Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta
Katedra zoológie

Kliešte a blchy drobných cicavcov a ich úloha potenciálnych vektorov vybraných patogénov na východnom Slovensku

Dizertačná práca

Študijný program: Zoológia
Študijný odbor: 4.2.5. Zoológia
Školiace pracovisko: Parazitologický ústav SAV, Košice
Vedúci práce: doc. RNDr. Michal Stanko, DrSc.
Školiteľ-špecialista: RNDr. Bronislava Víchová, PhD.

Bratislava, 2020 **Mgr. Ivana Heglasová**

90971671

Univerzita Komenského v Bratislave
Prírodovedecká fakulta

ZADANIE ZÁVEREČNEJ PRÁCE

Meno a priezvisko študenta: Mgr. Ivana Heglasová
Študijný program: zoológia (Jednoodborové štúdium, doktorandské III. st., denná forma)
Študijný odbor: biológia
Typ záverečnej práce: dizertačná
Jazyk záverečnej práce: slovenský
Sekundárny jazyk: anglický

Názov: Kliešte a blchy drobných cicavcov a ich úloha potenciálnych vektorov vybraných patogénov na východnom Slovensku
Ticks and fleas of small mammals and their role as potential vectors of selected pathogens on eastern Slovakia

Anotácia: 1. Dizertačná práca rieši aktuálnu problematiku výskumu vybraných vektormi prenášaných patogénov a význam hlodavcov ako rezervoárových hostiteľov. Cieľom dizertačnej práce je vykonať epidemiologický výskum so zámerom rozšíriť poznatky o prevalencii, diverzite a distribúcii vybraných patogénov (rickettsia, *B. miyamotoi*) vo viacerých druhoch článkonožcov a drobných cicavcov na modelových lokalitách východného Slovenska. Zistiť, či existujú špecifické asociácie patogénov s určitými druhmi článkonožcov a hostiteľov.
2. Zistiť aktuálne údaje o štruktúre ektoparazitov (kliešťov a bĺch) parazitujúcich na drobných cicavcoch v biotopoch s rôznym typom antropického využitia. Na základe získaných údajov stanoviť vplyv prostredia (typ habitatu) a druhového spektra kliešťov na výskyt a šírenie kliešťami prenášaných pôvodcov nákaz.
3. Významne rozšíriť poznatky o úlohe ektoparazitov ako potenciálnych vektorov viacerých patogénov (rickettsií, *B. miyamotoi*).

Školiteľ: doc. RNDr. Michal Stanko, DrSc.
Katedra: Prif.KZ - Katedra zoológie
PriF vedúci katedry: doc. RNDr. Ján Kodada, CSc.

Dátum zadania: 08.03.2016

Dátum schválenia: 17.03.2016 prof. RNDr. Miroslav Krumpál, CSc.
garant študijného programu

.....
študent

.....
školiteľ

Poďakovanie

Dizertačná práca bola vypracovaná v rámci interného doktorandského štúdia v odbore zoológia (Prif UK) na Parazitologickom ústave SAV v Košiciach ako externej vzdelávacej inštitúcii. Touto cestou preto srdečne ďakujem Parazitologickému ústavu SAV a najmä vedeniu, p. riaditeľke RNDr. Ivici Hromadovej, DrSc. za priateľský prístup a vytvorenie vhodných podmienok na štúdium, vďaka čomu som sa mohla zdokonaľovať.

Najväčšia vďaka patrí vedúcemu dizertačnej práce doc. RNDr. Michalovi Stankovi, DrSc. za jeho odborné vedenie, cenné rady, pripomienky, zaškolenie do určovania jednotlivých druhov kliešťov, zberu a spracovania materiálu a poskytnutie cenných literárnych zdrojov. Veľmi si vážim jeho pomoc, odborný prístup a ochotu kedykoľvek reagovať na moje dotazy. Ďakujem aj za finančné zabezpečenie celého výskumu, čím sa mi naskytla možnosť zúčastniť sa na vedeckých konferenciách, stáže v Českých Budějoviciach a publikovať články vo vedeckých karentovaných časopisov.

Taktiež som vďačná mojej konzultantke RNDr. Bronislave Víchovej PhD. za nesmiernu pomoc najmä pri vypracovaní fylogenetických analýz, zaškolenie v laboratóriu a cenné rady ohľadom molekulárnych otázok, ale aj publikácii. Nesmierne si vážim jej priateľský prístup a všetok čas, ktorý mi venovala.

Touto cestou by som chcela poďakovať celému nášmu tímu z oddelenia vektormi prenášaných nákaz, konkrétne: RNDr. Viktorii Majláthovej, PhD. vďaka, ktorej som mohla viesť Cvičenia z parazitológie na Univerzite Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, čo ma nesmierne nadchýňalo a tešilo, ďalej MVDr. Dane Zubríkovej, PhD., RNDr. Lucii Blaňárovej, PhD. a Mgr. Jasne Kraljik, PhD. za prijatie do kolektívu, všetky poskytnuté rady, laboratórne pomôcky a vybavenie, ktoré boli potrebné k môjmu výskumu.

V neposlednom rade by som chcela poďakovať i RNDr. Dane Miklisovej, PhD. za pomoc pri štatistickom vyhodnocovaní materiálu ako aj za konštruktívne pripomienkovanie a spoluprácu na rukopisoch.

MVDr. Markéte Derdákovej ďakujem za ochotu a nezištnú pomoc počas viacerých pobytov na ich pracovisku, za jej cenné rady a poskytnutie potrebného vybavenia.

Touto cestou by som rada poďakovala doktorke Natalii Rudenko, PhD. a MSc. Maryne Golovchenko za všetok čas, ktorý mi nezištne venovali počas zahraničnej stáže na Parazitologickom ústave Biologického centra AV ČR v Českých Budějoviciach. Veľmi si

vážim ich odborné vedenie, zaučenie do metodík genetickej analýzy *B. miyamotoi*, za množstvo užitočných rád a ich spoluprácu, na základe ktorej vznikla vedecká publikácia.

Na záver by som chcela poďakovať mojim rodičom, ktorí ma inšpirovali, posúvali vpred, stáli vždy pri mne, podporovali ma a verili mi. Ďakujem.

Abstrakt

Cieľom dizertačnej práce bolo priniesť aktuálne údaje o prevalencii, diverzite a distribúcii významných infekčných agens, rickettsií a na Slovensku novo zistenej *Borrelia miyamotoi* vo viacerých druhoch článkonožcov a drobných cicavcov. Čiastkovým cieľom bolo zistiť, či existujú špecifické asociácie patogénov (rickettsií) s určitými druhmi článkonožcov a hostiteľov a či vplýva typ prostredia a druhové spektrum kliešťov na výskyt a diverzitu kliešťami prenášaných pôvodcov nákaz. Ako modelové lokality boli vybrané biotopy rurálneho (Hrhov, Slovenský kras), suburbánneho (Čermeľ), a urbánneho (Botanická záhrada Košice), charakteru východného Slovenska. V skúmanom období 2014 až 2016 bolo odchytených 250 drobných cicavcov 11-tich druhov s dominantným zastúpením *Apodemus agrarius*, *Apodemus flavicollis* a *Myodes glareolus*. Celkovo bolo vyšetrených 2160 kliešťov *Ixodes ricinus, Ixodes trianguliceps*, *Dermacentor marginatus, Dermacentor reticulatus, Haemaphysalis concinna* a *Haemaphysalis inermis*. Z bĺch bolo na drobných cicavcoch určených 9 druhov, z ktorých prevažovali generalisti aj špecialisti – *Ctenophthalmus agyrtes, Ctenophthalmus assimilis, Ctenophthalmus solutus, Megabothris turbidus*. PCR analýza potvrdila prítomnosť *Rickettsia helvetica*, *R. slovaca* a *Rickettsia* sp. blízko príbuznej *R. felis* u 11 % najmä dominantných druhov drobných cicavcov. Výsledky práce zdôrazňujú dôležitú úlohu dominantných druhov drobných cicavcov (*Apodemus* spp. a *Myodes*) ako hostiteľov ektoparazitov a rezervoárov patogénov. U ektoparazitov bol výskyt rickettsií (*R. helvetica*, *R. slovaca, R. raoultii, R. felis, Rickettsia* sp.) potvrdený v prevalencii 12,5 % u kliešťov z vegetácie, 20 % u kliešťov z drobných cicavcov a 2,5 % u bĺch. Výsledky práce naznačujú prítomnosť špecifických asociácií medzi rickettsiami a určitými druhmi alebo skupinami bezstavovcov. Zdá sa, že niektoré druhy ako *R. helvetica*, *R. monacensis* alebo *R. felis* majú širší hostiteľský rozsah oproti druhom ako *R. slovaca* s užšou preferenciou na potenciálne vektory. Výskyt jednotlivých druhov článkonožcov môže naznačovať prítomnosť špecifických druhov rickettsií v konkrétnom prostredí a napomôcť tak odhadnúť riziko infekcie. *Borrelia miyamotoi* bola molekulárne potvrdená (RT-PCR) u 1,8 % kliešťov z vegetácie, 3,4 % kliešťov z drobných cicavcov a jedného hraboša *M. arvalis*. Všetky vyšetrované blchy boli negatívne testované na prítomnosť *B. miyamotoi*, čo naznačuje, že sa nepodieľajú na prenose a cirkulácii borélie. Spirochéta bola okrem kliešťa *I. ricinus* potvrdená aj v druhu *H. inermis* v rurálnom type

biotopu, čo je prvý záznam pre Európu a môže indikovať širšie druhové spektrum kliešťov pre *B. miyamotoi*. Na základe súhrnne získaných výsledkov sa rurálne typy biotopov s odlišnými druhmi kliešťov a hostiteľov javia ako vhodné na výskyt a prenos patogénov.

Kľúčové slová: *Rickettsia*, *Borrelia miyamotoi*, kliešte, blchy, drobné cicavce, habitat

Abstract

The aim of the thesis was to provide current data on the prevalence, diversity, and distribution of rickettsiae, important infectious agents and *Borrelia miyamotoi,* newly recorded in Slovakia, in several species of arthropods and small mammals. The partial objective was to determine whether there are specific associations of pathogens (rickettsiae) with certain arthropod and host species and whether the type of environment and the species spectrum of ticks affect the occurrence and diversity of tick-borne pathogens. The research was conducted in rural (Hrhov, the Slovak Karst), suburban (Čermeľ), and urban (Botanical Garden, Košice) habitats in Eastern Slovakia. Between 2014 and 2016, in total, 250 small mammals representing 11 species with a dominant representation of *Apodemus agrarius*, *Apodemus flavicollis* and *Myodes glareolus* were captured. A total of 2160 ticks of *Ixodes ricinus*, *Ixodes trianguliceps*, *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulatus*, *Haemaphysalis concinna* and *Haemaphysalis inermis* were examined. Out of nine flea species, flea generalists and specialists – *Ctenophthalmus agyrtes*, *Ctenophthalmus assimilis*, *Ctenophthalmus solutus*, and *Megabothris turbidus* were the most prevalent. PCR based methods confirmed the presence of *Rickettsia helvetica*, *R. slovaca* and *Rickettsia* sp. closely related to *R. felis* in 11% of mainly dominant small mammal species. The results emphasize the important role of the dominant species of small mammals (*Apodemus* spp. and *Myodes*) as hosts of ectoparasites and reservoirs of pathogens. The overall prevalence of rickettsiae (*R. helvetica*, *R. slovaca, R. raoultii, R. felis, Rickettsia* sp.) in questing ticks, rodent-attached ticks and fleas was 12.5%, 20%, and 2.5% respectively. The data suggest that individual species of rickettsiae tend to be associated with certain arthropod species or groups. The occurrence of certain potential vector species may suggest the presence of specific species of rickettsiae in a particular habitat and help to estimate the risk of infection. Apparently, some species of rickettsiae such as *R. helvetica*, *R. monacensis* or *R. felis* have a wider host range compared to R. *slovaca* with a narrower preference for potential vectors. *Borrelia miyamotoi* was confirmed by real-time PCR in 1.8% of questing ticks, 3.4% of rodent-attached ticks and a single *M. arvalis*. All examined fleas were tested negative for the presence of B. *miyamotoi*, indicating that fleas are not involved in *Borrelia* transmission and circulation. In addition to the *I. ricinus* tick, the spirochete was also confirmed in *H.*

inermis in the rural type of habitat, which is the first record in Europe and may indicate a wider species spectrum of ticks for *B. miyamotoi*. Based on overall results, rural habitat types with different tick and host species appear to be suitable for the occurrence and transmission of pathogens.

Key words: *Rickettsia*, *Borrelia miyamotoi*, ticks, fleas, small mammals, habitat

Predhovor

Výskum vektormi a rezervoárovými hostiteľmi prenosných patogénov má nesmierny význam. Vo svete sa objavuje čoraz viac prípadov humánnych ochorení s neznámou etiológiou. Najmä v súčasnej dobe môžeme pozorovať vplyv globálnej pandémie koronavírusu spôsobujúceho ochorenie COVID-19, ktoré predstavuje celosvetovú zdravotnú hrozbu s vplyvom na ekonomiku. Koronavírusy sú patogénne pre domáce, hospodárske aj voľne žijúce zvieratá a sú zoonotického charakteru. V posledných rokoch nie len vo svete, ale aj na území Slovenska zaznamenávame výskyt nových alebo novo sa objavujúcich vektormi prenosných patogénov. Príkladom sú niektoré druhy rickettsií a *Borrelia miyamotoi* zo skupiny návratných horúčok, ktorých eko-epidemiológia nie je doteraz celkom objasnená. Vzhľadom na to, že je dôležité pochopiť vývoj a vzťahy týchto baktérií v rezervoárových hostiteľoch a vektoroch v prírodných ohniskách som sa rozhodla venovať práve tejto problematike.

Predkladaná dizertačná práca sa venuje epidemiologickým významom drobných cicavcov a ektoparazitov v cirkulácii novo sa objavujúcich bakteriálnych patogénov – rickettsií a *B. miyamotoi*. Práca sa ďalej zaoberá stanovením vplyvu prostredia s rôznym stupňom antropického využívania (typ habitatu) a druhového spektra kliešťov na výskyt a šírenie kliešťami prenášaných pôvodcov nákaz. Práca je určená širokému spektru čitateľov, najmä však odbornej verejnosti z radov lekárov, epidemiológov, zoológov, ekológov, alebo učiteľom a študentom venujúcim sa obdobnej téme. Výsledky práce tak môžu napomôcť k rozšíreniu aktuálnych poznatkov o eko-epidemiológii vektormi prenosných patogénov.

OBSAH

ÚVOD 12
1. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY 14
1.1. Drobné cicavce ako hostitelia ektoparazitov a rezervoáre pôvodcov nákaz 14
1.1.1. Rozšírenie epidemiologicky významných druhov drobných cicavcov na Slovensku a ich ektoparazity 17
1.1.1.1. *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771) 17
1.1.1.2. *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834) 19
1.1.1.3. *Microtus arvalis* (Pallas, 1778) 20
1.1.1.4. *Myodes glareolus* (Schreber, 1780) 21
1.2. Bionómia, ekológia a epidemiológia kliešťov (Ixodida) 23
1.2.1. Životný cyklus a ekológia kliešťov 24
1.2.2. Kliešte (Ixodida) ako vektory patogénov 26
1.2.2.1. *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) 28
1.2.2.2. *Ixodes trianguliceps* (Birula, 1895) 30
1.2.2.3. *Dermacentor marginatus* (Sulzer, 1776) 31
1.2.2.4. *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) 32
1.2.2.5. *Haemaphysalis concinna* (Koch, 1844) 33
1.2.2.6. *Haemaphysalis inermis* (Birula, 1895) 34
1.3. Bionómia, ekológia a epidemiológia bĺch (Siphonaptera) 36
1.3.1. Blchy ako vektory patogénov 36
1.4. Charakteristika vybraných pôvodcov zoonóz prenášaných článkonožcami 38
1.4.1. *Borrelia* 38
1.4.1.1. *Borrelia miyamotoi* 41
1.4.2. *Rickettsia* 43
1.4.2.1. *Rickettsia africae* 46
1.4.2.2. *Rickettsia conori conori* 47
1.4.2.3. *Rickettsia felis* 47
1.4.2.4. *Rickettsia helvetica* 48
1.4.2.5. *Rickettsia monacensis* 49

1.4.2.6. *Rickettsia raoultii* 50
1.4.2.7. *Rickettsia slovaca* 50
2. CIELE PRÁCE 52
3. MATERIÁL A METODIKA 53
4. VÝSLEDKY 56
4.1. *Rickettsia* spp. 56
4.2. *Borrelia miyamotoi* 113
5. DISKUSIA 135
5.1. *Rickettsia* spp. 135
5.2. *Borrelia miyamotoi* 140
ZÁVER 143
ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY 145
PRÍLOHA 193

ÚVOD

Epidemiologický význam hematofágnych článkonožcov spočíva v ich schopnosti prenášať pôvodcov vírusových, bakteriálnych, protozoárnych a iných infekčných nákaz s fenoménom prírodnej ohniskovosti (Capinera 2008). Drobné cicavce sú významní rezervoároví hostitelia rôznych patogénov, u ktorých ma infekcia latentný až subklinický priebeh (Mehlhorn 2001). Aby sme mohli objasniť cirkuláciu patogénov v rôznych ekosystémoch je nutné študovať vzájomné interakcie medzi patogénom, rezervoárovým hostiteľom, vektormi a prostredím (Alekseev 2008).

