (10,1)	25 (89,3)	0	3 (10,7)
Nymfy	90	22 (24,4)	11 (50)	11 (50)	0
Celkem	367	50 (13,6)	36 (72)	11 (22)	3 (6)

5.2.3 Souhrn lokalit

Z celkem 52 ještěrek bylo odebráno 488 klíšťat (374 larev, 114 nymf) (Tab. 10). Dominující borrelií v sajících klíšťatech je *B. lusitaniae* (77,3 %), podstatně méně jsou zastoupené *B. afzelii* (18,2 %) a *B. burgdorferi* s.s. (4,5 %). V larvách *I. ricinus* je *B. lusitaniae* zastoupena nejvíce (91,9 %). Druhou borrelií detekovanou v sajících larvách je *B. burgdorferi* s.s. (8,1 %), která však nebyla vůbec prokázána v odebraných nymfách. V nymfách byla detekována pouze *B. lusitaniae* (58,6 %) a *B. afzelii* (41,4 %).

Tab. 10: Variabilita *B. burgdorferi* s.l. v klíšťatech odebraných ze všech odchytených ještěrek.

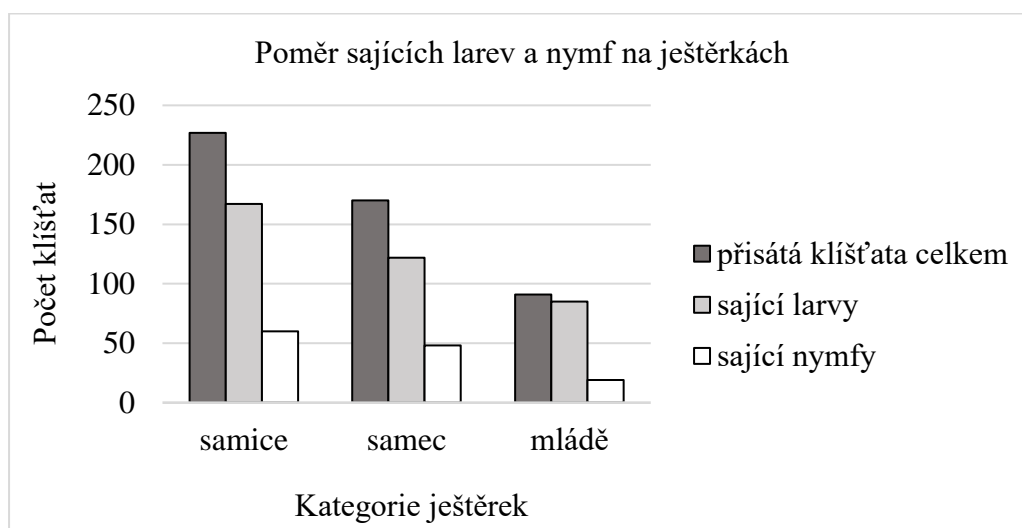
	Počet odebraných klíšťat	Počet pozitivních klíšťat (%)	<i>Borrelia lusitaniae</i>	<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.
Larvy	374	37 (9,9)	34 (91,9)	0	3 (8,1)
Nymfy	114	29 (25,4)	17 (58,6)	12 (41,4)	0
Celkem	488	66 (13,5)	51 (77,3)	12 (18,2)	3 (4,5)

Ze všech 37 borrelia-pozitivních larev byla u 34 (91,9 %) detekována *B. lusitaniae* a u zbylých 3 larev (8,1 %) *B. burgdorferi* s.s.. V případě borrelia-pozitivních nymf (představující celkem 29 klíšťat), byla *B. lusitaniae* zjištěna u 17 jedinců tohoto stádia (58,6 %) a zbylých 12 pozitivních nymf (41,4 %) přenášelo *B. afzelii*.

Na samicích ještěrek bylo přisátých celkem 227 klíšťat (46,5 %) ze všech 488 odebraných klíšťat. Ze samců bylo odebráno 170 klíšťat (představující 34,8 % ze všech odebraných) a u juvenilních ještěrek bylo odebráno 91 klíšťat (18,6 %).

U všech kategorií ještěrek bylo odebráno více larev než nymf (Graf 4). Juvenilní ještěrky měly nejméně přisátých nymf a tudíž největší podíl sajících larev ze všech odebraných klíšťat (93,4 %). Dospělé ještěrky měly nymf více než juvenilní jedinci. Mezi samci a samicemi se podíl larev ze všech přisátých klíšťat nijak významně neliší (samice 73,6 %, samci 71,8 %).

Graf 4: Přehled sajících larev a nymf na ještěrkách.



Z celkových 52 odchycených ještěrek mělo 30 jedinců (57,7 %) více než jedno sající klíšťe, zbylých 22 ještěrek nemělo žádné přísáté klíšťe. Z 30 ještěrek, které měly alespoň jedno přísáté klíšťe, 19 (63,3 %) neslo infikovaná klíšťata (pozitivní na borrelie). Přičemž 17 ještěrek (s alespoň jedním přísátým klíšťetem) mělo klíšťata pozitivní na *B. lusitaniae* (což představuje 56,7 % ještěrek s alespoň jedním přísátým klíšťetem).

Borrelie byly detekovány celkem u 66 klíšťat odebraných z ještěrek. Samice ještěrek měly 41 (62,1 %) borrelia-pozitivních klíšťat, samci 23 klíšťat (34,9 %) a juvenilní ještěrky měly pouze 2 borrelia-pozitivní klíšťata (3,0 %) (Graf 5).

Průměrný počet klíšťat sajících na jedné ještěrce (aritmetický průměr lokalita „Skály“: 5,3 klíšťat / ještěrku; lokalita „U lomu“: 12,7 klíšťat / ještěrku) se mezi lokalitami staticky významně liší (Binomický test: $p < 0,001$).

Graf 5: Graf ukazující počet borrelia-pozitivních sajících klíšťat vzhledem k celkovému počtu klíšťat na ještěrkách, rozdělené podle kategorií: samice, samici, mlád'ata.



