

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Klíšťata jako potenciální přenašeči mikrosporidií

Bakalářská práce

Michaela Fibigerová

Školitel: RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.

Školitel specialista: Ing. Nikola Holubová, Ph.D.

České Budějovice 2023

Fibigerová, M., 2023: Klíšťata jako potenciální přenašeči mikrosporidií. [Ticks as a potential vectors of microsporidia. Bc. Thesis, in Czech], 39 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

Anotace

Microsporidia are unicellular parasites that are primarily transmitted by contaminated water or food. Microsporidia are found in all organ systems of their host and cause various pathologies. The aim of this study is to describe another possible mode of transmission - transmission by blood sucking vectors, namely ticks.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, 12.4.2023

.....

Michaela Fibigerová

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat především svému školiteli RNDr. Bohumilu Sakovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce, pomoc při psaní a trpělivost, a své školitelce-specialistce Ing. Nikole Holubové, Ph.D. za trpělivost u praktických dovedností a pomoc se zpracováním výsledků. Také bych chtěla zanechat díky kolektivu Laboratoře veterinární a medicínské protistologie za příjemnou atmosféru během práce a také za sběr vzorků pro mou práci.

Dále bych chtěla poděkovat svým nejbližším za podporu během celého studia.

Práce je součástí programu Laboratoře veterinární a medicínské protistologie, Parazitologického ústavu, BC AV ČR, v. v. i.

Tato práce byla finančně podpořena grantovým projektem GAČR 20–10706S (řešitel RNDr. Bohumil Sak, Ph.D.)

Obsah

1	ÚVOD	6
1.1	Mikrosporidie	6
1.1.1	Historie	6
1.1.2	Morfologie a vývojový cyklus	7
1.1.3	Přenos mikrosporidií	8
1.1.4	Mikrosporidióza	9
1.1.5	<i>Encephalitozoon</i> spp.	10
1.1.5.1	<i>Encephalitozoon cuniculi</i> (Levaditi, Nicolau et Schoen, 1923)	10
1.2	Klíšťata	10
1.2.1	Taxonomie a morfologie	10
1.2.2	Životní cyklus tvrdých klíšťat	11
1.2.3	Klíště jako vektor patogenů	12
1.2.4	Patogeny přenášené klíšťaty	12
1.2.4.1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	12
1.2.4.2	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	12
1.2.4.3	Vir klíšťové encefalitidy	13
1.2.4.4	<i>Rickettsia</i> spp.	13
1.2.4.5	<i>Babesia</i> spp.	13
1.2.5	<i>Ixodes ricinus</i>	13
1.2.6	<i>Dermacentor reticulatus</i>	14
2	CÍLE PRÁCE	15
3	MATERIÁL A METODY	16
3.1	Prevalence mikrosporidií v klíšťatech	16
3.1.1	Klíšťata	16
3.1.2	Izolace DNA z klíšťat	16
3.1.2.1	Příprava vzorků klíšťat	16

3.1.2.2	Izolace DNA ze vzorků	16
3.1.3	Polymerázová řetězová reakce	17
3.1.4	Gelová elektroforéza	18
3.1.5	Izolace z gelu.....	19
3.1.6	Sekvenace a fylogenetické analýzy.....	20
3.1.7	Kvantitativní Real Time PCR	20
3.2	Experimentální přenos mikrosporidií	21
3.2.1	Myši.....	21
3.2.1.1	Spory mikrosporidií.....	21
3.2.2	Klíšťata.....	22
3.2.2.1	Design experimentů.....	22
4	VÝSLEDKY	24
4.1	Výskyt mikrosporidií v klíšťatech.....	24
4.2	Experimentální přenos mikrosporidií	26
5	DISKUZE	28
6	ZÁVĚR	31
7	REFERENCE.....	32

1 ÚVOD

Klíště je velmi rozšířený ektoparazit, který dokáže přenášet celou škálu patogenů způsobujících různorodá onemocnění, a to díky způsobu parazitování, při kterém dochází k interakci s krví hostitele. Mimo jiné, klíště není výhradně savčí parazit a díky životnímu cyklu, vyžadujícímu sání až na 3 různých hostitelích, představují klíšťata potencionálního kandidáta pro přenos mikrosporidií.

Mikrosporidie jsou jednobuněční obligátní paraziti, kteří při snížené imunitě hostitele dokážou způsobovat onemocnění zvané mikrosporidióza. Díky unikátním schopnostem se šířit, např. pomocí vody či potravy, a přežívat v různých podmínkách, jsou mikrosporidie velmi rozšířeným parazitem. Díky širokému hostitelskému spektru a patogenitě různých druhů mikrosporidií, mají na svědomí nemalé škody v chovatelství, ať už členovců, ryb nebo savců. Kvůli omezenému povědomí o existenci těchto parazitů v humánní medicíně a nemocech, které způsobují, dochází často k nesprávné diagnóze a s tím spjaté i nesprávné léčbě.

Teoretickým cílem této práce je obeznámení se s oběma parazity pro lepší pochopení problematiky.

Praktickým cílem je zjištění potenciálního výskytu mikrosporidií v klíšťatech a experimentální ověření schopnosti klíšťat přenést mikrosporidie.

1.1 Mikrosporidie

Mikrosporidie jsou obligátní, eukaryotní jednobuněční intracelulární paraziti zařazení do kmene Microsporidia spadajícího do říše Opisthokonta (Adl et al., 2005). Celkem bylo popsáno více než 1700 druhů rozřazených do 220 rodů (Han et al., 2021). Mikrosporidie dokážou infikovat široké spektrum živočichů, díky čemuž se stávají významnými škůdci v hospodářsky významných chovech bezobratlých a obratlovců. U člověka pak můžeme najít až 17 druhů mikrosporidií (Fadhilah et al., 2022).

1.1.1 Historie

Zhruba před 150 lety byl objeven první druh mikrosporidií (*Nosema bombycis*), který u bource morušového (*Bombyx mori*) způsoboval onemocnění Pébrine, jenž se projevovalo načernalými skvrnami na vajíčkách a housenkách tohoto motýla (Nägeli, 1857). Nejprve byly

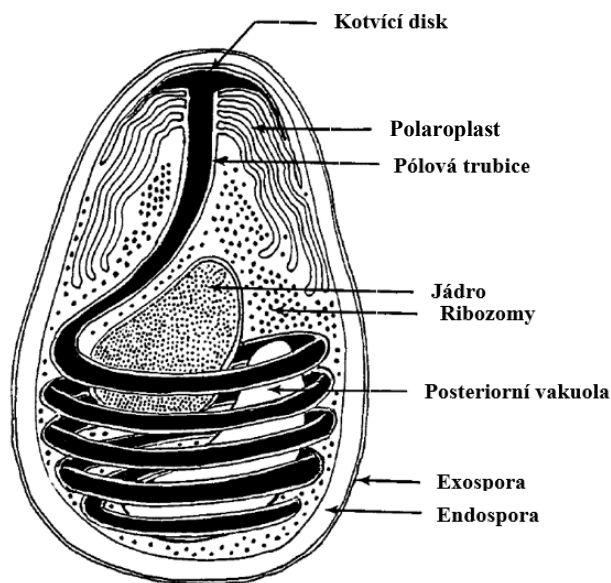
samotným objevitelem Carlem Wilhelmem von Nägeli mikrosporidie zařazeny do skupiny *Schizomycetes* mezi bakterie a kvasinky (Nägeli, 1857). Poté v roce 1882 byly mikrosporidie uznány jako protista spadající do *Cnidosporidia* patřící do skupiny *Sporozoa* z důvodu postrádání určitých znaků skupiny *Schizomycetes* (Balbiani, 1882). Po více než 100 letech byly mikrosporidie popsány jako primitivní eukaryotní organismy a díky tomu byly zařazeny do skupiny Archezoa (Cavalier-Smith, 1983), ale v roce 2008 byly reklasifikovány jako skupina spadající do říše hub (Fadhilah et al., 2022). Nyní se spekuluje o jejich přesnějším zařazení, protože stále není prokázáno, zda-li s kmenem *Aphelida* a druhem *Rozella* spp. tvoří sesterskou skupinu hub *Cryptomycota*, nebo jestli je jejich zařazení v říši hub správné (Park & Poulin, 2021).

1.1.2 Morfologie a vývojový cyklus

Životní cyklus mikrosporidií se skládá ze třech fází. Celý cyklus začíná infekční fází, kde v prvním kroku dojde k digesci nebo vdechnutí spory, která ve vhodných podmínkách začne nabývat na objemu, kdy se pomocí rozkladu molekul disacharidu trehalózy na monomery glukózy (Undeen & Meer, 1999) začne zvyšovat osmotický tlak uvnitř spory, zvýší se příjem vody pro podporu přetlakování spory, jenž vyvrcholí prolomením kotevního disku a vymrštění pólové trubice, pomocí které pak spora přenesení svůj infekční obsah (sporoplasmu) do hostitelské buňky (Han et al., 2022).

Po dokončení procesu přenosu dochází k druhé fázi, a to k proliferační vegetativní fázi (merogonii), kde se sporoplasma mění na jednoduchý útvar meront, u kterého nejprve dochází k jadernému množení a růstu, poté se rozdělí na dceřiné buňky (merozoity) (Han & Weiss, 2017; Keeling & Fast, 2002). Meronty se poté mění ve sporonty, které se mohou dále dělit.

V poslední fázi (intracelulární sporogonie) ze sporontů vznikají sporoblasty a následně ze sporoblastů vznikají diferencované spory. Dochází k tvorbě organel typických k této fázi životního cyklu, a to kotvícího disku, vakuoly a pólové trubice, k zesílení plazmatické membrány a zhuštění cytoplazmy. Při dokončení dozrávání spor dochází k nárůstu tlaku v hostitelské buňce, načež její cytoplazmatická membrána praská a dojde k uvolnění spor do okolního prostředí hostitelské buňky (Han & Weiss, 2017; Keeling & Fast, 2002).



