

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Diplomová práce**

**2017**

**Bc. Hana Hájková**

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Patogeny v klíšťatech získaných ze psů a koček v Českých Budějovicích a okolí.**

Diplomová práce

Bc. Hana Hájková

Vedoucí práce: Nataliia Rudenko, PhD.

Školitel specialista: Maryna Golovchenko, MSc.

České Budějovice 2017

Hájková, H., 2017: Patogeny v klíšťatech získaných ze psů a koček v Českých Budějovicích a okolí [Patogens in ticks collected from dogs and cats captured in the area of České Budějovice and neighboring regions.] – 69 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:** During a period of 3 years, from March to July 2014, 2015 and 2016, ticks were collected from dogs and cats in shelter facilities for abandon animals in České Budejovice, South Bohemia. In total, 343 ticks were found on 106 pets: 67 domestic dogs and 39 cats. All collected ticks, that were identified as *Ixodes ricinus* and *Ixodes hexagonus*, were tested for the presence of spirochetes from *Borrelia burgdorferis* sensu lato (s.l.) complex, *Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp, and *Babesia* spp using conventional PCR and nested PCR. Identification of pathogens was done by following sequencing of amplicons. Out of all tested ticks, 49,56% were proved to be infected at least with one pathogen. Co-infection of at least two different pathogens was determined in 18 ticks (5,2%). The aim of the present study was to estimate the role of accompanying animals (cats and dogs) in the circulation of ticks and tick-borne pathogens, to determine the frequency of pathogenic infections in dog and cat-associated ticks, to evaluate the current risk of infection for dogs and cats, with respect to risk for humans living in the area of České Budějovice.

Diplomová práce byla financována z grantů FP7 projekt ANTIGONE, projektové číslo – 278976, projekt se Slovenskou AV SAV-15-14 a s institucionální podporou RVO: 60077344 Biologického centra, Institutu parazitologie.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím zdrojů 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 nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím, 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, 18.4. 2017 . . . . . Hana Hájková

## **Poděkování**

Poděkování bych chtěla věnovat zejména své vedoucí a školitelce práce Maryně Golovchenko, MSc. a Natashe Rudenko, PhD. za poskytnutí odborného dohledu a rad v průběhu vypracování práce. Na tomto místě bych chtěla poděkovat profesoru Liborovi Grubhofferovi za příležitost pracovat v Laboratoři molekulární biologie vektorů a patogenů. Svým rodičům děkuji za oporu během celého studia

## Obsah

1. Úvod.....	1
2. Hlavní cíle práce .....	2
3. Literární přehled.....	3
3.1 Jednotlivé druhy zkoumaných patogenů .....	3
3.1.1 <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato .....	3
3.1.2 <i>Anaplasma</i> spp. ....	8
3.1.3 <i>Babesia</i> spp. ....	13
3.1.4 <i>Rickettsia</i> spp.....	17
4. Materiály a metody .....	21
4.1 Sběr a zpracování klíšťat.....	21
4.1.1 Zpracování vzorků.....	21
4.1.2 Isolace genomové DNA z klíšťat .....	21
4.1.3 Polymerázová řetězcová reakce .....	22
4.1.4 Elektroforéza .....	26
4.1.5 Purifikace DNA z gelu.....	26
4.1.6 Sekvenování .....	26
4.1.7 Klonování a transformační reakce .....	26
4.1.8 Ověření úspěšnosti klonování a transformace.....	27
4.2 Analýza sekvence .....	27
5. Výsledky.....	28
5.1 Výsledky sběrů klíšťat .....	28
5.2 Výsledky analýzy vzorků na přítomnost patogenů <i>Babesia</i> spp., <i>Rickettsia</i> spp., <i>B. burgdorferi</i> s.l. a <i>Anaplasma</i> spp.....	30
6. Diskuze.....	38
7. Závěr .....	46
Použitá literatura.....	47

## Seznam použitých zkratek

<b>LB</b> .....	Lymská borelióza
<b>Bb s.l.</b> .....	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato
<b>Bb s.s.</b> .....	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto
<b>Ery</b> .....	erythrocyty
<b>tzv.</b> .....	takzvané
<b>spp.</b> .....	druhy
<b>PCR</b> .....	Polymerázová řetězcová reakce
<b>MSF</b> .....	Středozevní skvrnitý tyfus
<b>SFG</b> .....	Skvrnitý tyfus
<b>ACA</b> .....	Acrodermatitis chronica atrophicans
<b>EM</b> .....	Erythema migrans

## 1. Úvod

Vektorem přenášené nemoci představují vážnou hrozbu pro zdraví nejen lidí, ale také zvířat a mohou se rozvinout v závažné zoonózy.

Mezi nejzávažnější patogeny přenášené klíšťaty patří virus klíšťové encefalitidy, spirochéty komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp. a *Babesia* spp.. Hlavním vektorem výše zmíněných patogenů pro oblast centrální Evropy je klíště obecné *Ixodes ricinus* (Hubalek a Rulf, 2011). Tento druh klíšťat se v hojném množství vyskytuje v parcích, rekreačních zónách a travnatých částech měst. Zvyšuje se tím riziko potenciálního vystavení lidí a zvířat, pohybujících se v těchto oblastech, nakaženým klíšťatům (Rizzoli, 2014). Zkoumání vektorů a patogenů, jež klíšťata přenáší, je v rámci epidemiologického výzkumu zásadní. Existuje řada studií, které se zaměřují zejména na identifikaci patogenů klíšťat získaných metodou vlajkování. Tato metoda je schopná poskytnout data, která jsou geograficky omezená. V této práci jsme se zaměřili na klíšťata odebraná přímo z hostitelů - psů a koček. Význam těchto domácích mazlíčků v oblasti ekologie a epidemiologie onemocnění spojených s klíšťaty je velice důležitý díky úzkému spojení psů, koček a lidí a také jejich podobné aktivity v přírodě i v domácnosti.

## **2. Hlavní cíle práce**

1. Literární studie k problematice.
2. Sběr vzorků ve spolupráci s pracovníky útulku pro zatoulané psy a kočky v Českých Budějovicích.
3. Optimalizace technik pro detekci různých patogenů v klíšťatech ze psů a koček (nepřisátých, částečně nasátých a téměř úplně nasátých jedinců různých druhů klíšťat).
4. Interpretace výsledků s důrazem na potenciální zdravotní riziko, kterému je vystaveno obyvatelstvo v oblasti našeho výzkumu.



### 3. Literární přehled

#### 3.1 Jednotlivé druhy zkoumaných patogenů

##### 3.1.1 *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Borelie jsou vektorem přenášené bakterie řádu *Spirochaetales*. Během dlouhodobého studia spirochét se podařilo shromáždit znalosti o jejich fylogenetické diverzitě, genetice, hostitelských interakcích, patogenitě pro člověka a pro jiné obratlovce (Rizzoli et al., 2014). Nejvíce studovanými zástupci borelie jsou druhy patřící do skupiny způsobující Lymfskou boreliózu (LB), tedy do komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*Bb* s.l.). Tento komplex se dnes skládá již z 21 pojmenovaných druhů spirochét (Tab.1). Identifikace nových druhů borelií je kontinuální proces. Důkazem tohoto faktu může být nejnovější nález *B. mayonii* (CDC: Centrum pro kontrolu a prevenci onemocnění, 2016; Pratt et al., 2016).

**Tab. 1:** Geografické rozšíření a klasifikace jednotlivých druhů komplexu spirochét *Bb* s.l.

Druh	Vektor	Hostitel/rezervoár	Oblast	Reference
<i>B. afzelii</i>	<i>I. ricinus, I. persulcatus</i>	hlodavci	Asie, Evropa	Canica et al. (1993)
<i>B. americana</i>	<i>I. pacificus, I. minor</i>	ptáci	USA	Rudenko et al. (2009a)
<i>B. andersonii</i>	<i>I. dentatus</i>	zajíci	USA	Marconi et al. (1995)
<i>B. bissetii</i>	<i>I. ricinus, I. pacificus, I. scapularis, I. minor</i>	hlodavci	USA, Evropa	Postic et al. (1998) Rudenko et al. (2008) Rudenko et al. (2009b) Girard et al. (2011)
<i>B. bavariensis</i>	<i>I. ricinus</i>	hlodavci	Evropa	Margos et al. (2009)
<i>Bb</i> s.s.	<i>I. ricinus, I. scapularis, I. pacificus</i>	hlodavci, práci, savci, ještěrky	Evropa, USA	Baranton et al. (1992) Picken et al. (1996)
<i>B. californiensis</i>	<i>I. pacificus, I. jellisonii, I. spinipalpis</i>	klokani, jeleni	USA	Postic et al. (2007)
<i>B. carolinensis</i>	<i>I. minor</i>	hlodavci ptáci	USA	Rudenko et al. (2009c)
<i>B. finlandensis</i>	<i>I. ricinus</i>	?	Evropa	Casjens et al. (2011)
<i>B. garinii</i>	<i>I. ricinus, I. hexagonus, I. nipponensis, I. persulcatus</i>	ptáci, hlodavci, ještěrky	Asie, Evropa	Baranton et al. (1992)

Druh	Vektor	Hostitel/rezervoár	Oblast	Reference
<i>B. chilensis</i>	<i>I. stilesi</i>	krysy	USA	Ivanova et al. (2014)
<i>B. japonica</i>	<i>I. ovatus</i>	hlodavci	Japonsko	Kawabata et al. (1993)
<i>B. kurtenbachii</i>	<i>I. scapularis</i>	hlodavci	USA, Evropa	Margos et al. (2010)
<i>B. lusitaniae</i>	<i>I. ricinus</i>	hlodavci, ještěrky	Evropa, S. Afrika	Le Fleche et al. (1997)
<i>B. mayoni</i>	<i>I. scapularis</i>	?	středozápad USA	Pritt et al. (2016)
<i>B. sinica</i>	<i>I. ovatus</i>	hlodavci	Čína	Masuzawa et al. (2001)
<i>B. spielmanii</i>	<i>I. ricinus</i>	hlodavci	Evropa	Richter et al. (2006)
<i>B. tanukii</i>	<i>I. tanuki</i>	? (pravděpodobně kočky, psi)	Japonsko	Fukunaga et al. (1996)
<i>B. turdi</i>	<i>I. turdus</i>	ptáci	Japonsko	Fukunaga et al. (1996)
<i>B. valaisiana</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>I. granulatus</i>	ptáci, ještěrky	Asie, Evropa	Wang et al. (1997)
<i>B. yangtzensis</i>	<i>I. ricinus</i> , <i>Haemaphysalis longicornis</i>	hlodavci	Čína	Chu et al. (2008)

Z komplexu *Bb* s.l. jsou *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s. a *B. garinii* prokázánymi původci Lymfské boreliózy v Evropě (Stanek a Reiter, 2011). Hlavními vektory těchto patogenů v Euroasii jsou klíšťata *I. ricinus* a *I. persulcatus*, přičemž výskyt posledního je omezen pouze na východní a jihovýchodní část Evropy a Asie. Díky přítomnosti vhodných hostitelů v příměstských částech států Evropy došlo také k rozšíření dalšího druhů klíštěte *I. hexagonus*, jehož typickými hostiteli jsou ježci, lišky, kočky a psi, kteří se pohybují volně po zahradách či parcích měst a tím přispívají k rozšíření LB (Gern et al., 1997). To, že klíště *I. hexagonus* může přenašet *B. burgdorferi*-like spirochéty, bylo poprvé prokázáno v roce 1989 v Německu (Liebisch et al., 1989). Později Gern a kolegové potvrdili, že toto klíště může sloužit jako kompetentní vektor *B. burgdorferi* a tím pádem přispívat k rozšíření LB v regionech, kde je klíště *I. ricinus* méně časté, nebo není vůbec přítomné (Gern et al., 1991).

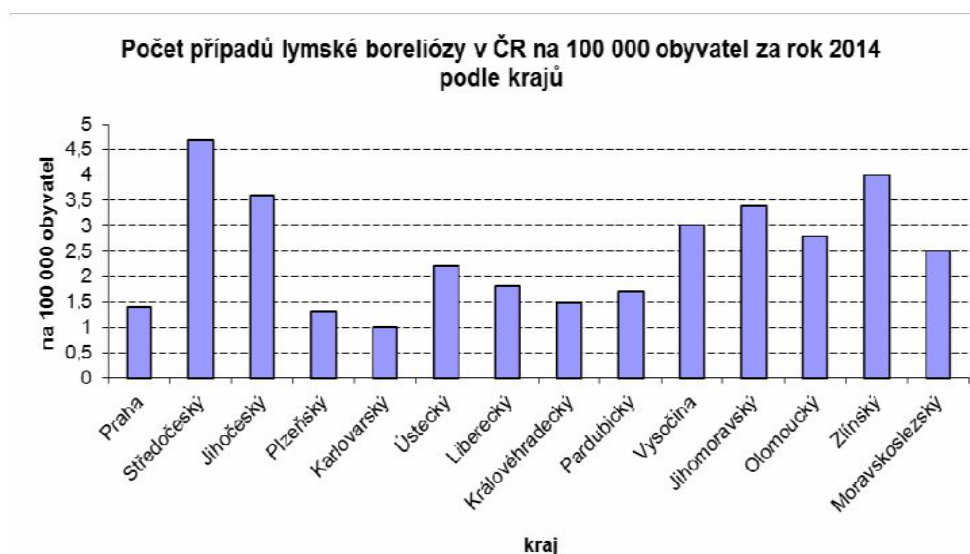
Stupeň rizika styku vektorů a hostitelů s infekcí stoupá v oblastech s výskytem listnatých a smíšených lesních ekosystémů, které jsou často odpočinkovým místem člověka i domácích zvířat (Fitzner et al., 2002). Přispívá k tomu i proces zalesňování ploch, který vede ke zvýšení koncentrace lesních hlodavců a jelenovitých, kteří představují klíčového hostitele

nymf a dospělých klíšťat. Psi a kočky při kontaktu s nakaženými vektory mohou sloužit jako hostitelé, nebo jako sentinely pro LB. Hrozba vystavení psa či kočky vysokému počtu vektorem přenášených patogenů v průběhu let postupně narůstá a blízký kontakt zvířete s člověkem v městských oblastech představuje další možné riziko pro veřejné zdraví obyvatel (Trotta et al., 2012).

Česká republika je geografickou polohou a umístěním v mírném pásu ideálním biotopem pro přenašeče LB – klíště *I. ricinus*. První klinický případ kožního projevu LB v ČR byl popsán před více než šedesáti lety, ale samotná diagnostika a povinné hlášení nemocných pacientů se rozvinulo teprve v roce 1986. Existuje několik endemických míst, kde je riziko nákazy v ČR nejvyšší (Bartunek et al., 2006).

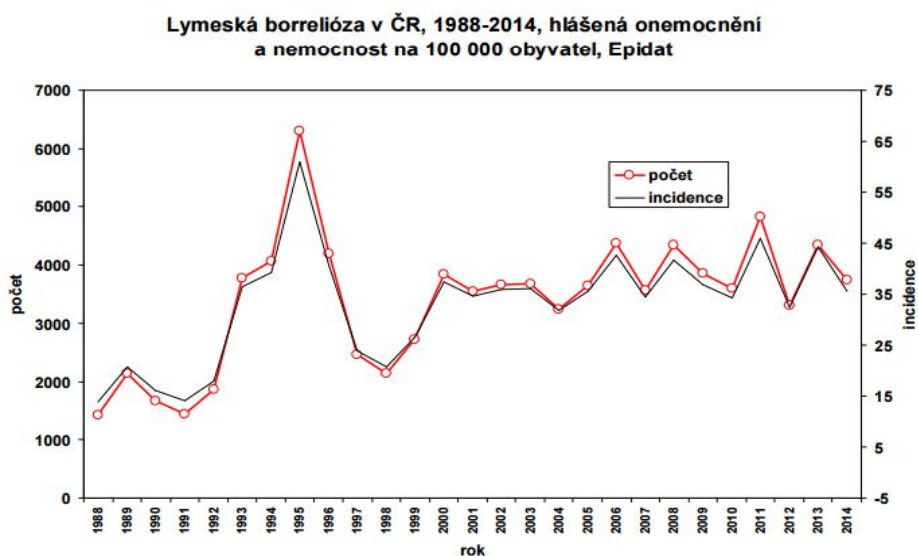
Následující graf zveřejněný státním zdravotním ústavem vystihuje výskyt onemocnění v jednotlivých krajích České republiky za rok 2014.

**Obr. 1:** Počet případů onemocnění LB v ČR za rok 2014 (zdroj: [www.szu.cz](http://www.szu.cz)).



Na obrázku 2 je zaznamenána incidence případů onemocnění LB v letech 1988-2014 (SZÚ).

**Obr. 2:** Incidence případů onemocnění LB v ČR v roce 1988-2014 (zdroj: [www.szu.cz](http://www.szu.cz)).



Státní zdravotní ústav

### Životní cyklus a vývoj *Borrelia* spp.

Spirochěty *B. burgdorferi* s.l. jsou přenášeny z klíštěte na hostitele během jeho sání. Jsou to právě sliny klíštěte, které usnadňují přenos patogenu do hostitelského organismu. Spirochěty, které jsou přítomny ve střevě infikovaných klíšťat, migrují do jeho slinných žláz po spouštěcím signálu, kterým je přísátí klíštěte (Leuba-Garcia et al., 1998). Přenos borelie začíná po přísátí a s prodlužující dobou sání se zvyšuje i možnost nákazy borelií (Crippa et al., 2002).

Borelie si vyvinuly speciální molekulární mechanismy, zajišťující efektivitu jejich přenosu do hostitele. Vnější povrchové proteiny *ospA* a *B* pravděpodobně pomáhají *Bb* s.l. zůstat přichycené na stěnu střeva klíštěte (Tsao, 2009). Během sání klíštěte modifikuje borelie expresi několika genů. Nejvíce zřetelná změna je tzv. "down-regulace" genu *ospA* a následná "up-regulace" *ospC* (Schwan a Piesman, 2000). Po přenosu do hostitele se borelie setkává s první překážkou – imunitním systémem. První obranou hostitele je aktivace klasické i alternativní cesty komplementu. Borelie však zabraňuje komplementem

mediované smrti tím, že pomocí povrchových proteinů CRASP a Erp ("*Osp E/F*-related proteins") váže plasmatický faktor H, či faktor H-like (FHL) protein a způsobuje degradaci C3b podjednotky komplementu (Zipfel et al., 2002; Skotarczak, 2009; Kraiczy et al., 2001; Alitalo et al., 2001).

### Lymfská borelióza u lidí a zvířat: klinické příznaky a průběh onemocnění

Lymfská borelióza patří mezi zoonózy postihující zejména člověka, ale i zvířata. Domestikovaná zvířata jsou důležitým bodem v epidemiologii tohoto onemocnění, jako účinný faktor přenosu lidské LB (Eng et al., 1988). Existuje značná podobnost mezi lidskou a zvířecí LB.

U člověka se na počátcích onemocnění objevuje erythema migrans (EM) a boreliový lymfocytom v místě kousnutí klíštěte. Časný symptomy zahrnují horečku, bolest hlavy, zimnici, schvácenost, bolest svalů a kloubů a zvětšené lymfatické uzliny. Při nezaléčení se infekce může rozšířit do kloubů, srdce a nervové soustavy. Ve druhé a třetí fázi onemocnění se objevují neurologické poruchy a artritidy. To může vyústit v závažné příznaky, jako je zánět mozku a míchy, nervové poruchy, necitlivost, nebo mravenčení v rukou či nohou a problémy s krátkodobou pamětí (Goossens, 2000).

U psů patří mezi obvyklé příznaky onemocnění: kulhání, horečka, zduření lymfatických uzlin a kloubů a snížená chuť k jídlu. V závažných případech se u zvířat může vyvinout onemocnění ledvin, srdce, nebo poruchy nervového systému. U zvířat nezaznamenáváme klasické kožní příznaky LB, které jsou typické pro lidské pacienty.

U koček je LB neobvyklá a mnoho z nich nevykazuje žádné příznaky onemocnění. Ty, které vykazují příznaky, trpí opakujícím se kulháním v důsledku zánětu. U jiných se může rozvinout akutní kulhavost, která trvá jen 3-4 dny s následným znovu navrácením po dnech až týdnech s kulhavostí stejné či jiné končetiny. Tento jev se nazývá "shifting-leg lameness", kdy se kulhavost přesouvá na jinou končetinu po navrácení původního kulhavého kloubu do normálního, funkčního stavu. Dále se mohou rozvinout ledvinové problémy, které bez zaléčení způsobují glomerulonefritidu, která vede k zánětu a disfunkci ledvinných glomerulů. V případě kompletního selhání ledvin začne kočka vykazovat takové znaky, jako zvracení, průjem, nechutenství, hubnutí, časté močení a žízeň, nahromadění tekutiny v břiše a tkáních zejména u končetin a v podkoží (Greene, 1991; Grauer et al., 1998; Levy a Duray, 1988; Härter et al., 1999; Hovius et al., 2000; Chang et al., 2001; Goossens et al., 2001; Cho

mel et al., 2001). I přesto, že je v současné době dostupná vakcína proti LB pro psy, žádná taková vakcína není k dispozici pro kočky.

Jak už bylo zmíněno, je prokázáno, že Lymfskou boreliózu u lidí způsobují tři z dnes známých dvaceti jedna druhů komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*Bb* s.l.). Jsou to *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (*Bb* s.s.), *Borrelia afzelii* a *Borrelia garinii*. Další druhy borelie mají pro člověka infekční potenciál, ale není dostatek popsanych případů Lymfské boreliózy, vyvolaných těmito druhy. Jsou to: *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. kurtenbachii*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii*, *B. valaisiana* a *B. americana*.

#### *B. afzelii*, *B. garinii*, *Bb* s.s.

Heterogenita těchto druhů borelií souvisí s vysokou heterogenitou povrchových antigenů, jako jsou *ospA* a *ospC*. Podle sérotypů jsou členěny do různých typů *ospA* 1-7 (Bartunek et al., 2006) a *ospC* (Barbour a Travinsky, 2010). Každá z borelií má rozdílný organotropismus. *B. afzelii* je spojována s kožními projevy onemocnění – EM a ACA (acrodermatitis chronica atrophicans). *B. garinii* má afinitu k nervové soustavě a působí neuroboreliózu a *Bb* s.s. je nejčastěji nalézána v kloubním aparátu a je spojena s artritidou (Bartunek et al., 2006).

#### **3.1.2 *Anaplasma* spp.**

*Anaplasma* patří mezi malé, gram negativní, obligátně intra-celulární alfa-proteobakterie napadající eozinofily, neutrofile a monocyty savců. V nich se replikují v rámci cytoplasmatické vakuoly odvozené z buněčné membrány. V Evropě je přenášena zejména klíšťaty *I. ricinus*. Již od minulého století je tato bakterie známá jako původce onemocnění přežvýkavců a koní. Dříve byla *Anaplasma* řazena mezi rody *Ehrlichia*, dnes je vyčleněna a na základě fylogenetických studií reklasifikována jako samostatný rod. Do dnešního dne bylo identifikováno celkem šest druhů anaplasmy, které vykazují rozdílnou hostitelskou preferenci a buněčný tropismus. *A. marginale* představuje značné riziko pro zdraví zvířat a podobně jako *A. centrale*, infikuje krvinky dobytka a divoce žijících přežvýkavců (Dumpler et al., 2001, 2005a,b). *A. ovis* a *A. bovis* je nezanedbatelným, obligátně intracelulárním patogenem menších přežvýkavců, který by měl být považován za hrozbu možné nižší produkce hospodářských zvířat (Inokuma, 2007; Renneker et al., 2013). *A. platys* a *A. phagocytophilum* infikují širokou škálu savců potažmo člověka (Rar a Golovljova, 2011).

