

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra parazitologie

**Optimalizace přenosového modelu *Babesia microti***

Diplomová práce

**Jiří Tápal**

Vedoucí práce: RNDr. Ondřej Hajdušek, PhD.

Školitel specialista: RNDr. Marie Jalovecká

České Budějovice 2016

**Ťápal J., (2016):** Optimalizace přenosového modelu *Babesia microti* [Optimization of *Babesia microti* transmission model. Mgr. Thesis, in Czech] - 59 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:**

*Babesia microti* is the most common causative agent of human babesiosis which is transmitted by the tick *I. ricinus* in Europe. Due to the increasing number of cases of human babesiosis there is a growing public concern about this disease. So far there has not been established transmission model for *Babesia sp.* in the tick *I. ricinus*. This thesis addresses successful implementation of the transmission model of *B. microti* in *I. ricinus*, localization of the parasite in tick tissues and its transmission to the laboratory mice.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 21. 4. 2016

.....

Bc. Jiří Ťápal

**Poděkování:**

Chtěl bych poděkovat svému školiteli RNDr. Ondřeji Hajduškovi Ph.D. a především své školitelce – specialistce RNDr. Marii Jalovecké za jejich vedení mé práce, cenné rady a trpělivost. Dále bych chtěl poděkovat ostatním členům laboratoře za jejich pomoc a vytvoření příjemné pracovní atmosféry. Děkuji také všem, kdo mi během mého působení v laboratoři pomáhali a poskytovali cenné rady. Poděkovat bych chtěl i panu řediteli Parazitologického ústavu Prof. RNDr. Juliovi Lukeši, CSc. za to, že jsem mohl vypracovat svoji magisterskou práci v jeho ústavu.

## Obsah:

1. Úvod .....	1
1.1. Charakteristika čeledi <i>Babesiidae</i> .....	1
1.1.1. Historie .....	1
1.1.2. Fylogenetické postavení babesíí .....	2
1.1.3. Životní cyklus .....	4
1.2. Morfologie buňky .....	5
1.3. Ekologie babesíí.....	7
1.3.1. Klíště jako přirozený vektor .....	7
1.3.2. Babezióza.....	11
1.4. Imunitní reakce .....	13
1.5. Diagnostika a kultivace babesíí .....	15
1.6. <i>Babesia microti</i> .....	16
2. Cíle.....	20
3. Materiál a metody .....	21
3.1. Materiál.....	
3.1.1. Parazit .....	
3.1.2. Experimentální zvířata .....	
3.2. Metody .....	
3.2.1. Infekce laboratorních myší parazitem <i>B. microti</i> .....	
3.2.2. Zavedení molekulární detekce <i>B. microti</i> .....	
3.2.3. Zavedení a optimalizace přenosového modelu <i>B. microti</i> .....	
3.2.4. Lokalizace vývojových stádií <i>B. microti</i> v nymfách klíšťat.....	
3.2.5. Přenos <i>B. microti</i> do laboratorní myši během sání nymf <i>I. ricinus</i> .....	
3.2.6. Vyhodnocení a grafické zobrazení výsledků .....	
4. Výsledky .....	22
4.1. Infekce laboratorních myší parazitem <i>B. microti</i> .....	

4.2. Zavedení molekulární detekce <i>B. microti</i> .....	
4.3. Zavedení a optimalizace přenosového modelu <i>B. microti</i> .....	
4.4. Lokalizace vývojových stádií <i>B. microti</i> v nymfách klíšťat .....	
4.5. Přenos <i>B. microti</i> do laboratorní myši během sání nymf <i>I. ricinus</i> .....	
5. Diskuze .....	23
6. Závěr .....	24
7. Reference .....	24

# 1. Úvod

## 1.1. Charakteristika čeledi *Babesiidae*

Babesie jsou protozoální mikroorganismy přenášené klíšťaty. Jedná se o intracelulární parazity erytrocytů všech obratlovců, které jsou díky své četnosti považovány za druhý nejvýznamnější krevní patogen po trypanosomách<sup>1</sup>. Patří do kmene Apikomplexa (Výtrusovci), který zahrnuje spoustu významných původců medicínských či veterinárních onemocnění, jako je např. *Plasmodium* spp. (malárie), *Cryptosporidium* spp. (kryptosporidióza), *Toxoplasma gondii* (toxoplazmóza) a jiné<sup>2</sup>. Pro babesie je charakteristický dvouhostitelský cyklus, kdy mezihostitelem je obratlovec a definitivním hostitelem vždy klíště. V erytrocytech obratlovců probíhá nepohlavní rozmnožování a ve střevech klíšete dochází k pohlavnímu množení babesií<sup>1,3,4</sup>.

Babesie jsou významným antropozooním patogenem s kosmopolitním rozšířením<sup>1</sup>. Jejich výskyt byl zaznamenán v Evropě<sup>5,6</sup>, Africe<sup>7</sup>, Asii<sup>8,9</sup>, Severní Americe<sup>10,11</sup>, Jižní Americe<sup>12</sup>, Austrálii<sup>13</sup> a dokonce i v Antarktidě, kde byly diagnostikovány v krvi tučňáka<sup>1,14</sup>. Babesie se vyznačují širokým hostitelským rozpětím (stovky savčích hostitelů, včetně člověka a několika ptačích jedinců) a škody jimi způsobené mají široký ekonomický, veterinární a medicínský dopad v mnoha státech světa<sup>15</sup>.

Onemocnění způsobené babesiemi se v humánní medicíně nazývá lidská babezióza. Kvůli vzrůstajícím případům lidské babeziózy jak v USA, tak i v Evropě a možnosti přenosu pomocí krevní transfuze, vzrůstá všeobecné znepokojení nad touto chorobou<sup>16,17</sup>. Z hlediska veterinárního významu jsou babesie původci tzv. zvířecí babeziózy. Toto onemocnění se objevuje nejen u volně žijících, ale i u hospodářsky významných zvířat. Nebezpečné jsou obzvláště bovinní babesie (např. *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*), které způsobují velké ekonomické škody na hovězím dobytku převážně v subtropických a tropických oblastech<sup>1,17</sup>.

### 1.1.1. Historie

První zmínka o epidemii způsobené babesiemi byla pravděpodobně zaznamenána v knize Exodus 9:3. Za vlády faraona Ramsese II. došlo k hromadnému vymírání dobytka na tzv. „dobyččí mor“<sup>18</sup>. Za objevitele babesií se považuje rumunský mikrobiolog Victor Babes, který v roce 1888 v Rumunsku objevil tento patogen uvnitř červených krvinek hospodářského dobytka (skot), kterému způsoboval febrilní hemoglobinurii<sup>1</sup>. Jelikož se tehdy domníval, že se jedná o bakterii, pojmenoval ji jako *Haematococcus bovis*. V roce 1893 byl tento patogen

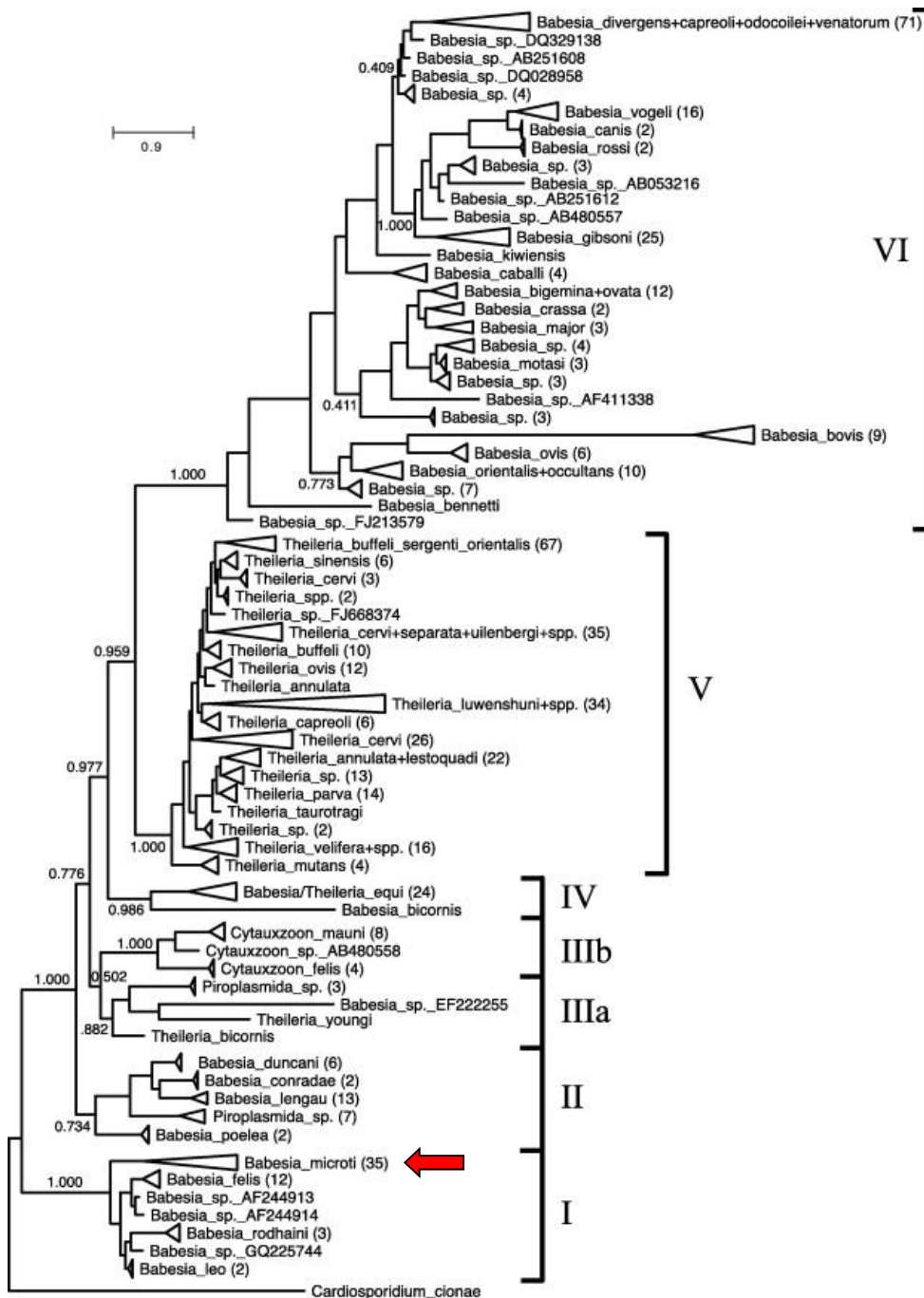
profesorem Starcovicim zařazen do říše protist a přejmenován po svém objeviteli jako *B. bovis*<sup>19</sup>. Tentýž rok objevili Smith a Killborn původce texaské horečky skotu, způsobené *Pyrosoma bigemina*, později přejmenované na *B. bigemina*<sup>20 4</sup>. Tento objev vedl k identifikaci přenašeče *Boophilus (Rhipicephalus) annulatus*, což byl první dokumentovaný zástupce z kmene Arthropoda, který dokázal přenášet patogeny<sup>21</sup>. Eradikace klíštěcího přenašeče vedla v roce 1943 na území USA k eliminaci této choroby<sup>22</sup>. První případ lidské babeziózy, kterou měla na svědomí *Babesia divergens*, nastal v roce 1956 v Jugoslávii a skončil fatálně pro splenektomizovaného pacienta. Daleko častější je však lidská babezióza způsobená *Babesia microti* (kap. 1.6.), která byla poprvé zaznamenána v roce 1969 na území USA a onemocnění bylo pojmenováno jako „Nantucket fever“<sup>23</sup>.

### 1.1.2. Fylogenetické postavení babesíí

Babesie patří do kmene Apikomplexa, třídy Hematozoa, řádu Piroplasmida a čeledi *Babesiidae*. V současné době existuje více než 100 druhů babesíí<sup>17</sup>. V minulosti byly babesie rozděleny do dvou skupin podle jejich morfologie, patogenního účinku a citlivosti k léčivům. První skupina byla pojmenována jako „malé“ babesie (trofozoiti 1,0 – 2,5 μm), do které patřily např. *Babesia gibsoni* a *B. microti*. Tato skupina je blízkce příbuzná theileriím. Druhá skupina „velké“ babesie (trofozoiti 2,5 – 5,0 μm) zahrnovala např. *B. bovis* a *Babesia canis*<sup>3</sup>. Toto rozdělení má význam i v životním cyklu babesíí, kdy se u „malých“ babesíí vyskytuje pouze transstadiální přenos, kdežto pro „velké“ babesie je typický jak transstadiální, tak i navíc transovariální přenos<sup>1</sup>.