5.3 Vlajkování

Vlajkování probíhalo během měsíce dubna a května v roce 2020. Na lokalitě „Skály“ byla vlajkována přilehlá vegetace u skalnaté vyhlídky. Na lokalitě „U lomu“ probíhalo vlajkování přímo v místě odchytu ještěrek (díky přítomnosti nízkých keřů) a kolem lesní cesty v horní části svahu. Celkem z obou lokalit bylo navlajkováno 173 klíšťat *I. ricinus* (135 nymf, 20 samic, 18 samců).

5.3.1 Lokalita „Skály“

Na první lokalitě bylo navlajkováno celkem 90 klíšťat (69 nymf, 8 samic, 13 samců) (Tab. 12). Borrelie byly prokázány u 21 klíšťat (23,3 %; 16 nymf, 5 samic). Nejvíce zastoupená je zde *Borrelia afzelii* (57,1 % ze všech pozitivních klíšťat), detekována v 9 nymfách a 3 samcích *I. ricinus*. U třech klíšťat (pouze nymf) byla detekována *Borrelia garinii* (14,3 %). Také ve třech případech (2 nymfy, 1 samice) zjištěna *Borrelia lusitaniae*, představující 14,3 % ze všech pozitivních klíšťat na první lokalitě. Dále ve dvou nymfách *I. ricinus* byla detekována *Borrelia burgdorferi* s.s. (9,5 %) a pouze v jednom případě (samice *I. ricinus*) *Borrelia valaisiana* (4,8 %).

Tab. 12: Přehled navlajkovaných klíšťat včetně detekovaných borrelií z lokality A.

	Celkem klíšťat	Počet pozitivních klíšťat (%)	<i>Borrelia lusitaniae</i>	<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.	<i>Borrelia garinii</i>	<i>Borrelia valaisiana</i>
Nymfy	69	16 (23,2)	2 (12,5)	9 (56,3)	2 (12,5)	3 (18,7)	0
Samice	8	0	0	0	0	0	0
Samci	13	5 (38,5)	1 (20)	3 (60)	0	0	1 (20)
Celkem	90	21 (23,3)	3 (14,3)	12 (57,1)	2 (9,5)	3 (14,3)	1 (4,8)

5.3.2 Lokalita „U lomu“

Na druhé lokalitě bylo navlajkováno 83 klíšťat *I. ricinus* (66 nymf, 12 samců, 5 samic) (Tab. 13). Celkem u 12 klíšťat (14,4 %) byly přítomny borrelie. Jako dominující borrelie na této lokalitě byla zjištěna *Borrelia lusitaniae* (z celkového počtu pozitivních klíšťat této lokality představuje přibližně 66,7 %). *B. lusitaniae* byla detekována u 6 nymf, u 1 samice a u 1 samce *I. ricinus*. Dále byla zjištěna *Borrelia burgdorferi* s.s. (16,7 %) a *Borrelia afzelii* (16,7 %) *Borrelia garinii* a *Borrelia valaisiana* zde nebyly detekovány.

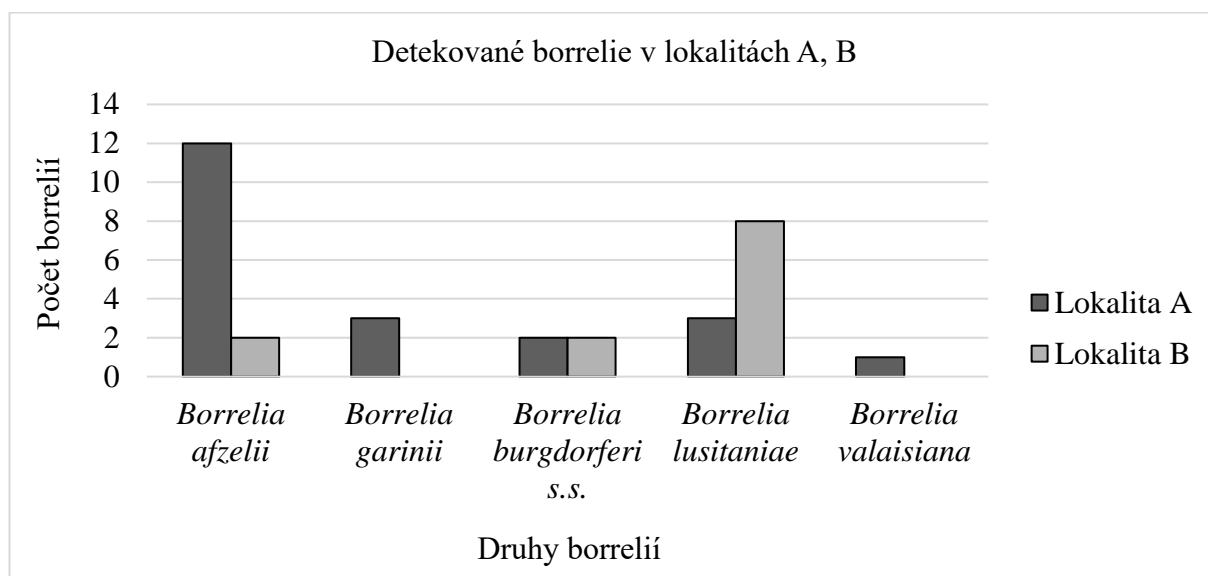
Tab. 13: Přehled navlajkovaných klíšťat včetně detekovaných borrelií z lokality B.

	Celkem klíšťat	Počet pozitivních klíšťat (%)	<i>Borrelia lusitaniae</i>	<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.	<i>Borrelia garinii</i>	<i>Borrelia valaisiana</i>
Nymfy	66	10 (15,2)	6 (60)	2 (20)	2 (20)	0	0
Samice	12	1 (8,3)	1 (100)	0	0	0	0
Samci	5	1 (20)	1 (100)	0	0	0	0
Celkem	83	12 (14,5)	8 (66,7)	2 (16,7)	2 (16,7)	0	0

5.3.3 Souhrn lokalit

Druhové složení borrelií na lokalitě A a B se významně statisticky liší (Fisherův exaktní test: $p = 0,00995$) (Graf 6). Na lokalitě A bylo zjištěno 5 druhů borrelií (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferii* s.s., *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*), na lokalitě B pouze 3 druhy (*B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s., *B. lusitaniae*).