*Anaplasma phagocytophilum*, způsobující granulocytární anaplasmózu u lidí, psů a koček (Rizzoli et al., 2014), je v klíšťatech *I. ricinus* často detekována s rozdílnou prevalencí (Stuen et al., 2013). Nesoulad mezi vysokým výskytem *A. phagocytophilum* v klíšťatech či savcích v porovnání s menším množstvím nahlášených případů onemocnění, může být podmíněno častým poddiagnostikováním. Další možností může být výskyt méně virulentních druhů v Evropě v porovnání například s USA (Barakova et al., 2014). Navíc nedávné rozsáhlé analýzy prokázaly existenci čtyř ekotypů *A. phagocytophilum* s výrazně odlišnými hostiteli. Analýzy byly založeny na "gro-EL heat-shock" proteinových sekvencích několika evropských vzorků obratlovců a klíšťat. Doposud byly všechny lidské případy zařazeny do tzv. **ekotypu I** s nejširší škálou hostitelů (domestikovaná zvířata, divoký kanec, jelen a ježek), **ekotyp II** je asociován se srnci a některými hlodavci, **ekotyp III** zaujímá pouze hlodavce a **ekotyp IV** ptáky (Jahfari et al., 2014).

Geografická distribuce, vektory a hostitelé rodů *Anaplasma* a *Ehrlichia* jsou představené v tabulce 2.

**Tab. 2:** Klasifikace rodu *Anaplasma* a *Ehrlichia* (Rar a Golovljova, 2011).

Druh	typ napadené buňky	Geograf. distribuce	vektor	hostitel
<i>A. phagocytophilum</i>	granulocyty	celosvětově	<i>Ixodes</i> spp.	přežvýkavci, psi, koně, hlodavci
<i>A. marginale</i>	erytrocyty	celosvětově (tropy, subtropy)	<i>Dermacentor</i> spp., <i>Rhipicephalus</i> spp.	dobytek, divocí přežvýkavci
<i>A. centrale</i>	erytrocyty	celosvětově (tropy, subtropy)	<i>Rhipicephalus simus</i>	skot
<i>A. platys</i>	krev. Destičky	Evropa, USA, Asie	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	psi
<i>A. ovis</i>	erytrocyty	Evropa, USA	<i>Dermacentor</i> spp., <i>Rhipicephalus</i> spp.	ovce, kozy, divocí přežvýkavci
<i>A. bovis</i>	monocyty	Afrika, J. Amerika, Asie	<i>Amblyoma</i> spp., <i>Hyalomma</i> spp.	skot, bucoli
<i>E. chaffensis</i>	monocyty, makrofágy	USA, Afrika, J. Amerika, Asie	<i>Amblyoma americanum</i>	jelen
<i>E. canis</i>	monocyty, makrofágy	celosvětově	<i>R. sanguineus</i> , <i>D. variabilis</i>	psi, psovité šelmy
<i>E. ewingii</i>	granulocyty	USA, Afrika, Asie	<i>Am. Americanum</i>	jeleni, psi
<i>E. muris</i>	monocyty, makrofágy	Euroasie	<i>Haemaphysalis</i> spp., <i>Ixodes</i> spp.	malí hlodavci
<i>E. ruminantium</i>	endoteliální buňky	Afrika, Karibik	<i>Amblyomma</i> spp.	skot, ovce, kozy

### Životní cyklus a vývoj *Anaplasma* spp.

S cílem napadnout leukocyty a trombocyty pronikají tyto infekční agens z klíštěte do budoucího hostitele. Výsledné onemocnění je pojmenováno podle typu zasažené buňky: *E. canis* infikuje monocyty, způsobuje tedy onemocnění CME ("canine monocytic

ehrlichiosis") (Skotarczak, 2003), *A. phagocytophilum* postihuje granulocyty člověka a psů, proto je pojmenovaná zkratkami HGA či CGA ("human or canine granulocytic anaplasmosis") (Woldehiwet, 2010), *A. platys* napadá krevní destičky a je původcem cyklické trombocytopenie CCT ("canine cyclic trombocytopenia") (Gaunt et al., 2010).

Stádium moruly se v krevním nátěru objevuje sporadicky, a proto se lze orientovat pouze podle poruch v počtu buněk: trombocytopenie, leukocytopenie a celková anémie (Mylonakis et al., 2003). V rámci diagnostiky jsou účinnější serologické testy, jako ELISA, IFAT a PCR, která je více citlivá a specifická díky možnosti stanovení a rozlišení jednotlivých druhů a schopnosti odhalit aktuální infekci (Iqbal et al., 1994; Harrus et al., 1998).

Infikované buňky jsou nasáty klíštětem spolu s krví, která slouží jako zdroj infekce buněk klíštěcích střev. Po vyvinutí anaplazmy v buňkách střeva se patogen šíří i do ostatních orgánů, včetně slinných žláz, odkud se bakterie dostává do zvířete v průběhu krmení klíštěte. Dvě formy anaplazmy jsou schopny infikovat klíštěcí buňky, kde jedna, tak zvaná "retikulární" forma, přechází v druhou "dense" formu, která je infekční a je přenášena kousnutím klíštěte. Všechna stádia klíštěte jsou schopna přenést anaplasmu (Kocan et al., 2003).

Anaplasma se replikuje uvnitř savčích granulocytů. Má pozoruhodnou schopnost převzít kontrolu nad regulačním systémem hostitelských buněk, aktivně reguluje a inhibuje jejich imunitní odpověď (Rikihisa, 2011).

#### Anaplasmóza u lidí a zvířat: klinické příznaky a průběh onemocnění

Ehrlichioza a Anaplasmóza patří mezi jedny z významných onemocnění přenášených klíšťaty a postihujících nejenom člověka, ale i jeho věrné společníky - zvířata. První případ lidské granulocytární anaplasmozy (HGA) v Evropě byl popsán v devadesátých letech (Petrovec et al., 1997). Typickými příznaky HGA jsou horečnaté stavy, bolesti svalů (myalgie) a hlavy a nevolnost. Symptomy mohou být nepatrné. Frekvence ohlášených případů anaplasmózy je vyšší u mužů a lidí kolem 40 let. Navíc je onemocnění závažnější u starších, nebo imunokompromitovaných osob. Mezi závažné příznaky patří selhání ledvin a plic. Příznaky dlouhodobého rázu zahrnují dýchací potíže, krvácení, selhání ledvin, nebo neurologické problémy. Anaplasmóza může být fatální, pokud se neléčí (odhadovaná míra úmrtnosti je nižší než 1%) (CDC, převzato z: [www.cdc.gov/anaplasmosis/](http://www.cdc.gov/anaplasmosis/)).



Mezi hlavní klinické příznaky onemocnění u psů patří anorexie, apatie, či stagnace pohybu, kulhavost a vysoké horečky. Tyto příznaky jsou závislé na věku a imunologickém stavu zvířete. Psi mohou být infikováni druhy *E. canis*, *E. chaffensis*, *E. ewingii*, *A. phagocytophilum* (dříve nazývaná *E. equi*, *E. phagocytophilum*) a *A. platys* (dříve pojmenovaná *E. platys*) (Dumpler et al, 2001). U psů byly prokázány i druhy *E. munis* a *E. ruminantum*, ale stejně jako *E. ewingii* a *E. chaffensis* nebyly tyto druhy doposud prokázány v Evropě (Kawahara et al., 1993; Hegarty et al., 2012; Sainz et al., 2015). Klinické příznaky onemocnění u zvířete jsou závislé i na druhu Anaplasmy, kterým je zvíře infikováno. Například infekce více častou formou anaplasmózy, *A. phagocytophilum*, často způsobuje kulhání, bolesti kloubů, horečku, letargii a nechutenství. Mezi méně běžné klinické příznaky patří zvracení, průjem, kašel a obtížné dýchání. Zřídka se objeví neurologické příznaky, jako jsou záchvaty. Infekce druhem *A. platys* způsobuje cyklickou trombocytopenii, stav, ve kterém periodicky klesá počet krevních destiček. Onemocnění je často mírné, ale u některých psů se mohou objevit modřiny nebo krvácení (včetně krvácení z čenichu), a to zejména v počátečních stádiích infekce, kdy počet krevních destiček klesne na nejnižší hladiny zachytelnosti (Billeter et al., 2007).

Psi, trpící anaplasmózou, vykazují stejné symptomy jako psi, trpící LB. Infekce oběma patogeny (koinfekce) není neobvyklá. Anaplasmóza i LB jsou běžně rozšířeny ve stejných oblastech a jsou přenášeny stejnými druhy klíšťat.

I když byly *Anaplasma* spp. dokumentovány jako původce onemocnění u koček, je jen málo informací o četnosti infekce, manifestaci onemocnění a možnostech léčby. Avšak u většiny zaznamenaných případů bylo onemocnění u koček patrné během 10-14 dnů po kousnutí klíštětem. Jsou známi i případy propuknutí nemoci až měsíce po kousnutí. Onemocnění probíhá stejně u obou pohlaví (kočky i kocoura) a větší možnost nákazy mají zvířata přebývající venku. Nejčastější příznaky jsou: letargie, nechutenství, horečky a oční abnormality (zánět spojivek). Oční příznaky jsou pravděpodobně důsledkem systémového zánětu. Méně často hlášené klinické příznaky jsou dehydratace, tachykardie, bolesti břicha, zřídka ataxie a hepatosplenomegalie (Ayllón et al., 2009).

#### *A. platys*

*A. platys* byla poprvé hlášena v USA roku 1978 a dnes je rozšířena po celém světě včetně Evropy. Jedná se o velice unikátní druh, který jako jediný intracelulární patogen zvířat či lidí specificky infikuje a napadá krevní destičky hostitele. Psi jsou všeobecně

nejběžnějším savčím hostitelem, i když byla *A. platys* sporadicky nalezena i u koček, impal a ovcí (Rick Alleman a Heather Wamsley, 2008). DNA *A. platys* byla nedávno objevena i u člověka a to u dvou členů rodiny v USA (Maggi et al., 2013) a také u dvou žen pocházejících z Venezuely (Arraga-Alvarado et al., 2014).

Další druhy *Ehrlichia/Anaplasma* spp., které doposud nebyly popsány v Evropě, mohou také infikovat člověka (Sainz et al., 2015). *Ehrlichia ewingii* byla prokázána jako původce infekce u imunosupresovaných pacientů (Buller et al., 1999), ale nejsou zde důkazy o přímé, či klíštětem způsobené transmissi ze psů na člověka. *Ehrlichia ruminantium*, která infikuje divoké druhy hlodavců, je rovněž schopná způsobit onemocnění u psů a lidí (Allsopp et al., 2005). *Ehrlichia chaffeensis* je původcem lidské monocytární ehrlichiozy (Ismail et al., 2010). *Amblyomma americanum* slouží jako vektor *E. chaffeensis* v USA. Mezi hlavní hostitele patří jelenec běloocasý, domácí psi, lišky, kozy a ptáci. Tento druh *Ehrlichia* spp. byl popsán u psů a jeho DNA byla nalezena v klíšťatech sajících na psech (Gutierrez et al., 2008). V neposlední řadě bylo prokázáno, že druh *E. muris* infikuje jak lidi, tak psy (Sainz et al., 2015).

U psů byla *A. platys* zaznamenána zejména ve státech středomořské oblasti zahrnujících Itálii, Španělsko, Portugalsko, Francii, Turecko, Řecko, Chorvatsko (Sainz et al., 2015).

### *E. canis*

I když organismus blízkce příbuzný *E. canis* byl objeven u obyvatel Venezuely (Perez et al., 1996), není do dnešního dne pro člověka považován za patogen s významným zoonotickým potenciálem.

*Ehrlichia canis* je jediný druh ze skupiny *Ehrlichia*, který byl izolován ze psů v Evropě. Další druhy nebyly doposud nalezeny (*E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* a *E. ruminantium*). Všechny evropské země hraničící se Středozezemním mořem jsou endemickými oblastmi pro *E. canis*. Některé studie naznačují, že tato infekční agens se rozšiřuje do oblastí severně od středomoří (např. Německo, Švýcarsko) (Dongus et al., 1996; Keysary et al., 1996; Pusterla et al., 1998; Aguirre et al., 2004). *E. canis* byla poprvé zaznamenána u psa v Alžírsku roku 1935. Psi nakažení tímto patogenem vykazovali příznaky horečky a anémie. Později se u vojenských pracovních psů ve Vietnamské válce objevily vážné symptomy tzv. tropické psí pancytopenie, která byla následně pojmenována psí monocytární ehrlichioza (CME) (Donatien a Lestoquard, 1935; Huxsoll et al., 1970). Několik studií zaznamenalo

přítomnost DNA *E. canis* u koček a kočkovitých šelem původem z Brazílie a Portugalska (Andre et al., 2010; Maia et al., 2014). Nicméně, na základě dosavadních údajů, nebyla do dnešního dne *E. canis* izolována z divokých ani domácích koček.

### 3.1.3 *Babesia* spp.

Klíště je vektorem řady intraerytrocytárních parazitických prvoků, jako například *Babesia* spp., cirkulujících v různých státech Evropy, napadajících červené krvinky a způsobujících onemocnění u člověka a zvířete (babesiózu). U člověka byly prokázány zejména *B. microti*, *B. divergens* a *B. venatorum*. Onemocnění u zvířete je poté způsobeno *B. canis*, *B. vogeli*, *B. caballi*, *B. gibboni* a *B. microti* podobné *Theileria annae* (Chauvin et al., 2009). Nález *Babesia* spp. se datuje již v 19. století, kdy jeho objevitel rumunský doktor Victor Babes pozoroval přemnožení tohoto mikroorganismu v červených krvinkách skotu a ovčí trpících hemoglobinurií (Uilenberg, 2006). Tyto organismy byly posléze pojmenovány *B. bovis* a *B. ovis* a zařazeny do rodu *Babesia*, pojmenovaném podle svého objevitele. Nedlouho po objevení tohoto patogenu u přežvýkavců byla babesie rovněž poprvé prokázána u italského psa v roce 1895 (Roncalli, 2001). Paraziti tohoto rodu jsou primárně přenášeni skrz klíštěcí kousnutí a mohou nakazit širokou škálu divokých i domestikovaných zvířat, stejně tak i člověka (Schnittger et al., 2012). Není překvapivým zjištěním, že právě psi jsou jedním z hlavních cílů mnoha *Babesia* spp., způsobujících psí babesiózu. Klíšťata čeledi klíšťatovití (*Ixodidae*) patří mezi hlavní vektory babesie (Solano, 2016). Zásadní je i dlouhodobá perzistence patogenu v ekosystému, díky jeho přenosu mezi jednotlivými generacemi klíšťat. Byl prokázán nejenom přenos mezi jednotlivými růstovými stádii klíštěte, ale také přenos transovariální (Chauvin et al., 2009). Babesióza je vzácné, závažné a často fatální onemocnění přenášené klíštětem, způsobené řadou druhů babesie. Dnes se toto závažné onemocnění vyskytuje po celém světě (Boozer et al., 2003; Solano-Gallego a Baneth, 2011).

Tradiční identifikace babesie se provádí pomocí mikroskopu, kdy se detekuje morfologie piroplasmatických merozoitů uvnitř erytrocytů. Na základě této identifikace a rozdílů ve velikosti a morfologii, lze tyto parazity rozdělit na velké, např. *B. canis*, a malé. *B. canis* patřící mezi velké formy parazita dnes obsahuje nejen *B. canis canis*, ale také *B. rossi*, *B. vogeli* (Carret et al., 1999) a *B. bigemina* jež byla popsána v USA (Birkenheuer et al., 2005). Mezi malé, klinicky významné parazity patří *B. gibsoni*, *B. conradae* (Kjemtrup a Conrad, 2006a; Kjemtrup et al., 2006b) a nedávno objevená *B. vulpes* (Baneth et al., 2015).

### Životní cyklus a vývoj *Babesia* spp.

V klišťeti parazit prožije sporogenní část životního cyklu a podstupuje sexuální konjugaci. Tato stádia se objevují v intestinálním lumenu a posléze v haemocoelu (cévná soustava) klišťete. Transovariální přenos (rovněž známý jako vertikální) byl dokumentován u "velkých babesí", ale ne u "malých". Skrz krevní potravu se sporozoity šíří ze slinných žláz klišťete přímo do jejich nového hostitele – obratlovce. V něm se dokončí životní cyklus prvoka asexuální replikací uvnitř červených krvinek hostitele a sporozoity se objevují ve formě merozoita (Solano-Gollego et al., 2016).

Člověk vstoupí do tohoto cyklu patogena po kousnutí infikovaným klišťetem. Během sání krve se sporozoity z klišťete dostávají do člověka, invadují jeho erythrocyty, kde se replikují. Namnožení parazita v krvi způsobuje hlavní projevy onemocnění. Člověk je často konečným hostitelem. Byl popsán přenos z člověka na člověka během krevní transfúze, kdy krev dárce obsahovala patogeny (převzato z: [www.identify.us.com](http://www.identify.us.com)).

### Babesióza u lidí a zvířat: klinické příznaky a průběh onemocnění

Více než 100 druhů babesie bylo do dnešního dne identifikováno u divokých a domestikovaných zvířat, ale pouze pár z nich infikuje člověka. Většina lidských případů onemocnění v USA je způsobeno *B. microti*, zatímco v Evropě bývá obvykle způsobeno *B. divergens* (Homer et al., 2000). Avšak i další druhy byly prokázány ve vzorcích z člověka, a to *B. duncani* (Persing et al., 1995) a *B. venatorum* (Sun et al., 2014). V Evropě je Babesióza znatelně méně častá, ale bývá častěji letální. Hodně lidí, kteří jsou infikováni babesí, nemají po delší dobu žádné symptomy. Pacienti se symptomatickou babesiózou trpí nespecifickými příznaky, napodobujícími virové horečnaté onemocnění (podobné jako malárie). Mezi nejčastější projevy onemocnění patří z počátku apatie a ztráta apetitu, následované změnou chování, poruchou vidění, bolestmi svalů, poruchami dýchání (mělkým dechem). Díky destrukci erythrocytů trpí nemocní také hemolytickou anémií a poruchou ledvin s možným selháním (Bajer et al., 2013). Tím, že babesie infikují a poškozují červené krvinky, způsobují u hostitele anémii zvanou hemolytická anémie. Tento typ anémie může vést ke žloutence a změně barvy moči na tmavou. Bez zlého léčení může babesióza vyústit v závažné, životu ohrožující onemocnění a to zejména v případech, kdy onemocní starší lidé (CDC, převzato z: [www.cdc.gov/parasites/babesiosis/](http://www.cdc.gov/parasites/babesiosis/)). První případ babesiózy u člověka byl identifikován v roce 1957 nedaleko Záhřebu (Chorvatsko) (Skrabalo a Deanovic, 1957). Ze začátku identifikovaná v Evropě a Severní Americe, lidská babesióza je nyní hlášená z

celého světa. Babesióza u člověka se dnes léčí antibiotiky a chininem. Není zde k dispozici žádná vakcína.

Psi jsou nejčastěji vystaveni tomuto parazitovi při kousnutí infikovaným klíštětem, ale přenos je možný i krevní transfuzí, krví při pokousání jiným, nakaženým psem a u štěňat je možný přenos přes placentu. Mladí psi trpí vážnějšími příznaky. Je zde i jistá odlišnost v náchylnosti jednotlivých plemen. Inkubační doba mezi expozicí a propuknutím prvních symptomů se pohybuje kolem 2 týdnů. Infekce může být buď mírná, bezpříznaková, nebo může způsobovat vážné příznaky. Babesie se replikují v červených krvinkách a dochází k jejich destrukci. Hemoglobin se uvolňuje do těla psa a může způsobovat žloutenku stejně jako anémii, která zahrnuje imunitně zprostředkovanou hemolytickou anémii. Navíc se mohou objevit vážné záněty a to nezávisle na samotné anémii. Dochází k poruše srážení krve a při invazi centrálního nervového systému může parazit způsobit i neurologické symptomy. Vážné případy psiho onemocnění mohou vykazovat poškození plic a jater. Příznaky mohou přicházet a odcházet, mohou zahrnovat nedostatek energie, nechutenství, slabost, horečku, bledé dásně a jazyk, oranžové nebo červené zbarvení moči, světlost stolice, hubnutí, zvětšené lymfatické uzliny, zežloutnutí očí a kůže (Solano-Gallego et al., 2016).

Babesióza se u koček prezentuje jako chronické onemocnění. Mnoho klinických příznaků (slabost, ztráta energie, žloutnutí kůže a očí, deprese, ztráta apetitu vedoucí ke ztrátě tělesné hmotnosti, zrychlené dýchání) jsou až sekundárním projevem onemocnění po propuknutí samotné hemolytické anémie, způsobené intraerytrocytární piroplasmatickou infekcí. Kočky se adaptují na tento anemický stav a nevykazují vážné příznaky, pokud nejsou stresovány. Vážnější případy mohou vyústit v edém plic, jaterní potíže a nervovou dysfunkci (Kumar et al., 2008).

#### *Babesia microti*

*Babesia microti* je zodpovědná za řadu infekcí v USA a to jak u zdravých pacientů, tak u asplenických pacientů (Gray et al., 2010). Řada případů byla hlášena v severní i jižní části Ameriky, jinde jsou celkem vzácné. Infekce byla také objevena v Asii (Taiwan a Japonsko) (Shih et al., 1997; Saito-Ito et al., 2000) a Austrálii (Senanayake et al., 2012). Přesto, že byla *B. microti* nalezena v klíšťatech v několika evropských zemích, způsobila pouze ojediněle případy lidského onemocnění (Meer-Scherrer et al., 2004; Hildenbrandt et al., 2013; Welc-Falęciak et al., 2015).

### *Babesia venatorum*

*B. venatorum* jako možný původce lidské babesiózy v Evropě, vykazuje určitou serologickou skříženou reaktivitu s *B. divergens* (Duh et al., 2007). Tento druh byl identifikován v klíštěti *I. ricinus* v několika evropských zemích, jako například Slovensko (Duh et al., 2005), Švýcarsko (Casati et al., 2006), Nizozemsko (Wielinga et al., 2009), Polsko (Cieniuch et al., 2009), Itálie (Cassini et al., 2010), Belgie (Lempereut et al., 2011), Německo (Schorn et al., 2011), Francie (Reis et al., 2011; Bonnet et al., 2007) a v neposlední řadě i v České republice kde např. v roce 2015 bylo nalezeno 0,5% klíšťat *I. ricinus* nakažených tímto druhem (Venclikova et al., 2015). V Itálii a Rakousku byly prvně popsány případy infekce *B. venatorum* u dvou nemocných asplenických mužů, trpících Hodgkinovo chorobou a B lymfomem. Klinické příznaky sahaly od mírných až po závažné. Oba pacienti byli zaléčeni clindamycinem a quaninem (Herwaldt et al., 2003; Häselbarth et al., 2007). Třetí a také velice neobvyklý evropský případ byl registrován v Německu. Asplenický muž s Hodgkinovou chorobou byl po dlouhou dobu seronegativní na specifické protilátky proti *B. venatorum*. Pacient prodělal i následný relaps onemocnění. To mohlo být způsobeno imunopresivním účinkem léčby. Mimo těchto případů není žádná další evidence onemocnění vyvolaného *B. venatorum* (Häselbarth et al., 2007).

### *B. divergens*

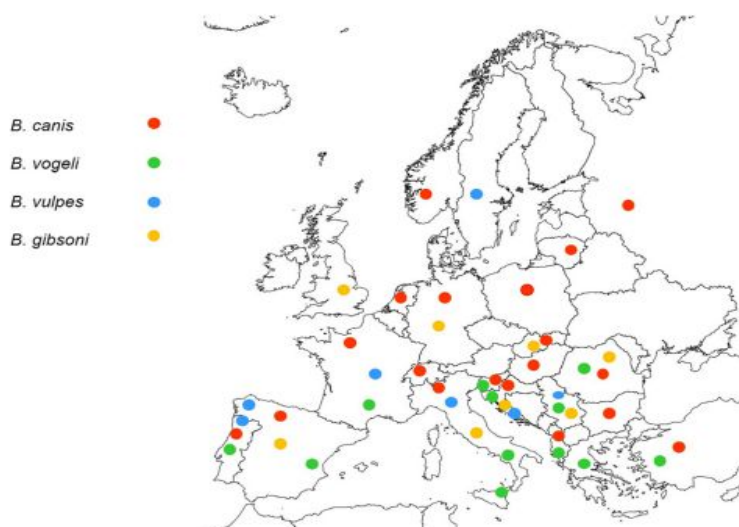
*B. divergens*, která je typickým patogenem napadajícím skot, způsobuje lidskou babesiózu u většiny nakažených evropanů. Od roku 2003 byly v Rakousku, Itálii a Německu zaznamenány četné případy lidského onemocnění způsobeného *B. divergens* (Herwaldt et al., 2003; Häselbarth et al., 2007). Klinické projevy onemocnění jsou omezeny zejména na jedince po splenektomii, či s poruchou funkce imunity (Martinot et al., 2011). Zvyšující se počet případů HIV pozitivních pacientů a imunokompetentních jedinců v městských oblastech může vést také k nárůstu počtu tohoto onemocnění (Hildebrandt et al., 2013).

