

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

## **Bakterie *Neohrlichia mikurensis* v těle klíštěte**

**Svobodová Klára**  
**Jihomoravská kraj**

**V Brně 2021**

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

**Bakterie *Neohrlichia mikurensis* v těle klíštěte**

***Neohrlichia mikurensis* in the tick bodies**

**Autoři:** Svobodová Klára

**Škola:** Gymnázium Brno, Křenová, příspěvková organizace, Křenová  
304/36, 602 00 Brno

**Kraj:** Jihomoravský kraj

**Konzultant:** Mgr. Jaroslav Ondruš

V Brně 2021

# Prohlášení

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

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

V Brně 2021

Klára Svobodová

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat Mgr. Jaroslavu Ondrušovi za odborný dozor při plnění praktické části a za konzultaci při psaní této práce. Tato práce byla vypracována za finanční podpory JMK.

## **Anotace**

Tato práce se zabývá nově objevenou intracelulární bakterií *Neoehrlichia mikurensis* z rodiny Anaplasmataceae. Bakterie byla objevena již v roce 1999, ovšem až od roku 2010 je známo, že může vyvolat onemocnění neoehrlichiózu, typické horečkou a tromboembolickými příhodami ohrožující především imunokompromitované jedince. V posledních dvou letech byla její přítomnost prokázána na téměř celém území České republiky a především v Evropě je předmětem intenzivního výzkumu. V teoretické části této práce jsou stručně přiblížena klíšťata s důrazem na klíště obecné (*Ixodes ricinus*) a studovaná bakterie. V rámci praktické části byla nasbíraná klíšťata na dvou brněnských lokalitách. Byla z nich vyizolována DNA a na těchto vzorcích byla provedena polymerázová řetězová reakce (PCR) analýza s následnou elektroforézou. Po prokázání přítomnosti bakterie na těchto lokalitách byla prozkoumána stejnou metodou distribuce bakterie v jednotlivých orgánech nasátých samic *I. ricinus* pocházejících z těchto lokalit, což také bylo cílem předložené práce. *N. mikurensis* byla poprvé detekována ve slinných žlázách a ováriích infikovaných klíšťat. Tato práce byla vypracována za finanční podpory JMK.

## **Klíčová slova**

*Neoehrlichia mikurensis*; *Ixodes ricinus*; klíště obecné; slinné žlázy; ovária

## **Annotation**

This thesis deals with a novel intracellular tick-borne pathogen *Neoehrlichia mikurensis* (Anaplasmataceae). Despite this bacterium was discovered in 1999, it is only known to be the causative agent of neoehrlichiosis from 2010. Fever and vascular events are typical for this disease threatening mainly immunocompromised individuals. During the last two years, it has been shown that *N. mikurensis* is widespread in ticks in the Czech Republic and is of a major research interest especially in Europe. In this thesis, ticks and the bacterium are briefly introduced. In the practical part of the thesis, ticks were collected in two distinct areas in Brno. Next, PCR and electrophoresis were employed in order to identify whether there are infected ticks in these localities. After the confirmation of the *N. mikurensis* presence, organs harvested previously from engorged females originating from these areas were screened for the bacterium. By doing so, the aim of this thesis was fulfilled. For the first time, *N. mikurensis* was detected in ovaries and salivary glands of engorged infected females. This work was financially supported by JMK.

## **Keywords**

*Neoehrlichia mikurensis*; *Ixodes ricinus*; ticks; salivary glands; ovaries

## Obsah

1 Úvod .....	7
2 Literární přehled .....	8
2.1 Klíšťata .....	8
2.1.1 Systematické zařazení.....	8
2.1.2 Charakteristika a výskyt .....	8
2.2 Choroby a parazitismus .....	9
2.2.1 <i>Neoehrlichia mikurensis</i> .....	9
3 Cíle práce .....	10
4 Materiál a metody .....	11
4.1 Sběr klíšťat .....	11
4.2 Izolace DNA .....	12
4.3 Analýza pomocí PCR .....	12
5 Výsledky.....	13
6 Diskuze .....	19
7 Závěr.....	20
8 Bibliografické údaje .....	21

# 1 ÚVOD

V dnešní době lidstvo trápí mnoho zdravotních problémů, které mají různé příčiny. Část onemocnění vyvolávají bakterie a viry přenášené klíšťaty. Tyto nemoci se stávají stále rozšířenějšími, a některé z nich jsou velmi nebezpečné. Také proto jsem si pro svoji práci vybrala téma „Bakterie *Neoehrlichia mikurensis* v těle klíštěte.“ Mým cílem je stát se veterinářkou, a protože nejen lidé chovající zvířata často chodí do přírody, bylo by dobré vědět o původcích těchto nemocí více. Z tohoto důvodu mne toto téma zaujalo a rozhodla jsem se podílet se na výzkumu.

Klíšťata jsou roztoči sající krev, žijí paraziticky na svých hostitelích a mohou přenášet bakterie a viry způsobující onemocnění jako je například lymeská borelióza, klíšťová encefalitida nebo nově objevená neoehrlichióza. Jejím původcem je bakterie *Neoehrlichia mikurensis* napadající živočišné buňky a vyskytující se na většině území Evropy. Útočí především na jedince s oslabenou imunitou, ve kterých je schopna tuto nemoc vyvolat. Onemocnění má méně i více závažné projevy, v nejhorších případech může dojít až k cévním a tromboembolickým příhodám.

Cílem práce bylo zjistit, kde se *N. mikurensis* nachází v tělech infikovaných klíšťat. Prověřovanými orgány byla střeva, Malpigické trubice, ovária a slinné žlázy.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Klíšťata

#### 2.1.1 Systematické zařazení

Klíšťata jsou parazité sající krev patřící do podřádu klíšťatovci (Ixodida). Klíšťata patří do kmene členovci (Arthropoda), podkmene klepítkatci (Chelicerata), třídy pavoukovci (Arachnida), do řádu roztoči (Acari) a čeledi klíšťatovití (Ixodidae). Pod podřádem klíšťatovci (Ixodida) rozlišujeme tři čeledi. Čeď klíšťatovití (Ixodidae), čeď klíšťákovití (Argasidae) a čeď Nuttalliellidae, která má dosud objeveného pouze jednoho zástupce (*Nuttalliella namaqua*). Klíšťatovití (Ixodidae) je nejpočetnější čeď, která zahrnuje třináct rodů s celkově 720 druhy. Jedním z nich je všem známé klíšťe obecné (*Ixodes ricinus*). Druhou skupinou je čeď klíšťákovití (Argasidae) zahrnující pět rodů s celkem 186 druhy.