Na základě podobností (morfologie, životní cyklus) byly některé theilerie řazeny k babesíím. Teprve použití elektronového mikroskopu vedlo k detailnějšímu pozorování rozdílů mezi buňkami a též objasnění životního cyklu (kap. 1.1.3.). Tyto poznatky posloužily k přesnějšímu zařazení tehdejších zástupců z piroplasmid do čeledi *Babesidae*, či *Theileridae* a v některých případech to vyústilo k přejmenování parazita (*Babesia equi* → *Theilerie equi*)<sup>24</sup>. Nicméně i tak zůstalo několik protozoí (např. *Cytauxzoon felis*, *B. microti*, *B. gibsoni*, *T. equi*) s nejistým postavením v systému *Piroplasmid*<sup>19</sup>.

Teprve s nástupem molekulárních metod v taxonomii došlo k spolehlivému odlišení mezi babesíemi a theileriemi. Fylogenetické analýzy byly založené na amplifikaci DNA genu malé ribosomální podjednotky RNA genu (*18S rDNA*). Schnitter a kolegové<sup>17</sup> navrhli rozdělení babesíí a thelerií do šesti monofyletických skupin na základě fylogramu vytvořeného bayesiánskou analýzou (obr. 1)<sup>17</sup>.



Obr. 1: Fylogenetické vztahy v rámci řádu Piroplasmida. Konsenzus stromu z 17 000 vzorkových stromů zhotovených bayseíánskou analýzou na základě 603 sekvencí 18S rDNA. Pro kořen stromu byl zde použit organismus *Cardiosporidium cionae*. Měřítka (0,9) udává počet substitucí v nukleotidech. Posteriorní pravděpodobnost je zobrazena nad hlavní větví. Fylogenetické zařazení *B. microti* je značeno šipkou<sup>17</sup>.

První skupina (I) je sesterskou skupinou pro všechny zástupce z řádu Piroplasmida, do kterého patří babesie kočkovitých šelem (*Babesia leo*, a *Babesia felis*) a hlodavců (*B. microti* a *Babesia rodhaini*). Předpokládá se, že tato zvířata byla prvními hostiteli babesii. Druhá skupina (II) obsahuje *Babesia duncani* (získána z lidských izolátů), *Babesia conradae*,



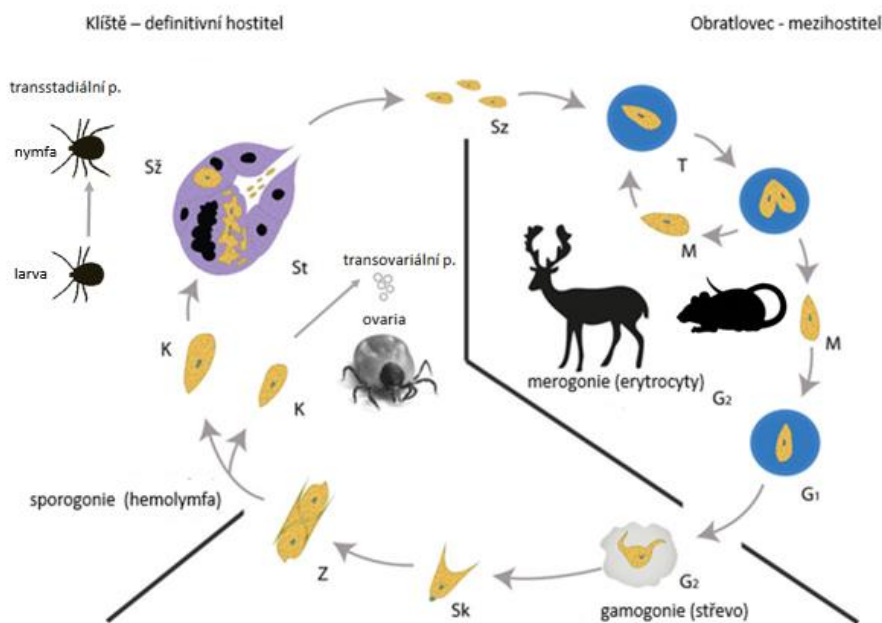
*Babesia poelae* a *Babesia lengaue*. Na základě morfologie a ultrastruktury jsou *B. duncani* a *B. conradae* nerozlišitelné od *B. microti*. Třetí skupina (III) je rozdělena do dvou větví. Do větve A (IIIA) patří *Theileria youngi*, *Theileria bicornis* a *Babesia sp.*. Ve větvi B (IIIB) se vyskytuje *Cytauxzoon spp.*. Čtvrtá skupina obsahuje *T. equi* a *Babesia bicornis*. Pátá skupina reprezentuje pravé theilerie (theilerie *sensu stricto*), kam patří *Theileria annulata*, *Theileria parva*, *Theileria buffeli*, *Theileria lestoquardi*. Poslední šestá skupina, *Babesia sensu stricto*, je tvořena babesiemi napadající karnivorní šelmy (*B. gibsoni*, *B. canis*, *Babesia rossi* a *Babesia vogeli*), kopytníky (*B. bovis*, *B. bigemina* a *B. divergens*), či hlodavce<sup>17</sup>.

### 1.1.3. Životní cyklus

Životní cyklus babesii je charakterizován střídáním hostitelů. V mezihostiteli (obratlovec) probíhá asexuální množení a v definitivním hostiteli (klíště) dochází k pohlavnímu rozmnožování<sup>3,15</sup>. Babesie jsou přenášeny výhradně klíšťaty ze skupiny *Ixodidae*. Nicméně existuje jedna výjimka, kdy byla zaznamenána přítomnost *Babesia meri* v *Ornithodoros erraticus*, což je klíště ze skupiny *Argasidae*<sup>25</sup>.

Vývojový cyklus babesii se skládá ze tří fází: sporogonie (klíště), merogonie (obratlovec) a gamogonie (klíště) (obr. 2). K přenosu babesii dochází prostřednictvím sání klíštěte na mezihostiteli. Klíště injikuje do mezihostitele sporozoity (Sz), kteří napadají jeho erythrocyty<sup>1</sup>. V nich se vyvíjí trofozoiti (T), u kterých dochází k asexuálnímu množení (binární dělení) a produkci merozoitů (M), kteří někdy mohou tvořit tetraidní formy („maltézský kříž“). Merozoiti napadají další erythrocyty a opět se množí. Po několika cyklech množení se z trofozoitů vyvinou pre-gametocyty (G1) a ty jsou pak nasávy klíštětem<sup>2,26</sup>. Ve střevě klíštěte nastává gamogonie, kdy se pre-gametocyty vyvíjí v gametocyty (G2) a ty se mění v tzv. „Strahlenkörper“ (= „ray bodies“) gamety (Sk), které následně splývají v diploidní otrněnou pohyblivou zygotu (Z)<sup>3,16</sup>. Zygota penetruje do střevních buněk a prostřednictvím meiózy se dělí na pohyblivé haploidní kinety, které se uvolní do hemolymfy a odtud napadají různé tkáně klíštěte (př. ovaria dospělé samice (= transovariální přenos), slinné žlázy), ve kterých se můžou nepohlavně rozmnožovat<sup>4</sup>. Sporogonie je zahájena až po migraci kinet do slinných žláz (Sž). Zde se mění v mnohojaderný dormantní sporoblast (St), který se aktivuje až během sání dalšího stádia klíštěte (= transstadiální přenos) na mezihostiteli. Aktivace má za následek produkci sporozoitů, kteří jsou inokulováni do obratlovce prostřednictvím slin ze slinných žláz klíštěte<sup>27</sup>.

V závislosti, jestli se jedná o „velké“, nebo „malé“ babesie (kap. 1.1.2.), rozlišujeme dva typy přenosu: transovariální („velké“ babesie) nebo transstadiální („velké“ babesie a „malé“ babesie) <sup>1,3</sup>. V případě transovariálního přenosu napadají kinety ovaria dospělých samic klíštěte a infekce je přenesena do snůšky vajíček. Vylíhnuté larvy jsou již infekční pro meziphostitele. Naproti tomu u zástupců „malých“ babesií se vyskytuje pouze transstadiální přenos, kdy dochází k přenosu patogenu z jednoho stádia klíštěte do druhého (obr. 1) <sup>17</sup>.

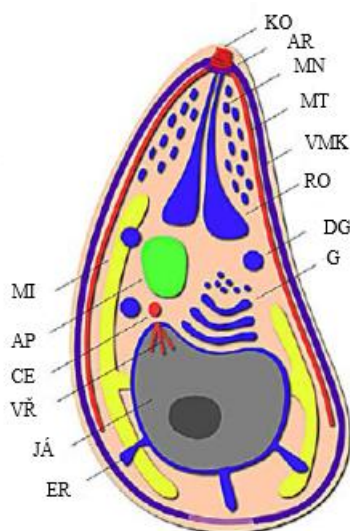


**Obr. 2: Zjednodušený životní cyklus *Babesia* spp.** Sporoziti (Sz) jsou společně se slinami klíštěte injikovány do obratlovce a invadují erythrocyty. Zde se vyvíjí v tzv. trofozoity (T), kteří se množí procesem merogonie a dávají vznik merozoitům (M) a částečně prvotním sexuálním stádiím, pre-gametocytům (G1). Během sání klíštěte se G1 dostanou do lumen klíštěcího střevo, zde dozrávají v gametocytů (G2) a poté se mění v gamety, tzv. Strahlenkörper (Sk). Splynutím gamet vzniká pohyblivá zygota (Z), která invaduje buňky střevo a meiózou se dělí na pohyblivé kinety invadující další tkáň klíštěte včetně ovarii (transovariální přenos) a slinných žláz (transstadiální přenos) (upraveno z 26).

## 1.2. Morfologie buňky

Základní infekční jednotka u zástupců z kmene Apikomplexa se nazývá zoit (obr. 3). Jedná se o unikátní buňku, která se vyskytuje u invazivních stádií <sup>28</sup>. Jeho povrch buňky, pelikula, je tvořen vnější plazmatickou membránou a vnitřním membránovým komplexem <sup>29</sup>. V přední části zoitu se nachází charakteristický útvar, tzv. apikální komplex, který slouží k přichycení a průniku do hostitelské buňky. Skládá se ze dvou komponent: skeletální a sekretorická. Skeletální část tvoří konoid, polární kruh a subpelikulární

mikrotubuly. V sekretorické oblasti se nachází mikronemy, rhoptrie a denzní granula. Tyto struktury jsou asociované s penetrací do hostitelské buňky<sup>30-32</sup>. Mikronemy umožňují pohyb a následnou vazbu na cílovou buňku. Rhoptrie upravují povrch hostitelské buňky a vytváří prostředí, ve kterém žije parazit, tzv. parazitoforní vakuola (PFV). Denzní granula obsahuje proteiny pro úpravu prostředí a povrchu PFV<sup>28,33</sup>.



Obr. 3: Schématický náčrt zoitu. AP – apikální komplex; AR – apikální prsteny; CE – centrozom; DG – denzní granula; ER – endoplazmatické retikulum; G – Golgiho aparát; JÁ – jádro; KO – konoid; MI – mitochondrie; MN – mikronema; MT – subpelikulární mikrotubuly; RO – rhoptrie; VMK – vnitřní membránový komplex; VŘ – vřetenko (upraveno z 32).

V rámci babesií můžeme nalézt pár odlišností oproti standardní morfologii buňky a chování výtrusovců. Babesie nemají konoid a PFV vzniká jen těsně po vniknutí zoitu do buňky a poté dezintegruje<sup>34,35</sup>. Zoiti se pohybují klouzavým pohybem zprostředkovaným proteiny glideosomu<sup>29</sup>. Hlavní protein Thrombospondin Related Adhesive Protein (TRAP) se nachází na povrchu zoitu, kde je sekretován z mikronem a umožňuje transmembránovou vazbu mezi receptory prostředí a myosinem uvnitř zoitu<sup>31</sup>. Avšak existuje výjimka, jako jsou theilerie, které aktivně nepenetrují do buňky jako babesie, ale vstupují do buňky metodou zvanou „zazipování“<sup>36</sup>.

Dalším charakteristickým znakem apikomplex je apikoplast, nefotosyntetizující plastid<sup>37</sup>. Pravděpodobně vznikl sekundární endosymbiózou výtrusovce a fotosyntetizující červené řasy. Tento plastid má genom o velikosti 35kb, obsahuje 4 membrány a jeho význam spočívá v syntéze mastných kyselin a isoprenoidů<sup>38</sup>.