Graf 6: Přehled detekovaných druhů borrelií v obou lokalitách.



Na obou lokalitách převažuje pozitivita u navlajkovaných nymf *I. ricinus*. Na první lokalitě dominuje v navlajkovaných klíšťatech *Borrelia afzelii*, avšak na druhé lokalitě *Borrelia lusitaniae*.

Pozitivita se mezi lokalitami statisticky významně neliší (Z-test: $p = 0,138$). Avšak podíl detekované *B. lusitaniae* na lokalitách (lokalita A: $3/21=0,143$; lokalita B: $8/12=0,667$) se statisticky významně liší (Fisherův exaktní test: $p = 0,00547$).

6 Diskuze

6.1 Pozorování během odchyty

Ještěrky na lokalitách v Tichém údolí při slunění jednoznačně preferovaly malé plochy bez vegetace, ve vzdálenosti do cca 50 cm od nejbližšího úkrytu, které navíc bývají velmi často, alespoň částečně, shora kryty vegetací a to nejčastěji různými trnitými keři. Během odpoledního odchyty byly ještěrky na lokalitě „U lomu“ pozorovány při slunění přímo v trnitých keřích, a ve dvou případech na suchém stromě zhruba do 1,5 m výšky. Ke stejnému pozorování na této lokalitě došli i Fischer & Reháč (2010).

6.2 Vliv borrelií a klíšťat na ještěrky

Samotný výskyt borelií ještěrky zdravotně neohrožuje, plazi hrají v cyklu borrelií pouze roli rezervoárového hostitele, který nemá příznaky onemocnění. Avšak může se u plazů v místě prisátí klíštěte objevit lokální bakteriální infekce (Köhler 2002). Na lokalitách v Tichém údolí bylo během jarních měsíců pozorováno, že prisátá klíšťata způsobují komplikace u ještěrek během ekdyze (svlékání kůže). V místech, kde byla mezi šupinami prisátá klíšťata, se stará kůže nemohla svléknout. Obtíž také mohou představovat i klíšťata prisátá na méně obvyklých místech, např. na ušním tympanu, v okolí očí a tlamy.

6.3 Míra parazitace u ještěrek

Ve studii od Majláthová et al. (2006), která sledovala přítomnost klíšťat na ještěrkách, byli klíšťaty více zamořeni samci. Což je pravděpodobně způsobené tím, že lokalita byla chudá na vegetaci a domovské okrsky samic od sebe byly více vzdálené. Samci mají během jarních měsíců vyšší pohybovou aktivitu, zejména kvůli konkurenčním bojům s ostatními samci o samice. Na sledovaných lokalitách v Tichém údolí byly celkově více klíšťaty zamořené samice (průměrně 13,4 klíšťat na samici ještěrky) než samci. Ze samic *L. viridis* bylo odebráno 46,5 % všech sajících klíšťat, nejméně bylo odebráno z juvenilních ještěrek (18,6 %). Malé množství sajících klíšťat na mladých ještěrkách může být dáno jejich menší pohybovou aktivitou. V lokalitě „U lomu“ bylo zpozorováno, že se juvenilové pohybují spíše na okraji dubového lesa, kde nízká vegetace zcela chybí. Předchozí studie provedená na stejné lokalitě (Chmelař 2013) také potvrzuje nejvyšší míru parazitace u samic a nejnižší pak u juvenilních jedinců.

Nejvyšší počet odebraných klíšťat z jedné ještěrky (dospělé samice) byl 67. To je v porovnání s dalšími evropskými studiemi (Bauwens et al. 1983; Majláthová et al. 2006, 2008; Földvári et al. 2009) nejvyšší hodnota. Bauwens et al. (1983) odebrali nejvíce 61 klíšťat z jedné ještěrky (Belgie, Nizozemsko), Földvári et al. (2009) nejvíce 47 klíšťat (Maďarsko), a Majláthová et al. (2008) odebrali nejvíce 46 sajících klíšťat z jedné ještěrky (Slovensko).

Studie ještěrek (Chmelař 2013) prováděná na lokalitě v Tichém údolí shodně se studovanou lokalitou „U lomu“ a uvádí, že na většině odchycených jedinců *L. viridis* (74 %) byla nalezena klíšťata. Během odchyty v rámci této práce byla v roce 2020 na této lokalitě parazitace prokázána u 17 ještěrek z celkových 29 jedinců (58,6 %). Zbylé ještěrky (12 jedinců) neměly žádné přisáté klíšťe, a to zejména proto, že šlo o mladé, čerstvě vylíhnuté jedince (celkem 8 mlád'at).

6.4 Přisátá klíšťata, přítomnost borrelií

V rámci této studie bylo zjištěno, že množství sajících klíšťat na ještěrce je ovlivněno přítomností více různých druhů hostitelů na lokalitě, aktivitou klíšťat a přítomností vegetace v místě jejich výskytu. Předchozí studie z Tichého údolí (Chmelař 2013) zjistila průměrný počet 7,1 klíšťat na ještěrku. Během tohoto pozorování na lokalitě „Skály“ bylo z ještěrek odebráno 121 klíšťat (5,3 klíšťat na ještěrku, medián 2), tedy podstatně méně než na druhé lokalitě „U lomu“, odebráno celkem 367 klíšťat (průměrně 12,7 klíšťat na ještěrku, medián 7). Přičemž právě na první lokalitě je přítomnost vegetace velmi malá a druhá lokalita je hustě porostlá nízkými keři.

Maďarská studie od Földvári et al. (2009) udává u ještěrek *L. agilis* medián 2 klíšťata a u druhu *L. viridis* medián 3 klíšťata, což odpovídá první sledované lokalitě v Tichém údolí. V případě druhé lokality „U lomu“ je medián 7 klíšťat, tedy podstatně více, což je opět způsobené přítomností husté vegetace, která na druhé lokalitě chybí.

