

# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní  
hospodářství**

## ***Ixodes ricinus* jako zdroj infekčních onemocnění pro zvířata i lidi**

**Ema Sošková**

**Jihomoravský kraj**

**Brno 2019/2020**

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní  
hospodářství

***Ixodes ricinus* jako zdroj infekčních onemocnění  
pro zvířata i lidi**

***Ixodes ricinus* as a source of infectious diseases for  
animals and humans**

**Autor:** Ema Sošková

**Škola:** Gymnázium, Brno, Křenová 36, 602 00

**Kraj:** Jihomoravský

**Konzultant:** Doc. MVDr. Eva Bártová Ph.D.

Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Brno 2019/2020

# Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 30. srpna 2022 .....

Ema Sošková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala doc. MVDr. Evě Bártové, Ph.D. za pomoc a podnětné připomínky při sepisování této práce. Velké díky také patří Mgr. Nikole Kašpárkové za pomoc a trpělivost při výzkumu v laboratoři, dále MVDr. Pavlíně Pittermannové za vedení při vlajkování.

Především bych chtěla poděkovat své mamince za velkou podporu a motivaci při tvorbě této práce a všem s tím spojené.

## Anotace

*Anaplasma* sp. a *Rickettsia* sp. jsou obligátní nitrobuněčné bakterie způsobující řadu onemocnění u lidí i zvířat. Tato onemocnění jsou přenášena převážně klíšťaty.

Cílem práce byla detekce původců infekčních onemocnění *Anaplasma* sp. a *Rickettsia* sp. u klíšťat *Ixodes ricinus*.

Sběr klíšťat probíhal metodou vlajkování v městských částech Brno-Bystrc, Brno-Pisárky a v okolí Brněnské přehrady. Vlajkování v Bystrci probíhalo v Zoologické zahradě a v přírodním parku Podkomorské lesy a to v roce 2015 (květen - září). V této městské části bylo nasbíráno 59 klíšťat, která byla rozdělena do 15 vzorků (35 nymf, 3 samice a 1 samec). V Pisárkách probíhal sběr klíšťat v městských parcích Anthropos, Wilsonův les a Masarykův háj a to v roce 2014 (březen - červen). V těchto parcích bylo celkem nasbíráno 151 klíšťat, která byla rozdělena do 55 vzorků (120 nymf, 10 samic a 21 samců). V okolí Brněnské přehrady probíhalo vlajkování v lokalitách Kozí horka a Přístaviště Bystrc a to v letech 2014 a 2015 (březen – červen). V těchto lokalitách bylo sesbíráno 180 klíšťat, která byla rozdělena do 45 vzorků (159 nymf, 5 samic, 6 samců a 10 larev). Celkem bylo nasbíráno 390 klíšťat, ze kterých bylo vytvořeno 115 vzorků.

K detekci výše uvedených patogenů byla použita metoda polymerázové řetězové reakce, pozitivní vzorky byly zaslány na sekvenování k přesné identifikaci. Celkem bylo 26 vzorků (22,6 %) pozitivních alespoň na jednoho ze dvou testovaných patogenů, z toho u jednoho vzorku byla zjištěna smíšená infekce. Nejvyšší pozitivita byla dosažena u larev (50 %). U dospělců byla vyšší pozitivita mezi samci (35,7 %). Bakterie *Anaplasma* sp. byla detekována u 4 vzorků (3,5 %) a *Rickettsia* sp. u 23 vzorků (20 %).

Stanovené prevalence pro *Anaplasma* sp. dosahovaly ve všech třech zkoumaných lokalitách podobných hodnot. Nejvyšší hodnota prevalence byla zaznamenána v městské části Bystrc (6,7 %). Naopak nejnižší hodnota prevalence byla zjištěna v okolí Brněnské přehrady (2,2 %). Bakterie *Rickettsia* sp. se vyskytovala s nejvyšší prevalencí v Pisárkách (27,3 %), dále v městské části Bystrc (26,7 %). Nejnižší prevalence (8,9 %) byla zjištěna v okolí Brněnské přehrady.

Výsledky této práce jsou základem pro bližší a rozsáhlejší výzkum výskytu *Anaplasma* sp. a *Rickettsia* sp. na území města Brna a to ve spolupráci VFU Brno a Masarykovy univerzity.

**Klíčová slova:** *Anaplasma*; *Rickettsia*; PCR; klíšťata.

## Annotation

*Anaplasma* sp. and *Rickettsia* sp. are obligatory intracellular bacteria causing a wide range of diseases in humans and animals. These diseases are mainly transmitted by ticks.

This work was focused on presence of pathogens of infectious diseases *Anaplasma* sp. and *Rickettsia* sp. in ticks *Ixodes ricinus*.

The ticks were collected using the flagging method in the Brno-Bystrc, Brno-Pisárky and Brno dam districts. Flagging in Bystrc took place in the ZOO and Podkomorské lesy nature park from May to September 2015. In total, 59 ticks were collected in these localities and divided into 15 samples (35 nymphs, 3 females and 1 male). In Pisárky ticks were collected in the city parks Anthropos, Wilsonův les and Masarykův háj from March to June in 2014. In total, 151 ticks were collected in these localities and divided into 55 samples (120 nymphs, 10 females and 21 males). In the surroundings of the Brno dam, flagging was carried out in the locations of Koží horka and the Bystrc dock from March to June in 2014 and 2015. In total, 180 ticks were collected in these localities and divided into 45 samples (159 nymphs, 5 females, 6 males and 10 larvae). A total of 390 ticks were collected and divided in 115 samples.

The above mentioned pathogens were detected by the polymerase chain reaction. Positive samples were sent for sequencing for accurate identification. In total 26 samples (22.6 %) were positive at least for one of both tested pathogens. In one sample was detected mixed infection. The highest positivity was reached in larvae (50 %). Bacteria *Anaplasma* sp. was detected in 4 samples (3.5 %) and *Rickettsia* sp. in 23 samples (20 %).

Determined prevalence of *Anaplasma* sp. reached similar values in all three researched locations. The highest prevalence was detected in city district Bystrc (6.7 %). On the other hand the lowest prevalence value was detected in the surroundings of the Brno dam (2.2 %). The highest prevalence of *Rickettsia* sp. was determined in Pisárky (27.3 %), then in Bystrc (26.7 %). The lowest prevalence was found in the surroundings of the Brno dam (8.9 %).

The results of this study will be the basis for more detailed and extensive research on the occurrence of *Anaplasma* sp. and *Rickettsia* sp. in Brno in cooperation of University of Veterinary and Pharmaceutical Science Brno and Masaryk University.

**Keywords:** *Anaplasma*; *Rickettsia*; PCR; ticks.

# Obsah

1	Úvod.....	8
2	Literární přehled.....	10
2.1	Klíště obecné ( <i>Ixodes ricinus</i> ).....	11
2.1.1	Životní cyklus klíšťat.....	12
2.2	Nemoci přenášené klíšťaty.....	15
2.2.1	Anaplazmóza .....	15
2.2.2	Rickettsióza .....	17
3	Metodika.....	20
3.1	Sběr klíšťat.....	20
3.2	Izolace DNA .....	20
3.3	Polymerázová řetězcová reakce .....	22
3.4	Gelová elektroforéza .....	24
3.5	Statistické zhodnocení výsledků .....	25
4	Výsledky.....	26
5	Diskuze.....	30
6	Závěr.....	32
7	Seznam použité literatury .....	34
8	Seznam použitých internetových odkazů .....	37
9	Seznam obrázků a tabulek.....	41
10	Příloha 1: Postup výpočtu chí-kvadrát testu nezávislosti .....	42

# 1 Úvod

V této práci jsem řešila problematiku výskytu bakterií *Anaplasma* sp. a *Rickettsia* sp. u klíšťat. Bakterie rodu *Anaplasma* a *Rickettsia* jsou původci závažných onemocnění pro zvířata i lidi. Tato onemocnění mohou být infekční pouze, pokud dojde k úspěšnému přenosu pomocí vektoru. Na území České republiky je tímto vektorem nejčastěji klíště obecné (*Ixodes ricinus*).

Monitoring výskytu a patogenity obou bakterií je důležitý z hlediska prevence onemocnění způsobených těmito klíšťaty. V posledních letech dochází v důsledku klimatických změn k migraci klíšťat na nová území, a proto nabývá monitoring výše zmíněných bakterií na významu.



**Cíle práce:**

- Sběr klíšťat v Brně (v městských parcích a na dalších travnatých plochách v Bystrci, Pisárkách a u Brněnské přehrady) metodou vlajkování.
- Detekce *Anaplasma* sp. a *Rickettsia* sp. u klíšťat (*Ixodes ricinus*), a to metodami molekulární biologie (PCR, gelová elektroforéza).
- Sekvence pozitivních vzorků.
- Zhodnocení celkové i dílčí (v rámci Brna a v jednotlivých městských částech) prevalence výskytu *Anaplasma* sp. a *Rickettsia* sp..

## 2 Literární přehled

Klíšťata zahrnují tři odlišné čeledi: *Argasidae* „měkká“ klíšťata (soft ticks), *Ixodidae* „tvrdá“ klíšťata (hard ticks) a *Nuttalliellidae*. Tyto tři skupiny klíšťat jsou odlišné jak stavbou, tak vývojem. Fylogenetický vztah čeledi *Nuttalliellidae* nebyl doposud zcela objasněn, jelikož chybí molekulárně genetické informace o této čeledi (URL 11). Z epidemiologického hlediska jsou nejdůležitější čeledi *Argasidae* a *Ixodidae* (Hubálek, 2000).

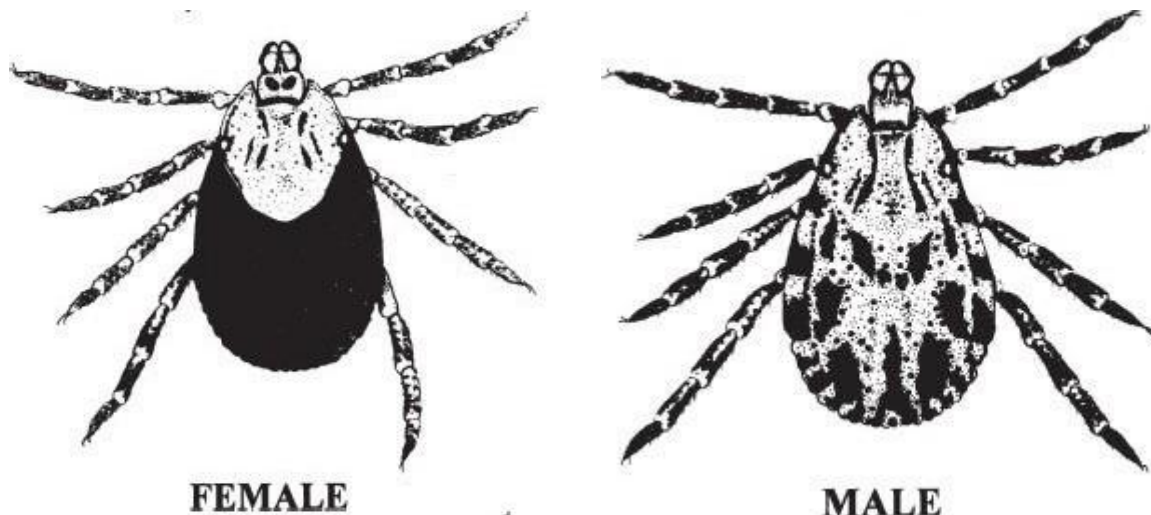
### Měkká klíšťata (*Argasidae*)

Tělo klíšťat není kryto hřbetním štítkem a integument je na hřbetě měkce vrásčitý až bradavičnatý. Ústní ústrojí mají na spodní straně těla. Ve vývoji se vyskytuje větší množství instarů nymf. Tento typ klíšťat žije až 25 let a dokáže hladovět i několik let. Na rozdíl od klíšťat čeledi *Ixodidae*, které sají dlouhodobě (2 – 14 dní), klíšťata čeledi *Argasidae* sají krev krátkodobě (většinou 1 – 2 min, nanejvýš několik hodin).