## 1.3. Ekologie babesií

### 1.3.1. Klíště jako přirozený vektor

Klíšťata jsou významní krev-sající parazité, jejichž nebezpečí tkví ve schopnosti přenášet široké spektrum patogenů. Mezi nejvýznamnější klíšťaty přenášená onemocnění patří klíšťová encefalitida, lymfská borelióza, babezióza, theilerióza a anaplazmóza<sup>16</sup>. Existuje přes 900 druhů klíšťat, které se řadí do kmene Arthropoda, podkmene Chelicerata, třídy Arachnida, řádu Acari/Acarina, podřádu Ixodida a v rámci podřádu do dvou velkých skupin *Ixodidae* („hard ticks“), *Argasidae* („soft ticks“) a jedné malé skupiny *Nuttalliellidae*<sup>39</sup>.

Klíšťata mají tělo rozdělené do dvou částí: přední část (gnathostoma) a zadní část (idiosoma). V přední části se nachází specializovaný orgán, hypostom, který slouží k proniknutí pokožkou a k sání krve hostitele. Na povrchu hypostomu je přítomno několik řad zahnutých zoubků, které pomáhají klíštěti udržet se na hostiteli během sání. Povrch těla mají krytý kutikulou, u skupiny *Ixodidae* je navíc tvrdý hřbetní štítek (scutum). U mnoha rodů se vyskytují po stranách hřbetu oči (např. *Dermacentor*, *Hyalomma*), avšak u několika rodů chybí (*Ixodes*, *Haemaphysalis*)<sup>40</sup>. V zadní části těla se nalézají končetiny. Larvální stádium má 6 nohou, zatímco nymfa a dospělec mají 8 nohou. Nenasátí dospělci *I. ricinus* dosahují velikosti okolo 3mm a plně nasáté samice velikosti až 11mm<sup>41</sup>.

Vývoj klíšťat začíná oplozeným vajíčkem, ze kterého se vyvíjí larva, která hledá svého hostitele. Po dokončení sání se mění v nymfu, která opět musí najít svého hostitele. Po nasátí se převléká do dospělého. Po kopulaci samice se samcem dochází k tvorbě vajíček a cyklus se uzavírá. U některých rodů (např. *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*) samec nesaje krev, ale slouží pouze k distribuci pohlavních buněk do samice. Podle počtu střídání hostitelů v životním cyklu rozlišujeme cykly na jedno-hostitelské (*Boophilus*), kde celý vývoj probíhá pouze na jednom hostiteli. V dvou-hostitelském (*Rhipicephalus*) cyklu probíhá nejprve sání larvy a následné nymfy na jednom hostiteli, po kterém se nasátá nymfa převleče do dospělého a ten vyhledává nového hostitele. V troj-hostitelském (např. *Ixodes scapularis*, *I. ricinus*) cyklu potřebuje klíště k dokončení svého vývoje najít tři různé hostitele<sup>39,42</sup>.

Klíšťata se běžně vyskytují ve vegetaci, kde čekají na svého hostitele a za pomoci Hallerova orgánu, který se nachází na tarzálním článku předních nohou, vnímají různou koncentraci CO<sub>2</sub>, teplotu a další chemické sloučeniny. Při kontaktu s hostitelskou kůží nedochází k okamžitému přisátí. Pomocí specializovaných smyslových orgánů na palpách probíhá lokalizace nejvhodnějšího místa pro sání krve<sup>40</sup>.

### 1.3.1.1 Imunita klíšťat

Klíšťata mají imunitu podobně jako ostatní bezobratlí založenou na humorální a buněčné odpovědi, která je však u všech bezobratlých nespecifická (na rozdíl od obratlovců) <sup>43</sup>. Ve střevě *Argasidae* klíšťat se vyskytují dva komponenty, které účinkují proti mikroorganismům, lysozymy <sup>44</sup> a defenziny <sup>45</sup> prostřednictvím narušení peptidoglykanu buněčných stěn bakterií <sup>46</sup>. Defenziny se nacházejí i u *Ixodidae* klíšťat, nicméně ještě nebyla uspokojivě vysvětlena jejich funkce ani působení na přenášené patogeny <sup>47</sup>. Klíště *Haemophysalis longicornis* exprimuje ve střevě defenzinu podobnou látce pojmenované longicin účinný proti řadě patogenů včetně různých druhů babesii <sup>48</sup>. Důležitou roli v klíštěcí imunitě hraje střevní mikroflóra, která ovlivňuje stav redoxní homeostázy, a tedy může ovlivnit úspěšnost vývoje parazita v klíštěti. Toto naznačuje i prokázaný vliv střevní mikroflóry a změn redoxní homeostázy na vývoj plasmodia uvnitř střeva komára *Anopheles gambiae* <sup>17</sup>. Zatím však není mnoho známo o udržení rovnováhy v redoxní homeostázi klíšťat a případném vlivu na patogeny uvnitř střeva <sup>16</sup>.

Velice dobře byla prostudována imunita v hemolymfě klíštěte. Mikroorganismy jsou likvidovány fagocytózou klíštěcími hemocyty. Fagocytóza je vyvolána humorální imunitou a dochází k produkci reaktivních forem kyslíku a komplementu podobným látkám <sup>49</sup>. V hemolymfě se také vyskytují defenziny, či defenzinům podobné látky, které účinkují proti bakteriím, avšak stále se uspokojivě neví, jaký mají účinek vůči dalším klíšťaty přenášeným patogenům <sup>16</sup>.

V hemolymfě se také vyskytují lektiny, což jsou glykoproteiny schopné selektivně rozpoznávat a vázat se na glykosylované složky nejen cizích, ale i tělu vlastních molekul <sup>43</sup>. Tyto proteiny jsou součástí přirozené imunity obratlovců i bezobratlých <sup>50</sup>. Hlavními lektiny u klíšťat jsou fibrinogenu podobné proteiny (FREPs) <sup>16</sup>. První FREP protein byl charakterizován v měkkém klíštěti *Ornithodoros moubata* a pojmenován jako Dorin M <sup>51</sup>. U klíštěte *I. ricinus* byly též identifikovány FREP proteiny a nazvány jako Ixoderiny <sup>43</sup>. Předpokládá se, že aspoň některé FREP proteiny se účastní aktivace komplementu v klíštěti.

Dalšími látkami nacházejícími se v hemolymfě klíšťat jsou thioester obsahující proteiny (TEP) <sup>49</sup>, které můžeme nalézt jak u obratlovců, tak bezobratlých <sup>52</sup>. TEP proteiny se podílí na likvidaci bakterií, avšak role TEP proteinů v přenosu dalších klíšťaty přenášených patogenů není dosud však dostatečně vysvětlená <sup>16</sup>.

Ve slinných žlázách, zásadním místem pro přenos patogenů z klíštěte do hostitele prostřednictvím slin, se exprimuje spousta antimikrobiálních proteinů (např. defenziny, lysozymy), nicméně nebylo zatím prokázáno, zdali působí na patogeny<sup>53</sup>. Existuje však jedna výjimka, u které byl prokázán účinek proti bakteriím a to v *I. scapularis*<sup>54</sup>.

#### 1.3.1.2. Interakce klíště – babesie

Byl prokázán negativní efekt babesií na fitness klíštěte, a proto se předpokládá, že si klíšťata vyvinula obranný mechanismus pro kontrolu a regulaci babesiové infekce<sup>55</sup>. Dosud však tato oblast není dostatečně probádána a je známo jen pár proteinů, které účinkují proti babesiím. Longicin, defenzinu podobný protein, výrazně snižuje parazitěmii u myší napadených *B. microti*<sup>48</sup>. „Vypnutím“ longicinu pomocí RNA interference se u *H. longicornis* zvýšil počet *B. gibsoni* ve střevě a v ovariích. Zdá se, že tedy longicin má důležitou roli v regulaci přenosu ve klíštěcím vektoru<sup>56</sup>. Longipain je protein (exprimovaný u *H. longicornis*) inhibující růst *B. bovis* v kultuře<sup>57</sup>. Dalšími účinnými proteiny vůči *B. bigemina* u *R. annulatus* a *R. microplus* se ukázaly být klíštěcí receptory lipoproteinu A (TROSPA), které prokazatelně snížily počty parazitů v klíštěti<sup>58</sup>. Podobný účinek vůči *B. bigemina* u *R. microplus* měl i další klíštěcí protein, subolesin<sup>59</sup>. Dalším zajímavým anti-babesiovým proteinem je vitellogenin, který byl testován u psů napadených *B. gibsoni* patřící do „velkých“ babesií (kap. 1.1.2.). Tento gen slouží jako zdroj aminokyselin během embryogeneze u *H. longicornis* a je esenciální pro vývoj vajíček<sup>60</sup>. Jeho „vypnutím“ bylo zjištěno, že se do vajíček nepřenesly *B. gibsoni*, zdá se tedy, že by vitellogenin mohl přerušit přirozenou distribuci (transovariální přenos) *B. gibsoni* v klíštěti<sup>16</sup>.

Tab.I: Seznam klíšťat, u kterých byl prokázán přenos babesií.

Klíště	Výskyt	Etiologický agens
<i>Ixodes ricinus</i>	Evropa	<i>Babesia microti</i> <i>Babesia divergens</i> <i>Babesia venatorum</i>
<i>Ixodes persulcatus</i>	Evropa, Asie	<i>Babesia microti</i> <i>Babesia venatorum</i>
<i>Ixodes pacificus</i>	Západní pobřeží USA	<i>Babesia duncani</i>
<i>Ixodes scapularis</i>	Východní pobřeží a středozápad USA	<i>Babesia microti</i> <i>Babesia divergens</i>
<i>Ixodes trianguliceps</i>	Evropa	<i>Babesia microti</i>
<i>Ixodes ovatus</i>	Asie	<i>Babesia ovata</i> <i>Babesia microti</i>
<i>Dermacentor reticulatus</i>	Evropa	<i>Babesia canis</i> <i>Babesia microti</i>
<i>Dermacentor nitens</i>	Subtropické a tropické oblasti světa	<i>Babesia caballi</i>
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Subtropické a tropické oblasti světa	<i>Babesia vogeli</i>
<i>Rhipicephalus bursa</i>	Jižní Evropa, střední Asie	<i>Babesia ovis</i>
<i>Rhipicephalus simus</i>	Afrika	<i>Babesia microti</i>
<i>Boophilus (Rhipicephalus) annulatus</i>	Subtropické a tropické oblasti světa	<i>Babesia bigemina</i> <i>Babesia bovis</i>
<i>Boophilus (Rhipicephalus) microplus</i>	Subtropické a tropické oblasti světa	<i>Babesia bigemina</i> <i>Babesia bovis</i>
<i>Haemaphysalis punctata</i>	Evropa, Asie	<i>Babesia major</i> <i>Babesia. bigemina</i> <i>Babesia motasi</i>
<i>Haemaphysalis leachi</i>	Afrika	<i>Babesia rossi</i>
<i>Haemaphysalis longicornis,</i>	Asie	<i>Babesia gibsoni</i> <i>Babesia ovata</i>
<i>Hyalomma marginatum</i>	Evropa, Asie, Maroko	<i>Babesia occultans</i>
<i>Amblyomma americanum</i>	Západní část USA	<i>Babesia microti</i>

Reference: <sup>1,17,40,61-68</sup>.

## 1.3.2. Babezióza

### 1.3.2.1. Lidská babezióza

Lidská babezióza je považována za celosvětově emergentní onemocnění <sup>4</sup>, které v mnoha případech končí smrtí pacienta. Za nejčastější původce této choroby se považují 4 zástupci: *B. divergens* a její blízké příbuzná *B. venatorum* (dříve označená jako EU1) <sup>69</sup>, *B. microti* a jí podobná *B. duncani* <sup>26,70</sup>. Přenašeči těchto babesii jsou sumarizováni v tab. I (kap. 1.3.1.).

V Evropě bylo zaznamenáno přibližně 50 případů lidské babeziózy. Většina z nich byla způsobena *B. divergens* a některé *B. venatorum* <sup>2,71</sup>. Byl zde popsán i první autochtonní případ způsobený *B. microti* <sup>5</sup>. Nejvíce infekcí bylo nahlášeno z Francie a Velké Británie <sup>26</sup>. Byly potvrzené nákazy i v jiných evropských státech jako je např. Česká republika <sup>72</sup>, Finsko <sup>73</sup>, Polsko <sup>74</sup>, Itálie <sup>69</sup>, Švýcarsko <sup>75</sup>, Norsko <sup>76</sup> a další země. Daleko více případů je však v Severní Americe, na území USA, kde původci tohoto onemocnění jsou *B. microti* (severovýchodní oblast Atlantiku a ve státech Wisconsin a Minnesota) a *B. duncani* (severozápadní oblast Pacifiku) <sup>2,15</sup>. Byl popsán pacient nakažený *B. divergens* ve státě Kentucky <sup>77</sup>. V posledních letech se objevují případy lidské babeziózy (*B. divergens*, *B. microti*, *B. venatorum*) i v Asii <sup>9,78</sup>, stejně tak i v Africe <sup>79</sup>, v Jižní Americe <sup>12</sup> nebo Austrálii <sup>13</sup>.

