

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

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

***Rickettsia spp. a Anaplasma phagocytophylum* u
klíšťat v Zoo Ostrava**

Lucie Pecová

Jihomoravský kraj

Brno 2025

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

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

***Rickettsia spp. a Anaplasma phagocytophylum u
klíšťat v Zoo Ostrava***

***Rickettsia spp. and Anaplasma phagocytophylum
in ticks in the Ostrava zoo***

Autor: Lucie Pecová

Škola: Gymnázium, Brno, Křenová 304/36, 602 00

Kraj: Jihomoravský

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

Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat

Veterinární univerzita Brno

Brno 2025

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 zpřístupňování 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: 27. 02. 2025 Lucie Pecová

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala paní doc. MVDr. Evě Bártové, Ph. D. za její odborné vedení, pomoc, cenné rady a připomínky, bez kterých bych se při psaní této práce neobešla. Velké díky patří také Mgr. Haně Pavelkové za její trpělivost a pomoc nejen při výzkumu v laboratořích, ale i se sběrem klíšťat. Především bych ráda poděkovala své mamince za podporu při vytváření této práce. A v neposlední řadě patří díky i Zoologické zahradě Ostrava, za umožnění sběru klíšťat v jejích prostorách.

Anotace

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) je nejčastějším vektorem při přenosu patogenů *Anaplasma phagocytophylum* a *Rickettsia spp.*, což jsou bakterie způsobující řadu onemocnění, jak u lidí, tak i u zvířat. Cílem práce byl přímý průkaz bakterií *Anaplasma* a *Rickettsia spp.* u klíšťat posbíraných v Zoologické zahradě Ostrava s následným vyhodnocením positivity klíšťat dle PCR a vyhodnocením rizika infekce pro zoo zvířata a návštěvníky zoo.

Klíšťata byla sbírána v zoologické zahradě Ostrava metodou vlajkování na pěti lokalitách v průběhu roku 2024 po dobu 8 měsíců (v době od března do října). Celkem bylo posbíráno 598 klíšťat, z toho 130 dospělců (67 samic a 63 samců) a 468 nymf. K vlastnímu vyšetření vzorků pomocí PCR v rámci této práce byli použiti pouze dospělci klíšťat, tj. 130 vzorků.

Rickettsia spp. byla prokázána pomocí PCR u 25,4 % (33/130) klíšťat, z čehož bylo pozitivních 16 samic (12,3 %) a 17 (13,1 %) samců bez statisticky významného rozdílu ($p=0,8378$). Větší pozitivita byla u samců, kteří, ale nejsou takovou hrozbou jako samice, protože na rozdíl od samic nesají krev. Na všech zkoumaných lokalitách byla zjištěna podobná pozitivita bez statisticky významného rozdílu ($p=0,7236$) s nejvyšší pozitivitou naproti výběhu jelenů (6,9 %) a nejnižší na úseku za rybníky a ostrovy lemůrů (3,9 %) a na včelí stezce (3,9 %). Pozitivní klíšťata se hojně vyskytovala v místech s nižším travnatým porostem bez vzrostlých keřů nebo vysazených květů. V rámci sledovaného období od března do října, se nejvíce pozitivních klíšťat objevilo v měsících květen (8,5 %) a červen (9,2 %).

A. phagocytophylum byla prokázána u 2 klíšťat (1,5 %), z čehož obě klíšťata byli samci. Pozitivní klíšťata byla na dvou lokalitách, a to v úseku za voliérou orlů skalních (0,8 %) a v úseku naproti výběhu jelenů (0,8 %).

Výsledky ukazují, že klíšťata se v zoologické zahradě Ostrava hojně vyskytují a zároveň jsou významným vektorem infekčních patogenů *Rickettsia spp.* a *A. phagocytophylum*.

Klíčová slova: *Ixodes ricinus*; anaplasmosis; rickettsiosis; PCR

Annotation

The common tick (*Ixodes ricinus*) is the most common vector for the transmission of pathogens *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp., which are bacteria that cause a number of diseases, both in humans and in animals. The aim of the work was the direct detection of *A. phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. for ticks collected in the Ostrava Zoological Garden with subsequent evaluation of tick positivity according to PCR and evaluation of the risk of infection for zoo animals and zoo visitors.

Ticks were collected in the Ostrava zoo using the flagging method at five locations during 2024 for a period of 8 months (between March and October). A total of 598 ticks were collected, of which 130 adults (67 females and 63 males) and 468 nymphs. For the actual examination of samples using PCR in this work, only adult ticks were used, i.e. 130 samples.

Rickettsia spp. was detected by PCR in 25.4 % (33/130) of ticks, of which 16 females (12.3 %) and 17 (13.1 %) males were positive without a statistically significant difference ($p=0.8378$). There was a higher positivity in males, which, however, are not as much of a threat as females because, unlike females, they do not suck blood. Similar positivity was found in all investigated locations without a statistically significant difference ($p=0.7236$), with the highest positivity in area opposite the deer enclosure (6.9 %) and the lowest in the area behind the ponds and lemur islands (3.9 %) and on the bee trail (3.9 %). Positive ticks were abundant in areas covered with lower grass without mature shrubs or planted flowers. Within the observed period from May to October, the most positive ticks appeared in the months of May (8.5 %) and June (9.2 %).

A. phagocytophilum was detected in 2 ticks (1.5 %), of which both ticks were male. There were positive ticks in two locations, namely in the area behind the golden eagle aviary (0.8 %) and in the area opposite the deer enclosure (0.8 %).

The results show that ticks are abundant in the Ostrava zoo and at the same time are an important vector of infectious pathogens *Rickettsia* spp. and *A. phagocytophilum*.

Keywords: *Ixodes ricinus*; anaplasmosis; rickettsiosis; PCR

Obsah

1. Úvod	8
2. Literární přehled	9
2.1 Bakterie <i>Rickettsia</i> spp.....	10
2.1.1 Rickettsiízy.....	11
2.2 Bakterie <i>Anaplasma phagocytophylum</i>	11
2.2.1 Lidská granulocytární anaplazmóza (HGA)	2
2.2.2 Granulocytární anaplazmóza u psa	11
2.3 Klíště obecné (<i>Ixodes ricinus</i>).....	12
2.3.1 Biologie klíšťat.....	13
2.3.2 Životní cyklus klíštěte	14
2.3.3 Klíště – významný přenašeč infekcí	16
3. Metodika.....	17
3.1 Sběr klíšťat.....	17
3.1.1 Zoo Ostrava.....	17
3.1.2 Sběr klíšťat v terénu	17
3.2 Izolace DNA (alkalická hydrolyza).....	19
3.3 PCR.....	20
3.4 Gelová elektroforéza	23
3.5. Statistické zhodnocení výsledků	24
4. Výsledky	26
4.1. Množství klíšťat dle období a lokalit.....	26
4.2. <i>Rickettsia</i> spp.	27
4.2.1 Statistické vyhodnocení výsledků u <i>Rickettsia</i> spp.....	28
4.3. <i>Anaplasma phagocytophylum</i>	29
5. Diskuze	31
6. Závěr.....	33
7. Seznam použité literatury.....	34
8. Seznam použitých internetových odkazů	36
9. Seznam obrázků.....	38
10. Seznam tabulek.....	39

1. Úvod

V této práci jsem se zabývala studiem bakterií *Rickettsia spp.* a *Anaplasma phagocytophylum* u klíšťat posbíraných v areálu Zoologické zahrady Ostrava. Tyto bakterie způsobují zoonotická onemocnění, která jsou rizikem, jak pro návštěvníky a chovatele, tak i pro zvířata chovaná v této zahradě. Tuto infekci obvykle přenášejí klíšťata rodu *Ixodes*, tedy i klíště obecné (*Ixodes ricinus*), které se běžně vyskytuje v celé České republice. Vzhledem k rostoucímu výskytu infekčních onemocnění způsobených bakteriemi *Rickettsia spp.* a *A. phagocytophylum* u lidí i zvířat, je nutný monitoring těchto bakterií u jejich hlavních přenašečů, tedy klíšťat.

Cíle práce:

- Sběr klíšťat v Zoologické zahradě Ostrava v pěti vytipovaných lokalitách metodou vlajkování
- Identifikace klíšťat (druh, vývojové stádium, pohlaví) pomocí mikroskopu a určovacích klíčů
- Detekce bakterií *Rickettsia spp.* a *Anaplasma phagocytophylum* pomocí metod molekulární biologie (izolace DNA, PCR, gelová elektroforéza)
- Vyhodnocení positivity klíšťat pomocí statistických metod

2. Literární přehled

Bakterie *Rickettsia* spp. a *Anaplasma phagocytophylum* způsobují zoonotická onemocnění u zvířat, ale i člověka.

Rickettsia spp. jsou rodem bakterií, které u člověka mohou vyvolávat onemocnění rickettsiozu (URL 10). Mezi druhy přenášené klíšťaty a významné z klinického hlediska patří *Rickettsia rickettsii*, způsobující tzv. horečku Skalistých hor, *Rickettsia conorii* a *Rickettsia africae*, které způsobují horečku boutonneuse (URL 11). V Evropě se vyskytuje velké množství klíšťaty přenášených rickettsií. Některé tyto rickettsie jsou pro evropský kontinent typické, jiné se primárně vyskytují na jiných kontinentech a v Evropě se objevují jen sporadicky (Obr. 1) (Tomčová, 2016). Tuto infekci na člověka obvykle přenáší klíště obecné (*I. ricinus*) (URL 10).

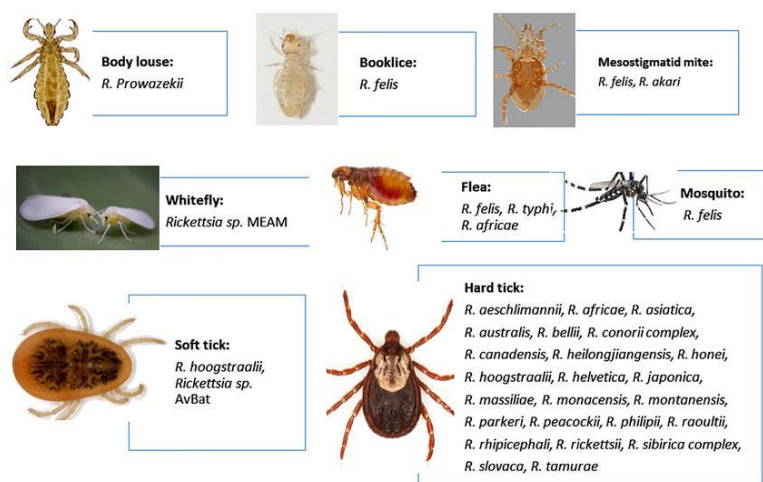
Obrázek 1: Souhrn všech rickettsií, se kterými se můžeme v Evropě setkat.