#### 2.1.2 Charakteristika a výskyt

Klíšťata žijí parazitickým způsobem života na svých hostitelích. Jejich krev je potřebná k přeměně životních stádií a je pro ně jedinou potravou. Tvrdá klíšťata mají nepřímý vývoj a jejich životní cyklus zahrnuje čtyři stádia: vajíčka, larvu, nymfu a dospělce. Krev je potravou jak pro dospělá klíšťata *I. ricinus*, tak pro nymfy a larvy, všechna tato stádia se přisávají na tělo, ale z dospělců tohoto druhu pouze samice.

Tělo klíšťat se skládá ze dvou částí: kapitulum (hlavová část) a tělová část. Na tělové části jsou čtyři páry nohou (u larvy nalezneme pouze tři páry), *I. ricinus* má na vnější straně těla tvrdý štítek (skutum), podle kterého rozeznáme samici od samce. Samec má tvrdým štítkem pokryté celé tělo, samice pouze přední polovinu. Měkká klíšťata (*Argasidae*) tento štítek nemají. Hlavová část je složena z chelicer, které slouží k přichycení na hostitele a proniknutí do kůže, z hypostomu a z palp.

Tělem klíšťat volně cirkuluje hemolymfa, která slouží k transportu živin a odstraňování odpadních látek. Uvnitř těla mají klíšťata uloženy orgány. Největším orgánem je střevo. Skládá se z centrálního žaludku, malého střeva a zadního střeva. Jeho funkcí je trávení a uchovávání krve.

Dalším důležitým orgánem jsou slinné žlázy připomínající hroznové víno, které pronikají od sacího ústrojí dál do těla. Obsahují aciny, které vylučují různorodou směs trávicích enzymů a proteinů. Sliny jsou vylučovány slinnými kanálky, které jsou připojeny k sacímu ústrojí. Spolu se slinami mohou být do hostitele vyloučeny i klíšťaty přenosné patogeny.

Dalšími orgány jsou hltan, jícn, střední střevo, rektální vak, reprodukční orgány, nervový systém, průdušnice a Malpighické trubice (Sonenshine a Roe, 2014).

Klíšťata se vyskytují téměř na celém světě, i na území České republiky.



Nejznámější klíšťata žijící v České republice z čeledi klíšťatovitých jsou *I. ricinus* (klíště obecné), které je zde i nejrozšířenějším druhem a *Dermacentor reticulatus* (píják lužní).

## 2.2 Choroby a parazitismus

Klíšťata jsou přenašeči velkého množství infekčních chorob. Po celém světě se nachází více než 850 druhů klíšťat. Mezi známé nemoci můžeme zahrnout klíšťovou encefalitidu či lymfskou boreliózu. Mezi onemocnění přenášené klíšťaty řadíme i neehrlichiózu, jejímž původcem je bakterie *Neoehrlichia mikurensis*.

### 2.2.1 *Neoehrlichia mikurensis*

Bakterie *N. mikurensis* je nově objevená bakterie přenášená klíšťaty (Portillo et al., 2018).

Byla objevená v roce 1999 u klíšťat ze srnců v Nizozemsku (Schouls et al., 1999), v roce 2004 byla pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) detekována v potkanech žijících na japonském ostrově Mikura (Kawahara et al., 2004). Transmisní elektronovou mikroskopií byla v této práci také popsána její domnělá ultrastruktura.

*N. mikurensis* je intracelulární mikroorganismus kulatého až ovoidního tvaru o průměru 0,5 až 1,2  $\mu\text{m}$  s vnitřní periplasmatickou membránou a vnější zvlněnou membránou odděleným nepravidelným elektronlucentním prostorem (Kawahara et al., 2004), patřící do čeledi *Anaplasmataceae*.

Na území Evropy byla zjištěna u klíštěte obecného v 18 zemích z 20 prověřovaných (Portillo et al., 2018) včetně České republiky, a ve Východní Asii (Kawahara et al., 2004). Rezervoárem bakterie *N. mikurensis* se zdají být malí hlodavci (Portillo et al., 2018).

Tato bakterie způsobuje onemocnění neehrlichiózu. Poprvé byla neehrlichióza diagnostikována u 77letého muže ze Švédska v roce 2010 (Welinder-Olsson et al., 2010). V Evropě, včetně České republiky, pak byly objeveny další případy neehrlichiózy (Pekova et al., 2011). Onemocnění je nebezpečné převážně pro osoby se sníženou obranyschopností (Grankvist et al., 2014). Neehrlichióza má asymptomatický průběh (Welc-Falęciak et al., 2014b), ale může dojít až ke smrti (Welinder-Olsson et al., 2010). Začínajícím příznakem tohoto onemocnění je zimnice s vysokou horečkou, později může dojít k bolesti svalů, kloubů, bolesti hlavy a nevolnosti. Tato bakterie napadá endotelové buňky a může vyvolávat tromboembolické příhody (Wass et al., 2019). U infikovaných hlodavců se neprojeví žádné příznaky onemocnění (Kawahara et al., 2004).

Dosud není známo mnoho informací o životním cyklu bakterie *N. mikurensis*. Její pravděpodobná morfologie byla popsána u savců (Kawahara et al. 2004; Pekova et al. 2011) i klíšťat (Ondruš et al., 2020b). Cílem této práce je rozšířit vědomosti o distribuci bakterie *N. mikurensis* v orgánech.