Symptomy se dostaví náhle. Je to fulminantní, život ohrožující infekce. Během 1-3 týdnů se objevuje septická horečka, hemoglobinurie a žloutenka způsobená lýzou buněk. Více než 42% takových případů pacientů umírá (Vannier a Krause, 2009). Do dnešního dne bylo v Evropě zaznamenáno kolem 43 případů infekce *B. divergens* a to především u asplenických pacientů (Vannier a Krause, 2012). Několik vážných případů onemocnění *B. divergens* skončilo fatálně celkovým selháním orgánů 4-7 dnů po manifestaci hemoglobinurie.

### B. canis

*Babesia canis* je přenášena pijákem hnědým (*Rhipicephalus sanguineus*) v USA a klíšťaty *Dermacentor* v Evropě. *Babesia canis* se dělí do tří poddruhů: *B. canis vogeli*, *B. canis rossi* a *B. canis canis* (Uilenberg et al., 1989) a to na základě distribuce a antigenních vlastností. Z těchto jmenovaných je právě poslední zodpovědná za vážná onemocnění u psů napříč celou Evropou (Duh et al., 2004; Földvári et al., 2005; Adaszek a Winiarczyk, 2008;). *B. canis* byla diagnostikována v různých zemích severní Evropy, stejně jako ve střední a jižní Evropě (Solano-Gallego et al. 2011)

**Obr. 3:** Distribuce *Babesia* spp. detekovaných u psů v evropských zemích (Solano-Gallego et al., 2016).



### **3.1.4 Rickettsia spp.**

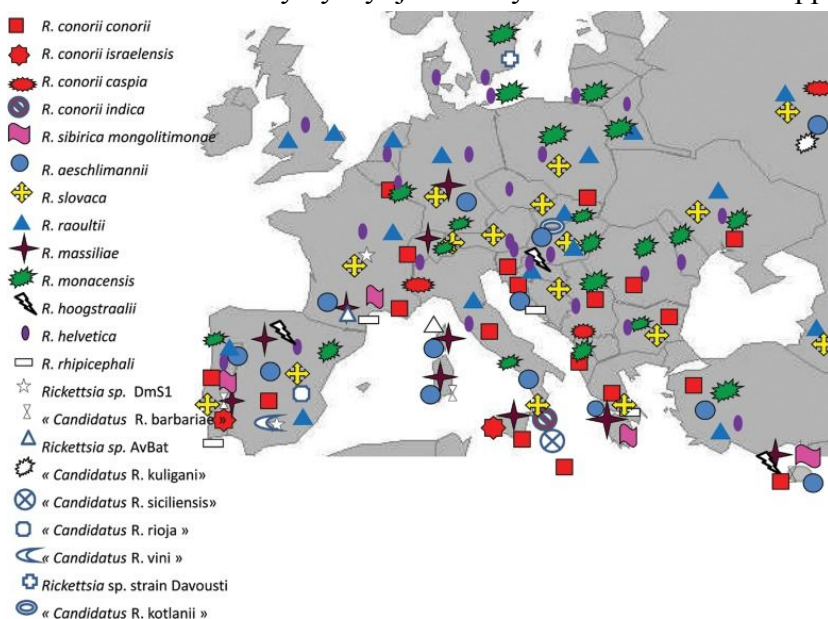
Tato skupina parazitů se řadí mezi obligátně intracelulární, aerobní alfa-proteobakterie patřící do rodiny *Rickettsiaceae*, skupiny *Rickettsiales* (Botelho-Nevers a Raoult, 2011). Tyto bakterie jsou schopny přežít volně bez cytosolu hostitelské buňky. *Rickettsiales* jsou tradičně děleny do dvou skupin: "typhus group" (MSF) a "spotted fever group" (SFG). SFG rickettsiae jsou spojeny s klíšťaty (hard ticks, rod *Ixodidae*), kromě druhů *R. akari* a *R. felis*, které jsou spojené s blechami. Klíšťata jsou schopná přenášet patogeny, jak mezi jednotlivými vývojovými stádii, tak i transovariálně (Raoult a Roux, 1997).

V Evropě je onemocnění rickettsiózou známo již delší dobu. Středomořský skvrnitý tyfus (MSF) byl doposud považován za jediné onemocnění v Evropě, způsobené druhem *R. conorii*. V posledních deseti letech byly zapojeny do lidské patologie ještě další druhy *Rickettsia* spp.: *R. slovaca*, *R. sibirica mongolotimonae* a *R. helvetica*. Navíc byly popsány další případy rickettsiózy přenášené blechou (*R. typhi*, *R. felis*).

Pro Evropu jsou charakteristické svým výskytem druhy: *R. felis*, *R. typhi*, *R. prowazekii*, *R. akari*, *R. conorii*, *R. slovaca*, *R. sibirica mongolotimonae*, *R. raoultii*, *R. massiliae*, *R. aeschlimanii*, *R. helvetica* a *R. monacensis*. Řada druhů rickettsiae je asociována s klíšťaty a řadí se mezi jakési symbionty, mikrosymbionty či endosymbionty. Patogenita těchto druhů není doposud zcela známá (Parola a Raoult, 2001).

Přítomnost *Rickettsia* spp. je dokumentována téměř ve všech zemích Evropy. Obrázek 5 vizualizuje geografickou distribuci jednotlivých druhů v Evropě, kde barevně zvýrazněné symboly značí infekční druh (Fournier et al., 2004).

**Obr. 4:** Aktualizovaný výskyt jednotlivých druhů *Rickettsia* spp. (Parola et al., 2013).



Evropská klíšťata rodu *I. ricinus* jsou vektory zejména dvou *Rickettsia* spp. a to *R. helvetica* a *R. monacensis* (Fernandez-Soto et al., 2006).



### Životní cyklus a vývoj *Rickettsia* spp.

Patogeny této skupiny patří mezi nepohyblivé, gramnegativní, vysoce pleomorfní bakterie bez schopnosti tvořit spory. Mohou se vyskytovat jako koky (0,1 $\mu$ m), vlákna (10 $\mu$ m dlouhé) a tyčky (1-4 $\mu$ m dlouhé). Jako obligátně intracelulární patogen se rickettsie po vstupu do eukaryotické (endoteliální) buňky hostitele replikuje v cytoplasmě, přežívá a dále roste. Není možné získat kulturu použitím umělých živin, proto je pěstovaná v tkáňových kulturách nebo se používá kuřecí embryo (Walker, 1996).

### Klinické znaky a průběh onemocnění u lidí a zvířat

SFG rickettsiae vyvolávají u lidí onemocnění známé jako DEBONEL ("Dermacentor-borne necrosis erythema lymphadenopathy") často nazývané také jako TIBOLA (tick-bornelymfadenopathy) (Ibarra, 2006). Obecné příznaky infekce *Rickettsia* spp. sahají od kožních projevů (vyrážka), zduřelých lymfatických uzlin, až po horečnaté onemocnění doprovázené bolestmi hlavy, kloubů a svalů (Bacellar et al., 1999; Parola a Raoult, 2001; Fournier et al., 2004, 2005). Klinické projevy se objevují 4. až 10. den po kousnutí klíštětem a liší se dle konkrétního druhu rickettsie. Pacienti jsou léčeni antibiotiky, konkrétně tetracykliny (doxycyklin) (Karpathy et al., 2007). Léčba by měla být započata co nejdříve od prvních projevů onemocnění. Ke snížení teploty dochází po dvou dnech. Vážně nemocné pacienty je třeba léčit delší dobu, než je vidět zřetelné zlepšení zdravotního stavu.

Evropští klinici by měli brát na zřetel i další onemocnění vyvolávané *Rickettsia* spp., mezi které patří cestovatelské: horečka skaliských hor (*R. rickettsii*), africká horečka (*Rickettsia africae*) a orientální skvrnitý tyfus (*Rickettsia japonica*) (Heyman et al., 2010).

Nezávisle na druhu SFG rickettsiae, představují tyto organismy u psa akutní horečnaté onemocnění, trvající po dobu 7 až 10 dní. Sekundární projevy onemocnění zahrnují poškození endoteliálních buněk, které způsobuje vaskulitidy, edém a nekrózu. Psi se mohou vyléčit spontánně, být zaléčeni doxycyklinem, nebo umřít. Pro toto onemocnění neexistuje žádná chronická fáze, po infekci vzniká nejspíše permanentní imunita. Klinické příznaky u psů jsou ve většině případů identické těm lidským příznakům onemocnění. Pes slouží jako sentinel pro MSF, proto je zásadní zavedení veterinárního vyšetření. Diagnostické potvrzení onemocnění MSF u psa umožní veterinářům zohlednit možné riziko přenosu *R. rickettsii*. Díky ohniskové distribuci *R. rickettsii* v populaci klíšťat mohou psi sloužit jako bezprostřední sentinely k přenosu onemocnění. Několik záznamů v literatuře

popisuje diagnózu onemocnění RMSF ("Rocky mountain spotted fever") u psů a v některých případech právě tyto vedou k identifikaci infekce u lidí ze stejného prostředí či domácnosti (Paddock et al., 2002; Elchos a Goddard, 2003).

SFG je u koček nalezeno a diagnostikováno pouze sporadicky. Nejčastějším původcem infekce rickettsií je u nich *R. felis*, přenášená blechou. Infekce jsou asymptomatické.

Evropská klíšťata rodu *I. ricinus* jsou přenašeči zejména dvou *Rickettsia* spp. a to *R. helvetica* a *R. monacensis*. (Fernandez-Soto et al., 2006)

#### *Rickettsia helvetica*

*Rickettsia helvetica* byla z klíštěte *I. ricinus* poprvé izolována ve Švýcarsku roku 1979 (Burgdorfer et al. 1979). Později byla nalezena v mnoha evropských a asijských zemích (Beati et al. 1993; Fournier et al. 2002). Klíště *I. ricinus* je považováno za klasického vektora tohoto patogenu, avšak v Chorvatsku byla *R. helvetica* rovněž objevena v klíštěti *D. reticulatus* (Dobec et al., 2009). I když byla *R. helvetica* prvotně považována za nepatogenní druh pro člověka a pro mnoho druhů zvířat, některé případy naznačují schopnost této rickettsie způsobit nespecifické symptomy onemocnění. Onemocnění způsobené tímto druhem rickettsie je spojeno s následujícími příznaky: erythema migrans nebo vyrážka, horečka, bolest hlavy, artralgie (bolest kloubů), myalgie (svalové stahy) (Fournier et al., 2004; Parola, 2005). V roce 1999 byl tento druh asociován s chronickou perikarditidou u švédského pacienta s náhlou srdeční smrtí (Nilson et al., 1999). *Rickettsia helvetica* byla nalezena v krevních vzorcích ze psů, koček, lišek a dalších volně žijících zvířat (Boretti et al., 2009).

#### *R. monacensis*

Tento druh byl prokázán v klíšťatech *I. ricinus* v městských a příměstských oblastech Slovenska, České republiky, Německa, Srbska, Polska a Portugalska (Rizzoli et al., 2014). Podobně jako druh *R. conori* patří mezi SFG asociované se středomořským skvrnitým tyfem (Jado et al., 2007). V roce 2005 byla *R. monacensis* identifikována jako lidský patogen u dvou španělských pacientů. Oba pacienti byli staršího věku. Před prvními příznaky choroby byli pokousáni klíštětem. Dále pak u mladého italského pacienta ze Sardinie (Jado et al., 2007; Madeddu et al., 2012). Onemocnění, kromě horečky a symptomů podobným chřipkovému onemocnění, se projevuje vyrážkami například na dlaních a chodidlech, stejně jako v místě inokulace klíštěte (Rizzoli et al., 2014).

## **4. Materiály a metody**

### **4.1 Sběr a zpracování klíšťat**

Sběr nenasátých, polonasátých a plně nasátých klíšťat z potulných psů a koček probíhal v průběhu let 2014, 2015 a 2016. Veškerá klíšťata byla získána ve spolupráci s útlukem pro psy a kočky na Zlaté stoce (Na Zlaté stoce 690/3, České Budějovice 2). Klíšťata byla rozříděna podle pohlaví, místa nálezu zvířete, data nálezu a podle stupně nasátí.

#### **4.1.1 Zpracování vzorků**

Klíšťata byla sbírána po odchytení zvířete (psa či kočky) do 15ml zkumavek zajištěných víčkem a opatřených popiskem s informací o místě odchyty, pravděpodobném věku a pohlaví zvířete. Takto popsané zkumavky byly do doby dalšího zpracování uchovány při teplotě +4 °C. Následně byla klíšťata rozříděna dle pohlaví do jednotlivých zkumavek typu eppendorf. Zkumavky byly opatřeny popiskem s informací o pohlaví (samice/samec), datu odchyty a sběru klíštěte, zdali bylo klíště nasáté, polonasáté či nenasáté a číslem vzorku. Takto rozdělené vzorky byly do dalšího zpracování uchovány v mrazáku při teplotě -20°C.

Před samotnou izolací genomové DNA klíšťat bylo provedeno promývání vzorků dle následujícího postupu:

1. 10% chlorové bělidlo – 10 minut
2. ddH<sub>2</sub>O
3. 70% EtOH – 10 minut
4. ddH<sub>2</sub>O
5. Usušení

Po promývání byla klíšťata rozkrájena na 4-6 kousků sterilním skalpelem.

#### **4.1.2 Isolace genomové DNA z klíšťat**

K purifikaci genomové DNA byl použit "DNeasy Blood & Tissue Kit" od firmy Qiagen. Jednotlivé kroky byly dodrženy přesně podle přiloženého protokolu výrobce. Takto byly vzorky připraveny k následné PCR reakci.

### 4.1.3 Polymerázová řetězcová reakce

Pro "screening" klíšťat na přítomnost jednotlivých patogenů (*Bb* s.l., Anaplasmy, Rickettsie a Babesie) byla použita PCR reakce s využitím specifických primerů, které jsou vyjmenovány v tabulce 4. K přesné identifikace druhu borelie byly u některých vzorků dodatečně použity primery k amplifikaci "housekeeping" genů (*clpA*, *cplX*, *pepX*, *pyrG*, *nifS*, *recG*, *rplB* a *uvrA*). Pro potvrzení inzertu v plasmidu po klonování PCR produktu byly použity primery M13 forward a reverse. Všechny složky PCR reakce jsou zaneseny do tabulky 3.

**Tab. 3:** Složky PCR reakce.

Složky reakční směsy	množství	
Taq DNA polymeráza*	0,5 µl	* komponenty nahrazeny 2x PCR Master mix (Promega)
25 mM MgCl <sub>2</sub> *	2 µl	
10 mM dNTPs *	1 µl	
10x reakční pufr *	2 µl	
ddH <sub>2</sub> O	v závislosti na množství templátu	
1 mM primer forward	1 µl	
1 mM primer reverse	1 µl	
Genomová DNA	1-4 µl	

Konečný objem PCR amplifikace byl 20µl. Jako negativní kontrola byla v reakci použita ddH<sub>2</sub>O a jako pozitivní kontrola byla použita DNA purifikovaná z kultury borelií. V případě ostatních patogenů byl PCR produkt z pozitivních klíšťat zaklonován do plasmidu. Získaná plasmidová DNA byla používána jako pozitivní kontrola. Jednotlivé kroky amplifikace jsou popsány níže:

1. Denaturace: 96°C, 5 min
  2. Denaturace: 95°C, 30 s
  3. Nasedání primerů: 50 – 63°C, 30s (teplota dle použitých primerů)
  4. Elongace: 72°C, 30s
  5. Konečná elongace: 72°C, 5-10 min
  6. Vzorky udržovány v cycleru při 4°C, ∞
- } 30/35 cyklů

\*reakce probíhala v "Master Cycler" (Eppendorf).

Po první amplifikační reakci (spacer PCR) následovala u některých vzorků druhá amplifikační reakce ("nested" PCR s druhým párem vnitřních primerů) ke zvýšení množství amplifikované DNA a zamezení možné inhibice větším množstvím necílové DNA ve vzorku. Jako templát bylo použito 5 µl z první "spacer" reakce.

Všechny použité primery jsou uvedeny v tabulce 4.

**Tab. 4:** Primery použité pro PCR reakce.

Patogen	Primer	Gen	Sekvence (5'→3')	Teplota nasedání (°C)	Autor
<i>Borrelia</i> spp.	<i>flaB</i> Outer F	<i>flagellin B</i>	AARGAATTGGCAGTTCAATC	52	Clark et al., 2005
	<i>flaB</i> Outer R		GCATTTTCWATTTTAGCAAGTGATG	52	
	<i>flaB</i> Inner F		ACATATTCAGATGCAGACAGAGGTTCTA	55	
	<i>flaB</i> Inner R		GAAGGTGCTGTAGCAGGTGCTGGCTGT	55	
	<i>ospC</i> Outer F	<i>ospC</i>	ATGAAAAAGAATACATTAAGTGC	52	Bunikis et al., 2004
	<i>ospC</i> Outer R		ATTAATCTTATAATATTGATTTTAATTAAGG	52	
	<i>ospC</i> Inner F		TATTAATGACTTTATTTTATTATATCT	55	
	<i>ospC</i> Inner R		TTGATTTTAATTAAGGTTTTTTTGG	55	
	<i>p66</i> Outer F	<i>p66</i>	CGAAGATACTAAATCTGT	50	Clark et al., 2005
	<i>p66</i> Outer R		GCTGCTTTTGAGATGTGTCC	50	
	<i>p66</i> Inner F		TGCAGAAACACCTTTTGAAT	50	
	<i>p66</i> Inner R		AATCAGTTCCCATTGCA	50	
<i>Anaplasma</i> spp.	A/Efor F	16S rRNA	GGGGATGATGTCAARTCAGCAY	60	Tabar et al., 2008
	A/Erev R		CACCAGCTTCGAGTTAAGCCAAT	60	
<i>Babesia</i> spp.	RLB-F2	18S rRNA	GACACAGGGAGGTAGTGACAAG	63	Matjila et al., 2004
	B.mic1075lo		AACCCAAAGACTTTGATTTCTCTC	63	
	Babesia spp. F		GTTTCTGMCCCATCAGCTTGAC	61	Hilpertshauer et al. 2006
	Babesia spp. R		CAAGACAAAAGTCTGCTTGAAC	61	
<i>Rickettsia</i> spp.	Rmasglta 863up F	<i>gltA</i>	GCTAAAGCTAAGGATAAAAATGAT	52	Matjila et al., 2004
	Rmasglta1065lo R		TCAATAAAATATTCATCTTTAAGAGC	52	
	RpCS.750p Outer F		GACCATGAGCAGAATGCTTCT	50	Roux et al., 2000
	RpCS.1258n Outer R		ATTGCAAAAGTACAGTGAAC	50	
	RpCS.877p Inner F		GGGGCCTGCTCACGGCGG	50	
	RpCS.1258n Inner R		ATTGCAAAAAGTACAGTGAAC	50	
<b>M13</b>	M13 F		GTAAAACGACGGCCAG	50	Euroimmun, 2005
	M13 R		CAGGAAACAGCTATGAC	50	

Podmínky reakce "spacer" a "nested" ("semi-nested" u *nifS* a *rplB*) pro "housekeeping" geny borelie s primery *clpA*, *clpX*, *pepX*, *pyrG*, *nifS*, *rplB*, *uvrA* jsou popsány níže:

### Reakce ("spacer" PCR)

1. Denaturace: 95°C, 15 min
  2. Denaturace: 94°C, 30 sekund
  3. Nasedání primerů: 55°C – 48°C, 30
  4. Elongace: 72°C, 30 s
  5. Denaturace: 94°C, 30 s
  6. Nasedání primerů: 48°C, 30 s
  7. Elongace: 72°C, 30 s
  8. Závěrečná elongace: 72°C, 5min
  9. Vzorky udržovány v cycleru: 14°C, ∞
- } 35 cyklů
- } 20 cyklů

\*s každým cyklem se teplota snížila o 1°C (tzv. "touchdown")

1. Denaturace: 95°C, 15 min
  2. Denaturace: 94°C, 30 s
  3. Nasedání primerů: 55°C , 30 s
  4. Elongace: 72°C, 30 s
  5. Závěrečná elongace: 72°C, 5 min
  6. Vzorky udržovány v cycleru: 14°C, ∞
- } 35 cyklů

Podmínky PCR reakce s primery pro *recG* se lišily a jsou popsány níže:

"Spacer" reakce s outer primery probíhala následovně:

1. Počáteční denaturace: 95°C, 15 min
  2. Denaturace: 94°C, 30 s
  3. Nasedání primerů: 50°C , 30 s
  4. Elongace: 72°C, 30 s
  5. Závěrečná elongace: 72°C, 5 min
  6. Vzotky udržovány v cycleru: 14°C, ∞
- } 30 cyklů

Druhá tzv. "nested" reakce probíhala při stejných podmínkách jako "spacer" reakce až na první krok denaturace, kdy se změnil čas na 7 minut. Jako templát bylo použito 5µl z první "spacer" reakce. Podmínky reakce pro "housekeeping" geny byly převzaty z práce Margos et al., 2008.

**Tab. 5:** Primery pro amplifikační reakci "housekeeping" genů borelie.

Primer	Teplota nasedání (°C)	Sekvence (5'→3')	Autor
<i>clpA</i> Outer F	50	GATAGATTTCTCCAGACAAAG	Margos et al., 2008
<i>clpA</i> Outer R	50	TTCATCTATTAAGGCTTTCCC	
<i>clpA</i> Inner F	48	GACAAAGCTTTTGATATTTTAG	
<i>clpA</i> Inner R	48	CAAAAAAACATCAAATTTTCTATCTC	
<i>clpX</i> Outer F	50	GCTGCAGAGATGAATGTGCC	
<i>clpX</i> Outer R	50	GATTGATTCATATAACTCTTTTG	
<i>clpX</i> Inner F	48	AATGTGCCATTTGCAATAGC	
<i>clpX</i> Inner R	48	TTAAGAAGACCCTCTAAAATAG	
<i>nifS</i> Outer F	50	GTTGGAGCAAGCATTATG	
<i>nifS</i> Outer R	50	GTTGGAGCAAGCATTATG	
<i>nifS</i> Inner F	48	ATGGATTTCAAACAAATAAAAAAG	
<i>nifS</i> Inner R	48	TCACAGCCAATTTTTTTAAC	
<i>pepX</i> Outer F	50	ACAGAGACTTAAGCTTAGCAG	
<i>pepX</i> Outer R	50	GTTCCAATGTCAATAGTTTC	
<i>pepX</i> Inner F	48	TTATTCCAAACCTTGCAATCC	
<i>pepX</i> Inner R	48	TGTGCCCTGAAGGAACATTTG	
<i>pyrG</i> Outer F	50	GATTGCAAGTTCTGAGAATA	
<i>pyrG</i> Outer R	50	CAAACATTACGAGCAAATTC	
<i>pyrG</i> Inner F	48	GATATGGAAAATATTTTATTTATTG	
<i>pyrG</i> Inner R	48	AAACCAAGACAAATTCCAAG	
<i>recG</i> Outer F	50	CCCTTGTTGCCTTGCTTTC	
<i>recG</i> Outer R	50	GAAAGTCCAAAACGCTCAG	
<i>recG</i> Inner F	48	CTTAATTGAAGCTGGATATC	
<i>recG</i> Inner R	48	CAAGTTGCATTTGGACAATC	
<i>rplB</i> Outer F	50	TGGGTATTAAGACTTATAAGC	
<i>rplB</i> Outer R	50	GCTGTCCCAAGGAGACA	
<i>rplB</i> Inner F	48	CGCTATAAGACGACTTTATC	
<i>rplB</i> Inner R	48	GCTGTCCCAAGGAGACA	
<i>uvrA</i> Outer F	50	GCTTAAATTTTAATTGATGTTGG	
<i>uvrA</i> Outer R	50	CCTATTGGTTTTTGATTTATTG	
<i>uvrA</i> Inner F	48	GAAATTTTAAAGGAAATTAAGTAG	
<i>uvrA</i> Inner R	48	CAAGGAACAAAAACATCTGG	

#### **4.1.4 Elektroforéza**

Jednotlivé PCR produkty byly rozdělovány podle velikosti v 0,9-1,5 % agarozovém gelu /1x TAE pufru při napětí 50-100 V. Před nanesením vzorků na gel k nim bylo přidáno 3,3  $\mu$ l 6x vzorkového pufru Orange DNA Loading Dye (Thermo Scientific) s obsahem 50x SYBR Green, který umožnil následnou vizualizaci výsledků pod UV světlem.