Obrázek 1: Spora mikrosporidie (Desportes-Livage, 2000; upraveno).

1.1.3 Přenos mikrosporidií

Nejčastějším přenosem mikrosporidií je přenos vodou, ve které jsou schopny spory dlouho přežívat (Fayer & Santin-Duran, 2014). Kontaminace vody může být zapříčiněna pomocí moči nebo výkalů infikovaných zvířat nebo lidí, v nichž jsou mikrosporidie obsaženy. Konzumace kontaminované vody byla příčinou dokumentované epidemie mikrosporidie způsobené druhem *Enterocytozoon bieneusi* ve Švédsku, kdy se nakazilo 135 lidí (Decraene et al., 2012).

Druhý nejčastější způsob je přenos pomocí potravy, od špatně tepelně ošetřeného masa (Sak et al., 2019), přes pasterované kravské mléko (Kváč et al., 2016; Lee, 2008) nebo sýry (Vecková et al., 2021) po ovoce, zeleninu a ovocné džusy, listovou zeleninu nebo bobulovité plody (Fayer & Santin-Duran, 2014; Jedrzejewski et al., 2007). Přenos potravou byl zachycen u několika pacientů s HIV (Didier et al., 2004).

Další možností je zoonotický přenos přímým kontaktem s infikovaným zvířetem. Tento způsob přenosu byl prokázán ve studii, kde pomocí sérologie byla zjištěna přítomnost mikrosporidií u dítěte, které žilo společně se štěňaty infikovanými mikrosporidii rodu *E. cuniculi* (McInnes & Stewart, 1991). Je zaznamenán i přenos mikrosporidií *E. bieneusi* z infikovaných morčat na 2 leté dítě (Cama et al., 2007).

Možný je i přenos vzduchem, kde dochází k vdechnutí spor v aerosolu (Han & Weiss., 2017). Dále byl také zjištěn přenos vertikální (transplacentární) u některých druhů obratlovců (Didier et al., 1998), a to u primátů (Snowden et al., 1998), králíků (Baneux & Pognan, 2003), hlodavců (Kotková et al., 2018) či koní (van Rensburg et al., 1991).

1.1.4 Mikrosporidióza

Jedná se o onemocnění způsobené mikrosporidiiemi hlavně v případě snížené imunity, která by mohla zabránit rozvoji infekce mikrosporidií. Přítomnost mikrosporidií je primárně spojována s HIV infekcí, způsobující průjem a malabsorpci živin nebo pneumonii (Didier & Weiss, 2006). Další ohroženou skupinou jsou pacienti po transplantaci orgánu, či onkologičtí pacienti, ale infekce byla zachycena i u imunokompetentních jedinců (Sak et al., 2011; Talabani et al., 2010).

Primárním místem vstupu mikrosporidií do těla hostitele je převážně gastrointestinální trakt, nicméně bylo zjištěno, že kromě zažívacího traktu mohou napadat jakoukoliv orgánovou soustavu. Proto je spektrum klinických projevů mikrosporidiózy velmi široké, závisí na napadeném orgánu a zahrnuje sinusitidu, keratitidu, cholecystitidu, myositidu nebo encefalitidu (Han et al., 2021). Projev infekce však také záleží na druhu mikrosporidie, který pak ovlivňuje i průběh infekce (Didier, 2005).

Klinickým příznakem infekce způsobené nejčastějšími rody, *Enterocytozoon bienersi* a *Encephalitozoon intestinalis*, je průjem. *Enterocytozoon bienersi* je typický tím, že způsobuje lokální infekci, především v gastrointestinálním traktu, zřídka i v dýchacím systému. Druhy rodu *Encephalitozoon* jsou schopny překonat stěnu střeva a rozšířit se do ostatních tkání a díky tomu způsobují nefritidu, bronchitidu, hepatitidu, či u pacientů s HIV systémovou infekci (Weber et al., 1994).

Výskyt mikrosporidiózy může být ovlivněn i stavem imunity. Mezi rizikové skupiny patří lidé s oslabenou imunitou, jako jsou diabetici (Waly et al., 2021), těhotné ženy (van Gool et al., 1997), cestovatelé (Müller et al., 2001) a homosexuálové (Orenstein et al., 1990). Výskyt mikrosporidií může být ovlivněn i profesí, vyšší prevalence byla objevena u pracovníků na jatkách (Halánová et al., 2003).

1.1.5 *Encephalitozoon* spp.

Rod *Encephalitozoon* je typický tím, že se všechny druhy tohoto rodu vyvíjejí v parazitoformní vakuole v cytoplazmě hostitelské buňky (Keeling & Fast, 2002). Do tohoto rodu spadají 3 druhy, *E. intestinalis*, *E. cuniculi* a *E. hellem* (Sak et al., 2011). Rod *Encephalitozoon* se podařilo zachytit jak u imunodeficitních, tak i u imunokompetentních jedinců a jsou schopny infikovat jakýkoliv orgánový systém. Je známo, že jsou infekční příčinou keratitidy, bronchitidy, sinusitidy, hepatitidy nebo diseminované infekce (Han et al., 2021).

1.1.5.1 *Encephalitozoon cuniculi* (Levaditi, Nicolau et Schoen, 1923)

K dnešnímu dni jsou známy 4 genotypy, které jsou rozděleny podle množství opakování nukleotidové sekvence GTTT v rámci ITS sekvence genu kódujícího malou ribosomální podjednotku rRNA (Didier et al., 1995): genotyp I, který byl objeven u králíků i lidí (Ditrich et al., 2011; Kimura et al., 2013), genotyp II objeven u myši a pacientů s HIV (Mertens et al., 1997; Perec-Matysiak et al., 2019), genotyp III nalezen u psů a prasat (Reetz et al., 2009; Snowden et al., 2009) a genotyp IV objeven u koček a také pacientů s HIV (Franzen et al., 1995; Nell et al., 2014).

1.2 Klíšťata

Klíšťata jsou obligátní ektoparaziti, kteří se živí sáním krve obratlovců a díky tomu mají schopnost přenášet široké spektrum patogenů, kteří dokážou způsobit nemoci s fatálními následky jak u zvířat, tak i u lidí (Anderson & Magnarelli, 2008). Klíšťata jsou přizpůsobena k životu v různých teplotních podmínkách. Výskyt klíšťat se mapuje od subarktických oblastí až po tropické a subtropické. Mimo jiné, klíštěcí kousnutí může způsobit alergickou reakci nebo klíštěcí paralýzu (Anderson & Magnarelli, 2008).

Z více než 900 v současnosti popsaných druhů klíšťat má pro člověka medicínský význam asi 10 % (Estrada-Peña et al., 2017).

1.2.1 Taxonomie a morfologie

Klíště je zařazeno do kmene členovci (Arthropoda), podkmene klepítkaci (Chelicerata), třídy pavoukovci (arachnida), řádu roztoči (Acarina) (Cupp, 1991).

Klíšťata se rozdělují do tří čeledí, *Ixodidae* (klíšťatovití, tzv. tvrdá klíšťata), *Argasidae* (klíšťákovití, tzv. měkká klíšťata) a *Nuttalliellidae*, u kterého je zatím znám pouze jeden druh, *Nuttalliella namaqua* (Barker & Murrell, 2004), které se mezi sebou liší jak z biologické, fyziologické i ekologické stránky. Díky těmto evolučním rozdílům, je každá čeleď schopna přenášet různé druhy patogenů (Beard et al., 2021).

Hlavní rozdíl spočívá v tom, že čeleď *Argasidae* postrádá chitinizovaný hřbetní štítek (scutum), kterým *Ixodidae* disponují, za to ale je tělo jedinců *Argasidae* pokryto měkkou kožovitou vrstvou (Cupp, 1991). Dalším rozdílem mezi čeledmi se považuje doba sání na hostiteli, která u čeledi *Argasidae* trvá několik minut až několik hodin, kdežto u *Ixodidae* tato doba trvá až několik dní, protože sají mnohonásobně více krve (Anderson & Magnarelli, 2008).

Rozdíl můžeme najít i mezi pohlavími u čeledi *Ixodidae*, a to v rozsahu chitinového štítu, který u samic pokrývá jen jednu třetinu těla, kdy je zadeček tvořen tzv. alloscutulem a umožňuje samici při sání krve zvětšit objem těla. U samců štítek pokrývá celou délku svého těla (Cupp, 1991).

Klíště se skládá ze dvou částí, z capitula (hlavová část) na přední části těla, kde se pak nachází hypostom, klepítka a makadla, a idiosomu (tělní část), ze které vyrůstají končetiny, jejichž počet se může s různými stádii vývoje měnit (nymfy a dospělci 4 páry, larvy 3 páry) (Anderson & Magnarelli, 2008).

1.2.2 Životní cyklus tvrdých klíšťat

Klíště během celého životního cyklu prochází 4 vývojovými stádii a z toho 3 stádia spadají do aktivních fází. Každá aktivní fáze parazituje na hostiteli určitou dobu. Je důležité si uvědomit, že díky tomuto způsobu vývoje v dospělce je klíště schopno infikovat až 3 různé druhy hostitele (Heyman et al., 2010).