Tato klíšťata mohou přenášet velké množství patogenů a to jak na zvířata, tak i na člověka, a proto je tato skupina hmyzu velice nebezpečná z hlediska rizika přenosu různých onemocnění. Klíšťata se podílí na přenosu různých infekčních patogenů slinami, ale i koxální tekutinou, která je smíchaná s hemolymfou z koxálních žláz. Klíšťata mohou vyvolat i těžké alergické reakce doprovázené anafylaktickým šokem (Sedlák, 2000).

### Tvrdá klíšťata (*Ixodidae*)

Tělo klíštěte se nazývá idiosoma, které je kryto štítkem (*scutum*). Tělo samce je celé pokryto štítkem, ale u samice je pokryta jen přední část těla (Obr. 1). Zbytek těla samice, který není pokryt štítkem, se nazývá *alloscutum*. Velikost těla klíštěte se pohybuje v rozmezí 2 – 20 mm, ale samice může při sání zvětšit svůj objem až 100 x, což znamená, že může měřit 25 – 30 mm. Chobotek (hypostom) je vyzbrojený několika příčnými řadami drobných, dozadu směřujících zoubků a představuje bodavě sací ústní ústrojí. Tento chobotek má také funkci rozmnožovací, kdy slouží jako kopulační orgán. Samice jsou oplodňovány spermatofory obsahujícími spermie. Přední část vlastního těla klíštěte nese končetiny a také genitální otvor. Na zadní části se nachází vzdušnice a řitní otvor. Ve vývojovém stadiu larvy a nymfy je genitální otvor uzavřen a skryt a otevírá se až v období dospělosti (URL 1).



Obr. 1: Tvrdá klíšťata z čeledi *Ixodidae*- samec a samice. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK83636/>)

## 2.1 Klíšťe obecné (*Ixodes ricinus*)

Klíšťe obecné (*Ixodes ricinus*) je roztoč s dorzoventrálně zploštělým oválným tělem a zřetelně vyvinutou přední částí těla. Klíšťata jsou obligátní ektoparazité sající krev u savců, plazů a ptáků. Ve střední Evropě je klíšťe obecné nejhojnějším zástupcem čeledi klíšťatovitých- *Ixodidae*. Rozšíření tohoto druhu zahrnuje téměř celou Evropu i část severní Afriky.

### Zařazení do systému

Taxonomické zařazení *Ixodes ricinus* bylo zavedeno Carlem von Linné, 1758 (URL 10), (upraveno dle Sedlák, 2000).

Kmen: Členovci (*Arthropoda*)

Podkmen: Klepítkatci (*Chelicerata*)

Třída: Pavoukovci (*Arachnida*)

Řád: Roztoči (*Acarina*)

Podřád: Klíšťata (*Ixodides*)

Čeleď: Klíšťatoví (*Ixodidae*)

Rod a druh: Klíšťe obecné (*Ixodes ricinus*)

Klíště obecné je nejběžnější druh klíštěte na našem území. Jeho výskyt je vázán především na prostředí, kde je největší šance, že naleznou svého hostitele. Klíště vyžaduje alespoň 80 % relativní vlhkost, nejčastěji se proto vyskytuje v biotopech lesů, křovin, pastvin s křovinami, i v městských parcích a zahradách (Randolph et al., 2002). Typickým místem výskytu těchto klíšťat ve městech jsou parky.

Klíšťata jsou velmi citlivá na klimatické změny, které dokážou ovlivnit hojnost jejich výskytu i aktivitu. Během zimy je jejich fyzická aktivita utlumena a jejich vývoj je pozastaven. Ve volné přírodě je v tomto období spatříme velmi vzácně. Jejich aktivita je nejvyšší na jaře a v případě mírnější zimy se mohou objevovat v přírodě podstatně dříve. Během léta je vlivem působením vysokých teplot, jejich aktivita nižší, a proto se v přírodě s nimi setkáme v menším počtu.

S poklesem horkých letních teplot se na podzim aktivita klíšťat opět zvyšuje a klíšťata jsou aktivní do té doby, než opět poklesne teplota a jejich aktivita přes zimu ustane (Randolph et al., 2002).

Dlouholeté studie v České republice prokázaly, že se klíšťata začala objevovat i v oblastech, které byly po dlouhou dobu klíšťat prosté. Jedná se především o lokality položené ve vyšších nadmořských výškách. Dříve se klíšťata zdržovala v nadmořských výškách do 700 m. V posledních letech se ale objevují i ve výškách až 1000 metrů nad mořem, kde jsou schopny dokončit svůj vývojový cyklus (Daniel et al., 2003).

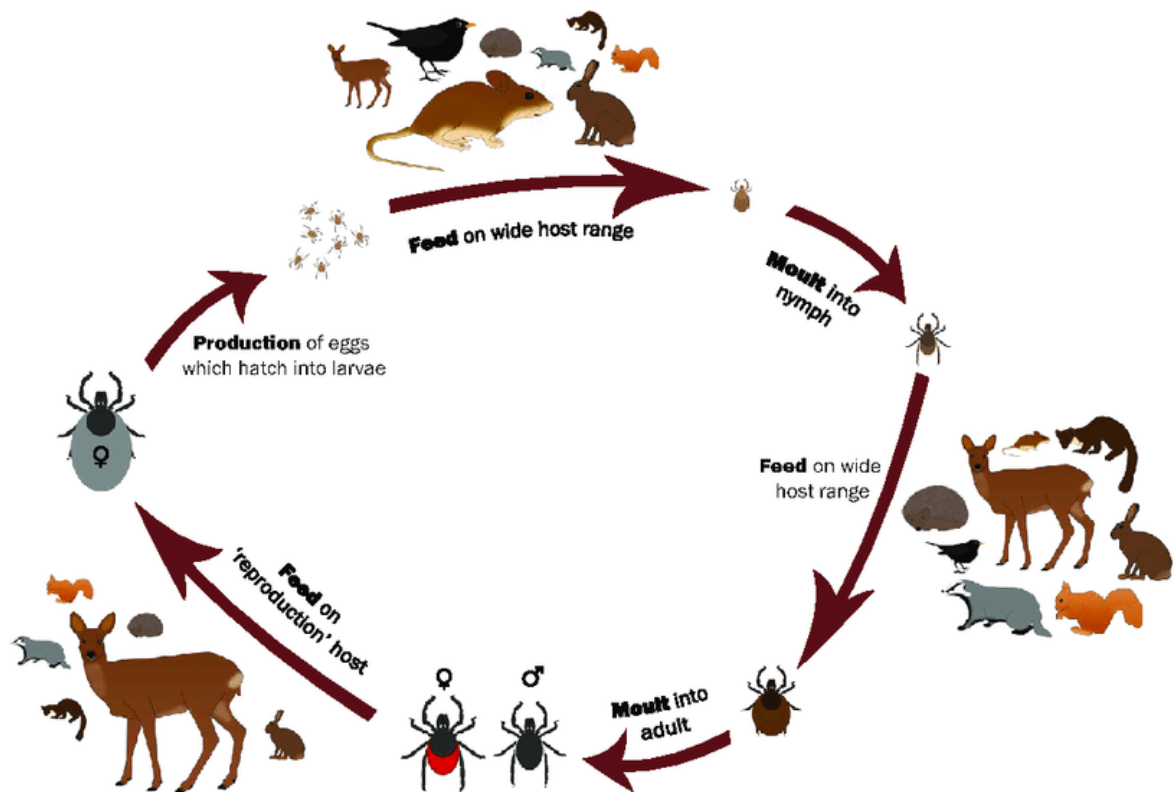
### **2.1.1 Životní cyklus klíšťat**

Vývoj klíštěte probíhá od vajíčka, dále přes larvu, nymfu a končí imagem. Tento cyklus obvykle probíhá 3 roky. Po oplození samečkem a plném nasátí krve, klade samice až 10 000 vajíček v hrabance. Z vajíček se následně začnou líhnout šestinohé larvy, které většinou sají na ptácích či drobných plazech. Po sání se v půdě svlékají a mění se na osminohé nymfy, které sají na hlodavcích a poté se opět svlékají. Nymfa se dále přemění v imago. Dospělé samice pak sají na skotu, lesní zvěři, domácích zvířatech a případně na člověku. Samci obvykle krev nesají (Anděra a kol., 2003).

Vývoj klíšťat může probíhat na jednom, či více hostitelích. Podle toho dělíme vývojové cykly na jednohostitelský, dvojhositelský a trojhositelský. Klíště obecné prochází, jako většina našich klíšťat, trojhositelským cyklem (Obr. 2).

Při trojhostitelském cyklu cizopasí každé vývojové stádium na jiném hostiteli. Toto střídání hostitele má epidemiologický význam. Vývoj klíštěte v přírodě vrcholí v období jara a pak také na podzim. V létě probíhá u klíštěte přeměna ve vyšší vývojové stádium.

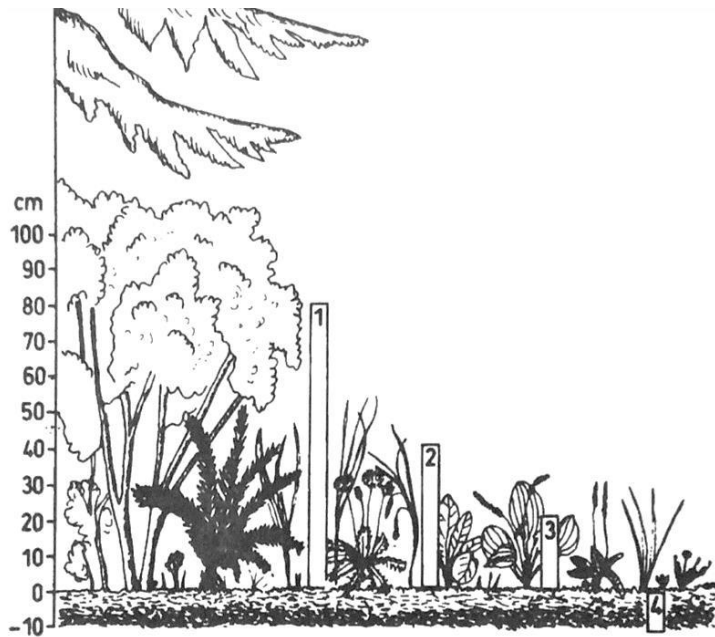
Samičky, které nakladou na podzim vajíčka, přezimují stejně, jako larvy, nymfy a neoplozené samičky (Hubálek a Rudolf, 2007).