Onemocnění se může projevit velmi rozličně, od asymptomatického průběhu infekce po manifestaci závažných příznaků podobných malárii, avšak bez typických hořečnatých periodicit <sup>3,80</sup>. Důležitým faktorem určujícím závažnost příznaků je stáří a zdravotní stav pacienta. Onemocnění způsobené *B. divergens* se projevuje po 1-4 týdnech od přísátí klíštěte vysokými horečkami (40-41°C), zimnicí, bolestmi hlavy, nechutenstvím, myalgií a hemoglobinurií. Při vysoké parazitémii se mohou symptomy zhoršit a následně vlivem rozsáhlé hemolýzy erytrocytů dochází k vývoji žloutenky, zvracení a průjmům <sup>2</sup>. U lidí s poškozenou imunitou (po splenektomii, HIV aj.), může tato choroba vést ke smrti pacienta na selhání důležitých orgánů <sup>26</sup>. Mortalita způsobená *B. divergens* dosahuje až 42 % <sup>27</sup>. U imunokompetentních lidí napadených *B. microti* se nemoc ve většině případů projevuje asymptomaticky, popřípadě příznaky připomínající chřipku <sup>81</sup>. Naopak u imunodeficientních pacientů se objevují vážnější symptomy (vysoké horečky, hemoglobinurie atd.), podobné jako u *B. divergens*, které mohou skončit smrtí pacienta <sup>78</sup>.



V přenosu lidské babeziózy hraje vedle klasické nákazy přes klíšřata značnou roli i přenos krevní transfuzí<sup>82</sup>. Bylo zaznamenáno více než 170 případů infekce *B. microti*, z toho mezi obdobími 2005-2008 skončilo 12 případů úmrtím pacienta<sup>2,83</sup>. Byl potvrzen i kongenitální přenos z matky na plod<sup>84</sup>. Prozatím nebyla nalezena žádná účinná vakcína proti lidské babezióze<sup>78</sup>.

## Léčba

K léčbě lidské babeziózy se využívá antibiotik a antimalarik klindamycinu, atovaquonu, azithromycinu, quininu, či kvůli objevující se resistenci jejich různé kombinace<sup>71</sup>. U asymptomatických případů se podává kombinace atovaquonu s azitromycinem po dobu jednoho týdne. Pacientům s mírnými příznaky se předepisuje opět tato kombinace, nebo kombinace klindamycinu s quininem<sup>26</sup>. Obě možnosti mají podobnou léčivou efektivitu proti babesii<sup>2</sup>. U závažných případů (imunokompetentních pacientů) se používá klindamycin s quininem, kde quinín může být nahrazen méně toxickým derivátem – quinidenem<sup>85</sup>. U případů, které má na svědomí *B. divergens* se doporučuje částečná, nebo kompletní krevní transfuze<sup>1</sup>.

### 1.3.2.2. Zvířecí babezióza

Babesie jsou významným veterinárním agens se širokým hostitelským spektrem. Napadají volně žijící (hlodavce, šelmy), domácí (psi), či hospodářsky významná zvířata (dobytek). Onemocnění se může projevit asymptomaticky, nebo mít závažný průběh, který v některých případech končí smrtí napadeného jedince<sup>17</sup>.

Bovinní babezióza je způsobena *B. bovis*, *B. bigemina* a *B. divergens*, příležitostně *B. major*, *B. ovata*, *B. occultans* (přenašeči tab. I – kap 1.3.1.). První dvě zmíněné působí škody především v subtropickém a tropickém pásu, kdežto *B. divergens* můžeme nalézt v severozápadní části Evropy – hlavně ve Francii a Velké Británii<sup>86</sup>. Mezi typické příznaky boviní babeziózy patří horečka, letargie, anémie, anorexie, tachykardie, hemoglobinurie a ikterus. *B. bovis* způsobuje ještě navíc tzv. cerebrální babeziózu, kdy se parazit nachází v kapilárách mozku a způsobuje hyperestezii či paralýzu<sup>87</sup>. Neléčené případy mohou dosahovat až 50% mortality<sup>88</sup>. Bylo zjištěno, že k nákaze jsou náchylnější dospělci, naopak mláďata do jednoho roku jsou více resistantní<sup>89</sup>. V léčbě se používá dimiazin a imidokarb. Nicméně tyto dvě léčiva zůstávají dlouho přítomna v masu a mléce, a proto se od nich v některých evropských zemích odstoupilo<sup>90</sup>. Proto se více využívá vakcinace pomocí atenuovaného kmene *B. bovis* a *B. bigemina*, kdy nejlepších výsledků dosahuje očkování

mladých jedinců starých 3-9 měsíců <sup>87</sup>. Bylo úspěšně provedeno i experimentální očkování proti *B. divergens*, nicméně dosud se běžně nevyužívá <sup>91</sup>.

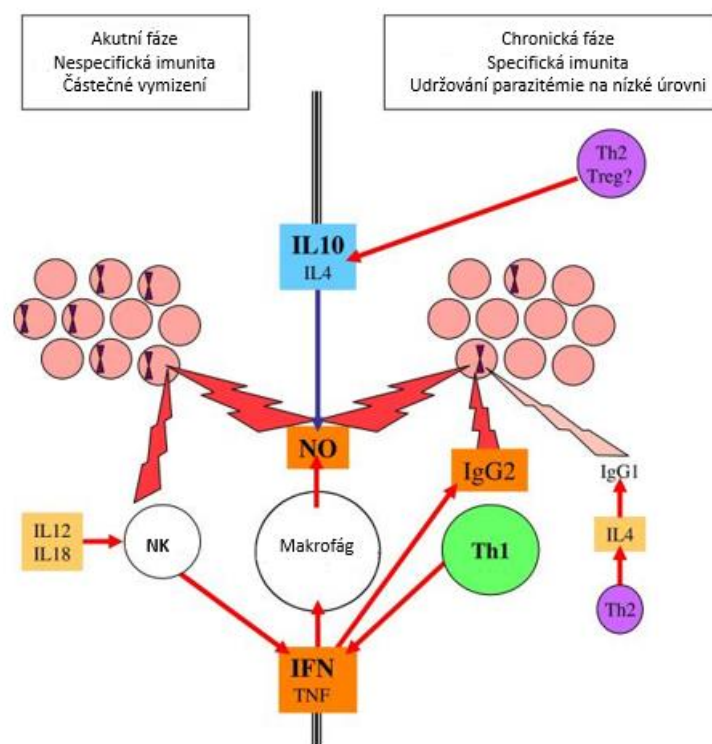
Původci psí babeziózy jsou *B. vogeli* (subtropické a tropické oblasti světa), *B. gibsoni* (Asie), *B. canis* (Evropa) a *B. rossi* (Afrika) <sup>62</sup>. Jejich přenašeči jsou sumarizováni v tab. I (kap. 1.3.1). Postižení psi trpí horečkami, anémií, splenomegalií, trombocytopenií a ikterem <sup>92</sup>. Onemocnění se může komplikovat přítomností netypických příznaků, které se projevují neurologickými poruchami (strnulost, oční poruchy, kóma), plicním edémem, akutním selháním rektu <sup>93</sup>. Při neléčeném stavu nemoc přechází do chronické fáze, kdy se může, ale i nemusí projevit při stresu, či oslabení organismu. V tomto případě psi mohou posloužit jako přenašeči, kdy při vzájemném souboji může dojít k přenosu skrze krevní oděrky <sup>62</sup>. Závažnější průběh onemocnění je u štěňat než u dospělých psů <sup>62,88</sup>. V léčbě psů se využívá imidokarb, dimiazin, nebo kombinace atovaquonu a azithromycinu <sup>94,95</sup>. Nicméně současná chemoterapie není schopná úplně eliminovat parazity, a proto může dojít v budoucnu k relapsu onemocnění. Jednou z možností prevence vůči psí babezióze je použití vakcíny. Bohužel však neposkytuje kompletní ochranu <sup>88,93</sup>.

Babesióza koní je způsobena *B. caballi* (přenašeč tab. I – kap. 3.1.3), která se vyskytuje jak v subtropickém, tak i v tropickém a mírném pásu <sup>63</sup>. Onemocnění se projevuje u každého koně s rozličnou závažností. Typickým příznakem pro všechny je hemolytická anémie. U některých koní však došlo i ke spontánnímu vyléčení <sup>96</sup>. V léčbě se využívá imidokarb <sup>88</sup>.

## 1.4. Imunitní reakce

Imunitní mechanismus obrany hostitele proti babesii byl dobře prostudován na *B. bovis* (obr. 4) <sup>86</sup>. V boji proti babezióze se uplatňuje jak buněčná, tak i humorální imunita, která cílí na infikované erythrocyty nebo proti volným merozoitům (merozoiti, kteří se nepohlavně rozmnožili v erythrocytu, následně ho opustili a teď hledají nové erythrocyty k napadení) <sup>86</sup>. Imunitní odpověď vede ke tvorbě degenerativního intracelulárního stádia babesii tzv. „crisis form“ <sup>3,97</sup>, které má na svědomí spíše buněčná než humorální imunita <sup>98</sup>. Během akutní fáze infekce u *B. bovis* je aktivována nespecifická imunitní odpověď prostřednictvím makrofágů a produkce interleukinu-12 (IL-12) a interleukinu-18 (IL-18), kteří stimulují aktivaci „přirozených zabíječů“ (NK buněk). NK buňky produkují interferon gamma (IFN $\gamma$ ), který poté vede k produkci oxidu dusnatého (NO) makrofágy s ničivými účinky pro parazita <sup>99,100</sup>. V chronické fázi dochází k opsonizaci infikovaných erythrocytů a následně k

jejich lýze pomocí NO produkovaného makrofágy, kteří jsou aktivováni prostřednictvím IFN $\gamma$  a faktoru nekrotizující nádory (TNF- $\alpha$ )<sup>101</sup>. V tomto procesu se zapojuje i specifická imunita, kdy prostřednictvím Th0 nebo Th1 lymfocytů se aktivuje produkce imunoglobulinu G (IgG). Humorální imunita vyvolává odpověď v podobě tvorby protilátek a aktivace komplementu prostřednictvím IgG1 a IgG2<sup>102</sup>. Také zabraňuje adhezenci merozoitů na erythrocyty (tím i samotný průnik) a také se aktivuje buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC)<sup>86,101</sup>. Avšak humorální imunita se nepodílí na přímé likvidaci napadených buněk, spíše pomáhá udržovat nízkou hladinu parazitémie<sup>101</sup>.



Obr 4: **Mechanismus imunitní odpovědi a její regulace u obratlovce napadené *B. bovis*.** Hlavní účinnou složkou v boji proti infikovaným erythrocytům je sekrece NO (oxidu dusnatého) makrofágy, kteří jsou aktivováni IFN $\gamma$ . Během akutní fáze je vyvolána nespecifická imunita prostřednictvím zánětlivých procesů a cytokiny typu 1. Tento proces vede k částečné eliminaci parazitů v napadených erythrocytech. Během chronické fáze je udržována nízká hladina parazitémie výskytem Th1 buněk a protilátek. Th2 buňky sekretují IL-4 a IL-10, který inhibuje aktivaci makrofágů (upraveno z 86).

## 1.5. Diagnostika a kultivace babesií

Pro správnou diagnostiku babesií je potřeba znát anamnézu pacienta, jako například cestovatelskou minulost, zdali pobýval v nějaké endemické oblasti, či měl na sobě klíště, také jestli prodělal krevní transfuzi nebo je po splenektomii. Po obeznámení všech těchto informací se zvolí vhodná detekční metoda <sup>2</sup>.

### Přímá detekce

Do přímé detekce patří detekování babesií pomocí krevních roztěrů a polymerázové řetězové reakce (PCR) <sup>4</sup>. Mikroskopické pozorování je nejčastější vyšetření, kdy se pacientům vykazujícím příznaky babeziózy udělá krevní roztěr obarvený Giemsa barvením <sup>3</sup>. Při pozitivním nálezu jsou uvnitř erytrocytů patrné krevní stádia babesií (kap. 1.1.3). Trofozoiti mají většinou prstencový, někdy až hruškovitý tvar a modro/růžovou cytoplazmu. Prstencové útvary můžeme nalézt i u plasmodií (*Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* – původce malárie), což představuje komplikaci pro správnou diagnózu <sup>26</sup>. Rozlišujícími znaky mohou být absence pigmentu (hemozoinu) v erytrocytu, či tvorba tetrády nebo absence banánovitých gametocytů (*P. falciparum*) <sup>1</sup>. Babesie mohou mít různou velikost ~1µm-5µm, nicméně je prakticky nemožné je od sebe na základě morfologie rozeznat <sup>78</sup>. Při nízké hladině parazitémie se navíc nemusí podařit detekovat parazita v krevním roztěru <sup>26</sup>.