První stádium klíštěte je vykladené vajíčko. Poté nastává první aktivní fáze, larvální, při které je klíště schopné parazitovat na hostiteli, převážně malých savcích a ptácích, po dobu 3-5 dní (Norte et al., 2012). Po odpadnutí nastává metamorfóza, při které se larva mění na nymfu. Stádium nymfy též patří mezi aktivní fáze a na hostiteli (větší savci) dokáže parazitovat 4-7 dní. Po dokončení sání jedinec odpadá a podstupuje metamorfózu v dospělého jedince, během čehož dochází i k diferenciaci pohlaví. V dospělém stádiu už dokáže parazitovat pouze

samička, a to převážně na větších savcích včetně člověka, kde doba přísátí trvá maximálně 11 dní. Zároveň zde dochází také k rozmnožování, přičemž se sameček páruje s přísátou samičkou (Vechtova et al., 2020). Po úspěšném dokončení sání samička odpadá a klade snášku vajíček.

1.2.3 Klíště jako vektor patogenů

Klíště pro přísátí k hostiteli využívá párové chelicery k rozříznutí vnější pokožky, čímž naruší síť kapilár. K pevnému uchycení k hostiteli využívá hypostom se žlábkem, který je pokryt zpětnými háčky, načež je žlábek ohraničen chelicery. Tento útvar pak vytváří kanál, kterým klíště nasává krev hostitele, a zároveň jej využívá pro vylučování slin do krve hostitele, přičemž tyto procesy se během přísátí střídají (Richter et al., 2013).

Přenos nastává tehdy, kdy se patogenu podaří dostat ze střev klíštěte do slin, přičemž je toto umožněno pomocí vylučování přebytečné vody získané z krve hostitele, která je poté vylučována spolu s látkami sloužící pro usnadnění sání (např. antikoagulanty, látky rozšiřující cévy, látky zabírající zánětlivou reakci) přes slinné žlázy do krve hostitele (Estrada-Peña, 2015; Ribeiro, 1995).

1.2.4 Patogeny přenášené klíšťaty

1.2.4.1 *Anaplasma phagocytophilum*

Jedná se o vnitrobuněčnou obligátní gram-negativní bakterii způsobující lidskou granulocytární anaplazmózu (HGA). HGA se často projevuje jako nespecifické onemocnění s horečkou se silnými bolestmi hlavy a bolestmi svalů, občasně je doprovázena vyrážkou. Laboratorně se projevuje jako leukocytopenie, trombocytopenie, zvýšená koncentrace jaterních enzymů s dalšími abnormálními hodnotami. Ve většině případů se nejedná o zdraví ohrožující onemocnění a léčba se provádí pomocí antimikrobiální terapie, ve které je podáván Rifampin (Rodino et al., 2020).

1.2.4.2 *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Borrelia burgdorferi je spirochéta, tedy gram-negativní bakterie ve tvaru dlouhé spirály, která způsobuje onemocnění zvané Lymeská borelióza. Onemocnění se projeví po pár dnech až týdnech, a to bolestí hlavy, malátností, bolestí svalů a občasně i horečkou. Laboratorně se nemoc projevuje jen zvýšenou rychlostí sedimentace erytrocytů a zvýšenou koncentrací

jaterních enzymů. Ne vždy se objeví typická vyrážka a léčba je provedena pomocí léků přímo na tuto nemoc (Rodino et al., 2020).

1.2.4.3 Vir klíšťové encefalitidy

Vir přenášený klíšťaty spadající do čeledi *Flaviviridae* způsobující klíšťovou encefalitidu, která se projevuje příznaky připomínajícími chřipku se střídajícími obdobími horeček a klidu, které pak v jedné třetině případů přechází ve druhou fázi. V této fázi dochází k propuknutí onemocnění jako encefalitida, meningitida nebo meningoencefalitida, přičemž tyto nemoci mohou u pacienta zanechat dlouhodobé následky. Nejlepším způsobem, jak nemocem předejít, je očkování, protože léčba je jen podpůrná (Madison-Antenucci et al., 2020).

1.2.4.4 *Rickettsia* spp.

Skupina gram-negativních bakterií, která se dělí na tři podskupiny podle toho, které onemocnění způsobují. Klíštětem přenášená skupina je skupina způsobující skvrnitou horečku. Každý druh v této skupině způsobuje jiný typ skvrnité horečky a projevy nemocí jsou různorodé, ale některé příznaky mají stejné, a to horečka, bolest hlavy a únava. U léčby (doxycyklin) je zásadní zachycení nemoci v co nejčasnějším stádiu kvůli případným celoživotním následkům (Rodino et al., 2020).

1.2.4.5 *Babesia* spp.

Je skupina prvoků parazitujících v erythrocytech způsobující babeziózu, která se nejčastěji projevuje bolestí hlavy, únavou a bolestí svalů. Laboratorně se projevuje hemolytickou anémií se zvýšenou koncentrací jaterních enzymů. Léčba babeziózy závisí na závažnosti onemocnění, kde se pro lehký až střední průběh podává atovaquone a azithromycin, pro těžký průběh clindamycin a quinin (Rodino et al., 2020).

1.2.5 *Ixodes ricinus*

Klíště obecné parazituje na celém spektru hostitelů, rozdíl můžeme najít pouze v preferenci jednotlivých stádií životního cyklu. Bylo vyzkoušeno, že mladší stadia vyhledávají spíše menší obratlovce, např. ptáky, drobné savce nebo kopytníky, kdežto dospělé stádium vyhledává větší obratlovce, např. psy, skot apod. (Gray et al., 1992).

Vyhledávají vlhčí oblasti a spíše nižší porosty, tudíž je jejich výskyt orientován do lesních porostů, luk nebo městských parků, možný je i výskyt v jeskyních nebo hnízdech (Anderson & Magnarelli, 2008).

1.2.6 *Dermacentor reticulatus*

Dermacentor reticulatus je znám pro svou odolnost vůči nízkým teplotám, a proto jeho aktivita byla zaznamenána i během zimních období. Tento druh dokáže také přežívat pod vodou, a to minimálně měsíc. V porovnání s rodem *I. ricinus* je jejich vývojový cyklus mnohem rychlejší a též má 3 aktivní stádia, ale na hostitelích nalézáme spíše dospělé samice, které vyhledávají střední až velké savce. Nejčastěji *D. reticulatus* přenáší *Rickettsia* spp. či viry způsobující klíšťovou encefalitidu nebo Omskou hemoragickou horečku. Vyhledává spíše nižší a řidší vegetaci, jako břehy jezer, louky nebo smíšené lesy (Földvári et al., 2016).

2 CÍLE PRÁCE

1. Zpracovat literární rešerši o tématu
2. Pomocí molekulárních metod vyšetřit vzorky klíšťat na přítomnost mikrosporidií rodu *Encephalitozoon*
3. Kvantifikovat množství spor v pozitivních vzorcích pomocí qPCR
4. Vyhodnotit roli klíšťat v šíření mikrosporidií
5. Vyvodit závěry ze získaných dat v souvislosti s epidemiologií mikrosporidióz

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Prevalence mikrosporidií v klíšťatech

3.1.1 Klíšťata

Klíšťata byla sbírána dvěma způsoby. Ve spolupráci s kolegy z Ústavu biologie obratlovců byla klíšťata získávána vlněním v okolí Českých Budějovic a Valtic na jižní Moravě. Druhým způsobem bylo získávání klíšťat od dobrovolníků, kteří sbírali klíšťata z různých druhů divokých a domácích zvířat a člověka. Klíšťata byla umístěna do uzavíratelných zkumavek, byl určen druh klíštěte, stádium vývoje, u dospělců pohlaví a druh hostitele.

3.1.2 Izolace DNA z klíšťat

DNA se z tkáně klíšťat izolovala pomocí komerčně dodávaného kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen).

3.1.2.1 Příprava vzorků klíšťat

Pro lepší extrakci DNA bylo nutné předem vzorky klíšťat nařezat pomocí sterilní žiletky na podložním sklíčku. Nakrájený vzorek byl opatrně vložen do předpřipravené izolační mikrozukavky obsahující 200 μ l ATL pufru, 4 zirkonové kuličky (2 mm), 1 skleněnou kuličku (5 mm) a 0,5 ml skleněných kuliček (0,5 mm).

3.1.2.2 Izolace DNA ze vzorků

Izolační mikrozukavky s nakrájenými vzorky byly homogenizovány v beadbeateru (MP Fast Prep®-24 Instrument) při rychlosti 5,5 m/s po dobu 60 sekund. Poté bylo do homogenizovaných vzorků napipetováno 20 μ l proteinázy K. Takto připravené vzorky byly vloženy na 1 hodinu do termobloku předehřátého na 56 °C, přičemž byly v průběhu pravidelně promíchávány.

Po uplynutí jedné hodiny bylo do vzorků napipetováno 200 μ l AL pufru a obsah mikrozukavek byl promíchán pomocí vortexu. Poté bylo přidáno 200 μ l 96% EtOH, vzorky byly zvortexovány a centrifugovány (Eppendorf MiniSpin) po dobu 60 s při 14 000 g. Vzniklý supernatant byl přenesen na kolonu mikrozukavky a zcentrifugován po dobu 3 minut při 14 000 g.

Obsah ve spodní části mikrozkuřavky byl vylit, na kolonu bylo napipetováno 500 µl AW1 pufru a mikrozkuřavky byly centrifugovány po dobu 60 s při 14 000 g. Poté byl obsah ve spodní části sběrné mikrozkuřavky vylit a na kolonu bylo napipetováno 500 µl AW2 pufru a mikrozkuřavky byly centrifugovány po dobu 60 s při 14 000 g. Obsah spodní části sběrné mikrozkuřavky byl opět odstraněn a mikrozkuřavky byly centrifugovány po dobu 60 s při 14 000 g. Horní část s kolonou byla přemístěna na čistou 1,5 ml mikrozkuřavku, na kolonu bylo napipetováno 200 µl AE pufru a následovala minutová inkubace při laboratorní teplotě. Následně byly mikrozkuřavky centrifugovány po dobu 60 s při 14 000 g. Nakonec byla horní část kolony odstraněna a vyizolovaná DNA byla skladována při -20 °C.