Rickettsie sú považované za vynárajúce sa patogény spôsobujúce rickettsiózy – infekčné ochorenia, ktoré ohrozujú ľudské zdravie a sú prenášané kliešťami, blchami, všami a roztočmi. Na Slovensku bolo doposiaľ publikovaných mnoho prác zameraných na analýzu rickettsií zo skupiny škvrnitých horúčok (SFG). Na základe mikroskopického dôkazu, sérologickej diagnostiky a rôznych metód molekulárnej biológie bolo identifikovaných väčšinou v kliešťoch a blchách sedem druhov rickettsií, najmä na lokalitách v južnej časti nášho územia (Řeháček *et al.* 1976, Sekeyová *et al.* 2000, 2003, 2012, 2013, Kováčová *et al.* 2006, Boldiš *et al.* 2008, Špitalská *et al.* 2008a,b, 2012, 2015). V tkanivách z drobných cicavcov boli na Slovensku molekulárnymi metódami zaznamenané *Rickettsia helvetica* (Minichová *et al*. 2017, Heglasová et al. 2018), *Rickettsia monacensis* (Minichová *et al*. 2017), *Rickettsia slovaca* a *Rickettsia* sp. fylogeneticky blízko príbuzná s druhom *Rickettsia felis* (Heglasová et al. 2018.). V posledných desaťročiach sa zvýšil počet novoidentifikovaných a charakterizovaných druhov rickettsií a potvrdilo sa, že niektoré z nich sú patogénne pre ľudí.

V cirkulácii patogénov (vírusy, baktérie) v prírodných ohniskách na Slovensku majú významnú úlohu najmä dominantné druhy hlodavcov z rodov *Apodemus* a *Myodes* (Guryčová & Letkovský 1973, Labuda *et al*. 1989, Čisláková *et al*. 2004, Klempa *et al*. 2005 a i.). Druhové spektrum rickettsií v hlodavcoch môže byť oveľa vyššie nielen v prirodzenom habitate, ale aj mestskom či prímestskom prostredí. Taktiež sa ich výskyt a rozšírenie môže meniť v závislosti od klimatických faktorov prostredia, sezóny alebo druhu vektora či hostiteľa. Je otázne do akej miery prispievajú drobné cicavce k cirkulácií rickettsií v mestskom či prímestskom prostredí a či je ich druhová diverzita vyššia v hostiteľoch, ako je nám v súčasnosti známe. Na objasnenie mnohých vynárajúcich sa

otázok je nutné nadviazať na výskum rickettsií nielen vo vektoroch, ale aj ich hostiteľoch.

Na Slovensku boli zaznamenané spirochéty z komplexu *Borreliella* (*Borrelia*) *burgdorferi* sensu lato vyvolávajúce lymskú boreliózu a zo skupiny vyvolávajúcej tzv. návratné horúčky. Do druhej skupiny patrí druh *Borrelia miyamotoi*, ktorý bol na západnom Slovensku po prvýkrát potvrdený v roku 2012 v kliešťoch *Ixodes ricinus* (Subramanian *et al*. 2012). Ďalej sa tejto problematike venovali Derdáková *et al*. (2016), Venczel *et al*. (2016), Hamšíková *et al*. (2017) a Vaculová *et al.* 2019. Avšak čo sa týka *B. miyamotoi* jej šírenie, ekológia a spektrum vektorov a hostiteľov zapojených do cirkulácie sú stále nedostatočne známe.

Predkladaná práca je zameraná na štúdium rickettsií a spirochéty *B. miyamotoi* v rurálnom, suburbánnom a urbánnom prostredí východného Slovenska. Na objasnenie druhovej diverzity patogénov, ich prevalencií, výskytu a sezónnej dynamiky či fylogenetických vzťahov budú študované nielen blchy a kliešte, ale aj drobné cicavce. Práca je vysoko aktuálna a jej výsledky môžu prispieť k objasneniu eko-epidemiológie študovaných patogénov. Výsledky práce sú sumarizované v podobe už zverejnených alebo akceptovaných publikácií.

1. SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

1.1. Drobné cicavce ako hostitelia ektoparazitov a rezervoáre pôvodcov nákaz

Drobné cicavce sú reprezentované dvoma samostatnými radmi, hlodavcami (Rodentia) a hmyzožravcami (Insectivora, Eulipotyphla), charakterizované odlišnou potravnou stratégiou. Na území Slovenska je známych 29 druhov drobných cicavcov, 7 druhov hmyzožravcov z čeľade Soricidae a 1 druh z čeľade Talpidae, 8 druhov hlodavcov z čeľade Muridae, 8 druhov z čeľade Cricetidae, 4 druhy z čeľade Gliridae a 1 druh z čeľade Dipodidae (Krištofík & Danko 2012, Baláž *et al*. 2013, Stanko 2014a). K drobným cicavcom sú radené druhy, ktoré sú si podobné veľkosťou a hmotnosťou a podľa ich životných stratégií sa delia na skupiny arborikolné, subteránne, terikolné a semiakvatické (Baláž *et al*. 2013). Ide o druhovo rozmanitú a početnú skupinu kozmopolitne rozšírených živočíchov (Schex 2011, Baláž *et al*. 2013). Niektoré druhy drobných cicavcov sú využívané ako modelové objekty na štúdium biologických a ekologických princípov, aj vďaka ich rýchlemu životnému cyklu, vysokej plodnosti a pomerne krátkej gravidite. Táto stratégia je zameraná na väčší počet mláďat vrhnutých niekoľko krát do roka, ktoré rýchlo pohlavne dospievajú. Vďaka ich schopnosti vyskytovať sa vo väčšom počte na rôznych stanovištiach a flexibilne reagovať na zmeny sú taktiež využívane ako bioindikátory pri hodnotení stavu prostredia (Baláž *et al*. 2013).

Ich mimoriadna schopnosť prispôsobiť sa rôznym podmienkam prostredia a osídliť takmer všetky biotopy, okrem Antarktídy, prispieva k udržiavaniu a cirkulácií patogénov v prostredí (Schex 2011, Baláž *et al*. 2013). Niektoré druhy drobných cicavcov sa prispôsobili synantropnému spôsobu života a môžu sa podieľať na udržiavaní a šírení antropozoonóz (infekčných ochorení zvierat, prenosných aj na človeka) (Baláž *et al*. 2013). Zoonózy sú infekcie prenosné medzi voľne žijúcimi zvieratami vyznačujúce sa fenoménom prírodnej ohniskovosti. Tento kolobeh sa uskutočňuje na ohraničenom teritóriu, ktoré je označované ako prírodne ohnisko nákazy, za presne definovaných biotických a abiotických podmienok (Daniel *et al*. 2015).

Do životného cyklu rôznych pôvodcov ochorení je zapojené široké spektrum rezervoárových hostiteľov vrátane cicavcov, plazov a vtákov, ktoré môžu prispievať

k šíreniu patogénov do väčších vzdialeností. Drobné cicavce sú hostitelia viacerých skupín ektoparazitických článkonožcov (kliešťov, mezostigmátnych a trombidiformných roztočov, bĺch, vší) vektorov pôvodcov širokého spektra nákaz. Z kliešťov sú hlodavce infestované najmä larvami, menej nymfami a zriedka dospelými kliešťami (Tälleklint & Jaenson 1994).

Široké spektrum cicavcov, najmä niektoré epidemiologicky významné druhy hlodavcov z čeľadí Muridae a Cricetidae (Anděra & Horáček 2005) dlhodobo vystupujú ako rezervoáre rôznych patogénov (vírusov, baktérií, prvokov, parazitov), pôvodcov nebezpečných ochorení ľudí aj zvierat v prírodných aj mestských oblastiach (Rizzoli *et al*. 2014). Aj napriek tomu, že drobné cicavce tvoria len časť hostiteľských zvierat kliešťov, patria medzi najdôležitejších kompetentných hostiteľov vírusu kliešťovej encefalitídy v prírode (Grešíková & Nosek 1981, Labuda *et al*. 1989).

Niektoré druhy drobných cicavcov môžu zohrávať dôležitejšiu úlohu v udržiavaní a šírení patogénov v rámci i mimo prírodných ohnísk. Výsledky práce Barandika *et al.* (2007) ukázali, že v závislosti od druhu hlodavca sa pohybovala infekčná miera v rozmedzí od 10,7 do 68,8 % na *Borrelia* spp., *C. burnetii* a *A. phagocytophilum*. Predpokladá sa, že najmä niektoré dominantné druhy drobných cicavcov ako napr. *A. flavicollis*, *A. agrarius* a *M. glareolus* môžu byť dôležitejšie v udržiavaní, obehu a šírení patogénov ako druhy, ktoré majú užší vzťah k určitému typu biotopu. Na Slovensku z jedenástich druhov drobných cicavcov najvyššia druhová diverzita rickettsií bola zistená u *A. flavicollis* a najvyššia prevalencia u *M. glareolus* (Heglasová *et al.* 2018). Zároveň bola na týchto dominantných druhov hlodavcov (*A. flavicollis*, *A. agrarius*, *M. glareolus*) rozšírených v rôznych typoch habitátov zaznamenaná väčšia druhová diverzita kliešťov, než u menej početnejších druhov s úzkou ekologickou valenciou (Černý 1972, Nosek *et al.* 1972).

Tieto epidemiologický významné druhy hlodavcov sú známe ako rezervoáre kliešťami prenosných pôvodcov ochorení v prírodných ohniskách. Mnohé sú pôvodcami zoonóz ako je lymská borelióza, ľudská granulocytárna ehrlichióza, anaplazmóza a iné (Barandika *et al.* 2007). Kompetentné rezervoáre ako ryšavky (*Apodemus*) sú schopné udržiavať patogény v krvi a keďže zostávajú dlhodobo infekčné, slúžia ako zdroj infekcie pre vektory (Gern *et al.* 1994). Dôležité kompetentné rezervoáre *Borrelia burgdorferi* s. l. v Európe sú viaceré druhy drobných cicavcov. Ide najmä o druhy rodu *Apodemus*

(*A. agrarius*, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus*), *Myodes* (*M. glareolus*) a *Microtus* (*M. agrestis*) (Tälleklint & Jaenson 1994, Kurtenbach *et al.* 1998, Barandika *et al.* 2007). Hlodavce sú spájané najmä s *B. afzelii*, *B. garinii* a *B. burgdorferi* s.s., ale aj *B. miyamotoi* a *Canditatus* Neoehrlichia mikurensis (Kurtenbach *et al.* 1998, Hanincová *et al.* 2003, Burri *et al.* 2014). Drobné cicavce sú považované za hlavných rezervoárových hostiteľov lymskej boreliózy v Európe, nielen v prírodných ale aj mestských habitátoch (Humair & Gern 1998, Matuschka *et al.* 1997, Skuballa *et al.* 2012).

Na území Slovenska sa štúdiu epidemiológie v populáciách drobných cicavcov venuje veľká pozornosť. Doposiaľ bolo publikovaných množstvo prác zameraných na rôzne parazity a patogény drobných cicavcov, preto v práci ďalej uvádzam príklady len pri niektorých skupinách. Spomedzi bakteriálnych patogénov bol u drobných cicavcov potvrdený výskyt *Borreliella* (*Borrelia*) *burgdorferi* s. l. (Trávniček *et al*. 2003, Štefančíková *et al*. 2004, 2008, Hamšíková *et al*. 2017), *B. afzelii* (Štefančíková *et al*. 2008), *B. miyamotoi* (Hamšíková *et al*. 2017, Heglasová *et al.* 2020). Ďalej bol potvrdený výskyt *Anaplasma phagocytophilum* a *Anaplasma* - like organizmov (Barandika *et al*. 2007, Štefančíková *et al*. 2008, Blaňarová *et al*. 2014, Víchová *et al*. 2014, Svitálková *et al*. 2015), *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis (Blaňarová *et al*. 2016), *Bartonella* sp. (Špitalská *et al*. 2008b, Karbowiak *et al*. 2009, Kraljik *et al*. 2016), rickettsií a *Coxiella burnetii* (Smetanová *et al*. 2006, Heglasová *et al.* 2018).

Taktiež bola potvrdená úloha hlodavcov ako rezervoárových hostiteľov hantavírusov (Klempa *et al*. 2005), leptospír (Stanko *et al*. 1996), chlamýdií (Čisláková *et al*. 2004), pôvodcov tularémie (Guryčová & Letkovský 1973) a i. Z protozoárnych parazitov bol potvrdený výskyt *Babesia microti* (Blaňárová *et al*. 2016) a kokcídií *Eimeria* spp. (Kvíčerová *et al*. 2012). V krvných sérach drobných cicavcov boli detegované protilátky proti mikrosporídiám, konkrétne *Encephalitozoon cuniculi* (Halánová *et al*. 2010), z trusu hlodavcov boli potvrdené viaceré druhy kryptosporídií (Danišová *et al*. 2017). Z parazitických hlístovcom bola u hlodavcov sérologickými metódami zistená prítomnosť protilátok proti *Toxocara* spp. (Antolová *et al*. 2004, Reiterová *et al*. 2010, 2013).

Teriologický výskum má na Slovensku dlhodobú tradíciu, vo východnej časti územia položil základy faunistického prieskumu A. Mošanský (Mošanský 1957, 1981,

1993, 1995). Na teriologický výskum A. Mošanského nadviazalo vo výskume viacero teriológov, možno spomenúť významné práce Kratochvíla: Kratochvíl & Rosický 1953, 1954, Kratochvíl *et al*. 1959, Rosického: Rosický 1951, 1953, Rosický & Hanzák 1947, Rosický & Kratochvíl 1953, 1955, a Dudicha: Dudich 1983a,b, 1984a,b,c, 1985a,b, Dudich & Štolman 1983, 1986, Dudich *et al*. 1987, 2003 a mnohé ďalšie.

Podrobnejšie údaje k bionómii a ekológii sú uvedené vo viacerých monografických publikáciách podľa jednotlivých druhov hlodavcov a hmyzožravcov (Stanko 2014b, Anděra & Horáček 2005, Baláž & Ambros 2010, Baláž *et al*. 2012, 2013, Krištofík 2012a,b). V knižnej publikácii Cicavce Slovenska – rozšírenie, bionómia a ochrana od zostavovateľov Krištofík & Danko (2012) je sumarizovaný stav poznatkov o cicavcoch na Slovensku. Informácie o jednotlivých dominantných druhov hlodavcov sú uvedené v jednotlivých kapitolách knihy (Stanko 2012a,b, Krištofík 2012a,b).

V nasledujúcej časti preto iba v krátkosti uvádzam údaje o rozšírení a ektoparazitoch epidemiologicky významných druhov drobných cicavcov, ktoré sa vyznačovali dominantným zastúpením počas odchytov v rámci tejto štúdie. Ide o zaujímavé druhy hlodavcov z mnohých aspektov, najmä epidemiológie, keďže sú hostiteľmi viacerých skupín endo- a ektoparazitov a rezervoáre mnohých patogénov.

1.1.1. Rozšírenie epidemiologicky významných druhov drobných cicavcov na Slovensku a ich ektoparazity

1.1.1.1. *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771)

Areál rozšírenia ryšavky tmavopásej (*A. agrarius*) zahŕňa palearktickú a orientálnu oblasť. V rámci palearktickej oblasti sa hranica tiahne cez strednú a východnú Európu, z oblastí južného Fínska, pobaltských republík (Litva, Lotyšsko, Estónsko) a Dánska, prechádza stredom Nemecka a Čiech, severnou a centrálnou časťou Slovenska a Maďarska cez sever Talianska a západ balkánskeho polostrova až po jazero Bajkal, lokálne v Rakúsku. Hranica orientálnej oblasti prechádza cez územie južného Ruska, Kórei, Číny a Taiwanu (Gliwicz & Kryštufek 1999, Spitzenberger *et al*. 2001, Anděra & Horáček 2005).

Ryšavka tmavopása sa vyskytuje na 40,6 % rozlohy Slovenska a je rozšírená najmä vo východnej a centrálnej časti územia, avšak areál rozšírenia druhu sa v dôsledku jeho

migrácie posúva západným smerom (Gliwicz & Kryštufek 1999, Anděra & Horáček 2005, Stanko 2012a). Na severovýchode boli zaznamenané okrajové populácie v Pieninách a v Spišskej Magure, v centrálnej časti aj v Slovenskom raji (Stanko 2012a, 2014b). Výskyt druhu bol zaznamenaný aj v severnej časti územia (Tatry, Liptov, Orava, Kysuce) a v južnej časti (južná Karpatská oblasť nad Krupinskou planinou a Ipeľskou kotlinou). Výskyt ryšavky bol potvrdený aj na juhu Žitného ostrova, kde sa pravdepodobne druh dostal migráciou z Maďarska (Ambros *et al*. 2010, Baláž *et al*. 2012, 2013).