Daleko citlivější metodou je PCR, která nám nejen prokáže přítomnost babesií, ale určí i konkrétní druh babesie. PCR je navržena většinou na amplifikaci malé ribozomální podjednotky (18S rDNA) <sup>78</sup>. Výsledky z PCR mohou být potvrzeny osekvenováním PCR produktu, či kultivací pacientovi krve, případně injekcí přímo do laboratorních zvířat (např. myš, křeček) <sup>2</sup>. Nadstavbou PCR detekce je sensitivnější dvoukolová nested PCR, kdy se produkt z prvního kola PCR využije jako templát pro druhé kolo PCR <sup>103</sup>. Další molekulární metody, které se využívají pro testování babesií jsou DNA próby, reverzní hybridizace (RLB hybridizace), kvantitativní PCR (RT-PCR/qPCR) a izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou (LAMP-PCR) <sup>22,78</sup>. Zmíněné metody se uplatňují hlavně při diagnostice zvířecích babesií (např. *B. bigemina*, *B. bovis*, *B. canis*) <sup>26</sup>.

### Nepřímá detekce

V nepřímé detekci se ke stanovení přítomnosti babesií využívá metoda nepřímé imunofluorescence (IFAT - Indirect Immunofluorescence Antibody Test) <sup>26</sup>.

Tato metoda se využívá v lidské medicíně a slouží k detekci protilátek IgG a IgM proti *B. microti*<sup>1</sup>. IgG protilátky se mohou vyskytovat jak při chronické, tak i při akutní nákaze. Detekce IgM značí akutní fázi infekce, nicméně jsou však méně specifické než IgG protilátky, které nastupují o něco později<sup>3</sup>. Nepřímá imunofluorescence je užitečná zejména jako podpůrný test při chronické nákaze, kdy je již brán za pozitivní výsledek IgG titr, který má větší hodnotu než 1:64. Protilátky mohou být přítomné až 12 měsíců po vymizení parazita. Během akutní fáze IgG titry obvykle překračují hodnotu 1:1024<sup>78,85</sup>. Tato metoda není vhodná u závažných případů způsobených *B. divergens*, jelikož jsou specifické protilátky detekovatelné až po prvním týdnu od infekce, v té době však může pacient trpět vážnými příznaky<sup>26</sup>.

Byly pozorovány falešně pozitivní výsledky u pacientů trpících systémovým lupusem erythematodes, nebo revmatoidní artritidou<sup>3</sup>. Též byly popsány případy zkřížené reaktivity *B. venatorum* s antigeny *B. divergens*. Nicméně antigeny vůči *B. microti* nebo *B. duncani* nevykazovaly zkříženou reaktivitu s ostatními antigeny *Babesia* spp.<sup>1</sup>. Také byla prokázána nespecifická zkřížená reaktivita protilátek s babesiovými proteiny u zástupců blízké příbuzných k babesiím (*Plasmodium* spp., *Toxoplasma*)<sup>26</sup>. Vzhledem k těmto problémům je potřeba zaručit spolehlivě diagnostickou a epidemiologickou věrohodnost těchto testů prostřednictvím vhodně zvolené hraniční hodnoty (tzv „cut-off“) titrů<sup>26</sup>.

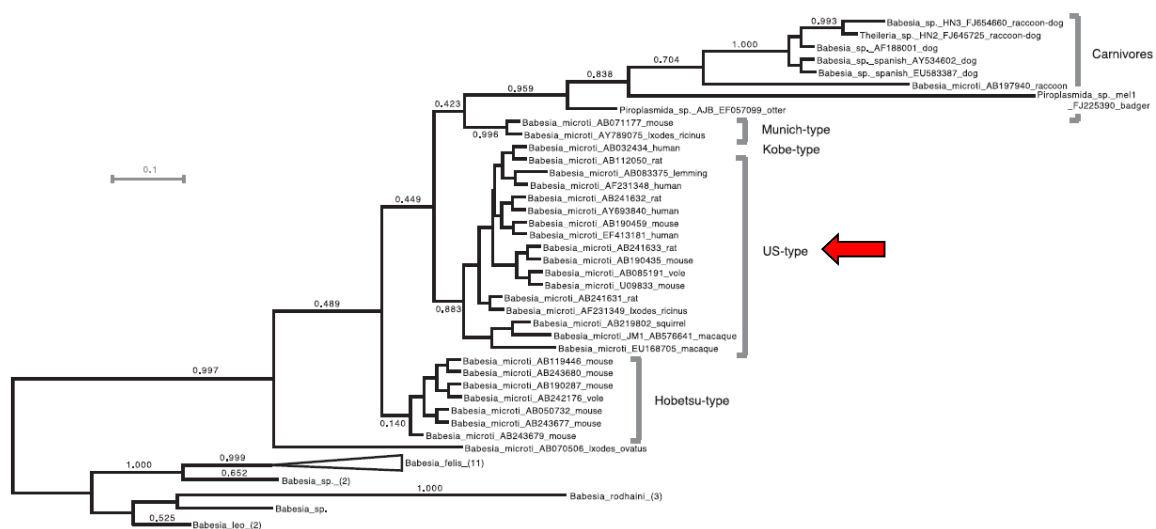
## 1.6. *Babesia microti*

*B. microti* je nevýznamnějším původcem lidské babeziózy, která však, na rozdíl od *B. divergens*, není tak smrtelná, mortalita zde dosahuje okolo 10% (*B. divergens* 42%)<sup>27,78</sup>. Nejvíce případů bylo zaznamenáno na území USA, kde byla hlášena již v 18 státech<sup>78</sup>. Ve státě New Jersey bylo potvrzeno mezi lety 1993-2001 pouze 8 případů způsobených tímto patogenem, nicméně v následujících letech 2006-2011 se tento počet zvětšil na 568 případů<sup>104</sup>. V Severní Americe je *B. microti* přenášena *I. scapularis*. Byl potvrzen výskyt tohoto parazita i v Evropě, kde je přenášena *I. ricinus*<sup>1</sup>. Vektorem také může být *I. trianguliceps*, *D. reticulatus* a *I. persulcatus*<sup>68,105,106</sup>. V Asii je pak přenášena *I. persulcatus*, *I. ovatus*<sup>78</sup>. Nalézt ji můžeme i v ostatních částech světa – Afrika<sup>66</sup>, Austrálie<sup>13</sup>. Výjimkou nejsou i různé koinfekce *B. microti* s jiným patogenem. V Číně bylo zaznamenáno několik případů koinfekce s *Plasmodium* spp.<sup>107</sup>, v USA byly případy koinfekce s *Borrelia burgdorferi*<sup>108</sup> nebo v Evropě s *Borrelia* spp.<sup>74</sup>. Velkým nebezpečím může být její skrytý

přenos skrze krevní transfuzi <sup>2</sup> a také již byl hlášen kongenitální přenos z matky na plod prostřednictvím placenty <sup>84</sup>. Toto bylo i experimentálně ověřeno u BALB/c myši <sup>109</sup>

Jako rezervoár *B. microti* slouží hlodavci, v USA zejména křeček bělonohý (*Peromyscus leucopus*), v Evropě norník rudý (*Myodes glareolus*), avšak byla nalezena i v jiných zvířatech (např. rejsci, veverky, norci), kteří se vyskytují po celém světě. Prostřednictvím sání klíšťat na těchto hostitelích je pak *B. microti* udržována v přírodě <sup>3,15,110,111</sup>. Byla zdokumentována i infekce *B. microti* v ptácích, na kterých sály larvy klíšťat. Ptáci tedy mohou sloužit též jako rezervoár <sup>112</sup>.

Na základě chaperonin-obsahující t-komplex polypeptide 1 (CCT7) genu z různých *B. microti* izolátů byla *B. microti* rozdělena do 4 skupin: US, Munich, Kobe a Hobetsu <sup>113</sup>. Podporujícím faktorem pro toto uskupení byla i různá velikost intronů v CCT7 genu mezi izoláty <sup>113</sup>. Toto rozdělení bylo potvrzeno ve studii od Schnittger a kolegů <sup>17</sup>, kteří pomocí 18S rDNA genu zhotovili vlastní fylogram, nicméně ve skupině Kobe vykazoval slabou podporu větve, navíc se ještě vyskytla jedna parafyletická skupina zahrnující *Babesia* sp. nalezené v karnivorních hostitelích (obr. 5) <sup>17</sup>. Navíc izoláty patřící do US skupiny jsou vysoce variabilní a pocházely z různých kontinentů – Severní Amerika, Evropa a Asie <sup>17,113</sup>. Vzorky z Kobe a Hobetsu skupiny byly vyizolovány na území státu Japonska, kde Hobetsu skupina je velmi častá, zatímco Kobe skupina se vyskytuje jen v určitých oblastech (ostrovy Honshu, Mikura a Awaji). Munich skupina izolátů je endemická pro Evropu (Polsko, Německo, Velká Británie) <sup>113</sup>.



**Obr. 4: Fylogenetické vztahy v rámci druhu *B. microti*.** Měřítko (0,1) udává počet substitucí v nukleotidech. Posteriorní pravděpodobnost je zobrazena nad větvemi. Každá sekvence má svoje databázové číslo a zaznamenaného hostitele. Outgroup sekvence byly sloučeny podle jednotlivých druhů s číslem v závorce (označuje počet sdružených sekvencí). Kmen Peabody užívaný naší laborkou patří do US skupiny (šipka) <sup>114</sup>. Fylogram byl zhotoven bayesiánskou analýzou <sup>17</sup>.

*B. microti* patří mezi „malé“ babesie, které se vyznačují pouze transstadiálním přenosem <sup>105</sup>, transovariální přenos dosud nebyl prokázán <sup>115</sup>. V erythrocytech obratlovců se vyskytují všechna životní stádia, nicméně výskyt tetraidní formy – maltézský kříž není tak častý jako u jiných druhů babesii (např. *B. divergens*) <sup>3</sup>.

První studie týkající se *B. microti* se snažily charakterizovat tohoto parazita, pomocí infekcí různých laboratorních zvířat. Úspěšně se podařilo nakazit myš (*Mus musculus*) <sup>116</sup>, makaka rhesus (*Macaca mulatta*) <sup>117</sup>, pískomila (*Meriones unguiculatus*) <sup>118</sup>, křečka zlatého (*Mesocricetus auratus*) <sup>119</sup>, křečička čínského (*Cricetulus griseus*) a křečička džungarského (*Phodopus sungorus*) <sup>120</sup>. Další práce se zaměřovaly na přenos *B. microti* různými klíšťaty (*I. scapularis*, *I. ricinus*, *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *H. punctata*, *R. sanguineus*, *Ixodes hexagonus* a *I. trianguliceps*) <sup>115,118,121-123</sup> a také na popsání různých vývojových stádií (sporozoit, trofozoit, merozoit, gametocyt) <sup>119,124-126</sup>. Byla sledována i imunitní reakce hostitele na infekci *B. microti* <sup>65,127-131</sup>. Po charakterizaci *B. microti* bylo potřeba zavést účinnou detekční metodu, nejprve se využívala nepřímá imunofluorescence <sup>132</sup>, postupem času se vyvinuly další diagnostické metody (např. PCR a její různé modifikace, DNA próby, reverzní hybridizace – kap. 1.5.) <sup>78,133-135</sup>. Jako velice sensitivní metoda se ukázala „droplet digital PCR“, která je schopná zachytit ~10 genových kopií <sup>136</sup>. V současné době je velmi žádoucí výzkum *B. microti*, který směřuje k zavedení účinné a levné diagnostické metody, což

by se využívalo k detekci *B. microti* u krevních dárců a rovněž i k testování vlivu imunitních genů klíštěte na přenos *B. microti* včetně nalezení účinné vakcíny<sup>16,137</sup>.