A. phagocytophylum je bakterie, která způsobuje lidskou granulocytární anaplazmózu. Zástupci rodu *Anaplasma* mohou způsobit infekci u lidí a širokého spektra domácích zvířat s různým stupněm závažnosti. Infekci na člověka obvykle přenáší klíště obecné, které se běžně vyskytuje v České republice ([URL 1](#)). Lidská granulocytární anaplazmóza (HGA), dříve známá jako lidská granulocytární ehrlichioza (HGE) se vyznačuje příznaky jako je horečka, bolest hlavy, zimnice a bolesti svalů, které se obvykle objevují během 1-2 týdnů po přisátí klíštěte. Epidemiologie této nákazy je velmi podobná Lymeské borelióze (způsobuje *Borrelia burgdorferi*) a Babesioze (způsobuje především *Babesia microti*) majících stejného přenašeče, tj. klíště ([URL 2](#)).

2.1 Bakterie *Rickettsia* spp.

Rickettsia spp. jsou rozmanitou sbírkou obligátně intracelulárních gramnegativních bakterií, které jsou přenášeny pomocí klíšťat, vší, blech, roztočů a savců ([Obr. 2](#)).



Obrázek 2: Potenciální vektorovi členovci pro *Rickettsia* ([URL 19](#))

Tyto zoonotické patogeny způsobují infekce, které se šíří krví do mnoha orgánů. Druhy rodu *Rickettsia* způsobují skalnatou horečku Rocky Mountain, rickettsial neštovice, další skvrnitě horečky, epidemický tyfus a myší tyfus. Druhy rodu *Rickettsia* a *Orientia* se přenášejí kousnutím infikovanými klíšťaty nebo roztoči nebo trusem infikovaných vší nebo blech. Ze vstupní brány v kůži se rickettsie šíří krevním řečištěm a infikují endotel a někdy i buňky hladkého svalstva cév. Druhy rodu *Rickettsia* vstupují do svých cílových buněk, množí se binárním štěpením v cytosolu a přímo poškozují napadené buňky ([Baron, 1996](#)).

Taxonomické zařazení bakterie rodu *Rickettsia* spp.:

Doména: *Bacteria*

Kmen: *Proteobacteria*

Třída: *Alphaproteobacteria*

Řád: *Rickettsiales*

Čeleď: *Rickettsiaceae*

Rod: *Rickettsia*

(Tomčová, 2016)

2.1.1 Rickettsiózy

Rickettsiové choroby jsou obtížně diagnostikovatelné, a to i poskytovateli zdravotní péče, kteří mají s těmito chorobami zkušenosti. Inkubační doba většiny rickettsiových onemocnění se pohybuje od 5 do 10 dnů. Cestovatelé mohou zaznamenat příznaky během cesty nebo až 1–2 týdny po návratu domů. Většina symptomatických rickettsiových onemocnění způsobuje středně závažná onemocnění, ale jiná, včetně RMSF (také nazývaná brazilská tečkovaná horečka), epidemického tyfu, křovinatého tyfu a středomořské tečkované horečky, mohou být v některých případech život ohrožující, zvláště když je léčba opožděna. Klinické projevy se liší podle původce a pacienta. Mezi běžné příznaky, které se obvykle vyvinou do 1 týdne od infekce, patří horečka, bolest hlavy, malátnost, nevolnost nebo zvracení. Mnoho rickettsióz je také doprovázeno makulopapulární, petechiální nebo vezikulární vyrážkou nebo někdy escharem (tmavý nekrotický strup) v místě kousnutí klíštětem nebo roztočem ([URL 5](#)).

2.2 Bakterie *Anaplasma phagocytophylum*

Patogeny rodu *Anaplasma* se vztahují k obligátním intracelulárním bakteriím v rámci řádu *Rickettsiales* přenášených především kousnutím klíštětem a považovaným za riziko pro domácí zvířata, hospodářská zvířata a lidi po celém světě. U obratlovců dochází k infikování krevních buněk včetně erytrocytů (RBC), monocytů, krevních destiček a neutrofilů ([Chisu et al., 2023](#)).

K dnešnímu dni zahrnuje tento rod osm druhů a velké množství neklasifikovaných genotypů, které nelze přiřadit k doposud známým druhům.

Taxonomické zařazení bakterií rodu *Anaplasma*:

Doména:	<i>Bacteria</i>
Kmen:	<i>Proteobacteria</i>
Třída:	<i>Alphaproteobacteria</i>
Řád:	<i>Rickettsiales</i>
Čeleď:	<i>Anaplasmataceae</i>
Rod:	<i>Anaplasma</i> (URL 4)

Bylo zjištěno, že několik druhů rodu *Anaplasma*, které byly dříve považovány za nepatogenní, jsou zoonotické a spojené s lidskými nemocemi, což naznačuje, že počet druhů rodu *Anaplasma*, které infikují lidi, bude mnohem vyšší. Konkrétně druh *A. phagocytophilum*, původce klíšťové horečky u ovčí a granulocytární anaplazmózy u psů (CGA) a koní (EGA), je také zodpovědný za infekci člověka (HGA) ([Chisu et al., 2023](#)).

2.2.1 Lidská granulocytární anaplazmóza (HGA)

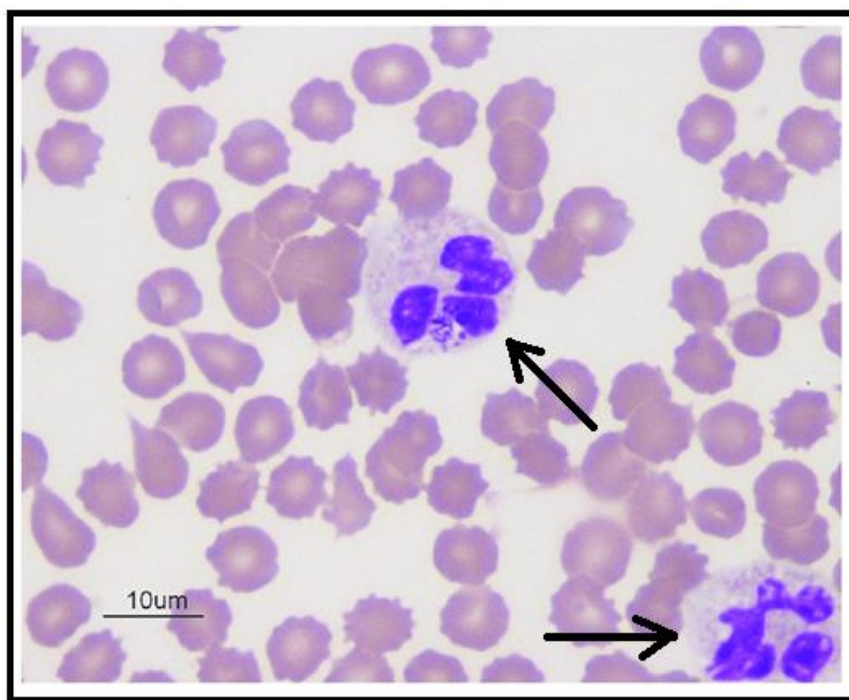
Navzdory zvyšující se prevalenci *A. phagocytophilum* u zvířecích hostitelů nejsou lidské případy časté, i když jsou pravděpodobně podhodnoceny kvůli nespecifickým klinickým příznakům (symptomy podobné chřipce) ([URL 12](#)). Inkubační doba onemocnění je v rozmezí 5 – 21 dní, většina onemocnění se vyskytuje v období duben–říjen. Klinickým projevem je obvykle akutní nespecifické febrilní onemocnění trvající 2 – 11 dní. U 70-95 % infikovaných osob je přítomna horečka ($> 38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$), malátnost, myalgie a bolesti hlavy, někdy také artralgie, poškození jater (zvýšené jaterní transaminázy), poruchy centrálního nervového systému (zmatenost, neurologické příznaky), gastrointestinálního systému (nevolnost a zvracení) nebo respirační příznaky (dýchací obtíže). Někdy se může objevit vyrážka (nesvědící zarudnutí). Fatální infekce se vyskytují zřídka, ale infekce může vyústit v multiorgánové selhání ([URL 12](#)).

Hlavním přenašečem *A. phagocytophilum* v Evropě je klíště *I. ricinus* s prevalencí v jednotlivých zemích v rozmezí od 0,5 do 34 %. Infekce se nejčastěji šíří pomocí klíšťat, která se mohou nakazit od infikovaných zvířecích hostitelů. Kmeny patogenní pro člověka mohou být přenášeny klíšťaty sajícími na koních, psech, domácích nebo volně žijících přežvýkavcích (některé kmeny), jezcích a divokých prasatech ([URL 12](#)).

2.2.2 Granulocytární anaplazmóza u psa

Granulocytární anaplazmóza psů je akutní horečnaté onemocnění charakterizované letargií, nechutenstvím, úbytkem hmotnosti a muskuloskeletálními bolestmi. Změny hematologického a biochemického profilu spojené s tímto onemocněním jsou nespecifické a zahrnují trombocytopenii, anémii, moruly v neutrofilech a zvýšenou aktivitu jaterních enzymů. Mohou se objevit koinfekce s jinými patogeny přenášenými klíšťaty (TBP), zejména s *B. burgdorferi*, což komplikuje klinický obraz, diagnostiku a odpověď na léčbu. Přestože byly publikovány klinické studie na psech, zůstává nejasné, zda několik klinických příznaků a klinickopatologických abnormalit může souviset s touto infekcí ([Obr. 3](#)).

Porozumění granulocytární anaplazmóze je důležité kvůli jejímu zoonotickému hledisku, potenciálním závažným následkům u psů i lidí a možnosti použití epidemiologických dat u psích druhů jako dobrého odhadu rizika pro člověka ([El Hamiani Khatat et al., 2021](#)).