3.1.3 Polymerázová řetězová reakce

Nested polymerázová řetězová reakce (PCR) se skládá ze dvou po sobě jdoucích bloků, primární a sekundární reakce, kde každá z nich má své specifické primery (Tabulka I) a reakční směs se lišila použitím primárního PCR produktu v sekundární reakci místo vyizolované DNA (Tabulka II). Nested PCR umožnila amplifikaci 5' konce genu velké ribozomální podjednotky, 3' konce genu malé ribozomální podjednotky a celé sekvence ITS (internal transcribed spacer) (cca 320 bp, Katzwinkel-Wladarsch et al., 1996).

Tabulka I: Nukleotidové sekvence primerů *Encephalitozoon* spp.

Primární primery (Katzwinkel-Wladarsch et al., 1996)	
INT580F	5' - TGC AGT TAA AAT GTC CGT AGT - 3'
INT580R	5' - TTT CAC TCG CCG CTA CTC AG - 3'
Sekundární primery (navrženy v LVMP)	
MSP-6A	5' - ATG CTT AAG TCM AAG GGG T - 3'
MSP-5A	5' - GTC GCT ATC TAA GAT GAC GC - 3'

Tabulka II: Složení směsi nested PCR

Reagencie	Zásobní roztoky	Primární reakce	Sekundární reakce
deionizovaná H ₂ O	—	35,10 µl	35,10 µl
MgCl ₂	25 mM	1,00 µl	1,00 µl
pufr	10×	5,00 µl	5,00 µl
dNTP's	10 mM	1,50 µl	1,50 µl
forward primer	10 µM	1,50 µl	1,50 µl
reverse primer	10 µM	1,50 µl	1,50 µl
BSA	10 mg/1ml	2,00 µl	2,00 µl
Taq	5 U/µl	0,40 µl	0,40 µl
DNA/PCR produkt	—	2,00 µl	2,00 µl
Celkový objem		50,00 µl	50,00 µl

Do každé sady reakcí byla zahrnuta pozitivní i negativní kontrola. Jako pozitivní kontrola sloužila DNA *E. cuniculi* genotyp II vyizolovaná z tkáňové kultury Vero E6 v koncentraci 1×10^4 spor na 1 ml.

Amplifikační PCR program se skládal z počáteční denaturace při teplotě 94 °C po dobu 3 min, 35 cyklů (denaturace při teplotě 94 °C po dobu 45 s, nasedání primerů při teplotě 58 °C po dobu 45 s a syntézu nového řetězce při teplotě 72 °C po dobu 1 min), a syntézy nového řetězce při 72 °C po dobu 7 minut.

3.1.4 Gelová elektroforéza

Pomocí gelové elektroforézy byly získány fragmenty DNA nutné k izolaci z gelu a byla ověřována délka DNA fragmentů. K tomu byl použit 1% agarózový gel, ve kterém bylo obsaženo 0,00002 % ethidium-bromidu.

Podle stanoveného poměru byla navážena agaróza, která se smíchala s 1× TAE pufrem (10% vodný roztok 0,5 M EDTA, 24,2% vodný roztok Tris báze, 5,7% vodný roztok ledové kyseliny octové, pH 8,00). Pomocí mikrovlnné trouby byla tato směs v Erlenmeyerově baňce zahřívána do úplného rozpuštění agarózy v pufru. Následně byla baňka s roztokem zchlazena pod tekoucí studenou vodou na teplotu cca 40 °C. Po zchlazení byl do směsi napipetován roztok ethidium bromidu a veškerý roztok byl nalit do formy s vloženými příslušnými hřebeny. Po úplném zatuhnutí byl gel vložen do elektroforetické vany, která byla naplněna 1× TAE pufrem, a hřebeny byly vyjmuty. Do první jamky bylo napipetováno 7 µl 100 bp DNA Ladderu (O'Gene Ruler™) a do ostatních jamek 20 µl produktů sekundární reakce PCR. Pro pečlivé rozdělení DNA fragmentů probíhala elektroforéza při 80 V.

3.1.5 Izolace z gelu

Pro extrakci fragmentů DNA z gelu byl použit komerčně dodávaný kit Gen Elute (Sigma Aldrich).

Před extrakcí bylo potřeba z gelu čistým skalpelem vyříznout námi zkoumaný fragment DNA a vložit ho do čisté mikrozkušavky. Do mikrozkušavky bylo poté napipetováno 500 µl Gel Solubilization Solution a mikrozkušavka byla vložena do termobloku k inkubaci při 50 °C po dobu 10 min a každé dvě až tři minuty byly vzorky promíchány. Během inkubace byla sestavena Binding Column G, do které bylo napipetováno 500 µl Column Preparation Solution a mikrozkušavka byla centrifugována 60 s při rychlosti 14 000 g. Do termobloku předeřátého na 65 °C byla vložena PCR voda.

Po rozpuštění fragmentu gelu (roztok musí být žlutý nikoli oranžový nebo fialový) bylo ke vzorku připipetováno 150 µl isopropanolu a vzorek byl promíchán. Následně byl veškerý obsah mikrozkušavky přepipetován na předem připravenou kolonu (Binding Column G) se sběrnou mikrozkušavkou, která byla poté centrifugována 60 s při rychlosti 14 000 g. Odpad ze sběrné zkumavky byl vylit a na kolonu bylo napipetováno 700 µl Wash Solution G. Kolona byla centrifugována po dobu 60 s při rychlosti 14 000 g. Odpad ze sběrné zkumavky byl vylit a znovu centrifugován 60 s při rychlosti 14 000 g bez přídavku jakýchkoliv roztoků. Po dotočení v centrifuze byly kolony otočeny o 180° a následně byly centrifugovány 180 s při rychlosti 14 000 g. Nakonec byla kolona vložena do čisté 1,5 ml mikrozkušavky. Na kolonu bylo napipetováno 30 µl předeřáté PCR vody a 60 s se vzorky inkubovaly při laboratorní teplotě. Poté byla mikrozkušavka 60 s centrifugována při rychlosti 14 000 g. V získaném roztoku byla změřena koncentrace DNA pomocí přístroje NanoDrop a byly připraveny vzorky pro sekvenaci.

3.1.6 Sekvenace a fylogenetické analýzy

Sekvenování sekundárních PCR produktů bylo provedeno pomocí ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit a sekvenátoru ABI123130 za použití sekundárních primerů v komerčních firmách (SeqMe, Dobříš, Česká republika; nebo Eurofins, Praha, Česká republika).

Získané výsledné sekvence byly spojeny v programu ChromasPro (Technelysium, Pty Ltd, Jižní Brisbane, Austrálie) a dále zpracovány v programu BioEdit Sequence Alignment Editor (Ibis Biosciences) a porovnány se sekvencemi uloženými v GenBank.

3.1.7 Kvantitativní Real Time PCR

Real Time PCR byla použita ke stanovení množství spor *E. cuniculi* v klišťech vzorcích, a to pomocí specifické TaqMan próby (268 bp) a specifických primerů amplifikujících část genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (rRNA) *Encephalitozoon* spp. (Wolk et al., 2002) (Tabulka III). Množství všech reagensů zahrnuté v jedné reakci jsou uvedeny v Tabulce IV.

Tabulka III: Nukleotidové sekvence próby a specifických primerů pro RT-PCR

<i>Encephalitozoon</i> spp.	
RT-ENC-F	5' - GTC CGT TAT GCC CTG AGA - 3'
ET-ENC-R	5' - ACA GCA GCC ATG TTA CGA CT - 3'
Probe1-ENC_FITC	5' - red 640-TGG ACG AAG ATT GGA AGG TCT GAG TC-phosphate-3'

Tabulka IV: Seznam směsí pro RT-PCR

Roztoky	Množství
PCR H ₂ O (Top-Bio, ČR)	5,0 µl
forward primer (10 µM, Generi Biotech, ČR)	1,0 µl
reverse primer (10 µM, Generi Biotech, ČR)	1,0 µl
FastStart Universal Probe Master 2× (Roche, USA)	12,5 µl
próba (10 µM, Generi Biotech, ČR)	0,5 µl
DNA	5,0 µl
Celkem	25,0 µl

Program použitý k amplifikaci části genu, který kóduje malou podjednotku rRNA *Encephalitozoon* spp., se skládal z počáteční denaturace při teplotě 95 °C po dobu 3 minut, samotné amplifikace sestávající ze 45 cyklů, kde jeden cyklus se skládal z denaturace při teplotě 95 °C po dobu 45 s, nasedání primerů při teplotě 60 °C po dobu 10 s a z extenze při teplotě 72 °C po dobu 16 s. Nakonec nastala závěrečná extenze při 55-85 °C po dobu 16 s rychlostí 20 °C/s a chlazení 40 °C po dobu 30 s (Wolk et al., 2002).

Bylo nutné sestrojit kalibrační křivku pro určení výsledků reakce. Ta byla sestrojena pomocí známého množství spor obsaženého v již vyizolované DNA rodu *E. cuniculi* genotyp II (10^3 až 10^8) (Sak et al., 2017). Výsledky byly zpracovány pomocí Light cycler 480 Software Release 1.5.0 SP4 (Roche).

Každá RT-PCR série obsahovala vzorky o známé koncentraci *Encephalitozoon* spp. ($1,0 \times 10^6$) a negativní kontroly jako použité standardy. Všechny vzorky byly testovány v triplikátech. Koncentrace spor byla vypočítána pomocí automaticky odečítané CT hodnoty (threshold cycle), která byla přepočítána na počet spor na klišť.