### 3 CÍLE PRÁCE

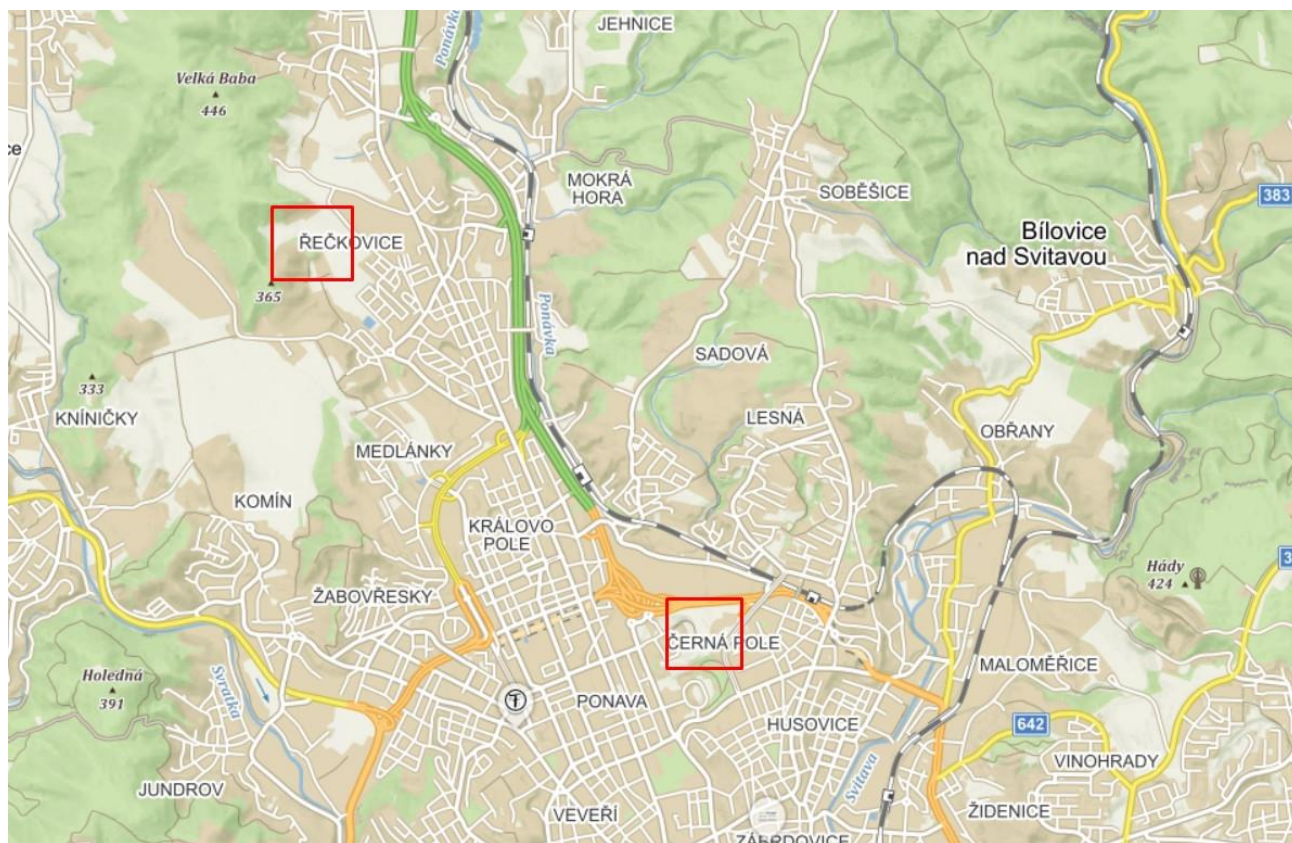
Cílem této práce bylo detekovat přítomnost bakterie *N. mikurensis* v orgánech nasátých klíšťat *I. ricinus*.

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Sběr klíšťat

Sběr klíšťat byl proveden metodou vlajkování. K vlajkování byla použita vlajka, která byla vyrobena z bílé látky o velikosti jednoho metru čtverečního připevněné k dřevěné tyči. Vlajkou jsme pohybovali po trávě či lesní cestě, klíšťata se na ni zachytávali a pravidelně jsme vlajku kontrolovali. Z vlajky jsme klíšťata následně sbírali do plastových zkumavek pomocí entomologické pinzety. Zkumavka by měla být popsána informacemi, které potřebujeme znát pro další práci s klíšťaty. V mém případě byla zkumavka popsána sběratelem, datem a pohlavím.

Touto metodou byla klíšťata sbírána ve dvou brněnských lokalitách (Obr. 1). V dubnu v lese v Medláncích a v září v Černých polích.



**Obr. 1:** Lokality sběru klíšťat.

## 4.2 Izolace DNA

Nasbíraná klíšťata byla tříděna podle pohlaví do skupin po pěti vzorcích. Každá skupina obsahovala pět vzorků stejného pohlaví, používána byla pouze dospělá klíšťata. DNA byla izolována pomocí soupravy, také nazývané jako kit, NucleoSpin® Tissue (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Německo). Pracovalo se podle pokynů výrobce s několika úpravami. V prvním kroku byla poolovaná klíšťata homogenizována pomocí 1 g 1,4 mm kuliček (BIOplastics, Landgraaf, Nizozemsko) v centrifuze (MagNA Lyser) (Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, Švýcarsko) při rychlosti 7 000 x g po dobu 99 sekund. V dalším kroku bylo k homogenizovaným vzorkům přidáno 180 µl pufru T1 a 25 µl roztoku proteinázy K a promícháno ve vortexu. Takto připravené vzorky byly inkubovány při 56 °C po dobu 1 hodiny v inkubátoru s mícháním. Po 1 hodině bylo ke vzorkům přidáno 200 µl pufru B3. Vzorky byly důkladně promíchány, inkubovány 10 minut při 70 °C a poté znovu promíchány. Ke vzorkům bylo přidáno 210 µl ethanolu opět byly zvortexovány. Vzorky byly centrifugovány po dobu 60 sekund při 11 000 x g. V dalším kroku bylo přidáno 500 µl pufru BW, vzorky byly znovu centrifugovány 1 minutu při 11 000 x g, poté bylo přidáno 600 µl pufru B5 a vzorky byly centrifugovány 1 minutu při 11 000 x g. Po tomto kroku byly vzorky znovu centrifugovány po stejnou dobu při stejné rychlosti. V posledním kroku bylo do zkumavky přidáno 100 µl předeřátého pufru BE na teplotu 70 °C, poté byly vzorky inkubovány po dobu 60 sekund při pokojové teplotě a centrifugovány 1 minutu při 11 000 x g. Vyizolované vzorky DNA byly až do detekce PCR skladovány při -20 °C.