Výskyt ryšavky tmavopásej bol na území Slovenska zaznamenaný najmä v nížinách s rozpätím výskytu od 97 m n. m. (Mošanský & Stanko 2001) a kotlinách od 600 do 700 m n. m. (Kratochvíl & Rosický 1954, Mošanský 1957, Feriancová-Masárová & Hanák 1965, Dudich & Štollmann 1986), zriedkavo sa vyskytuje v horských oblastiach v 1070 m n. m. (Baláž *et al*. 2012), najvyšší zaznamenaný bod výskytu je z nadmorskej výšky 1550 metrov spod nezalesneného vrcholu Chlebu v Malej Fatre (Hanák & Mazák 1962). Ryšavka tmavopása sa vyskytuje najmä v otvorenej krajine, kde obýva polia, okraje menších lesov i porasty brehových krovín. S obľubou vyhľadáva vlhšie biotopy s bujnou vegetáciou, avšak lesným porastom sa vyhýba a dokáže sa adaptovať aj na synantropný spôsob života (Anděra & Horáček 2005, Baláž *et al*. 2013).

Z ektoparazitov ryšavky tmavopásej boli na Slovensku zaznamenané kliešte radu Ixodida čeľade Ixodidae: *Ixodes trianguliceps*, *I. ricinus*, *Ixodes apronophorus*, *Dermacentor reticulatus* a *Dermacentor marginatus*. Z roztočov radu Mesostigmata bolo zistených 15 druhov patriacich do siedmych rodov: *Androlaelaps*, *Eulaelaps*, *Haemogamasus, Hyperlaelaps*, *Laelaps*, *Myonyssus* a *Hirstionyssus*. Z radu Anoplura bolo na ryšavke tmavopásej zistených šesť druhov vší patriacich do dvoch rodov *Hoplopleura* a *Polyplax*. Z územia Slovenska bolo z radu Siphonaptera zaznamenaných 20 druhov patriacich do 12 rodov a troch čeľadí. Konkrétne ide o druhy bĺch z čeľade Hystrichopsyllidae: *Hystrichopsylla talpae*, *Hystrichopsylla orientalis*, *Rhadinopsylla integella*, *Rhadinopsylla mesoides*, *Ctenophtalmus bisoctodentatus*, *Ctenophthalmus agyrtes*, *Ctenophthalmus solutus*, *Ctenophthalmus assimilis*, *Ctenophthalmus uncinatus*, *Doratopsylla dasycnema*, *Palaeopsylla soricis*. Z čeľade Pulicidae bol na ryšavke tmavopásej zistený druh *Ctenocephalides felis*, z čeľade Leptopsylidae *Leptopsylla segnis*, *Peromyscopsylla silvatica*, *Peromyscopsylla bidentata* a z čeľade Ceratophyllidae druhy

Amalaraeus arvicolae, *Megabothris turbidus*, *Nosopsyllus fasciatus* a *Ceratophyllus sciurorum* (Fenďa *et al*. 2012c).

Z bakteriálnych patogénov bol u *A. agrarius* na Slovensku sérologickými a molekulárnymi metódami potvrdený výskyt *B. afzelli*, *A. phagocytophilum*, (Štefančíková *et al*. 2008), viacerých druhov rodu *Bartonella* (Karbowiak *et al*. 2009, Kraljik *et al*. 2016), *Candidatus* N. mikurensis (Blaňarová *et al*. 2016) a *Rickettsia helvetica* (Heglasová *et al.* 2018).

1.1.1.2. *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834)

Ryšavka žltohrdlá (*A. flavicollis*) je rozšírená v západnej časti palearktickej oblasti a Blízkom východe (Mitchell-Jones *et al*. 1999). Hranica výskytu druhu sa tiahne od severozápadného Španielska cez celú Európu až po Ural. Na severe zahŕňa južnú časť Britských ostrovov, Škandináviu (Görner & Hackethal 1988), pobaltské republiky (Balčiauskas *et al*. 1999) a severné oblasti Ruska. Na juhu zahŕňa severnú časť Španielska, Francúzsko, Taliansko, Balkán a ďalej na východ až po Kaukaz. Výskyt druhu bol zaznamenaný aj na niektorých ostrovoch v Jadranskom a Egejskom mori (Mitchell-Jones *et al*. 1999).

Na Slovensku ide o najväčší druh ryšavky, ktorý je súvisle rozšírený na celom území (82,6 % rozlohy Slovenska), od nížin (97 m n. m. z alúvia Bodrogu) (Mošanský 1986, Mošanský & Stanko 1998, 2001), až po vysokohorské oblasti Tatier (2016 m n. m.) (Hanzák & Rosický 1949, Stanko 2012b). Ryšavka žltohrdlá obýva široké spektrum biotopov, ale uprednostňuje listnaté a zmiešané lesy najmä s výskytom buka, duba a liesky. Obýva aj mokraďové biotopy a brehy vodných tokov, stanovištia s drevinovým porastom, väčším plochám a poliam sa vyhýba (Anděra & Horáček 2005, Stanko 2012b, Baláž *et al*. 2013).

Na Slovensku boli na ryšavke žltohrdlej zaznamenané kliešte *I. trianguliceps*, *I. ricinus*, *Haemaphysalis inermis*, *Haemaphysalis concinna*, *Haemaphysalis punctata*, *D. reticulatus* a *D. marginatus*. Z roztočov radu Mesostigmata bolo zistených 25 druhov patriacich do dvoch čeľadí a siedmych rodov: *Androlaelaps*, *Eulaelaps*, *Haemogamasus*, *Hyperlaelaps*, *Laelaps*, *Myonyssus*, *Hirstionyssus*. Z trombikúl (Trombidiformes, Trombiculidae) boli nájdené larvy 14 druhov patriacich do siedmich rodov: *Miyacarus*,

Aboriginesia, *Eutonella*, *Hirsutiella*, *Neotrombicula*, *Leptotrombidium* a *Cheladonta*. Z radu Anoplura bolo na *A. flavicollis* zistených päť druhov vší patriacich do rodov *Hoplopleura* a *Polyplax*. Na Slovensku boli z radu Siphonaptera na ryšavke žltohrdlej zistené blchy čeľade Hystrichopsyllidae: *H. talpae*, *H. orientalis*, *Stenoponia tripectinata*, *Atyphloceras nuperus*, *Rhadinopsylla pentacantha*, *R. integella*, *R. mesoides*, *Ctenophthalmus bisoctodentatus*, *C. agyrtes*, *C. solutus*, *C. assimilis*, *Ctenophthalmus congener*, *Ctenophthalmus obtusus*, C. *uncinatus*, *Ctenophthalmus orientalis*, *Doratopsylla dasycnema*, *Palaeopsylla soricis*, *Palaeopsylla kohauti* a *Palaeopsylla similis*. Z čeľade Leptopsyllidae boli zistené blchy *P. bidentata*, *P. silvatica*, *Peromyscopsylla fallax* a *Leptopsylla segnis*. Z čeľade Ceratophyllidae druhy *A. arvicolae*, *Amalaraeus penicilliger*, *Megabothris turbidus*, *N. fasciatus*, *C. sciurorum* a *Tarsopsylla octodecimdentata* (Fenďa *et al*. 2012d).

Ryšavka žltohrdlá je rezervoárovým hostiteľom pre spirochéty *B. afzelii* a *B. miyamotoi* (Burri *et al*. 2014). *B. miyamotoi* a borelie z komplexu *Borreliella* (*Borrelia*) *burgdorferi* s. l., konkrétne *B. afzelii*, *B. garinii* a *B. bavariensis* boli detegované v *A. flavicollis* aj na Slovensku (Hanincová *et al*. 2003, Hamšíková *et al*. 2017). Molekulárnymi metódami bola potvrdená prítomnosť *R. helvetica, R. monacenis* a *R. slovaca* (Minichová *et al*. 2017, Heglasová *et al.* 2018) a *Candidatus* N. mikurensis (Blaňarová *et al*. 2016). Druhy *A. agrarius* a *A. flavicollis* majú tendenciu sa počas zimných mesiacov sťahovať do blízkosti ľudských obydlí, čo môže viesť k prenosu zoonóz na človeka (Rosický & Kratochvíl 1953).

1.1.1.3. *Microtus arvalis* (Pallas, 1778)

Hraboš poľný (*M. arvalis*) je európsky endemit, rozšírený od pobrežia Atlantického oceánu vo Francúzsku po oblasti Ukrajiny a Ruska smerom na severovýchod od rieky Dneper s izolovanou populáciou na Pyrenejskom polostrove. Nevyskytuje sa na Islande, Britských ostrovoch (výnimku tvoria Orknejské ostrovy či Guernsey), v mediteránnej oblasti, na väčšine územia Škandinávie a v severnom Rusku (Mitchell-Jones *et al*. 1999, Anděra & Horáček 2005).

Hraboš poľný patrí na Slovensku k najhojnejším druhom drobných cicavcov vyskytujúci sa na 90,5 % rozlohy územia (Krištofík 2012a). Je rozšírený od nížin (100 m n.

m., NPR Tajba) (Mošanský & Stanko 1998) až po alpínske lúky (2100 m n. m., hrebeň Belianskych Tatier) (Kratochvíl & Pelikán 1955). V hojnom počte sa vyskytuje v otvorenej poľnohospodárskej krajine najmä na poliach, suchých spásaných lúkach a pastvinách nížinných oblastí (Pelikán 1955, Stanko 1994b, Anděra & Horáček 2005, Baláž *et al*. 2013).

Na našom území boli na hrabošovi poľnom zaznamenané kliešte *I. trianguliceps*, *I. ricinus* a *I. apronophorus, H. concinna*, *H. inermis*, *D. reticulatus* a *D. marginatus*. Z roztočov radu Mesostigmata bolo na Slovensku zistených 22 druhov patriacich do dvoch čeľadí a šiestich rodov: *Androlaelaps*, *Eulaelaps*, *Haemogamasus*, *Laelaps*, *Myonyssus*, *Hirstionyssus*. Z trombikúl (Trombidiformes, Trombiculidae) boli nájdené larvy 12 druhov patriacich do siedmych rodov: *Miyacarus*, *Aboriginesia*, *Eutonella*, *Hirsutiella*, *Neotrombicula*, *Leptotrombidium* a *Cheladonta*. Z radu Anoplura bolo u nás zistených päť druhov vší patriacich do rodov *Hoplopleura* a *Polyplax*. Z radu Siphonaptera boli na hrabošovi poľnom na území Slovenska zaznamenané druhy bĺch z čeľade Hystrichopsyllidae: *H. orientalis*, *R. integella*, *R. pentacantha*, a *D. dasycnema*, *P. soricis*, *C. bisoctodentatus*, *C. agyrtes*, *C. solutus*, *C. assimilis*, *C. congener*, *C. obtusus*, C. *uncinatus*. Z čeľade Pulicidae *C. felis* a z čeľade Leptopsyllidae boli zistené druhy *Leptopsylla segnis*, *P. bidentata*, *P. fallax*, *Amphipsylla rossica*. Z čeľade Ceratophyllidae druhy *A. penicilliger*, *A. arvicolae*, *M. turbidus* a *N. fasciatus* (Fenďa *et al*. 2012a).

V hrabošovi poľnom boli zaznamenané *R. helvetica* a zo spirochét bol potvrdený druh *B. miyamotoi* (Heglasová *et al.* 2018, 2020) a *B. afzelii* (Minichová *et al*. 2017).

1.1.1.4. *Myodes glareolus* (Schreber, 1780)

Hrdziak lesný (*M. glareolus*) je rozšírený v pásme lesov od Britských ostrovov cez Európu až po Bajkalské jazero. Druh sa vyskytuje od polárneho kruhu smerom na juh po severné Španielsko, Taliansko, Balkánsky polostrov, severné Grécko až po pohoria Sajan a Ťan Šan, severný Kazachstan a sever Malej Ázie (Mitchell-Jones *et al*. 1999, Spitzenberger *et al*. 2001). Hrdziak lesný je rozšírený aj na ostrovoch pri atlantickom a baltickom pobreží, nevyskytuje sa na ostrovoch v mediteránnej oblasti a na Islande (Mitchell-Jones *et al*. 1999).

Na území Slovenska je hojne rozšírený, obývajúci 86,5 % územia. Jeho výskyt bol

zaznamenaný v nížinách od nadmorskej výšky 97 metrov v NPR Tajba (Mošanský & Stanko 1998) až po alpínske pásmo Vysokých Tatier v nadmorskej výške 2000 metrov (Rosický & Kratochvíl 1955). Hrdziak lesný sa vyskytuje v rôznych typoch lesa najmä listnatom a zmiešanom s bohatým podrastom, ale vyskytovať sa môže aj v brehových porastoch, poľných remízkach, krovinách, parkoch a pod. (Anděra & Horáček 2005, Krištofík 2012b).

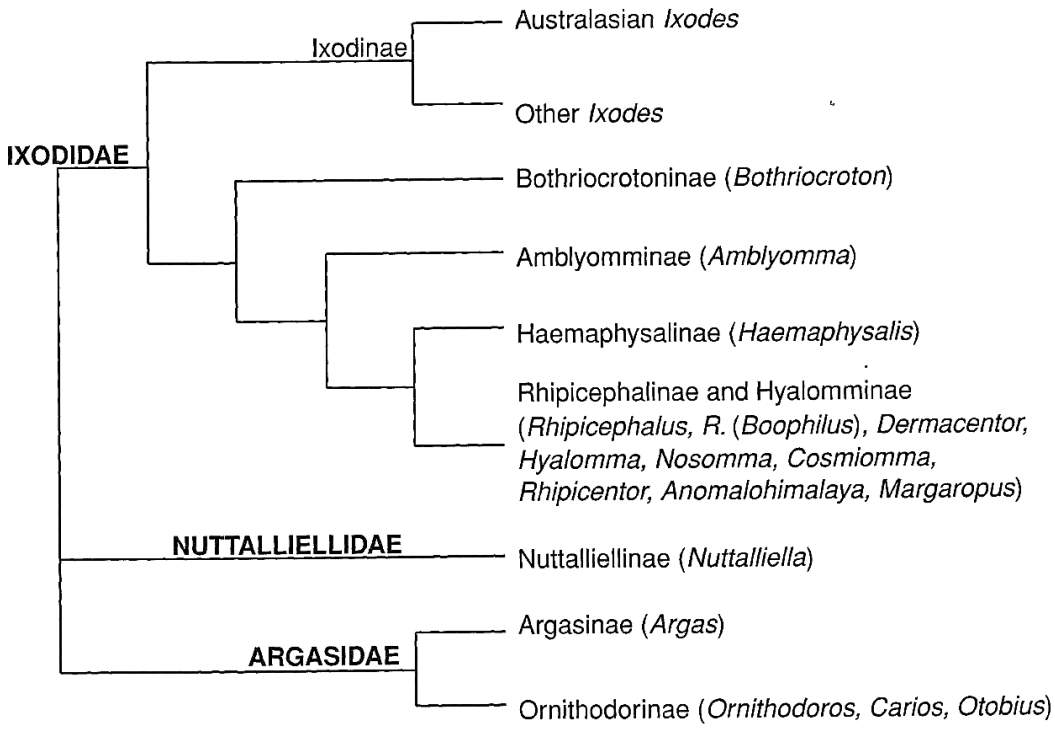
Na Slovensku boli na hrdziakovi lesnom zaznamenané kliešte *I. trianguliceps*, *I. ricinus*, *H. concinna*, *H. punctata*, *D. reticulatus* a *D. marginatus*. Z roztočov radu Mesostigmata bolo zistených 27 druhov patriacich do dvoch čeľadí a siedmich rodov: *Androlaelaps*, *Eulaelaps*, *Haemogamasus*, *Hyperlaelaps*, *Laelaps*, *Myonyssus*, *Hirstionyssus*. Z trombikúl (Trombidiformes, Trombiculidae) boli nájdené larvy 15 druhov patriacich do siedmych rodov: *Miyacarus*, *Aboriginesia*, *Hirsutiella*, *Neotrombicula*, *Leptotrombidium*, *Cheladonta* a *Kayella*. Z radu Anoplura bolo na *C. glareolus* zistených päť druhov vší patriacich do rodov *Hoplopleura* a *Polyplax*. Z radu Siphonaptera boli na hrdziakovi lesnom zaznamenané druhy bĺch z čeľade Hystrichopsyllidae: *H. talpae*, *H. orientalis*, *A. nuperus*, *R. pentacantha*, *R. integella*, *R. mesoides*, *Rhadinopsylla isacantha*, *C. bisoctodentatus*, *C. agyrtes*, *C. solutus*, *C. assimilis*, *C. congener*, *C. obtusus*, C. *uncinatus*, *D. dasycnema*, *P. soricis* a *P. similis*. Z čeľade Leptopsyllidae boli zistené blchy *P. bidentata*, *P. silvatica*, *P. fallax*, *A. rossica*, *Amphipsylla sibirica*. Z čeľade Ceratophyllidae druhy *A. arvicolae*, *A. penicilliger*, *M. turbidus*, *Megabothris rectangulatus*, *N. fasciatus*, *C. sciurorum* a *Ceratophyllus garei* (Fenďa *et al*. 2012b).