Pozitivita ještěrek a klíšťat na *B. lusitaniae* je závislá na její přítomnosti v prostředí. Vlajkování na lokalitě „Skály“ odhalilo jako majoritní druh *B. afzelii* (57,1 %). Lokalita leží v blízkosti pole a během odchyty, zběhem odchyty zde bylo pozorováno množství aktivních nor patřících hlodavcům, kteří jsou nejčastějším rezervoárem této borrelie. A proto zde bylo zjištěno menší množství ještěrek a sajících klíšťat pozitivních na *B. lusitaniae*. Zatímco na druhé lokalitě „U lomu“ byla vlajkováním prokázána jako majoritní *B. lusitaniae* (66,7 %), bylo zároveň detekováno více ještěrek i sajících klíšťat s tímto druhem borrelie.

Výzkum, který studoval přítomnost klíšťat u ještěrek ve Slovenském krasu (Majláthová et al. 2006) udává, že 29 % odchycených ještěrek (s alespoň jedním sajícím klíšťetem) mělo nějaké infikované klíšťe (pozitivní na borrelie). V lokalitě Tiché údolí byla zjištěna přítomnost borrelia-positivních klíšťat u 63,3 % ještěrek, které měly alespoň jedno klíšťe, procento ještěrek se však liší mezi lokalitami. Na lokalitě „Skály“ bylo 46,2 % ještěrek s alespoň jedním sajícím klíšťetem pozitivním na borrelie, kdežto na druhé lokalitě „U lomu“ tvoří ještěrky s borrelia-positivními klíšťaty 76,5 %. Rozdíly na lokalitách v Tichém údolí (i v porovnání s výsledky ze Slovenského krasu) jsou způsobeny zejména rozdílnými abiotickými faktory (např. odlišným množstvím vegetace) a mezi hlavní biotické faktory patří přítomnost více druhů hostitelů na sledované lokalitě.

6.5 *Borrelia lusitaniae* v ještěrkách

V larvách klíšťat odebraných z ještěrek je dominující *B. lusitaniae* (91,9 %); a ve třech případech byla detekována *B. burgdorferi* s.s. (8,1 %). V odebraných sajících nymfách opět dominuje *B. lusitaniae* (58,6 %). Druhou početně zastoupenou zjištěnou borrelií je *B. afzelii* (41,4 %) a to kvůli přítomnosti drobných druhů hlodavců v obou sledovaných lokalitách.

Nejčastější borrelií v ještěrkách *L. viridis* je *Borrelia lusitaniae*. U 3 studovaných ještěrek byla *Borrelia lusitaniae* detekována přímo ze vzorku ocasní tkáně. Nicméně množství borrelií je v hostitelských obratlovcích nízké a může se ukládat v hlubších orgánech, proto nemusí být jejich detekce ve vzorcích vždy možná. Negativní výsledek vzorku ocasní tkáně tedy neprokazuje přesvědčivě, že ještěrka není infikována. U dalších 9 ještěrek byla nepřímo prokázána přítomnost *Borrelia lusitaniae* prostřednictvím nasátých larev *I. ricinus* pozitivních na tuto borrelii (i přesto, že vzorek ocasní tkáně byl na borrelii negativní). Vzhledem k životnímu cyklu klíšťat *I. ricinus* víme, že larvy sají poprvé. Pokud byly odebrány jako sající na ještěrkách, lze předpokládat, že se doposud živily pouze krví těchto ještěrek. Detekce *B. lusitaniae* u larev klíšťat sajících na ještěrkách zpětně ukazuje na přítomnost této borrelii u těchto ještěrek.

Transovariální přenos borrelií je velmi vzácný (0,7 %), avšak může poskytnout mechanismus pro rozšíření patogenu do nových oblastí (Piesman et al. 1986). Pravděpodobnější je, že se larvy infikovaly od ještěrky, i když ze vzorku její tkáně nebyla detekována *B. lusitaniae*. To lze vysvětlit nízkou koncentrací borrelií v tkáních obratlovců, viz výše. Další možností přenosu borrelií je tzv. cofeeding, kdy infikované klíště infikuje jiná klíšťata sající v okolí, bez toho aniž by se hostitelský organismus nakazil (Gern & Rais 1996; Patrican 1997).

Z obou sledovaných lokalit bylo celkem zjištěno 12 borrelia-pozitivních ještěrek (23,1 %). *Borrelia lusitaniae* byla prokázána u 8 samic (včetně dospělé samice, která měla nejvíce odebraných klíšťat, tj. 67), dále u 2 samců a 2 mláďat. Ve Slovenském krasu byla zjištěna podobná hodnota - *B. lusitaniae* byla detekována u 18,6 % odchycených ještěrek (Majláthová et al. 2006).

6.6 *Borrelia lusitaniae* v navlajkových klíšťatech

Přítomnost *B. lusitaniae* na evropských lokalitách (bez výskytu ještěrek) je velmi okrajová. Při vlajkování klíšťat v pražských parcích (Kybicová et al. 2017), nebyla tato borrelii vůbec detekována.

V minulosti proběhlo vlajkování klíšťat na různých lokalitách napříč Evropou (Kurtenbach et al. 2001) a *B. lusitaniae* byla detekována pouze v 5,8 % (ze všech pozitivních klíšťat). Všechny vzorky pozitivní na tuto borrelii pocházely z města Grândola v Portugalsku. Zatímco na druhé lokalitě v Portugalsku (město Mafra) a na lokalitách v ostatních sledovaných zemích (Slovensko, Lotyšsko, Německo, Velká Británie) nebyla *B. lusitaniae* zjištěna. Poblíž již zmíněného města Grândola probíhal později další výzkum naměřený na přítomnost

B. burgdorferi s.l. v klíš'atech *I. ricinus* a *B. lusitaniae* zde byla opět detekována (Baptista et al. 2004).

Je zřejmé, že se tato borrelie vyskytuje čteněji v oblastech s výskytem ještěrek. To potvrzují i výsledky z Tichého údolí, zejména lokalita „U lomu“, kde je zastoupení *B. lusitaniae* 66,7 % ze všech detekovaných druhů borrelií v navlajkových klíš'atech.

7 Závěr

Výsledky práce prokázaly přítomnost *Borrelia lusitaniae* v klíšťatech i ještěrkách v České republice. Navíc bylo potvrzeno, že na sledovaných lokalitách s výskytem ještěrek se jedná o dominantní borrelii (91,9 %). Je tedy patrné, že ještěrky *Lacerta viridis* hrají významnou roli jakožto rezervoár tohoto patogenu i v České republice.