## 4.3 Analýza pomocí PCR

Po vyizolování DNA byla metodou PCR detekována DNA bakterie *N. mikurensis*. Primery byly navrženy pomocí softwaru Geneious 11.1.4 (<https://www.geneious.com>) s použitím příslušných sekvencí dostupných v GenBank. Sekvence primerů jsou popsány v tabulce I. Tyto primery amplifikovaly 654 bází dlouhý fragment genu. Teplota nasedání primeru byla stanovena gradientovou PCR. Optimalizace běhů PCR obsahovala pozitivní a negativní kontroly. Specifičnost reakce byla potvrzena sekvenováním. PCR reakce byla provedena v 25 µl obsahující: 12,5 µl PPP Master Mix (Top-Bio s.r.o., Vestec, Czech Republic), 1 µl přímého a 1 µl reverzního primeru (finální koncentrace v roztoku byla 500 nM pro každý z primerů), 9,5 µl PCR vody a 1 µl DNA. Master Mix byl připraven do jedné větší zkumavky obsahující 500 µl PPP Master Mixu, 40 µl přímého primeru, 40 µl reverzního primeru a 380 µl PCR vody. Takto připravený Master Mix byl rozpipetován do 200 µl zkumavek po 24 µl a do každé zkumavky byl přidán 1 µl roztoku obsahujícího DNA. V PCR cycleru byl navolen program tak, aby se vlákno DNA namnožilo 35krát. V prvních 60 sekundách byl cycler nahřán na 94 °C, aby se DNA rozvolnila. Poté se 35krát opakoval cyklus, ve kterém se vždy úsek odpovídající primerům 2x rozmnožil. Nastavení cycleru je popsáno v tabulce II. V předposlední fázi byl cycler nahříván na 72 °C po dobu 7 minut. Po 7 minutách následovala teplota 4 °C, která byla stálá až do vyjmutí našich vzorků s namnoženými vlákny DNA. Vzorky byly detekovány pomocí elektroforézy v 1.5 % agarózovém gelu obsahujícím Midori

Green (Elisabeth Pharmacon, Brno, Česká republika). Gel byl vizualizován a vyhodnocen pod UV světlem.

### Tabulka I

Použité primery pro detekci *Neoehrlichia mikurensis* a jejich sekvence.

Primery	Sekvence
CNM_groEL_PCR_F	(5'_AACTACAACATGTTCTATTTTAACAGC_3')
CNM_groEL_PCR_R	(5'_TCGTCATTAATAACGTATTTTGCACC_3')

### Tabulka II

Použité nastavení PCR cycleru pro detekci *Neoehrlichia mikurensis*.

Cyklus	Teplota [°C]	Čas [sec]	
1	94	60	35×
2a	94	15	
2b	52,4	15	
2c	72	45	
3	72	420	
4	4	0	

Stejnou metodou byla detekována i klíčící DNA. Sekvence primerů jsou popsány v tabulce III. Primery amplifikovaly 310 bází dlouhý fragment genu. Nastavení PCR cycleru je popsané v tabulce IV. V předposlední fázi byl cycler nahříván na 72 °C po dobu 7 minut. Po 7 minutách následovala teplota 4 °C, která byla stálá až do vyjmutí našich vzorků s namnoženými DNA. Vzorky byly také detekovány pomocí elektroforézy v 1.5 % agarózovém gelu a vizualizovány pod UV zářením.

### Tabulka III

Použité primery pro detekci klíčící DNA a jejich sekvence.

Primery	Sekvence
Ire_16S_PCR_F	(5'_CTGTGGTATTTTGACTATACGAAGG_3')
Ire_16S_PCR_R	(5'_TCCAAAATTATTACGCTGTTATCCC_3')

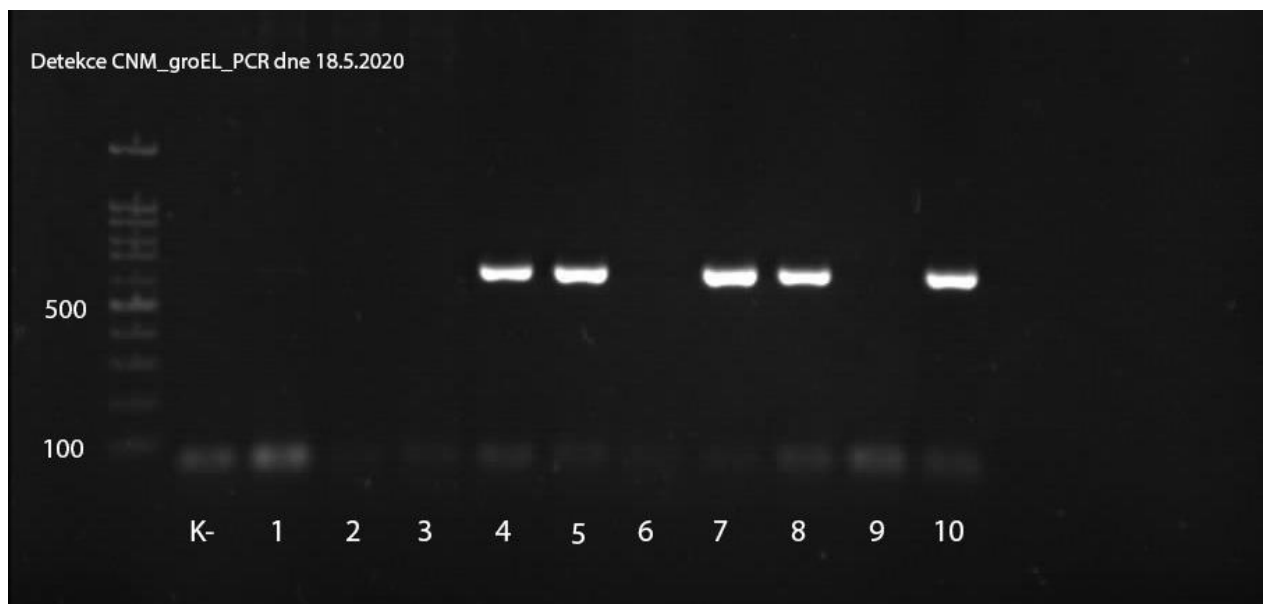
### Tabulka IV

Použité nastavení PCR cycleru pro detekci klíčící DNA.

Cyklus	Teplota [°C]	Čas [sec]	
1	94	60	35x
2a	94	15	
2b	61	15	
2c	72	30	
3	72	420	
4	4	0	