U hrdziaka lesného boli potvrdené *B. afzelii*, *B. miyamotoi* (Hanincová *et al*. 2003, Burri *et al*. 2014, Minichová *et al*. 2017), *Candidatus* N. mikurensis (Burri *et al*. 2014, Blaňarová *et al*. 2016) a *R. helvetica* (Heglasová *et al.* 2018).

1.2. Bionómia, ekológia a epidemiológia kliešťov (Ixodida)

Roztoče (Acari) sa delia na dve hlavné skupiny: Acariformes (nemajú stigmy) a Parasitiformes (zástupcovia majú stigmy). Kliešte patria do kmeňa článkonožce (Arthropoda), podkmeňa klepietkavce (Chelicerata), triedy pavúkovce (Arachnida), podtriedy roztoče a kliešte (Acarina), nadradu Parasitiformes, radu Ixodida (Metastigmata) (Sonenshine 1991, Volf *et al*. 2007, Barker & Murrell 2008). Do radu Ixodida sú zahrnuté tri čeľade: Ixodidae (kliešte s chitínovým štítkom tzv. „tvrdé" kliešte), Argasidae („mäkké" kliešte) a Nuttalliellidae monotypická čeľaď s jedným zástupcom *Nuttalliella namaqua* Bedford, 1931 (Guglielmone *et al*. 2010).

Systematika kliešťov bola v minulosti založená najmä na morfologických, biologických a ekologických charakteristikách (Hoogstraal & Aeachlimann 1982, Klompen & Oliver 1993, Filippova 1994). V práci Hoogstraal & Aeschlimann (1982) bola čeľaď Ixodidae rozdelená do dvoch skupín na základe niekoľkých morfologických znakov, vývinového cyklu a hostiteľskej špecificity na Prostriata s rodom *Ixodes* a podčeľaďou Ixodinae. Do Metastriata boli zahrnuté všetky ostatné rody, ktoré zahŕňajú štyri podčeľade: Amblyomminae, Haemaphysalinae, Hyalomminae a Rhipicephalinae. Avšak neskoršie morfologické a molekulárne analýzy jadrovej aj mitochondriálnej DNA nepodporili oddelenie Hyalominae od Rhipicephalinae (Barker & Murel 2004) (Obr. 1.). V súčasnosti rad Ixodida zahŕňa 900 platných druhov, čeľaď Ixodidae zahŕňa 713 druhov kliešťov, kde patria rody *Amblyomma* (143 druhov), *Anomalohimalaya* (3), *Bothriocroton* (3), *Cosmiomma* (1), *Cornupalpatum* (1), *Compluriscutula* (1) *Dermacentor* (36), *Haemaphysalis* (166), *Hyalomma* (24), *Ixodes* (249), *Margaropus* (3), *Nosomma* (2), *Rhipicentor* (2) a *Riphicephalus* (79). Čeľaď Argasidae zahŕňa 186 druhov patriacich do štyroch rodov: *Argas* (58 druhov), *Antricola* (3), *Carios* (88) a *Ornithodoros* (37). Čeľaď Nuttalliellidae zahŕňa jeden druh rodu *Nuttalliella* (Barker & Murrell 2008, Guglielmone *et al*. 2010, 2013). Kliešte (Ixodida, Metastigmata) sú obligátne hematofágne ektoparazity ľudí a zvierat. Zástupcovia jednotlivých čeľadí sa od seba odlišujú v štruktúre tela, životných cyklov a ich asociáciách s patogénmi (Mehlhorn 2001). Kliešte žijúce na našom území patria do čeľadí Argasidae s rodom *Argas* a Ixodidae s rodmi *Ixodes*, *Dermacentor* a *Haemaphysalis* (Černý 1972, Klompen *et al*. 1996, Barker & Murrell 2008, Guglielmone *et al*. 2010, 2013).



Obr. 1. Systematická klasifikácia Ixodidae (zdroj: Barker & Murel 2004).

Na Slovensku žije približne 20 druhov kliešťov, epidemiologicky významné pre človeka sú druhy: kliešť obyčajný *Ixodes ricinus* Linnaeus 1758, kliešť lužný *Haemaphysalis concinna* Koch 1844, kliešť stepný *Haemaphysalis punctata* Canestrini & Franzago, 1878, kliešť lesostepný *Haemaphysalis inermis* Birula, 1895, pijak lužný *Dermacentor reticulatus* Fabricius, 1794 a pijak stepný *Dermacentor marginatus* Sulzer, 1776 (Černý 1972, Řeháček *et al.* 1991, Guglielmone *et al.* 2010).

1.2.1. Životný cyklus a ekológia kliešťov

V ontogenéze ixodových kliešťov sú typické štyri vývinové štádiá: vajíčko, larva, nymfa a dospelý jedinec. Po každom nacicaní a strávení krvi nasleduje metamorfóza na vyššie štádium. Každé štádium cicia krv iba raz za život a môže ostať pricicané na tele hostiteľa niekoľko hodín až dní. Samice po nacicaní produkujú početnú znášku vajíčok (2500 až 4000) a potom hynú (Filippova 1977, Dusbábek 2002, Volf *et al.* 2007). Za

optimálnych podmienok sa približne po mesiaci z nakladených vajíčok liahnu larvy.

Podľa počtu hostiteľov, na ktorých kliešte čeľade Ixodidae cicajú môžu mať jedno-, dvoj- alebo troj-hostiteľský cyklus (Mehlhorn 2001). Vývin jednohostiteľských kliešťov od larvy až po dospelého jedinca prebieha iba na jednom hostiteľovi (niektoré druhy z rodov *Boophilus* sp., *Hyalomma* sp. a *Rhipicephalus* sp.). U dvojhostiteľských kliešťov larvy a nymfy cicajú a metamorfujú na jednom hostiteľovi a dospelé kliešte vyhľadávajú iného hostiteľa, na ktorom dokončujú vývin (*Hyalomma* spp., *Rhipicephalus* sp.). Väčšina ixodových kliešťov (*Ixodes* spp., *Haemaphysalis* spp., *Dermacentor* spp.) potrebuje k svojmu vývinu troch rôznych hostiteľov, celý vývinový cyklus trojhostiteľských kliešťov tak väčšinou trvá tri roky (Rosický & Weiser 1952, Volf *et al*. 2007). Toto striedanie hostiteľov je významné najmä z hľadiska prenosu rôznych patogénov (Hubálek 2000, Volf *et al*. 2007). Pre vznik a udržanie prirodzených ohnísk sú najvýznamnejšie druhy s trojhostiteľským cyklom, parazitujúce na zvieratách rôznych druhov (Rosický & Weiser 1952). Dôležitým limitujúcim faktorom pre všetky vývinové štádiá kliešťov je dostatok vhodných hostiteľov a optimálne faktory prostredia (Sonenshine 1991).

Jednotlivé druhy kliešťov sa vyznačujú rôznym stupňom hostiteľskej špecificity. Hniezdno-norové (nidikolné, endofilné) druhy sú úzko špecializované na svojich hostiteľov a žijú v ich blízkosti v norách, hniezdach, búdach, pôde, puklinách kôry stromov a pod. Ide o druhy *Ixodes vespertilionis* a *Ixodes simplex*, ktoré sú viazané na netopiere. *Ixodes lividus*, parazituje výlučne na brehuliach riečnych (*Riparia riparia* Linnaeus, 1758). Nidikolný druh kliešťa *I. trianguliceps* parazituje na drobných cicavcoch vo všetkých vývinových štádiách (Rosický & Černý 1954). Externé (exofilné) kliešte napádajú vo voľnej prírode široké spektrum hostiteľov a vyznačujú sa rôznou dennou a ročnou aktivitou. Oportunistický druh *I. ricinus* parazituje na širokom spektre hostiteľov, avšak jeho jednotlivé štádiá preferujú zväčša určité skupiny hostiteľov t. j. nedospelé štádiá parazitujú na drobných cicavcoch, plazoch, vtákoch, dospelé parazitujú na raticovej zveri a pod. (Černý 1972, Sonenshine 2003). Vývinové štádiá jednotlivých druhov kliešťov parazitujú na určitých miestach tela svojich hostiteľov. Larvy a nymfy druhu *I. ricinus* parazitujú zväčša na ušniciach, pysku a brade drobných cicavcov (Rosický & Černý 1954).

Na človeku môžu parazitovať všetky štádiá, najčastejšia sú však nachádzané cicajúce nymfy a samice. Rozmiestnenie číhajúcich kliešťov na vegetácii je závislé od typu preferovaného hostiteľa, ale aj od samotného druhu kliešťa. Larvy a nymfy striehnu na hostiteľov bližšie pri zemi v tráve alebo hrabanke. Dospelé štádiá číhajú na hostiteľov zväčša na vyššej vegetácii a kroch, keďže parazitujú na väčších zvieratách (Volf *et al.* 2007, Hubálek & Rudolf 2011, Majláth & Majláthová 2015). Exofilné druhy kliešťov sa vyznačujú sezónnou aktivitou, ktorá sa zvyšuje s nástupom teplejších a dlhších dní. Nepriaznivé podmienky prostredia prežívajú v kľudovom štádiu tzv. diapauze. Niektoré druhy kliešťov sú aktívne aj počas miernej zimy napr. dospelé jedince *H. inermis*, ktoré sú bežne aktívne od jesene do jari. Larvy a nymfy sú zasa aktívne v teplejšej časti roka. Počet kliešťov na vegetácii sa mení aj počas dňa v závislosti od sezóny, počasia – teploty a vlhkosti a dostupnosti hostiteľov (Nosek 1973). Kliešť obyčajný má počas sezóny v našich podmienkach dvojvrcholovú aktivitu v mesiacoch máj/jún a september/október. Veľmi teplé a suché letá kliešťom nevyhovujú a spôsobujú ich zvýšený úhyn. Dennú aktivitu kliešťov môžeme rozdeliť na jednovrcholovú, najmä v jarnom a jesennom období pri zvýšenej vlhkosti a dvojvrcholovú počas teplých a suchých letných mesiacov s prvým vrcholom skoro ráno pri relatívne väčšej vzdušnej vlhkosti (Chmela 1969, Peťko 2005, Gern 2009).

1.2.2. Kliešte (Ixodida) ako vektory patogénov

Kliešte patria medzi významné prenášače (vektory) rôznych pôvodcov ochorení ľudí domácich i hospodárskych zvierat. Vektor musí byť schopný biologického prenosu agens a patogén je v ňom schopný množenia (Süss 2003, Hubálek & Rudolf 2007). Niektoré druhy kliešťov môžu hostiteľa súčasne infikovať patogénmi rôznych skupín. Prenos patogénov z prenášača na hostiteľa je rozdielny v závislosti od samotného patogénu. Uvádza sa, že niektoré vírusy sú prenášané zo slinných žliaz kliešťa hneď po začatí cicania, iné druhy až po 24 hodinách.

Epidemiologický význam kliešťov ako prenášačov spočíva aj v transovariálnom prenose patogénov (z infikovanej samice na vajíčka) a transštadiálnom prenose (medzi jednotlivými vývinovými štádiami), čo v závislosti od druhu kliešťa môže trvať niekoľko mesiacov až rokov (Randolph 1998). Prenos niektorých patogénov medzi kliešťami môže

prebiehať aj počas ich kopulácie (Dumpis *et al*. 1999). Dlhú dobu bol známy iba viremický prenos vírusov medzi kliešťami. Avšak je možný aj prenos niektorých vírusov z nakazeného na nenakazeného kliešťa v priebehu cicania na rovnakom mieste tela hostiteľa aj bez systémovej infekcie hostiteľa, tzv. neviremický prenos (Labuda *et al*. 1993, Randolph *et al*. 1996, Dusbábek 2002, Gritsun *et al*. 2003). Pre mechanizmus pri ktorom sa neinfikovaný kliešť nakazí od infikovaného kliešťa pri spoločnom cicaní na hostiteľovi bol zavedený pojem co-feeding alebo saliva-activated transmission (Philip 1959, Gritsun *et al*. 2003, Hubálek & Rudolf 2007).

V posledných desaťročiach sú v Európe zaznamenané meniace sa klimatické (nárast priemernej teploty a zmena v rozložení zrážok), hospodárske (neobhospodarovanie ornej pôdy, zarastanie medzí, klčovanie lesov) a socioekonomické podmienky (zvýšená migrácia obyvateľstva, turizmus), s ktorými súvisia aj zmeny v rozširovaní kliešťov do nových oblastí a nárast incidencie ochorení prenášaných kliešťami. Klimatické zmeny majú vplyv na aktivitu kliešťov aj počas zimných mesiacov, na ich výskyt vo vyšších nadmorských výškach aj na šírenie kliešťov smerom na sever (Materna *et al*. 2008, Süss *et al*. 2008). Hoci bol v minulosti zaznamenaný sporadický výskyt kliešťov *I. ricinus* i vo vyšších nadmorských výškach (nad 1000 m n. m.) (Mačička 1955, Dyk 1957), v súčasnosti je pozorovaná v týchto oblastiach ich častejšia prítomnosť (Majláth & Majláthová 2015). V poslednom období bola zaznamená aj zmena areálu pijaka lužného *D. reticulatus* o najmenej 200 km smerom na sever územia Slovenska a posun o 300 metrov vyššie nad morom (Bullová *et al*. 2009). Vo Švédsku bol pozorovaný posun hranice výskytu *I. ricinus* smerom na sever, po období kedy sa začali prejavovať zmeny klímy (Gray *et al*. 2009). Na šírení kliešťov do nových oblastí sa podieľajú aj migrujúce vtáky, ktoré ich distribuujú nielen vnútri geograficky ohraničených územiach, ale aj medzi vzdialenými kontinentami (Mărcuţan *et al*. 2014).

Mení aj sezónna aktivita a abundancia rôznych druhov kliešťov na dlhodobo sledovaných lokalitách. Vplyvom týchto zmien sa do rôznych oblastí šíria kliešťami prenášaní pôvodcovia ochorení a vytvárajú sa tak nové ohniská nákaz (Peťko *et al*. 1996, Materna *et al*. 2005, Bullová *et al*. 2009, Lukáň *et al*. 2010, Jaenson *et al*. 2012). Takýmto prípadom je aj výskyt babeziózy psov na Slovensku od roku 2000, ktorá bola pôvodne rozšírená v stredomorí (Swan *et al*. 2001). Tento nový výskyt intracelulárneho

jednobunkového parazita červených krviniek súvisí so šírením kliešťov (vektorov) pijakov lužných *D. reticulatus* (Bullová *et al*. 2009). Nákaza sa ďalej šíri z južných okresov východného a západného Slovenska do severnejších oblastí (Majláthová *et al*. 2011). Pre tieto novo sa objavujúce choroby sa zaviedol termín „emerging diseases“, na určitom území sa objavia ako nové alebo opätovne s odstupom času. Počet novo sa objavujúcich kliešťami prenášaných ochorení rastie aj vďaka modernizácii a pokrokom v diagnostike na základe imunochemických a molekulárnych metód.

1.2.2.1. *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758)

Kliešť obyčajný *I. ricinus* (Ixodinae, Ixodidae) sa vyznačuje širokou ekologickou valenciou, ide o najrozšírenejší a najpočetnejší druh kliešťa nielen na Slovensku, ale aj v centrálnej Európe. Zároveň je aj medicínsky najvýznamnejším kliešťom z čeľade Ixodidae, keďže je vektorom rôznych vírusových, bakteriálnych a protozoárnych ochorení. Je rozšírený na juhu od Severnej Afriky po severný polárny kruh v Škandinávii a v celej západnej Európe vrátane Britských ostrovov, ďalej na východ po stredné Povolžie, Gruzínsko, Arménsko, Azerbajdžán, severný Irán, Turecko, hranica výskytu siaha až za pohorie Ural (Filippova 1977, Parola & Raoult 2001a). Na Slovensku je rozšírený na celom území, najmä v listnatých dubovohrabových a zmiešaných lesoch, hájoch, na lesných lúkach a pasienkoch, najčastejšie v nadmorskej výške do 600 až 800 metrov. V minulosti bol zaznamenaný výskyt aj vo vyšších nadmorských výškach od 1100 až 1300 m n. m. v Jesenníkoch a 1450 až 1600 m n. m. vo Vysokých Tatrách (Mačička 1955). Vo výške 600 až 1100 m n. m. bol zaznamenaný *I. ricinus* na jelenej a srnčej zveri z viacerých oblastí Šumavy, Krušných hôr, Magury, Beskýd a i. (Dyk 1957). I v súčasnosti sa uvádza jeho výskyt v polohách nad 1000 m n. m. Veľká Fatra – Smrekovica 1460 m n. n., Vysoké Tatry – Hrebienok – 1368 m n. n. (Majláth & Majláthová 2015). Najvyššie potvrdený výskyt kliešťov *I. ricinus* infikovaných vírusom kliešťovej encefalitídy bol zaznamenaný vo výške 1100 m n. m. (Danielová *et al*. 2008) a spirochétami *Borreliella* (*Borrelia*) *burgdorferi* s. l. vo výške nad 1000 m n. m. v Krkonošiach (Danielová *et al*. 2006). Rozsiahla štúdia o sezónnej dynamike kliešťa obyčajného bola publikovaná v práci Černý et al. (1965).