#### **4.1.5 Purifikace DNA z gelu**

PCR produkty rozdělené na 0,9-1,5% agarózovém gelu byly extrahovány pomocí kolon "Ultrafree DA DNA extraction from agarose gels" (Millipore) přesně dle protokolu a doporučení výrobce s využitím centrifugy (Centrifuge 5415 C, Eppendorf, Centrifuge 5415D, Eppendorf). Po přečištění a změření koncentrací na spektrofotometru (Nano dropSpectrophotometer, Thermo Scientific) byly vzorky sekvenovány.

#### **4.1.6 Sekvenování**

Sekvenační reakce byly připravené podle požadavků sekvenační laboratoře (©SEQme s.r.o.) následovně: pokud byl PCR produkt < 500 bp, bylo použito 50 ng vzorku, ke kterému bylo přidáno 25 pmol primeru (který byl použit pro amplifikaci). V případě, že velikost PCR produktu byla v rozpětí 500 – 1000 bp, bylo použito 100 ng vzorku a 25 pmol primeru. Při sekvenaci plazmidové DNA bylo k 500 ng vzorku přidáno 25 pmol primeru.

\*celkový objem reakce 10  $\mu$ l

#### **4.1.7 Klonování a transformační reakce**

Pro přesné ověření sekvence vzorků, byly PCR produkty zaklonovány do PCR<sup>®</sup> 4-TOPO vektoru pro sekvenaci. Veškeré kroky klonovací reakce byly provedeny podle protokolu od výrobce "TOPO TA Cloning Kit For Sequencing" (Invitrogen). Pro transformace byly použity kompetentní buňky DH5 $\alpha$ . Transformační směs byla rozetřena na předem připravené Petriho misky s LB agarem a ampicilinem (50 mg/ml) a přes noc inkubována při 37°C.

Druhý den byly jednotlivé kolonie přeneseny do LB média s ampicilinem (50 mg/ml) a inkubovány přes noc na 37°C na třepačce. Další den byly buněčné kultury stočeny při max. otáčkách po dobu 15 minut.

Po odsání supernatantu byl buněčný pelet zmrazen či ihned použit k purifikaci plazmidové DNA pomocí kitu "QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit" podle protokolu od výrobce. Konečným krokem purifikace byla eluce DNA z kolonky 30  $\mu$ l dvakrát deionizované vody.



#### 4.1.8 Ověření úspěšnosti klonování a transformace

K ověření přítomnosti inzertu byla použita PCR reakce s gen-specifickými primery, které byly použity k získání PCR produktu s vektor specifickými primery M13 (forward, reverse). PCR produkty se analyzovaly s použitím 1.5-2% agarozového gelu. Výsledek byl vizualizován pod UV lampou. Pozitivní vzorky byly odeslány na sekvenaci.

Všechny přístroje použité při této práci, chemické látky a programy k úpravě a analýze sekvencí jsou zaznamenány v tabulkách 6 a 7.

**Tab. 6:** Použité chemikálie.

Látka	Komponenty	
2x Master mix	Taq DNA polymeráza [doplněno reakčním pufrém (pH 8,5)] 400 μM dATP, 400 μM dGTP, 400 μM dCTP, 400 μM dTTP, 3 mM MgCl <sub>2</sub> (Promega)	PCR reakce
50x TAE pufr	200 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA	Elektroforéza
Agaróza	Agarosa (Serva) pro DNA ELFO, 1xTAE pufr	
Marker	100 bp Plus Gene Ruller (Sigma a Invitrogen)	
Vzorkový pufr	Blue/Orange 6x loading dye, (0,03% bromophenol blue, 0,03% xylene cyanol FF, 0,4% orange G, 15% Ficoll™ 400, 10mM TrisHCl (pH 7,5) a 50mM EDTA (pH 8,0) (MBI Fermentas)	
S.O.C. médium	2% trypton, 0,5% výtazek z kvasnic, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> a 20 mM glukóza	Klonování a transformáční reakce
Ampicilin	50 mg/ml stock sol.	
Kultivační médium	Luria-Bertani Medium (LB médium) [25 g LB Broth, Miller, Tissue Culture Grade (Amresco)/1l dH <sub>2</sub> O]	
LB/agar	20 g/L Gibco® LB Broth, 10 g SELECT Peptone 140, 5 g SELECT Yeast Extract, 5 g NaCl	

**Tab. 7:** Přístroje použité při práci se vzorky.

PCR box	DNA/RNA UV cleaner UVC/T-M-AR (Biosan)
PCR cycler	Mastercycler personal (Eppendorf)
Elektroforéza	OVL Easycast™ B2 (Thermo scientific)
Centrifugy	5415 C (Eppendorf), 5415D (Eppendorf)
Flow box	Gelaire
Focení gelů	FotosystémKodak
Nanodrop (měření koncentrace)	NanoDrop®, ND-1000 Spectrophotometer

#### 4.2 Analýza sekvence

Analýza sekvencí byla provedena pomocí modulu EditSeq a Seqman (DNASTAR) a ověřeny v GenBank pomocí Blast Search.

## MLST ("Multilocus sequence typing")

Pro potvrzení druhové specifičnosti některých vzorků byla použita metoda detekce variací mezi sekvencemi "housekeeping" genů, která charakterizuje jednotlivé druhy na základě jejich unikátních alelických profilů. MLST analýza byla provedena pomocí databáze MLST- [www.pubmlst.org](http://www.pubmlst.org).

## 5. Výsledky

Pro výzkum incidence a infekčnosti klíšťat čtyřmi patogeny (*Borrelia* spp., *Anaplasma* spp., *Babesia* spp. a *Rickettsia* spp.) byla zvolena metoda sběru klíšťat přímo ze psů a koček, odchycených v Českých Budějovicích a okolí ve spolupráci s útulkem pro zatoulané psy a kočky Na Zlaté stoce (Na Zlaté stoce 690/3, České Budějovice 2).

### 5.1 Výsledky sběrů klíšťat

Jednotlivé oblasti okolí Českých Budějovic, kde byla zvířata odchycena, spolu s informací o počtu a pohlaví klíšťat nalezených na těchto zvířatech, jsou zaznamenány v tabulce 8. Za dobu sběru vzorků bylo získáno celkem 343 klíšťat.

**Tab. 8:** Místa odchyty zvířat a na nich nalezená klíšťata.

Oblast	Odchycené kočky	Klíšťata	Odchycení psi	Klíšťata
Kamenný Újezd	32	54 (♂4, ♀50)	1	1♂
Pražská ul.	1	1♀	-	-
Azylový dům ČB	2	18 (17♀, 1♂)	-	-
Arpida centrum	1	12♀	1	1♀
Havlíčkova kolonie	-	-	2	2♀
Jírovcova ul.	-	-	1	7♀
Na Zlaté stoce	2	3♀	2	2♀
Novohradská ul.	-	-	5	9 (8♀, 1♂)
Stromovka	-	-	14	23 (17♀, 6♂)
České Vrbné	-	-	1	2♀
Vrbenské rybníky	-	-	1	1♀
Hůrská ul.	-	-	2	3 (2♀, 1♂)
Pekárenská ul.	-	-	1	4♀
Rudolfovo	-	-	3	3♀
Zliv	-	-	1	1♀
Otavská	-	-	1	2♀
Dřiteň	-	-	1	3♀
Vrbenská ul.	-	-	1	1♀
Okružní ul.	-	-	1	1♀
Břeží	-	-	2	3♀
Hl. nad Vltavou	-	-	4	10♀
ČB n.	1	3♀	22	173 (164♀, 9♂)

\*n.- nespecifikováno

Celkem 92 klíšťat bylo nalezeno na 39 kočkách (27 ♂, 12 ♀), v průměru 2,4 klíštěte na jednu kočku. Dohromady bylo potvrzeno 23 (59%) koček s infekcí 1 patogenem, 8 (21%) se 2 a více.

Na 67 psech bylo nalezeno 251 klíšťat, v průměru 3,7 klíštěte na jednoho psa. Byla prokázána infekce 24 (36%) psů s 1 patogenem, 8 (12%) se 2 a více patogeny

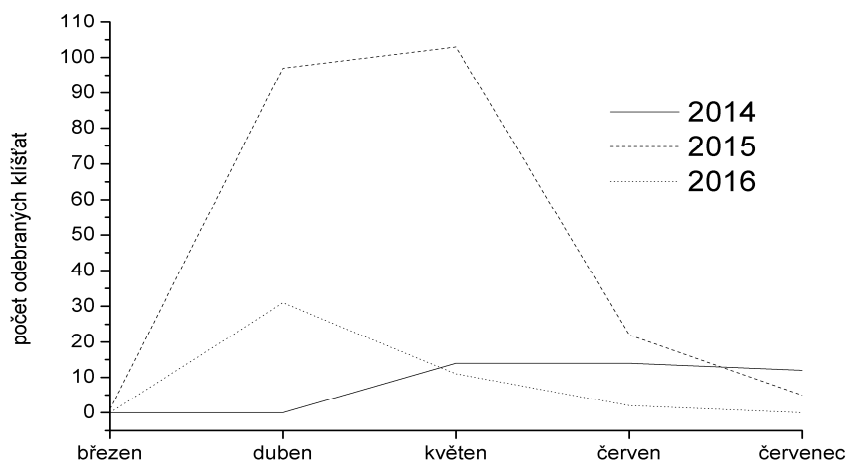
**Tab. 9:** Počty klíšťat nasbíraných v jednotlivých měsících roku 2014, 2015 a 2016.

Měsíc	počet klíšťat	Rok sběru
květen	14	2014
červen	14	
červenec	12	
celkem	40	
březen	1	2015
duben	97	
květen	103	
červen	22	
červenec	5	
celkem	259	2016
duben	31	
květen	11	
červen	2	
celkem	44	

Počty nalezených klíšťat se v průběhu měsíců lišily. Byl potvrzený jarní pík a to zejména v měsících duben a květen, kdy byl průměrný počet klíšťat nejvyšší.

Informace zanesené do tabulky 9 jsou znázorněny v grafu na obrázku 5.

**Obr. 5:** Počty klíšťat v průběhu let 2014, 2015 a 2016.



## 5.2 Výsledky analýzy vzorků na přítomnost patogenů *Babesia* spp., *Rickettsia* spp., *B. burgdorferi* s.l. a *Anaplasma* spp.

Na přítomnost jednotlivých patogenů bylo vyšetřeno celkem 343 klíšťat z toho 93,29% (n = 320) samic a 6,71% (n = 23) samců. Identifikace klíšťat prokázala, že klíšťata druhu *I. ricinus* (n = 323) představovala většinu všech vyšetřených klíšťat (94,17%), z toho 93,19% samic (n = 301), 6,81% samců (n = 22). Dále bylo nalezeno nápadně méně klíšťat rodu *I. hexagonus* (n = 20) 5,83%, z toho 5% samců (n = 1) a 95% samic (n = 19).

Z celkového počtu analyzovaných klíšťat bylo 44,3% nakaženo jedním patogenem a 5,25% dvěma a více patogeny. Z toho *I. ricinus* – 44,3% s jedním patogenem a 5,25% se dvěma a více patogeny a *I. hexagonus* – 3,5% jedním patogenem.

Pro optimalizaci podmínek PCR reakcí byly upraveny podmínky amplifikační reakce, množství templátové DNA a byly použity různé primery.

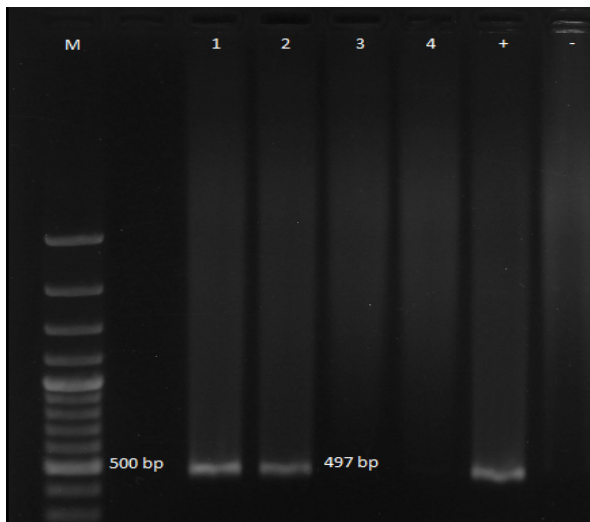
Ke stanovení přítomnosti *Borrelia* spp. ve vzorcích pomocí PCR, byly použity primery pro *flaB* gen (Clark et al., 2005).

Příklad výsledku amplifikační reakce je uveden na obrázku 6 (A), jamky 1 a 2 jsou pozitivní vzorky (velikost PCR produktu 479 bp). Na stejném obrázku (B) je vidět výsledek

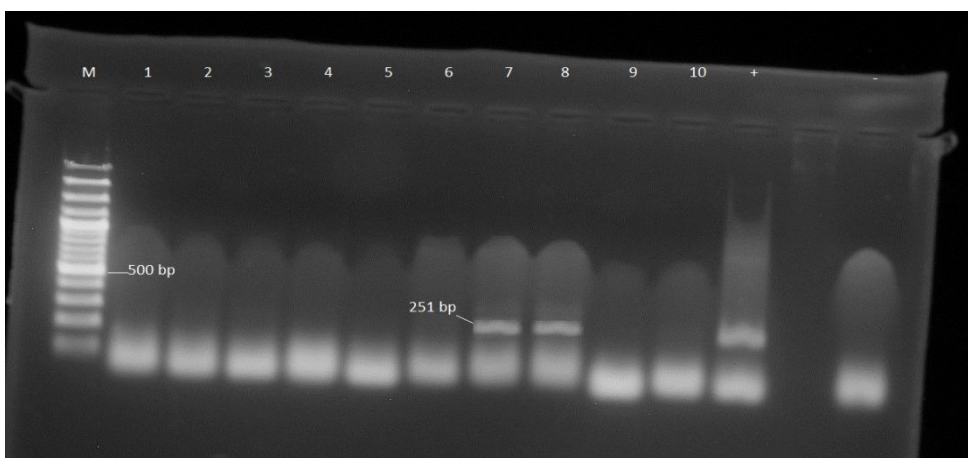
amplifikační reakce s primery pro 16S rRNA *Anaplasma* spp. (Tabar et al., 2008), jamky 7 a 8 - pozitivní vzorky (velikost PCR produktu 251 bp).

**Obr. 6:** Výsledky amplifikace části genu pro *flagellin* borelie (A) a 16S rRNA anaplasmy (B).

A)



B)

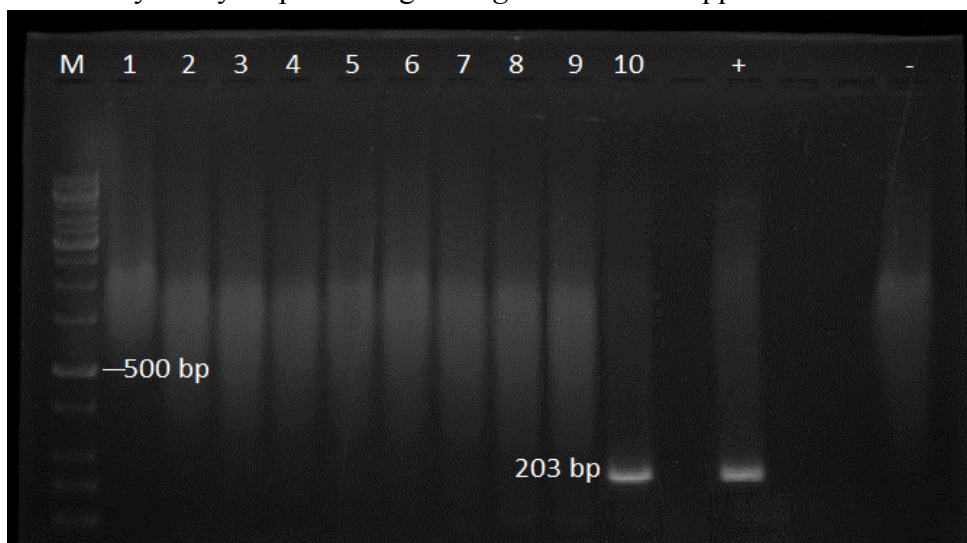


\*M-marker (100 kb)

\*+ pozitivní kontrola, - negativní kontrola

Výsledky amplifikací částečné sekvence *gltA* genu *Rickettsia* spp. (Matjila et al., 2004) jsou uvedeny na obrázku 7. Jamka č. 10 – pozitivní vzorek. Velikost PCR produktu 203 bp.

**Obr. 7:** Výsledky amplifikace genu u *gltA* *Rickettsia* spp.

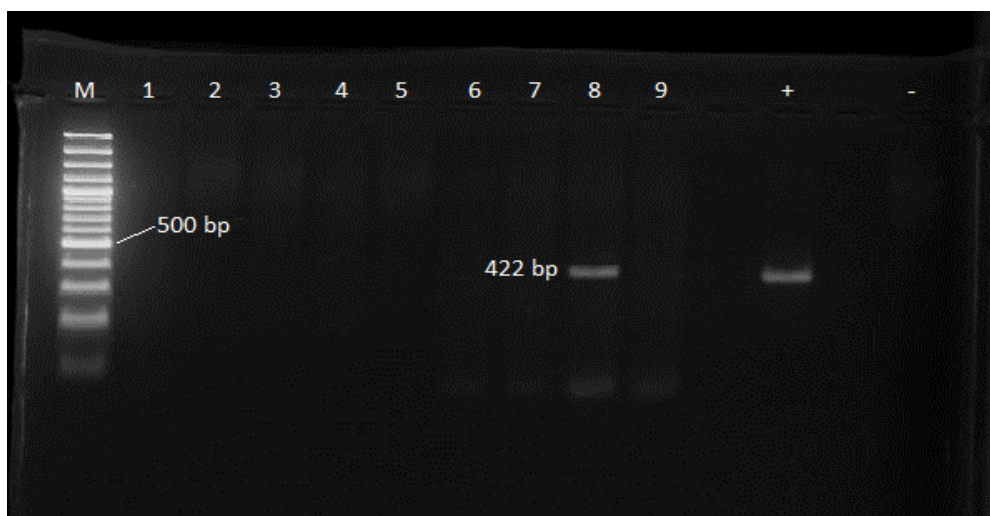


\*M-marker (100 kb)

\*+ pozitivní kontrola, - negativní kontrola

Posledním prokazovaným patogenem byla *Babesia* spp., kde byla amplifikována část genu 18S rRNA o velikost produktu 422 bp. Jamka č. 8 – pozitivní vzorek.

**Obr. 8:** Výsledky amplifikace části 18 rRNA genu *Babesia* spp.



\*M-marker (100 kb)

\*+ pozitivní kontrola, - negativní kontrola

Statistická analýza dat byla vyhodnocená pomocí programu "R project" ([www.r-project.org](http://www.r-project.org), Wilson, 1927). Rozdíl v pozitivitě mezi samci a samicemi klíštěte *I. ricinus* nebyl statisticky významný ( $\chi^2 = 2,482$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,115$ ). U *I. ricinus* ( $n = 323$ ) byla nejvíce zastoupena *Borrelia* spp., která byla nalezena u 21,87% ( $n = 75$ ), dále následovaná *Anaplasma* spp. 11,1% ( $n = 38$ ), *Rickettsia* spp. 10,2% ( $n = 35$ ) a *Babesia* spp. 4,1% ( $n = 14$ ).

Z celkového počtu nasbíraných *I. hexagonus* (n = 20) byla nejvíce zastoupena infekce *Anaplasma* spp. 15 % (n = 3), nasledovaná *Borrelia* spp. 10 % (n = 2), dále *Babesia* spp. 10 % (n = 2) a *Rickettsia* spp. 5 % (n = 1).

Rozdíly mezi přítomností patogenů u obou klíšťat *I. ricinus* a *I. hexagonus* ( $\chi^2 = 0,079$ , df = 2, p = 0,778) nebyly vyhodnoceny jako statisticky významné, což mohlo být způsobeno velice malým vzorkem klíšťat *I. hexagonus*. Rozdíly prevalence jednotlivých druhů patogenů nalezených současně u obou druhů klíšťat, nebyly statisticky významné: *B.burgdorferi* s.s. ( $\chi^2 = 0,985$ , df = 2, p = 0,321), *Anaplasma phagocytophilum* ( $\chi^2 = 1,052$ , df = 2, p = 0,305), *Rickettsia helvetica* ( $\chi^2 = 0,021$ , df = 2, p = 0,885).

### Interval spolehlivosti

Incidence jednotlivých patogenů u obou klíšťat se lišila. Hodnoty intervalu spolehlivosti (CI) udávají interval, ve kterém s určitou pravděpodobností (námi zvolenou 95%) leží skutečná hodnota veličiny odhadovaná na základě studia vzorku z populace klíšťat. V případě *I. ricinus* (n = 324) bylo nejvíce klíšťat infikovaných *Borrelia* spp. (n = 75): *B. afzelii* - 15,43% (CI: 11,91-19,77%), *Bb* s.s. - 4,94% (CI: 3,06-7,87%), *B. carolinensis* - like - 1,23% (CI: 0,48-3,13%), *B. bissettii* - 0,93% (CI: 0,32-2,69%), , neurčený druh borelie u 0,62% (CI: 0,17-2,22%). U *Babesia* spp. (n = 14) byl identifikován pouze jeden druh, *B. canis* a to v 2,16% klíšťat (CI: 1,05-4,39%); u zbytku pozitivních klíšťat - 2,16% (CI: 1,05-4,39%) nebyl druh babesie identifikován. *Rickettsia* spp. (n = 35) se prokázalo u 4,32% jako *R. helvetica* (CI: 2,59-7,12%), u zbytku klíšťat druh *Rickettsia* spp. nebyl určen 6,48% (CI: 4,28-9,7%). *Anaplasma* spp. (n = 38) vykazovaly spolu s boreliemi největší druhovou rozmanitost: *A. phagocytophilum* - 8,33% (CI: 5,79-11,85%), *A. platys* - 0,93% (CI: 0,32-2,69%), *E. canis* - 0,31% (CI: 0,05-1,73%) a neurčených druhů - 2,47 % (CI: 0,99-4,25%). Procentuální zastoupení klíšťat *I. ricinus* bez patogenů dosahuje 49,69% (CI: 44,28-55,11%).

O mnohem méně pozitivních klíšťat bylo nalezeno u druhého druhu klíštěte *I. hexagonus* (n = 20): *Borrelia* spp. (n = 2): *Bb* s.s. - 10% (CI: 2,79-30,1%); *Babesia* spp. (n = 2): *B. venatorum* - 10% (CI: 2,79-30,1%); *Rickettsia* spp. (n = 1): *R. helvetica* - 5% (CI: 0,89-23,61%); *Anaplasma* spp. (n = 3): *A. phagocytophilum* - 15% (CI: 5,24-36,04%). Žádný patogen nebyl objeven u 60% klíšťat (CI: 38,66-78,12%).

Koinfekce se vyskytla u 5,25% klíšťat (n = 18) (CI: 3,34-8,14%), kromě koinfekce dvěma patogeny (n = 13) - 3,79% (CI: 2,23-6,38%), se objevila koinfekce se 3 patogeny (n =

4) a to u 1,17% klíšťat (CI: 0,45-2,96%) a 4 patogeny (n = 1) u 0,29% (CI: 0-1,63%) všech analyzovaných klíšťat.