Obr. 2: Trojhostitelský životní cyklus klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*). ([https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-life-cycle-of-Ixodes-ricinus-Ixodes-ricinus-immature\\_fig1\\_311431517](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-life-cycle-of-Ixodes-ricinus-Ixodes-ricinus-immature_fig1_311431517))

Při hledání hostitele uplatňují klíšťata několik strategií a podle toho se dělí na klíšťata, která vyčkávají v hnízdech či norách a klíšťata hledající svého hostitele v prostředí (takzvaná pastevní klíšťata).

Klíště obecné se řadí do skupiny pastevních klíšťat, která aktivně vyhledávají svého hostitele v prostředí lesů a luk. Na hostitele číhají v různých výškách na vegetaci podle stádia vývoje. Larvy a nymfy většinou napadají z trávy či hrabanky, imaga z keřů, travin a jiných bylin (Obr. 3). Výška, do které klíště vyšplhá, závisí také na velikosti jeho budoucího hostitele. Pokud bude budoucím hostitelem klíštěte velké zvíře, vyšplhá až do výšky 1 m.



Obr. 3: Rozmístění jednotlivých stádií ve vegetaci. Imaga (1), nymfy (2), larvy (3) a svlékající či přezimující klíšťata (4).  
[https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/17039/BPTX\\_0\\_0\\_11160\\_0\\_55700\\_0\\_18095.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/17039/BPTX_0_0_11160_0_55700_0_18095.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Na svého hostitele vyčkává tak, že zvedá 1. pár předních končetin, kde se na dorsální straně chodidla nachází Hallerův orgán sloužící k detekci CO<sub>2</sub>. (URL 1). Po přichycení na svého hostitele se po něm klíště dokáže pohybovat i několik hodin, než nalezne místo, kde se přisaje (Parola a Raoult, 2001).

Tělo hostitele reaguje na ztrátu krve hemostázou, která způsobuje srážení krve. Bodnutí klíštětem zůstává většinou nepostřehnuo, jelikož jeho sliny obsahují anestetikum ixodin, které také slouží proti srážlivosti krve. K pevnému ukotvení klíštěte v pokožce hostitele slouží speciální látky vylučované taktéž pomocí slin, které vytvoří kolem jeho hypostomu takzvanou cementovou vrstvu.

Prvních 24 - 36 h po přichycení v pokožce se klíště krví krmí jen velmi málo či vůbec. Po uplynutí této doby saje klíště krev v několika periodách, ve kterých se střídají fáze sání krve a intenzivního vylučování slin do organismu hostitele. Obecně se klíšťata čeledi *Ixodidae* krmí 2 - 15 dní (Parola a Raoult, 2001).

Při sání krve může docházet k přenosu mnohých patogenních organismů, které mohou způsobovat různá onemocnění. Přenos patogenů pomocí krev sajících vektorů se dá rozdělit na dva způsoby, a to na mechanický a biologický.

O mechanický způsob přenosu se jedná, pokud nedojde k modifikaci patogenu přeneseného klíštětem. Úspěšnost přenosu těchto organismů tedy spočívá v množství, jež se do vektoru dostane.

Pokud dojde při přenosu patogenu k jeho modifikaci či pomnožení v organismu hostitele, jedná se o biologický způsob přenosu (Marcondes, 2017).

## 2.2 Nemoci přenášené klíšťaty

Klíšťata jsou jedním z nejčastějších přenašečů infekčních onemocnění. Celkově je jich známo několik desítek. Na území České republiky je jich daleko méně, ale přesto mohou být tyto nemoci velmi závažné (Hubálek, et al., 2007).

Klíšťata přenáší původce bakteriálních, virových, ale i protozoálních onemocnění. Mezi nejznámější virové onemocnění způsobené klíšťaty patří klíšťová encefalitida. Klíšťata mohou přenášet i původce bakteriálních nemocí, jako jsou Lymeská borelióza, tularemie, lidská granulocytární anaplazmóza, či horečka Skalistých hor. Mezi protozoální onemocnění přenášené klíšťaty patří babezióza, která bývá velmi často spojena s boreliózou (Hubálek a Rudolf, 2007).

Původci těchto infekčních onemocnění se vyskytují pouze v endemických oblastech (Daniel et al., 2003). Nejvýznamnějšími přenašeči těchto infekcí jsou klíšťata trojhostitelská, která se mohou vyvíjet i přes to, že jsou infikována. Infekční onemocnění u nich mohou poškodit slinné žlázy a vaječníky. Infekce vaječníků může způsobit, že se infekce šíří na potomstvo. Tento způsob infekce se označuje jako transovariální (Hubálek a Rudolf, 2007).

### 2.2.1 Anaplazmóza

Anaplazmóza je zoonóza způsobena bakteriemi z čeledi *Anaplasmataceae*, kam patří druhy patogenní pro lidi i zvířata. Jedná se o malé, gram negativní, obligátní intracelulární bakterie. Replikují se v granulocytech a monocytech hostitelských buněk, kde následně vytváří moruly (URL 1).

Pro člověka jsou patogenní čtyři druhy:

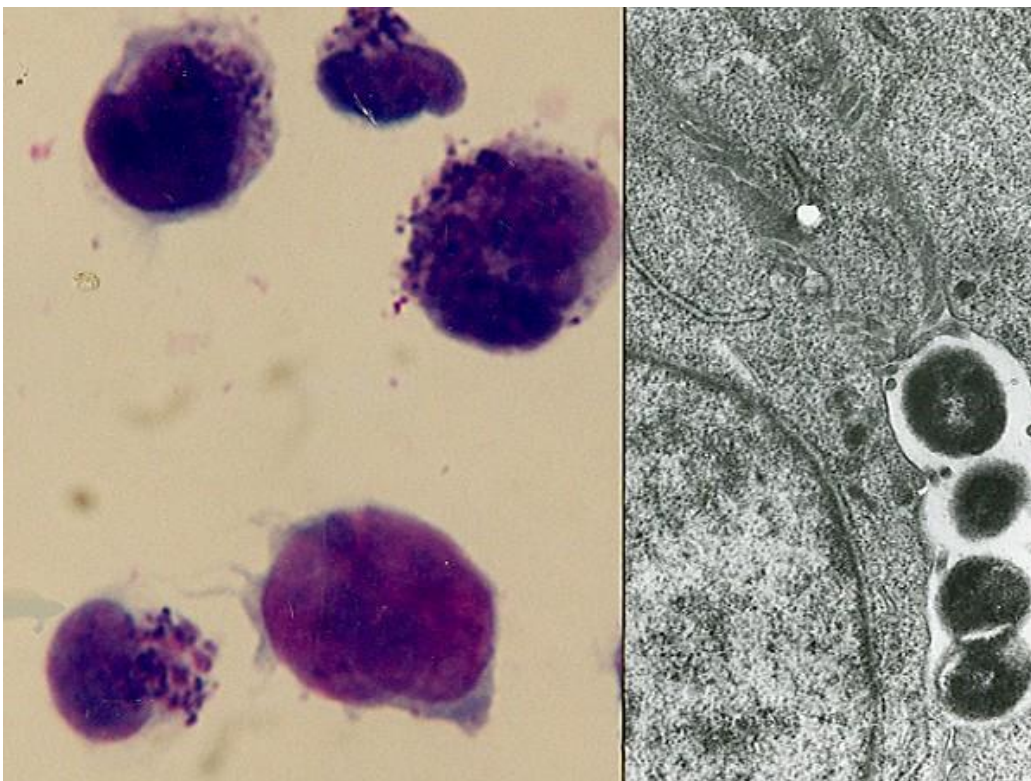
- 1) *Ehrlichia chaffeensis* - původce lidské monocytární ehrlichiozy (Human monocytic ehrlichiosis – HME).

- 2) *Anaplasma phagocytophilum* - původce lidské granulocytární anaplazmózy (dříve ehrlichiozy), (Human granulocytic anaplasmosis / ehrlichiosis – HGA / HGE).
- 3) *Ehrlichia ewingii* - původce granulocytotropické ehrlichiozy.
- 4) *Neorickettsia sennetsu* - původce monocytotropické ehrlichiozy (URL 6).

### ***Anaplasma phagocytophilum***

Jedná se o gramnegativní bakterii kokoidního až elipsoidního, často pleomorfního tvaru (Obr. 4). *A. phagocytophilum* způsobuje lidskou granulocytární anaplazmózu (URL 7). Toto onemocnění bylo poprvé zjištěno v roce 1990 u pacienta ve Wisconsinu, který zemřel s těžkým horečnatým onemocněním 2 týdny po kousnutí klíštěte (Chen, 1994), ačkoli už v roce 1932 bylo známo, že tento patogen způsobuje onemocnění (URL7).

Stejně jako rickettsie, využívá anaplasma pro šíření bakterií přenos pomocí klíšťat. Mikroorganismus se udržuje ve svých vektorech transstadiálním přenosem. Transovariální přenos u *A. phagocytophilum* není možný. V prostředí se *A. phagocytophilum* udržuje infekcí rezervoárových hostitelů, nejčastěji se jedná o malé savce. Infekce se u těchto savců projevuje velmi málo, nebo se vůbec nemusí projevit (Bergey, 2005).



Obr. 4: *Anaplasma phagocytophilum* ve vakuole v cytoplasmě buněk. Vlevo barveno Giemsa, vpravo elektronmikroskopický snímek.  
<http://www.szu.cz/tema/prevence/onemocneni-prenasena-klisaty-v-ceske-republice>



Lidská granulocytární anaplazmóza svým průběhem připomíná Lymeskou boreliózu, především vyrážkou *erythema migrans* (EM), která se často objevuje v rané fázi onemocnění. Tato vyrážka je doprovázena makulopapulární vyrážkou nebo krvácením do kůže ve středu EM. Dále se projevuje zimnicí a bolestí hlavy, mohou nastat i vážnější zánětlivé reakce, jako následek nadměrné činnosti imunitního systému (URL 7).

*A. phagocytophilum* parazituje uvnitř neutrofilních nebo eosinofilních granulocytů, může proniknout i do megakaryocytů (buňky, ve kterých v kostní dřeni vznikají erytrocyty). Jakmile je slinami klíštěte přenesena do krve člověka, nechají se bakterie pozřít neutrofilem, kde si vytváří modifikovanou vakuolu a moruli, ve které se následně množí. Napadený neutrofil má omezené funkce. Za normálních okolností mají tyto buňky krátkou životnost, v krvi se nachází jen několik hodin, poté přechází do tkání a dochází k sebedestrukci. *A. phagocytophilum* jim brání v sebezničení i v průniku do tkání, a tím jim prodlužuje jejich životnost (URL 8).

V minulosti nebyla nemoc považována za infekční, avšak jen z důvodu, že vědci neměli prostředky k její diagnostice. Moderní metody molekulární biologie však jednoznačně prokázaly patogenitu této bakterie (URL 7). Akutní neléčené případy přechází do stavu chronického a mohou ohrožovat i život pacienta. Muži onemocní touto chorobou častěji než ženy (4:1), (URL 1). Lidská granulocytární anaplazmóza se léčí antibiotiky ze skupiny tetracyklinů (URL 8).

### 2.2.2 Rickettsióza

Některé druhy rickettsií mohou být patogenní pro člověka a způsobovat různě závažné onemocnění, které se nazývají rickettsiózy (Raoult a Roux, 1997).