Obrázek 3: *Anaplasma phagocytophilum* (modrá barva) v cytoplazmě neutrofilů v krvi psa; 1000× (URL 18)

2.3 Klíště obecné (*Ixodes ricinus*)

K významným přenašečům infekčních chorob na území České republiky patří klíště, zejména klíště obecné (*Ixodes ricinus*). Jako přirození hostitelé pro *I. ricinus* bylo hlášeno více než 300 živočišných druhů. Hustota tohoto druhu klíšťat může být velmi vysoká, místy dosahuje více než 300 klíšťat/100 m² (Gern, 2005). Široký geografický a klimatický rozsah klíštěte *I. ricinus* a následné výrazné rozdíly v jeho sezónní populační dynamice mají přímý dopad na dynamiku přenosu mnoha patogenů přenášených tímto druhem klíšťat (Randolph et al., 2002).

Ve střední Evropě je známých 7 epidemiologicky významných druhů klíšťat. Podle typu parazitismu je dělíme na **Exofilní** (svého hostitele aktivně vyhledávají): klíště obecné (*Ixodes ricinus*), klíšť lužní (*Haemaphysalis concinna*), klíšť stepní (*Haemaphysalis punctata*), klíšť lesostepní (*Haemaphysalis inermis*), piják lužní (*Dermacentor reticulatus*), piják stepní (*Dermacentor marginatus*) a na **Endofilní** (žijí v úkrytech svých hostitelů): klíště ježčí (*Ixodes hexagonus*) (URL 8).

I v České republice se v posledních letech vyskytují i jiné druhy klíšťat, což může mít za příčinu mnoho faktorů. Mezi nové druhy klíšťat objevených v České republice, patří např. exotická klíšťata rodu *Hyalomma*. Tento druh je známý tím, že se do naší země dostal pomocí stěhovavých ptáků z teplých krajín, kteří se sem vrací a tase odlétají. *Hyalomma* přenáší řadu významných infekcí lidí i zvířat (URL 16). Dalším klíštětem je piják lužní (*Dermacentor reticulatus*), který se vykytuje spíše v oblasti s chladnějším a mírnějším klimatem, nejčastěji v lesích, křovinách a velmi ho láká stín a vlhko. Tento druh je hlavním vektorem původce babeziózy (URL 17). V posledních letech se také díky zvyšujícím se průměrným teplotám výskyt klíštěte posouvá i do vyšších nadmořských výšek. Není se tedy čemu divit, když se s klíštětem setkáme i v horských oblastech, třeba i na samotné horní hranici lesa (URL 15).

Taxonomické zařazení klíštěte obecného:

Říše: Živočichové (*Animalia*)

Kmen: Členovci (*Arthropoda*)

Podkmen: Klepítkatci (*Chelicerata*)

Třída: Pavoukovci (*Arachnida*)

Řád: Klíšťata (*Ixodida*)

Čeleď: Klíšťatovití (*Ixodidae*)

Rod: Klíště (*Ixodes*)

Druh: Klíště obecné (*Ixodes ricinus*)

([URL 9](#))

2.3.1 Biologie klíšťat

Jedním z častých omylů je, že klíště je hmyz. Tak tomu ovšem není, klíšťata taxonomicky řadíme mezi pavoukovce, do řádu roztočů. Spolehlivým rozpoznávacím znakem je počet nohou. Hmyz jich má 6, oproti tomu všichni pavoukovci (včetně klíšťat) mají nohou 8 ([URL 6](#)). Klíšťata se vyskytují v rozsáhlých oblastech světa v řadě druhů. Podle svého druhu a klimatických podmínek žijí až 8 let. Klíště má nepřímý vývoj a v našich podmínkách trvá jeho životní cyklus 2 roky ([URL 7](#)). Na celém světě žije v současné době necelých 900 druhů klíšťat a můžeme je najít na všech kontinentech a ve všech klimatických pásmech od tropů, až po arktické oblasti. Z tohoto počtu se můžeme v České republice setkat s 11 druhy klíšťat, z nichž je nejčastější, a z hlediska přenosu patogenů nejdůležitější, klíště obecné. Toto klíště je typickým představitelem tzv. tvrdých klíšťat ([URL 6](#)). Dnes jsou patrné dva obecné typy klíšťat: klíšťata argasidová neboli měkká a klíšťata ixodidová neboli tvrdá. Každá linie vykazuje odlišné vzorce hostitelské koevoluce a preference ([Cupp, 1991](#)). Tělo klíštěte splynulo v jeden celek. Typickým morfologickým znakem je štít v dorzální části těla. Hlavová část je tvořena bazální a apikální částí, která se skládá z hypostomu, pedipalp a chelicer. Hypostom je na ventrální části opatřen zpětně ohnutými háčky. Slinné žlázy jsou umístěny mezi hypostomem a chelicerami. Sliny obsahují četné bio aktivní složky, které umožňují sání krve. Patří mezi ně antikoagulanty, anesteticky působící substance a další ([URL 7](#)). Jako takové jsou rozhodující pro biologický úspěch klíšťat jak během delšího období mimo hostitele, tak i během období krmení na hostiteli. Slinné žlázy jsou místem vývoje patogenu a sliny cestou přenosu ([Obr. 4](#)). Multifunkčních slinné žlázy jsou důležité pro přežití klíšťat a schopnost přenášet vektory

(Bowman a Sauer, 2004). Pro klíšťata jsou důležité smyslové orgány, které slouží pro vyhledávání hostitelů. Tyto orgány reagují na termický, chemický nebo i fyzikální stimul (vibrace) (URL 7).



1: Končetiny s dráčky 2: Řitní otvor 3: Štít 4: Pohlavní otvor 5: Lopatky

Obrázek 4: Samec klíštěte *Ixodes ricinus* zespoda i shora (URL 20).

2.3.2 Životní cyklus klíštěte

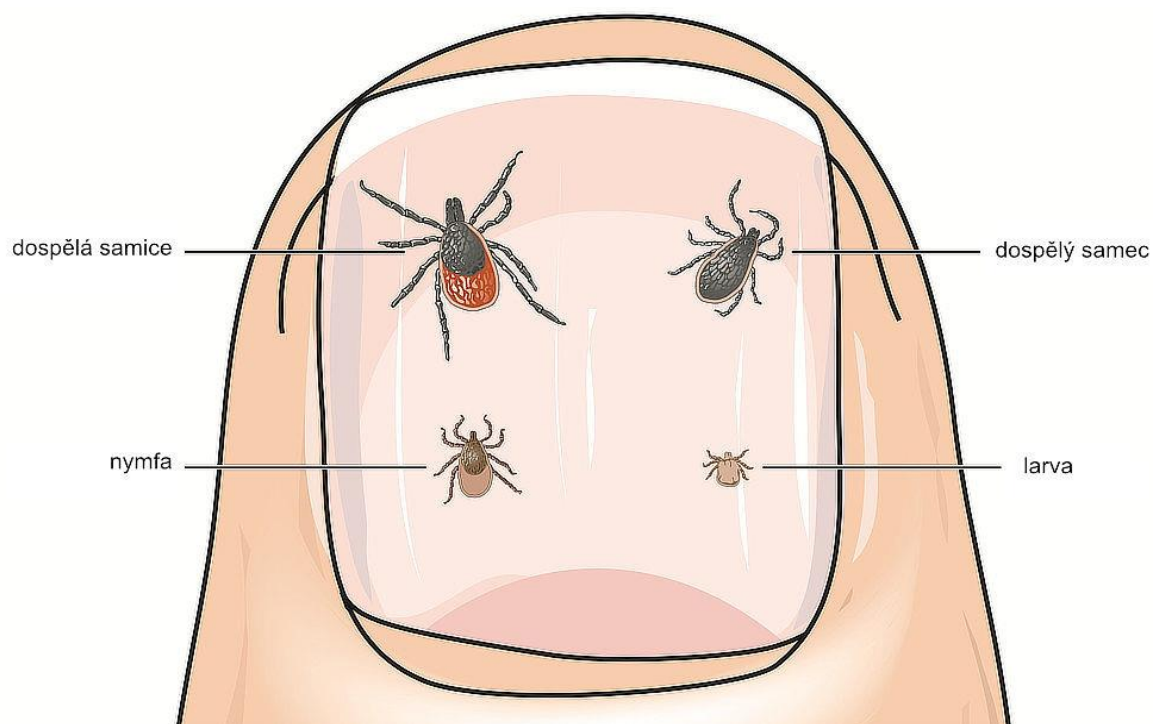
Klíšťata mají poměrně složitý a dlouhý vývojový cyklus, který zahrnuje vajíčka a tři krev sající stádia: **larvy, nymfy a dospělce**. Na počátku vývojového cyklu jsou dospělá klíšťata (Obr. 5 C, D). U klíštěte obecného saje pouze samice, a to většinou na velkých obratlovcích, jako je např. vysoká nebo černá zvěř. Samec klíštěte krev nesaje a jeho jediným posláním je oplodnit samici, poté hyne. K oplození samice dochází nejčastěji přímo na hostiteli během sání, ale může k němu dojít i mimo hostitele. Oplození je naprosto klíčové pro úspěšné dosátí klíštěte, neoplozená samice není schopná sání dokončit. Dospělá samice klíštěte saje 7-10 dní a během této doby ze svého hostitele získá až 1 ml krve a zvětší objem svého těla přibližně stokrát. Po dosátí samice z hostitele odpadne, tráví krev a získané živiny využívá k produkci vajíček (URL 6).

Klíšťata jsou velmi potentní, jedna samice naklade 2-3000 vajíček. Samice po vykladení hyne a přibližně po měsíci se z vajíček začínají líhnout drobné larvy. Larva je jediné stádium klíštěte, které nemá osm nohou, ale má jich jen šest (Obr. 5A). Aby se larva mohla dostat do dalšího stádia, musí se nasát krve. Larva většinou saje na drobných obratlovcích, jako jsou nejrůznější hlodavci nebo ptáci. Klíštěcí larva saje 2-3 dny, poté z hostitele odpadne a přibližně po měsíci se přemění na nymfu. Nymfa již má 8 nohou (Obr. 5B) a opět se musí nasát. Spektrum hostitelů

je podobné, jako u larvy. Sání trvá 3-5 dní, poté se nasátá nymfa přeměňuje na dospělé, a tím se celý životní cyklus uzavírá. V přírodě trvá životní cyklus klíštěte přibližně 2 roky a během této doby se klíště musí třikrát nasát na třech různých hostitelích. Právě střídání hostitelů a dlouhý životní cyklus může za to, že je klíště vhodným přenašečem různých patogenů ([URL 6](#)) ([Obr. 6](#)).