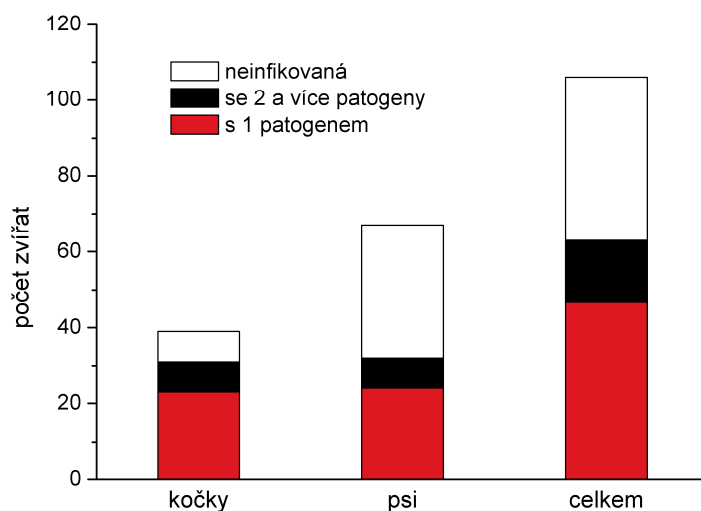
Porovnání četnosti patogenů u psů a koček je uvedeno v tabulce 10.

**Tab. 10:** Srovnání výskytu infikovaných zvířat.

Kočky celkem	39	Kočky s 1 patogenem	se 2 a více patogeny	celkem možných inf. zvířat
♂	27	23 (59%)	8 (21%)	63 (59%) (106 celkem)
♀	12			
Psi celkem	67	psi s alespoň 1 patogenem	se 2 a více patogeny	
♀	26	24 (36%)	8 (12%)	
♂	41			

Údaje z tabulky 10 jsou znázorněny v grafu na obrázku 9.

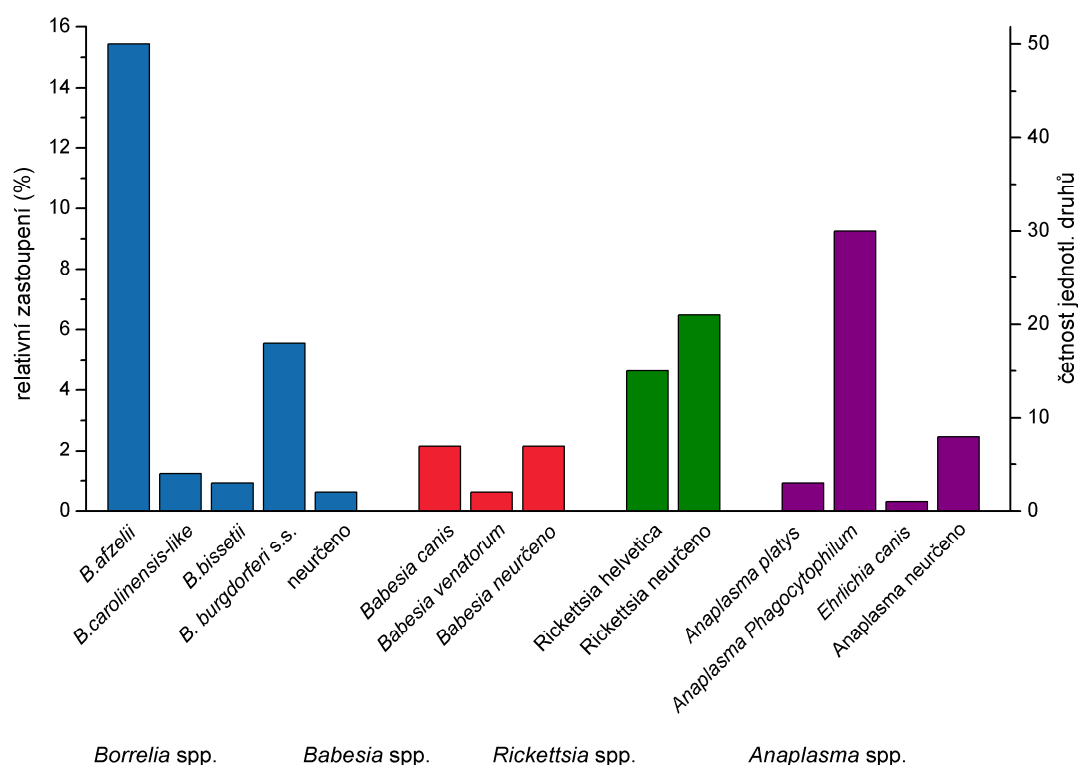
**Obr. 9:** Výsledky analýzy počtu zvířat infikovaných 1, 2 a více patogeny.





Incidence jednotlivých druhů patogenů v klišťatech je znázorněna na obrázku 10.

**Obr. 10:** Druhové zastoupení u čtyř detekovaných patogenů.



Tabulky 11 a 12 představují frekvence výskytu jednotlivých patogenů u klišťat *I. ricinus* a *I. hexagonus* s hodnotami intervalu spolehlivosti (CI), vyjádřenými rozhraním mezi hodnotami LCL a UCL.

**Tab. 11:** Frekvence jednotlivých patogenů detekovaných v klišťatech *I. ricinus* s CI hodnotami.

<i>I. ricinus</i>	Frekvence	[%]	LCL	UCL
<b><i>Borelia</i> spp.</b>				
<i>Borellia afzelii</i>	50	15,43	11,91	19,77
<i>Borellia carolinensis like</i>	4	1,23	0,48	3,13
<i>Borellia bissetii</i>	3	0,93	0,32	2,69
<i>Bb s.s.</i>	16	4,94	3,06	7,87
<i>Borelia</i> spp.	2	0,62	0,17	2,22
<b><i>Babesia</i> spp.</b>				
<i>Babesia canis</i>	7	2,16	1,05	4,39
<i>Babesia</i> spp.	7	2,16	1,05	4,39

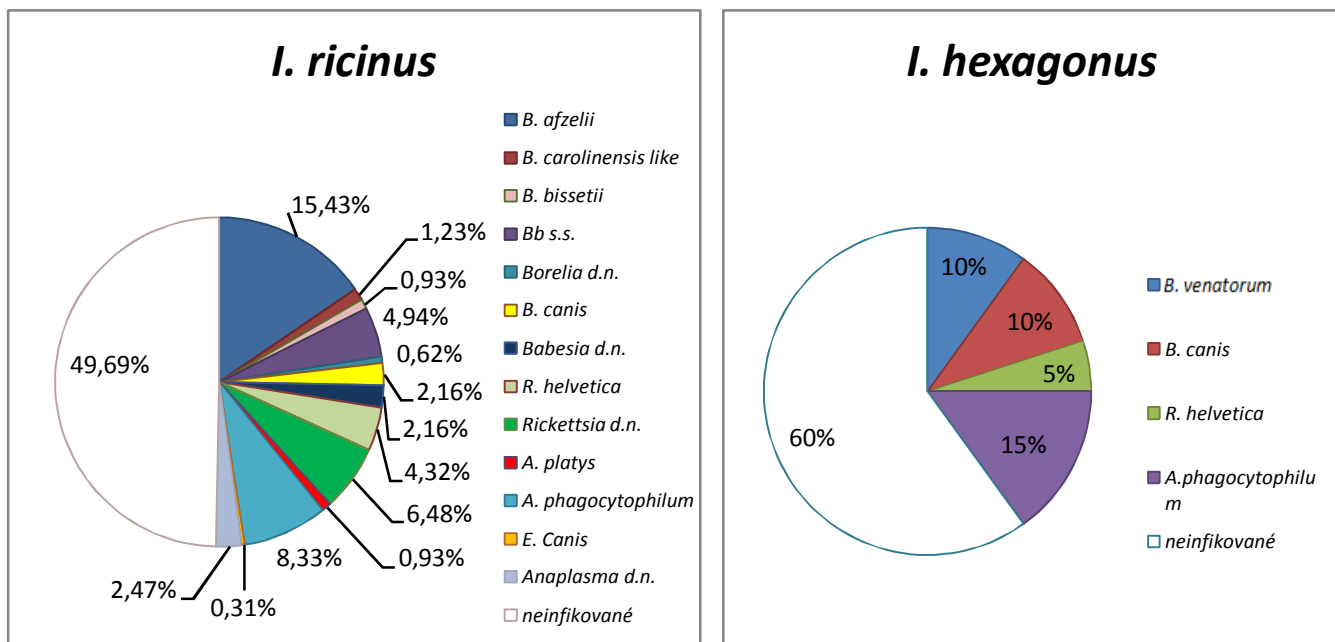
<i>Rickettsia</i> spp.				
<i>Rickettsia helvetica</i>	14	4,32	2,59	7,12
<i>Rickettsia</i> spp.	21	6,48	4,28	9,7
<i>Anaplasma</i> spp.				
<i>Anaplasma platys</i>	3	0,93	0,32	2,69
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	27	8,33	5,79	11,85
<i>Ehrlichia canis</i>	1	0,31	0,05	1,73
<i>Anaplasma</i> spp.	8	2,47	1,26	4,8
neinfikované	161	49,69	44,28	55,11

**Tab. 12:** Frekvence jednotlivých patogenů detekovaných v klíšťatech *I. hexagonus* s CI hodnotami.

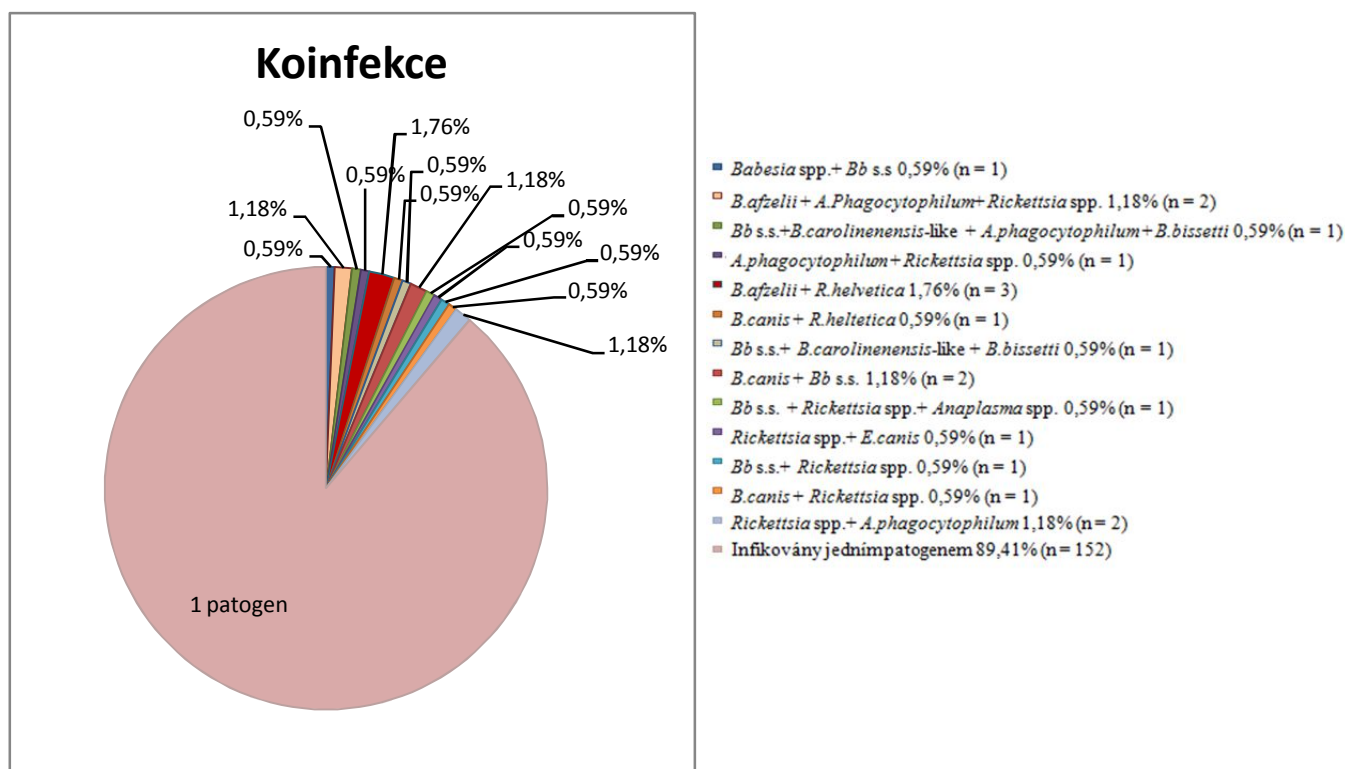
<i>I. hexagonus</i>	Frekvence	[%]	LCL	UCL
<i>Borelia</i> spp.				
<i>Borelia afzelii</i>	0	0	0	16,11
<i>Borelia carolinensis</i>	0	0	0	16,11
<i>Borelia bissetii</i>	0	0	0	16,11
<i>Bb</i> s.s.	2	10	2,79	30,1
<i>Borelia</i> spp.	0	0	0	16,11
<i>Babesia</i> spp.				
<i>Babesia venatorum</i>	2	10	2,79	30,1
<i>Babesia</i> spp.	0	0	0	16,11
<i>Rickettsia</i> spp.				
<i>Rickettsia helvetica</i>	1	5	0,89	23,61
<i>Rickettsia</i> spp.	0	0	0	16,11
<i>Anaplasma</i> spp.				
<i>Anaplasma platys</i>	0	0	0	16,11
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	3	15	5,24	36,04
<i>Ehrlichia canis</i>	0	0	0	16,11
<i>Anaplasma</i> spp.	0	0	0	16,11
neinfikované	12	60	38,66	78,12

Obrázek 11 znázorňuje srovnání druhového zastoupení patogenů u obou druhů vyšetřovaných klíšťat *I. ricinus* a *I. hexagonus*.

**Obr. 11:** Srovnání spektra patogenů v klíšťatech *I. ricinus* a *I. hexagonus*.



**Obr. 12:** Výsledky analýzy koinfekce v celkovém souboru klíšťat.



## 6. Diskuze

Postupná akumulace dat zaznamenávajících výskyt klíšťat a s nimi souvisejících zoonóz v městských oblastech, poukazuje na urgentnost vytvoření efektivní, účinné a k přírodě šetrné metody ochrany obyvatel těchto měst před klíšťaty a patogeny jimi přenášenými. K úspěšnému uskutečnění těchto metod je třeba pochopit veškeré aspekty výskytu klíšťat ve městech a faktory ovlivňující jejich rozšíření. Evropa, jako konglomerát vyspělých zemí s většinou obyvatel v městech, byla formována v průběhu století. Urbanizace západní Evropy dosahuje přibližně 75% s očekávaným ročním vzrůstem o 0,3% od roku 2000 do 2015. Úroveň urbanizace se pravděpodobně stabilizuje na 82% (GEO-3, 2002).

Mezi hlavní faktory, které jsou zásadní pro perzistenci klíšťat, patří vhodné podmínky v prostředí a dostupnost vhodných hostitelů. Vývoj a růst evropských zemí výrazně ovlivňuje výše zmíněné faktory a to v mnoha směrech. Je zde znatelná tendence zachovávat zelené plochy vegetace uvnitř měst a to i po několik desítek let (Malmivaara et al., 2002; Straupe et al., 2012). Proces urbanizace je spojen se vzrůstem počtu domácích zvířat, což vede často ke zvýšení počtu zejména zatoulaných psů a koček, kteří jsou velice vítaným hostitelem pro dospělou populaci klíšťat (Slater, 2001). Byl vytvořen úzký kontakt mezi divokou a městskou faunou a to zejména v okrajových částech rozrůstajících se měst. Hlodavci migrující mezi lidským obydlím a volnou přírodou přináší různá vývojová stádia klíšťat do obydlí. Dalším prostředkem rozšíření klíšťat jsou migrující a potulná zvířata. Četné a pravidelné nálezy *I. ricinus* byly zaznamenány i v hlavních městech v České republice, Německu a Polsku (Kahl a Radda, 1988; Kahl et al., 1989; Daniel a Cerný, 1990; Hubalek et al., 1993; Siński a Rijpkema, 1997; Dautel a Kahl, 1999; Stanczak et al., 2004; Maetzel et al., 2005).

V městech centrální Evropy je klíště *I. ricinus*, spolu s dalšími exofilními druhy, objevováno pouze za použití techniky sbírání klíšťat přímo z vegetace. Pokud je tato metoda doplněna sběrem klíšťat přímo z ptáků a savců o různé tělesné velikosti, počet jednotlivých druhů a jejich pestrost znatelně vzrůstá (Uspensky, 2008). Klíště rodu *I. hexagonus*, které je typickým parazitem ježka, je pravidelně nacházeno v městech Evropy. Od doby prokázání jeho důležitosti jako vektora *Bb* s.l. je klíště rovněž zahrnuto do enzootického cyklu přenosu spirochéty v městských oblastech (Gray et al., 1994; Gern et al., 1997; Skuballa et al., 2012). Navíc je ježek možným reservoárovým hostem pro *Anaplasma phagocytophylum* (Silaghi et al., 2012), což poukazuje na možnou účast klíštěte *I. hexagonus* v cykulaci tohoto patogenu.

*I. hexagonus* parazituje také na jezevcích, liškách a kunách, které se pohybují v blízkosti lidských obydlí stejně jako psi a kočky (Gern et al., 1997; Nijhof et al., 2007).

Tato práce se zaměřila na analýzu vzorků klíšťat sesbíraných přímo z potulných psů a koček v Českých Budějovicích a okolí. I přes to, že nebylo možné pokrýt všechny oblasti města České Budějovice dle geografické posloupnosti je jisté, že představené informace udávají širší pohled na problematiku distribuce klíšťat a LB v tomto městě.

*I. ricinus* bylo považováno za hlavní druh klíštěte v Evropě, které je schopné přenášet *Bb* s. l. Později byly spirochéty Lymské boreliózy objeveny v klíštěti *I. hexagonus* (Liebisch et al., 1989). Bylo prokázáno, že tento druh klíštěte je schopen přenášet borelie i na myším modelu (Gern et al., 1991).

Z 343 nasbíraných klíšťat bylo 93,29% (n = 320) samic a 6,71% (n = 23) samců; larvy a nymfy nebyly nalezeny. Většina klíšťat (n = 323) byla identifikována jako *I. ricinus*. Jenom 20 klíšťat bylo identifikováno jako *I. hexagonus*. Značná prevalence klíšťat *I. ricinus* nad jinými druhy byla zaznamenána i v jiných evropských zemích a to v Polsku (Król et al., 2016), Bosně a Hercegovině (Krcmar et al., 2014), Belgii (Claerebout et al., 2013), Švýcarsku (Eichenberger et al., 2015), Německu (Beichel et al., 1996) a Británii (Smith et al., 2011). Prevalence dospělých klíšťat nad nymfami a larvami, které nebyly nalezeny ani na jednom zvířeti, může být způsobena tím, že dospělci preferují právě větší, či středně velké hostitele jako jsou kočky a psi (Little et al., 2010). Například Claerebout zmiňuje incidenci 89,2% dospělých klíšťat odebraných z koček a psů v Belgii (Claerebout, 2013) a v Německu dokonce 99,6% klíšťat sebraných ze psů byli dospělci (Schreiber et al., 2014).

Námi bylo v průměru nalezeno 2,4 klíštěte na jednu kočku z celkem 39 odchycených koček. Na psech bylo nalezeno znatelně více klíšťat oproti kočkám: 251 klíšťat na 67 psech, v průměru 3,7 klíštěte na jednoho psa. Odlišnosti v četnosti klíšťat na psech a kočkách mohou být následkem rozdílné hygieny u koček a psů, kdy si kočka s větší pravděpodobností klíště vyškrábne (převzato z: [www.parasitipedia.net](http://www.parasitipedia.net)). Počet jednotlivých klíšťat nalezených na jedné kočce odpovídá průměrům v jiných evropských zemích, například v Polsku se incidence pohybovala kolem 1,88 klíštěte/kočku (Król et al., 2016). Počet jednotlivých klíšťat objevených na psech byl vyšší v porovnání s průměrným počtem klíšťat na jednoho psa, například v Berlíně 1,1–1,45 klíštěte/psa (Becka et al., 2014). Tento rozdíl může být způsoben neobvykle vysokým počtem nalezených klíšťat (70 klíšťat) na jednom psovi.

Počet klíšťat *I. hexagonus* nalezených na kočkách byl zřetelně větší nežli na psech. Zajímavostí je tvrzení několika vědeckých článků, které zaznamenaly stejné množství obou druhů klíšťat *I. ricinus* a *I. hexagonus* jak u psů, tak i u koček (Beichel et al., 1996, Nijhof et al., 2007, Claerebout et al., 2013). Nicméně, Ogden s kolegy našel znatelně více klíšťat *I. ricinus* na psech než na kočkách, zatím co klíšťata *I. hexagonus* byla s větší frekvencí nalezena na kočkách (Ogden et al., 2000). Z 20 námi nalezených klíšťat *I. hexagonus* byla pouze dvě klíšťata původem ze psa.

U klíšťat *I. ricinus* odebraných z koček a psů z Českých Budějovic a okolí se jako nejpočetnější patogen z celkem čtyř zkoumaných prokázal komplex *Bb* s.l. 21,87 % (n = 75), což odpovídá evropskému průměru definovanému Hubálkem (Hubalek et al., 1997). Naše výsledky jsou srovnatelné s rozsahem hodnot infekčnosti (2,3-23%) u klíšťat sesbíraných ze psů a koček v ostatních státech Evropy. Například v Polsku (Zygner et al., 2008), Německu (Beichel et al., 1996), Dánsku (Hovius et al., 1998) a Belgii (Claerebout et al., 2013). Avšak oproti výsledkům v počtu pozitivních klíšťat u psů v jednotlivých zemích, například v Německu – 11,6% (Schreiber, et al., 2014) a v České republice - 12,1% klíšťat vyšetřovaných veterinárním ústavem v Brně (Kybicova, et al., 2009), byl počet námi nalezených klíšťat pozitivních na *Bb* s.l. výrazně větší.

O mnohem méně klíšťat pozitivních na *Borrelia* spp. bylo nalezeno mezi klíšťaty *I. hexagonus*. Pouze dvě klíšťata byla pozitivní na *Bb* s.s.- 10% (CI: 2,79-30,1%). V porovnání s Německem, kde bylo nalezeno 11,2% pozitivních *I. hexagonus* na spirochéty borelie, jsou hodnoty frekvence borelie srovnatelné s průměrem (Schreiber et al., 2014).

Procentuální hodnoty byly vyšší než evropský průměr i u konkrétních druhů borelie. Největší zastoupení měl druh *B. afzelii*- 15,43% (CI: 11,24-18,7%). Porovnáním dat ze studie prováděné v Jižních čechách můžeme vidět podobnost v převládajícím počtu klíšťat pozitivních na *B. afzelii* (Hönig et al., 2015). Následovala *Bb* s.s. - 4,94 % (CI: 3,06-7,87), *B. carolinensis* like -1,23%(CI: 0,48-3,13%) a *B. bissettii* – 0,93% (CI: 0,32-2,69%); u 0,62 % (CI: 0,17-2,22%) klíšťat nebylo možné identifikovat druh borelie.

V Belgii bylo u klíšťat sajících na kočkách a psech nalezeno 4,8% *B. afzelii* a 0,6% *Bb* s.s. (Claerebout, et al., 2013). Je známo velice málo o prevalenci borelie v klíšťatech pocházejících ze psů z České republiky. Existují však data popisující infekci borelií ve vzorkách přímo ze zvířat. Pejchalová s kolegy analyzovala vzorky sér získaných ze zdravých armádních psů z celkem 12 oblastí České republiky na přítomnost IgG protilátek proti *Bb*

s.l. Seroprevalence se v jednotlivých oblastech lišila – od 0% do 28,6%. Nejvyšší hodnoty byly zaznamenány na Jihu čech (Pejchalová et al., 2006). Tato data korelují s našimi výsledky získanými z klíšťat původem ze psů a koček. Většina zvířat byla pozitivní na protilátky proti *B. afzelii* (5,5%), což odpovídá našim výsledkům.