Kliešť obyčajný sa v prírode nevyskytuje rovnomerne, je pre neho skôr typická mozaikovitosť výskytu. Vyššia hustota je pozdĺž lesných chodníkov a ciest alebo okrajoch lesa, čo súvisí s vyššou frekvenciou pohybu potencionálnych hostiteľov. Kliešť obyčajný má široké spektrum hostiteľov. Larvy a nymfy napádajú živočíchy ako sú drobné cicavce (hlodavce, hmyzožravce), vtáky (napr. hniezdiace na zemi) aj plazy (jašterice). Dospelé jedince okrem uvedených živočíchov cicajú na väčších prežúvavcoch (dobytok, vysoká zver), domácich a divo žijúcich mačkovitých a psovitých šelmách, ďalej lasicovitých šelmách, zajacoch, medveďoch a pod. (Černý, 1972, Nosek *et al.* 1972, Hubálek 2000).

Ixodes ricinus je vektorom mnohých patogénov, nebezpečných pre človeka i zvieratá. Najčastejšie sú prenášané spirochéty spôsobujúce lymskú boreliózu z komplexu *Borreliella* (*Borrelia*) *burgdorferi* s. l. napr. *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. burgdorferi* s. s., ako aj *B. miyamotoi* patriaci do skupiny vyvolávajúcej návratné horúčky. Na niektorých lokalitách môže byť infikovaných okolo 50 % kliešťov (Burri *et al*. 2007, Subramanian *et al*. 2012, Vayssier-Taussat *et al*. 2015, Venczel *et al*. 2016). Kliešť obyčajný prenáša celé spektrum baktérií, rickettsií zo skupiny škvrnitých horúčok, napr. *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia monacensis* a ďalšie. Tiež je vektorom bartonel, napr. *Bartonella birtlesii* a *Bartonella hensellae*, ktorá je prenášaná najmä mačacím poškriabaním (Socolovschi *et al*. 2009, Reis *et al*. 2011, Sekeyová *et al*. 2012, Subramanian *et al*. 2012, Špitalská *et al*. 2014, Minichová *et al*. 2017). Ďalej sa podieľa na prenose *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis (Špitalská *et al*. 2006, 2008b, Jahfari *et al*. 2012, Lommano *et al*. 2012, Pangrácová *et al*. 2013, Blaňárová *et al*. 2016) a *A. phagocytophilum* pôvodcu granulocytárnej anaplazmózy (Nováková *et al*. 2010, Derdáková *et al*. 2011, Subramanian *et al*. 2012, Pangrácová *et al*. 2013, Víchová *et al*. 2014). Je príležitostným vektorom pre *Coxiella burnetii* (pôvodca Q-horúčky) a *Francisella tularensis* (pôvodca tularémie) (Vayssier-Taussat *et al*. 2015). *Ixodes ricinus* sa podieľa aj na prenose nebezpečného vírusu kliešťovej encefalitídy. Stredoeurópska kliešťová encefalitída sa v prírodnom ohnisku vyskytuje približne u 1–2 % infikovaných kliešťov (Grešíková 1999, Máderová 2005). Z jednobunkových parazitov prenáša *Babesia microti*, *B. venatorum* a *B. divergens*, *B. capreoli* nebezpečné i pre človeka (Duh *et al*. 2001, Øines *et al*. 2012).

1.2.2.2. *Ixodes trianguliceps* (Birula, 1895)

Kliešť myší *I. trianguliceps* z podrodu *Exopalpiger* Schulze, 1935 a rodu *Ixodes* (Ixodinae, Ixodidae) patrí do skupiny hniezdno-norových druhov neparazitujúcich na človeku. Areál výskytu *I. trianguliceps* je rozdelený na niekoľko od seba oddelených oblastí. Najväčšia časť areálu zaberá takmer celú Európu, od Írska a Veľkej Británie na juh po severné Španielsko, severné Taliansko, Slovinsko, Bulharsko a Ukrajinu. Nálezy boli opísané aj zo Škandinávie, Dánska a Fínska. Areál ďalej zasahuje za horný tok Jeniseja až po Bajkal. Dve samostatné oblasti výskytu na juhu tvoria pohoria Krymu a Kaukazu (Filippova 1977).

Kliešť myší je na rozdiel od kliešťa obyčajného viazaný na nižšiu teplotu a preferuje chladnejšie, tienisté a vlhkejšie biotopy s hrubou vrstvou lesnej hrabanky (Lichard 1965, Filippova 1977, Siuda 1993). Najčastejšie obýva ihličnaté a zmiešané lesy, ojedinele aj stepné biotopy (Lykov 1975). Má široký rozsah vertikálneho rozšírenia, jeho výskyt bol zaznamenaný v nížinnom pásme (Stanko 1996), ďalej v podhorských (600 – 900 m n. m.) a horských oblastiach až do výšky nad 2000 m. n. m. (Černý 1972, Tovornik 1988).

Druh je hostiteľsky špecifický a všetky jeho vývinové štádiá parazitujú na drobných cicavcoch. Larvy a nymfy parazitujú najmä na hmyzožravcoch rodu *Sorex*, ale nymfy spolu s dospelými jedincami aj na hlodavcoch rodov *Apodemus*, *Myodes*, *Microtus* (Peťko *et al*. 1991, Bown *et al*. 2003, 2006, Kovalevskii *et al*. 2013, Nefedova *et al*. 2013). Sezónna dynamika výskytu *I. trianguliceps* sa vyznačuje počas roka dvomi vrcholmi s jarným a jesenným maximom. V letných mesiacoch je výskyt ojedinelý. Samice sa objavujú na svojich hostiteľoch celoročne v nízkej početnosti najmä počas leta (Peťko *et al*. 1991, Stanko *et al*. 2007). Samce sa vyskytujú na hostiteľoch len sporadicky, najmä v čase kopulácie (Filippova 1977, Randolph 1980, Kovalevskii *et al.* 2013). Obdobia vrcholov závisia od geografickej polohy a sú odlišné na severe, juhu a východe areálu (Randolph 1975, Kovalevskii *et al.* 2013).

Ixodes trianguliceps patrí medzi epidemiologicky významné druhy kliešťov, keďže sa podieľa na udržiavaní vysokej hladiny infekcie v rezervoárových hostiteľoch (Mysterud *et al.* 2015). Druh je vektorom baktérie *F. tularensis* (Guryčová *et al.* 1982), *A. phagocytophilum* (Ogden *et al.* 1998, Bown *et al.* 2003, 2006, 2008, 2009, Blaňarová *et al.*

2014), spirochét *B. garinii* a *B. afzelii* (Kovalevskii *et al.* 2013) a podieľa sa aj na cirkulácii *Babesia microti* (Randolph 1995, Nefedova *et al.* 2013).

1.2.2.3. *Dermacentor marginatus* (Sulzer, 1776)

Pijak stepný - *D. marginatus* (Rhipicephalinae, Ixodidae) spolu s pijakom lužným *D. reticulatus* patri k naším najväčším druhom kliešťov, oba druhy sú polyfágne a trojhostiteľské. Druh je rozšírený od severozápadnej Afriky a juhozápadnej Európy cez Stredozemné more do oblastí južnej a strednej Európy vrátane južnej časti Slovenska, v niektorých oblastiach Poľska, ďalej v celej západnej Európe a na východe až po Čínu (Rubel *et al*. 2016). *Dermacentor marginatus* je rozšírený od nížin až do nadmorskej výšky 3500 m n. m. najmä v južných teplejších oblastiach. Najčastejšie obýva lesostepi, stepi, polopúšte, kde vyhľadáva vlhšie biotopy, doliny riek, na západe preniká do pásma lesov pozdĺž stepných oblastí. Na Slovensku sa vyskytuje najmä na otvorených biotopoch s dominantnou xerotermnou vegetáciou, na krajoch dubových lesov či spásaných alebo úhorom ležiacich pasienkoch (Nosek 1972).

Sezónna aktivita je u dospelých jedincov pijaka stepného dvojvrcholová, s jarným a jesenným maximom. Aktivita začína koncom zimy a trvá do začiatku mája s maximom v apríli. Jesenná aktivita trvá od septembra pokračuje približne do novembra v závislosti od vonkajších podmienok. Vývinové štádiá majú iba jednovrcholovú aktivitu v teplej časti roka. Larvy sú aktívne zväčša od polovice júna do polovice augusta a nymfy od júla do septembra. Dospelé jedince pijaka stepného sú aktívne po celý deň s maximom v podvečerných hodinách, denná aktivita vývinových štádií vrcholí po súmraku (Nosek 1972).

Dospelé jedince *D. marginatus* parazitujú najmä na hospodárskych a voľne žijúcich kopytníkoch. Nedospelé vývinové štádiá sú nidikolné, obývajú nory drobných cicavcov na ktorých parazitujú, menej napádajú vtáky, jašterice a veľké cicavce (Nosek 1972). Medicínsky význam pijaka stepného spočíva najmä v prenose viacerých druhov rickettsií napr. *R. conorii*, *R. helvetica*, *R. slovaca*, *R. sibirica, R. massiliae* a *R. raoulti* (Brezina *et al*. 1969, Řeháček *et al*. 1990, Smetanová *et al*. 2006, Špitalská *et al*. 2012, Hornok *et al*. 2013, Minichová *et al*. 2017). Z bakteriálnych patogénov prenáša pôvodcu tularémie *F. tularensis* (Hubálek *et al*. 1990), *Coxiella burnetii* a spirochét *Borreliella* (*Borrelia*)

burgdorferi (Špitalská & Kocianová 2003, Smetanová *et al*. 2006), zistená bola u kliešťa aj *B. afzelii* (Hornok *et al.* 2013). Ďalej sa podieľa na prenose niekoľkých vírusov napr. vírusu kliešťovej encefalitídy a vírusu Krymsko-Konžskej hemoragickej horúčky (Kožuch & Nosek 1971, Markeshin *et al*. 1992). Z jednobunkových parazitov sa podieľa na prenose *B. canis*, *B. ovis*, *B. equi*, *Babesia* sp. (Pietrobelli *et al*. 2007, Trotta *et al*. 2012).

1.2.2.4. *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794)

Pijak lužný - *D. reticulatus* (Rhipicephalinae, Ixodidae) je palearktický druh vyskytujúci sa v miernom klimatickom pásme od Španielska na západe po rieku Jenisej na východe a od úrovne južného Anglicka na severe po úroveň Rumunska na juhu. V niektorých oblastiach strednej Európy dominuje nad ostatnými druhmi (Švehlová *et al*. 2014, Mierzejewska *et al*. 2015, Rubel *et al*. 2014, 2016). Jeho výskyt sa viaže najmä na vlhšie oblasti v blízkosti stojatých či tečúcich vôd. Na našom území sa vyskytuje v povodí riek Dunaja a Moravy na západe a Latorice, Bodrogu a Tisy na východe. V súčasnosti areál jeho výskytu dosahuje do severnejších oblastí Slovenska, zaznamenaný bol aj pozdĺž Laborca až pod Vihorlatom (Bullová *et al*. 2009). *Dermacentor reticulatus* obýva najmä teplé a nížinné oblasti s vyššou vlhkosťou. Vyhľadáva krovinami a stromami zarastené údolia riek, potokov, podmáčané listnaté a zmiešané lesy, lužné lesy, vlhké lúky pasienky a pastviny s krovinami, vresoviská, lesné čistiny a pod. (Nosek 1972, Hubálek & Rudolf 2011).

Sezónna aktivita je u dospelých jedincov dvojvrcholová, s jarným a jesenným maximom. Maximum jarného vrcholu aktivity je v apríli, druhý vrchol aktivity je miernejší a väčšinou pripadá na október. Nymfy a larvy majú len jeden vrchol sezónnej aktivity, ktorý trvá od apríla do septembra. Larvy majú maximum v júli a nymfy v auguste, aktivita nýmf sa však môže predĺžiť až do októbra. Na rozdiel od kliešťa obyčajného trvá vývinový cyklus pijaka lužného iba jeden rok v prirodzených podmienkach (Nosek 1972, Hubálek & Rudolf 2007, Pfäffle *et al*. 2015). Dospelé jedince *D. reticulatus* parazitujú najmä na hospodárskych a voľne žijúcich kopytníkoch, divých sviniach, líškach, psoch, králikoch, zajacoch, ježoch a pod. Nedospelé vývinové štádiá sú nidikolné, obývajú nory drobných cicavcov na ktorých parazitujú, menej napádajú vtáky, jašterice a veľké cicavce (Arthur 1960, Nosek 1972, Földvári & Farkas 2005, Földvári *et al*. 2007, 2016, Pfäffle *et al*. 2015).

Dermacentor reticulatus prenáša viaceré druhy rickettsií (*R. helvetica*, *R. monacensis*, *R. slovaca*, *R. raoultii*, *R. sibirica*), anaplazmy (*A. phagocytophilum*), *F. tularensis*, *C. burnetii* (Jongejan & Uilenberg 2004, Anderson & Magnarelli 2008, Dobec *et al*. 2009, Špitalská *et al*. 2012, Karbowiak *et al*. 2014). Podieľa sa na prenose vírusu kliešťovej encefalitídy (Hubálek & Rudolf 2011). Z jednobunkových parazitov sa podieľa na prenose *B. c. canis, B. venatorum* a *B. caballi* (Duh *et al*. 2006, Majláthová *et al*. 2011, Karbowiak *et al*. 2014, Švehlová *et al*. 2014, Jongejan *et al*. 2015).

1.2.2.5. *Haemaphysalis concinna* (Koch, 1844)

Kliešť lužný (Haemaphysalinae, Ixodidae) je euroázijský druh, ktorého geografické rozšírenie zahŕňa strednú Európu od Francúzka na západe po pohorie Ural a od Stredozemného mora po sever Poľska a Bieloruska. Vyskytuje sa aj vo východnej a juhovýchodnej Ázii, Číne a Japonsku. Na Slovensku sa druh vyskytuje v južnejších oblastiach a jeho teplotné a zrážkové nároky sú podobné ako u druhu *H. inermis*, hoci oba druhy čiastočne preferujú odlišné nároky na habitáty (Nosek 1971, Filippova 1997, Siuda *et al.* 2006, Sun *et al.* 2006, Švehlová *et al.* 2014). Kliešť lužný sa môže vyskytovať v rôznych biotopoch vrátane listnatých a zmiešaných lesoch s bohatým podrastom, vlhkých stepných habitátoch, okolí jazier, povodí riek a v pobrežnej vegetácii (Nosek *et al.* 1967, Nosek 1971, Filippova 1997).

Všetky vývinové štádia môžu byť aktívne počas celého roka, ale vrchol aktivity a jej trvanie varíruje v závislosti od regiónu a mikroklimatických podmienok. Vo všeobecnosti sú dospelé kliešte aktívne od apríla do októbra/novembra, nymfy od polovice apríla do októbra a larvy od konca mája do novembra (Nosek *et al.* 1967, Nosek 1971, Barandika *et al.* 2008). Ide o trojhostiteľský druh, ktorého larvy a nymfy parazitujú na širokom spektre hostiteľov zahŕňajúc mnoho druhov drobných cicavcov, vtákov, ale aj plazov. Dospelé kliešte môžu infestovať domáce a voľne žijúce kopytníky, mäsožravce alebo stredne veľké hmyzožravce (Nosek *et al.* 1967, Nosek 1971, Filippova 1997).

Haemaphysalis concinna môže byť vektorom viacerých vírusov, vrátane vírusu kliešťovej encefalitídy (Kožuch & Nosek 1980), môže byť spájaný s vírusom Krymsko-konžskej hemoragickej horúčky (Tekin *et al.* 2012) a Omskej hemoragickej horúčky (Hubálek *et al.* 1989). Taktiež je vektorom širokého spektra rickettsií, vrátane *R.*

heilongjiangensis, *R. sibirica*, *R. helvetica*, *R. raoultii* (Shpynov *et al.* 2006, Heglasová nepubl. údaje) a baktérii *A. phagocytophilum*, *C. burnetii* a *F. tularensis* (Řeháček *et al.* 1991, Guryčová *et al.* 1995, Rybářová & Široký 2017). V kliešťovi lužnom boli zistené aj baktérie z komplexu *B. burgdorferi* s. l., avšak nie je zrejme či sa podieľa aj na ich prenose (Rigó *et al.* 2011).