Obrázek 6: Vývojová stadia klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*). (A) larva, (B) nymfa, (C) dospělý samec, (D) dospělá samice. ([URL 21](#))



Obrázek 5: Vývojová stadia klíštěte a srovnání jejich velikosti s velikostí lidského nehtu. ([URL 22](#))

2.3.3 Klíště – významný přenašeč infekcí

Klíšťata jsou v současné době považována za přenašeče původců lidských infekčních chorob na světě na druhém místě po komárech ([Parola a Raoult, 2001](#)). Celosvětově přenáší až 80 různých nemocí, u nás jsou to především původci Lymeské boreliózy a klíšťové encefalitidy ([URL 6](#)). Významný nárůst výskytu klíšťové encefalitidy za poslední 1–2 desetiletí vyvolal značný zájem o veřejné zdraví a vědecký zájem. Jde o nejvýznamnější onemocnění lidí přenášené vektory v Evropě, pro které vynikající data umožňují robustní kvantitativní analýzy ([Randolph, 2008](#)).

Ostatní onemocnění, jako je babezióza, anaplazmóza a další jsou u nás vzácná ([URL 6](#)). Rezervoárovými zvířaty mohou být, jak drobní zemní savci, tak větší savci i ptáci. Pokud se klíště přisaje na člověka, končí jeho životní cyklus, neboť člověk je slepým článkem řetězu. Důležití pro přenos infekce jsou nejen dospělci, ale též larvy a nymfy, jež jsou rovněž schopny přenášet infekci. Vzhledem k jejich velikosti jsou velmi často na kůži člověka přehlédnuty. Přitom doba přisátí hraje u některých infekcí, např. lymeské boreliózy, velkou úlohu ([URL 7](#)).

Klíště obecné bylo zaznamenáno v termo-mezofilních lesích a křovinatých stanovištích, kde relativní vlhkost umožňuje klíštěti dokončit svůj tříletý vývojový cyklus, jak se předpokládá pro evropské klimatické oblasti. Toto klíště působí jako přenašeč i rezervoár pro řadu divokých zoonotických patogenů, zejména původců lymeské boreliózy, klíšťové encefalitidy a lidské granulocytární ehrlichiozy, které se objevují nejenom v Itálii, kde probíhal výzkum, ale i ve většině Evropy ([Rizzoli et al., 2004](#)).

Klíšťata jsou hematofágní ektoparazité, kteří jsou uznáváni pro svou schopnost přenášet širokou škálu patogenů virové, bakteriální, protozoální a helmintické povahy do hostitelů z obratlovců. Mezi různými nemocemi přenášenými klíšťaty, nazývanými také „nemoci přenášené klíšťaty“ (TBD), je mnoho zoonotických ([Chisu et al., 2023](#)). Zoonotické infekce přenášené klíšťaty patří k nejrozšířenějším chorobám přenášeným vektory. Tato velká skupina infekcí je způsobena různými mikroorganismy, jako je *Babesia spp.*, *Borrelia spp.*, *Rickettsia spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii* ([Sambri et al., 2004](#)).

Klíšťata rodů *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Ixodes* a *Rhipicephalus* přenášejí bakterie rodu *Anaplasma*, které se množí intracelulárně v krevních buňkách savců ([Chisu et al., 2023](#)).

3. Metodika

3.1 Sběr klíšťat

3.1.1 Zoo Ostrava

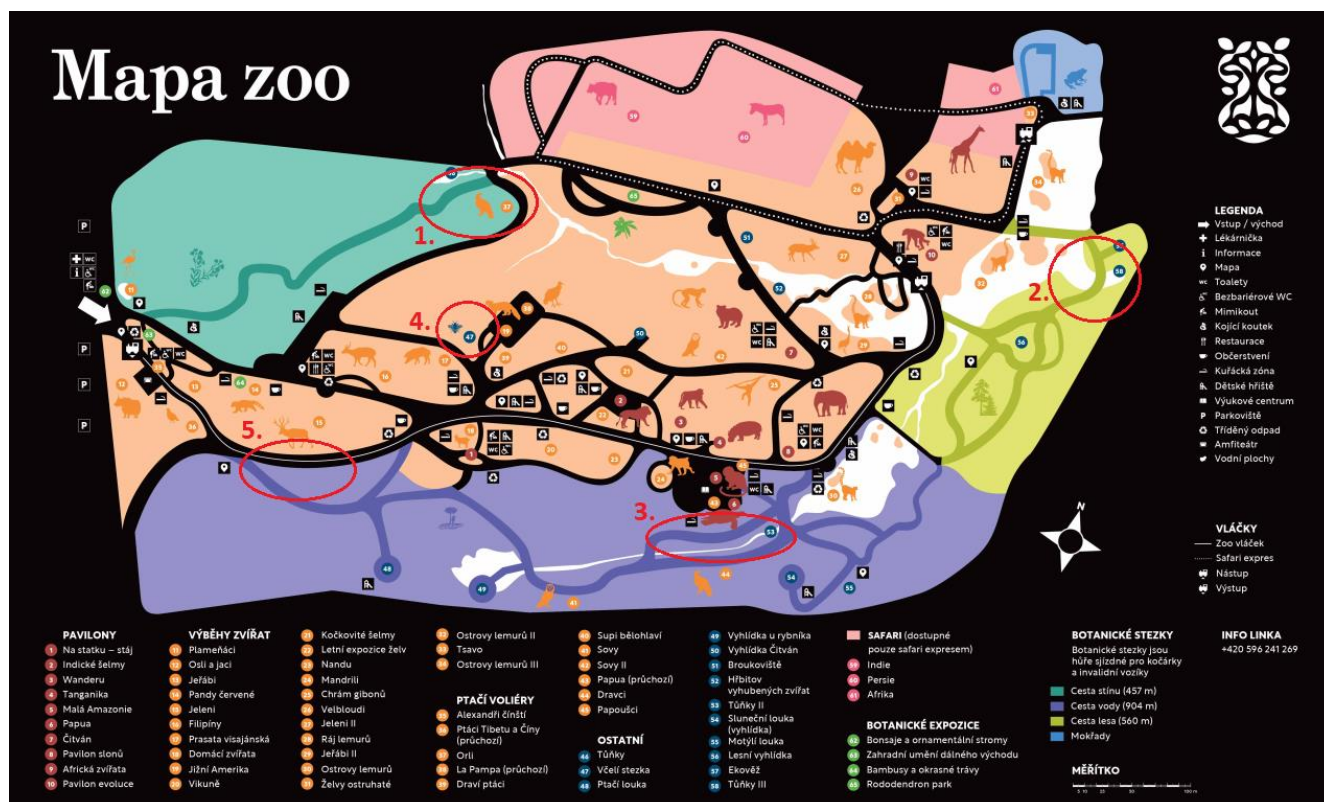
Klíšťata se nejvíce vyskytují v parcích a zahradách, také u vodních toků a rybníků, v listnatých a smíšených lesích. Cílem práce byl sběr klíšťat v areálu Zoologické zahrady Ostrava, kde je velká zalesněná plocha, čímž je vytvořeno vhodné prostředí pro život klíšťat. Tato Zoologická zahrada se nachází v Ostravě, největším městě Moravskoslezského kraje. Je 2. největší zoologická zahrada v České republice, velká zhruba 100 ha, chovající přes 435 druhů zvířat. Součástí zoo je také botanický park, ve kterém se nachází velké množství vzácných rostlin včetně největší kolekce rododendronů a azalek v České republice a na Slovensku ([URL 13](#)). Tato zoologická zahrada podporuje různé výzkumy a projekty. Jedním z nich je i tento projekt, který byl zahájen v roce 2023. Projekt se zabývá odchycením klíšťat ve třech zoologických zahradách v České republice a následným zjišťováním positivity na *Anaplasma*, *Borrelia*, *Coxiella* a *Rickettsia*.

3.1.2 Sběr klíšťat v terénu

Sběry klíšťat probíhaly na 5 lokalitách v měsících od března do listopadu (minimálně jednou za měsíc), protože v ČR jsou klíšťata nejaktivnější v období květen/červen a srpen/září.

Lokality v zoo Ostrava, ve kterých byly prováděny sběry klíšťat ([Obr. 7](#)):

1. úsek za voliérou orlů skalních – listnatý les s hustými porosty plazivých rostlin a s říčkou
2. úsek za rybníky a ostrovy lemůrů – listnatý les a louka, poblíž tůně
3. okruh kolem tůňky – listnatý les s rozsáhlou tůní, na straně s voliérami hustý porost plazivých rostlin a na straně za pavilonem Papua kratší travnatý porost
4. úsek naproti výběhům jelenů – listnatý les a louka s vysazenými stromky, vysoký travní porost
5. včelí stezka – listnatý les bez přítomnosti vodního zdroje



Obrázek 7: Mapa Zoo Ostrava (URL 23)

Ke sběru klíšťat byla potřeba vlajka (bílé prostěradlo cca 1x1 m připevněné provázky k dřevěné tyčce), rukavice, pinzeta, zkumavky s alkoholem – 96% etanol, který se připravil v laboratoři a fix pro popis zkumavek.

Popis sběru klíšťat smýkáním:

1. Vlajkou bylo smýkáno na vybraných místech po vegetaci několik metrů (Obr. 8).
2. Poté byla vlajka obrácena a byla posbírána klíšťata pinzetou. Klíšťata byla následně umístěna do zkumavek s alkoholem, který byly už předem popsány.
3. Podle toho, co bylo připravené na poznámky (sešit s tužkou nebo telefon), bylo zapsáno číslo zkumavky a další informace jako počet klíšťat a počasí v den sběru.
4. Po ukončení sběru byla vlajka umístěna do igelitového sáčku.
5. Popsané zkumavky se vzorky v etanolu byly umístěny v laboratoři do lednice.



Obrázek 8: Vlajkování (Vlastní obrázek)

3.2 Izolace DNA (alkalická hydrolýza)

Před samotnou izolací DNA byla klíšťata rozdělena dle pohlaví a vývojového stádia (samci, samice a nymfy).

DNA pro tuto práci byla izolovaná ze vzorků dospělých klíšťat (každý dospělec samci i samice zvlášť). Izolace DNA byla prováděna pomocí alkalické hydrolýzy a mechanického drcení klíšťat (zatavenou špičkou/skalpelem).