## 2. Cíle

- 1) Sledovat průběh a intenzitu infekce *Babesia microti* v laboratorních BALB/c myších
- 2) Zavést molekulární detekci *B. microti*
- 3) Zavedení a optimalizace přenosového modelu *B. microti*
- 4) Lokalizovat vývojová stadia *B. microti* v nymfách klíštěte *I. ricinus*
- 5) Zmapovat přenos *B. microti* do laboratorní myši během sání nymf klíštěte *I. ricinus*

### 3. Materiál a metody

Následující pasáž o rozsahu devíti stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

## 4. Výsledky

Následující pasáž o rozsahu sedmi stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

## 5. Diskuze

Následující pasáž o rozsahu šesti stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

## 6. Závěr

Následující pasáž o rozsahu jedné strany obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

## 7. Reference

- 1 Hunfeld, K. P., Hildebrandt, A. & Gray, J. S. Babesiosis: recent insights into an ancient disease. *Int J Parasitol* **38**, 1219-1237, doi:10.1016/j.ijpara.2008.03.001 (2008).
- 2 Vannier, E. G., Diuk-Wasser, M. A., Ben Mamoun, C. & Krause, P. J. Babesiosis. *Infect Dis Clin North Am* **29**, 357-370, doi:10.1016/j.idc.2015.02.008 (2015).
- 3 Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S. R., Krause, P. J. & Persing, D. H. Babesiosis. *Clin Microbiol Rev* **13**, 451-469 (2000).
- 4 Kjemtrup, A. M. & Conrad, P. A. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *Int J Parasitol* **30**, 1323-1337 (2000).
- 5 Hildebrandt, A. *et al.* First confirmed autochthonous case of human *Babesia microti* infection in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **26**, 595-601, doi:10.1007/s10096-007-0333-1 (2007).
- 6 Martinot, M. *et al.* Babesiosis in immunocompetent patients, Europe. *Emerg Infect Dis* **17**, 114-116, doi:10.3201/eid1701.100737 (2011).
- 7 El-Bahnasawy, M. M. & Morsy, T. A. Egyptian human babesiosis and general review. *J Egypt Soc Parasitol* **38**, 265-272 (2008).
- 8 Wei, Q. *et al.* Human babesiosis in Japan: isolation of *Babesia microti*-like parasites from an asymptomatic transfusion donor and from a rodent from an area where babesiosis is endemic. *J Clin Microbiol* **39**, 2178-2183, doi:10.1128/JCM.39.6.2178-2183.2001 (2001).
- 9 Kim, J. Y. *et al.* First case of human babesiosis in Korea: detection and characterization of a novel type of *Babesia* sp. (KO1) similar to ovine babesia. *J Clin Microbiol* **45**, 2084-2087, doi:10.1128/JCM.01334-06 (2007).
- 10 Persing, D. H. *et al.* Infection with a babesia-like organism in northern California. *N Engl J Med* **332**, 298-303, doi:10.1056/NEJM199502023320504 (1995).
- 11 Herwaldt, B. *et al.* A fatal case of babesiosis in Missouri: identification of another piroplasm that infects humans. *Ann Intern Med* **124**, 643-650 (1996).
- 12 Rios, L., Alvarez, G. & Blair, S. Serological and parasitological study and report of the first case of human babesiosis in Colombia. *Rev Soc Bras Med Trop* **36**, 493-498 (2003).
- 13 Senanayake, S. N. *et al.* First report of human babesiosis in Australia. *Med J Aust* **196**, 350-352 (2012).
- 14 Montero, E. *et al.* First record of *Babesia* sp. in Antarctic penguins. *Ticks Tick Borne Dis* **7**, 498-501, doi:10.1016/j.ttbdis.2016.02.006 (2016).
- 15 Yabsley, M. J. & Shock, B. C. Natural history of Zoonotic *Babesia*: Role of wildlife reservoirs. *Int J Parasitol Parasites Wildl* **2**, 18-31, doi:10.1016/j.ijppaw.2012.11.003 (2013).
- 16 Hajdušek, O. *et al.* Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* **3**, 26, doi:10.3389/fcimb.2013.00026 (2013).
- 17 Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M. & Morrison, D. A. *Babesia*: a world emerging. *Infect Genet Evol* **12**, 1788-1809, doi:10.1016/j.meegid.2012.07.004 (2012).
- 18 Boustani, M. R. & Gelfand, J. A. Babesiosis. *Clin Infect Dis* **22**, 611-615 (1996).
- 19 Allsopp, M. T. & Allsopp, B. A. Molecular sequence evidence for the reclassification of some *Babesia* species. *Ann N Y Acad Sci* **1081**, 509-517, doi:10.1196/annals.1373.076 (2006).
- 20 Smith, T. & Kilborne, F. L. Vol. 8th and 9th Repts. 177-304 (Bur. Anim. Industr., U.S. Dept. Agric., 1893).

- 21 Graham, O. H. & Hourrigan, J. L. Eradication programs for the arthropod parasites of livestock. *J Med Entomol* **13**, 629-658 (1977).
- 22 Mosqueda, J., Olvera-Ramirez, A., Aguilar-Tipacamu, G. & Canto, G. J. Current advances in detection and treatment of babesiosis. *Curr Med Chem* **19**, 1504-1518 (2012).
- 23 Ortiz, J. M. & Eagle, R. C. Ocular findings in human babesiosis (Nantucket fever). *Am J Ophthalmol* **93**, 307-311 (1982).
- 24 Mehlhorn, H. & Schein, E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. *Parasitol Res* **84**, 467-475 (1998).
- 25 Gunders, A. E. Piroplasmal sporozoites in the Argasid *Ornithodoros erraticus* (Lucas). *Experientia* **33**, 892-893 (1977).
- 26 Hildebrandt, A., Gray, J. S. & Hunfeld, K. P. Human babesiosis in Europe: what clinicians need to know. *Infection* **41**, 1057-1072, doi:10.1007/s15010-013-0526-8 (2013).
- 27 Vannier, E. & Krause, P. J. Update on babesiosis. *Interdiscip Perspect Infect Dis* **2009**, 984568, doi:10.1155/2009/984568 (2009).
- 28 Blackman, M. J. & Bannister, L. H. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol Biochem Parasitol* **117**, 11-25 (2001).
- 29 Keeley, A. & Soldati, D. The glideosome: a molecular machine powering motility and host-cell invasion by Apicomplexa. *Trends Cell Biol* **14**, 528-532, doi:10.1016/j.tcb.2004.08.002 (2004).
- 30 Dubremetz, J. F., Garcia-Réguet, N., Conseil, V. & Fourmaux, M. N. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int J Parasitol* **28**, 1007-1013 (1998).
- 31 Soldati, D., Foth, B. J. & Cowman, A. F. Molecular and functional aspects of parasite invasion. *Trends Parasitol* **20**, 567-574, doi:10.1016/j.pt.2004.09.009 (2004).
- 32 Striepen, B., Jordan, C. N., Reiff, S. & van Dooren, G. G. Building the perfect parasite: cell division in apicomplexa. *PLoS Pathog* **3**, e78, doi:10.1371/journal.ppat.0030078 (2007).
- 33 Mercier, C., Adjogble, K. D., Däubener, W. & Delauw, M. F. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int J Parasitol* **35**, 829-849, doi:10.1016/j.ijpara.2005.03.011 (2005).
- 34 Loretto, A. P. & Barros, S. S. Hemorrhagic disease in dogs infected with an unclassified intraendothelial piroplasm in southern Brazil. *Vet Parasitol* **134**, 193-213, doi:10.1016/j.vetpar.2005.07.011 (2005).
- 35 Lobo, C. A., Rodriguez, M. & Cursino-Santos, J. R. Babesia and red cell invasion. *Curr Opin Hematol* **19**, 170-175, doi:10.1097/MOH.0b013e328352245a (2012).
- 36 Sultan, A. A. Molecular mechanisms of malaria sporozoite motility and invasion of host cells. *Int Microbiol* **2**, 155-160 (1999).
- 37 Lang-Unnasch, N., Reith, M. E., Munholland, J. & Barta, J. R. Plastids are widespread and ancient in parasites of the phylum Apicomplexa. *Int J Parasitol* **28**, 1743-1754 (1998).
- 38 Arisue, N. & Hashimoto, T. Phylogeny and evolution of apicoplasts and apicomplexan parasites. *Parasitol Int* **64**, 254-259, doi:10.1016/j.parint.2014.10.005 (2015).
- 39 Estrada-Peña, A. Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Rev Sci Tech* **34**, 53-65 (2015).
- 40 Anderson, J. F. & Magnarelli, L. A. Biology of ticks. *Infect Dis Clin North Am* **22**, 195-215, v, doi:10.1016/j.idc.2007.12.006 (2008).
- 41 Due, C., Fox, W., Medlock, J. M., Pietzsch, M. & Logan, J. G. Tick bite prevention and tick removal. *BMJ* **347**, f7123 (2013).

- 42 Jongejans, F. & Uilenberg, G. The global importance of ticks. *Parasitology* **129** Suppl, S3-14 (2004).
- 43 Kopáček, P., Hajdusek, O., Buresová, V. & Daffre, S. Tick innate immunity. *Adv Exp Med Biol* **708**, 137-162 (2010).
- 44 Kopáček, P., Vogt, R., Jindrák, L., Weise, C. & Safarik, I. Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochem Mol Biol* **29**, 989-997 (1999).
- 45 Nakajima, Y., van der Goes van Naters-Yasui, A., Taylor, D. & Yamakawa, M. Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Biochem Mol Biol* **31**, 747-751 (2001).
- 46 Podboronov, V. M. [Comparative characteristics of lysozymes of different origin]. *Antibiot Khimioter* **35**, 22-25 (1990).
- 47 Nakajima, Y. *et al.* Antibacterial activity and mechanism of action of tick defensin against Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1624**, 125-130 (2003).
- 48 Tsuji, N. & Fujisaki, K. Longicin plays a crucial role in inhibiting the transmission of *Babesia* parasites in the vector tick *Haemaphysalis longicornis*. *Future Microbiol* **2**, 575-578, doi:10.2217/17460913.2.6.575 (2007).
- 49 Buresova, V. *et al.* Functional genomics of tick thioester-containing proteins reveal the ancient origin of the complement system. *J Innate Immun* **3**, 623-630, doi:10.1159/000328851 (2011).
- 50 Vasta, G. R., Ahmed, H. & Odom, E. W. Structural and functional diversity of lectin repertoires in invertebrates, protochordates and ectothermic vertebrates. *Curr Opin Struct Biol* **14**, 617-630, doi:10.1016/j.sbi.2004.09.008 (2004).
- 51 Rego, R. O. *et al.* The tick plasma lectin, Dorin M, is a fibrinogen-related molecule. *Insect Biochem Mol Biol* **36**, 291-299, doi:10.1016/j.ibmb.2006.01.008 (2006).
- 52 Buresová, V., Franta, Z. & Kopáček, P. A comparison of *Chryseobacterium indologenes* pathogenicity to the soft tick *Ornithodoros moubata* and hard tick *Ixodes ricinus*. *J Invertebr Pathol* **93**, 96-104, doi:10.1016/j.jip.2006.05.006 (2006).
- 53 Karim, S., Singh, P. & Ribeiro, J. M. A deep insight into the sialotranscriptome of the gulf coast tick, *Amblyomma maculatum*. *PLoS One* **6**, e28525, doi:10.1371/journal.pone.0028525 (2011).
- 54 Pichu, S., Ribeiro, J. M. & Mather, T. N. Purification and characterization of a novel salivary antimicrobial peptide from the tick, *Ixodes scapularis*. *Biochem Biophys Res Commun* **390**, 511-515, doi:10.1016/j.bbrc.2009.09.127 (2009).
- 55 Cen-Aguilar, J. F., Rodríguez-Vivas, R. I., Domínguez-Alpizar, J. L. & Wagner, G. G. Studies on the effect of infection by *Babesia* sp. on oviposition of *Boophilus microplus* engorged females naturally infected in the Mexican tropics. *Vet Parasitol* **78**, 253-257 (1998).
- 56 Tsuji, N. *et al.* Babesial vector tick defensin against *Babesia* sp. parasites. *Infect Immun* **75**, 3633-3640, doi:10.1128/IAI.00256-07 (2007).
- 57 Okubo, K., Yokoyama, N., Govind, Y., Alhassan, A. & Igarashi, I. *Babesia bovis*: effects of cysteine protease inhibitors on in vitro growth. *Exp Parasitol* **117**, 214-217, doi:10.1016/j.exppara.2007.04.009 (2007).
- 58 Antunes, S. *et al.* Functional genomics studies of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus* ticks in response to infection with the cattle protozoan parasite, *Babesia bigemina*. *Int J Parasitol* **42**, 187-195, doi:10.1016/j.ijpara.2011.12.003 (2012).
- 59 Merino, O. *et al.* Targeting the tick protective antigen subolesin reduces vector infestations and pathogen infection by *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina*. *Vaccine* **29**, 8575-8579, doi:10.1016/j.vaccine.2011.09.023 (2011).