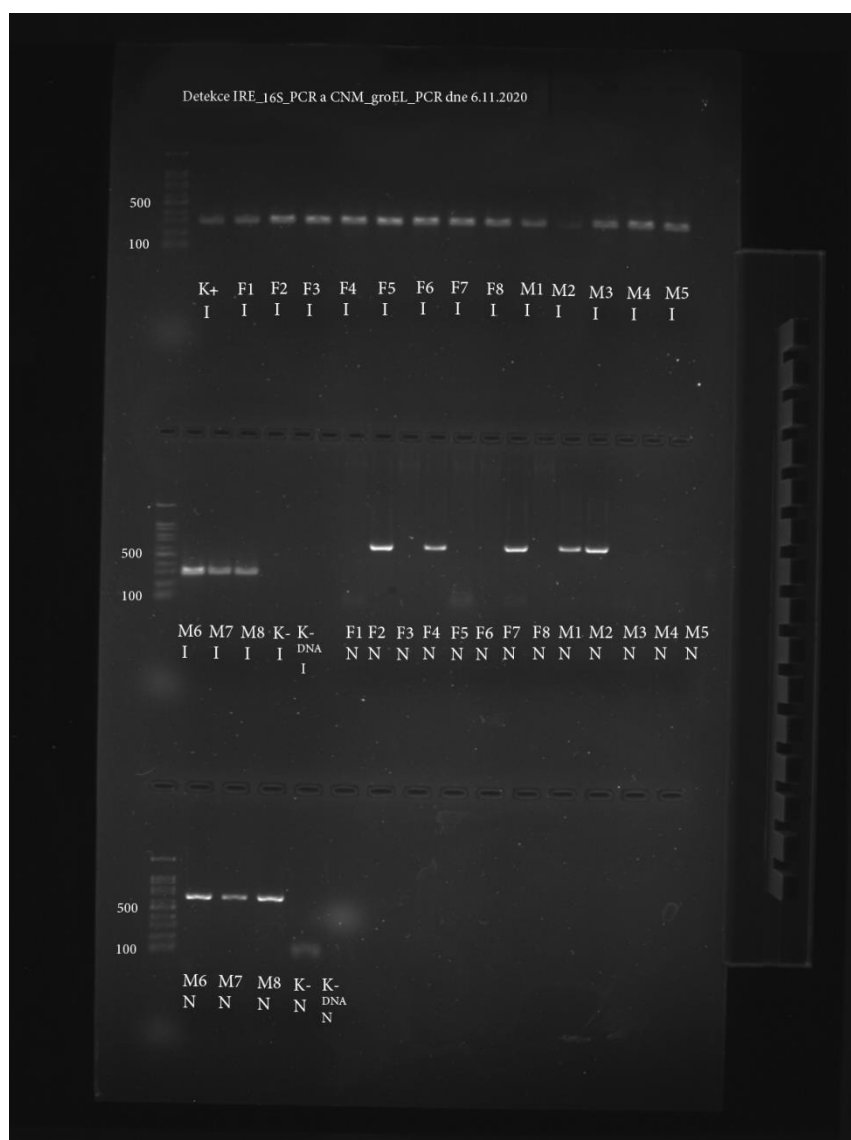
## 5 VÝSLEDKY

V pokusu č. 1 (Obr. 2) bylo analyzováno deset vzorků po pěti kusech dospělých klíšťat. Vzorky 4, 5, 7, 8 a 10 vykazují pozitivní signál o velikosti 654 bází, tj. v těchto vzorcích byla potvrzena přítomnost bakteriální DNA *N. mikurensis*. Ve vzorkách 1, 2, 3, 6 a 9 není žádný signál, tj. neobsahují bakteriální DNA. Vzorek K- je negativní kontrola, vzorek pocházející z neinfikovaných klíšťat.



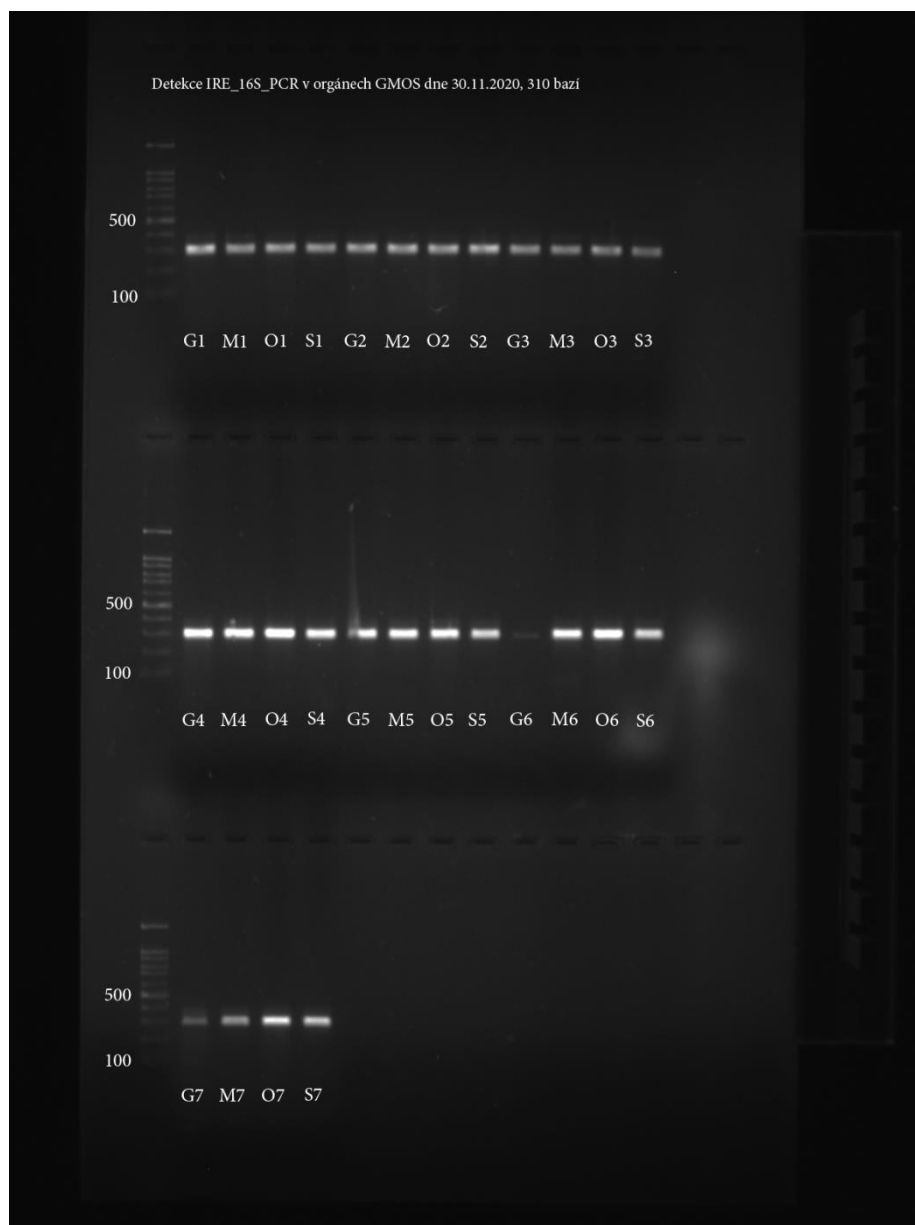
**Obr. 2:** Detekce DNA *Neohrlichia mikurensis* v poolovaných klíšťatech po pěti.