3.2 Experimentální přenos mikrosporidií

3.2.1 Myši

Pro pokusy bylo použito vždy 10 imunodeficitních SCID myši, 7–9 týdnů starých (vlastní chov, PaÚ BC AVČR v Českých Budějovicích). Myši byly chovány za standardních podmínek ve sterilním prostředí v IVC (Air Handling Solutions; Tecnoplast, Italy) s HEPA filtry ve zvěřinci PaÚ AVČR, v.v.i. v Českých Budějovicích. Myši byly krmeny sterilní komerční směsí (TOP – VELAZ Praha) a napájeny sterilní vodou *ad libitum*.

3.2.1.1 Spory mikrosporidií

Byly použity spory *Encephalitozoon cuniculi* kmene EC2 izolovaného Koudelou a spol. (1994) z dexamethazonem imunosuprimované myši, které byly kultivovány v buňkách opičích ledvin Vero E6 v termostatu při teplotě 37 °C v kompletním kultivačním médiu RPMI-1640 Hepesmodification (hepes 25mM, Sigma) s přidavkem 2,5% bovinního fetálního séra (Bofes, ZVOS Hustopeče), směsi antimykotik, antibiotik (Sigma) (100 UI penicilinu, 10 µg streptomycinu, 0,25 µg amfotericinu B/ml média), gentamycinu (30 µg/ml RPMI) a neesenciálních aminokyselin (SEVAC, Praha). Naadherované infikované buňky byly

uvolněny pomocí skleněné tyčinky. V deionizované vodě došlo k plasmolýze buněk a jejich centrifugací (20 min při 1370 g) byl získán sediment se spory, který byl uchováván v pufru PBS s obsahem antibiotik a antimykotik v chladničce při 4 °C.

Před samotným použitím byly spory získané z *in vitro* kultur mikrosporidií počítány v Bürkerově komůrce a byly připraveny infekční dávky ve vodě.

3.2.2 Klíšťata

V rámci tohoto experimentu byla použita laboratorně chovaná naivní klíšťata rodu *Ixodes ricinus* (vlastní chov, PaÚ BC AVČR v Českých Budějovicích). Před použitím pro experiment byl reprezentativní vzorek klíšťat z kolonie vyšetřen molekulárními metodami na přítomnost mikrosporidií (viz kapitoly 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4).

3.2.2.1 Design experimentů

Experiment 1 – přenos mikrosporidií z infikovaného hostitele do klíšťat

Před samotným pokusem byly myši perorálně jícni sondou infikovány spory *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II v koncentraci 10^7 spor v 0,2 ml vody/myš. Kontrolní (neinfikované) myši byly inokulovány 0,2 ml sterilní vody/myš. Infikované i neinfikované myši byly chovány odděleně ve sterilním prostředí v izolátorech (BEM, Znojmo, ČR) s HEPA filtry.

Po 11 dnech od infekce byla myším vyholena část srsti na zádech pomocí holicího strojku, kam byl poté přilepen a lepící páskou připevněn speciální košíček (Obr. 2), do kterého byla vložena klíšťata (samec a samice) *I. ricinus*.

Sedm až devět dní po přiložení klíšťat došlo k odpadnutí nasátých samic klíšťat. Infikované myši sloužící k nasátí klíšťat byly následně vypitvány pro zjištění úspěšnosti infekce mikrosporidii. Při pitvě byly odebrány tyto orgány: ledviny, játra, mozek, slezina a vzorek krve. Z nasátých samic klíšťat a orgánů myši byla vyizolována DNA a provedena molekulární detekce mikrosporidiové DNA (viz kapitoly 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4).



Obrázek 2: Myš se speciálním košíčkem na klíšťata

Experiment 2 – transovariální přenos mikrosporidií

Jedná se o obdobu experimentu 1, kdy samice *I. ricinus*, infikované mikrosporidiemi z pozitivních myší, byly ponechány vyklást vajíčka (Obr. 3), která byla následně testována na přítomnost mikrosporidiové DNA molekulárními metodami (viz kapitoly 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4). Také pozitivita samic po vykladení byla potvrzena molekulárními metodami.



Obrázek 3: Samice *I. ricinus* s vykladenými vajíčky

Experiment 3 – transstadiální přenos mikrosporidií

Obdobně jako v experimentu 1 byly využity imunodeficitní SCID myši, samice, 7-9 týdnů staré infikované sporami *E. cuniculi* genotyp II v koncentrací 10^7 spor v 0,2 ml vody/myš, nebo inokulované 0,2 ml sterilní vody/myš (kontrolní skupina).

Na těchto myších byly v košíčkách nechány sít naivní larvy *I. ricinus* v počtu 100 larev/myš nebo nymfy v počtu 15 ks/myš. Po úspěšném nasátí byly larvy/nymfy ponechány se svléct do nymf (larvy 1 měsíc, nymfy 3 měsíce), které byly testovány na přítomnost mikrosporidiové DNA molekulárními metodami (viz kapitoly 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4).

4 VÝSLEDKY

4.1 Výskyt mikrosporidií v klíšťatech

Pro zjišťování přítomnosti mikrosporidií byly získány dva druhy klíšťat z čeledi *Ixodidae*, *I. ricinus* a *Dermacentor reticulatus*. Zpracováno bylo celkem 217 vzorků, 203 *I. ricinus* a 14 *D. reticulatus*. Nejvíce bylo získáno samic a nymf *I. ricinus* (Tabulka V).

Tabulka V: Rozdělení vzorků podle druhu klíšťat, vývojového stádia a pohlaví

<i>Ixodes ricinus</i>		<i>Dermacentor reticulatus</i>	
Pohlaví	Počet	Pohlaví	Počet
Samec	34	Samec	7
Samice	100	Samice	5
Nymfa	69	Nymfa	-
Mix	-	Mix	2
Celkem	203	Celkem	14

Vlajkováním bylo získáno 137 vzorků. Zbývající část byla nalezena na hostitelích uvedených v Tabulce VI. Nejvíce vzorků bylo získáno vlajkováním, vzorky z hostitelů nejčastěji pocházely ze psa, člověka a kočky. Vzorky byly shromažďovány na 2 větších územních celcích, a to v jižních Čechách a na jižní Moravě (Tabulka VI).

Tabulka VI: Výpis hostitelů a lokalit

Hostitel	Počet vzorků	Lokalita
Člověk	18	Doubravice, Trhové Sviny, Boletice, České Budějovice, Albertice nad Vltavou
Ještěrka	1	Doubravice
Kočka	13	Doubravice, Chotěbudice, Bulhary, Rožmberk nad Vltavou, Boršov nad Vltavou
Jelen	3	Bulhary
Pes	39	Břeclav, Doubravice, České Budějovice, Chotčiny, Prachovice, Zdíkov, České Budějovice, Hořice na Šumavě, Pohůrka, Větrník, Volary, Bulhary, Landštejn, Frymburk
Srnec	6	Bulhary, Štěkeň
Neznámý (vlajkování)	137	Břeclav, Valtice, Doubravice, Chotěbudice, Branišovský les, Rendezvous, Římov

Podařilo se zachytit 22 vzorků pozitivních na přítomnost mikrosporidií. V pozitivních vzorcích se podařilo zachytit mikrosporidie rodu *Encephalitozoon cuniculi* genotyp I a II. Pozitivní vzorky byly rozděleny do dvou skupin podle toho, jakým způsobem byly získány, a to vlajkováním (Tabulka VII) a nalezením na hostiteli (Tabulka VIII).

Tabulka VII: Kvantifikace a genotypizace mikrosporidií v pozitivních vzorcích (vlajkování)

Klíště			Mikrosporidie	
Pohlaví/stádium	Druh	Lokalita	qPCR	Genotypizace
Samice	<i>Ixodes ricinus</i>	Valtice	4.7×10^0	<i>E. cuniculi</i> I
Samice	<i>Ixodes ricinus</i>	Rendezvous	1.7×10^0	-
Samice	<i>Ixodes ricinus</i>	Rendezvous	1.1×10^0	<i>E. cuniculi</i> I
Samec	<i>Ixodes ricinus</i>	Rendezvous	5.3×10^1	<i>E. cuniculi</i> I
Samec	<i>Ixodes ricinus</i>	Rendezvous	1.2×10^2	-
Samec	<i>Ixodes ricinus</i>	Rendezvous	1.5×10^1	<i>E. cuniculi</i> II
Samec	<i>Ixodes ricinus</i>	Rendezvous	9.2×10^0	<i>E. cuniculi</i> II
Nymfa	<i>Ixodes ricinus</i>	Valtice	1.8×10^1	<i>E. cuniculi</i> II
Nymfa	<i>Ixodes ricinus</i>	Valtice	5.4×10^0	<i>E. cuniculi</i> II
Nymfa	<i>Ixodes ricinus</i>	Rendezvous	1.1×10^2	<i>E. cuniculi</i> I
Nymfa	<i>Ixodes ricinus</i>	Rendezvous	4.0×10^0	<i>E. cuniculi</i> II

Vzorků, které byly získány vlajkováním, bylo celkem 137, z toho se podařilo zachytit 11 vzorků pozitivních na přítomnost mikrosporidií. Mikrosporidiální DNA byla identifikována pouze u klíšťat rodu *Ixodes ricinus*, které byly získány v lokalitách Valtice a Rendezvous. 3 vzorky pocházely z dospělých samic, 4 ze samců a 4 vzorky z nymf. Pomocí RT-qPCR bylo stanoveno množství spor, které se pohybovalo v rozmezí od 1-115 spor na klíště. Následná sekvenace prokázala přítomnost *E. cuniculi* genotyp I u 4 pozitivních vzorků a *E. cuniculi* genotyp II u 5 pozitivních vzorků. Ve dvou případech se i přes pozitivní výsledek qPCR nepodařilo DNA mikrosporidií naamplifikovat konvenční PCR.