V našich vzorcích nebyla překvapivě nalezena *B. garinii*, což může být vysvětleno tím, že zmíněný druh borelie preferuje ptáky jako hostitele. Nicméně navzdory faktu, že prevalence *Bb* s.s. je v Evropě nízká (Rauter a Hartung, 2005), podle našich dat je tento druh borelie druhým nejpočetnějším zástupcem u *I. ricinus* a jediným nalezeným zástupcem u klíštěte *I. hexagonus*. Tento nález může být vysvětlen tím, že naše klíšťata byla odebrána z koček a psů a většina případů Lymské boreliózy u těchto zvířat je asociována právě s druhem *Bb* s.s..

Dalšími významnými a pro Evropu neobvyklými druhy byly nalezené *B. bissettii* 0,93% (CI: 0,32-2,69%) a *B. carolinensis*-like 1,23% (CI: 0,48-3,13%). *B. bissettii* byla v Evropě prokázána ve vzorcích sér či tkáně pacientů s diagnózou onemocnění Lymská borelióza (Rudenko et al., 2008, 2009b). Tento druh se dokonce podařilo prokázat i u klíšťat v rekreačních lokalitách Českých Budějovic, kde frekvence *B. bissettii* v *I. ricinus* dosahovala 0,5% (nepublikováno). I přes to, že je tento druh rozšířen spíše v oblastech Severní Ameriky, mohou být naše nálezy potvrzením faktu, že mimo hojně zastoupených druhů *B. afzelii*, *Bb* s.s. a *B. garinii*, cirkuluje v Evropě také *B. bissettii*. *Borrelia carolinensis*, objevená na jihu Spojených států v roce 2009, byla v Evropě doposud prokázána pouze v západní Francii, kdy z celkového množství 572 klíšťat *I. ricinus* bylo jedno pozitivní na *B. carolinensis*. Sekvence nalezené *B. carolinensis* vykazovala 100% identitu s kmenem borelie z Jižní Karolíny (Violaine, et al. 2010).

V našem výzkumu se podařilo u tří vzorků potvrdit *B. carolinensis*-like pomocí amplifikace genu kodujícího *flaB*. Sekvence PCR produktu vykazovala 99% identitu s EU076485.1 v GenBank. V jednom vzorku byla dodatečně i u genu *p66* a housekeeping genu *nifS* (jen jedna záměna) potvrzena podobnost s *B. carolinensis*. Nicméně analýza dalších genů tento fakt nepotvrdila. MLST analýza prokázala 100 % homologii s *B. californiensis* a to u 4 z 8 analyzovaných genů. Tyto vzorky potřebují další zkoumání.

Druhým nejvíce reprezentovaným patogenem v infikovaných klíšťatech byla *Anaplasma* spp. Celková prevalence anaplasmy byla stanovena na 12,24%. *Anaplasma* spp. byla nalezená téměř po celé Evropě a míra infekce sahá od 0,4% až po 67% (Stuen et al., 2013). Prevalence infekčních nymf a dospělců například v Nizozemí dosahuje až 8% (Coipan et al., 2013). Schreiber zmiňuje 6,5% infekce v klíšťatech *I. ricinus* odebraných ze psů v Německu (Schreiber et al., 2014). K vysoké proměnlivosti klíšťat anaplasmou přispívá široká škála hostitelů, jako jsou hlodavci, přežvýkavci, hmyzožravci, masožravci, ptáci a dokonce i plazi (Stuen et al., 2013).

*A. phagocytophilum* byla námi detekována u 8,33% (CI: 5,79-11,85%) klíšťat *I. ricinus*. To odpovídá evropskému průměru. *A. phagocytophilum* byla často nalezena s rozdílnou prevalencí ve 30 evropských státech, například na Slovensku s prevalencí 1,1 až 8,3% a v Německu dokonce až 17,4% (Stuen et al., 2013).

Podařilo se nám rovněž prokázat přítomnost *A. phagocytophilum* v 15% (CI: 5,24-36,04%) klíšťat *I. hexagonus*. V porovnání s výsledky z jiných evropských států, jsou naše hodnoty o něco vyšší. Například v Polsku u klíšťat *I. hexagonus* pocházejících z koček a psů byla prevalence *A. phagocytophilum* kolem 8,1% (Król et al., 2016). V Berlíně byla v roce 2014 prokázána přítomnost *A. phagocytophilum* u 3,9% těchto klíšťat sajících na psech a kočkách (Schreiber et al., 2014). Avšak v roce 2010 byla v Německu zjištěna přítomnost *A. phagocytophilum* u 39,5% *I. hexagonus* pocházejících z ježků (Skuballa et al., 2010). Námi objevená vyšší prevalence může být způsobená tím, že ježci, kteří se hojně vyskytují v městech, jsou hlavním hostitelem tohoto druhu klíšťat a jsou potenciálním vektorem *A. phagocytophilum* (Silaghi et al., 2012).

*A. platys* byla objevena u 0,93% (CI: 0,32-2,69%) klíšťat *I. ricinus*. Hlavním vektorem *A. platys* je klíště *Rhipicephalus sanguineus*, které se v ČR nevyskytuje. Bohužel, cestovatelská historie většiny zvířat v této studii nemůže být zpětně a přesně dohledána. Pokud vezmeme v úvahu fakt, že počet psů importovaných z oblastí, kde je *A. platys* endemická (Menn et al., 2010) stále vzrůstá, může být objevení tohoto druhu Anaplasmy v našich vzorcích z klíšťat *I. ricinus* objasněno náhodným sáním na zvířeti infikovaném *A. platys* dovezeném do České republiky. Nebo se v tomto případě dá uvažovat o tom, že klíště nakažené *A. platys* bylo přeneseno do České republiky migrujícími hostiteli, případně ptáky.



V roce 2015 se Zobba a kolegové v Itálii zaměřili na výzkum prevalence *A. platys* u koček a psů a zjistili přítomnost tohoto patogenu u 31% koček a 5,88%, což odpovídá našemu zjištění vyššího zastoupení u koček v porovnání se psy.

*E. canis* byla nalezena u 0,31% (CI: 0,05-1,73%) klíšťat *I. ricinus*. Tento druh je také asociován s klíštětem *R. sanguineus*, které je rozšířeno po celém světě, zejména v teplejších oblastech (Gray et al., 2012). Námi objevená prevalence (0,31%) je srovnatelná s dalšími evropskými státy. Ku příkladu ve Francii byla nalezena četnost tohoto patogenu v sérech psů 0,33 % (Pantchev et al., 2009), u švýcarských psů byla detekována 2,2% seroprevalence (Pusterla et al., 1998) a v Rumunsku u 2,1% psů (Mircean et al., 2012). V roce 2008 se prevalence nakažených koček v Barceloně pohybovala kolem 1% (Tabar et al., 2008) a u koček ve Španělsku dokonce 9,9% (Ayllón et al., 2012). Mezi nejaktuálnější záznamy o prevalenci tohoto druhu v Evropě patří pozitivita vyder v jižní Itálii (Santoro et al., 2017), kde byl tento patogen nalezen opakovaně i v dřívějších letech u divokých lišek (Millán et al., 2016). Naše výsledky spolu s daty z jiných evropských zemí podporují teorii možného rozšíření *E. canis* na území s výskytem klíštěte *R. sanguineus*, ale i další oblasti Evropy, kde se tento druh klíštěte nevyskytuje.

První hlášený případ nákazy psa *Babesia* spp. byl popsán v roce 1893 v Severní Africe a poté v Evropě v roce 1895 (Babes, 1888; Piana a Galli-Vallerio, 1895; Baneth, 2013). V České republice byl počet Babesiózy donedávna zanedbatelný. Nicméně v posledních letech se objevila tendence ke zvyšování případů nálezů domácích mazlíčků tímto patogenem. V roce 2005, po prvním průkazu *B. microti* v České republice, byla hladina infekce v klíšťatech nízká – 1,5% (Rudolf et al., 2005). Avšak výsledky analýzy celkem 2473 klíšťat pátrajících po hostiteli (v letech 2011-2014) a 199 nasátých klíšťat *I. ricinus* (v letech 2013 a 2014) pocházejících z různých oblastí České republiky prokázaly přítomnost infekce babesii u 5,2% vyšetřovaných klíšťat (Venclikova et al., 2016). Konvalinová s kolegy potvrdila v roce 2012 seropozitivitu na babesii u 12,21% vyšetřovaných krevních vzorků psů, kteří nikdy neopustili území České republiky (Konvalinova et al., 2012).

Nám se podařilo stanovit přítomnost *Babesia* spp. u 4,66% klíšťat *I. ricinus*, což odpovídá nálezům v ostatních zemích Evropy. Poměr infekce byl vyšší u klíšťat *I. hexagonus*. Například Schreiber a kolegové (Schreiber et al., 2014) zaznamenali přítomnost

*Babesia* spp. u 2,5% klíšťat *I. ricinus* původem ze psa, zatím co u klíštěte *I. hexagonus* byl počet vyšší (3%), což odpovídá našim výsledkům.

Námi byla zjištěna přítomnost dvou druhů babesii v analyzovaných vzorcích - *B. venatorum* (10%) a *B. canis* (2,16%). Tyto data se shodují s výsledky ze severního Polska, kde bylo na přítomnost babesie analyzováno celkem 1392 klíšťat *I. ricinus* (Cieniuch et al., 2009). V ČR se doposud podařilo identifikovat přítomnost druhů *B. venatorum* u nenasátých klíšťat *I. ricinus* (Venclikova et al., 2015). Další data byla hlášena z různých evropských zemí a prevalence se pohybovala kolem 1%. Například v Itálii 0,85% vyšetřovaných klíšťat bylo infikováno *B. venatorum* (Cassini et al., 2010), ve Švýcarsku do 1,3% (Casati et al., 2006). Hladiny výrazně vyšší v porovnání z výše vyjmenovanými byly zaznamenány v rekreačních oblastech Rakouska (4,1%), Německa (5,5%) a Polska (6,1%) s druhovým zastoupením *B. venatorum*, *B. divergens*, *B. microti* a *B. capreoli* (Silaghi et al., 2012). Výsledky z jihozápadního Polska, Německa a Dánska odhalují převládající prevalenci *B. microti*, následovanou *B. venatorum* a to u klíšťat pocházejících ze psů (Król et al., 2016, Schreiber et al., 2014, Stensvold et al., 2015). Absence *B. microti* v naší studii může být vysvětlena možným zahrnutím tohoto druhu do 50% nedefinovaných *Babesia* spp..

Velice neobvyklým nálezem byl druh *B. canis* objevený u 2,16% klíšťat *I. ricinus* (CI: 1,05-4,39%) sesbíraných z jedné kočky v naší studii. Dodnes byla *B. canis* nalezena pouze u evropských klíšťat *Dermacentor reticulatus* (Zahler et al., 2000; Rar et al., 2005, Földvári et al., 2007). Doposud raritní případ objevení *B. canis* u 2 klíšťat *I. ricinus* v Evropě byl hlášen z Polska (Cieniuch et al., 2009). Tento nález může být odůvodněn buď zavlečením nakaženého zvířete do České republiky (tato možnost může být podpořena řadou případů onemocnění domácích zvířat tímto druhem babesie v okolních státech), nebo druhým potvrzením rozšíření spektra vektorů u *B. canis* na klíště *I. ricinus*.

U druhu *I. hexagonus* byl nalezen pouze jeden druh babesie a to *B. venatorum* s incidencí 10% (CI: 2,79-30,1%), která převyšuje 3% nalezené v Berlíně (Schreiber et al., 2014). Vyšší hodnota positivity u klíšťat v naší studii může být způsobena menším počtem nalezených klíšťat *I. hexagonus* u zvířat, která se mohla pohybovat v oblastech bohatých na celkově početnější druh *B. venatorum*.

*I. ricinus* slouží jako vektor dvou významných druhů *Rickettsia* spp.: *R. helvetica* a *R. momancensis* (Fernandez-Soto et al., 2006). Několik autorů potvrzuje přítomnost *R. helvetica* nejenom ve psech a ve volně žijících liškách, ale také v krvi infikovaného člověka (Borreti et al., 2009). U 4,32 % pozitivních klíšťat *I. ricinus* v naší studii byla objevena přítomnost *R. helvetica* (CI: 2,59-7,12%). Tento druh rickettsie byl prokázán v klíšťatech *I. ricinus* alespoň ve 24 evropských zemích (Parola et al., 2013). V České republice v roce 2014 byly zveřejněny data o prevalenci *Rickettsia* spp. u klíšťat *I. ricinus*, kdy minimální promořenost dosahovala 2,9% u klíšťat pocházejících z oblasti městského parku a 3,4% u klíšťat z lesního ekosystému (Venclikova et al., 2014). Dalším příkladem může být nález konkrétně *R. helvetica* u 3% klíšťat sajících na slavících v České republice (Dubska et al., 2012). V Dánsku bylo v roce 2010 nalezeno 4,7% *R. helvetica* pozitivních nymf *I. ricinus* (Bjørn et al., 2010). V Německu byla *R. helvetica* nalezena u 14,2% klíšťat *I. ricinus* pocházejících ze psů (Silaghi, 2008; Pluta, 2010).

I přes to, že je obecně uznaným vektorem *R. helvetica* právě *I. ricinus*, je tento patogen nalézán i u klíšťat *I. hexagonus*. V naší práci se podařilo prokázat přítomnost *R. helvetica* u 5% klíšťat *I. hexagonus* (CI: 0,89-23,61%). Procentuální zastoupení *Rickettsia* spp. v *I. hexagonus* se v evropských zemích liší. Například *I. hexagonus* sesbíraná z nizozemských domácích zvířat byla pouze z 0,8% infikovaná *Rickettsia* spp. (Pichon et al., 2006). Další studie odhalila přítomnost *Rickettsia* spp. u 44% *I. hexagonus*, mezi kterými byla nalezena i *R. helvetica* (Schreiber et al., 2014). V nedávné době bylo na jihozápadě Polska v rámci zkoumání klíšťat sesbíraných z koček a psů na veterinární klinice objeveno 2,2% *I. hexagonus* vykazujících pozitivitu na *Rickettsia* spp. (Król et al., 2016). Další výzkum ukazuje na přibližnou 11% promořenost *I. hexagonus* druhem *R. helvetica* (Speck et al., 2012). Nižší množství námi nalezených klíšťat *I. hexagonus*, může mít za následek i nižší prevalenci druhu *R. helvetica* v nich nalezených.

*R. helvetica* je pravděpodobně patogenem i pro člověka. Četnost nálezů klíšťat *I. ricinus* pozitivních na tento druh rickettsie naznačuje vysokou pravděpodobnost přenosu *R. helvetica* na člověka. Dosud je však nejasné, zda li mohou psi a kočky sloužit jako rezervoáry pro tuto infekci. Česká republika naštěstí není považována za endemickou oblast pro toto onemocnění u lidí.

## 7. Závěr

Bylo provedeno jedno z prvních mapování oblasti jižních Čech na prevalenci čtyř patogenů přenášených klíšťaty a souvisejících s infekcemi zvířat i člověka s využitím odchycených potulných zvířat. Ve vybraných lokalitách v okolí Českých Budějovic byla objevena vysoká promořenost klíšťat zachycených na psech a kočkách zmíněnými patogeny. Byla prokázána přítomnost všech čtyř patogenů s různou hladinou výskytu. Tato skutečnost poukazuje na vysokou pravděpodobnost vystavení městských zvířat nemocem přenášeným klíšťaty v okolí Českých Budějovic a poskytuje důkaz, že domestikovaná zvířata mohou přispívat k cirkulaci jak samotných klíšťat, tak i patogenů jimi přenášených. Jelikož jde o domácí mazlíčky, kteří žijí v těsné blízkosti člověka a sdílejí společné rekreační zóny i bydlení, představuje tento fakt možné riziko rozšíření klíšťat do domácností a možné zvýšení rizika nákazy pro lidi. Prokázáním přítomnosti *B. bissettii* v klíšťatech sajících na psech a kočkách byl potvrzen závěr z bakalářské práce autora o běžném výskytu *B. bissettii* v rekreačních oblastech Českých Budějovic. Přítomnost *B. bissettii* spolu s obvyklými druhy *B. afzelii* a *B. burgdorferi* s.s. v okolí Českých Budějovic může výrazně měnit klinické projevy Lymské boreliózy v této oblasti. Přítomnost pro Evropu vzácného druhu podobného *B. carolinensis* vyžaduje další prověření. Značný výskyt a druhová pestrost u nalezených konfekcí *B. burgdorferi* s.l., *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. a *Anaplasma* spp. v klíšťatech naznačuje možné problémy s diagnostikou chorob a rozpoznáním jejich původce a možnou odlišnost v typických klinických projevech onemocnění. Klíšťata sající na infikovaných hostitelích slouží jako spolehlivá cesta k průkazu existence a rozšíření patogenů ve specifických oblastech a jsou vhodným nástrojem k monitorování epidemiologické situace v lokalitách, které lidská populace sdílí s hostiteli jak z divoké přírody tak i s těmi, kteří jsou už po delší dobu našimi blízkými společníky.

## Použitá literatura

**Adaszek L. a Winiarczyk S. (2008):** Molecular characterisation of *Babesia canis canis* isolates from naturally infected dog in Poland. *Vet. Parasitol.* 152:235-241.

**Aguirre E., Sainz A., Dunner S., Amusatogui I., Lopez L., Rodriguez-Franco F. (2004):** First isolation and molecular characterization of *Ehrlichia canis* in Spain. *Vet. Parasitol.* 125(3-4):365-72.

**Alberti A. a Sparagano O.A. (2006):** Molecular diagnosis of granulocytic anaplasmosis and infectious cyclic thrombocytopenia by PCR-RFLP. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1081, 371-378.

**Alitalo A., Meri T., Rämö L., Jokiranta S., Heikkilä T., Seppälä I., Oksi J., Viljanen M., Meri S. (2001):** Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: serum-resistant strains promote C3b inactivation. *Infect. Immun.* 69:3685-3691.

**Allsopp M.T., Louw M., Meyer E.C. (2005):** *Ehrlichia ruminantium*: an emerging human pathogen? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1063:358-60

**Sainz Á., Roura X., Miró G., Estrada-Peña A., Barbara Kohn B., Shimon Harrus S., Solano-Gallego L. (2015):** Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasit. Vectors.* 8:75.

**Arraga-Alvarado C.M., Qurollo B., Parra O.C., Berrueta M.A., Hegarty B.C., Breitschwerdt E.B. (2014):** Molecular Evidence of *Anaplasma platys* Infection in Two Women from Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 91(6):1161-5.

**Ayllón T., Villaescusa A., Tesourob M.Á., Sainz Á. (2009):** Serology, PCR and culture of Ehrlichia/Anaplasma species in asymptomatic and symptomatic cats from central Spain. *Clin Microbiol Infect* 15(2):4-5.

**Ayllón T., Diniz P.P., Breitschwerdt E., Villaescusa A., Rodríguez-Franco F., Sainz A. (2012):** Vector-borne diseases in client-owned and stray cats from Madrid, Spain. *Vector Borne Zoon. Dis.* 12:143-50.

**Babes V. (1888):** Sur l'hémoglobinurie bacterienne du boeuf. *C.R. Acad. Sci., Ser. III Sci. vie* 107, 692-694.

**Bacellar F., Beati L., Franca A. (1999):** Israeli spotted fever rickettsia (*Rickettsia conorii* complex) associated with human disease in Portugal. *Emerg Infect. Dis.* 5: 835-836.

**Bajer A., Rodo A., Bednarska M., Mierzejewska E., Welc-Fałęciak R. (2013):** *Babesia canis* and tick-borne encephalitis virus (TBEV) co-infection in sled dog. *A. of Agricultural and Environm. Medicine.* 426-430.

**Baneth G. (2013):** Pathophysiology and treatment of Babesiosis. Emergence of new piroplasms / diseases in dogs and cats. Proceedings of the International SCIVAC Congress “Canine Leishmaniosis and Other Vector-Borne Dis. 28 – 33.

**Baneth G., Florin-Christensen M., Cardoso L., Schnittger L. (2015):** Reclassification of *Theileria annae* as *Babesia vulpes* sp. nov. *Parasit. Vectors.* 8:207.

**Barakova I., Derdákova M., Carpi G., Rosso F., Collini M., Tagliapietra V., Ramponi C., Hauffe H.C., Rizzoli A. (2014):** Genetic and ecologic variability among *Anaplasma phagocytophilum* strains, northern Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 20(6): 1082-5.

**Baranton G., Postic D., I. Saint Girons, Boerlin P. , Jean-Claude Piffaretti, Assous M., Grimont P.A. (1992):** Delineation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Internat. J. of System. and Evolution. Microbiol.* 42(3), 378-383.

**Barbour A. G., Travinsky B. (2010):** Evolution and Distribution of the ospC Gene, a Transferable Serotype Determinant of *Borrelia burgdorferi*. *mBio.* vol. 1 no.

**Bartunek P., Bojar M., Calsa P., Diblík P., Horcova J., Hoza J., Hulínska D., Janovská D., Pícha D., Valesová M. (2006):** Lymeská borelióza, 3. přepracované vydání. 124.

**Beati L., Péter O., Burgdorfer W., Aeschlimann A., Raoult D. (1993):** Confirmation that *Rickettsia helvetica* sp. nov. is a distinct species of the spotted fever group of *rickettsiae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43(3):521-6.

**Becka S., Schreiber C., Scheinb E., Krückenb J., Baldermann C., Pachnicke S., Georg von Samson-Himmelstjerna, Kohna B. (2014):** Tick infestation and prophylaxis of dogs in northeastern Germany: A prospective study. *Ticks and Tick-borne Diseases.* 5:336–342.

**Beichel E., Petney T.N., Hassler D., Brückner M. a Maiwald M. (1996):** Tick infestation patterns and prevalence of *Borrelia burgdorferi* in ticks collected at a veterinary clinic in Germany. *Vet. Parasitol.* 65(1-2):147-55.

**Billeter S.A., Spencer J.A., Griffin B., Dykstra Ch.C., Blagburn B.L. (2007):** Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic felines in the United States. *Vet.Paras.* 147:194–198.

**Birkenheuer A.J., Correa M.T., Levy M.G., Breitschwerdt E.B. (2005):** Geographic distribution of babesiosis among dogs in the United States and association with dogs bites:150 cases (2000-2003). *J. Am.Vet.Assoc.* 227:942-7.

**Bjørn K., Claus Bo Svendsena, Per Moestrup Jensenb, Jean Vennestrømb, Karen A. Krogfelt (2010):** Seasonal and habitat variation in the prevalence of *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks from Denmark. 101-103.

**Bonnet S., Jouglin M., L’Hostis M., Chauvin A. (2007):** *Babesia* spp. EU1 from roe deer and transmission within *I.ricinus*. *Emerg. Infect. Dis.* 13:1208-10.

**Boozer A.L. a Macintire D.K. (2003):** Canine babesiosis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 33:885-94.

**Boretti F.S., Perreten A., Meli M.L., Cattori V., Willi B., Wengi N., Hornok S., Honegger H., Hegglin D., Woelfel R., Reusch C.E., Lutz H., Hofmann-Lehmann R. (2009):** Molecular Investigations of *Rickettsia helvetica* Infection in Dogs, Foxes, Humans, and Ixodes Ticks. *Appl.and Environ. Microbiol.* 3230–3237.

**Botelho-Nevers E. a Raoult D. (2011):** Host, pathogen and treatment-related prognostic factors in rickettsioses. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30(10):1139–1150.

**Buller R.S., Arens M., Hmiel S.P., Paddock C.D., Sumner J.W., Rikhisa Y. (1999):** *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. *N. Engl. J. Med.* 341(3):148–55.

**Bunikis J., Garpmo U., Tsao J., Berglund J., Fish D., Barbour A. G. (2004):** Sequence typing reveals extensive strain diversity of the Lyme borreliosis agents *Borrelia burgdorferi* in North America and *Borrelia afzelii* in Europe. *Microbiol.* 150(6), 1741-1755.

**Burgdorfer W., Aeschlimann A., Peter O., Hayes S.F., Philip R.N. (1997):** *Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland.*Acta Trop.* 36(4):357-67.

**Canica M.M., Nato F., Merle L. D., Mazie J. C., Baranton G., Postic D. (1993):** Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scandin. Journ. of Infect. Dis.* 441-448.