V pokusu č. 2 (Obr. 3) bylo připraveno 8 vzorků po třech kusech samic (F1-F8) a 8 vzorků po třech kusech klíštěcích samců (M1-M8). Vzorky byly analyzovány na přítomnost DNA *I. ricinus* a DNA *N. mikurensis*. V prvním kroku byly analyzovány vzorky na přítomnost klíštěcí DNA. Vzorky F1-F8/I a M1-M8/I vykazují pozitivní signál v oblasti 310 bází, tj. obsahují DNA pocházející z klíštěte *I. ricinus*. Vzorek K+/I je pozitivní kontrolou obsahující klíštěcí DNA. Vzorek K-/I je negativní kontrolou, která neobsahuje žádnou DNA. Vzorek K-DNA/I je negativní kontrolou obsahující DNA jiného živočicha. V druhém kroku byly vzorky analyzovány na přítomnost bakteriální DNA. Vzorky F2/N, F4/N, F7/N, M1/N, M2/N, M6/N, M7/N, M8/N vykazují pozitivní signál v oblasti 654 bází, tj. obsahují DNA *N. mikurensis*. Vzorek K-/N je negativní kontrolou, která neobsahuje bakteriální DNA. Vzorek K-DNA/N je negativní kontrolou s obsahem DNA jiného živočicha.



**Obr. 3:** Detekce DNA *Ixodes ricinus* a *Neoehrlichia mikurensis* v poolovaných klíštětech po třech.

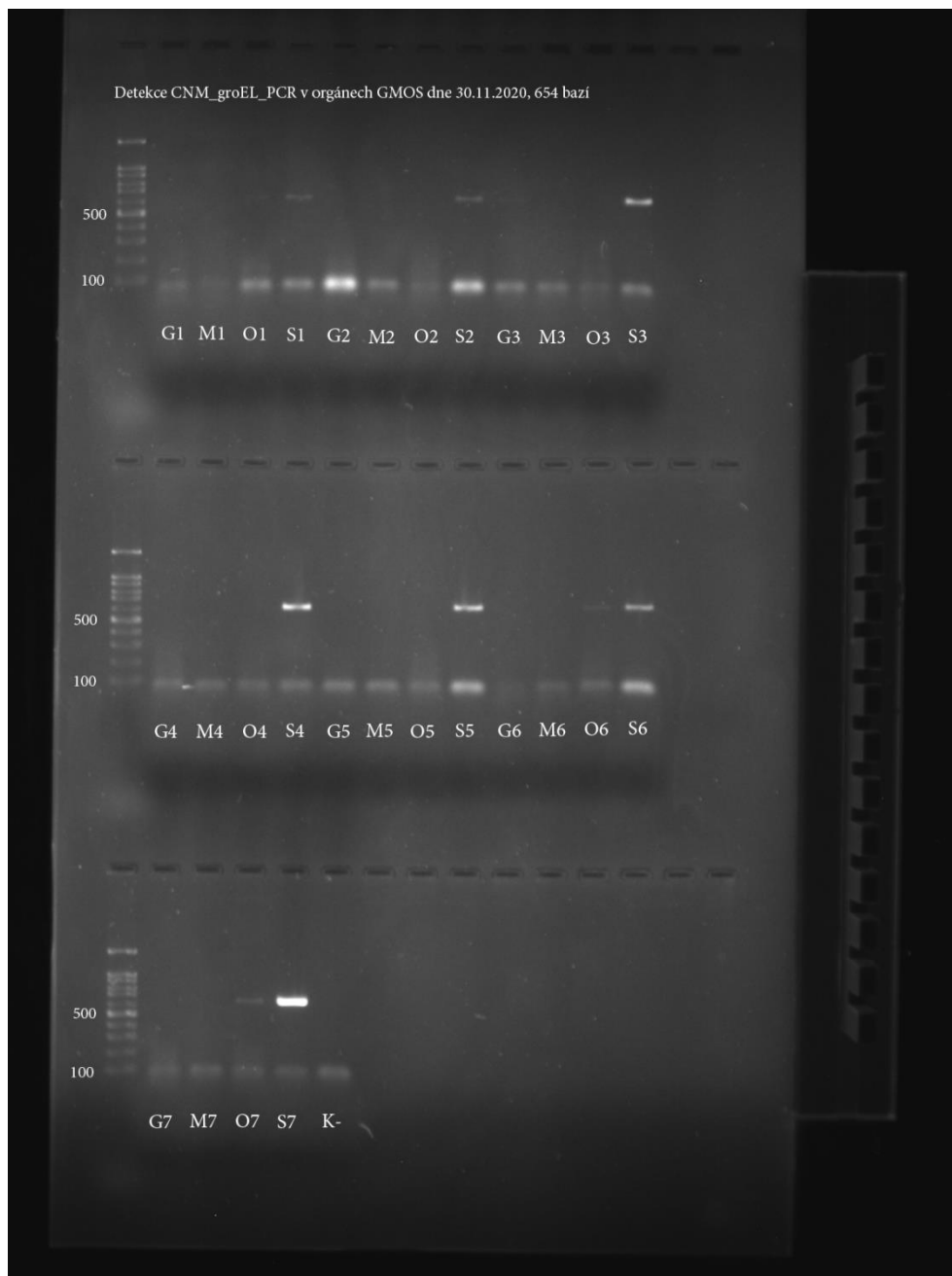
V pokusu č. 3 (Obr. 4) bylo použito 28 vzorků klíštěcích orgánů. Vzorky pocházely ze 7 klíšťat, z každého klíštěte vždy vzorek střeva (G1-G7), Malpigických trubic (M1-M7), ovárií (O1-O7) a slinných žláz (S1-S7). Ve všech orgánových vzorcích byla zjištěna přítomnost DNA *I. ricinus*. Podle Markeru je očividné, že primery amplifikovaly 310 bází dlouhý produkt, tedy že ve všech vzorcích se nalézají klíštěcí DNA a její izolace tedy proběhla správně.