Tabulka VIII: Kvantifikace a genotypizace mikrosporidií v pozitivních vzorcích získaných z hostitelů

Klíště				Mikrosporidie	
Pohlaví	Druh	Hostitel	Lokalita	qPCR	Genotypizace
Samice	<i>Ixodes ricinus</i>	Pes	Zdíkov	1.5×10^1	<i>E. cuniculi</i> I
Samice	<i>Ixodes ricinus</i>	Pes	Zlaté Moravce	2.1×10^0	<i>E. cuniculi</i> II
Samice	<i>Ixodes ricinus</i>	Pes	Chotěbudice	9.0×10^0	-
Samice	<i>Ixodes ricinus</i>	Pes	Hořice na Šumavě	1.2×10^1	<i>E. cuniculi</i> II
Samice	<i>Ixodes ricinus</i>	Pes	Frymburk	1.0×10^0	<i>E. cuniculi</i> I
Samice	<i>Ixodes ricinus</i>	Pes	České Budějovice	1.9×10^1	<i>E. cuniculi</i> II
Samice	<i>Ixodes ricinus</i>	Kočka	Chotěbudice	7.1×10^0	-
Samice	<i>Ixodes ricinus</i>	Kočka	Doubravice	8.4×10^1	<i>E. cuniculi</i> II
Samice	<i>Ixodes ricinus</i>	Člověk	Doubravice	2.5×10^0	<i>E. cuniculi</i> I
Samice	<i>Ixodes ricinus</i>	Srnc	Bulhary	2.1×10^1	<i>E. cuniculi</i> II
Samec	<i>Ixodes ricinus</i>	Pes	České Budějovice	3.3×10^0	-

Počet vzorků, které byly získány od dobrovolníků, byl celkem 80, z toho se podařilo zachytit 11 vzorků s pozitivním nálezem mikrosporidií. Mikrosporidie byly zachyceny pouze v jednom rodu klíšťat, *Ixodes ricinus*, v 10 případech se jednalo o vzorky samic, v 1 případě o samce. Pozitivní klíšťata byla nalezena na 4 hostitelích, přičemž se nejčastěji jednalo o psa (7 pozitivních vzorků), 2 pozitivní vzorky pocházely z kočky, 1 vzorek z člověka a 1 vzorek ze srnce. Mezi časté lokality nalezení pozitivních klíšťat patřily České Budějovice, Doubravice a Chotěbudice. Ke stanovení množství spor byla využita RT-qPCR, která prokázala koncentraci od 1–84 spor na klíště, pomocí genotypizace byl zachycen *E. cuniculi* genotyp I u 3 pozitivních vzorků a *E. cuniculi* genotyp II u 5 pozitivních vzorků. Ve třech případech se i přes pozitivní výsledek qPCR nepodařilo DNA mikrosporidií naamplifikovat konvenční PCR.

4.2 Experimentální přenos mikrosporidií

Experiment 1

Po pitvě infikovaných SCID myší byla pomocí molekulárních metod zjištěna přítomnost mikrosporidií ve všech vyšetřených orgánech myší použitých k nasání dospělých klíšťat. Nejvyšší koncentrace spor byla zaznamenána v játrech ($2,4 \times 10^{10}$ spor na gram tkáně), slezině ($2,4 \times 10^{10}$ spor na gram tkáně) a ledvinách ($2,3 \times 10^{10}$ spor na gram tkáně). O řád nižší koncentrace byla zaznamenána v krvi a mozku ($1,5 \times 10^9$ a $1,1 \times 10^9$ spor na gram tkáně).

Z odpadnutých klíšťat, 7 až 9 dní od přísátí, byla pomocí molekulárních metod zjištěna přítomnost mikrosporidiální DNA u 4 z 10 nasátých samic. Izolát *E. cuniculi* genotyp II použitý k infekci myší se sekvenčně 100% shodoval se získanými sekvencemi z nasátých klíšťat.

Experiment 2

Pozitivní samice klíšťat, které sály na infikovaných SCID myších, byly ponechány vyklást vajíčka. Vykladení všech vajíček trvalo 30 dní a poté se vajíčka testovala na přítomnost mikrosporidií pomocí molekulárních metod. Všechny snášky vajíček z *E. cuniculi*-pozitivních samic byly negativní na přítomnost mikrosporidiální DNA, transovariální přenos mikrosporidií tudíž nebyl potvrzen. Následné vylíhnutí larviček z vajíček infikovaných samic bylo úspěšné a srovnatelné se snáškou samic nasátých na neinfikovaných myších.

Experiment 3

U naivních larev nasátých na infikovaných myších byla posléze prokázána přítomnost specifické DNA mikrosporidií. Nicméně i přes úspěšné nasátí všech skupin larev nedošlo k dokončení metamorfózy do nymf, a všechny skupiny larev uhynuly do 14 dní po dokončení sání, kdežto kontrolní larvy metamorfózu dokončily.

Nymfy sající na infikovaných myších byly po odpadnutí také pozitivní na přítomnost mikrosporidiální DNA, jejich životaschopnost byla srovnatelná s nymfami nasátými na neinfikovaných myších, nicméně úspěšnost metamorfózy v dospělce nemohla být z časové náročnosti životního cyklu klíšťat vyhodnocena.

5 DISKUZE

Mikrosporidie jsou obligátní intracelulární paraziti, kteří parazitují u široké škály hostitelů, zahrnujících bezobratlé i obratlovce včetně člověka (Fadhilah et al., 2022). U člověka se onemocnění mikrosporidiemi projeví spíše u imunodeficitních pacientů, u kterých může být průběh fatální (Han et al., 2021).

Mikrosporidie byly nalezeny skoro po celém světě, a to díky jejich výjimečné schopnosti odolat nepříznivým podmínkám vnějšího prostředí v kombinaci se širokým spektrem způsobů přenosu. Jedním z nejvýznamnějších způsobů přenosu je pomocí vody, do které se mohou mikrosporidie dostat kontaminací z infikovaných hospodářských a volně žijících zvířat. S tímto je spjatý i přenos potravou, do které se mikrosporidie dostaly pravděpodobně s vodou, ve které byly obsaženy a jež pravděpodobně sloužila k opláchnutí zeleniny a ovoce (Fayer & Santin-Duran, 2014; Jedrzejewski et al., 2007). Další možností přenosu infekce je konzumace nedostatečně tepelně upravených živočišných produktů, jako je mléko ošetřené UHT pasterizací, čerstvé sýry, nebo fermentované masné výrobky (Kváč et al., 2015; Sak et al., 2019; Vecková et al., 2021).

Tato práce proto byla zaměřena na další možný způsob přenosu, a to přenos pomocí krevsajícího vektoru, přesněji klíštětem, na základě výsledků polských autorů, kdy byla zjištěna přítomnost mikrosporidií v klíšťatech (Trzebny et al., 2022).

Klíště je významný parazit obratlovců, který díky svému způsobu parazitování může být též významným přenašečem, a to proto, že jeho životní cyklus mu umožňuje během života parazitovat až na třech různých hostitelích (Heyman et al., 2010) a je tudíž potenciálně schopno přenést patogeny z malých obratlovců na ty větší, aniž by se tito přímo setkali.

Klíště je díky dlouhotrvajícímu sání a produkci slin bránících odhojení klíštěte schopno přenést celou řadu patogenů. Navíc během sání klíště vylučuje přebytečnou vodu, získanou z krve hostitele, a tím může také být vylučována celá řada patogenů. Výčet patogenů je rozsáhlý, přičemž nejznámějšími patogeny jsou bakterie *Borrelia burgdorferi* způsobující Lymskou boreliózu nebo vir klíšťové encefalitidy (Rodino et al., 2020).

Naše výsledky prevalenční studie získané na základě souboru 217 vzorků jsou srovnatelné s prevalencemi uvedenými v práci Trzebny et al. (2022), i když detekovaný druh mikrosporidie byl odlišný a prevalence pozitivních klíšťat mírně vyšší než v Polsku. Nám se podařilo identifikovat druh *E. cuniculi* u 11 vzorků z klíšťat *I. ricinus* získaných vlnkováním

(8 %), z toho byly 3 vzorky samic, 4 vzorky samců a 4 vzorky nymf, a *E. cuniculi* u 11 vzorků klíšťat *I. ricinus* nalezených na hostitelích (13,8 %), z toho bylo 10 vzorků samic a 1 vzorek samce. V Polsku byl detekován druh *Encephalitozoon intestinalis* u třech nasátých samic klíštěte rodu *Ixodes ricinus* (prevalence 3,2 %) a rod *Endoreticulatus* u osmi nepřísátých klíšťat rodu *I. ricinus* (prevalence 0,8 %), z toho 3 samci, 2 samice a 3 nymfy (Trzebny et al., 2022).

Přenos mikrosporidií pomocí krevsajícího vektoru kromě klíšťat byl zjištěn i u komára rodu *Anopheles* v Africe s prevalencí 1,8 % (Akorli et al., 2021). Jednalo se tehdy o *Microsporidia MB*, druh příbuzný mikrosporidii *Crispospora chironomi* izolované z pakomárovitých. Z epidemiologického hlediska je zajímavé, že přítomnost *Microsporidia MB* v komárech *Anopheles arabiensis* snižuje úspěšnost přenosu parazita *Plasmodium falciparum*, způsobujícího malarii (Herren et al., 2020).