1.2.2.6. *Haemaphysalis inermis* (Birula, 1895)

Kliešť lesostepný (Haemaphysalinae, Ixodidae) patrí na Slovensku medzi najbežnejšie druhy kliešťov rodu *Haemaphysalis.* Vyskytuje sa v severozápadnej oblasti Malej Ázie, Zakaukazka a v severnom Iráne. V Európe je rozšírený v celej západnej a strednej časti územia od Španielska až na juh po takmer celý Balkánsky polostrov a Turecko (Manilla 1998, Hornok & Farkas 2009). Na Slovensku je rozšírený v južnejších oblastiach s miernou zimou na vlhkých lokalitách s listnatými prípadne zmiešanými lesmi a preferuje tiež lesostepné spoločenstvá (Mačička 1958, Černý 1972, Nosek 1973).

Sezónna aktivita je u dospelých jedincov jednovrcholová od októbra do mája a kliešte môžu byť aktívne počas celého dňa. Vývinové štádiá sú aktívne od júna do septembra najmä ráno a neskôr večer po ústupe vlhkosti (Nosek *et al.* 1981). Ide o trojhostiteľský exofilný druh kliešťa, ktorého vývinové štádia parazitujú na širokom spektre hostiteľov ako sú drobné cicavce, plazy alebo vtáky. Dospelé jedince môžu parazitovať na domácich a voľne žijúcich kopytníkoch, šelmách ale aj na človeku (Nosek *et al.* 1972, Manilla 1998).

Haemaphysalis inermis je vektorom vírusu kliešťovej encefalitídy (Nosek *et al.* 1981), podieľa sa aj na prenose viacerých druhov rickettsií (*R. aeschlimannii*, *R. helvetica*) (Portillo *et al.* 2008, Hornok *et al.* 2010). U kliešťa lesostepného bola na Slovensku zistená *B. miyamotoi* zo skupiny návratných horúčok (Heglasová *et al.* 2020) a pôvodca Q horúčky *C. burnetii* (Řeháček *et al.* 1991). Z jednobunkových parazitov boli zistené *Babesia crassa* a *Babesia bigemina* (Hornok *et al.* 2015, García-Sanmartín *et al.* 2008).

Obr. 2. a 3. Biotop šiestich opísaných druhov kliešťov (Slovenský kras, Hrhov), pri ktorých literárne zdroje uvádzajú čiastočne odlišnú habitátovú preferenciu.

1.3. Bionómia, ekológia a epidemiológia bĺch (Siphonaptera)

Blchy (Siphonaptera) patria do kmeňa Arthropoda, podkmeňa Hexapoda a triedy Insecta. Ide o sekundárne bezkrídly hmyz s dokonalou premenou (holometabola), v dospelosti žijúci výlučne parazitickým spôsobom života (endo- alebo ektoparazitické). Blchy sa vyskytujú na všetkých kontinentoch a na väčšine ostrovov vrátane Antarktídy a obývajú širokú škálu biotopov púštnych, tropických i polárnych (Whiting 2002, Krasnov 2008, Whiting *et al*. 2008). Väčšina druhov bĺch parazituje na cicavcoch, na vtáky sa špecializovali iba zástupcovia z piatich čeľadí. Do radu Siphonaptera patrí okolo 2500 opísaných druhov, patriacich do 16 čeľadí a 246 rodov (Whiting *et al*. 2008). Fauna bĺch palearktickej oblasti má najväčšiu diverzitu, zahŕňajúcu 96 rodov a 892 druhov, ktoré tvoria 38 % z celkového počtu známych druhov a 38 % zo známych rodov. Najväčší počet endemických rodov sa nachádza v neotropickej (31) a 15 v austrálskej oblasti (Medvedev 2016). Na Slovensku bolo doposiaľ zaznamenaným približne 75 druhov bĺch (Rosický 1957, Cyprich & Krumpál 2006, Cyprich *et al.* 2006, Cyprich & Lukáš 2006, Plachý 2012). Vo východnej časti územia bolo potvrdených 24 druhov bĺch z drobných cicavcoch (Rosický 1957, Stanko 1987, 1988, 1994a, Stanko *et al*. 2002, 2006).

Larva blchy má tri vývinové štádiá a žije v norách alebo hniezdach, kde sa živí organickým odpadom. Dospelé blchy cicajú krv svojich hostiteľov cicavcov (90 % druhov) a vtákov (10 %). Na svojho hostiteľa nie sú tak úzko viazané ako napr. vši, a preto môžu prechádzať z jedného hostiteľského druhu na iný. Taktiež sú blchy schopné dlhodobo prežívať bez hostiteľa napr. v búdkach alebo dutinách vtákov. Bližšie údaje o bionómii a ekológii bĺch sú podrobne opísané v mnohých prácach (Rosický 1957, Volf *et al.* 2007, Krasnov 2008).

1.3.1. Blchy ako vektory patogénov

Blchy môžu pri cicaní krvi spôsobovať svojím hostiteľom anémie, svrbenie, kožné vyrážky, alergie a zmeny v správaní, pri masívnom rozmnožení môže dôjsť až k úhynu. Spôsobujú aj nepriame ekonomické škody pre človeka parazitovaním na hydine a dobytku. Príkladom je blcha *Ceratophyllus gallinae* parazitujúca na hydine, ale aj voľne žijúcich vtákoch a bežne sa vyskytuje aj v ich hniezdach (Dryden & Blakemore 1989, Cyprich *et al*. 2006, Krasnov 2008). Blchy majú negatívny vplyv aj na telesnú hmotnosť, dĺžku tela,

hematokrit, oxidačný stres, humorálnu imunitnú odpoveď a celkový fitness drobných cicavcov (Krasnov 2008). Krasnov (2008) sumarizoval práce mnohých autorov, ktoré sú zamerané na blchy ako vektory vírusových, rickettsiálnych, bakteriálnych ochorení, protozoárnych a medzihostitelia viacerých druhov helmintov. U ľudí parazitujú najmä zástupcovia dvoch rodov *Pulex* a *Ctenocephalides* (Volf *et al*. 2007).

Najznámejším bakteriálnym ochorením prenášaným približne 250 druhmi bĺch je mor vyvolaný baktériou *Yersinia pestis* (Gage & Kosoy 2005). Najčastejším vektorom baktérie sú niektoré blchy rodu *Xenopsylla* napr. blcha morová *Xenopsylla cheopis* (Sherman 2003, Krasnov *et al*. 2006, Konopásek 2014). Blchy sú dôležité pri udržiavaní a prenose niekoľkých ďalších patogénov, baktérií napr. *Bartonella henselae*, spôsobujúcej chorobu z mačacieho škrabnutia (cat scratch dissease) a iných druhov bartonel (Marie *et al*. 2006, Morick *et al*. 2009, 2010, Brinkerhoff *et al*. 2010). *Ctenocephalides canis* blcha psia a *Ctenocephalides felis* blcha mačacia sú významné pri šírení rickettsií, prenášajú pôvodcu endemického škvrnitého týfusu (*Murine typhus*), baktériu *Rickettsia typhi* zo skupiny vyvolávajúcej týfus (TG) (Parola & Raoult 2006), ktorá bola detegovaná ešte v ďalších dvanástich druhov z rodov *Ctenocephalides*, *Ctenophthalmus*, *Echidnophaga*, *Leptopsylla, Monopsyllus*, *Nosopsyllus*, *Pulex*, *Rhadinopsylla* a *Xenopsylla* (Merhej *et al*. 2014). Na východnom Slovensku bolo analyzovaných na prítomnosť *B. miyamotoi* 279 bĺch 9 druhov odobratých z drobných cicavcov. Doposiaľ získané výsledky nepotvrdili borreliu v blchách čo naznačuje, že blchy nie sú dôležité v prenose a udržiavaní *B. miyamotoi* v prírodných ohniskách (Heglasová *et al.* 2020).

Blchy sú primárne vektory a hlodavce rezervoáre endemického škvrnitého týfusu (Parola *et al*. 2005, Parola & Raoult 2006). V blchách bol zaznamenaný transovariálny prenos *R. typhi* a u *Rickettsia felis* aj tranštadiálny, majú teda význam nielen ako vektory, ale aj rezervoáre rickettsií (Adams *et al.* 1990, Azad *et al.* 1992, Farhang-Azad *et al*. 1985, 1997). Ďalšie druhy rickettsií *R. felis, R. helvetica* boli identifikované v blchách *C. felis*, *C. canis*, *Ctenophthalmus solutus*, *Pulex irritans*, *Archaeopsylla erinacei* a *Anomiopsyllus nudatus*, *Ctenophthalmus agyrtes* a *C. uncinatus* zozbieraných najmä z drobných cicavcov a ďalších voľne žijúcich i domácich zvierat (Parola *et al*. 2005, Stevenson *et al*. 2005, Bitam *et al*. 2006, Parola & Raoult 2006, Merhej *et al*. 2014, Špitalská *et al*. 2015, Heglasová *et al.* 2018). Blchy sa ďalej podieľajú aj na šírení protozoárnych pôvodcov ako

napr. *Trypanosoma lewisi* spôsobujúcu trypanozomózu potkanov zistenú v blche *Nosopsyllus fasciatus*. Blchy *C. felis* a *C. canis* sú medzihostiteľmi pásomnice *Dipylidium caninum*, *Hymenolepis diminuta* a *Hymenolepis nana* (Hinaidy 1991, Thomas 1996). V blchách odobratých z voľne žijúcich zvierat boli zaznamenané aj vírusy ako napr. vírus kliešťovej encefalitídy (TBE), avšak samotná detekcia vírusu v blchách neznamená, že sú schopné vírus aj prenášať (Naumov & Guttova 1984, Krasnov 2008).

1.4. Charakteristika vybraných pôvodcov zoonóz prenášaných článkonožcami

1.4.1. *Borrelia*

Zástupcovia rodu *Borrelia* sú gram-negatívne dlhé, tenké spirochéty charakteristické špirálovito vinutým tvarom bunky s pravidelnými závitmi. Pohybujú sa rotáciou okolo pozdĺžnej osy či zmršťovaním a naťahovaním. Pohyb je umožnený bičíkmi, ktoré vybiehajú medzi oboma koncami bunky z bazálnych diskov uložených v cytoplazmatickej membráne (Hulínská 2006). Borélie sa delia priečnym alebo pozdĺžnym delením približne každých 12 hodín (Barbour & Hayes 1986). Pri nepriaznivých podmienkach k rastu (prítomnosť antibiotík, protilátok, zmena pH, prebytok metabolitov) sa borélie menia z helikálnej formy na guľovitú (cystu) (Brorson & Brorson 1998). Ide o formy so zníženou metabolickou aktivitou, ktoré sú väčšinou schopné reverzie v plne metabolicky aktívnu špirálovitú formu (Miklossy *et al*. 2008).

Systematicky sú radené do kmeňa Spirochaetes, triedy Spirochaetes, radu Spirochaetales a čeľade Spirochaetaceae (Sedláček 2007). Rod *Borellia* je ďalej rozdelený na dve skupiny. Do prvej skupiny patria spirochéty vyvolávajúce tzv. návratné horúčky (relapsing fever – RF), vyznačujúce sa opakujúcimi sa horúčkami. Patria tu druhy *B. baltazardii, B. caucasica, B. crocidurae, B. duttonii, B. graingeri, B. harveyi, B. hispanica, B. latyschewii, B. persica, B. recurrentis, B. tillae, B. brasiliensis, B. coriaceae, B. dugesii, B. hermsii, B. mazzottii, B. parkeri, B. turicatae, B. venezuelensis, B. anserina, B. theileri* a aj na Slovensku vyskytujúci sa druh *B. miyamotoi* (Adeolu & Gupta 2014, Talagrand-Reboul *et al.* 2018). Hlavnými vektormi väčšiny uvedených zástupcov sú najmä kliešte rodu *Ornithodoros* spp. (Argasidae). Niektoré druhy spirochét ako *B. miyamotoi, B. theileri* a *B. lonestari* sú penášané tzv. tvrdými kliešťami rodov *Ixodes* spp., *Rhipicephalus*

spp. alebo *Amblyomma* spp. (Barbour & Hayes 1986, Subramanian *et al*. 2012, Venczel *et al*. 2016, Hamšíková *et al*. 2017, Talagrand-Reboul *et al.* 2018). *Borrelia miyamotoi* je prenášaná najmenej šiestimi druhmi kliešťov rodu *Ixodes* (*I. ovatus*, *I. pacificus*, *I. pavlovskyi*, *I. persulcatus I. ricinus*, *I. scapularis*) (Krause *et al*. 2015). Druh *B. recurrentis* je prenášaný ektoparazitmi dokonca z inej skupiny patriacej do triedy Insecta, a to všou *Pediculus humanus* (Felsenfeld 1965).

Druhú skupinu tvoria spirochéty z komplexu *Borreliella* (*Borrelia*) *burgdorferi* s. l. vyvolávajúce lymskú boreliózu. Doposiaľ bolo v skupine *Borreliella* (*Borrelia*) *burgdorferi* s. l. opísaných najmenej 20 genospecies, ktoré sa vzájomne líšia genotypom alebo fenotypom. Do komplexu B. burgdorferi sensu lato patria: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia spielmanii*, *Borrelia bissetti*, *Borrelia valaisiana*, *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia japonica*, *Borrelia tanukii*, *Borrelia turdi*, *Borrelia sinica*, *Borrelia andersonii*, *Borrelia californiensis* a nedávno opísané *Borrelia yangtze*, *Borrelia americana*, *Borrelia carolinensis*, *Borrelia bavariensis*, *Borrelia kurtenbachii*, *Borrelia finlandensis*, *Borrelia chilensis* (Kawabata *et al.* 1993, Wang *et al.* 1997, Derdáková *et al.* 2003, Rudenko *et al.* 2009a,b, Margos *et al.* 2011, Rudenko *et al.* 2011, Jacquot *et al.* 2014, Wang *et al.* 2014). V Európe sa vyskytujú druhy *B. afzelii*, *B. bavariensis*, *B. bissetti*, *B. burgdorferi* s. s., *B. finlandensis*, *B. garinii*, *B. lusitaniae*, *B. spielmanii* a *B. valaisiana* (Obiegala *et al.* 2017). Na Slovensku boli zaznamenané *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana, B. burgdorferi* s. s., *B. lusitaniae*, *B. spielmanii* a *B. bavariensis* (Subramanian *et al.* 2012, Tarageľová *et al.* 2016, Chvostáč *et al.* 2018).

Do prenosu spirochét z komplexu *B. burgdorferi* s. l. môže byť zahrnutých viac než 18 druhov kliešťov z rodu *Ixodes* a viac ako 300 stavovcov (Coipan & Sprong 2016). Geografické rozšírenie zástupcov komplexu *Borreliella* (*Borrelia*) *burgdorferi* s. l. súvisí s výskytom ich hlavných vektorov kliešťov z čeľade Ixodidae (Gray *et al*. 2002). *Ixodes ricinus* je najrozšírenejším a zároveň najvýznamnejším vektorom *B. burgdorferi* s. l. v Európe (Gern & Humair 2002). Medzi ďalšie druhy kliešťov schopné prenosu *Borreliella* (*Borrelia*) *burgdorferi* s. l. v Európe patria *I. hexagonus* (Toutoungi & Gern 1993), *I. frontalis* (Estrada-Peña *et al*. 1995) a *I. trianguliceps* (Gorelova *et al*. 1996), *Ixodes uriae* (Olsén *et al.* 1993). Vo východnej Európe a Ázii patria *I. persulcatus* a *I.*

ricinus medzi najvýznamnejšie prenášače, na západe Severnej Ameriky ide o druh *I. pacificus* a na východe Severnej Ameriky *I. scapularis* (Lane *et al*. 1991, Rosa *et al*. 2005). Borélie boli zistené aj v kliešťoch z iných rodov (*Dermacentor*, *Haemaphysalis*), ale či sú schopné prenosu patogéna na hostiteľa nie je dokázané (Chu *et al*. 2008, Hornok *et al.* 2013). Borélie boli izolované aj z viacerých druhov roztočov, bĺch (Pokorný 1989, Hubálek *et al*. 1998), z múch (Pokorný 1989, Magnarelli & Anderson 1988) aj z komárov (Hubálek *et al*. 1998, Halouzka *et al*. 1999, Žákovská *et al*. 2006).