**Obr. 4:** Detekce DNA *Ixodes ricinus* v klíštěcích orgánech.

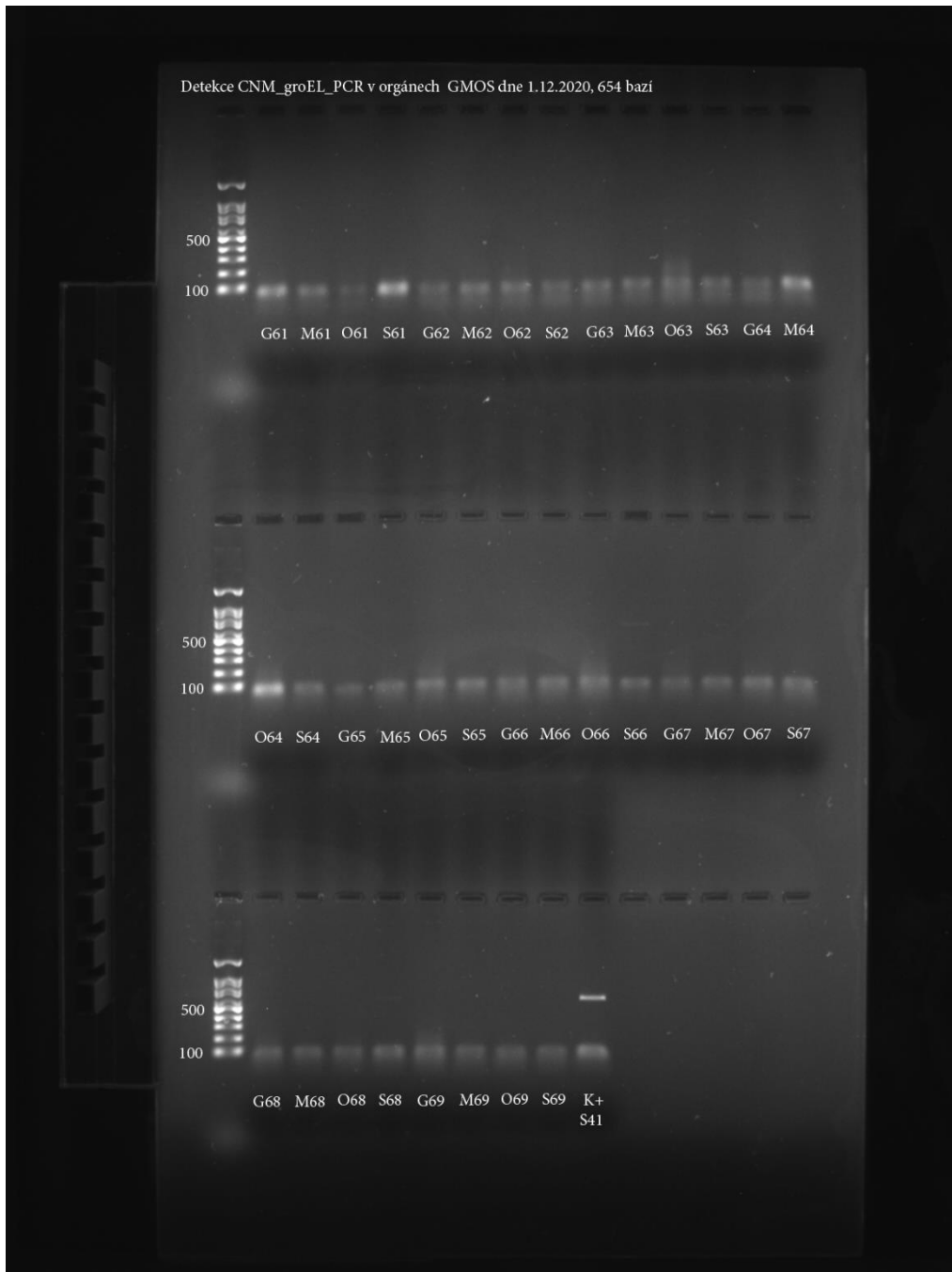


V pokusu č. 4 (Obr. 5) byla detekována bakteriální DNA v orgánech klíšťat. Bylo použito identických 28 vzorků z klíštěcích orgánů jako u pokusu č. 3. Pozitivní signál v oblasti 654 bází na přítomnost DNA bakterie *N. mikurensis* byl zjištěn ve dvou vzorcích ovárií a v sedmi vzorcích slinných žláz. Pozitivní ovária byla detekována ve stejných jedincích, jako pozitivní slinné žlázy.



**Obr. 5:** Detekce DNA *Neohrllichia mikurensis* v klíštěcích orgánech.

V pokusu č. 5 (Obr. 6) bylo analyzováno 36 vzorků klišťecích orgánů. Vzorky pocházely z 9 klišťat, z každého klišťete vždy vzorek střeva (G61-G69), Malpigických trubic (M61-M69), ovárií (O61-O69) a slinných žláz (S61-S69). O těchto vzorcích jsme předem věděli, že nejsou infikovány bakterií *N. mikurensis*. Pozitivní signál na přítomnost bakterie *N. mikurensis* byl detekován pouze ve vzorku označeném K+, tedy pozitivní kontrole. Očekávaný výsledek bez falešně pozitivních nálezů potvrzuje správnost provedení metody.



**Obr. 6:** Ověření negativních vzorků na přítomnost DNA *Neoehrlichia mikurensis*.

## 6 DISKUZE

Cílem práce bylo detekovat přítomnost bakterie *N. mikurensis* v orgánech klíšťat. Nejprve jsme nasbírali klíšťata na dvou lokalitách v Brně a pomocí metody PCR jsme se přesvědčili, že se na těchto místech bakterie *N. mikurensis* nachází. V dalším kroku jsme použili orgány ze sedmi klíšťat, která byla na těchto lokalitách nasbíraná již dříve. Zjistili jsme, že se bakterie vyskytuje ve všech sedmi vzorcích slinných žláz a ve dvou vzorcích ovárií. Detekcí klíšťecí DNA jsme si ověřili, že jsme DNA správně vyizolovali. Pokud bychom *N. mikurensis* detekovali rovnou bez detekce klíšťecí DNA, nebylo by jasné, zda je negativní výsledek způsobený nepřítomností bakterie nebo nepřítomností klíšťecí DNA z důvodu chybné izolace. Pozitivní výsledek by měl být tedy všude. Při detekci jsme použili negativní a pozitivní kontroly, které jsme dělali proto, abychom si ověřili, že nemáme ostatní vzorky nebo přísady pro PCR kontaminované DNA *N. mikurensis* a že tedy nechytáme falešně pozitivní signál. V negativní kontrole tedy nemá být žádný signál.

Tato práce je první studií distribuce *N. mikurensis* v klíšťatech. V roce 2020 byla poprvé zveřejněna systematická studie, která odhalila přítomnost *N. mikurensis* na většině území České republiky (Ondruš et al., 2020a). Ve stejném roce byla popsána pravděpodobná morfologie této bakterie ve tkáních klíšťete (Ondruš et al. 2020b) pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Zároveň byla *N. mikurensis* poprvé detekována ve slinných žlázách, což naznačuje, že se hostitel infikuje klíšťecími slinami. Vzorky s orgány z této studie byly použity v této práci. Kromě slinných žláz byla *N. mikurensis* detekována v ováriích, což naznačuje transovariální přenos. Bakterie se tedy dostane do vajíček infikované samice, ze kterých se vylíhnou larvy. V těchto larvách se bakterie stále nachází a nakazí tak svoje hostitele. Tímto způsobem se bakterie šíří z dospělého na jeho potomstvo.