V minulosti byly nemoci způsobené rickettsiemi jedny z nejobávanějších. V průběhu historie byly popsány velké epidemie způsobené právě těmito bakteriemi. Uvádí se, že měly na svědomí více obětí, než všechny války v historii (Zinsser, 1939). Předpokládá se, že Rickettsie, konkrétně *R. prowazekii*, je původcem Athénské moru v roce 429 př. n. l., což byla jedna z nejstarších popsaných epidemií (Raoult a Roux, 1997).

Mezi nejzávažnější onemocnění přenášená bakterií *Rickettsia* sp. patří horečka Skalistých hor vyskytující se především v Americe a dále skvrnitý tyfus, který se vyskytuje celosvětově. Ve středomoří se můžeme setkat se závažnou Marseillskou horečkou, jejímž původcem je *R. conorii* (Parola et al., 2009).

Hlavní podmínkou, aby mohla být rickettsie patogenní pro člověka je úspěšný přenos pomocí vektoru. Takový vektor musí parazitovat na člověku. (Parola et al., 2005). Jakmile proběhne úspěšný přenos, rickettsie napadají lidský organizmus. Jedná se o intracelulární bakterie, proto se začnou rozmnožovat v endoteliálních buňkách malých a středních cév, v makrofázích, lymfocytech a granulocytech (Sahni a Rydkyna, 2009).

Podle přenašeče a příznaků dělíme rickettsie na dvě skupiny:

- 1) Rickettsie způsobující tyfové horečky (Tyfus group), které se množí v buňce hostitele do té doby, než dojde k lýze buňky a následně se uvolní do krve hostitele. Původcem mohou být *R. typhi* a *R. prowazeki* (např. Toulon tyfus, Moscow tyfus).
- 2) Rickettsie způsobující skvrnitě horečky (Spotted fever group - SFG), které mají schopnost pohybu a díky tomu se rychle šíří z buňky do buňky. Původcem mohou být *R. ricketti*, způsobující horečku Skalických hor (Rocky Mountain spotted fever), *R. conori* a *R. helvetica* (URL 1).

Každá fáze klíštěte z čeledi *Ixodidae* se živí pouze jednou. V důsledku toho je transstadiální přenos (tj. průchod bakterií z jednoho stádia do druhého, z larev do nymf a do dospělců) nezbytnou součástí vektorové kompetence.

Rickettsia získaná klíštětem během krmení na zvířeti, jakožto mezihostiteli, může být přenesena na jiného hostitele pouze tehdy, když klíště přešlo do další vývojové fáze. Pokud jsou rickettsie přenášeny účinně transstadiálně i transvariálně (z jedné generace na druhou prostřednictvím vaječnicků) u klíštěte, bude klíště sloužit také jako rezervoár bakterií.

Úspěšný transvariální přenos byl prokázán u některých druhů SFG rickettsií, včetně některých v současnosti uznávaných patogenů jako jsou *R. slovaca*, *R. parkeri* a podezřelý patogen *R. helvetica*. U některých rickettsií byl zjištěn negativní účinek na jejich vektory (URL 3).

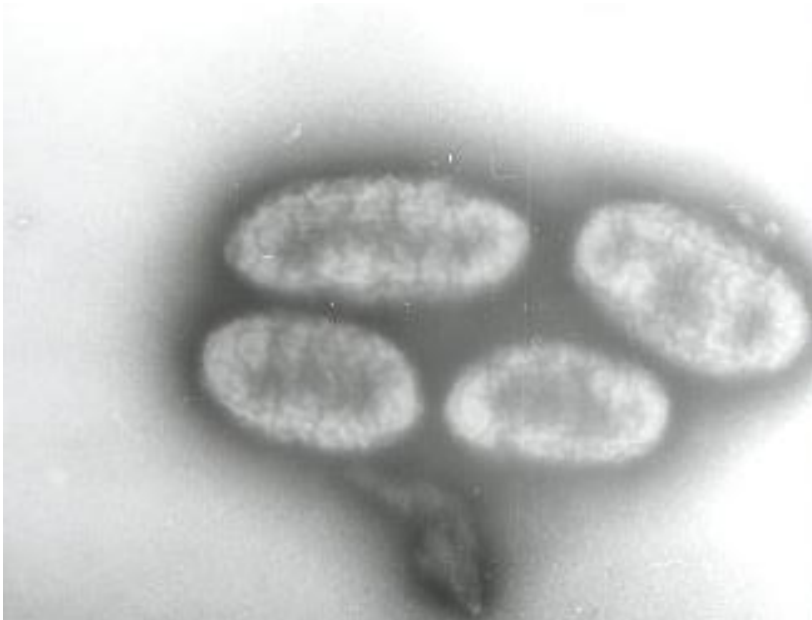
### ***Rickettsia helvetica***

*Rickettsia helvetica* (Obr. 5) je považována za nepotvrzený lidský patogen. Poprvé byla zjištěna v roce 1979 u klíšťat *I. ricinus* ve Švýcarsku jako nový člen skupiny SFG rickettsií. Bakterie *R. helvetica* byla nakonec vyizolována až v roce 1993 (URL 2). Přenašečem této rickettsie je především *I. ricinus*, ale také *I. hexagonus* a *Dermacentor reticularis* (Parola et al., 2013).

*I. ricinus* je jedním z nejrozšířenějších klíšťat na evropském kontinentu, což indikuje výskyt této rickettsie v mnoha evropských zemích, i na území České republiky (Sprong et al., 2009).

Infekce *R. helvetica* jsou obvykle považovány za mírné onemocnění, projevují se většinou bolestmi hlavy a svalů, může se objevit vyrážka, popřípadě i příškvár. Byly však hlášeny i závažnější příznaky, jako meningitida či selhání srdce (URL 4).

Léčba pacientů s možnou rickettsiózou by měla být zahájena už v případě podezření a během doby čekání na potvrzující vyšetření. Některé infekce mohou být totiž velmi rychle progresivní a mít fatální následky. Okamžitá léčba tetracyklinovými antibiotiky, nejčastěji doxycyklinem, je vhodná pro všechny věkové skupiny (URL 5).



Obr. 5: Elektronogram *Rickettsia helvetica* z endomyokarditis.  
(<http://www.szu.cz/tema/prevence/onemocneni-prenasena-klisaty-v-ceske-republice>)

## 3 Metodika

### 3.1 Sběr klíšťat

Typickým místem výskytu klíšťat obecných ve městech jsou parky. Klíšťata byla sbírána metodou vlajkování (Obr. 6) v brněnských parcích a na dalších travnatých plochách. K vlajkování byla použita vlajka z bílého pevného plátna o rozměrech 1 x 1 m. Principem vlajkování je smýkání vlajky po trávě či jiné vegetaci. Po každém metru se vlajka otočí a přichycená klíšťata se pinzetou sesbírají do zkumavek, které jsou následně popsány. V laboratoři byla klíšťata roztríděna podle vývojového stádia (larva, nymfa, imago) a pohlaví (samice, samec).



Obr. 6: Vlajkování.

(<https://www.zdraviamy.cz/wp-content/uploads/2017/05/vlajkov%C3%A1n%C3%AD-720x340.jpg>)

### 3.2 Izolace DNA

Klíšťata byla použita k izolaci DNA a to s použitím NucleoSpin™ Tissue soupravy (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Německo). Klíšťata (samice a samci po jednom, larvy a nymfy po pěti kusech) byla přesunuta do mikrocentrifugační zkumavky. Do každé zkumavky bylo přidáno 180  $\mu$ L pufru T1 a 25  $\mu$ L roztoku proteinázy K (Obr. 7). Zkumavka byla zvortexována. Zkumavky byly poté umístěny do homogenizátoru (MagNALyser) při 7000 x 99 s (dvakrát po sobě). Dále byly zkumavky inkubovány v třepacím inkubátoru při 56° C aspoň 3 hod.

Do každé zkumavky bylo přidáno 200  $\mu$ L pufru B3. Zkumavka byla zvortexována a vložena do inkubátoru při 70° C po dobu 10 min. Z každé zkumavky bylo přepipetováno 600  $\mu$ L čistého vzorku do 210  $\mu$ L etanolu (96-100 %).

Zkumavky byly zvortexovány a umístěny do centrifugy na 5 min při 11,500 x g. Vzorky byly přepipetovány do zkumavek s kolonkou a centrifugovány 1 min na 11,000 x g. Kolonky byly přemístěny do nové zkumavky a bylo k nim přidáno 500  $\mu$ L pufru BW. Zkumavky byly centrifugovány 1 min při 11,000 x g (Obr. 8). Kolonky byly opět přemístěny do nové zkumavky a bylo k nim přidáno 600  $\mu$ L pufru B5 (naředěného 96 % etanolem). Zkumavky byly umístěny do centrifugy na 1 min při 11,000 x g. Proteklá kapalina byla odstraněna a zkumavky znovu centrifugovány 1 min při 11,000 x g.

Kolonka byla umístěna do 1.5 mL mikrocentrifugační zkumavky a bylo přidáno 100  $\mu$ L pufru BE. Zkumavky byly inkubovány při pokojové teplotě na 5 min a dále centrifugovány na 1 min při 11,000 x g. Výsledná DNA byla skladována při -20 °C.



Obr. 7: Pufrы použité při izolaci DNA. (Vlastní fotografie)



Obr. 8: Vzorky připravené k centrifugaci. (Vlastní fotografie)

### 3.3 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla zavedena v roce 1983 Kary Mullisem, který za tento objev obdržel Nobelovu cenu za chemii. Jedná se o snadnou metodu zmnožení úseku DNA, založenou na principu replikace nukleových kyselin (URL 13).

K detekci *Anaplasma* sp. byla použita nested PCR amplifikující gen 16S rDNA (Massung et al., 1998). Během této metody byla použita řada čtyř primerů: ge3a a ge10r (dlouhé 932 bp) a ge2 a ge9f (dlouhé 546 bp), (Tabulka 1).

Tabulka 1: Primery použité při nested PCR.

Primer	Oligonukleotidová sekvence
ge3a	5' CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC3'
ge10r	5' TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC3'
ge2	5' GGCAGTATTAAAAGCAGCTCCAGG3'
ge9f	5' ACCGGATTATTCTTTATAGCTTGC3'

V prvním kroku PCR byly použity primery ge3a a ge10r. Reakční směs pro jeden vzorek o objemu 25  $\mu\text{L}$  byla složena z 12,5  $\mu\text{L}$  Master Mixu, 1  $\mu\text{L}$  každého primeru (naředěné v poměru 90  $\mu\text{L}$  PCR  $\text{H}_2\text{O}$  a 10  $\mu\text{L}$  primeru), 9,5  $\mu\text{L}$  PCR  $\text{H}_2\text{O}$  a 1  $\mu\text{L}$  DNA. Hotová reakční směs byla krátce zvortexována a centrifugována 5 s při 11,000 x g. Míchání směsí probíhalo v laminárním boxu. Pro PCR byla použita pozitivní a negativní kontrola. Negativní kontrola obsahovala místo DNA 1  $\mu\text{L}$  PCR  $\text{H}_2\text{O}$ . Pozitivní kontrola obsahovala 1  $\mu\text{L}$  DNA *A. phagocytophilum* potvrzené sekvenací. Zkumavky byly vloženy do termocycleru.

PCR probíhala v termocycleru, kde na vzorky působily různé teploty po pevně stanovenou dobu v opakujících se cyklech. Celá reakce byla zahájena počáteční denaturací, která probíhala 1 min při 94 °C. Dále následovaly tři fáze cyklu.