Podľa infekčného potenciálu spirochét z komplexu *Borreliella* (*Borrelia*) *burgdorferi* s. l. ich možno rozdeliť do troch podskupín. Do prvej sú radené borélie, ktoré u človeka spôsobujú lymskú boreliózu (napr. *B. afzelii* vyvolávajúca kožné prejavy, *B. garinii* neurologické prejavy, *B. burgdorferi* sensu stricto je najčastejšie spájaná s kĺbovými ťažkosťami). Charakteristická kožná lézia *erythema migrans* môže byť prítomná pri infekcii všetkými troma druhmi a ich hlavným vektorom je *I. ricinus* (Lünemann *et al*. 2001, Brouqi *et al*. 2004, Baranton & De Martino 2009). Do druhej skupiny patria borélie, ktoré majú pre človeka infekčný potenciál, ale je málo doložených prípadov ochorenia vyvolaného týmito druhmi (napr. potenciálny patogén *B. spielmanii* a *B. valaisiana*) (Wang *et al*. 1997, Richter *et al*. 2006). Do poslednej patria druhy, ktoré neboli nikdy v pacientoch nájdené ani z nich izolované (druhy s neznámou patogenitou pre človeka *B. americana*, *B. caroliniensis*) (Rudenko *et al*. 2009a, b).

Geografické rozšírenie zástupcov komplexu *Borreliella* (*Borrelia*) *burgdorferi* s. l. súvisí s výskytom ich hlavných vektorov kliešťov z čeľade Ixodidae (Gray *et al*. 2002). Medzi druhy kliešťov schopné prenosu *Borreliella* (*Borrelia*) *burgdorferi* s. l. v Európe patria *I. ricinus*, *I. hexagonus* (Toutoungi & Gern 1993), *I. frontalis* (Estrada-Peña *et al*. 1995) a *I. trianguliceps* (Gorelova *et al*. 1996). Vo východnej Európe a Ázii patria *I. persulcatus* a *I. ricinus* medzi najvýznamnejšie prenášače, na západe Severnej Ameriky ide o druh *I. pacificus* a na východe Severnej Ameriky *I. scapularis* (Lane *et al*. 1991, Rosa *et al*. 2005). Borélie boli izolované aj z viacerých druhov roztočov, bĺch (Pokorný 1989, Hubálek *et al*. 1998), z múch (Pokorný 1989, Magnarelli & Anderson 1988) aj z komárov (Hubálek *et al*. 1998, Halouzka *et al*. 1999, Žákovská *et al*. 2006). Na detekciu borelií sú najčastejšie amplifikované gény ospA a ospC, *glpQ, 16S rRNA,* gén kódujúci flagelín, p66, ribozomálne intergénové regióny rrs(16S)-rrlA(23S) a rrf(5S)-rrl(23S) a mnoho ďalších

lokusov lokalizovaných buď na chromozóme, alebo na plazmidoch (Schmidt 1997, Fomenko *et al*. 2011, Platonov *et al*. 2011).

1.4.1.1. *Borrelia miyamotoi*

Borrelia miyamotoi patrí do skupiny borélií spôsobujúcich návratnú horúčku (tick-borne relapsing fever, TBRF). Z tejto skupiny ide o jediný známy druh, ktorý je prenášaný kliešťami rodu *Ixodes*. *Borrelia miyamotoi* je schopná transovariálneho a transštadiálneho prežitia v kliešťoch čo jej napomáha k udržiavaniu a šíreniu v prostredí. U borélie bola preukázaná aj schopnosť prenosu pomocou co-feedingu (Scoles *et al.* 2001, Barbour *et al*. 2009). Prvýkrát bola *B. miyamotoi* izolovaná v roku 1994 z kliešťov *I. persulcatus*, ktoré sú považované za najdôležitejších vektorov lymskej boreliózy v Japonsku (Fukunaga *et al*. 1995). *Borrelia miyamotoi* je reprezentovaná tromi geograficky oddelenými genotypmi. Európsky genotyp je spájaný s kliešťami druhu *I. ricinus* (Fraenkel *et al.* 2002, Richter *et al.* 2003, Subramanian *et al.* 2012, Burri *et al.* 2014, Cochez *et al.* 2015, Nunes *et al.* 2015, Szekeres *et al.* 2015, Kalmár *et al.* 2016, Potkonjak *et al.* 2016, Venczel *et al.* 2016, Wagemakers *et al.* 2017, Vaculová *et al.* 2019). Americký genotyp je spájaný s kliešťami *Ixodes scapularis, I. pacificus* a *I. dentatus* (Scoles *et al.* 2001, Mun *et al.* 2006, Hamer *et al.* 2012, Crowder *et al.* 2014). Sibírsky (alebo Ázijský) genotyp je asociovaný s kliešťami *Ixodes persulcatus I. ovatus* a *I. pavlovskyi* (Fukunaga *et al.* 1995, Korotkov *et al.* 2008, Fomenko *et al.* 2010, Borgoiakov *et al.* 2011, Geller *et al.* 2012, Takano *et al.* 2014, Khasnatinov *et al.* 2016, Rar *et al.* 2017). Okrem kliešťov rodu *Ixodes* bola *B. miyamotoi* zaznamenaná aj v kliešťoch *H. concinna* (Jiang *et al.* 2018) a *Haemaphysalis longicornis* v Ázijskom regionóne (Yang *et al.* 2018). Avšak či sú tieto druhy kliešťov schopné prenášať *B. miyamotoi* na hostiteľov zostáva nejasné (Cutler *et al.* 2019).

V Európe bola spirochéta prvýkrát zaznamenaná v roku 2002 vo Švédsku v kliešťovi *I. ricinus* (Fraenkel *et al*. 2002), neskôr aj vo Francúzku, Nemecku, Česku (Richter *et al*. 2003), Belgicku a Holandsku (Cochez *et al*. 2015, Wagemakers *et al*. 2017), Švajčiarsku (Burri *et al*. 2014), Portugalsku (Nunes *et al*. 2015), Maďarsku (Szekeres *et al*. 2015), Rumunsku (Kalmár *et al*. 2016) a Srbsku (Potkonjak *et al*. 2016). Prevalencia *B. miyamotoi* v *I. ricinus* sa v rámci Európy pohybuje od 0 do 5,4 % (Reiter *et al.* 2015, Siński *et al.* 2016, Venczel *et al.* 2016, Hamšíková *et al.* 2017). V Európe bola v roku 2019

prvýkrát zaznamenaná *B. miyamotoi* aj v kliešťovi *H. inermis*. *Borrelia miyamotoi* by sa tak v rámci Európy mohla vyskytovať nielen v kliešťovi *I. ricinus*, ale aj v ďalších druhoch kliešťov (Heglasová *et al.* 2020).

Na Slovensku bola *B. miyamotoi* prvýkrát izolovaná v roku 2012 z kliešťa *I. ricinus* v blízkosti Bratislavy (Subramanian *et al*. 2012), neskôr tiež na lokalitách stredného Slovenska (Venczel *et al*. 2016). Spirochéta bola detegovaná nielen v kliešťoch *I. ricinus*, ale aj v hlodavcoch *A. flavicollis* (s prevalenciou 9,3 %) a *C. glareolus* (4,4 %) a bola zaznamenaná koinfekcia *B. miyamotoi* s *B. afzelii* vo vektoroch aj hostiteľoch (Hamšíková *et al*. 2017). Humánny prípad návratnej horúčky prenášanej kliešťami nebol na Slovensku doposiaľ zaznamenaný (Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky, http://www.uvzsr.sk/en/). Ochorenie môže byť na Slovensku prehliadané, kedže sú jeho klinické prejavy nešpecifické (horúčka, bolesť hlavy atď.). *Borrelia miyamotoi* bola na Slovensku detegovaná aj v kliešťoch cicajúcich na človeku, z čoho vyplýva možné riziko nákazy (Derdáková *et al*. 2016).

Predpokladá sa, že voľne žijúce hlodavce najmä *A. flavicollis* a *M. glareolus* sú dôležití rezervoároví hostitelia pre *B. miyamotoi* v Európe (Burri *et al*. 2014). Borélia bola izolovaná zo širokého spektra drobných cicavcov ako napr. škrečka bielonohého (*Peromycus leucopus* (Rafinesque, 1818) v Severnej Amerike (Barbour *et al*. 2009, Scoles *et al*. 2001), z hlodavcov rodu *Apodemus* (Taylor *et al*. 2013, Burri *et al*. 2014, Szekeres *et al.* 2015, Hamšíková *et al*. 2017), *Myodes* (Taylor *et al*. 2013, Cosson *et al*. 2014, Hamšíková *et al*. 2017) a *Microtus* (Heglasová *et al.* 2020) v Európe a Japonsku. Potencionálne rezervoáre môžu byť aj ďalšie skupiny stavovcov ako vtáky alebo prežúvavce (Scott *et al*. 2010, Han *et al*. 2016). *Borrelia miyamotoi* bola izolovaná aj z morky divej (*Meleagris gallopavo* Linnaeus, 1758) v Tennessee v pomerne vysokej prevalencii až 58 % (35/60) (Scott *et al*. 2010). Je pravdepodobné, že sa borélia môže vyskytovať v širšej škále vtáčich druhov (Hamer *et al.* 2012, Scott *et al.* 2010, Wagemakers *et al.* 2017). *B. miyamotoi* a *Borreliella* (*Borrelia*) *burgdorferi* s. l. zdieľajú rovnaké druhy vektorov a hostiteľov (Fukunaga & Koreki 1995, Gern *et al*. 2010, Burri *et al*. 2014, Cochez *et al*. 2015, Wagemakers *et al*. 2015, van Duijvendijk *et al*. 2016).

Záujem o štúdium *B. miyamotoi* sa zvýšil najmä po tom, čo bola v roku 2011 prvýkrát identifikovaná v krvi človeka s následnou infekciou v Rusku (Platonov *et al*.

2011). Neskôr bola infekcia týmto druhom borélie zaznamenaná aj v USA (Gugliotta *et al*. 2013), Európe (Nemecko, Holandsko) (Hovius *et al*. 2013, Boden *et al*. 2016) a v Japonsku (Sato *et al*. 2014). Ochorenie sa prejavuje predovšetkým opakujúcimi sa vysokými horúčkami, zimnicou a bolesťami hlavy, môžu sa objaviť aj ďalšie príznaky ako bolesť svalov, únava, malátnosť a zvracanie. Súčasná diagnostika infekcií vyvolaných spirochétou *B. miyamotoi* je založená na priamej detekcii DNA metódou polymerázovej reťazovej reakcie (konvenčná PCR), špecializovaná vysoko citlivá Real Time PCR (RT-PCR), nested-PCR, ale aj detekciou špecifických protilátok a *in vitro* kultiváciách. Na rozdiel od spirochét z komplexu *Borreliella* (*Borrelia*) *burgdorferi* s.l. sú *B. miyamotoi* a ďalšie spirochéty návratnej horúčky prenášané transovariálne z dospelej samice kliešťa na jej potomstvo (vertikálny prenos) a transštadiálne (horizontálny prenos) (Scoles *et al*. 2001, Schwan & Piesman 2002, Davis & Bent 2011, Rollend *et al*. 2013, van Duijvendijk *et al*. 2016).

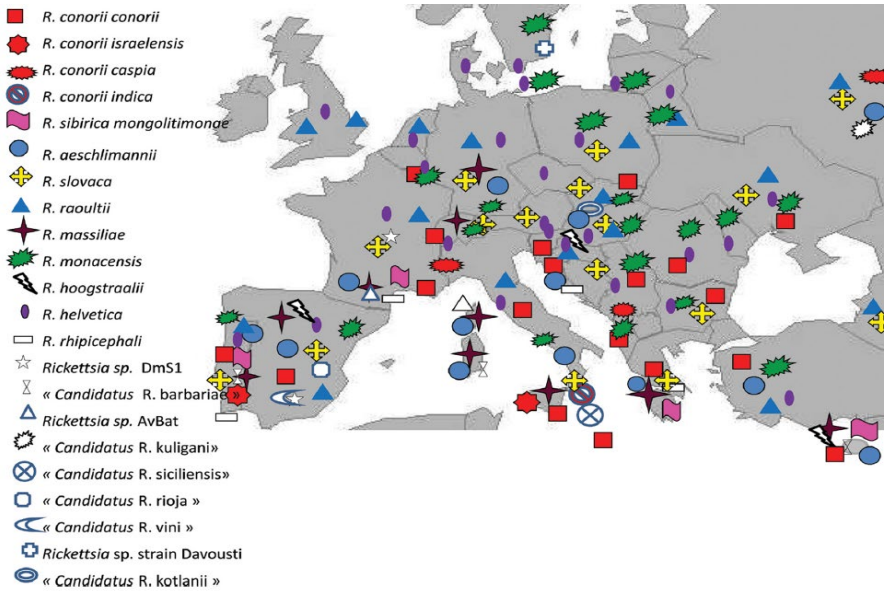
1.4.2. *Rickettsia*

Rickettsie sú gram-negatívne, obligátne, intracelulárne, nepohyblivé baktérie, ktoré na rast a rozmnožovanie potrebujú eukaryotické bunky (Fournier & Raoult 2007). Systematicky patria zástupcovia rodu *Rickettsia* do kmeňa Proteobacteria, triedy Alphaproteobacteria, radu Rickettsiales a čeľade Rickettsiaceae (Gillespie *et al.* 2008). Tvar buniek *Rickettsia* spp. je tyčinkovitý, kokobacilárny alebo pleomorfný, ich šírka sa pohybuje v priemere od 0,3 do 0,6 μm a dĺžka od 0,8 do 2,00 μm (Raoult & Roux 1997, Fournier & Raoult 2007).

V súčasnosti je známych okolo 30 druhov rickettsií, pričom 20 z nich je patogénnych a ďalších približne 60 druhov sú charakterizované ako nepatogénne, neúplne popísané alebo nekultivovateľné druhy. Na základe súčasných fylogenetických štúdii sú zástupcovia rodu *Rickettsia* rozdelení do niekoľkých odlišných skupín. Do skupiny spotted fever group – SFG, ktorých zástupcovia sú zväčša prenášaní kliešťami, blchami a roztočmi patria napr. druhy *R. africae*, *R. sibirica*, *R. slovaca*, *R. raoultii*. Zástupcovia zo skupiny vyvolávajúcej týfus (typhus group – TG) sú prenášaní všami (*R. prowazekii*) alebo blchami (*R. typhi*). Na základe celogenómového sekvenovania rickettsií bola navrhnutá ďalšia skupina nazývaná ako prechodná skupina (transitional group – TRG), pozostávajúca

z druhov *R. felis* a *R. acari* a druhy ako *R. helvetica*, *R. canadensis, Rickettsia monteiroi* a *R. bellii* tvoria samostatné bazálne skupiny (Stothard & Fuerst 1995, Gillespie *et al*. 2007, Merhej & Raoult 2011, Parola *et al.* 2013, Hajduskova *et al.* 2016, Murray *et al.* 2016). Rickettsie zo skupiny TG sa vyskytujú v cytoplazme, druhy zo skupiny SFG a *R. canadensis* v cytoplazme aj jadre buniek (Silverman 1991, Boldiš *et al*. 2009).

Rickettsie sú rozšírené takmer po celom svete a boli zaznamenané aj v mnohých krajinách Európy (Obr. 4.) (Fournier *et al*. 2004, Parola *et al*. 2013). Mnohé z nich sú pôvodcami závažných ochorení ľudí a zvierat súhrnne nazývaných rickettsiózy. Tieto zoonózy predstavujú jedny z najstarších známych ľudských ochorení, ktorých typické prejavy zahŕňajú zväčšené lymfatické uzliny, kožné prejavy (vyrážka, lézie v mieste pricicania kliešťom), horúčku, bolesti hlavy, kĺbov, svalov, zimnicu, nauzeu a celkovú únavu (Bacellar *et al*. 1999, Parola *et al*. 2005, Fournier *et al*. 2004, 2005). Klinické prejavy sa u pacientov objavujú na 4. až 10. deň od uhryznutia infikovaným kliešťom a líšia sa od konkrétneho druhu rickettsie, jeho patogenity a imunitné stavu hostiteľa. Pri liečbe sa podávajú antibiotiká, tetracykliny (doxycyklin) (Parola *et al*. 2005, Karpathy *et al*. 2007).



Obr. 4. Výskyt jednotlivých druhov *Rickettsia* spp. Farebné symboly označujú infekčný druh, biele symboly označujú druhy s možnou/neznámou patogenitou (zdroj: Parola *et al*. 2013).

Hostiteľ sa môže nakaziť priamo z cicajúceho infikovaného kliešťa alebo roztoča, alebo kontamináciou poškodenej kože trusom infikovanej vši alebo blchy (Azad & Beart 1998, Walker *et al*. 2003, Perlman *et al*. 2006). Článkonožce sa môžu infikovať pri cicaní na hostiteľovi, ktorý má rickettsie v periférnej krvi (rickettsémia), prostredníctvom co-feedingu, keď nenakazený kliešť cicia v blízkosti nakazeného kliešťa alebo vertikálnou cestou (prenos patogénov z matky na potomstvo) (Philip 1959, Parola *et al*. 2005).