Chemikálie a pomůcky na alkalickou hydrolýzu:

- Amoniak – vodný roztok p. a. 25%
- H₂O pro injectione
- Eppendorf zkumavka 1,5 ml
- Zatavená špička/skalpel
- Pinzeta
- Respirátor (použitý při práci s amoniakem)

Jako první byla klíšťata položena na filtrační papír/ubrouskový papír a osušena. Byl připraven roztok 1,25% NH₄OH (1 ml 24% amoniak + 19 ml aqua pro injectione) do plastového kelímku s víčkem uchován v lednici. Následně byl do Eppendorf zkumavky napipetován 1,25% roztok NH₄OH (na dospělé to bylo 500 µl). Osušené klíště (dospělec) bylo umístěno do popsané Eppendorf zkumavky s NH₄OH roztokem a mechanicky rozdrčeno zatavenou špičkou (nad

plamenem zatavené 1000 μ l špičky bez filtru od pipety tak, že tam nebyla dutina) nebo bylo klíště před vložením rozříznuto skalpelem a pinzetou vloženo do Eppendorf zkumavky s NH_4OH roztokem. Popsané a uzavřené Eppendorf zkumavky byly umístěny do termobloku na 30 min při 100 °C (Obr. 9). Vzorky mírně vychladly a následně byly vloženy do centrifugy na 1 min při 3000 otáčkách za min. Poté byly otevřené zkumavky přemístěny zpátky do termobloku, kde byly do doby, než byl objem zredukován na polovinu (zhruba 15-20 min). Izolovaná DNA byla přepipetovaná do nové popsané Eppendorf zkumavky bez klíštěte a uchovaná při teplotě -20 °C. Původní zkumavka s klíštětem byla uzavřena a vhozena do nádoby Nebezpečný odpad.



Obrázek 9: Termoblok s Eppendorf zkumavkami (Vlastní fotografie)

3.3 PCR

PCR je metoda, která byla použita po izolaci DNA.

Reagencie:

- Master Mix
- H_2O (PCR voda)
- Primery (firma Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)
- Negativní kontrola (NK) – PCR voda
- Pozitivní kontrola (PK)
 - *Anaplasma phagocytophilum* (izolované z klíštěte, ČR)
 - *Rickettsia spp.* (izolované z klíštěte klíště, ČR)

Ředění primerů probíhalo v PCR boxu: k originálním primerům (prášek) byla přidána PCR voda (množství je napsáno na zkumavce, pro každý primer je jiné), čímž vznikly tzv. zásobní primery, následně se primery ředily, podle koncentrace, která byla potřeba, čímž vznikly naředěné primery, které se používají pro vlastní PCR.

Před vlastním mícháním PCR směsi bylo potřeba si připravit potřebné věci: naředěné primery, Master Mix, PCR vodu, vzorky DNA a pozitivní kontroly (vše bylo vyndáno z mrazáku ještě před použitím). Před použitím PCR boxu byly připravené otevřené krabičky se špičkami, které byly potřeba, stojánek s prázdnými Eppendorfkami, stojánek na stripy, PCR stripy a fix. Následně byl PCR box se všemi nachystanými věcmi zavřen a vysvícen na 20 min ([Obr. 10](#)). Při práci v PCR boxu byly dodržovány určité zásady: bylo nutné pracovat v rukavicích, z boxu nic průběžně nevynášet, zkumavky neotevírat mimo box a měnit špičky.

Když byl PCR box po 20 min vysvícený, mohl se začít používat. Do Eppendorf zkumavky byla připravená PCR směs, která obsahovala Master Mix, naředěné primery a PCR vodu v množství vypočítaném dle počtu vzorků (vše bylo přidáno podle tabulky zkoumaného patogenu [Tab. 2/4](#)). Všechny přidané složky směsi byly vynásobeny počtem vzorků. Poté byly připraveny PCR zkumavky (PCR stripy), do kterých bylo po označení napipetováno X μ l PCR směsi a X μ l izolované DNA (každý vzorek jinou špičkou podle zkoumaného patogenu). Byla připravena negativní kontrola (X μ l PCR směsi a X μ l PCR vody) a pozitivní kontrola (X μ l PCR směsi a X μ l pozitivního vzorku). Obsah PCR zkumavky byl zvortexován, PCR zkumavky byly umístěny do termocykleru a následně byl spuštěn PCR program (podle zkoumaného patogenu [Tab. 3/5](#)).



Obrázek 10: PCR box (Vlastní fotografie)



Obrázek 11: PCR stripy s PCR směsí (Vlastní fotografie)

Tabulka 1: Seznam použitých primerů.

Druh	Cílový gen	Sekvence	Citace
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	groEL	FW: ATG GTA TGC AGT TTG ATC GC RW: TCT ACT CTG TCT TTG CGT TC	Alberti et al., 2005
<i>Rickettsia</i> spp.	gltA	FW: GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT RW: GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	Labruna et al., 2004

***Rickettsia* spp.**

Tabulka 2: Množství složek v reakční směsi pro PCR k detekci *Rickettsia* spp.

Složky směsi	Množství (μl)
Master mix	12,5
PCR H ₂ O	7,5
Primer <i>Rickettsia</i> 1	1,25
Primer <i>Rickettsia</i> 2	1,25
Vzorek izolované DNA/PK/NK	2,5
Celkem	25

PK – pozitivní kontrola

NK – negativní kontrola

Tabulka 3: PCR program pro detekci *Rickettsia* spp.

Fáze	Opakování	Čas	Teplota (°C)
Denaturace (počáteční)	1x	5 min	95
Denaturace		20 s	95
Nasedání primerů	40x	30 s	57
Prodlužování řetězce		1 min	72
Prodloužená řetězce	1x	5 min	72

Anaplasma phagocytophilum

Tabulka 4: Množství složek v reakční směsi pro PCR k detekci *A. phagocytophilum*.

Složky směsi	Množství (μl)
Master mix	12,5
PCR H ₂ O	9,5
Primer groEL 569	1
Primer groEL 1193	1
Vzorek izolované DNA/PK/NK	1
Celkem	25

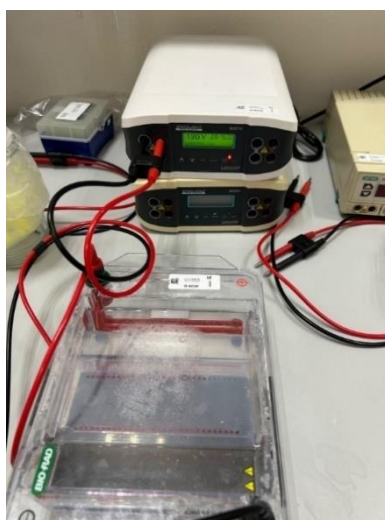
Tabulka 5: Program pro nested PCR k detekci *A. phagocytophilum*.

Fáze	Opakování	Čas	Teplota (°C)
Denaturace (počáteční)	1x	1 min	94
Denaturace		15 s	94
Nasedání primerů	35x	15 s	53
Extenze DNA		30 s	72
Závěrečná extenze	1x	7 min	72

3.4 Gelová elektroforéza

Při přípravě agarozového gelu bylo do baňky typu Erlen odváženo 2 g agarózy, následně bylo ve skleněném válci odměřeno 80ml TBE pufru, které bylo přidáno do baňky a krouživým pohybem promícháno. Baňka byla zahřívána v mikrovlnné troubě po dobu 4-5 min, poté byla baňka vyjmutá a chladila se pod tekoucí vodou na 60 °C (několik sec udržet přiloženou kádinku

na hřbetu ruky). Následně bylo do baňky přidáno 80 μ l Midori green a krouživým pohybem promíchán. Připravený gel byl přelit do nalévací vany s připraveným hřebínkem, případné bubliny byly odstraněny špičkou a nakonec byl gel přikryt alobalem a nechán ztuhnout (cca 30 min). Po ztuhnutí gelu byl vyjmut hřebínek, povolena vana, vyndán gel a přesunut do elektrické vany s TBE pufrům tak, že byl celý ponořený. Do jamek v gelu byly napipetovány vzorky (po 10 μ l), následně NK a PK (po 10 μ l) a do poslední jamky velikostní marker 100 bp (po 5 μ l). Po pipetování byl gel přiklopen, byla zapojena elektroforetická vana do zdroje a puštěn elektrický proud (120 V) (Obr. 12). Elektroforéza trvala 25-40 min podle velikosti gelu (bylo nutné sledovat produkty gelu, jakmile se blížily na konec, či k druhé řadě jamek, bylo potřeba proces ukončit). Po ukončení byl gel přemístěn na UV transluminátor, kde bylo pořízeno pár snímků, které byly uloženy a nakonec byly odečteny výsledky. U gelové elektroforézy, bylo také nutné dodržovat určité zásady: před přípravou agarozového gelu bylo také nutné pracovat v nitrilových rukavicích. Velikost produktů pro *Rickettsia* spp. bylo 401 bp a pro *Anaplasma phagocytophilum* to bylo 625 bp.



Obrázek 12: Elektroforéza (Vlastní obrázek)

3.5. Statistické zhodnocení výsledků

Statistické vyhodnocení výsledků probíhalo pomocí programu Unistat 6.5 metodou kontingenční tabulky formátu kxm a 2x2. U formátu kxm byla výsledkem hodnota Pearson, zatímco u formátu 2x2 byla výsledkem hodnota Yatesovy korekce.