První fází byla denaturace, kde byla dvoušroubovice DNA rozpletena na dva řetězce. Denaturace probíhala 15 s při 94 °C.

Druhou fází bylo nasednutí primerů (annealing), při které byly primery specificky spojeny s komplementárními oblastmi na templátové DNA ve směru od konce 5' ke konci 3'. Tato fáze probíhala 15 s při 50 °C.

Poslední fází cyklu byla syntéza DNA, která probíhala 45 s při 72 °C. Při této fázi byly volné nukleotidy připojeny k vlákně DNA dle principu komplementarity dusíkatých bází. Celý cyklus byl 35 x opakován.

Závěrečným krokem celé reakce byla konečná elongace, která probíhala 10 min při 72 °C. V tomto kroku byla dokončena syntéza řetězců DNA a celá reakce byla schlazena na 10 °C.

Při druhém kroku nested PCR byly použity primery ge2 a ge9f. Reakční směs byla složena z 12,5  $\mu\text{L}$  Master Mixu, 1  $\mu\text{L}$  od každého primeru (naředěné v poměru 90  $\mu\text{L}$  PCR  $\text{H}_2\text{O}$  a 10  $\mu\text{L}$  primeru), 8  $\mu\text{L}$  PCR  $\text{H}_2\text{O}$  a 1  $\mu\text{L}$  produktu z prvního kroku PCR reakce. Zkumavky byly opět vloženy do termocycleru a reakce byla zahájena počáteční denaturací, která probíhala po dobu 1 min při 94 °C. Dále následoval cyklus složený ze tří fází.

První fází byla denaturace, která probíhala 15 s při 94 °C. Poté následovalo nasednutí primerů, které probíhalo 15 s při 48 °C. Poslední fází cyklu byla syntéza DNA, která probíhala 45 s při 72°C.

Posledním krokem celé reakce byla závěrečná elongace, která probíhala 10 min při 72 °C a na závěr byla celá reakce schlazena na 10 °C.

K detekci *Rickettsia* sp. byla využita jednoduchá polymerázová řetězcová reakce amplifikující gen *gltA* (Regnery et al., 1991). Vzorek pro PCR o objemu 25  $\mu\text{L}$  obsahoval 12,5  $\mu\text{L}$  Master Mix, 1,25  $\mu\text{L}$  primer I. a 1,25  $\mu\text{L}$  primer II. (naředěné v poměru 90  $\mu\text{L}$  PCR  $\text{H}_2\text{O}$  a 10  $\mu\text{L}$  primeru), 7,5  $\mu\text{L}$  PCR  $\text{H}_2\text{O}$  a 2,5  $\mu\text{L}$  DNA.

Negativní kontrola byla připravena přidáním 2,5  $\mu\text{L}$  PCR  $\text{H}_2\text{O}$  do zkumavky s 22,5  $\mu\text{L}$  reakční směsí. Pozitivní kontrola byla připravena přidáním 2,5  $\mu\text{L}$  pozitivního vzorku k reakční směsí. Do zbylých zkumavek bylo k reakční směsí přidáno 2,5  $\mu\text{L}$  získané DNA. Zkumavky byly vloženy do termocycleru.

PCR reakce byla zahájena počáteční denaturací, která probíhala 5 min při 95  $^{\circ}\text{C}$ . Dále následovaly tři fáze cyklu. První fází byla denaturace, která probíhala 20 s při 95  $^{\circ}\text{C}$ , následovalo nasednutí primerů, které probíhalo 30 s při 57  $^{\circ}\text{C}$ . Poslední fází cyklu byla syntéza DNA, která probíhala 1 min při 72  $^{\circ}\text{C}$ . Tento cyklus byl 40 x opakován (URL 12). Celá PCR reakce byla ukončena závěrečnou elongací, která probíhala 5 min při 72  $^{\circ}\text{C}$  a reakce byla schlazena na 10  $^{\circ}\text{C}$  (URL 13).

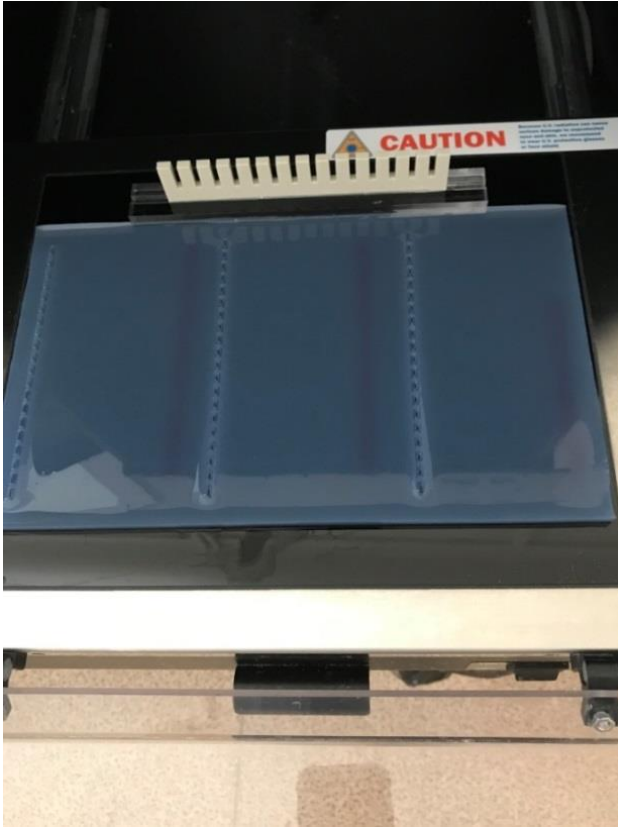
### 3.4 Gelová elektroforéza

Pro gelovou elektroforézu byl použit 1,5% agarózový gel. Do Erlenmayerovy baňky byly naváženy 3 g agarózy. Dále bylo přidáno 200 mL TBE (Tris Borate EDTA) pracovního roztoku. Směs byla povařena v mikrovlnné troubě na 4 min při 450 W. Ohřátý roztok byl schlazen pod proudem tekoucí vody a bylo přidáno 200  $\mu\text{L}$  Midori green (MG04).

Do velké formy na gel byly vloženy hřebeny. Agarózový gel byl pomalu přelit do formy a vzniklé bubliny byly odstraněny. Gel tuhl po dobu 30 min. Ze ztuhlého gelu byly vyjmuty hřebeny, které vytvořily jamky pro nanesení vzorků. Forma s gelem byla přemístěna do elektroforetické vany.

Do jamek gelu byl nanesen žebříček (3  $\mu\text{L}$  100bp DNA Marker Ladder) a po 10  $\mu\text{L}$  pozitivní kontrola, negativní kontrola a vzorky (Obr. 9). Elektroforéza probíhala při napětí 120V po dobu 60 min. Po proběhnutí elektroforézy byl gel přemístěn na UV transiluminátor, kde byly pořízeny fotografie.





Obr. 9: Focení gelu v transiluminátoru. (Vlastní fotografie)

### 3.5 Statistické zhodnocení výsledků

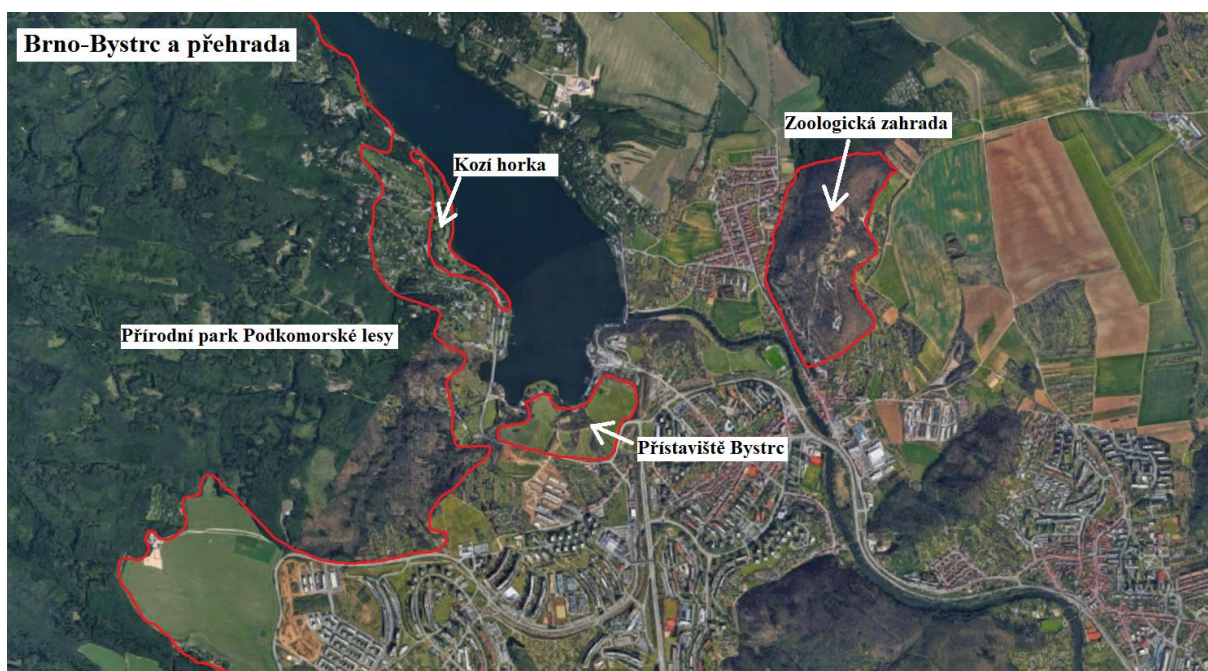
Platnost výsledků výzkumu byla ověřena pomocí statistické metody chí-kvadrát testu nezávislosti, který umožnil stanovit vztah mezi lokalitou sběru klíšťat a přítomností patogenů u vyšetřovaných klíšťat. Pomocí hodnoty chí-kvadrát testu byla určena pravděpodobnost (hodnota  $p$ ), s jakou platí nulová hypotéza, která byla dále porovnávána s hladinou významnosti (u epidemiologických studií 0,05).

Pokud je pravděpodobnost nižší než 0,05, chí-kvadrát test nezávislosti potvrdil alternativní hypotézu, tj. že existuje spojitost mezi přítomností patogenů u klíštěte a jeho výskytem. Pokud je pravděpodobnost vyšší než 0,05, je potvrzena nulová hypotéza, tj. že neexistuje spojitost mezi těmito dvěma parametry (URL 18).