Během testování klíšťat na přítomnost mikrosporidií vyvstala otázka, zda se mikrosporidie mohou přenést z jednoho stadia klíštěte do druhého a zda infikované samičky vykladou infikovaná vajíčka. Transovariální přenos byl dosud potvrzen u viru klíšťové encefalitidy (Karbowski & Biernat, 2016), bakterií *Rickettsia* spp. a *Anaplasma* spp. (Moore et al., 2018) a *Babesia* spp. (Mierzejewska et al., 2018). V našem případě se transovariální přenos testováním vykladených vajíček samic klíšťat, u nichž byla potvrzena přítomnost mikrosporidií, nepodařilo prokázat, u všech testovaných vajíček nebyla zachycena přítomnost mikrosporidií. Nicméně vajíčka byla životaschopná a dala vzniknout nové generaci larev.

Zjištění, že i samci, kteří již v dospělém stádiu nesají krev, v sobě přenášejí mikrosporidie (naše výsledky, Trzebny et al., 2022) naznačují možnost transstadiálního přenosu, kdy mikrosporidie překonají metamorfózu klíšťat. Touto cestou by klíště v nedospělém stádiu (larva, nymfa) přisáté na infikovaném hostiteli (myš, zajíc) mohlo přenést, po úspěšné metamorfóze v další stadium, mikrosporidie z těchto drobných savců na větší hostitele. Nicméně předpokládaný transstadiální přenos mikrosporidií, jako je tomu například u viru klíšťové encefalitidy (Karbowski et al., 2016) nebo u jednoho druhu z rodu *Borrelia* (Kalmár et al., 2015), se nám dosud experimentálně nepodařilo ověřit, jelikož nasáté larvy na infikované myši SCID do 14 dnů po nasátí vyschly. Jelikož kontrolní skupina larev nasátá na neinfikovaných myších úspěšně metamorfovala v nymfy, lze předpokládat, že úhyn larev byl způsoben právě přítomností mikrosporidií v krvi hostitele. Tuto hypotézu bude nicméně potřeba ještě potvrdit sérií experimentů založených na sání larev na myších s různou intenzitou

infekce *E. cuniculi*. Metamorfóza nymf v dospělce bohužel trvá 2 měsíce a výsledky úspěšnosti přenosu a životnost nymf nemohla být do odevzdání práce vyhodnocena.

Výsledky této práce by měly sloužit pro upozornění na to, že mohou existovat i další způsoby přenosu mikrosporidií, které by mohly uniknout pozornosti a pro zvýšení povědomí o tom, že klíšťata mohou přenášet daleko více patogenů, než je doposud známo.

6 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala dvěma parazity, mikrosporidiemi jakožto patogenem onemocnění a klíštětem jako vektorem parazita. Na teoretické bázi byl popsán možný přenos mikrosporidií a jak by k němu docházelo. V praktické části jsme prokázali úspěšnost přenosu mikrosporidií z infikovaného hostitele do různých stádií klíšťat, a to u 10,1 % vzorků získaných z porostu nebo hostitelů a následně i experimentálně. Nepodařilo se nám prokázat transovariální a dosud ani transstadiální přenos z důvodu úhynu nasátých larev a časové náročnost metamorfózy do dospělce.

7 REFERENCE

- Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., McCourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W., Taylor, M. F. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(5), 399–451.
- Akorli, J., Akorli, E. A., Tetteh, S. N. A., Amlalo, G. K., Opoku, M., Pwalia, R., Adimazoya, M., Atibilla, D., Pi-Bansa, S., Chabi, J., & Dadzie, S. K. (2021). *Microsporidia* MB is found predominantly associated with *Anopheles gambiae* s.s and *Anopheles coluzzii* in Ghana. *Scientific Reports*, 11(1), 18658.
- Anderson, J. F., & Magnarelli, L. A. (2008). Biology of ticks. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(2), 195–215.
- Balbani, G. (1882). Sur les microsporidies ou psorospermies des articules. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. 95: 1168–1171.
- Baneux, P. J., & Pognan, F. (2003). In utero transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type I in rabbits. *Laboratory Animals*, 37(2), 132–138.
- Barker, S. C., & Murrell, A. (2004). Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*, 129 Suppl, S15–S36.
- Beard, D., Stannard, H. J., & Old, J. M. (2021). Morphological identification of ticks and molecular detection of tick-borne pathogens from bare-nosed wombats (*Vombatus ursinus*). *Parasites & Vectors*, 14(1), 60.
- Cama, V. A., Pearson, J., Cabrera, L., Pacheco, L., Gilman, R., Meyer, S., Ortega, Y., & Xiao, L. (2007). Transmission of *Enterocytozoon bieneusi* between a child and guinea pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(8), 2708–2710.
- Cavalier-Smith, T. (1983). A 6-kingdom classification and a unified phylogeny. In: Endocytobiology II: Intracellular Space as Oligogenetic Ecosystem. Schenk H. E. A., Schwemmler W. (Eds.) Walter de Gruyter. (Berlin). 1027–1034.

- Cupp, E. W. (1991).** Biology of ticks. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 21(1), 1–26.
- Decraene, V., Lebbad, M., Botero-Kleiven, S., Gustavsson, A. M., & Löfdahl, M. (2012).** First reported foodborne outbreak associated with microsporidia, Sweden, October 2009. *Epidemiology and Infection*, 140(3), 519–527.
- Desportes-Livage, I. (2000).** Biology of microsporidia. *Contributions to Microbiology*, 6, 140–165.
- Didier, E. S. (2005).** Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Tropica*, 94(1), 61–76.
- Didier, E. S., Snowden, K. F., & Shadduck, J. A. (1998).** Biology of microsporidian species infecting mammals. *Advances in Parasitology*, 40, 283–320.
- Didier, E. S., Stovall, M. E., Green, L. C., Brindley, P. J., Sestak, K., & Didier, P. J. (2004).** Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Veterinary Parasitology*, 126(1-2), 145–166.
- Didier, E. S., Vossbrinck, C. R., Baker, M. D., Rogers, L. B., Bertucci, D. C., & Shadduck, J. A. (1995).** Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology*, 111 (Pt 4), 411–421.
- Didier, E. S., & Weiss, L. M. (2006).** Microsporidiosis: current status. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19(5), 485–492.
- Ditrich, O., Chrdle, A., Sak, B., Chmelík, V., Kubále, J., Dyková, I., & Kváč, M. (2011).** *Encephalitozoon cuniculi* genotype I as a causative agent of brain abscess in an immunocompetent patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(7), 2769–2771.
- Estrada-Peña, A. (2015).** Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 34(1), 53–65.
- Estrada-Peña, A., Mihalca, A.D., Petney, T.N. (2017).** Ticks of Europe and North. Africa - A Guide to Species Identification; *Springer International Publishing: Cham, Switzerland*; pp. XXI, 404.
- Fadhilah, A., Gabbar, A., & Bokhari, A. A. (2022).** Microsporidium. *In StatPearls*. StatPearls Publishing.

Fayer, R., & Santin-Duran, M. (2014). Epidemiology of Microsporidia in Human Infections. In *Microsporidia: Pathogens of Opportunity* (eds L.M. Weiss and J.J. Becnel), 135–164.

Franzen, C., Schwartz, D. A., Visvesvara, G. S., Müller, A., Schwenk, A., Salzberger, B., Fätkenheuer, G., Hartmann, P., Mahrle, G., & Diehl, V. (1995). Immunologically confirmed disseminated, asymptomatic *Encephalitozoon cuniculi* infection of the gastrointestinal tract in a patient with AIDS. *Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 21(6), 1480–1484.

Földvári, G., Široký, P., Szekeres, S., Majoros, G., & Sprong, H. (2016). *Dermacentor reticulatus*: a vector on the rise. *Parasites & Vectors*, 9(1), 314.

Gray, J. S., Kahl, O., Janetzki, C., & Stein, J. (1992). Studies on the ecology of Lyme disease in a deer forest in County Galway, Ireland. *Journal of Medical Entomology*, 29(6), 915–920.

Halánová, M., Cisláková, L., Valencáková, A., Bálent, P., Adam, J., & Trávnicek, M. (2003). Serological screening of occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in humans and animals in Eastern Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 10(1), 117–120.

Han, B., Pan, G., & Weiss, L. M. (2021). Microsporidiosis in Humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(4), e0001020.

Han, B., Takvorian, P. M., & Weiss, L. M. (2022). The Function and Structure of the Microsporidia Polar Tube. *Experientia Supplementum* (2012), 114, 179–213.

Han, B., & Weiss, L. M. (2017). Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens Within the Fungal Kingdom. *Microbiology Spectrum*, 5(2), 10.1128.

Herren, J. K., Mbaisi, L., Mararo, E., Makhulu, E. E., Mobegi, V. A., Butungi, H., Mancini, M. V., Oundo, J. W., Teal, E. T., Pinaud, S., Lawniczak, M. K. N., Jabara, J., Nattoh, G., & Sinkins, S. P. (2020). A microsporidian impairs *Plasmodium falciparum* transmission in *Anopheles arabiensis* mosquitoes. *Nature Communications*, 11(1), 2187.

Heyman, P., Cochez, C., Hofhuis, A., van der Giessen, J., 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 Review of Anti-Infective Therapy*, 8(1), 33–50.

Jedrzejewski, S., Graczyk, T. K., Słodkiewicz-Kowalska, A., Tamang, L., & Majewska, A. C. (2007). Quantitative assessment of contamination of fresh food produce of various retail types by human-virulent microsporidian spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12), 4071–4073.

Kalmár, Z., Cozma, V., Sprong, H., Jahfari, S., D'Amico, G., Mărcuțan, D. I., Ionică, A. M., Magdaș, C., Modrý, D., & Mihalca, A. D. (2015). Transstadial transmission of *Borrelia turcica* in *Hyalomma aegyptium* ticks. *PloS One*, 10(2), e0115520.