U více než poloviny odchycených jedinců *L. viridis* (30 z 52) byla nalezena přisátá klíšťata – larvy a nymfy *Ixodes ricinus*. Celkem byla *Borrelia lusitaniae* detekována u 12 ještěrek (23,1 %). Ze vzorků ocasní tkáně byly prokázány 3 pozitivní ještěrky, zbylých 9 bylo prokázáno nepřímo, díky přítomnosti nasátých larev pozitivních na tuto borrelii.

Z výsledků práce zároveň vyplývá, že výskyt ještěrek pozitivních na *B. lusitaniae* na dané lokalitě zvyšuje pravděpodobnost výskytu této bakterie i v klíšťatech vyskytujících se na téže lokalitě, a že prevalence borrelií je ovlivněna hustotou a skladbou vegetace a přítomností dalších rezervoárových zvířat.

Klíšťata přenášejí, kromě borrelií, celou řadu dalších patogenů, a proto by budoucí studie měly objasnit úlohu ještěrek (*Lacerta agilis*, *Lacerta viridis*, *Zootoca vivipara* a dalších) také v cirkulaci dalších bakterií například rodu *Anaplasma* a *Rickettsia*, které podobně jako borrelie znamenají riziko pro zdraví lidí i zvířat.

8 Literatura

- Anderson JF, Magnarelli LA. 2008. Biology of Ticks. *Infectious Disease Clinics of North America* **22**:195–215.
- Aronowitz RA. 2012. The rise and fall of the Lyme disease vaccines: A cautionary tale for risk interventions in American medicine and public health. *Milbank Quarterly* **90**:250–277.
- Baptista S, Quaresma A, Aires T, Kurtenbach K, Santos-Reis M, Nicholson M, Collares-Pereira M. 2004. Lyme borreliosis spirochetes in questing ticks from mainland Portugal. *International Journal of Medical Microbiology, Supplement* **293**:109–116.
- Bartůněk P. 2006. *Lymeská borelióza*, 3rd edition. Grada Publishing, a.s., Praha.
- Bauwens D, Strijbosch H, Stumpel AHP. 1983. The lizards *Lacerta agilis* and *L. vivipara* as hosts to larvae and nymphs of the tick *Ixodes ricinus*. *Ecography* **6**:32–40.
- Böhme MU, Fritz U, Kolenko T, Ljubisavljević K, Tzankov N, Berendonk TU. 2007. Phylogeography and cryptic variation within the *Lacerta viridis* complex (Lacertidae, Reptilia). *Zoologica Scripta* **36**:119–131.
- Bröker M. 2012. Following a Tick Bite: Double Infections by Tick-Borne Encephalitis Virus and the Spirochete *Borrelia* and Other Potential Multiple Infections. *Zoonoses and Public Health* **59**:176–180.
- Buchancová J, Hudečková H, Murajda L, Švihrová V, Bátora I, Legáthm L., Osina O, Vilček R, Jakubovičová E. 2009. Lyme borreliosis from the perspective of Occupational Medicine – a comparative study. *Pracovní lékařství* **2**:46–55.
- Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. 1982. Lyme disease - A tick-borne spirochetosis? *Science* **216**:1317–1319.
- Čakić S, Veinović G, Cerar T, Mihaljica D, Sukara R, Ružić-Sabljić E, Tomanović S. 2019. Diversity of Lyme borreliosis spirochetes isolated from ticks in Serbia. *Medical and Veterinary Entomology* **33**:512–520.
- Čerňanský A. 2010. Earliest world record of green lizards (Lacertilia, Lacertidae) from the lower Miocene of Central Europe. *Biologia* **65**:737–741.
- Chmelař J. 2013. *Ekologie, etologie a variabilita ještěrky zelené, Lacerta viridis v Přírodní rezervaci Tiché údolí*. Karlova Universita v Praze.
- Collares-Pereira M, Couceiro S, Franca I, Kurtenbach K, Schäfer SM, Vitorino L, Gonçalves L, Baptista S, Vieira ML, Cunha C. 2004. First Isolation of *Borrelia lusitaniae* from a Human Patient. *Journal of Clinical Microbiology* **42**:1316–1318.
- Da Franca I, Santos L, Mesquita T, Collares-Pereira M, Baptista S, Vieira L, Viana I, Vale E, Prates C. 2005. Lyme borreliosis in Portugal caused by *Borrelia lusitaniae*? Clinical report on the first patient with a positive skin isolate. *Wiener Klinische Wochenschrift* **117**:429–432.

- de Carvalho IL, Fonseca JE, Marques JG, Ullmann A, Hojgaard A, Zeidner N, Nuncio MS. 2008. Vasculitis-like syndrome associated with *Borrelia lusitaniae* infection. *Clinical Rheumatology* **27**:1587–1591.
- Dsouli N, Younsi-kabachii H, Postic D, Noura S, Gern L, Bouattour A. 2006. Reservoir Role of Lizard *Psammmodromus algirus* in Transmission Cycle of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato (Spirochaetaceae) in Tunisia. *Journal of Medical Entomology* **43**:737–742.
- Fischer D, Reháč I. 2010. The Ecology, Ethology and Variability of the European Green Lizard *Lacerta viridis*, from a Local population along the River Vltava in Central Bohemia. *Gazella* **37**:51–167.
- Fleche AL, Postic D, Girardet K, Peter O, Baranton G. 1997. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**:921–925.
- 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**:331–336.
- Francischetti IMB, Sa-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JMC. 2009. The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience* **14**:2051–2088.
- Franta Z, Frantová H, Konvičková J, Horn M, Sojka D, Mareš M, Kopáček P. 2010. Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Parasites and Vectors* **3**:119.
- Gallagher SR, Desjardins PR. 2006. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Current Protocols in Molecular Biology* **76**:3–21.
- Gern L. 2008. *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the agent of Lyme borreliosis: Life in the wilds. *Parasite* **15**:244–247.
- Gern L, Rais O. 1996. Efficient Transmission of *Borrelia burgdorferi* between Cofeeding *Ixodes ricinus* Ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* **33**:189–192.
- Ghosh S, Bansal GC, Gupta SC, Ray D, Khan MQ, Irshad H, Shahiduzzaman M, Seitzer U, Ahmed JS. 2007. Status of tick distribution in Bangladesh, India and Pakistan. *Parasitology Research* **101**:207–216.
- Graça-Souza A V., Maya-Monteiro C, Paiva-Silva GO, Braz GRC, Paes MC, Sorgine MHF, Oliveira MF, Oliveira PL. 2006. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **36**:322–335.
- Halouzka J, Postic D, Hubálek Z. 1998. Isolation of the spirochaete *Borrelia afzelii* from the mosquito *Aedes vexans* in the Czech Republic. *Medical and Veterinary Entomology* **12**:103–105.
- Hanincova K, Schäfer SM, Etti S, Sewell HS, Taragelová V, Ziak D, Labuda M, Kurtenbach K. 2003. Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. *Parasitology* **126**:11–20.
- Havránek J, Mačát Z, Trnka F. 2011. Plán péče o přírodní rezervaci Roztocký háj – Tiché