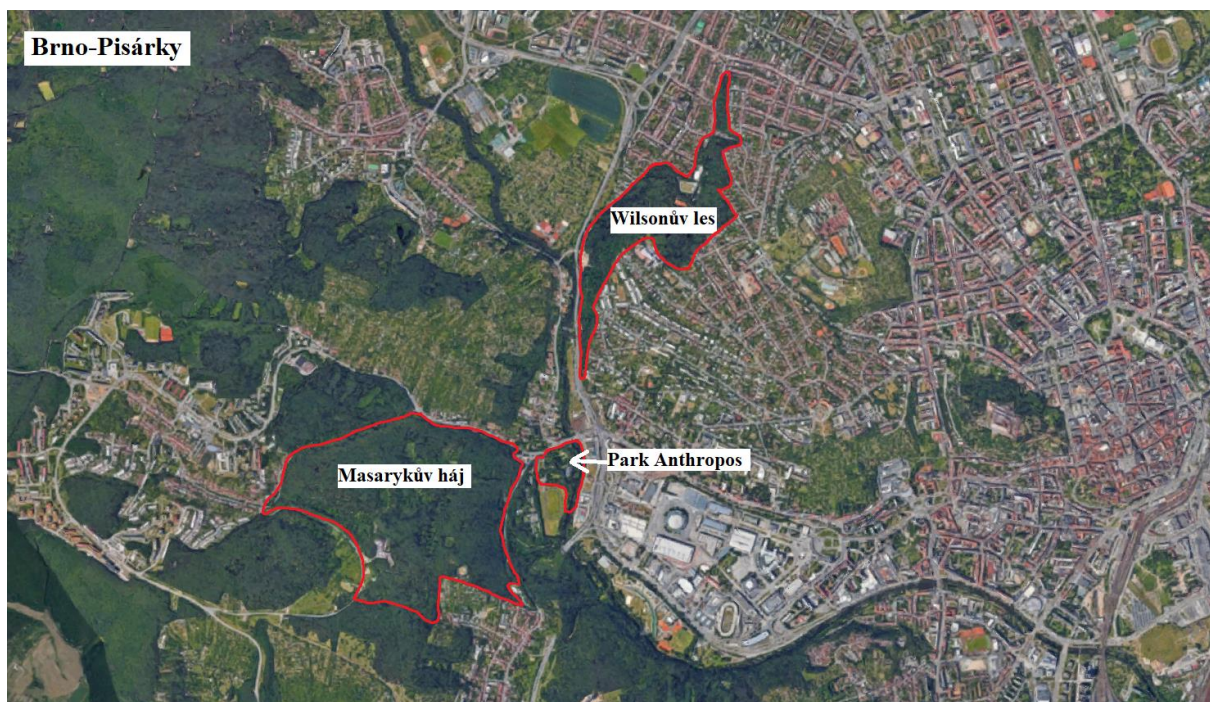
## 4 Výsledky

V městské části Brno-Bystrc byla klíšťata sbírána v Zoologické zahradě a v přírodním parku Podkomorské lesy (Obr. 10). V okolí Brněnské přehrady byla klíšťata sesbírána v lokalitách Kozí horka a Přístaviště Bystrc (Obr. 10). V části Brno-Pisárky byla klíšťata sbírána v parcích Masarykův Háj, Wilsonův les a v parku Anthropos (Obr. 11).

Celkem se podařilo nasbírat 390 klíšťat, která byla rozdělena do 115 vzorků (jeden vzorek tvořilo pět nymf nebo larev, každé imago tvořilo samostatný vzorek).



Obr. 10: Oblasti sběru klíšťat v Bystrci a u Brněnské přehrady.  
(<https://mapy.cz/zakladni?x=16.4787807&y=49.2338165&z=13&source=ward&id=14645>)



Obr. 11: Oblasti sběru klíšťat v Pisárkách.  
(<https://mapy.cz/zakladni?x=16.5554490&y=49.1934246&z=14&source=ward&id=14983>)

Celkově bylo 26 vzorků (22,6 %) pozitivních, alespoň na jednoho ze dvou testovaných patogenů, smíšená infekce (současně oba patogeny) byla zjištěna u 1 vzorku. Nejvyšší pozitivita byla u larev (50 %), v porovnání s dospělci (26 %) a nymfami (20,9 %), (Tabulka 2). U dospělců byla vyšší pozitivita u samců (35,7 %, 28 jedinců) v porovnání se samicemi (11,1 %, 18 jedinců), (Tabulka 3).

Tabulka 2: Prevalence dvou patogenů v jednotlivých vzorcích dle stádií.

Stádium	Počet vzorků	Pozitivní	Prevalence
Larvy	2	1	50 %
Nymfy	67	14	20,9 %
Dospělci	46	12	26 %

Tabulka 3: Prevalence dvou patogenů v jednotlivých vzorcích dle pohlaví.

Pohlaví	Počet vzorků	Pozitivní	Prevalence
Samci	28	10	35,7 %
Samice	18	2	11,1 %

Bakterie *Anaplasma sp.* byla zjištěna celkem u 4 vzorků (3,5 %), konkrétně 2 vzorky samců (50 %) a 2 vzorky nymf (50 %), (Tabulka 4). Nejvyšší prevalence byla zaznamenána v městské části Bystrc (6,7 %), naopak nejnižší hodnota prevalence byla zjištěna v okolí Brněnské přehrady (2,2 %), (Tabulka 5).

Tabulka 4: Rozdělení pozitivních vzorků na *Anaplasma sp.* dle pohlaví a stádií.

Pohlaví / stádium	Počet vzorků	Pozitivní	Prevalence
Nymfy	4	2	50 %
Samci	4	2	50 %

Tabulka 5: Detekce *Anaplasma sp.* v klíšťatech dle brněnských lokalit.

Lokalita	Počet vzorků	Pozitivní	Prevalence
Bystrc	15	1	6,7 %
Pisárky	55	2	3,6 %
Přehrada	45	1	2,2 %
<b>Celkem</b>	<b>115</b>	<b>4</b>	<b>3,5 %</b>

Pro *Anaplasma sp.* byla hodnota  $p = 0,715$ , což potvrzuje nulovou hypotézu, tzn., není vztah mezi lokalitou sběru klíšťat a přítomností patogenu *Anaplasma sp.*, mezi lokalitami tak nebyl statisticky významný rozdíl v prevalenci.

Bakterie *Rickettsia sp.* (Obr. 12) byla zjištěna u 23 vzorků (20 %). Nejvíce pozitivních vzorků na *Rickettsia sp.* bylo zaznamenáno u nymf (52,2 %, 12 vzorků) a u dospělců (43,5 %, 10 vzorků). U larev byl zjištěn pouze 1 pozitivní vzorek (4,3 %), (Tabulka 6). U dospělců byla vyšší pozitivita u samců (34,8 %, 8 vzorků) v porovnání se samicemi (8,7 %, 2 vzorky), (Tabulka 7).

Nejvyšší hodnota prevalence byla zjištěna v Pisárkách (27,3 %), dále v městské části Bystrc (26,7 %), zatímco nejnižší prevalence (8,9 %) byla zjištěna v okolí Brněnské přehrady (Tabulka 8).

Tabulka 6: Rozdělení pozitivních vzorků na *Rickettsia sp.* dle stádií.

Stádium	Počet vzorků	Pozitivní	Prevalence
Larvy	23	1	4,3 %
Nymfy	23	12	52,2 %
Dospělci	23	10	43,5 %



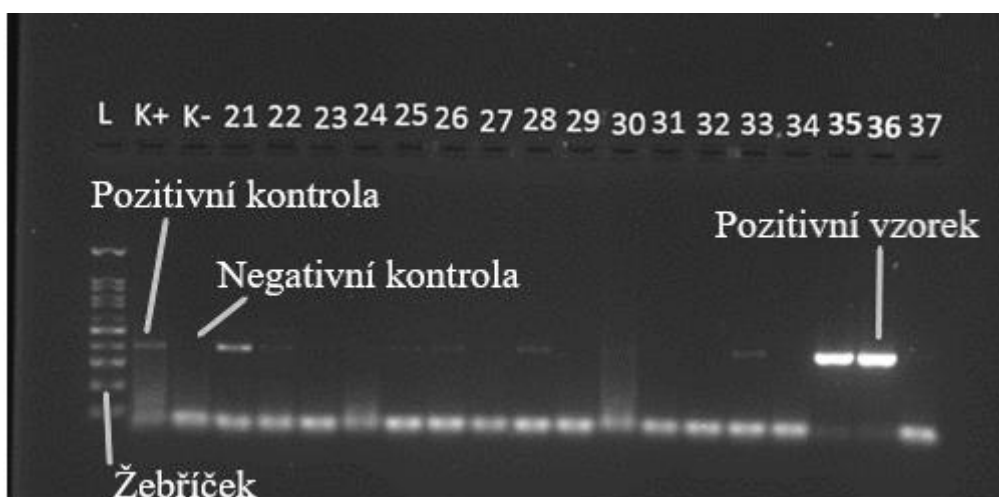
Tabulka 7: Rozdělení pozitivních vzorků na *Rickettsia* sp. dle pohlaví.

Pohlaví	Počet vzorků	Pozitivní	Prevalence
Samice	23	2	8,7 %
Samci	23	8	34,8 %

Tabulka 8: Detekce *Rickettsia* sp. v klíš'atech dle brněnských lokalit.

Lokalita	Počet vzorků	Pozitivní	Prevalence
Pisárky	55	15	27,3 %
Bystřec	15	4	26,7 %
Přehrada	45	4	8,9 %
<b>Celkem</b>	<b>115</b>	<b>23</b>	<b>20 %</b>

Pro *Rickettsia* sp. byla hodnota  $p = 0,026$ , což potvrdilo alternativní hypotézu, že existuje vztah mezi lokalitou sběru klíš'at a přítomnosti patogenu *Rickettsia* sp., mezi lokalitami tak byl zjištěn statisticky významný rozdíl v prevalenci. Celý postup výpočtu chí-kvadrát testu nezávislosti je uveden v příloze 1.



Obr. 12: Fotografie gelu s popisky pořízená po dokončení PCR k detekci *Rickettsia* sp. (Vlastní fotografie) Pozitivní vzorky č.: 21, 22, 25, 26, 28, 30, 33, 35, 36; negativní kontrola K<sup>-</sup> a pozitivní kontrola K<sup>+</sup>. Dále žebříček L (100bp DNA ladder; BIOSYSTEMS), (URL 17).

## 5 Diskuze

Bakterie *Anaplasma* sp. jsou původci řady závažných onemocnění. To stejné platí i pro bakterie z rodu *Rickettsia*. K přenosu těchto onemocnění slouží vektor, kterým bývá nejčastěji klíště. Na území České republiky to je klíště obecné (*I. ricinus*). V důsledku klimatických změn se na našem území v posledních letech vyskytují i další druhy klíšťat původem z jižních krajů. Tyto nové nepůvodní druhy klíšťat mohou do České republiky přinést také nové bakterie a nemoci. Příkladem toho je piják lužní (*Dermacentor reticulatus*), který je přenašečem závažného psího onemocnění psí babeziózy (URL 20).

Na základě mých výsledků se ukazuje, že se bakterie *Rickettsia* sp. vyskytuje na území Brna častěji, než bakterie *Anaplasma* sp. Nejvyšší prevalence byla zjištěna v městské části Brno-Pisárky, ze které pocházelo 55 vzorků. *Anaplasma* sp. byla v této městské části zjištěna s prevalencí 3,6 % a *Rickettsia* sp. s prevalencí 27,3 %.

Vycházejíce z výsledků, v případě *Rickettsia* sp. byl zjištěn statisticky významný rozdíl (hodnota  $p = 0,026$ ) mezi lokalitami.

Výskyt bakterií *Anaplasma* sp. a *Rickettsia* sp. u klíštěte obecného v různých lokalitách České republiky byl předmětem jedné dřívější studie (URL 15). Metodou PCR byla *Anaplasma* sp. detekována v následujících lokalitách v České republice: Praha 0,7 %, Plzeň 2,6 %, Ostrava 6,1 % a České Budějovice 1,9 %. V případě *Rickettsia* sp. to bylo: Praha 4,9 %, Plzeň 2,6 %, Ostrava 2,9 % a České Budějovice 3,9 %. Prevalence *Anaplasma* sp. zjištěna v mé práci je srovnatelná s prevalencí v jiných městech, naopak prevalence *Rickettsia* sp. zjištěna v mé práci se liší od prevalencí zjištěných v jiných městech. Tento fakt může být způsoben především odlišným počtem vyšetřovaných vzorků.