**Carret C., Delbecq S., Labesse G., Carcy B., Precigout E., Moubri K., Theo P.M. Schetters, Gorenflot A. (1999):** Characterization and molecular cloning of an adenosine kinase from *Babesia canis rossi*. *Eur. J. Biochem.* 265:1015-21.

**Casati S., Sager H., Gern L., Piffaretti J.C. (2006):** Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. For human in *I. ricinus* in Switzerland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 13:65-70.

**Casjens S.R., Claire M. Fraser-Liggett, Emmanuel F. Mongodin, Wei-Gang Qiu, John J. Dunn, Benjamin J. Lufta Steven E. Schutzer (2011):** Whole genome sequence of an unusual *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate. Journ. of bacteriol. 193(6):1489-1490

**Cassini R., Bonoli C., Montarsic F., Tessarina C., Marcera F., Galuppi R.(2010):** Detection of *Babesia* EU1 in *Ixodes ricinus* ticks i northern Italy. Vet. Parasitol. 171:151-154.

**CDC.gov (2015):** *Borrelia mayonii*, Centers for Disease Control and Prevention [online]. Poslední změna 2.11. 2015. [Cit. 5.2. 2017]. Dostupné z: <http://www.cdc.gov/ticks/mayonii.html>.

**CDC.gov (2016):** *Cases of anaplasmosis in the United States* [online]. CDC Statistics and Epidemiology. Annual. CDC 24/7. Poslední změna 16.1. 2016. [Cit. 10.2. 2017]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/anaplasmosis/stats>.

**CDC.gov**

**(2014):** *Babesiosis FAQs* [online]. Poslední změna 4.2. 2014. [Cit. 5.2. 2017]. Dostupné z: [https://www.cdc.gov/parasites/babesiosis/gen\\_info/faqs.html](https://www.cdc.gov/parasites/babesiosis/gen_info/faqs.html).

**Cieniuch S., Stanczak J., Ruczaj A. (2009):** The first detection of *Babesia* EU1 and *Babesia canis canis* in *I. ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) collected in urban and rural areas in Northern Poland. Polish J. of Microbiol. 3:231-236.

**Clark K., Hendricks A., Burge D. (2005):** Molecular identification and analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lizards in the southeastern United States. Applied and Environ. Microbiol. 71(5):2616-2625.

**Clarebout E., Lesson B., Cochez Ch., Casaert S., Anne-Catherine Dalemans, Ann De Cat, Madder M., Saegerman C., Heyman P., Lempereur L. (2013):** Ticks and associated pathogens collected from dogs and cats in Belgium. Parasit. and Vectors. 6:183.

**Coipan E.C., Jahfari S., Fonville M., Maassen C.B., van der Giessen J., Takken W., Takumi K., Sprong H. (2013):** Spatiotemporal dynamics of emerging pathogens in questing *Ixodes ricinus*. Front Cell Infect Microbiol. 2013, 3: 36.

**Crippa M., Rais O., Gern L. (2002):** Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. Vector Borne Zoonotic Dis. 2:3–9



**Daniel M. a Cerny V. (1990):** Occurrence of the tick *Ixodes ricinus* (L.) under the conditions of anthropopressure. *Folia Parasitol.* 37, 183–186.

**Dautel H. a Kahl O. (1999):** Ticks (Acari: Ixodoidea) and their medical importance in the urban environment. In: Robinson, W.H., Rettich, F., Rambo, G.W. (Eds.), *Proceedings of the 3rd International Conference on Urban Pests.* 73–82.

**Dobec M., Golubic D., Punda-Polic V., Kaeppli F., Sievers M. (2009):** *R. helvetica* in *D. reticulatus* ticks. *Emerg. Infect. Dis.* 15:98-100.

**Donatien A., Lestoquard F. (1935):** Existence en Algerie d'une *Rickettsia* du chien. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* ;28:418–9.

**Dongus H., Zahler M., Gothe R (1996):** The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (*Ixodidae*), in Germany: an epidemiologic study and control measures. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 109(6–7):245–8.

**Dubska L., Literak I., Kverek P., Roubalova E., Kocianova E., Taragelova V. (2012):** Tick-borne zoonotic pathogens in ticks feeding on the common nightingale including a novel strain of *Rickettsia* sp. *Ticks and tick-borne dis.* 265-268.

**Duh D., Petrovec M., Avsic-Zupanc T. (2005):** Molecular characterization of human pathogen *Babesia* EU1 in *I. ricinus* ticks from Slovenia. *J.Parasitol.* 91:463-5.

**Duh D., Jelovšek M., Avsic-Zupanc T. (2007):** Evaluation of an indirect fluorescence immunoassay for the detection of serum antibodies against *Babesia divergens* in humus. *Parasitology.* 134:179-85.

**Duh D., Tozon N., Petrovec M., Strasek K., Avsic-Zupanc T. (2004):** Canine babesiosis in Slovenia: Molecular evidence of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli*. *Vet. Res.* 35:365-368.

**Dumpler J.S. (2005b):** Family II. *Anaplasmataceae*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed. Williams & Wilkins Co. 117-145.

**Dumpler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P.(2001):** Reorganisation of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdia* with *Ehrlichia*, and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichiaequi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia Phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 2145-2165.

**Dumpler J.S., Choi K.S., Garcia-Garcia J.C., Barat N.S., Scorpio D.G., Garyu J.W., Grab D.J., Bakken J.S. (2005a):** Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. Emerg. Infect. Dis. 11, 1828-1834.

**Elchos B.N. a Goddard J. (2003):** Implications of presumptive fatal Rocky Mountain spotted fever in two dogs and their owner J. Am. Vet. Med. Assoc. 223, pp. 1450–1452.

**Eng T.R., Wilson M.L., Spilman A., Lastovica C.C. (1988):** Greater risk of *Borrelia burgdorferi* infection in dogs than people. J. Infect. Dis. 158:1410-1411.

**Euroimmun A. G. (2015):** Lyme Borreliosis—the Utility of Improved Real-Time PCR Assay in the Detection of *Borrelia burgdorferi* Infections. 4:663–670.

**Eichenberger R. M., Deplazes P., Mathis A. (2015):** Ticks on dogs and cats: a pet owner-based survey in a rural town in northeastern Switzerland. Ticks Tick Borne Dis. 3:267-71.

**Fernandez-Soto P., Pérez-Sánchez R., Díaz Martín V., Encinas-Grandes A., Alamo Sanz R. (2006):** *Rickettsia massiliae* in ticks removed from humans in Castilla, Spain. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 25:811-3.

**Fitzner L., Ammon A., Baumann I., Talaska T., Schönberg A., Stöbel K., Fingerle V., Wilske B., Petersen L.(2002):** Risk factors in Lyme borreliosis : a German case-control study, Int. J. Med. Microbiol. 291:220.

**Földvári G., Hell E., Farkas R. (2005):** *Babesia canis canis* in dogs from Hungary: Detection by PCR and sequencing. Vet. Parasitol. 127:221-226.

**Földvári G., Márialigeti M., Solymosi N., Lucács Z., Majoros G., Kósa J.P. a Farkas R. (2007):** Hard ticks infesting dogs in Hungary and their infection with *Babesia* and *Borrelia* species. Parasitol. Res. 101: 25-34.

**Fournier P. E., Gouriet F., Brouqui P. (2005):** Lymphangitis-associated rickettsiosis, a new rickettsiosis caused by *Rickettsia sibirica mongolotimonae*: seven new cases and review of the literature. Clin. Infect. Dis. 40:1435–1444.

**Fournier P.E., Allombert C., Supputamongkol Y. (2004):** An eruptive fever associated with antibodies to *Rickettsia helvetica* in Europe and Thailand. J. Clin. Microbiol. 42:816–818.

**Fournier P.E., Fujita H., Takada N., Raoult D. (2002):** Genetic identification of rickettsiae isolated from ticks in Japan. J. Clin. Microbiol. 40(6):2176-81.

**Fukunaga M., Akiko Hamase, Keiji Okada, Minoru Nakao (1996):** *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiology and immunology*, 40(11), 877-881.

**Gaunt S., Beall M.J., Stillman B.A., Lorentzen L., Diniz P.P.V.P, Chandrashekar R., Breitschwerdt E.B. (2010):** Experimental infection and co-infection of dogs with anaplasma platys and Ehrlichia canis: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasit. Vec.* 3:33.

**GEO-3 (2002):** Global Environment Outlook 3. UNEP Earthscan. Earthscan Publ. Ltd., London.

**Gern L., Toutoungi L.N., Hu C.M., Aeschlimann A. (1991):** *Ixodes* (Pholeoixodes) *hexagonus*, an efficient vector of *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. *Med. Vet. Entomol.* 5(4):431-5).

**Gern L., Rouvinez E., Toutoungi L.N., Godfroid E. (1997):** Transmission cycles Of *Borrelia burgdorferi* sensu lato involving *Ixodes ricinus* and/or *I. hexagonus* ticks and the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*, in suburban and urban areas in Switzerland. *Folia Parasitol.* 44:309-314.

**Girard Y. A., Fedorova N. a Lane R. S. (2011):** Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* and detection of *B. bissettii*-like DNA in serum of north-coastal California residents. *Journ. of clin. microbiol.* 49(3):945-954.

**Goossens H., van den Bogaard A., Nohlmans M.K. (2001):** Dogs as Sentinels for Human Lyme Borreliosis in The Netherlands. *J Clin Microb.* 39:844-848.

**Goossens H.A., van den Bogaard A.E., Nohlmans M.K. (2000):** Reduced specificity of combined IgM and IgG enzyme immunoassay testing for lyme borreliosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19:400-402.

**Grauer O.F., Burgess F.C., Cooley A.J., Hagee J.H. (1988):** Renal lesions associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193:237-239.

**Gray J., Zintl A., Hildebrandt A., Hunfeld K-P., Weiss L. (2010):** Zoonotic babesiosis: overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. *Ticks Tick Borne Dis.* 1:3-10.

**Gray J.S., Kahl O., Janetzki-Mittman C., Stein J., Guy E. (1994):** Acquisition of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes ricinus* ticks fed on the European hedgehog, *Erinaceus europaeus* L. *Exp. Appl. Acarol.* 18:485-491.

**Gray J., Dantas-Torres F., Estrada-Peña A., Levin M. (2013):** Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. Ticks Tick Borne Dis. 171–80.

**Greene R.T. (1991):** Canine Lyme borreliosis. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 1:51-64.

**Gutierrez C.N., Martinez M., Sanchez E., De Vera M., Rojas M., Ruiz J. (2008):** Cultivation and molecular identification of *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia chaffeensis* from a naturally co-infected dog in Venezuela. Vet. Clin. Pathol. 37(3):258–65.

**Gutierrez C.N., Martinez M., Sanchez E., De Vera M., Rojas M., Ruiz J. (2008):** Cultivation and molecular identification of *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia chaffeensis* from a naturally co-infected dog in Venezuela. Vet. Clin. Pathol. 37(3):258–65.

**Hamel D., Silaghi C., Lescai D., Pfister K. (2012):** Epidemiological aspects on vector-borne infections in stray and petdogs from Romania and Hungary with focus on *Babesia* spp. Parasitol. Res. 110:1537–45.

**Harrus S., Waner T., Aizenberg I., Foley J.E., Poland A.M., Bark H. (1998):** Amplification of ehrlichia DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. J. Clin. Microbiol. 36 (1), 73-76.

**Härter L. Straubinger R.K., Swruners B.A., Erb H.N., Appel M. (1999):** Up- regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA in dogs experimentally infected with *Borrelia burgdorferi*. Vet. Immunol., Immunopathol., 67, 271-284.

**Häselbarth K., Tenter A.M., Brade V., Krieger G., Hunfeld K.P. (2007):** First case of human babesiosis in Germany - Clinical presentation and molecular characterisation of the pathogen. Int. J. Med. Microbiol. 297:197–204.

**Hegarty B.C., Maggi R.G., Koskinen P., Beall M.J., Eberts M., Chandrashekar R., Breitschwerdt E.B. (2012):** *Ehrlichia muris* infection in a dog from Minnesota. J. Vet. Intern. Med. 26(5), 1217-1220.

**Herwaldt B.L., Cacció S., Gherlinzoni F., Aspöck H., Slemenda S.B., Piccaluga P., Martinelli G., Edelhofer R., Hollenstein U., Poletti G., Pampiglione S., Löschenberger K., Tura S., Pieniasek N.J. (2003):** Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. Emerg. Infect. Dis. 9:942–8.

**Heyman P., Cochez Ch., Hoffhuis A.; Joke van der Giessen, Sprong H., Porter S.R., Losson B., Saegerman C., Donoso-Mantke O., Niedrig M., Papa A. (2010):** A Clear and Present Danger: Tick-borne Diseases in Europe Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 8(1):33-50.

**Hildebrandt A., Gray J.S., Hunfeld K.P. (2013):** Human babesiosis in Europe: what clinicians need to know. *Infection*.41:1057-72.

**Hilpertshauer H., Deplazes P., Schnyder M., Gern L., Mathis A. (2006):** *Babesia* spp. identified by PCR in ticks collected from domestic and wild ruminants in Southern Switzerland. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(10): 6503-6507.

**Homer M. J., Irma Aguilar-Delfin, Sam R. Telford, III, Krause Peter J., Persing David H. (2000):** *Babesia*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13(3): 451–469.

**Hönig V., Svec P., Halas P., Vavruskova Z., Tykalova H., Kilian P., Vetiskova V., Dornakova V., Sterbova J., Simonova Z., Erhart J., Sterba J., Golovchenko M., Rudenko N., Grubhoffer L. (2015):** Ticks and tick-borne pathogens in South Bohemia (Czech Republic)--Spatial variability in *Ixodes ricinus* abundance, *Borrelia burgdorferi* and tick-borne encephalitis virus prevalence.

**Hovius J.W., Emil HoviusK., Anneke Oei, Dirk HouwersJ., Aljevan P. Dam (2000):** Antibodies against specific proteins of and immobilizing activity against three strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato can be found in symptomatic but not in infected asymptomatic dogs. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2611-2621.

**Hubalek Z. a Rudolf I. (2011):** *Microbial Zoonoses and Sapronoses*. St ed. USA (New York), Springer. 1-3.

**Hubalek Z. a Halouzka J. (1997):** Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur. J. Epidemiol.* 13:951-957.

**Hubalek Z., Halouzka J., Juricová Z. (1993):** Prevalence of *borreliae* in *Ixodes ricinus* ticks from urban parks. *Folia. Parasitol.* 40: 236.

**Hulinska D., Drevova H., Votypka J., Langrova K., Kurzova Z. (2004):** Prevalence druhů *Borrelia burgdorferi* sensu latou pacientů v České republice; přímá sekvenční analýza a polymerázová řetězová reakce v reálném čase, *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 4:181-189.

**Huxsoll D.L., Hildebrandt P.K., Nims R.M., Walker J.S. (1970):** Tropical canine pancytopenia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 157(11):1627–32.

**Chang Y.F., Novosel V., Chang C.F., Summers B.A., Ma D.P., Chiang Y.W., Acree W.M., Chuill Shin S., Lein D.H. (2001):** Experimental induction of chronic borreliosis in adult dogs exposed to *Borrelia burgdorferi*- infected ticks and treated with dexamethasone. *Am. J. Vet. Res.* 62:1104-1112.

**Chauvin A., Moreau E., Bonnet S., Plantard O., Malandrin L.(2009):** *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet.Res.* 40:37.

**Chomel B., Mac Donald K., Kasten R., Chang C.C., Wey A., Foley J., Thomas W., Kittleson M. (2001):** Aortic Valve Endocarditis in a Dog Due to *Bartonella clarridgeiae*. *J. Clin. Microbiol.* 39:3548-3554.

**Chu C. Y., Wei Liu, Bao-Gui Jiang, Ding-Ming Wang, Wei-Jia Jiang, Qiu-Min Zhao, Pan-He Zhang, Zhao-Xiao Wang, Guang-Peng Tang, Hong Yang a Wu-Chun Cao (2008):** Novel genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks in southwestern China. *J. of clin. microb.* 46(9):3130-3133.

**Ibarra V. (2006):***Rickettsia slovaca* infection: DEBONEL/TIBOLA. *Ann.N.Y. Acad Sci.* 1078:206-14.

**Identify.us.com:** *Life cycle of the Parasite Babesia, (B.microti or B.divergens) including the infection to humans* [online]. ©2010-2016, IdentifyUS, LLC. Dostupné z: <https://identify.us.com/idmybug/ticks/tick-docs/babesia-life-cycle.html>.

**Inokuma H. (2007):** Vectors and reservoir hosts of *Anaplasmataceae*. In: Raoult D., Parola P., *Rickettsial diseases*. Taylor & Francis Group LLC, NY. 99-212.

**Ionita M., Ioan L.M., Hamel D., Silaghi C. (2011):** Canine babesiosis in Romania due to *Babesia canis* and *Babesia vogeli*: A molecular approach. *Parasitol. Res.* 110:1659-1664.

**Iqbal Z., Chaichanasiriwithaya W., Rikihisa Y. (1994):** Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 32 (7), 1658-1662.

**Ismail N., Bloch K.C., McBride J.W. (2010):** Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clin. Lab. Med.* 30(1):261–92.

**Ivanova L. B., Tomanova A., Alexandra Tomova, Daniel González-Acuña, Roberto Murúa, Claudia X. Moreno, Claudio Hernández, Javier Cabello, Carlos Cabello, Thomas J. Daniels, Henry P. Godfrey, Felipe C. Cabello (2014):** *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere. *Environ. Mic.* 16(4):1069-1080.

**Jado I., Oteo J.A., Aldamiz M., Gil H., Escudero R., Ibarra V. (2007):** *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 13:1405-7.

**Jahfari S., Claudia Coipan E., Fonville M., Docters van Leeuwen A, Hengeveld P., Heylen D., Heyman P., Cees van Maanen, Catherine M. Butler, Földvári G., Szekeres S., Gilian van Duijvendijk, Tack W., Jolianne M. Rijks, Joke van der Giessen, Willem Takken, Sipke E. van Wieren, Katsuhisa Takumi a Hein Sprong (2014):** Circulation of four *A. phagocytophilum* ecotypes in Europe, Parasit vectors. 7: 365.

**Jongejan F. a Uilenberg G. (2004):** The global importance of ticks. Parasit. 129:3-14.

**Kahl O. a Radda A.C. (1988):** Occurrence of tick-borne encephalitis (TBE) virus in Berlin (West). Zentrbl. Bakteriolog. Hyg. A 268, 482–486.

**Kahl O., Schmidt K., Schönberg A., Laukamm-Josten U., Knülle W., Bienzle U. (1989):** Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in Berlin (West). Zentrbl. Bakteriolog. Hyg. A. 270:434–440.

**Karpathy S.E., Dasch G.A., Ereemeeva M.E. (2007):** Molecular typing of isolates of *Rickettsia rickettsii* by use of DNA sequencing of variable intergenic regions. *J. Clin. Microbiol.* 45(8):2545–2553.

**Kawabata H., Masuzawa T., Yasutaku Y. (1993):** Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. Microbiology and immunology, 37(11), 843- 848.

**Kawahara M., Suto C., Rikihisa Y., Yamamoto S. a Tsuboi Y.(1993):** Characterization of ehrlichia organisms isolated from a wild mouse. *J. Clin. Microbiol.* 31 (1), 89-96.

**Keysary A., Waner T., Rosner M., Warner C.K., Dawson J.E., Zass R. (1996):** The first isolation, in vitro propagation, and genetic characterization of *Ehrlichia canis* in Israel. *Vet. Parasitol.* 62(3–4):331–40.

**Kjemtrup A.M. a Conrad P.A. (2006):** A review of the small canine piroplasms from California: *Babesia conradae* in literature. *Vet. Parasitol.* 138:112-7.

**Kjemtrup A.M., Wainwright K., Miller M., Penzhorn B.L., Carreno R.A.(2006):** *Babesia conradae*, sp. nov., a small canine *Babesia* identified in California. *Vet. Parasitol.* 138:103-11.

**Kocan K.M., de la Fuente J., Guglielmone A.A., Melendez R.D. (2003):** Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin. Microbiol. Rev.* 16:698–712.

**Konvanlinova J., Rudolf I., Sikutova S., Hubálek Z., Svobodova V., Svoboda M. (2012):** Contribution to canine babesiosis in the Czech Republic. *Acta Vet.* 81: 91-95.

**Kraiczy P., Skerka C., Kirschfink M., Brade V. a Zipfel P.F. (2001):** Immune evasion of *Borrelia burgdorferi* by acquisition of human complement regulators FHL1/reconectin and factor H. *Eur. J. Immunol.* 31:1674–1684.

**Król N., Obiegala A., Pfeffer M., Elzbieta L. a Kiewra D. (2016):** Detection of selected pathogens in ticks collected from cats and dogs in the Wrocław Agglomeration, South-West Poland. *Parasit. Vectors.* 9:351.

**Król N., Obiegala A., Pfeffer M., Lonc E., Kiewra D. (2016):** Detection of selected pathogens in ticks collected from cats and dogs in the Wrocław Agglomeration, South-West Poland. *Parasites and Vectors.* 9:351.

**Kremar S., Ferizbegović J., Lonić E., Kamberović J. (2014):** Hard tick and tick infestation of dogs in the Tuzla area (Bosnia and Herzegovina) infestation of dogs in the Tuzla area (Bosnia and Herzegovina). *Vet. Arhiv.* 84: 177- 182.

**Kumar M., Shekhar P., Haque S., Maht D. (2008):** Feline Babesiosis. *Vet. World.* 1(4): 120-121.

**Kybicová K., Schánilec P., Hulínská D., Uherková L., Kurzová Z., Spejchalová S. (2009):** Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs in the Czech Republic. *Vector Borne Zoon. Dis.* 9(6):655-61.

**Le Fleche A., Postic D., Girardet K., Olivier P., Baraton G. (1997):** Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *Intern. J. of System. and Evolut. Microbiol.* 47(4):921-925.

**Lempereur L., De Cat A., Caron Y., Madder M., Claerebout E., Saegerman C., Losson B. (2011):** First molecular evidence of potentially zoonotic *Babesia microti* and *Babesia* sp. EU1 in *Ixodes ricinus* ticks in Belgium. *Vector. Born. Zoon. Dis.* 11:125-30.

**Leuba-Garcia S., Martinez R. a Gern L. (1998):** Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks and in the skin of mice. *Zentbl. Bakt. Hyg.* 287:475–484.

**Levy S.A. a Duray P.H. (1988):** Complete heart block in a dog seropositive for *Borrelia burgdorferi*. Similarity to human Lyme carditis. *J. Vet. Intern. Med.*, 2, 138-14.

**Liebisch A., Olbrich S., Brand A., Liebisch G., Mourettou-Kunitz M. (1989):** Natural infection of *Ixodes hexagonus* with *Borrelia burgdorferi*. *Tierärztliche Umschau*, 44, 809-810 (in German).



**Lima M.L.F., Soares P.T., Ramos C.A.N., Araújo F.R., Ramos R.A.N., Souza I.I.F., Faustino M.A.G., Alves L.C.A. (2010):** Molecular detection of *Anaplasma platys* in naturally-infected cats in Brazil. *Braz.J.Microbiol.* 41:381-385.

**Little S.E., Heise S.R., Blagburn B.L., Callister S.M., Mead P.S. (2010):** Lyme borreliosis in dogs and humans in the USA. *Trends Parasitol.*, 26:213-218.

**Lymedisease.org: Babesia** [online]. © 2017 LymeDisease.org advocacy, education and research [Cit. 13.3. 2017]. Dostupné z: <https://www.lymedisease.org/lyme-basics/co-infections/babesia/>.

**Madeddu G., Mancini F., Caddedo A., Ciervo A., Babudieri S., Maida I. (2012):** *Rickettsia monacensis* as cause of MSF-like illness, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 18:702-4.

**Maetzel D., Maier W.A., Kampen H. (2005):** *Borrelia burgdorferi* infection prevalence in questing *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) in urban and suburban Bonn, western Germany. *Parasitol. Res.* 95, 5–12.

**Maggi R.G., Mascarelli P.E., Havenga L.N., Naidoo V., Breitschwerdt E.B. (2013):** Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and *Candidatus Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. *Parasit. Vectors.* 6:103.