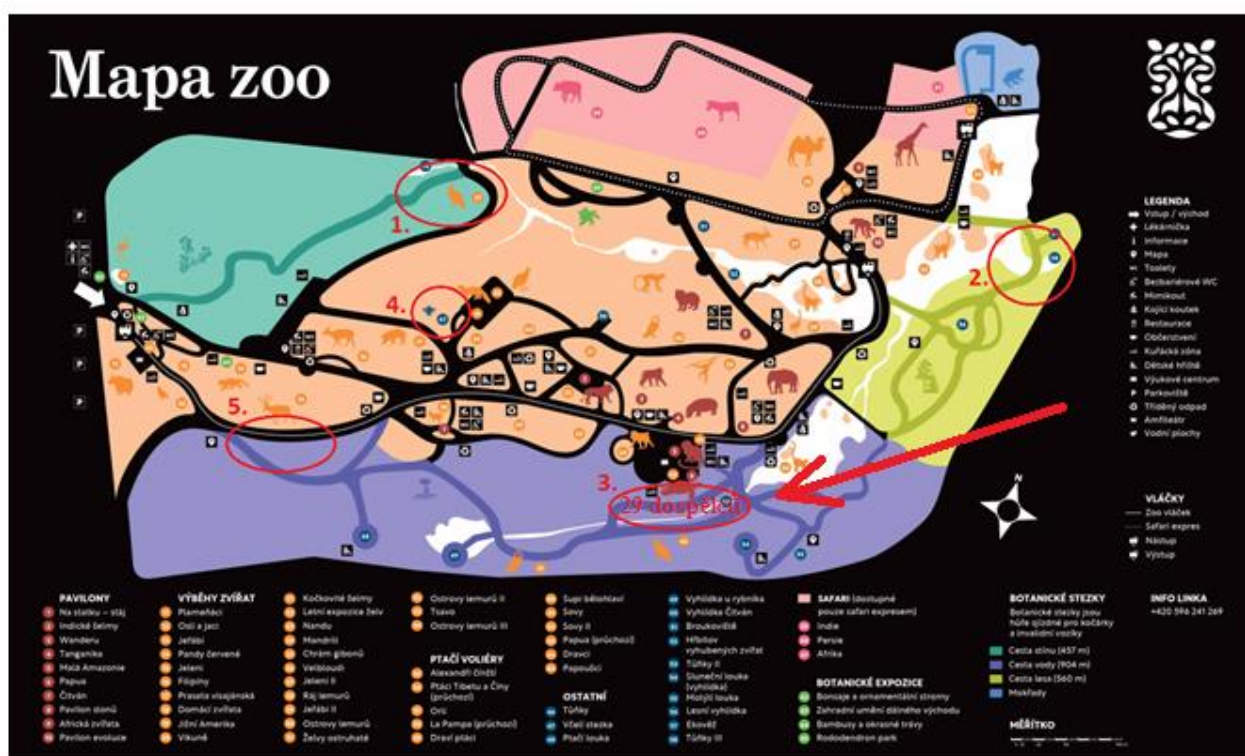
Jestliže byla hodnota „p“ nižší než 0,05, jednalo se o statisticky významný rozdíl a byla přijata alternativní hypotéza, tj. námi sledovaný faktor (lokalita, roční období, pohlaví klíšťat) má vliv na pozitivitu klíšťat. V případě, že byla hodnota „p“ vyšší než 0,05, jednalo se o statisticky nevýznamný rozdíl a byla přijata nulová hypotéza.

4. Výsledky

4.1. Množství klíšťat dle období a lokalit

V období od března do října roku 2024 bylo v zoologické zahradě Ostrava nasbíráno celkem 598 klíšťat, z toho bylo 130 dospělců (67 samic a 63 samců) a 468 nymf (Tab. 6). K detekci *Rickettsia spp.* a *A. phacocytophylum* pomocí PCR byly v rámci této práce použity pouze vzorky dospělců tj. 130 vzorků.

Celkem bylo v Zoo Ostrava za dobu 8 měsíců vylajkováním sesbíráno 130 dospělců (Tab. 7). Nejvíce dospělců (49) bylo posbíráno v měsíci červen a nejvíce dospělců (29) bylo na lokalitě číslo 3, tj. v okruhu kolem tůňky (Obr. 13).



Obrázek 13: Mapa zoo, s vyznačenými lokalitami pro sběr klíšťat (šipka ukazuje na lokalitu s největším nálezem klíšťat).

1. úsek za voliérou orlů skalních
2. úsek za rybníky a ostrovy lemuru
3. okruh kolem tůňky
4. úsek naproti výběhům jelenů
5. včelí stezka

Tabulka 6: Rozdělení klíšťat (dospělců a nymf dohromady) dle měsíců a lokalit.

Měsíc	Lokalita					Celkem
	1	2	3	4	5	
Březen	6	3	10	11	8	38
Duben	8	29	27	8	41	113
Květen	2	4	6	1	11	24
Červen	16	15	7	13	15	66
Červenec	2	11	3	0	4	20
Srpen	2	2	0	0	1	5
Září	1	0	1	1	0	3
Říjen	2	1	2	4	8	17
Celkem	39	65	56	38	88	286

Tabulka 7: Rozdělení dospělců dle měsíců a lokalit.

Měsíc	Lokalita					Celkem
	1	2	3	4	5	
Březen	0	2	7	6	1	16
Duben	6	8	7	3	5	29
Květen	2	3	6	1	7	19
Červen	13	10	6	11	9	49
Červenec	1	3	1	0	1	6
Srpen	0	0	0	0	0	0
Září	1	0	1	1	0	3
Říjen	2	0	1	2	3	8
Celkem	25	26	29	24	26	130

Lokalita 1: úsek za voliérou orlů skalních

Lokalita 2: úsek za rybníky a ostrovy lemurů

Lokalita 3: okruh kolem tůňky

Lokalita 4: včelí stezka

Lokalita 5: úsek naproti výběhům jelenů

4.2. *Rickettsia* spp.

Rickettsia spp. byla zjištěna u 33 vzorků klíšťat (25,4 %), z toho bylo 16 samic (12,3 %) a 17 samců (13,1 %) (Obr. 14). Nejvyšší pozitivita byla zaznamenána v lokalitě 5 (úsek naproti výběhům jelenů), kde bylo pozitivních 9 vzorků (6,9 %). V rámci měsíčního období bylo nejvíce pozitivních vzorků zaznamenáno v měsíci červen, tedy 12 pozitivních vzorků (9,2 %) (Tab. 8).

Tabulka 8: Rozdělení pozitivních vzorků na *Rickettsia* spp. dle měsíců a lokalit.

Měsíc	Lokalita					Celkem	Prevalence
	1	2	3	4	5		
Březen	–	–	2	1	–	3	2,3 %
Duben	–	–	2	–	1	3	2,3 %
Květen	2	2	1	1	5	11	8,5 %
Červen	3	2	2	3	2	12	9,2 %
Červenec	1	1	–	–	–	2	1,5 %
Srpen	–	–	–	–	–	0	0%
Září	1	–	–	–	–	1	0,8 %
Říjen	–	–	–	–	1	1	0,8 %
Celkem	7	5	7	5	9	33	–
Prevalence	5,4 %	3,85 %	5,4 %	3,85 %	6,9 %	–	25,4 %

4.2.1 Statistické vyhodnocení výsledků u *Rickettsia* spp.

Tabulka 9: Statistické vyhodnocení vlivu lokalit sběru.

	Lokalita 1	Lokalita 2	Lokalita 3	Lokalita 4	Lokalita 5
Negativní	18	21	22	19	17
Pozitivní	7	5	7	5	9

Hodnota Pearson: $p = 0,7236$, statisticky nevýznamný rozdíl. Lokalita v zoologické zahradě Ostrava nemá vliv na pozitivitu klíšťat bakterií *Rickettsia* spp.

Tabulka 10: Statistické vyhodnocení vlivu ročního období.

	Jaro	Léto	Podzim
Negativní	47	41	9
Pozitivní	17	14	2

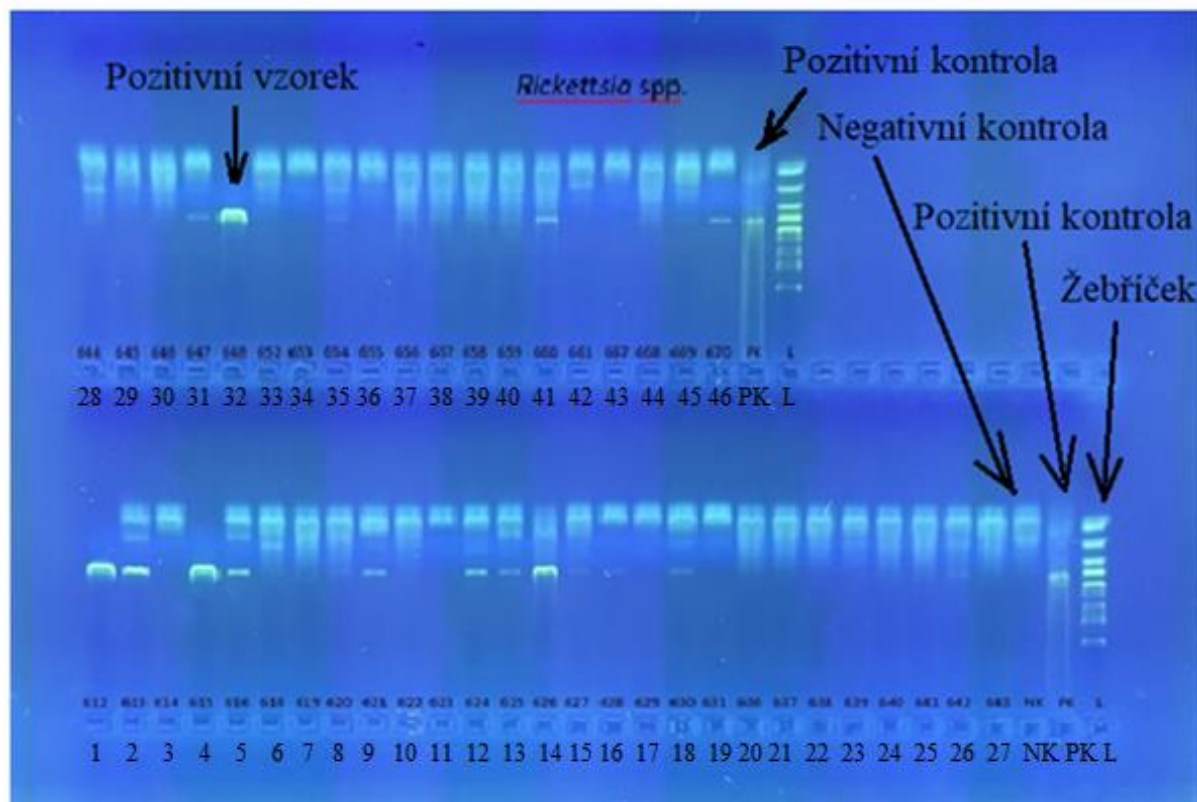
Hodnota Pearson: $p = 0,8402$, statisticky nevýznamný rozdíl. Nebyl prokázán vliv ročního období na pozitivitu klíšťat bakterií *Rickettsia* spp.

Tabulka 11: Statistické vyhodnocení vlivu pohlaví klíšťat.