Povědomí o bakterii se v poslední době zvyšuje a je nalézána na stále větším území Evropy (Portillo et al. 2018). Byla zjištěna v klíšťatech např. i v Norsku (Pedersen et al. 2020). V roce 2019 byla poprvé úspěšně nakultivována, a to v buňkách klíšťecích linií (Wass et al. 2019). Od té doby není potřeba používat ve jménu slovo *Candidatus*. Bakterie *N. mikurensis* bude předmětem dalšího výzkumu.

## 7 ZÁVĚR

Tato studie poprvé potvrdila přítomnost intracelulární bakterie *Neoehrlichia mikurensis* ve slinných žlázách a ováriích infikovaných klíšťat *Ixodes ricinus*. Na základě těchto výsledků se zdá, že bakterie infikuje hostitele skrze sliny a je pravděpodobné, že se v přírodě šíří také transovariálním přenosem. Tyto hypotézy budou předmětem dalšího výzkumu.

Touto studií jsem se přiučila novým dovednostem. Naučila jsem se, jak v přírodě probíhá sběr klíšťat metodou vlajkování. Naučila jsem se základy pipetování a izolaci DNA. Poznala jsem, jak funguje analýza PCR, která se obdobným způsobem využívá také při testech na covid-19. Mimo to jsem získala základy k psaní odborných prací. Pracovala jsem s programem Mendeley, s jehož pomocí jsem se naučila orientovat v odborné literatuře a citovat ji.

## 8 BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

1. GARCIA-ALVAREZ, Lara, Ana Maria PALOMAR a Jose Antonio OTEO, 2013. Prevention and Prophylaxis of Tick Bites and Tick-Borne Related Diseases. *American Journal of Infectious Diseases*. **9**(3), 104–116.
2. GRANKVIST, Anna, Per Ola ANDERSSON, Mattias MATTSSON, Monica SENDER, Krista VAHT, Linnea HÖPER, Egidija SAKINIENE, Estelle TRYSBERG, Martin STENSON, Jan FEHR, Sona PEKOVA, Christian BOGDAN, Guido BLOEMBERG a Christine WENNERÅS, 2014. Infections With the Tick-Borne Bacterium „*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” Mimic Noninfectious Conditions in Patients With B Cell Malignancies or Autoimmune Diseases. *Clinical Infectious Diseases*. **58**(12), 1716–1722.
3. KAWAHARA, Makoto, Yasuko RIKIHISA, Emiko ISOGAI, Mamoru TAKAHASHI, Hitoko MISUMI, Chiharu SUTO, Shinichiro SHIBATA, Chunbin ZHANG a Masayoshi TSUJI, 2004. Ultrastructure and phylogenetic analysis of „*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” in the family *Anaplasmataceae*, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **54**(5), 1837–1843.
4. ONDRUŠ, Jaroslav, Alena BALÁŽOVÁ, Vojtech BALÁŽ, Kristína ZECHMEISTEROVÁ, Adam NOVOBILSKÝ a Pavel ŠIROKÝ, 2020a. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* is widespread in questing *Ixodes ricinus* ticks in the Czech Republic. *Ticks and Tick-borne Diseases*. **11**(3), 101371.
5. ONDRUŠ, Jaroslav, Pavel KULICH, Oldřich SYCHRA a Pavel ŠIROKÝ, 2020b. Putative morphology of *Neoehrlichia mikurensis* in salivary glands of *Ixodes ricinus*. *Scientific Reports*. **10**, 15987.
6. PEDERSEN, Benedikte N., Andrew JENKINS, Katrine M. PAULSEN, Yohannes B. OKBALDET, Kristin S. EDGAR, Alaka LAMSAL, Arnulf SOLENG a Åshild K. ANDREASSEN, 2020. Distribution of *Neoehrlichia mikurensis* in *Ixodes ricinus* ticks along the coast of Norway: The western seaboard is a low-prevalence region. *Zoonoses and Public Health*. **67**(2), 130–137.
7. PEKOVA, Sona, Jan VYDRA, Hana KABICKOVA, Sona FRANKOVA, Renata HAUGVICOVA, Oldřich MAZAL, Radek CMEJLA, David W. HARDEKOPF, Tereza JANCUSKOVA a Tomas KOZAK, 2011. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* infection identified in 2 hematooncologic patients: Benefit of molecular techniques for rare pathogen detection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. **69**(3), 266–270.
8. PORTILLO, A., P. SANTIBÁÑEZ, A. M. PALOMAR, S. SANTIBÁÑEZ a J. A. OTEO, 2018. ‘*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*’ in Europe. *New Microbes and New Infections*. **22**, 30–36.
9. SCHOOLS, Leo M., Ingrid VAN DE POL, Sjoerd G.T. RIJKEMA a Corrie S. SCHOT, 1999. Detection and Identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* Sensu

Lato, and *Bartonella* Species in Dutch *Ixodes ricinus* Ticks. *Journal of Clinical Microbiology*. **37**(7), 2215–2222.

10. SONENSHINE, Daniel E. a R. Michael ROE, 2014. *Biology of Ticks* 1.
11. WASS, Linda, Anna GRANKVIST, Lesley BELL-SAKYI, Malin BERGSTRÖM, Erik ULFHAMMER, Christine LINGBLOM a Christine WENNERÅS, 2019. Cultivation of the causative agent of human neehrlichiosis from clinical isolates identifies vascular endothelium as a target of infection. *Emerging Microbes & Infections*. **8**(1), 413–425.
12. WELC-FAŁĘCIAK, Renata, Maciej KOWALEC, Grzegorz KARBOWIAK, Anna BAJER, Jerzy M. BEHNKE a Edward SIŃSKI, 2014a. Rickettsiaceae and Anaplasmataceae infections in *Ixodes ricinus* ticks from urban and natural forested areas of Poland. *Parasites and Vectors*. **7**(1), 121.
13. WELINDER-OLSSON, Christina, Eva KJELLIN, Krista VAHT, Stefan JACOBSSON a Christine WENNERÅS, 2010. First Case of Human „*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*” Infection in a Febrile Patient with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Clinical Microbiology*. **48**(5), 1956–1959.