údolí na období 2012-2021.

- Herrmann C, Gern L. 2015. Search for blood or water is influenced by *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *Parasites and Vectors* **8**:6.
- Horn M et al. 2009. Hemoglobin Digestion in Blood-Feeding Ticks: Mapping a Multipeptidase Pathway by Functional Proteomics. *Chemistry and Biology* **16**:1053–1063.
- Hovius JWR, van Dam AP, Fikrig E. 2007. Tick-host-pathogen interactions in Lyme borreliosis. *Trends in Parasitology* **23**:434–438.
- Kamradt T. 2002. Lyme disease and current aspects of immunization. *Arthritis Research* **4**:20–29.
- Kimmig P, Hassler D, Rüdiger B. 2003. Klíšťata. Pragma, Praha.
- Kiszewski AE, Matuschka FR, Spielman A. 2001. Mating strategies and spermiogenesis in ixodid ticks. *Annual Review of Entomology* **46**:167–182.
- Köhler G. 2002. Nemoci obojživelníků a plazů, 1st edition. Brázda, Praha.
- Kurokawa C, Lynn GE, Pedra JHF, Pal U, Narasimhan S, Fikrig E. 2020. Interactions between *Borrelia burgdorferi* and ticks. *Nature Reviews Microbiology* **18**:587–600.
- Kurtenbach K et al. 2001. Distinct Combinations of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Genospecies Found in Individual Questing Ticks from Europe. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:4926–4929.
- Kybicová K, Baštová K, Malý M. 2017. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in questing ticks *Ixodes ricinus* from the Czech Republic. *Ticks and Tick-borne Diseases* **8**:483–487.
- Lindgren E, Jaenson TGT. 2006. Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. World Health Organization, Copenhagen.
- Logina I, Krumina A, Karelis G, Elson L, Viksna L, Rozentale B, Donaghy M. 2006. Clinical features of double infection with tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis transmitted by tick bite. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* **77**:1350–1353.
- Ložek V, Kubíková J. 2005. Chráněná území ČR. XIII., Střední Čechy. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, EkoCentrum Brno.
- Ludmila Vojtková. 1982. Parazitofauna obojživelníků CSSR, její ekologické a praktické aspekty. Univerzita J.E. Purkyně, Brno.
- Magnarelli LA, Anderson JF. 1988. Ticks and biting insects infected with the etiologic agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Clinical Microbiology* **26**:1482–1486.
- Majláthová V, Majláth I, Derdáková M, Víchová B, Pet'ko B. 2006. *Borrelia lusitaniae* and

- green lizards (*Lacerta viridis*), Karst Region, Slovakia. *Emerging Infectious Diseases* **12**:1895–1901.
- Majláthová V, Majláth I, Hromada M, Tryjanowski P, Bona M, Antczak M, Víchová B, Dzimko Š, Mihalca A, Peťko B. 2008. The role of the sand lizard (*Lacerta agilis*) in the transmission cycle of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *International Journal of Medical Microbiology* **298**:161–167.
- Margos G et al. 2009. A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. *Applied and Environmental Microbiology* **75**:5410–5416.
- Matějovská T. 2007. Interakce klíště-hostitel I. Sání krve a přenos patogenů. *Živa* **6**:247–249.
- Matuschka FR, Fischer P, Heiler M, Richter D, Spielman A. 1992. Capacity of European Animals as Reservoir Hosts for the Lyme Disease Spirochete. *Journal of Infectious Diseases* **165**:479–483.
- Mejlon HA, Jaenson TGT. 1997. Questing behaviour of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology* **21**:747–754.
- Mendoza-Roldan JA, Colella V, Lia RP, Nguyen VL, Barros-Battesti DM, Iatta R, Dantas-Torres F, Otranto D. 2019. *Borrelia burgdorferi sensu lato* in ectoparasites and reptiles in southern Italy. *Parasites and Vectors* **12**:35.
- Němec J, Slavík P. 2016. Chráněná území Prahy - levý břeh Vltavy . Pages 130–134, 1st edition. Magistrát hl. m. Prahy, Praha.
- Norte AC, Alves da Silva A, Alves J, da Silva LP, Nuncio MS, Escudero R, Anda P, Ramos JA, Lopes de Carvalho I. 2015. The importance of lizards and small mammals as reservoirs for *Borrelia lusitaniae* in Portugal. *Environmental Microbiology Reports* **7**:188–193. Wiley-Blackwell.
- Nuncio MS, Péter O, Alves MJ, Bacellar F, Filipe AR. 1993. Isolamento e caracterização de Borrélias de *Ixodes ricinus* L. em Portugal. *Rev. Portuguesa Doenças Infecç.* **16**:175–179.
- Nuttall PA. 1999. Pathogen-tick-host interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE virus. *Zentralblatt für Bakteriologie* **289**:492–505.
- Obiegala A, Król N, Oltersdorf C, Nader J, Pfeffer M. 2017. The enzootic life-cycle of *Borrelia burgdorferi sensu lato* and tick-borne rickettsiae: An epidemiological study on wild-living small mammals and their ticks from Saxony, Germany. *Parasites and Vectors* **10**:115.
- Olsén B, Jaenson TGT, Noppa L, Bunikis J, Bergström S. 1993. A Lyme borreliosis cycle in seabirds and *Ixodes uriae* ticks. *Nature* **362**:340–342.
- Orlíková H, Kybicová K, Gašpárek M, Kynčl J, Malý M. 2019. Lymeská borrelióza v České republice. Roční zpráva o epidemioepidemiologické situaci za rok 2018 **28**:453–458.
- Orlíková H, Lenz P, Kynčl J. 2020. Klíšťová encefalitida v České republice v roce 2019. Zpráva o epidemioepidemiologické situaci v kontextu předcházejících let **29**:211–219.