	Samice	Samci
Negativní	51	46
Pozitivní	16	17

Hodnota Pearson: $p = 0,8378$, statisticky nevýznamný rozdíl. Pohlaví klíšťat nelze považovat za faktor ovlivňující infekci *Rickettsia* spp.

Obrázek 14: Fotografie gelu po gelové elektroforéze pro detekci *Rickettsia* spp. u klíšťat (Vlastní fotografie)



Pozitivní vzorky (1, 2, 4, 5, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 26, 31, 32, 35, 41, 45, 46....18 vzorků), negativní vzorky (3, 6, 7, 8, 10, 11, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 42, 43, 44,28 vzorků), PK – pozitivní kontrola (401bp), NK – negativní kontrola, L –100bp velikostní marker.

4.3. *Anaplasma phagocytophylum*

Bakterie *A. phagocytophylum* byla zjištěna u 2 vzorků (oba samci). Prevalence byla zaznamenána v 1. a 5. lokalitě (1 - úsek za voliérou orlů skalních, 5 - úsek naproti výběhu jelenů). Smíšená infekce (současný průkaz obou patogenů) byla zjištěna u 2 samců.

V rámci měsíců byly pozitivní vzorky zjištěny v dubnu a červnu (Tab. 12).

Tabulka 12: Rozdělení vzorků pozitivních na *Anaplasma phagocytophilum* dle měsíců a lokalit.

Měsíc	Lokalita					Celkem	Prevalence
	1	2	3	4	5		
Březen	–	–	–	–	–	0	0%
Duben	–	–	–	–	1	1	0,75%
Květen	–	–	–	–	–	0	0%
Červen	1	–	–	–	–	1	0,75%
Červenec	–	–	–	–	–	0	0%
Srpen	–	–	–	–	–	0	0%
Září	–	–	–	–	–	0	0%
Říjen	–	–	–	–	–	0	0%
Celkem	1	0	0	0	1	2	–
Prevalence	0,75%	0%	0%	0%	0,75%	–	1,50%

U bakterie *A. phagocytophilum* se statistika nedělala, jelikož byly pouze 2 pozitivní vzorky.

5. Diskuze

Zoologická zahrada Ostrava je místem mnoha tvorů, mezi které nepochybně patří i klíště rodu *I. ricinus*, na které jsem se ve svém výzkumu zaměřila. V zoologické zahradě byla potvrzena jak přítomnost klíšťat, tak se podařilo prokázat i přítomnost bakterií *A. phagocytophylum* a *Rickettsia* spp. Jako vektor těmto bakteriím slouží právě klíště obecné, které se na území České republiky hojně vyskytuje.

Ve výzkumu, jsem se tedy zaměřila na dva patogeny *A. phagocytophylum* a *Rickettsia* spp. Je patrné, že počty případů nákazy těmito bakteriemi ve světě a v České republice neustále rostou. Mezi důvody může být globalizace a oteplování klimatu a také neustálé pokroky v detekčních metodách (Zálešáková, 2022). Na základě mých výsledků se ukázalo, že bakterie *Rickettsia* spp. se v Zoologické zahradě Ostrava vyskytuje mnohem početněji než bakterie *A. phagocytophylum*. Důvodem vyššího výskytu bakterie *Rickettsia* spp., může být např. to, že tyto bakterie jsou velice běžné. Klíšťata, jako jedni z hlavních hostitelů rickettsií, se mohou těmito bakteriemi nakazit nejčastěji prostřednictvím některého ze svých hostitelů, kterými bývají zpravidla myši, veverky, či různá domácí zvířata (Tomčová, 2016). Celkově bylo na bakterii *Rickettsia* spp. pozitivních 33 vzorků (25,4 %) a na bakterii *A. phagocytophylum* byly pozitivní 2 vzorky (1,5 %).

Největší počet klíšťat je v období na jaře. Často se, ale klíšťata hojně vyskytují i mezi létem a podzimem. Podobné výsledky jako v naší práci, byly zjištěny i v jiných studiích. Žákovská et al. (2022) uvádí, že sezona klíšťat vrcholí v období od května do června. Při měření teploty vzduchu a vlhkosti zjistili, že optimální podmínky pro klíšťata jsou teplota kolem 17 až 18 °C a vlhkost mezi 60 až 70 %. Podle Žákovské (2022) bylo nejvíce infikovaných klíšťat zjištěno v květnu. V naší studii bylo v září nasbíráno nízký počet klíšťat, což mohlo být způsobeno velkými povodněmi, které trvaly několik dní v kuse a ustály den před sběrem klíšťat.

Lokalita s největším počtem nasbíraných klíšťat byla včelí stezka neboli lokalita 5. Důvodem může být např. to, že se klíšťata často vyskytují na vlhkých travnatých plochách, které se na této stezce hojně vyskytují. Naopak lokalita číslo 4 je nejsušší, a i to může být jeden z faktorů, proč bylo na této lokalitě nasbíráno nejméně klíšťat. Jako důkaz nám může posloužit i to, že na lokalitách u Brněnské přehrady se počet klíšťat a jejich aktivita stále rovná nejvyšším počtům

nasbíraných klíšťat v sezoně, protože zde vlhkost hraje velkou roli a místo je pro klíšťata atraktivní (Žáková, 2018).

Při porovnání s dřívějšími vědeckými studiemi dělané rovněž v zoo Ostrava je patrné, že pozitivita klíšťat na *Rickettsia* spp. je mnohem vyšší oproti *A. phagocytophylum*. *Rickettsia* spp. 16,5 % (Pleško, 2024) versus v této práci 25,4 %, *A. phagocytophylum* 2,3 % (Plecháčková, 2024) versus v této práci 1,5 %. Vyšší pozitivita u *Rickettsia* spp. byla zaznamenána také v německém městě Hannover 26,2 % (551/2100), naopak nízká pozitivita na *A. phagocytophylum* 4,5 % (94/2100) (Tappe et al., 2016). I další výzkum na severu Německa potvrdil, že se *Rickettsia* spp. (29,6 %, 931/3150) vyskytuje mnohem častěji než *A. phagocytophylum* (6,4 %, 202/3150) (Knoll et al., 2021).

Jelikož Zoologická zahrada je místo s vysokou návštěvností, a to hlavně v době velkého výskytu klíšťat, ohrožení mohou být lidé, ale i mnoho druhů zvířat, které se v Zoo vyskytují. Je tedy nutné, aby návštěvníci dbali na prevenci před klíšťaty, čímž může být např. repelent, který slouží jako odpuzení klíšťat. Důležité je také důkladné prohlédnutí sebe i psa a popř. bezpečné odstranění klíštěte. Další možní větší ochrany, alespoň v rizikovém období je vyhýbat se travnatým oblastem u vodních toků a okrajů lesa, které klíšťatům vyhovují nejvíce.

V monitoringu *A. phagocytophylum* a *Rickettsia* spp. u klíšťat v zoologických zahradách by bylo vhodné pokračovat i v dalších letech, protože se prevalence bakterie může měnit v závislosti na různých obdobích a dalších faktorech.

6. Závěr

Cílem mé práce byl sběr klíšťat v Zoologické zahradě Ostrava a následná detekce DNA bakterií *Rickettsia* spp. a *Anaplasma phagocytophilum* u těchto klíšťat pomocí PCR a zjištění aktuální situace výskytu klíšťat v této Zoo.

Jelikož jsou zoologické zahrady vhodným místem pro výskyt klíšťat i přenos patogenů klíšťaty, předpokládaly se pozitivní výsledky u obou bakterií. Pozitivita u bakterie *Rickettsia* spp. byla mnohem vyšší (25,4 %) oproti *A. phagocytophilum* (1,5 %).

Monitoring těchto bakterií je velmi důležitý i do budoucnosti a je potřeba s ním i nadále pokračovat, neboť může přinést mnoho nových, důležitých dat, které mohou pomoci při zkoumání závažných onemocnění, které jsou těmito patogeny způsobovány.

Závěrem lze konstatovat, že nejlepší způsob prevence proti rickettsiovou a anaplazmovou infekcí je především ochrana před vektory neboli klíšťaty, proti kterým už dnes máme řadu možností větší ochrany (např. repelent).

7. Seznam použité literatury

1. Gern L. Die Biologie der *Ixodes ricinus* Zecke [The biology of the *Ixodes ricinus* tick]. Ther Umsch. 2005, 62(11): 707-712. German. doi: 10.1024/0040-5930.62.11.707.
2. Randolph SE, Green RM, Hoodless AN, Peacey MF. An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. Int J Parasitol. 2002, 32(8): 979-989. doi: 10.1016/s0020-7519(02)00030-9.
3. Randolph SE. Tick-borne encephalitis virus, ticks and humans: short-term and long-term dynamics. Curr Opin Infect Dis. 2008, 21(5): 462-467. doi: 10.1097/QCO.0b013e32830ce74b.
4. Rizzoli A, Rosà R, Mantelli B, Pecchioli E, Hauffe H, Tagliapietra V, Beninati T, Neteler M, Genchi C. *Ixodes ricinus*, malattie trasmesse e reservoirs [*Ixodes ricinus*, transmitted diseases and reservoirs]. Parassitologia. 2004, 46(1-2): 119-122.
5. Sambri V, Marangoni A, Storni E, Cavrini F, Moroni A, Sparacino M, Cevenini R. Infezioni zoonosiche trasmesse da zecche: aspetti clinici e diagnostici in medicina umana [Tick borne zoonosis: selected clinical and diagnostic aspects]. Parassitologia. 2004, 46(1-2): 109-113.
6. Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. Clin Infect Dis. 2001, 32(6): 897-928. doi: 10.1086/319347. Epub 2001 Mar 14. Erratum in: Clin Infect Dis 2001 Sep 1;33(5):749.
7. Bowman AS, Sauer JR. Tick salivary glands: function, physiology and future. Parasitology. 2004, 129 Suppl: S67-81. doi: 10.1017/s0031182004006468.
8. Cupp EW. Biology of ticks. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1991, 21(1): 1-26. doi: 10.1016/s0195-5616(91)50001-2.
9. El Hamiani Khatat S, Daminet S, Duchateau L, Elhachimi L, Kachani M, Sahibi H. Epidemiological and clinicopathological features of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs: A systematic review. Front Vet Sci. 2021, 8: 686644. doi: 10.3389/fvets.2021.686644.
10. Chisu V, Dei Giudici S, Foxi C, Chessa G, Peralta F, Sini V, Masala G. *Anaplasma* Druh v klíšťatech napadající savce na Sardinii, Itálie. Zvířata (Basilej). 2023, 13(8): 1332. doi: 10.3390/ani13081332.
11. Baron S., David H. Walker. Medical Microbiology. 4th edition. The University of Texas Medical Branch at Galveston. 1996 Bookshelf ID: NBK7624