- 60 Boldbaatar, D. *et al.* Tick vitellogenin receptor reveals critical role in oocyte development and transovarial transmission of Babesia parasite. *Biochem Cell Biol* **86**, 331-344, doi:10.1139/o08-071 (2008).
- 61 Shock, B. C. *et al.* Diversity of piroplasms detected in blood-fed and questing ticks from several states in the United States. *Ticks Tick Borne Dis* **5**, 373-380, doi:10.1016/j.ttbdis.2014.01.003 (2014).
- 62 Irwin, P. J. Canine babesiosis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **40**, 1141-1156, doi:10.1016/j.cvsm.2010.08.001 (2010).
- 63 Wise, L. N., Pelzel-McCluskey, A. M., Mealey, R. H. & Knowles, D. P. Equine piroplasmosis. *Vet Clin North Am Equine Pract* **30**, 677-693, doi:10.1016/j.cveq.2014.08.008 (2014).
- 64 Decaro, N. *et al.* Clinical bovine piroplasmosis caused by Babesia occultans in Italy. *J Clin Microbiol* **51**, 2432-2434, doi:10.1128/JCM.00713-13 (2013).
- 65 Sivakumar, T. *et al.* PCR detection of Babesia ovata from questing ticks in Japan. *Ticks Tick Borne Dis* **5**, 305-310, doi:10.1016/j.ttbdis.2013.12.006 (2014).
- 66 Maamun, J. M. *et al.* Prevalence of Babesia microti in free-ranging baboons and African green monkeys. *J Parasitol* **97**, 63-67, doi:10.1645/GE-2391.1 (2011).
- 67 Jiang, J. F. *et al.* Epidemiological, clinical, and laboratory characteristics of 48 cases of "Babesia venatorum" infection in China: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* **15**, 196-203, doi:10.1016/S1473-3099(14)71046-1 (2015).
- 68 Wójcik-Fatla, A., Bartosik, K., Buczek, A. & Dutkiewicz, J. Babesia microti in adult Dermacentor reticulatus ticks from eastern Poland. *Vector Borne Zoonotic Dis* **12**, 841-843, doi:10.1089/vbz.2011.0904 (2012).
- 69 Herwaldt, B. L. *et al.* Molecular characterization of a non-Babesia divergens organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg Infect Dis* **9**, 942-948, doi:10.3201/eid0908.020748 (2003).
- 70 Gray, J., Zintl, A., Hildebrandt, A., Hunfeld, K. P. & Weiss, L. Zoonotic babesiosis: overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. *Ticks Tick Borne Dis* **1**, 3-10, doi:10.1016/j.ttbdis.2009.11.003 (2010).
- 71 Rozej-Bielicka, W., Stypułkowska-Misiurewicz, H. & Gołąb, E. Human babesiosis. *Przegl Epidemiol* **69**, 489-494, 605-488 (2015).
- 72 Nohýnková, E., Kubek, J., Měst'ánková, O., Chalupa, P. & Hubálek, Z. [A case of Babesia microti imported into the Czech Republic from the USA]. *Cas Lek Cesk* **142**, 377-381 (2003).
- 73 Haapasalo, K., Suomalainen, P., Sukura, A., Siikamaki, H. & Jokiranta, T. S. Fatal babesiosis in man, Finland, 2004. *Emerg Infect Dis* **16**, 1116-1118, doi:10.3201/eid1607.091905 (2010).
- 74 Welc-Falęciak, R., Hildebrandt, A. & Siński, E. Co-infection with Borrelia species and other tick-borne pathogens in humans: two cases from Poland. *Ann Agric Environ Med* **17**, 309-313 (2010).
- 75 Baumann, D. *et al.* [Fever after a tick bite: clinical manifestations and diagnosis of acute tick bite-associated infections in northeastern Switzerland]. *Dtsch Med Wochenschr* **128**, 1042-1047, doi:10.1055/s-2003-39103 (2003).
- 76 Mørch, K., Holmaas, G., Frolander, P. S. & Kristoffersen, E. K. Severe human Babesia divergens infection in Norway. *Int J Infect Dis* **33**, 37-38, doi:10.1016/j.ijid.2014.12.034 (2015).
- 77 Beattie, J. F., Michelson, M. L. & Holman, P. J. Acute babesiosis caused by Babesia divergens in a resident of Kentucky. *N Engl J Med* **347**, 697-698, doi:10.1056/NEJM200208293470921 (2002).

- 78 Ord, R. L. & Lobo, C. A. Human Babesiosis: Pathogens, Prevalence, Diagnosis and Treatment. *Curr Clin Microbiol Rep* **2**, 173-181, doi:10.1007/s40588-015-0025-z (2015).
- 79 Bush, J. B., Isaácson, M., Mohamed, A. S., Potgieter, F. T. & de Waal, D. T. Human babesiosis--a preliminary report of 2 suspected cases in South Africa. *S Afr Med J* **78**, 699 (1990).
- 80 White, D. J. *et al.* Human babesiosis in New York State: Review of 139 hospitalized cases and analysis of prognostic factors. *Arch Intern Med* **158**, 2149-2154 (1998).
- 81 Krause, P. J. Babesiosis. *Med Clin North Am* **86**, 361-373 (2002).
- 82 Herwaldt, B. L. *et al.* Transfusion-associated babesiosis in the United States: a description of cases. *Ann Intern Med* **155**, 509-519, doi:10.7326/0003-4819-155-8-201110180-00362 (2011).
- 83 Leiby, D. A. Transfusion-transmitted Babesia spp.: bull's-eye on Babesia microti. *Clin Microbiol Rev* **24**, 14-28, doi:10.1128/CMR.00022-10 (2011).
- 84 Joseph, J. T. *et al.* Vertical transmission of Babesia microti, United States. *Emerg Infect Dis* **18**, 1318-1321, doi:10.3201/eid1808.110988 (2012).
- 85 Vannier, E., Gewurz, B. E. & Krause, P. J. Human babesiosis. *Infect Dis Clin North Am* **22**, 469-488, viii-ix, doi:10.1016/j.idc.2008.03.010 (2008).
- 86 Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O. & Malandrin, L. Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet Res* **40**, 37, doi:10.1051/vetres/2009020 (2009).
- 87 Suarez, C. E. & Noh, S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Vet Parasitol* **180**, 109-125, doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.032 (2011).
- 88 Vial, H. J. & Gorenflot, A. Chemotherapy against babesiosis. *Vet Parasitol* **138**, 147-160, doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.048 (2006).
- 89 Brown, W. C., Norimine, J., Knowles, D. P. & Goff, W. L. Immune control of Babesia bovis infection. *Vet Parasitol* **138**, 75-87, doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.041 (2006).
- 90 de Waal, D. T. & Combrink, M. P. Live vaccines against bovine babesiosis. *Vet Parasitol* **138**, 88-96, doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.042 (2006).
- 91 Edelhofer, R., Kanout, A., Schuh, M. & Kutzer, E. Improved disease resistance after Babesia divergens vaccination. *Parasitol Res* **84**, 181-187 (1998).
- 92 Irwin, P. J. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasit Vectors* **2** **Suppl 1**, S4, doi:10.1186/1756-3305-2-S1-S4 (2009).
- 93 Bourdoiseau, G. Canine babesiosis in France. *Vet Parasitol* **138**, 118-125, doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.046 (2006).
- 94 Wang, C. *et al.* Frequency and therapy monitoring of canine Babesia spp. infection by high-resolution melting curve quantitative FRET-PCR. *Vet Parasitol* **168**, 11-18, doi:10.1016/j.vetpar.2009.10.015 (2010).
- 95 Sakuma, M., Setoguchi, A. & Endo, Y. Possible emergence of drug-resistant variants of Babesia gibsoni in clinical cases treated with atovaquone and azithromycin. *J Vet Intern Med* **23**, 493-498, doi:10.1111/j.1939-1676.2009.0300.x (2009).
- 96 Friedhoff, K. T. & Soulé, C. An account on equine babesioses. *Rev Sci Tech* **15**, 1191-1201 (1996).
- 97 Li, Y. *et al.* Macrophages are critical for cross-protective immunity conferred by Babesia microti against Babesia rodhaini infection in mice. *Infect Immun* **80**, 311-320, doi:10.1128/IAI.05900-11 (2012).
- 98 Zintl, A., Gray, J. S., Skerrett, H. E. & Mulcahy, G. Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. *Parasite Immunol* **27**, 115-120, doi:10.1111/j.1365-3024.2005.00748.x (2005).

- 99 Shoda, L. K. *et al.* Babesia bovis-stimulated macrophages express interleukin-1beta, interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide and inhibit parasite replication in vitro. *Infect Immun* **68**, 5139-5145 (2000).
- 100 Goff, W. L., Storset, A. K., Johnson, W. C. & Brown, W. C. Bovine splenic NK cells synthesize IFN-gamma in response to IL-12-containing supernatants from Babesia bovis-exposed monocyte cultures. *Parasite Immunol* **28**, 221-228, doi:10.1111/j.1365-3024.2006.00830.x (2006).
- 101 Brown, W. C. Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune responses to Babesia bovis, a protozoan parasite that causes persistent infection. *Vet Parasitol* **101**, 233-248 (2001).
- 102 Brown, W. C. & Palmer, G. H. Designing blood-stage vaccines against Babesia bovis and B. bigemina. *Parasitol Today* **15**, 275-281 (1999).
- 103 Kim, E. J., Bauer, C., Grevelding, C. G. & Quack, T. Improved PCR/nested PCR approaches with increased sensitivity and specificity for the detection of pathogens in hard ticks. *Ticks Tick Borne Dis* **4**, 409-416, doi:10.1016/j.ttbdis.2013.04.004 (2013).
- 104 Apostolou, A., Sorhage, F. & Tan, C. Babesiosis surveillance, new jersey, USA, 2006-2011. *Emerg Infect Dis* **20**, 1407-1409, doi:10.3201/eid2008.131591 (2014).
- 105 Uilenberg, G. Babesia--a historical overview. *Vet Parasitol* **138**, 3-10, doi:10.1016/j.vetpar.2006.01.035 (2006).
- 106 Alekseev, A. N., Semenov, A. V. & Dubinina, H. V. Evidence of Babesia microti infection in multi-infected Ixodes persulcatus ticks in Russia. *Exp Appl Acarol* **29**, 345-353 (2003).
- 107 Zhou, X. *et al.* Co-infections with Babesia microti and Plasmodium parasites along the China-Myanmar border. *Infect Dis Poverty* **2**, 24, doi:10.1186/2049-9957-2-24 (2013).
- 108 Knapp, K. L. & Rice, N. A. Human Coinfection with Borrelia burgdorferi and Babesia microti in the United States. *J Parasitol Res* **2015**, 587131, doi:10.1155/2015/587131 (2015).
- 109 Bednarska, M. *et al.* Vertical Transmission of Babesia microti in BALB/c Mice: Preliminary Report. *PLoS One* **10**, e0137731, doi:10.1371/journal.pone.0137731 (2015).
- 110 Kallio, E. R. *et al.* First report of Anaplasma phagocytophilum and Babesia microti in rodents in Finland. *Vector Borne Zoonotic Dis* **14**, 389-393, doi:10.1089/vbz.2013.1383 (2014).
- 111 Eshoo, M. W. *et al.* Broad-range survey of tick-borne pathogens in Southern Germany reveals a high prevalence of Babesia microti and a diversity of other tick-borne pathogens. *Vector Borne Zoonotic Dis* **14**, 584-591, doi:10.1089/vbz.2013.1498 (2014).
- 112 Hersh, M. H., Tibbetts, M., Strauss, M., Ostfeld, R. S. & Keesing, F. Reservoir competence of wildlife host species for Babesia microti. *Emerg Infect Dis* **18**, 1951-1957, doi:10.3201/eid1812.111392 (2012).
- 113 Nakajima, R. *et al.* Babesia microti-group parasites compared phylogenetically by complete sequencing of the CCTeta gene in 36 isolates. *J Vet Med Sci* **71**, 55-68 (2009).
- 114 Moitra, P. *et al.* Expression, Purification, and Biological Characterization of Babesia microti Apical Membrane Antigen 1. *Infect Immun* **83**, 3890-3901, doi:10.1128/IAI.00168-15 (2015).
- 115 Oliveira, M. R. & Kreier, J. P. Transmission of Babesia microti using various species of ticks as vectors. *J Parasitol* **65**, 816-817 (1979).
- 116 Ruebush, M. J. & Hanson, W. L. Susceptibility of five strains of mice to Babesia microti of human origin. *J Parasitol* **65**, 430-433 (1979).