**Malmivaara M., Löfström I., Vanha-Majamaa I. (2002):** Anthropogenic effects on understorey vegetation in Myrtillus type urban forests in southern Finland. *Silva Fennica.* 36:367–381.

**Marconi R. T., Liveris D., Schwartz I. (1995):** Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. *J. of clin. Mikrob.* 33(9):2427-2434.

**Margos G., Gatewood A. G., Aanensen D. M., Hanincová K., Terekhova D., Vollmer S. A., Cornet M., Piesman J., Donaghy M., Bormane A., Hurn M.A., Feil E.J., Fish D., Casjens S., Wormser G.P., Schwartz I., Kurtenbach K. (2008):** MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:8730–8735.

**Margos G., Hojgaard A., Robert S. Lane, Cornet M., Fingerle V., Rudenko N., Ogdén N., David M. Aanensen, Fish D., Piesman J. (2010):** Multilocus sequence analysis of *Borrelia*

*bissettii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. Ticks and tick-borne diseases. 1(4):151-158.

**Margos G., Stephanie A. Vollmer, Cornet M., Garnier M., Fingerle V., Vitorino L., Margarida Collares-Pereira, Drancourt M. a Kurtenbach K. (2009):** A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. Applied and Environ. Microbiol. 75(16):5410-5416.

**Martinot M., Zadeh M.M., Hansmann Y., Grawey I., Christmann D., Aguillon S., Jouglin M., Chauvin A., Dominique De Briel (2011):** Babesiosis in immunocompetent patients, Europe. Emerg. Infect. Dis. 17:114-6.

**Masuzawa T., Nobuhiro T., Midori K., Takako F., Yasuhiro Y., Fubito I., Yoshiaki K., Yasuyuki I. a Takayuki E. (2001):** *Borrelia sinica* sp. nov., a lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. Internat. J. of systém. and evol. Microbiol. 51(5):1817-1824.

**Matjila P.T., Penzhorn B.L., Bekker C.P., Nijhof A.M., Jongejan F. (2004):** Confirmation of occurrence of *Babesia canis vogeli* in domestic dogs in South Africa. Vet. Parasitol. 122(2):119–125.

**Meer-Scherrer et al. (2004):** *Babesia microti* Infection in Europe. Current Microbiology 48, pp. 435– 437.

**Millan J., Proboste T., Fernández de Mera I.G., Chirife A.D., de la Fuente J., Altet L. (2016):** Molecular detection of vector-borne pathogens in wild and domestic carnivores and their ticks at the human-wildlife interface. Ticks & Tick Borne Dis. 7: 284–90.

**Mircean V., Dumitrache M.O., Györke A., Pantchev N., Jodies R., Mihalca A.D., Cozma V. (2012):** Seroprevalence and Geographic Distribution of *Dirofilaria immitis* and Tick-Borne Infections (*Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Ehrlichia canis*) in Dogs from Romania. Vector-Borne and Zoon. Dis. 12(7): 595-604.

**Mylonakis M. E., Koutinas A.F, Billinis C., Leontides L.S., Kontos V., Papadopoulos O., Rallis T., Fytianou A. (2003):** Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*E. canis*): a coparison between five methods. Vet. Microbiol. 91(2-3), 197-204.

**Nijhof A.M., Bodaan C., Postigo M., Nieuwenhuijs H., Opsteegh M., Franssen L., Jebbink F., Jongejan F. (2007):** Ticks and associated pathogens collected from domestic animals in the Netherlands. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 7:585–595.

**Nilsson K., Lindquist O., Pahlson C. (1999):** Association of *R.helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *Lancet.* 354:1169-73.

**Nilsson K., Lindquist O., Pahlson C. (1999):** Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *Lancet.* 354(9185):1169-73.

**Ogden N.H., Cripps P., Davison C.C., Owen G., Parry J.M., Timms B.J., Forbes A.B. (2000):** The ixodid tick species attaching to domestic dogs and cats in Great Britain and Ireland. 332–338.

**Otranto D., Dantas-Torres F., Breitschwerdt E.B. (2009):** Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part two. *Trends Parasitol.* 228-235.

**Paddock C.D., Brenner O., Vaid C., Boyd D.B., Berg J.M., Joseph R.J., Zaki S.R., Childs J.E. (2002):** Short report: concurrent Rocky Mountain spotted fever in a dog and its owner *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66:197–199.

**Parasitipedia.net:** *Ticks in dogs and cats: biology, prevention and control* [online]. Poslední změna 12.12. 2016. [Cit. 14.3. 2017]. Dostupné z: [http://parasitipedia.net/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2550&Itemid=2828](http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2550&Itemid=2828).

**Parasitipedia.net:** *Ticks in dogs and cats: biology, prevention and control* [online]. Poslední změna 12.12. 2016. [Cit. 14.3. 2017]. Dostupné z: [http://parasitipedia.net/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2550&Itemid=2828](http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2550&Itemid=2828).

**Parola P. a Raoult D. (2001):** Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin. Infect. Dis.* 32:897-928.

**Parola P. a Raoult D. (2001):** Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 7: 80–83.

**Parola P. et al. (2005):** Tick-borne rickettsioses around the World: emerging diseases challenging old concepts. *Clin. Microbiol. Rev.* 18:719-56.

**Parola P., Paddock C.D., Socolovschi C., Labruna M.B., Mediannikov O., Kernif T., Abdad M.Y., Stenos J., Bitam I., Fournier P.E., Raoult D. (2013):** Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.* 26(4):657-702.

**Pantchev N., Schaper R., Limousin S., Norden N., Weise M., Lorentzen L. (2009):** Occurrence of *Dirofilaria immitis* and Tick-Borne Infections Caused by *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia canis* in Domestic Dogs in France: Results of a Countrywide Serologic Survey. 105:110.

**Pejchalova K., Zakovska A., Fucik K., Schanilec P. (2006):** Serological confirmation of *Borrelia burgdorferi* infection in dogs in the Czech Republic. Vet. Res. Commun. 30(3): 231-8.

**Perez M., Rikihisa Y., Wen B. (1996):** *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. J. Clin. Microbiol. 34(9):2133-9.

**Persing D.H., Herwaldt B.L., Glaser C. (1995):** Infection with a babesia-like organism in northern California. N. Engl. J. Med. 332(5):298–303.

**Petrovec M., Lotric F.S., Zupanc T.A., Strle F., Brouqui P., Roux V. (1997):** Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. J. Clin. Microbiol. 35:1556-9.

**Piana G.P., Galli-Valerio B. (1895):** Su di un infezione del cane con parassiti endoglobulari. Il Moderno Zoiatro 6:163–169.

**Pichon B., Kahl O., Hammer B., Gray J.S. (2006):** Pathogens and host DNA in *Ixodes ricinus* nymphal tick from a German forest. Vector Borne Zoonotic Dis. 6:382-387.

**Pluta S. (2010):** Prevalence of *Coxiella burnetii* and *Rickettsia* spp. in ticks and rodents in southern Germany. Ticks Tick Borne Dis. 1(3):145–147.

**Postic D., Garnier M., Baranton G. (2007):** Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates—description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. Internat. j. med. microbiol. 297(4):263-271.

**Postic D., Ras N. M., Lane R. S., Henderson M., a Baranton G. (1998):** Expanded Diversity among Californian *Borrelia* Isolates and Description of *Borrelia bissettii* sp. nov.(Formerly *Borrelia* Group DN127). J. Clin. Microbiol. 36(12):3497-3504.

**Pritt, B. S., Mead P.S., Johnson D.K., Neitzel D.F., Respicio-Kingry L.B., Davis J.P., Schiffman E., Sloan L.M., Schriefer M.E., Replogle A.J., Paskewitz S.M., Ray J.A., Bjork J., Steward C.R., Deedon A., Lee X., Kingry L.C., Miller T.K., Feist M.A., Theel E.S., Patel R., Irish C.L., Petersen J.M. (2016):** Identification of a novel pathogenic *Borrelia* species causing Lyme borreliosis with unusually high spirochaetaemia: a descriptive study. The Lancet Infect. Dis. 16(5):556-564.

**Pusterla N., Pusterla J.B., Deplazes P., Wolfensberger C., Muller W., Horauf A. (1998):** Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and of canine granulocytic Ehrlichia infection in dogs in Switzerland. J. Clin. Microbiol. 36(12):3460–2.

**Raoult D. a Roux V. (1997):** Rickettsioses as paradigm of new or emerging infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev. 10:694-719.

**Rar V. a Golovljova I. (2011):** Anaplasma, Ehrlichia, and “*Candidatus Neoehrlichia*” bacteria: Pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. Infection, Genetics and Evolution 11. 1842–1861.

**Rar V.A., Maksimova T.G., Zakharenko L.P., Bolykhina S.A., Dobrotvorsky A.K., Morozova O.V. (2005):** *Babesia* DNA detection in canine blood and *Dermacentor reticulatus* ticks in south-western Siberia, Russia. Vector-Borne Zoonotic Dis. 5: 285-287.

**Rauter C., Hartung T. (2005):** Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in Ixodes ricinus ticks in Europe: a metaanalysis. 71(11):7203-16.

**Reis C. et al. (2011):** Questing tick in suburban forest are infected by at least six tick borne pathogens. Vector borne zoonotic dis. 11:907-16.

**Renneker S., J. Abdo, D. E. A. Salih, T. Karagenç, H. Bilgiç, A. Torina, A. G. Oliva, J. Campos, B. Kullmann, J. Ahmed, U. Seitzer (2013):** Can *Anaplasma ovis* in small ruminants be neglected any Langer? Transbound. Emerg. Dis. 60, 105-112.

**Rick Alleman A. a Heather Wamsley L. (2008):** This bacterial disease, caused by two different *Anaplasma* species, is spreading worldwide in dogs and has zoonotic potential. Veterinary Medicine. 1.

**Richter D., Postic D., Sertour N., Livey I., Franz-Rainer Matuschka a Baranton G. (2006):** Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 56(4):873-881.

**Rikihisa Y. (2011):** Mechanisms of Obligatory Intracellular Infection with *Anaplasma phagocytophilum*. Clin. Microbiol. Rev. 24(3): 469–489. doi: 10.1128/CMR.00064-10.

**Rizzoli A., Silaghi C., Obiegala A., Rudolf I., Hubalek Z., Földváti G., Plantard O., Vayssier-Taussat M., Bonnet S., Spitalska E. a Kazimirova M. (2014):** Ixodes ricinus and its transmitted pathogens in urban and peri.urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health, Article. 251:8-9.

- Roncalli A.R. (2001):** The history of Italian parasitology. *Vet.parasitol.* 98:3-30.
- Roux V. a Raoult D. (2000):** Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiol.* 50, 1449–1455.
- Rudenko N., Golovchenko M., Mokráček A., Piskunová N., Růžek D., Mallatová N., Grubhoffer L. (2008):** Detection of *Borrelia bissettii* in cardiac valve tissue of a patient with endocarditis and aortic valve stenosis in the Czech Republic. *J. clin. Microbiol.* 46(10):3540-3543.
- Rudenko N., Golovchenko M., Lin T., Gao L., Grubhoffer L., Oliver J. H. (2009a):** Delineation of a New Species of the *Borrelia burgdorferi* sensu Lato Complex, *Borrelia americana* sp. nov. *J. clin. mikrobiol.* 47(12):3875-3880.
- Rudenko N., Golovchenko M., Růžek, D., Piskunova N., Mallátová N., Grubhoffer L. (2009b):** Molecular detection of *Borrelia bissettii* DNA in serum samples from patients in the Czech Republic with suspected borreliosis. *FEMS microbiology letters.* 292(2):274-281.
- Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L., James H. Oliver Jr. (2009c):** *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from the southeastern region of the United States. *J. clin. mikromol.* 47(1):134-141.
- Rudolf I., Golovchenko M., Sikutová S., Rudenko N., Grubhoffer L., Hubálek Z. (2005):** *Babesia microti* (Piroplasmida: *Babesiidae*) in nymphal *Ixodes ricinus* (Acari: *Ixodidae*) in the Czech Republic. *Folia Parasitol (Praha).* 52(3):274-6.
- Sainz A., Roura X., Miró G., Estrada-Peña A., Kohn B., Harrus S., Solano-Gallego L. (2015):** Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites Vectors.* 8:75.
- Saito-Ito A., Tsuji M., Wei Q., He S., Matsui T., Kohsaki M., Arai S., Kamiyama T., Hioki K., Ishihara C. (200):** Transfusion-acquired, autochthonous human babesiosis in Japan: isolation of *Babesia microti*-like parasites with hu-RBC-SCID mice. *J. Clin. Microbiol.* 38:4511–6.
- Salakij C., Lertwatcharasarakul P., Salakij J., Nunklang K., Rattanakunuprakarn J. (2012):** Molecular characterization on *Anaplasma platys* in a domestic cat from Thailand. *Comp. Clin. Pathol.* 21, 345-348.
- Santarem V.A., Laposy C.B., Farias M.R. (2000):** *Ehrlichia platys* like inclusions and morulae in platelets of cat. *Braz. J.Vet.Sci.* 7:130.

**Santoro M., D'Alessio N., Cerrone A., Lucibelli M.G., Borriello G., Aloise G., Auriemma C., Riccone N., Galiero G. (2017):** The Eurasian otter (*Lutra lutra*) as a potential host for rickettsial pathogens in southern Italy. PLoS. One. 12.

**Senanayake S.N., Papparini A., Latimer M., Andriolo K., Dasilva A.J., Wilson H., Xayavong M.V., Collignon P.J., Jeans P., Irwin P.J. (2012):** First report of human babesiosis in Australia. Med. J. 196:350–2.

**Shih C.M., Liu L.P., Chung W.C., Ong S.J., Wang C.C. (1997):** Human babesiosis in Taiwan asymptomatic infection with a *Babesia microti*-like organism in a Taiwanese woman. J.Clin. Microbiol. 35:450–4.

**Schorn S., Pfister K., Reulen H., Mahling M., Silaghi C. (2011):** Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. Parasit. Vectors. 4:135.

**Schreiber C., Krücken J., Beck S., Maaz D., Pachnicke S., K.Krieger, Gross M., Kohn, Georg von Samson-Himmelstjerna B. (2014):** Pathogens in ticks collected from dogs in Berlin/Brandenburg, Germany, Parasites and Vectors. 7:535.

**Schwan T. a Piesman J. (2000):** Temporal changes in outer surface proteins A and C of the Lyme disease-associated spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the chain of infection in ticks and mice. J. Clin. Microbiol. 38:382–388.

**Silaghi C. (2008):** Prevalence of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in southern Germany. J. Med. Entomol. 45(5):948–955.

**Silaghi C., Woll D., Hamel D., Pfister K., Mahling M., Pfeffer M. (2012):** *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in questing ticks, ticks parasitizing rodents and the parasitized rodents - analyzing the host-pathogen-vector interface in a metropolitan area. Parasit. Vect. 5(1):1-14.

**Siński E., Rijpkema S.G. (1997):** Prevalence of *Borrelia burgdorferi* infection in *Ixodes ricinus* ticks at urban and suburban forest habitats. P. Epidemiol. 51:431–435.

**Skotarczak B. (2003):** Canine ehrlichiosis. Ann. Agric. E.viron. Med. 10, 137-141.

**Skotarczak B. (2009):** Adaptation factors of *Borrelia* for host and vector. (1):1-8.

**Skrabalo Z. a Deanivič Z. (1957):** Piroplasmosis in ma. Docum. Geogr. Trop. 9:11-16.

**Skrabalo Z., Deanovic Z. (1957):** Piroplasmosis in man; report of a case. Doc. Med. Geogr. Trop. 9(1):11-6.

**Skuballa J., Petney T., Pfäffle M., Oehme R., Hartelt K., Fingerle V., Kimmig P., Taraschewski H.(2012):** Occurrence of different *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies including *B. afzelii*, *B. bavariensis*, and *B. spielmanii* in hedgehogs (*Erinaceus* spp.) in Europe. Ticks Tick-Borne Dis. 3, 8–13.

**Skuballa J., Petney T., Pfäffle M. a Taraschewsk H. (2010):** Molecular Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in the European Hedgehog (*Erinaceus europaeus*) and its Ticks. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 10(10): 1055-1057.

**Slater M.R. (2001):** The role of veterinary epidemiology in the study of free-roaming dogs and cats. Prev. Vet. Med. 48:273–286.

**Smith F.D., Ballantyne R., Morgan E.R., Wall R. (2011):** Prevalence, distribution and risk associated with tick infestation of dogs in Great Britain. Med. Vet. Entomol. 25(4):377-84.

**Solano-Gallego L a baneth G. (2011):** Babesiosis in dogs and cats – expanding parasitological and clinical spectra. Vet. Parasitol. 181:48-60.

**Solano-Gallego L., Sainz A., Roura X., Estrada-Peña A., Miró G. (2016):** A review of canine babesiosis: the European perspective. Parasites and Vectors. 9:336.

**Speck S., Derschum H., Damdindorj T., Dashdavaa O., Jiang J., Kaysser P., Jigjav B., Nyamdorj E., Baatar U., Munkhbat E., Choijilsuren O., Gerelchuluun O., Römer A., Richards A.L., Kiefer D., Scholz H., Wölfel R., Zöller L., Dobler G., Essbauer S. (2012):** *Rickettsia raoultii*, the predominant *Rickettsia* found in Mongolian *Dermacentor nuttalli*. Ticks Tick Borne Dis. 3(4):227-31

**Stanczak J., Gabre R.M., Kruminis-Łozowska W., Racewicz M., Kubica-Biernat B. (2004):** *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. Ann. Agric. Environ. Med. 11, 109–114.

**Stanek G. a Reiter M. (2011):** The expanding Lyme *Borrelia* komplex – clinical significance of genomic species? Clin. Microbial Infect. 17:487-93.

**Stensvold Ch.R., Marai D.A., Andersen L.O'Brien, Krogfelt K.A., Jensen J.S., Larsen K.S., Nielsen H.V. (2015):** *Babesia* spp. and other pathogens in ticks recovered from domestic dogs in Denmark. Parasit. And Vec. 8:262.

**Straupe I., Jankovska I., Rusina S., Donis J. (2012):** The impact of recreational pressure on urban pine forest vegetation in Riga city, Latvia. Int. J. Energy Environ. 4:406–414.



**Stuen S., Granquist E.G., Silaghi C. (2013):** *Anaplasma Phagocytophilum*- a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front. Cell.Infect. Microbial.*, 3:31.

**Sun Y., Li S., Jiang J., Wang X., Zhang Y., Wang H. (2014):** *Babesia venatorum* Infection in Child, China. *Emerg. Infect. Dis.* 20(5):896-897.

**szu.cz:** Lymeská borrelióza – *Epidemiologická data za rok 2014*. Mapy a grafy incidencí lymeské boreliózy v České republice. [online]. Poslední změna 15.9. 2015. [Cit. 5.2. 2017]. Dostupné z: [http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Lymeska\\_borrelioza/Lymeska\\_borelioza\\_CR\\_data\\_do\\_roku\\_2014.pdf](http://www.szu.cz/uploads/Epidemiologie/Lymeska_borrelioza/Lymeska_borelioza_CR_data_do_roku_2014.pdf).

**Tabar M.D., Altet L., Francino O., Sanchez A. a Ferrer L. (2008):** Vector-borne infections in cats: Molecular study in Barcelona area (Spain). *Vet. Parasitol.* 151:332-336.

**Tiskina V., Capligina V., Must K., Berzina I., Ranka R. a Jokelainen P. (2016):** Fatal *Babesia canis canis* infection in a splenectomized Estonian dog. *Acta.Vet.Scand.* 58:7.

**Trotta M., Nicetto M., Fogliazza A., Montarsi F., Caldin M., Furlanello T., Solano-Gallego L. (2012):** Detection of *Leishmania infantum*, *Babesia Canis*, and rickettsiae in ticks removed from dogs living in Italy. *Ticks Tick Borne Dis.* 3(5-6):294-7.

**Tsao J.I. (2009):** Reviewing molecular adaptations of Lyme borreliosis spirochetes in the context of reproductive fitness in natural transmission cycles. *Vet. Res.* 40:36.

**Uilenberg G. (2006):** *Babesia*-a historical overview. *Vet.parasitol.* 138:3-10.

**Uilenberg G., Franssen F.F., Perié N.M., Spanjer A.A. (1989):** Three Gross of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *Vet. Q.*, 11,33–40.

**Uspensky I. (2008):** Brown dog tick (or kennel tick) *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodida: Ixodidae). In: Capinera, J.L. (Ed.), *Encyclopedia of Entomology*, vol. 1, 2nd ed. Springer, Dordrecht. 577–580.

**Vannier E. a Krause P.J. (2009):** Update on babesiosis. *Interdiscip. Perspect Infect. Dis.* 10.1155.

**Vannier E. a Krause P.J. (2012):** Human babesiosis. *N. Engl. J. Med.* 366:2397–407.

**Venclikova K., Rudolf I., Mendel J., Betasova L., Hubalek Z. (2014):** Rickettsiae in questing *Ixodes ricinus* ticks in the Czech Republic. *Ticks and Tick-borne Dis.* 135–138.

**Venclikova K., Mendel J., Betasova L., Hubalek Z., Rudolf I. (2015):** First evidence of *Babesia venatorum* and *Babesia capreoli* in questing *Ixodes ricinus* ticks in the Czech Republic. *Annals of Agricult. and Environ. Med.* 212–214.

**Venclikova K., Mendel J., Betasova L., Hubalek Z., Rudolf I. (2015):** First evidence of *Babesia venatorum* and *Babesia capreoli* in questing *I. ricinus* ticks in the Czech Republic. *A. of Agricultural and Environm. Medicine.* 212-214.

**Venclikova K., Mendel J., Betasova L., Blazejova H., Jedlickova P., Strakova P., Hubalek Z., Rudolf I. (2016):** Neglected tick-borne pathogens in the Czech Republic, 2011-2014. *Ticks Tick Born. Dis.* 7(1):107-12.

**Violaine C, Sarah Bonnet, Martine C. a Muriel Vayssier-Taussat (2010):** Prevalence of Five Pathogenic Agents in Questing *Ixodes ricinus* Ticks from Western France. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.* 10(8):723-730.

**Walker D.H. (1996):** Baron S; et al., eds. *Rickettsiae*. In: *Barron's Medical Microbiology* (4th ed.). Univ of Texas Medical Branch. 10: 0-9631172.

**Wang, G., Alje P. van Dam, A. Le Fleche, Postic D., Olivier P., Baraton G., Rob de Boer, Spanjaard L., Dankert J. (1997):** Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *Internat. J. of Systematic and Evolut. Microbiol.* 47(4):926-932.

**Welc-Fałęciak et al. (2015):** First report of two asymptomatic cases of human infection with *Babesia microti* (Franca, 1910) in Poland. *Annals of Agricult. and Environ. Med.* 51–54.

**Welc-Fałęciak R., Rodo A., Siński E., Bajer A. (2009):** *Babesia canis* and other tick-borne infections in dogs in Central Poland. *Vet. Parasitol.* 166(3-4):191-8

**Wielinga P.R., Fonville M., Sprong H., Gaasenbeek C., Borgsteede F., van der Giessen J.W. (2009):** Persistent detection of *Babesia* EU1 and *Babesia microti* in *I. ricinus* in the Netherlands during 5-year surveillance. *Vector Borne Zoon. Dis.* 9:119-22.

**Wilson E. B. (1927):** Probable Inference, the Law of Succession, and Statistical Inference. *Journal of the American Statistical Association.* 209-112.

**Woldehiwet Z. (2010):** The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet. Parasitol.* 167 (2-4), 108-122.

**Zahler M., Steffenz T., Lutz S., Hahnel W.C., Rinder H. a Gothe R. (2000):** *Babesia canis* und *Dermatocentor reticulatus* in Munchen, ein neuer Naturherd in Deutschland. Tierarztl. Prax. 28:116-120.

**Zipfel P.F., Skerka C., Hellwage J., Jokiranta S. T., Meri S., Brade V., Kraiczky P., Noris M., Remuzzi G. (2002):** Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases. *Biochem. Soc. Trans.* 30:971–978.

**Zygner W., Jaros S., Wedrychowicz H. (2008):** Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia afzelii*, and *Anaplasma phagocytophilum* infection in hard ticks removed from dogs in Warsaw (central Poland). 153(1-2):139-42.