Další podobný výzkum byl proveden v Hamburku v roce 2011 (URL 14) s celkovým počtem 1400 vzorků klíštěte obecného. Bakterie *Anaplasma* sp. byla zjištěna s prevalencí 3,6 % a *Rickettsia* sp. s prevalencí 52,5 %. Důvodem vyššího výskytu bakterie *Rickettsia* sp. může být souhra několika faktorů, jedná se o přímořskou oblast a zároveň velkoměstskou aglomeraci s velkým výskytem ptactva a hlodavců, kteří se řadí mezi časté hostitele klíšťat.

Výskyt *Anaplasma* sp. byl na území Brna zkoumán také u lidí. Během let 2015 až 2017 byla provedena studie ve FN u sv. Anny. Sérologickými metodami imunoblot a microblot-array byla prokázána prevalence u lidí 2,4 % (URL 16). Tato prevalence je srovnatelná s prevalencí u klíšťat (3,5 %), zjištěnou v mé studii.

Zhodnotíme-li prevalenci pozitivních vzorků dle stádia vývoje a pohlaví, dvě početně převládající skupiny jsou nymfy (20,9 %, 14 vzorků) a samci (35,7 %, 10 vzorků).

Tuto poměrně vysokou prevalenci samců oproti samicím (11,1 %) lze vnímat pozitivně, protože nesají krev, tím pádem nemůže dojít k přenosu patogenů na hostitele.

Nejvíce vzorků v mé práci pocházelo z městské části Pisárky a z oblasti Brněnské přehrady. Tento fakt koresponduje s rozhodující podmínkou pro výskyt klíšťat, kterou je vysoká vlhkost. Pro tyto oblasti je také charakteristický nižší podrost s travinami. Oproti tomu v Bystřici, kde proběhl sběr ve smíšeném lese s nižší vlhkostí a částečně i v lesoparku brněnské ZOO, byl nasbírán nižší počet vzorků.

Z hlediska výskytu *I. ricinus* na území města Brna jsou významné parky, ale je třeba nezapomínat i na brněnskou ZOO. Jedná se o oblast s vysokou návštěvností (ročně 300 000), zároveň se jedná o místo s vysokou hustotou výskytu mnoha druhů exotických zvířat. Návštěvníci ZOO by měli dbát na vhodnou prevenci před klíšťaty (repelent) a vyhýbat se kontaktu se zvířaty, která by mohla být jejich přenašeči.

Obecně ke zvýšenému výskytu klíšťat na území České republiky dochází ve dvou hlavních vlnách, na jaře a na podzim. Nejrizikovějšími místy jsou břehy vodních toků a ploch, okraje lesů s nízkým podrostem a travinami a také větší městské parky a zahrady. Zásadou je zabránit napadení klíšťaty při pobytu v přírodě a jejich včasné odstranění, pokud k napadení došlo.

## 6 Závěr

Hlavní cílem mojí práce byl sběr klíšťat na území města Brna a detekce bakterií *Anaplasma* sp. a *Rickettsia* sp. Z tohoto pohledu byla práce úspěšná, všechny odebrané vzorky byly vyšetřeny moderními molekulárními metodami a byla stanovena míra prevalence pro vybrané brněnské oblasti se statistickým vyhodnocením. Pozitivní vzorky byly zaslány na sekvenaci. Jedná se o pilotní studii, která bude základem pro rozsáhlejší výzkum v daných lokalitách, a to jak v delším časovém horizontu, tak s větším počtem vzorků.

Jak bylo zmíněno v úvodu, tyto bakterie způsobují mnoho závažných onemocnění zvířat i lidí, a proto je jejich monitoring v prostředí velice důležitý z hlediska prevence před těmito nemocemi, ale také z hlediska sledování vztahů hostitel, patogen a vektor. Závěrem lze konstatovat, že nejúčinnějším způsobem prevence před anaplazmovou a rickettsiovou infekcí je především ochrana před vektory, tj. před klíšťaty.



## Seznam zkratek

DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ELFO	Elektroforéza
EM	Erythema migrans
HGA	Human granulocytic anaplasmosis (lidská granulocytární anaplazmóza)
HGE	Human granulocytic ehrlichiosis (lidská granulocytární ehrlichióza)
HME	Human monocytic ehrlichiosis (lidská monocytární ehrlichióza)
PCR	Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
SFG	Spotted fever group
TBC	Tris Borate EDTA (roztok)

## 7 Seznam použité literatury

1. ANDĚRA, M., ZAVŘEL, P. a kol. Šumava: příroda, historie, život. 1. vyd. Praha: Baset. 2003. ISBN 80-734-0021-9.
2. BERGEY, D. H. Bergey's manual of systematic bacteriology Vol 2: Proteobacteria, Part C - The Alpha-, Beta-, Delta- and Epsilonproteobacteria. 2005; 1388. ISBN 03-872-4145-0.
3. CHEN, S. M., DUMLER, J. S., BAKKEN, J. S., WALKER, D. H. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. Journal of Clinical Microbiology. 1994; 32(3):589-595.
4. DANIEL, M., DANIELOVÁ, V., KŘÍŽ, B., JIRSA, A. a NOŽIČKA, A. Shift of the Tick *Ixodes ricinus* and tick-borne encephalitis to higher altitudes in Central Europe. National Institute of Public Health. Praha. 2003; 22(5): 327-328.
5. HUBÁLEK, Z. Mikrobiální zoonózy a saponózy. 1.vyd. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. 2000; 153. ISBN 80-210-2446-1.
6. HUBÁLEK, Z., RUDOLF, I., GOLOVCHENKO, M., RUDENKO N., GRUBHOFFER L. Detection of *Anaplasma* DNA in *Ixodes ricinus* ticks: pitfalls. Folia Parasitologica. 2007; 54: 310-312.
7. MARCONDES, C. B. Anthropod borne diseases. Switzerland: Springer. 2017; 645. ISBN 978-3-319-13883-1.
8. MASSUNG, R. F., SLATER, K., OWENS, J. H., NICHOLSON, W. L., MATHER, T. N., SOLBERG, V. B., OLSON, J. G. Nested PCR assay for detection of Granulocytic Ehrlichiae. Journal of Clinical Microbiology. 1998; 36(4): 1090-1095.
9. PAROLA, P., PADDOCK, C. D., RAOULT, D. Tick- borne rickettsioses around the World: Emerging diseases challenging old concepts. Clinical Microbiology Reviews. 2005; 18(4): 719-756.

10. PAROLA, P., PADDOCK, C. D., SOCOLOVSKI C. Update on tick-borne *Rickettsioses* around the World: a geographic approach. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013; 26(4): 657-702.
11. PAROLA, P., RAOULT, D. Ticks and tick-borne bacterial diseases in humans: An emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases*. 2001; 6(32): 897-928.
12. PAROLA, P., RAOULT, D., BROUQUI, P., FOURNIER, P. E. Spotted fever *Rickettsioses* in southern and eastern Europe, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2007; 49(1): 2-12.
13. PAROLA, P., ROVERY, C., ROLAIN, J. M. *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii* in tick-borne *Rickettsioses*. *Emerging Infectious Disease*. 2009; 15(7): 1105-1108.
14. RANDOLPH, S. E., GREEN, R., M., HOODLESS, A. N., PEACEY, M. F. An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. *International Journal for Parasitology*. 2002; (32): 979-989.
15. RAOULT, D., ROUX, V. *Rickettsioses* as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 1997; 10(4): 694-719.
16. REGNERY, R., SPRUILL, C., PLIKAYTIS, B. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal of Bacteriology*. 1991; 173(5): 1576-1589.
17. SAHNI S., SANJEEV K., RYDKYNA E. Host cell interactions with pathogenic *Rickettsia* species. *Future Microbiology*. 2009; 4(3): 323-339.
18. SEDLÁK, E. *Zoologie bezobratlých: příroda, historie, život*. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. 2000. ISBN 80-210-2396-1.
19. SONENSHINE, D. E., MICHAEL, R., R. *Biology of ticks 2*. New York: Oxford university press. 2014. ISBN 978-0-19-97445-3.
20. SPRONG, H., WIELINGA, R., H., FONVILLE, M. *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne *Rickettsia* species. *Parasites and Vectors*. 2009; 2(1): 41.

19. ZINSSER, H. Rats, lice and history. Praha: Život a práce. 1939; 166-170.  
ISBN 03-169-88960.

## 8 Seznam použitých internetových odkazů

URL 1: Onemocnění přenášená klíšťaty v České republice, SZÚ. Státní zdravotní ústav [online]. [cit. 26. 08. 2019]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/onemocneni-prenasena-klisaty-v-ceske-republice>

URL 2: Confirmation that *Rickettsia helvetica* sp. nov. Is a Distinct Species of the Spotted Fever Group of Rickettsiae. Microbiology Society [online]. [cit. 26. 08. 2019]. Dostupné z: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-43-3-521>

URL 3: Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. Veterinary Research, a journal on Animal Infection [online]. [cit. 26. 08. 2019]. Dostupné z: <https://www.vetres.org/articles/vetres/abs/2005/03/v4057/v4057.html>

URL 4: Seroreactivity for spotted fever *Rickettsiae* and co-infections with other tick-borne agents among habitants in central and southern Sweden. National Center for Biotechnology Information [online]. [cit. 26. 08. 2019]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3569577/>

URL 5: Rickettsial (Including Spotted Fever & Typhus Fever, Rickettsioses, Scrub Typhus, Anaplasmosis, and Ehrlichioses) - Chapter 4 - 2020 Yellow Book, Travelers' Health, Centers for Disease Control and prevention. Object moved [online]. [cit. 27. 08. 2019]. Dostupné z: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/rickettsial-including-spotted-fever-and-typhus-fever-rickettsioses-scrub-typhus-anaplasmosis-and-ehr>

URL 6: Klíště obecné a jím přenášené patogeny ve středoevropském prostoru. Informační systém Masarykovy univerzity [online]. [cit. 26. 08. 2019]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/th/krnye/Ixodes\\_ricinus.pdf](https://is.muni.cz/th/krnye/Ixodes_ricinus.pdf)

URL 7: Human Granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. National Center for Biotechnology Information [online]. [cit. 26. 7. 2019]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3367650/>

URL 8: Granulocytární anaplasmóza - Veterinární průvodce. Zverolekarka.com - Veterinární průvodce [online]. MVDr. Tereza Ježková [cit. 27. 08. 2019].

Dostupné z: <http://zverolekarka.com/granulocytarni-anaplasmoza/>

URL 9: Pro výzkum málo známých bakterií Rickettsií potřebujeme nasátá klíš'ata, říká bioložka. Ekolist.cz [online]. [cit. 24. 10. 2019].

Dostupné z: <https://ekolist.cz/cz/publicistika/rozhovory/pro-vyzkum-malo-znamych-bakterii-rickettsii-potrebujeme-nasata-klisata-rika-biolozka>

URL 10: Klíš'tě obecné (*Ixodes ricinus*), BioLib.cz. Taxonomie živočichů a rostlin s obrázky. BioLib.cz [online]. [cit. 06. 11. 2019].

Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id76144/>

URL 11: LATIF, A. A., PUTTERILL J. F., DE KLERK, D. G., PIENAAR, R., MANS, B. J., OLIVEIRA, P. L. *Nuttalliella namaqua* (Ixodoidea: Nuttalliellidae). PLoS ONE [online], 2012; 7 (7). [cit. 6. 11. 2019].

Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0041651>

URL 12: Molekulární biologie - CIT. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno [online]. [cit. 10. 11. 2019].

Dostupné z: [https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis\\_metod-pcr&lang=cz](https://cit.vfu.cz/opvk2011/?title=popis_metod-pcr&lang=cz)

URL 13: Polymerázová řetězcová reakce. Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita [online]. [cit. 10. 11. 2019].

Dostupné z: <http://botanika.bf.jcu.cz/laboratory/pcr.html>

URL 14: Prevalence of *Anaplasma* and *Rickettsia* spp. in *Ixodes ricinus* in the city of Hamburg, Germany. Springer Nature Switzerland AG [online]. [cit. 30. 11. 2019].

Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-014-3869-x>

URL 15: Vliv krajinných parametrů na riziko výskytu klíš'at a jimi přenášených chorob. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého. Theses.cz [online]. [cit. 01. 12. 2019].

Dostupné z: [https://theses.cz/id/ynb1ne/DP\\_Schichor\\_Marcel.pdf](https://theses.cz/id/ynb1ne/DP_Schichor_Marcel.pdf)

URL 16: Séroprevalence *Anaplasma phagocytophilum* u pacientů vyšetřovaných na MiÚ FN USA v Brně. Informační systém Masarykovy univerzity [online]. [cit. 01. 12. 2019].

Dostupné z: [https://is.muni.cz/th/fxmzm/Sedlackova\\_Eva.pdf](https://is.muni.cz/th/fxmzm/Sedlackova_Eva.pdf)

URL 17: 100 bp DNA ladder. BIOSYSTEMS. [online]. [cit. 03. 01. 2020].  
Dostupné z: <https://www.cebiosys.cz/products/a100bp-dna-ladder-ready-to-use/>

URL 18: Hodnocení genetických dat - Chí-kvadrát test nezávislosti. Mendelova univerzita v Brně. [online]. [cit. 03. 01. 2020].

Dostupné z: [http://user.mendelu.cz/urban/vsg1/mendel/klas\\_pravd3.html](http://user.mendelu.cz/urban/vsg1/mendel/klas_pravd3.html)

URL 19: Chí-kvadrát test v excelu. Ing. Vladimír Volko. [online]. [cit. 03. 01. 2020].

Dostupné z: [http://www.volko.cz/new/chikvadrat\\_v\\_excelu.php](http://www.volko.cz/new/chikvadrat_v_excelu.php)

URL 20: O stavu pijáků v zemích českých: výsledky ročního sledování výskytu *Dermacentor reticulatus* v České republice. Zpravodaj časopisů Veterinářství a Veterinární klinika [online]. [cit. 05. 02. 2020].

Dostupné z: <https://www.vetweb.cz/o-stavu-pijaku-v-zemich-ceskych-vysledky-rocnihosledovani-vyskytu-dermacentor-reticulatus-v-ceske-republice/>

Obr. 1: Tvrdá klíšťata z čeledi Ixodidae - samec a samice. [cit. 10. 11. 2019].

Obrázek stažen z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK83636/>

Obr. 2: Trojhostitelský životní cyklus klíšťete *Ixodes ricinus*.

[cit. 10. 11. 2019].

Obrázek stažen z: [https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-life-cycle-of-Ixodes-ricinus-Ixodes-ricinus-immature\\_fig1\\_311431517](https://www.researchgate.net/figure/Schematic-representation-of-the-life-cycle-of-Ixodes-ricinus-Ixodes-ricinus-immature_fig1_311431517)

Obr. 3: Rozmístění jednotlivých stádií ve vegetaci. [cit. 26. 12. 2019].

Obrázek stažen z: [https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/17039/BPTX\\_0\\_0\\_11160\\_0\\_55700\\_0\\_18095.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/17039/BPTX_0_0_11160_0_55700_0_18095.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Obr. 4: Anaplasma phagocytophilum ve vakuole v cytoplasmě buněk. Vlevo barveno Giemsa, vpravo elektronmikroskopický snímek. [cit. 10. 11. 2019].

Obrázek stažen z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/onemocneni-prenasena-klitasty-v-ceske-republice>)

Obr. 5: Elektronogram *Rickettsia helvetica* z endomyokarditis. [cit. 10. 11. 2019].

Obrázek stažen z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/onemocneni-prenasena-klitasty-v-ceske-republice>

Obr. 6: Vlajkování. [cit. 10. 11. 2019].

Obrázek stažen z: <https://www.zdraviamy.cz/wp-content/uploads/2017/05/vlajkov%C3%A1n%C3%AD-720x340.jpg>

Obr. 10: Oblasti sběru klíšťat v Bystrci a u Brněnské přehrady.

Obrázek stažen z: <https://mapy.cz/zakladni?x=16.4787807&y=49.2338165&z=13&source=ward&id=14645>

Obr. 11: Oblasti sběru klíšťat v Pisárkách.

Obrázek stažen z: <https://mapy.cz/zakladni?x=16.5554490&y=49.1934246&z=14&source=ward&id=14983>



## 9 Seznam obrázků a tabulek

Obr. 1: Tvrdá klíšťata z čeledi <i>Ixodidae</i> - samec a samice	11
Obr. 2: Trojhostitelský životní cyklus klíšťete obecného ( <i>Ixodes ricinus</i> )	13
Obr. 3: Rozmístění jednotlivých stádií ve vegetaci	14
Obr. 4: <i>Anaplasma phagocytophilum</i> ve vakuole v cytoplasmě buněk	16
Obr. 5: Elektronogram <i>Rickettsia helvetica</i> z endomyokarditis	19
Obr. 6: Vlajkování	20
Obr. 7: Pufry použité při izolaci DNA	21
Obr. 8: Vzorky připravené k centrifugaci	22
Obr. 9: Focení gelu v transiluminátoru	25
Obr. 10: Oblasti sběru klíšťat v Bystrci a v okolí Brněnské přehrady	26
Obr. 11: Oblasti sběru klíšťat v Pisárkách	27
Obr. 12: Fotografie gelu s popisky pořízená po PCR k detekci <i>Rickettsia</i> sp.	29
Tabulka 1: Primery použité při nested PCR	22
Tabulka 2: Prevalence dvou patogenů v jednotlivých vzorcích dle stádií	27
Tabulka 3: Prevalence dvou patogenů v jednotlivých vzorcích dle pohlaví	27
Tabulka 4: Rozdělení pozitivních vzorků na <i>Anaplasma</i> sp. dle pohlaví a stádií	28
Tabulka 5: Detekce <i>Anaplasma</i> sp. v klíšťatech dle brněnských lokalit	28
Tabulka 6: Rozdělení pozitivních vzorků na <i>Rickettsia</i> sp. dle stádií	28
Tabulka 7: Rozdělení pozitivních vzorků na <i>Rickettsia</i> sp. dle pohlaví	29
Tabulka 8: Detekce <i>Rickettsia</i> sp. v klíšťatech dle brněnských lokalit	29

## 10 Příloha 1: Postup výpočtu chí-kvadrát testu nezávislosti

### Pro *Anaplasma* sp.:

Nejdříve byla vytvořena tabulka pozorovaných četností (Tabulka 1). Následně byly spočítány součty řádků  $n_j$  (modře), sloupců  $n_i$  (žlutě) a celkový součet všech prvků  $n$  (zeleně).

Tabulka 1: Pozorované četnosti  $n_{ij}$  - *Anaplasma* sp.

	Bystrc (A)	Pisárky (B)	Přehrada (C)	$n_j$
ANO	1	2	1	4
NE	14	53	44	111
$n_i$	15	55	45	$n = 115$

Následně byly vypočítány předpokládané četnosti  $e_{ij}$  podle vzorce  $e_{ij} = \frac{n_i * n_j}{n}$ . Spočítané hodnoty byly vloženy do tabulky předpokládaných četností (Tabulka 2).

Tabulka 2: Předpokládané četnosti  $e_{ij}$  - *Anaplasma* sp.

	Bystrc (A)	Pisárky (B)	Přehrada (C)
ANO	0,52173913	1,91304348	1,56521739
NE	14,4782609	53,0869565	43,4347826

Dalším krokem bylo vytvoření tabulky testovacích kritérií  $K_{ij}$  (Tabulka 3) a dopočítání hodnot  $K_{ij}$  podle vzorce  $K_{ij} = \frac{(n_{ij} - e_{ij})^2}{e_{ij}}$ .

Tabulka 3: Testovací kritéria  $K_{ij}$  - *Anaplasma* sp.

	Bystrc (A)	Pisárky (B)	Přehrada (C)
ANO	0,4384059	0,0039525	0,204106
NE	0,0157984	0,0001424	0,0073552

Následně byla spočítána hodnota chí-kvadrát (chi-sq) jako součet všech  $K_{ij}$  a vyhodnocena pravděpodobnost (p-value), že vliv prvků A, B a C je nevýznamný. K tomu byla využita funkce v Microsoft Excelu = CHIDIST (URL 19).

chi-sq = 0,669760

**p-value = 71,5 %**

### Pro *Rickettsia* sp.:

Nejdříve byla vytvořena tabulka pozorovaných četností (Tabulka 4). Následně byly spočítány součty řádků  $n_j$  (modře), sloupců  $n_i$  (žlutě) a celkový součet všech prvků  $n$  (zeleně).

Tabulka 4: Pozorované četnosti  $n_{ij}$  - *Rickettsia* sp.

	Bystrc (A)	Pisárky (B)	Přehrada (C)	$n_j$
ANO	4	15	4	23
NE	11	40	41	92
$n_i$	15	55	45	$n = 115$

Následně byly vypočítány předpokládané četnosti  $e_{ij}$  podle vzorce  $e_{ij} = \frac{n_i * n_j}{n}$ . Spočítané hodnoty byly vloženy do tabulky předpokládaných četností (Tabulka 5).

Tabulka 5: Předpokládané četnosti  $e_{ij}$  - *Rickettsia* sp.

	Bystrc (A)	Pisárky (B)	Přehrada (C)
ANO	2,2	11	9
NE	8,8	44	36

Dalším krokem bylo vytvoření tabulky testovacích kritérií  $K_{ij}$  (Tabulka 6) a dopočítání hodnot  $K_{ij}$  podle vzorce  $K_{ij} = \frac{(n_{ij} - e_{ij})^2}{e_{ij}}$ .

Tabulka 6: Testovací kritéria  $K_{ij}$  - *Rickettsia* sp.

	Bystrc (A)	Pisárky (B)	Přehrada (C)
ANO	1,472727	1,454545	2,777777
NE	0,55	0,363636	0,694444

Následně byla spočítána hodnota chí-kvadrát (chi-sq) jako součet všech  $K_{ij}$  a vyhodnocena pravděpodobnost (p-value), že vliv prvků A, B a C je nevýznamný. K tomu byla využita funkce v Microsoft Excelu = CHIDIST (URL 19).

chi-sq = 7,313129

**p-value = 2,6 %**