Karbowiak, G., & Biernat, B. (2016). The role of particular tick developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens affecting humans in Central Europe. 2. Tick-borne encephalitis virus. *Annals of Parasitology*, 62(1), 3–9.

Karbowiak, G., Biernat, B., Werszko, J., & Rychlik, L. (2016). The transstadial persistence of tick-borne encephalitis virus in *Dermacentor reticulatus* ticks in natural conditions. *Acta Parasitologica*, 61(1), 201–203.

Katzwinkel-Wladarsch, S., Lieb, M., Helse, W., Löscher, T., & Rinder, H. (1996). Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Tropical Medicine & International Health: TM & IH*, 1(3), 373–378.

Keeling, P. J., & Fast, N. M. (2002). Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Review of microbiology*, 56, 93–116.

Kimura, M., Aoki, M., Ichikawa-Seki, M., Matsuo, K., Yagita, K., & Itagaki, T. (2013). Detection and genotype of *Encephalitozoon cuniculi* DNA from urine and feces of pet rabbits in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 75(8), 1017–1020.

Kotková, M., Sak, B., Hlášková, L., Květoňová, D., & Kváč, M. (2018). Evidence of transplacental transmission of *Encephalitozoon cuniculi* genotype II in murine model. *Experimental Parasitology*, 193, 51–57.

- Koudela, B., Lom, J., Vítovec, J., Kucerová, Z., Ditrich, O., & Trávníček, J. (1994).** In vivo efficacy of albendazole against *Encephalitozoon cuniculi* in SCID mice. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 41(5), 49S–50S.
- Kváč, M., Tomanová, V., Samková, E., Koubová, J., Kotková, M., Hlásková, L., McEvoy, J., & Sak, B. (2016).** *Encephalitozoon cuniculi* in Raw Cow's Milk Remains Infectious After Pasteurization. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(2), 77–79.
- Lee, J. H. (2008).** Molecular detection of *Enterocytozoon bieneusi* and identification of a potentially human-pathogenic genotype in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(5), 1664–1666.
- Levaditi, C., Nicolau, S., Schoen, R., (1923).** L'agent étiologique de l'encéphalite épizootique du lapin (*Encephalitozoon cuniculi*). *Comptes Rendus de la Societe de Biologie Paris*, 89: 984-986.
- Madison-Antenucci, S., Kramer, L. D., Gebhardt, L. L., & Kauffman, E. (2020).** Emerging Tick-Borne Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2), e00083-18.
- McInnes, E. F., & Stewart, C. G. (1991).** The pathology of subclinical infection of *Encephalitozoon cuniculi* in canine dams producing pups with overt encephalitozoonosis. *Journal of the South African Veterinary Association*, 62(2), 51–54.
- Mertens, R. B., Didier, E. S., Fishbein, M. C., Bertucci, D. C., Rogers, L. B., & Orenstein, J. M. (1997).** *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis: infection of the brain, heart, kidneys, trachea, adrenal glands, and urinary bladder in a patient with AIDS. *Modern Pathology*, 10(1), 68–77.
- Mierzejewska, E. J., Dwużnik, D., & Bajer, A. (2018).** Molecular study of transovarial transmission of *Babesia canis* in the *Dermacentor reticulatus* tick. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*, 25(4), 669–671.
- Moore, T. C., Pulscher, L. A., Caddell, L., von Fricken, M. E., Anderson, B. D., Gonchigoo, B., & Gray, G. C. (2018).** Evidence for transovarial transmission of tick-borne rickettsiae circulating in Northern Mongolia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(8), e0006696

Müller, A., Bialek, R., Kämper, A., Fätkenheuer, G., Salzberger, B., & Franzen, C. (2001). Detection of microsporidia in travelers with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(4), 1630–1632.

Nägeli, K. W. (1857). Ueber die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. *Bot Zeitung*. 15: 760–761

Nell, B., Fuchs-Baumgartinger, A., Fritsche, J., Borer-Germann, S., Thyssen, C., Hoffmann, I., & Hinney, B. (2014). Distribution of *Encephalitozoon cuniculi* infections in the cat resulting in ophthalmological symptoms in Europe. *Vet Ophthalmol*, 17: E24.

Norte, A. C., de Carvalho, I. L., Ramos, J. A., Gonçalves, M., Gern, L., & Nuncio, M. S. (2012). Diversity and seasonal patterns of ticks parasitizing wild birds in western Portugal. *Experimental & Applied Acarology*, 58(3), 327–339.

Orenstein, J. M., Chiang, J., Steinberg, W., Smith, P. D., Rotterdam, H., & Kotler, D. P. (1990). Intestinal microsporidiosis as a cause of diarrhea in human immunodeficiency virus-infected patients: a report of 20 cases. *Human pathology*, 21(5), 475–481.

Park, E., & Poulin, R. (2021). Revisiting the phylogeny of microsporidia. *International Journal for Parasitology*, 51(10), 855–864.

Perec-Matysiak, A., Leśniańska, K., Buńkowska-Gawlik, K., Čondlová, Š., Sak, B., Kváč, M., Rajský, D., & Hildebrand, J. (2019). The opportunistic pathogen *Encephalitozoon cuniculi* in wild living Murinae and Arvicolinae in Central Europe. *European Journal of Protistology*, 69, 14–19.

Reetz, J., Nöckler, K., Reckinger, S., Vargas, M. M., Weiske, W., & Broglia, A. (2009). Identification of *Encephalitozoon cuniculi* genotype III and two novel genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in swine. *Parasitology International*, 58(3), 285–292.

Ribeiro, J. M. (1995). How ticks make a living. *Parasitology Today*, 11(3), 91–93.

Richter, D., Matuschka, F. R., Spielman, A., & Mahadevan, L. (2013). How ticks get under your skin: insertion mechanics of the feeding apparatus of *Ixodes ricinus* ticks. *Proceedings. Biological Sciences*, 280(1773), 20131758.

Rodino, K. G., Theel, E. S., & Pritt, B. S. (2020). Tick-Borne Diseases in the United States. *Clinical Chemistry*, 66(4), 537–548.

Sak, B., Brady, D., Pelikánová, M., Květoňová, D., Rost, M., Kostka, M., Tolarová, V., Hůzová, Z., & Kváč, M. (2011). Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(3), 1064–1070.

Sak, B., Jandová, A., Doležal, K., Kváč, M., Květoňová, D., Hlásková, L., Rost, M., Olšanský, M., Nurcahyo, W., & Foitová, I. (2017). Effects of selected Indonesian plant extracts on *E. cuniculi* infection *in vivo*. *Experimental Parasitology*, 181, 94–101.

Sak, B., Vecková, T., Brdíčková, K., Smetana, P., Hlásková, L., Kicia, M., Holubová, N., McEvoy, J., & Kváč, M. (2019). Experimental *Encephalitozoon cuniculi* Infection Acquired from Fermented Meat Products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(6), 394–398.

Snowden, K. F., Didier, E. S., Orenstein, J. M., & Shadduck, J. A. (1998). Animal models of human microsporidial infections. *Laboratory Animal Science*, 48(6), 589–592.

Snowden, K. F., Lewis, B. C., Hoffman, J., & Mansell, J. (2009). *Encephalitozoon cuniculi* infections in dogs: a case series. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 45(5), 225–231.

Talabani, H., Sarfati, C., Pillebout, E., van Gool, T., Derouin, F., & Menotti, J. (2010). Disseminated infection with a new genovar of *Encephalitozoon cuniculi* in a renal transplant recipient. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(7), 2651–2653.

Trzebny, A., Liberska, J., Slodkiewicz-Kowalska, A., & Dabert, M. (2022). Metabarcoding reveals low prevalence of microsporidian infections in castor bean tick (*Ixodes ricinus*). *Parasites & Vectors*, 15(1), 26.

Undeen, A. H., & Vander Meer, R. K. (1999). Microsporidian intrasporal sugars and their role in germination. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73(3), 294–302.

van Gool, T., Vetter, J. C., Weinmayr, B., Van Dam, A., Derouin, F., & Dankert, J. (1997). High seroprevalence of *Encephalitozoon* species in immunocompetent subjects. *The Journal of Infectious Diseases*, 175(4), 1020–1024.

van Rensburg, I. B., Volkmann, D. H., Soley, J. T., & Stewart, C. G. (1991). *Encephalitozoon* infection in a still-born foal. *Journal of the South African Veterinary Association*, 62(3), 130–132.

Vecková, T., Sak, B., Samková, E., Holubová, N., Kicia, M., Zajączkowska, Ż., Hlásková, L., Květoňová, D., & Kváč, M. (2021). Raw Goat's Milk, Fresh and Soft Cheeses as a Potential Source of *Encephalitozoon cuniculi*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 18(9), 661–667.

Vechtova, P., Fussy, Z., Cegan, R., Sterba, J., Erhart, J., Benes, V., & Grubhoffer, L. (2020). Catalogue of stage-specific transcripts in *Ixodes ricinus* and their potential functions during the tick life-cycle. *Parasites & Vectors*, 13(1), 311.

Waly, W. R., Ismail, M. A. G. M., Abu-Sarea, E. Y., & Abd El Wahab, W. M. (2021). Intestinal parasitic infections and associated risk factors in diabetic patients: a case-control study. *Journal of Parasitic Diseases*, 45(4), 1106–1113.

Weber, R., Bryan, R. T., Schwartz, D. A., & Owen, R. L. (1994). Human microsporidial infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(4), 426–461.

Wolk, D. M., Schneider, S. K., Wengenack, N. L., Sloan, L. M., & Rosenblatt, J. E. (2002). Real-time PCR method for detection of *Encephalitozoon intestinalis* from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11), 3922–3928.