- Patrican LA. 1997. Acquisition of Lyme disease spirochetes by co-feeding *Ixodes scapularis* ticks. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **57**:589–593.
- Piesman J, Donahue JG, Mather TN, Spielman A. 1986. Transovarially acquired Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) in field-collected larval *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* **23**:219.
- Pospíšilová T, Urbanová V, Hes O, Kopacek P, Hajdusek O, Sima R. 2019. Tracking of *Borrelia afzelii* transmission from infected *Ixodes ricinus* nymphs to mice. *Infection and Immunity* **87**:896–918.
- Poupon MA, Lommano E, Humair PF, Douet V, Rais O, Schaad M, Jenni L, Gern L. 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:976–979. *Appl Environ Microbiol.*
- Prokeš Z. 2015. Lymeská borrelióza. *Dermatologie pro praxi* **9**:36–39.
- Raileanu C, Moutailler S, Pavel I, Porea D, Mihalca AD, Savuta G, Vayssier-Taussat M. 2017. *Borrelia* diversity and co-infection with other tick borne pathogens in ticks. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **7**:36.
- Richter D, Schlee DB, Allgöwer R, Matuschka FR. 2004. Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:6414–6419.
- Rizzoli A et al. 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.
- Rochlin I, Toledo A. 2020. Emerging tick-borne pathogens of public health importance: A mini-review. *Journal of Medical Microbiology* **69**:781–791.
- Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH. 2011. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks and Tick-borne Diseases* **2**:123–128.
- Rudolf I, Mendel J, Šikutová S, Švec P, Masaříková J, Nováková D, Buňková L, Sedláček I, Hubálek Z. 2009. 16S rRNA gene-based identification of cultured bacterial flora from host-seeking *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* ticks, vectors of vertebrate pathogens. *Folia Microbiologica* **54**:419–428.
- Salvador A, Veiga JP, Martin J, Lopez P, Abelenda M, Puerta M. 1996. The cost of producing a sexual signal: testosterone increases the susceptibility of male lizards to ectoparasitic infestation. *Behavioral Ecology* **7**:145–150.
- Šapovaliv P. 1987. Morfometrie a variabilita morfologických znaků u *Lacerta viridis*. *Fauna Bohemiae septentrionalis* **12**:75–101.
- Schwan TG, Piesman J, Golde WT, Dolan MC, Rosa PA. 1995. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**:2909–2913.

- Skuballa J, Oehme R, Hartelt K, Petney T, Bücher T, Kimmig P. 2007. European Hedgehogs as Hosts for *Borrelia* spp., Germany.
- Smith RP, Muzaffar S Bin, Lavers J, Lacombe EH, Cahill BK, Lubelczyk CB, Kinsler A, Mathers AJ, Rand PW. 2006. *Borrelia garinii* in seabird ticks (*Ixodes uriae*), Atlantic Coast, North America. *Emerging Infectious Diseases* **12**:1909–1912.
- Sojka D. 2016. “Krvemlýnek” ve střevě klíštěte. *Živa* **1**:10–13.
- Sonenshine DE, Lane RS, Nicholson WL. 2002. Ticks (Ixodida). *Medical and Veterinary Entomology* **2**:517–558.
- Süss J. 2011. Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia-An overview. *Ticks and Tick-borne Diseases* **2**:2–15.
- SZÚ. 2020. Infekce v ČR - ISIN. Available from <http://www.szu.cz/publikace/data/2020> (accessed April 17, 2021).
- Taragel'ová VR, Mahříková L, Selyemová D, Václav R, Derdáková M. 2016. Natural foci of *Borrelia lusitaniae* in a mountain region of Central Europe. *Ticks and Tick-borne Diseases* **7**:350–356.
- Václav R, Prokop P, Fekiač V. 2007. Expression of breeding coloration in European Green Lizards (*Lacerta viridis*): variation with morphology and tick infestation. *Canadian Journal of Zoology* **85**:1199–1206.
- Valešová M. 1999. *Lymeská artritida*. Grada Publishing, a.s., Praha.
- Vancová M et al. 2020. Three-dimensional reconstruction of the feeding apparatus of the tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae): a new insight into the mechanism of blood-feeding. *Scientific Reports* **10**:1–7.
- Vancová M, Rudenko N, Vaněček J, Golovchenko M, Strnad M, Rego ROM, Tichá L, Grubhoffer L, Nebesářová J. 2017. Pleomorphism and Viability of the Lyme Disease Pathogen *Borrelia burgdorferi* Exposed to Physiological Stress Conditions: A Correlative Cryo-Fluorescence and Cryo-Scanning Electron Microscopy Study. *Frontiers in Microbiology* **8**:596.
- Véle A. 2018. *Biologické posouzení záměru. Železný Brod*.
- Vieira JP, Brito MJ, de Carvalho IL. 2019. *Borrelia lusitaniae* Infection Mimicking Headache, Neurologic Deficits, and Cerebrospinal Fluid Lymphocytosis. *Journal of Child Neurology* **34**:748–750.
- Wada T et al. 2010. Selective ablation of basophils in mice reveals their nonredundant role in acquired immunity against ticks. *Journal of Clinical Investigation* **120**:2867–2875.
- Wrangel R. 1995. Haltung und Nachzucht der Pamphyllischen Smaragdeidechse *Lacerta pamphylica*. *Herpetofauna*:6–14. Available from herpetofauna.de.
- Younsi H, Postic D, Baranton G, Bouattour A. 2001. High prevalence of *Borrelia lusitaniae* in *Ixodes ricinus* ticks in Tunisia. *European Journal of Epidemiology* **17**:53–56.