- 117 Ruebush, T. K., Collins, W. E. & Warren, M. Experimental Babesia microti infections in Macaca mulatta: recurrent parasitemia before and after splenectomy. *Am J Trop Med Hyg* **30**, 304-307 (1981).
- 118 Gray, J., von Stedingk, L. V., Gürtelschmid, M. & Granström, M. Transmission studies of Babesia microti in Ixodes ricinus ticks and gerbils. *J Clin Microbiol* **40**, 1259-1263 (2002).
- 119 Cullen, J. M. & Levine, J. F. Pathology of experimental Babesia microti infection in the Syrian hamster. *Lab Anim Sci* **37**, 640-643 (1987).
- 120 Ike, K. *et al.* High susceptibility of Djungarian hamsters (Phodopus sungorus) to the infection with Babesia microti supported by hemodynamics. *J Vet Med Sci* **67**, 515-520 (2005).
- 121 Walter, G. & Weber, G. [A study on the transmission (transstadial, transovarial) of Babesia microti, strain "Hannover i", in its tick vector, Ixodes ricinus (author's transl)]. *Tropenmed Parasitol* **32**, 228-230 (1981).
- 122 Walter, G. [Transmission of Babesia microti by nymphs of Dermacentor marginatus, D. reticulatus, Haemaphysalis punctata, Rhipicephalus sanguineus and Ixodes hexagonus]. *Z Parasitenkd* **66**, 353-354 (1982).
- 123 Hussein, H. S. Ixodes trianguliceps: seasonal abundance and role in the epidemiology of Babesia microti infection in north-western England. *Ann Trop Med Parasitol* **74**, 531-539 (1980).
- 124 Karakashian, S. J. *et al.* Ultrastructural studies on sporogony of Babesia microti in salivary gland cells of the tick Ixodes dammini. *Cell Tissue Res* **231**, 275-287 (1983).
- 125 Rudzinska, M. A., Spielman, A., Lewengrub, S., Trager, W. & Piesman, J. Sexuality in piroplasms as revealed by electron microscopy in Babesia microti. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 2966-2970 (1983).
- 126 Piesman, J., Karakashian, S. J., Lewengrub, S., Rudzinska, M. A. & Spielman, A. Development of Babesia microti sporozoites in adult Ixodes dammini. *Int J Parasitol* **16**, 381-385 (1986).
- 127 Hussein, H. S. The nature of immunity against Babesia hylomysci and B. microti infections in mice. *Ann Trop Med Parasitol* **71**, 249-253 (1977).
- 128 Herod, E., Clark, I. A. & Allison, A. C. Protection of mice against haemoprotozoan Babesia microti with Brucella abortus strain 19. *Clin Exp Immunol* **31**, 518-523 (1978).
- 129 Gray, G. D. & Phillips, R. S. Suppression of primary and secondary antibody responses and inhibition of antigen priming during Babesia microti infections in mice. *Parasite Immunol* **5**, 123-134 (1983).
- 130 Matsubara, J., Koura, M. & Kamiyama, T. Infection of immunodeficient mice with a mouse-adapted substrain of the gray strain of Babesia microti. *J Parasitol* **79**, 783-786 (1993).
- 131 Clawson, M. L. *et al.* Cellular immunity, but not gamma interferon, is essential for resolution of Babesia microti infection in BALB/c mice. *Infect Immun* **70**, 5304-5306 (2002).
- 132 Chisholm, E. S., Sulzer, A. J. & Ruebush, T. K. Indirect immunofluorescence test for human Babesia microti infection: antigenic specificity. *Am J Trop Med Hyg* **35**, 921-925 (1986).
- 133 Persing, D. H. *et al.* Detection of Babesia microti by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **30**, 2097-2103 (1992).
- 134 Bloch, E. M. *et al.* Development of a real-time polymerase chain reaction assay for sensitive detection and quantitation of Babesia microti infection. *Transfusion* **53**, 2299-2306, doi:10.1111/trf.12098 (2013).

- 135 Rollend, L. *et al.* Quantitative PCR for detection of *Babesia microti* in *Ixodes scapularis* ticks and in human blood. *Vector Borne Zoonotic Dis* **13**, 784-790, doi:10.1089/vbz.2011.0935 (2013).
- 136 Wilson, M. *et al.* Development of droplet digital PCR for the detection of *Babesia microti* and *Babesia duncani*. *Exp Parasitol* **149**, 24-31, doi:10.1016/j.exppara.2014.12.003 (2015).
- 137 Bish, E. K., Moritz, E. D., El-Amine, H., Bish, D. R. & Stramer, S. L. Cost-effectiveness of a *Babesia microti* blood donation intervention based on real-time prospective screening in endemic areas of the United States. *Transfusion* **56**, 775-777, doi:10.1111/trf.13453 (2016).
- 138 Malandrin, L., Jouglin, M., Sun, Y., Brisseau, N. & Chauvin, A. Redescription of *Babesia capreoli* (Enigk and Friedhoff, 1962) from roe deer (*Capreolus capreolus*): isolation, cultivation, host specificity, molecular characterisation and differentiation from *Babesia divergens*. *Int J Parasitol* **40**, 277-284, doi:10.1016/j.ijpara.2009.08.008 (2010).
- 139 Häselbarth, K., Tenter, A. M., Brade, V., Krieger, G. & Hunfeld, K. P. First case of human babesiosis in Germany - Clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. *Int J Med Microbiol* **297**, 197-204, doi:10.1016/j.ijmm.2007.01.002 (2007).
- 140 Zhou, X. *et al.* Human babesiosis, an emerging tick-borne disease in the People's Republic of China. *Parasit Vectors* **7**, 509, doi:10.1186/s13071-014-0509-3 (2014).
- 141 Poisnel, E. *et al.* *Babesia microti*: an unusual travel-related disease. *BMC Infect Dis* **13**, 99, doi:10.1186/1471-2334-13-99 (2013).
- 142 Ramharter, M. *et al.* Clinical and molecular characterization of a near fatal case of human babesiosis in Austria. *J Travel Med* **17**, 416-418, doi:10.1111/j.1708-8305.2010.00446.x (2010).
- 143 Welc-Fałęciak, R. *et al.* First report of two asymptomatic cases of human infection with *Babesia microti* (Franca, 1910) in Poland. *Ann Agric Environ Med* **22**, 51-54, doi:10.5604/12321966.1141394 (2015).
- 144 Karbowski, G. Zoonotic reservoir of *Babesia microti* in Poland. *Pol J Microbiol* **53 Suppl**, 61-65 (2004).
- 145 Blaňarová, L. *et al.* Presence of *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* and *Babesia microti* in rodents and two tick species (*Ixodes ricinus* and *Ixodes trianguliceps*) in Slovakia. *Ticks Tick Borne Dis* **7**, 319-326, doi:10.1016/j.ttbdis.2015.11.008 (2016).
- 146 Rudolf, I. *et al.* *Babesia microti* (Piroplasmida: Babesiidae) in nymphal *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in the Czech Republic. *Folia Parasitol (Praha)* **52**, 274-276 (2005).
- 147 Skotarczak, B. & Cichočka, A. The occurrence DNA of *Babesia microti* in ticks *Ixodes ricinus* in the forest areas of Szczecin. *Folia Biol (Krakow)* **49**, 247-250 (2001).
- 148 Kálmán, D., Sréter, T., Széll, Z. & Egyed, L. *Babesia microti* infection of anthropophilic ticks (*Ixodes ricinus*) in Hungary. *Ann Trop Med Parasitol* **97**, 317-319, doi:10.1179/000349803235002272 (2003).
- 149 Wójcik-Fatla, A. *et al.* Prevalence of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks from Lublin region (eastern Poland). *Ann Agric Environ Med* **13**, 319-322 (2006).
- 150 Lempereur, L. *et al.* First molecular evidence of potentially zoonotic *Babesia microti* and *Babesia* sp. EU1 in *Ixodes ricinus* ticks in Belgium. *Vector Borne Zoonotic Dis* **11**, 125-130, doi:10.1089/vbz.2009.0189 (2011).
- 151 Krause, P. J. *et al.* Comparison of PCR with blood smear and inoculation of small animals for diagnosis of *Babesia microti* parasitemia. *J Clin Microbiol* **34**, 2791-2794 (1996).

- 152 Yokoyama, N. *et al.* Roles of the Maltese cross form in the development of parasitemia and protection against *Babesia microti* infection in mice. *Infect Immun* **71**, 411-417 (2003).
- 153 Welc-Faleciak, R., Bajer, A., Bednarska, M., Paziewska, A. & Siński, E. Long term monitoring of *Babesia microti* infection in BALB/c mice using nested PCR. *Ann Agric Environ Med* **14**, 287-290 (2007).
- 154 Gumber, S. *et al.* Experimental transfusion-induced *Babesia microti* infection: dynamics of parasitemia and immune responses in a rhesus macaque model. *Transfusion*, doi:10.1111/trf.13521 (2016).
- 155 Josling, G. A. & Llinás, M. Sexual development in *Plasmodium* parasites: knowing when it's time to commit. *Nat Rev Microbiol* **13**, 573-587, doi:10.1038/nrmicro3519 (2015).
- 156 Yin, H., Lu, W., Luo, J., Zhang, Q. & Dou, H. Experiments on the transmission of *Babesia major* and *Babesia bigemina* by *Haemaphysalis punctata*. *Vet Parasitol* **67**, 89-98 (1996).
- 157 Ikadai, H. *et al.* Molecular evidence of *Babesia equi* transmission in *Haemaphysalis longicornis*. *Am J Trop Med Hyg* **76**, 694-697 (2007).
- 158 Kumar, S., Malhotra, D. V., Sangwan, A. K., Goel, P. & Kumar, A. Infectivity rate and transmission potential of *Hyalomma anatolicum anatolicum* ticks for *Babesia equi* infection. *Vet Parasitol* **144**, 338-343, doi:10.1016/j.vetpar.2006.10.009 (2007).
- 159 Dalglish, R. J. & Stewart, N. P. Some effects of time, temperature and feeding on infection rates with *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus* larvae. *Int J Parasitol* **12**, 323-326 (1982).
- 160 Süß, J., Klaus, C., Gerstengarbe, F. W. & Werner, P. C. What makes ticks tick? Climate change, ticks, and tick-borne diseases. *J Travel Med* **15**, 39-45, doi:10.1111/j.1708-8305.2007.00176.x (2008).
- 161 Daniel, M., Cerný, V., Dusbábek, F., Honzáková, E. & Olejníček, J. Influence of microclimate on the life cycle of the common tick *Ixodes ricinus* (L.) in an open area in comparison with forest habitats. *Folia Parasitol (Praha)* **24**, 149-160 (1977).
- 162 Moltmann, U. G., Mehlhorn, H. & Friedhoff, K. T. Electron microscopic study on the development of *Babesia ovis* (Piroplasmia) in the salivary glands of the vector tick *Rhipicephalus bursa*. *Acta Trop* **39**, 29-40 (1982).
- 163 Blouin, E. F. & van Rensburg, L. An ultrastructural study of the development of *Babesia occultans* in the salivary glands of adult *Hyalomma marginatum rufipes*. *Onderstepoort J Vet Res* **55**, 93-100 (1988).
- 164 Weber, G. & Walter, G. *Babesia microti* (apicomplexa: piroplasmida): electron microscope detection in salivary glands of the tick vector *Ixodes ricinus* (Ixodoidea: Ixodidae). *Z Parasitenkd* **64**, 113-115 (1980).
- 165 Piesman, J. & Spielman, A. Human babesiosis on Nantucket Island: prevalence of *Babesia microti* in ticks. *Am J Trop Med Hyg* **29**, 742-746 (1980).
- 166 Kocan, K. M., Blouin, E. & de la Fuente, J. RNA interference in ticks. *J Vis Exp*, doi:10.3791/2474 (2011).
- 167 Dong, Y. *et al.* *Anopheles gambiae* immune responses to human and rodent *Plasmodium* parasite species. *PLoS Pathog* **2**, e52, doi:10.1371/journal.ppat.0020052 (2006).
- 168 Cirimotich, C. M., Dong, Y., Garver, L. S., Sim, S. & Dimopoulos, G. Mosquito immune defenses against *Plasmodium* infection. *Dev Comp Immunol* **34**, 387-395, doi:10.1016/j.dci.2009.12.005 (2010).

- 169 Povelones, M., Waterhouse, R. M., Kafatos, F. C. & Christophides, G. K. Leucine-rich repeat protein complex activates mosquito complement in defense against Plasmodium parasites. *Science* **324**, 258-261, doi:10.1126/science.1171400 (2009).
- 170 Fraiture, M. *et al.* Two mosquito LRR proteins function as complement control factors in the TEP1-mediated killing of Plasmodium. *Cell Host Microbe* **5**, 273-284, doi:10.1016/j.chom.2009.01.005 (2009).

**Příloha:**

Následující pasáž o rozsahu jedné strany obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.