12. Tomčová E. Bakterie rodu *Rickettsia* přenášené klíšťaty ve světě. Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Brno 2016.
13. Plecháčová L. Klíšťata v zoologických zahradách a riziko infekce bakterií *Anaplasma phagocytophilum*. Bakalářská práce, VETUNI Brno, 2024.
14. Pleško K. *Rickettsia* spp. u klíšťat v zoo. Bakalářská práce, VETUNI Brno, 2024.
15. Pirklová G., Milotová A., Žákovská A. Klíšťata v Brně: studie ukázala, že největší riziko je v květnu. Brněnský deník, 2022.
16. Žákovská A. Klíšťata si letos pospíšila. Zprávy z MUNI, 2018.
17. Alberti A, Addis MF, Sparagano O, Zobba R, Chessa B, Cubeddu T, Parpaglia ML, Ardu M, Pittau M. *Anaplasma phagocytophilum*, Sardinia, Italy. Emerg Infect Dis. 2005 Aug;11(8):1322-4. doi: 10.3201/eid1108.050085. PMID: 16110587; PMCID: PMC3320504.
18. Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, Popov V, Gennari SM, Walker DH. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. J Clin Microbiol. 2004 Jan;42(1):90-8. doi: 10.1128/JCM.42.1.90-98.2004. PMID: 14715737; PMCID: PMC321730.
19. Knoll S, Springer A, Hauck D, Schunack B, Pachnicke S, Strube C. Regional, seasonal, biennial and landscape-associated distribution of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. infections in *Ixodes* ticks in northern Germany and implications for risk assessment at larger spatial scales. Ticks Tick Borne Dis. 2021 May;12(3):101657. doi: 10.1016/j.ttbdis.2021.101657. Epub 2021 Jan 19. PMID: 33524939.
20. Tappe J, Strube C. *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. infections in hard ticks (*Ixodes ricinus*) in the city of Hanover (Germany): revisited. Ticks Tick Borne Dis. 2013 Sep;4(5):432-8. doi: 10.1016/j.ttbdis.2013.04.009. Epub 2013 Jul 6. Erratum in: Ticks Tick Borne Dis. 2016 Jul;7(5):1059-1060. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.03.004. PMID: 23838023.

8. Seznam použitých internetových odkazů

- URL 1: *Anaplasma phagocytophilum*, rejstřík pojmů. Národní zdravotní informační portál dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/6494> [cit. 18. 08. 2024]
- URL 2: Elisabeth Pharmacon, diagnostická souprava. Dostupné z: <https://www.elisabeth.cz/produkt-eligene-anaplasma-phagocytophilum-uni.html> [cit. 18. 08. 2024]
- URL 3: BOTANY.cz, Linné, Carl. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/linne/> [cit. 22. 08. 2024]
- URL 4: Séroprevalence *Anaplasma phagocytophilum* u pacientů vyšetřovaných na MiÚ FN v Brně. Informační systém Masarykovy univerzity. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/fxmzm/Sedlackova_Eva.pdf [cit. 23. 08. 2024].
- URL 5: Rickettsial diseases, CDC yellow book 2024, Travel-associated infections & diseases, William Nicholson, Christopher Paddock. Dostupné z: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2024/infections-diseases/rickettsial-diseases> [cit. 18. 08. 2024].
- URL 6: Klíšťaty přenášená onemocnění, Radek Šíma. Datum publikace: 27. 08. 2021, Aktualizováno: 17. 02. 2023. Dostupné z: <https://sancedetem.cz/klisaty-prenasena-onemocneni> [cit. 18. 08. 2024]
- URL 7: Onemocnění přenášená klíšťaty, Hana Roháčová, přehledové články. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2006/06/05.pdf> [cit. 18. 08. 2024]
- URL 8: *Ixodes ricinus*, WikiSkripta, Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Ixodes_ricinus [cit. 18. 08. 2024]
- URL 9: Klíště obecné - *Ixodes ricinus*, BioLib.cz. Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxonposition/id76144/> [cit. 18. 08. 2024].
- URL 10: *Rickettsia*, rejstřík pojmů. Národní zdravotní informační portál. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/6498> [cit. 20. 08. 2024]
- URL 11: Klíšťová encefalitida, Novinky – klíště jako vektor. Dostupné z: <https://www.klistova-encefalitida.cz/novinky/rickettsie-klisite-jako-vektor-104> [cit. 20. 08. 2024]
- URL 12: Lidská granulocytární anaplazmóza (HGA), Státní zdravotní ústav. Dostupné z: <https://szu.cz/temata-zdravi-a-bezpecnosti/a-z-infekce/a/anaplazmoza/lidska-granulocytarni-anaplazmoza/> [cit. 20. 08. 2024].

- URL 13: Kudyznudy.cz, CzechTourism. Dostupné z:
<https://www.kudyznudy.cz/aktivita/zoologicka-zahrada-ostrava-priroda-na-dosah> [cit. 21. 08. 2024].
- URL 15: Český hydrometeorologický ústav. Dostupné z:
<https://info.chmi.cz/bio/mapy.php?type=kliste> [cit. 29. 12. 2024]
- URL 16: Biologické centrum, AV ČR, v. v. i. Dostupné z:
https://www.bc.cas.cz/novinky/detail/5497-v-cr-se-siri-nove-druhy-klisat-pomozte-vedcum-s-jejich-mapovanim/?fbclid=IwAR3uX_qw88rPbUOQ_0xhSv5npQJOjUzUGpsnQT4zNF1DPc_iIHkrCUvs7wck [cit. 29. 12. 2024].
- URL 17: Klíště.cz. Dostupné z: <https://www.kliste.cz/cz/vse-o-klisatech/clanek/druhy-klisat> [cit. 29. 12. 2024].
- URL 18: *Anaplasma phagocytophilum* (modrá barva) v cytoplazmě neutrofilů krvi psa; 1000 X. Dostupné z <https://www.researchgate.net/figure/> [cit. 10. 01. 2025].
- URL 19: Potenciální vektorové členovci pro *Rickettsia*. Dostupné z
<https://www.researchgate.net/> [cit. 10. 01. 2025]
- URL 20: Samec klíštěte *Ixodes ricinus* zespoda i shora. Dostupné z
https://is.muni.cz/el/1431/jaro2010/Bi5611c/um/nemoci_prenas._klisaty.pdf [cit. 10. 01. 2025]
- URL 21: Vývojová stadia klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*). (A) larva, (B) nymfa, (C) dospělý samec, (D) dospělá samice. Dostupné z <https://sancedetem.cz/klisaty-prenasena-onemocneni> [cit. 10. 01. 2025]
- URL 22: Vývojová stadia klíštěte a srovnání jejich velikosti s velikostí lidského nehtu. Dostupné z <https://www.nzip.cz/images/articles/95-ochrana-pred-klisaty/klisate-vyvojova-stadia-min.jpg> [cit. 10. 01. 2025]
- URL 23: Mapa zoo Ostrava. Dostupné z <https://www.zoo-ostrava.cz/cz/pred-navstevou/mapa-zoo/> [cit. 10. 01. 2025]

9. Seznam obrázků

Obrázek 1: Souhrn všech rickettsií, se kterými se můžeme v Evropě setkat.	9
Obrázek 2: Potenciální vektoroví členovci pro <i>Rickettsia</i> (URL 19).....	10
Obrázek 3: <i>Anaplasma phagocytophilum</i> (modrá barva) v cytoplazmě neutrofilů v krvi psa; 1000× (URL 18) .	11
Obrázek 4: Samec klíštěte <i>Ixodes ricinus</i> zespoda i shora (URL 20).	14
Obrázek 5: Vývojová stadia klíštěte a srovnání jejich velikosti s velikostí lidského nehtu. (URL 22)	15
Obrázek 6: Vývojová stadia klíštěte obecného (<i>Ixodes ricinus</i>). (A) larva, (B) nymfa, (C) dospělý samec, (D) dospělá samice. (URL 21).....	15
Obrázek 7: Mapa Zoo Ostrava (URL 23)	18
Obrázek 8: Vlajkování (Vlastní obrázek)	19
Obrázek 9: Termoblok s Eppendorf zkumavkami (Vlastní fotografie).....	20
Obrázek 10: PCR box (Vlastní fotografie)	Obrázek 11: PCR stripy s PCR směsí (Vlastní fotografie)
.....	22
Obrázek 12: Elektroforéza (Vlastní obrázek)	24
Obrázek 14: Mapa zoo, s vyznačenými lokalitami pro sběr klíšťat (šipka ukazuje na lokalitu s největším nálezem klíšťat).	26
Obrázek 15: Fotografie gelu po gelové elektroforéze pro detekci <i>Rickettsia</i> spp. u klíšťat (Vlastní fotografie).	29

10. Seznam tabulek

Tabulka 1: Seznam použitých primerů.	22
Tabulka 2: Množství složek v reakční směsi pro PCR k detekci <i>Rickettsia</i> spp.	22
Tabulka 3: PCR program pro detekci <i>Rickettsia</i> spp.	23
Tabulka 4: Množství složek v reakční směsi pro PCR k detekci <i>A. phagocytophilum</i>	23
Tabulka 5: Program pro nested PCR k detekci <i>A. phagocytophilum</i>	23
Tabulka 6: Rozdělení klíšťat (dospělců a nymf dohromady) dle měsíců a lokalit.	27
Tabulka 7: Rozdělení dospělců dle měsíců a lokalit.	27
Tabulka 8: Rozdělení pozitivních vzorků na <i>Rickettsia</i> spp. dle měsíců a lokalit.	28
Tabulka 9: Statistické vyhodnocení vlivu lokalit sběru.	28
Tabulka 10: Statistické vyhodnocení vlivu ročního období.	28
Tabulka 11: Statistické vyhodnocení vlivu pohlaví klíšťat.	28
Tabulka 13: Rozdělení vzorků pozitivních na <i>Anaplasma phagocytophilum</i> dle měsíců a lokalit.	30