Zhang X, Meltzer MI, Peña CA, Hopkins AB, Wroth L, Fix AD. 2006. Economic impact of Lyme disease. *Emerging Infectious Diseases* **12**:653–660.

Zwach I. 2013. *Obojživelníci a plazi České republiky*, 2nd edition. Grada Publishing, a.s., Praha.

9 Samostatné přílohy

9.1 Příloha 1 – Záznamový arch: Obecné informace o odchycených ještěrkách

Tabulkový přehled všech 52 odchycených ještěrek (č. J.: číslo ještěrky), rozdělených podle kategorií juvenilní jedinec (JUV), samice (F), samec (M). Poslední sloupec s přehledem počtu odebraných klíšťat celkem a podíl larev, nymf.

č. J	pohlaví	počet klíšťat	larvy	nymfy
1/0	F	7	2	5
2/0	M	4	0	4
3/0	F	7	1	6
4/0	M	0	0	0
5/0	JUV	0	0	0
6/0	F	8	2	6
7/0	JUV	3	2	1
8/0	JUV	1	0	1
9/0	F	67	38	29
10/0	M	7	3	4
11/0	JUV	0	0	0
12/0	M	31	5	26
13/0	JUV	0	0	0
14/0	M	6	2	4
15/0	F	16	6	10
16/0	JUV	2	2	0
17/0	JUV	4	2	2
18/0	F	12	10	2
19/0	F	40	39	1
20/0	F	7	7	0
21/0	M	23	22	1
22/0	M	58	55	3
23/0	JUV	11	11	0
24/0	M	22	18	4
25/0	JUV	0	0	0
26/0	JUV	0	0	0
27/0	JUV	0	0	0
28/0	M	16	15	1
29/0	F	3	3	0
30/0	JUV	43	43	0
31/0	F	4	4	0
32/0	F	16	16	0
33/0	F	28	28	0
34/0	M	0	0	0

č. J	pohlaví	počet klíšťat	larvy	nymfy
36/0	JUV	0	0	0
37/0	M	0	0	0
38/0	M	0	0	0
39/0	M	0	0	0
40/0	JUV	0	0	0
41/0	F	5	5	0
42/0	F	0	0	0
43/0	F	0	0	0
44/0	M	0	0	0
45/0	F	7	6	1
46/0	M	3	2	1
47/0	JUV	0	0	0
48/0	JUV	0	0	0
49/0	M	0	0	0
50/0	JUV	0	0	0
51/0	JUV	0	0	0
52/0	JUV	27	25	2

9.2 Příloha 2 – Informace klíšťatech sajících na ještěrkách

Tabulkový přehled zahrnující výsledky PCR analýzy: pozitivní (na borrelie) či negativní. Dále ukazující počty všech odebraných klíšťat a borrelia-pozitivních klíšťat. Borrelia-pozitivní klíšťata byla dále sekvenována a rozdělena podle detekovaných druhů borrelí na *B. lusitaniae* (larvy, nymfy), *B. afzelii* (nymfy) a *B. burgdorferi* s.s. (nymfy).

č. J	tkáň ještěrky (PCR)	počet klíšťat	borrelia pozitivní klíšťata	<i>Borrelia lusitaniae</i> larvy	<i>Borrelia lusitaniae</i> nymfy	<i>Borrelia afzelii</i> nymfy	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. nymfy
1/0	negativní	7	3	0	2	1	0
2/0	negativní	4	2	0	2	0	0
3/0	negativní	7	3	1	2	0	0
4/0	negativní	0	0	0	0	0	0
5/0	negativní	0	0	0	0	0	0
6/0	negativní	8	1	0	1	0	0
7/0	negativní	3	0	0	0	0	0
8/0	negativní	1	0	0	0	0	0
9/0	pozitivní	67	6	0	4	2	0
10/0	negativní	7	0	0	0	0	0
11/0	pozitivní	0	0	0	0	0	0
12/0	negativní	31	5	0	1	4	0
13/0	negativní	0	0	0	0	0	0
14/0	negativní	6	1	1	0	0	0
15/0	pozitivní	16	4	1	0	3	0

č. J	tkáň ještěrky (PCR)	počet klíšťat	borrelia pozitivní klíšťata	<i>Borrelia lusitaniae</i> larvy	<i>Borrelia lusitaniae</i> nymfy	<i>Borrelia afzelii</i> nymfy	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s. nymfy
17/0	negativní	4	1	0	0	1	0
18/0	negativní	12	8	6	2	0	0
19/0	negativní	40	0	0	0	0	0
20/0	negativní	7	1	1	0	0	0
21/0	negativní	23	11	10	1	0	0
22/0	negativní	58	1	0	0	1	0
23/0	negativní	11	0	0	0	0	0
24/0	negativní	22	2	0	1	0	1
25/0	negativní	0	0	0	0	0	0
26/0	negativní	0	0	0	0	0	0
27/0	negativní	0	0	0	0	0	0
28/0	negativní	16	1	0	1	0	0
29/0	negativní	3	0	0	0	0	0
30/0	negativní	43	1	1	0	0	0
31/0	negativní	4	0	0	0	0	0
32/0	negativní	16	5	5	0	0	0
33/0	negativní	28	9	7	0	0	2
34/0	negativní	0	0	0	0	0	0
35/0	negativní	0	0	0	0	0	0
36/0	negativní	0	0	0	0	0	0
37/0	negativní	0	0	0	0	0	0
38/0	negativní	0	0	0	0	0	0
39/0	negativní	0	0	0	0	0	0
40/0	negativní	0	0	0	0	0	0
41/0	negativní	5	0	0	0	0	0
42/0	negativní	0	0	0	0	0	0
43/0	negativní	0	0	0	0	0	0
44/0	negativní	0	0	0	0	0	0
45/0	negativní	7	1	1	0	0	0
46/0	negativní	3	0	0	0	0	0
47/0	negativní	0	0	0	0	0	0
48/0	negativní	0	0	0	0	0	0
49/0	negativní	0	0	0	0	0	0
50/0	negativní	0	0	0	0	0	0
51/0	negativní	0	0	0	0	0	0
52/0	negativní	27	0	0	0	0	0