V Európe sa vyskytujú druhy: *R. aeschlimanni, R. akari*, *R. conorii*, *R. felis*, *R. helvetica, R. massiliae*, *R. monacensis, R. prowazekii*, *R. raoiltii, R. sibirica, R. slovaca* a *R. typhi*. Mnoho druhov rickéttsií asociovaných s kliešťami sa radia medzi tzv. symbionty, mikrosymbionty či endosymbionty s neznámou patogenitou (Parola & Raoult 2001b). Medzi najznámejšie patogénne druhy rickettsií patrí *R. prowazekii* zo skupiny TG je pôvodcom endemického škvrnitého týfusu, jej vektorom je voš ľudská – *P. humanus*, v minulosti ochorenie spôsobilo úmrtia miliónov ľudí, najmä počas hladomorov a vojen. Ďalším patogénom zo skupiny – TF je *R. typhi* pôvodca endemického myšacieho týfusu, ktorej vektorom je blcha morová – *Xenopsylla cheopis* a rezervoármi potkany *Rattus rattus* Linnaeus, 1758 a *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) (Raoult & Roux 1997, Azad & Beard 1998). Medzi patogénne druhy rickettsií zo skupiny SFG patria napr. *R. rickettsii* etiologický agens škvrnitej horúčky Skalistých hôr (Rocky Mountain spotted fever, RMSF) v Severnej a Strednej Amerike, *Rickettsia conorii* subsp. *conorii* pôvodca stredomorskej škvrnitej horúčky (Mediterannean spotted fever, MSF), *Rickettsia conori* subsp. *caspia* vyvolávajúci Astrachánsku horúčku (Astrakhan fever), *R. africae* pôvodca africkej horúčky v Subsaharskej Afrike, *R. australis* Queenslandského kliešťového týfusu/austrálska kliešťová horúčka (Queensland tick typhus), *R. japonica* je pôvodcom orientálneho škvrnitého týfusu atď. (Heyman *et al*. 2010, Kuloglu *et al*. 2012, Parola *et al*. 2013).

Akútne horúčkovité ochorenie spôsobené SFG rickettsiami bolo pozorované aj u psov a sporadicky u mačiek (Paddock *et al*. 2002, Elchos & Goddard 2003). U ďalších novo identifikovaných druhov je patogenita zatiaľ neznáma, predpokladá sa, že niektoré endosymbiotické druhy môžu za vhodných podmienok pôsobiť ako patogény (Parola & Raoult 2001b, Perlman *et al*. 2006). Ixodové kliešte sú vektormi a rezervoármi väčšiny rickettsií zo skupiny SFG. Rickettsie sa medzi kliešťami prenášajú transovariálne (z infikovanej samice na jej potomstvo prostredníctvom vajíčok) a transštadiálne (medzi

jednotlivými vývinovými štádiami). Väčšina rickettsií cirkuluje v prírodných ohniskách, človek pôsobí iba ako náhodný hostiteľ a neprispieva k ich šíreniu a cirkulácií v prírode (Parola & Raoult 2001b, Parola *et al*. 2005, Socolovschi *et al*. 2009).

Na Slovensku boli doposiaľ zistené *R. slovaca*, *R. raoulti*, *R. monacensis*, *R. helvetica* v kliešťoch rodu *Ixodes* a *Dermacentor*, ďalej *R. conorii* len špecifické protilátky v ľudskom sére, *R. felis* z blchy *C. solutus* parazitujúcej na *A. agrarius* a druh *R. africae* v blchách C*eratophyllus garei* z trsteniarika bahenného *Acrocephalus scirpaceus*. Identifikácia rickettsií zo skupiny SFG bola založená na mikroskopickom dôkaze, sérologickej diagnostike, izoláciou na bunkových kultúrach a na rôznych metód molekulárnej biológie (Sekeyová *et al.* 2013, Špitalská *et al.* 2014, 2015). Ich klasifikácia je založená na základe sekvencií génov: 16Sr RNA (rrs), gltA, ompA, ompB a sca4 (gén D) (Fournier *et al*. 2003). Na Slovensku sú takmer každoročne zaznamenávané humánne prípady rickettsióz. V Epidemiologickom informačnom systéme (epis.sk, Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky, 2006) sú uvádzané ako „ochorenia škvrnitej horúčky - rickettsiózy prenášané kliešťami“ alebo iné nešpecifikované ricketsiózy (*Ehrlichia sennetsu*).

1.4.2.1. *Rickettsia africae*

Rickettsia africae je pôvodca Afrického kliešťového týfusu /horúčky (African tick bite fever – ATBF). Prvýkrát boli klinické príznaky ochorenia u ľudí zaznamenané v Mozambiku a Južnej Afrike v roku 1911 (McNaught 1911, Sant’Anna 1911). Vektorom a zároveň rezervoárom sú kliešte rodu *Amblyomma*, medzi najčastejšie druhy patria *Amblyomma hebraeum*, *Amblyomma variegatum* a *Amblyomma lepidum* (Kelly *et al*. 1996, Parola *et al*. 2001, 2005, 2013). *R. africae* bola detegovaná aj v kliešťoch rodu *Rhipicephalus* z rôznych oblastí Afriky (Mediannikov *et al*. 2010, Reye *et al*. 2012). V Európe je ochorenie sporadické, potvrdené najmä u cestovateľov vracajúcich sa z Afriky. Humánny prípad ochorenia spôsobeného *R. africae* nebol doposiaľ na Slovensku zaznamenaný (Sekeyová *et al*. 2013). DNA zhodná na 99,7 % s *R. africae* bola na Slovensku detegovaná v blchách *Ceratophyllus garei* odobratých z trsteniarika bahenného (*Acrocephalus scirpaceus* (Hermann, 1804) migrujúceho z Afriky (Sekeyová *et al*. 2012).

1.4.2.2. *Rickettsia conorii conorii*

Ku druhu *R. conorii* patria blízko príbuzné poddruhy s rozdielnym fenotypom a geografickou distribúciou. *R. conorii* subsp. *conori* je pôvodca mediteránnej škvrnitej horúčky (Mediterranean spotted fever – MSF) (Obr. 5.). Existujú tri kmene tohto druhu rickettsie „Malish" je prvý kmeň najčastejšie sa vyskytujúci vo Francúzku, Portugalsku a Severnej Afrike. Kmene „Kenyan" a „Moroccan" sa vyskytujú sporadicky (Parola *et al*. 2005). Ďalším poddruhom je *R. conorii* subsp. *caspia*, ktorý spôsobuje astrachánsku horúčku, *R. conorii* subsp. *indica*, agens indického kliešťového týfusu *a R. conorii* subsp. *israelensis*, pôvodca izraelského kliešťového týfusu (Zhu *et al*. 2005). Najčastejším vektorom a potencionálnym rezervoárom *R. conorii conorii* v mediteránnej oblasti je kliešť *Rhipicephalus sanguineus* (Parola & Raoult 2001a, Parola *et al*. 2009a, 2013). MSF bola zaznamenaná v oblasti Stredozemného mora, severnej Afriky najmä v štátoch Maroko, Tunis a Alžírsko, južnej Európy a Ázie (Raoult & Roux 1997, Amaro *et al*. 2003). V rámci južnej Európy je ochorenie endemické a bolo evidované v Portugalsku, Španielsku, Francúzsku, Taliansku, Turecku, Ukrajine, Rumunsku, Bulharsku a Grécku. Niekoľko prípadov bolo hlásených aj v severnej a strednej Európe, vrátane Belgicka a Švajčiarska (Botelho-Nevers *et al*. 2005, Parola *et al*. 2005, 2013, Colomba *et al*. 2006, Kuloglu *et al*. 2006, Brouqui *et al*. 2007, Sousa *et al*. 2008, Papa *et al*. 2010, Baltadzhiev & Popivanova 2012). Na Slovensku bola diagnostikovaná sérologicky prítomnosť protilátok na *R. conorii conorii* v sére u ľudí (3,0 %) a psov (2,9 %) (Kováčová *et al*. 2006). Výskyt *R. conorii conorii* nebol na Slovensku doposiaľ potvrdený molekulárnymi metódami (Sekeyová *et al*. 2013).

1.4.2.3. *Rickettsia felis*

Rickettsia felis je pôvodcom horúčky tzv. flea-borne spotted fever – FBSF alebo cat-flea typhus – CFT (Abdad *et al*. 2011). Prvý prípad humánnej infekcie bol zaznamenaný v roku 1991 v Texase (Schriefer *et al*. 1994). Molekulárnymi a sérologickými analýzami bola infekcia zaznamenaná ďalej v Severnej a Južnej Amerike (Brazília, Mexiko), Ázii (Thajsko, Južná Korea, Laos, u talianskeho turistu z Nepálu), Afrike (Tunisko, Egypt, Keňa), a Európe (Francúzsko, Nemecko, Španielsko, Švédsko) (Zavala-Velazquez *et al*. 2000, Richter *et al*. 2002, Renvoisé *et al*. 2009, Richards *et al*.

Obr. 5. Kožné prejavy infekcie spôsobenej *R. conorii conorii* (Mediteránna škvrnitá horúčka) (Prevzaté z www.vzbb.sk).

2010, Lindblom *et al*. 2010, Sulis *et al*. 2015). Výskyt *R. felis* bol potvrdený na každom kontinente s výnimkou Antarktídy (Schriefer *et al*. 1994, William *et al*. 2011), čo súvisí s kozmopolitným rozšírením jej primárneho hematofágneho vektora a zároveň rezervoára, ktorým je blcha mačacia (*C. felis*) (Reif & Macaluso 2009). Blcha sa mohla prostredníctvom domestikovaných zvierat ľahšie rozšíriť do nových oblastí (Abdad *et al*. 2011). V *C. felis* bol zaznamenaný transštadiálny a transovariálny prenos *R. felis* (Azad *et al*. 1992, Higgins *et al*. 1994). Medzi potencionálnych vektorov *R. felis* patrí viac než 30 druhov bĺch, kliešťov, roztočov a komárov (Abdad *et al*. 2011). Hostiteľ sa zvyčajne môže infikovať výkalmi bĺch zanesenými do tela cez poškodenú kožu (Azad & Beard 1998). Na Slovensku *Rickettsia* sp. blízko príbuzná *R. felis* bola zaznamenaná v blche *Ctenophthalmus solutus* z *A. agrarius* a v tkanive z *A. flavicollis* (Špitalská *et al*. 2015, Heglasová nepubl. údaje).

1.4.2.4. *Rickettsia helvetica*

Rickettsia helvetica bola prvýkrát izolovaná v roku 1979 z kliešťov *I. ricinus* vo Švajčiarsku (Burgdorfer *et al*. 1979), na základe týchto izolátov bola pomenovaná a charakterizovaná v roku 1993 (Beati *et al*. 1993). V rámci Európy bol jej výskyt

zaznamenaný najmenej v 24 krajinách (Parola *et al*. 2013). *Rickettsia helvetica* bola tiež detegovaná v Afrike a Ázii (Parola *et al*. 2005). Kliešť *I. ricinus* je považovaný za hlavného vektora a zároveň rezervoára *R. helvetica* (Parola *et al*. 2005). Rickettsia bola detegovaná tiež v kliešťoch *D. reticulatus* v Chorvátsku (Dobec *et al*. 2009), *I. hexagonus* v Nemecku (Sprong *et al*. 2009) a *I. arboricola* v Českej republike (Špitalská *et al*. 2011). Táto baktéria bola považovaná za nepatogénnu, avšak v roku 1999 bola asociovaná s chronickou perikarditídou u švédskeho pacienta s náhlym srdcovým úmrtím (Nilsson *et al*. 1999). Neskôr boli humánne prípady potvrdené v Rakúsku (Sonnleitner *et al*. 2012), Francúzsku (Davoust *et al*. 2012), Taliansku (Corrain *et al*. 2012), Poľsku (Chmielewski *et al*. 2011) Dánsku a Švajčiarsku (Parola *et al*. 2005).

Na Slovensku patrí *R. hevetica* k najčastejšie zaznamenávaným druhom rickettsií a to najmä v kliešťoch *I. ricinus* (Špitalská *et al*. 2008b, 2014, Heglasová nepubl. údaje), ale bola molekulárne potvrdená aj v *H. conncina, D. reticulatus* (Heglasová nepubl. údaje) taktiež v kliešťoch z vtákov (Špitalská *et al*. 2011) a plazov (Václav *et al*. 2011), v tkanivách drobných cicavcov (*A. agrarius*, *A. flavicollis*, *M. glareolus*, *M. arvalis*) (Minichová *et al*. 2017, Heglasová *et al.* 2018), v blchách odobratých z drobných cicavcov (Špitalská *et al*. 2015, Heglasová nepubl. údaje) a bola izolovaná aj zo sleziny srnčej zveri (Štefanidesová *et al*. 2008). Na Slovensku bola sérologicky potvrdená infekcia s *R. helvetica* u ľudí (Sekeyová *et al*. 2012).

1.4.2.5. *Rickettsia monacensis*

V roku 2002 bola *R. monacensis* izolovaná a charakterizovaná z *I. ricinus* v Mníchove, Nemecku (Simser *et al*. 2002). Tento druh je rozšírený takmer po celom svete a bol zaznamenaný v približne 20 krajinách Európy, v Rusku, Ázii a Afrike (Fernandez-Soto *et al*. 2004, Huang *et al*. 2006, Jado *et al*. 2007, Dib *et al*.2009, Oteo & Portillo 2012, Parola *et al*. 2013, Rizzoli *et al*. 2014). *R. monacensis* bola považovaná za nepatogénnu, avšak v roku 2005 boli preukázané humánne prípady infekcie u dvoch pacientov zo Španielska (Jado *et al*. 2007) a jedného z Talianska (Madeddu *et al*. 2012). *R. monacensis* je pôvodcom ochorenia podobného mediteránnej škvrnitej horúčke (Jado *et al.* 2007, Madeddu *et al.* 2012). Na Slovensku bola *R. monacensis* molekulárnymi metódami potvrdená v kliešťoch *I. ricinus* a hlodavcoch rodu *Apodemus* (Minichová *et al*. 2017).

1.4.2.6. *Rickettsia raoultii*

R. raoultii bola detegovaná už v mnohých európskych krajinách napr. v Nemecku (Dautel *et al*. 2006), Portugalsku (Vitorino *et al*. 2007), Holandsku (Nijhof *et al*. 2007), Francúzsku, Chorvátsku (Mediannikov *et al*. 2008), Poľsku (Chmielewski *et al*. 2009), Španielsku (Márquez 2008), v pobaltských krajinách (Radzijevskaja *et al*. 2015), na Slovensku (Boldiš *et al*. 2008) a v európskej časti Ruska (Shpynov *et al*. 2001). *R. raoultii* spôsobuje u ľudí ochorenie TIBOLA, avšak je považovaná za menej patogénnu ako *R. slovaca* a vyznačuje sa rezistenciou k rifampicinu (Mediannikov *et al*. 2008, Parola *et al*. 2009b). *Rickettsia* je najčastejšie prenášaná kliešťami rodu *Dermacentor* a *Rhipicephalus* (Parola *et al*. 2013).

Humánne prípady infekcie boli zaznamenané v strednej Európe, konkrétne vo Francúzsku (Mediannikov *et al*. 2008), v Poľsku, kde bolo ochorenie sprevádzané zväčšením lymfatických uzlín a kožnými léziami (Switaj *et al*. 2012) ako aj na Slovensku (Sekeyová *et al*. 2012). Na Slovensku bola *R. raoultii* detegovaná v kliešťoch *D. marginatus*, *D. reticulatus, H. concinna* a *I. trianguliceps* (Boldiš *et al*. 2008, Špitalská *et al*. 2012, Minichová *et al*. 2017, Heglasová nepubl. údaje).

1.4.2.7. *Rickettsia slovaca*

Rickettsia slovaca bola prvýkrát izolovaná v roku 1968 v hemolymfe, čreve, Malpigiho trubiciach a nervových gangliách kliešťov *D. marginatus* zozbieraných na strednom Slovensku (Brezina *et al*. 1969). Neskôr, na základe molekulárnych metód, genotypovej a fenotypovej diferenciácie bola rickettsia uznaná ako samostatný druh (Sekeyová *et al*. 1998). Na Slovensku sa štúdiu *R. slovaca* venoval aj Řeháček napr. v prácach Řeháček *et al*. (1972, 1976, 1990), v ktorých sérologickými analýzami potvrdil prítomnosť protilátok aj u hlodavcov *A. flavicollis* a *C. glareolus.* Rickettsia bola v tkanivách hlodavcov potvrdená na Slovensku aj molekulárne (Heglasová *et al.* 2018). Kliešte *D. marginatus* a *D. reticulatus* sú vektory *R. slovaca* v Európe (Oteo & Portillo 2012).

Ide o patogénny druh rickettsie, prvý klinický prípad ochorenia bol zdokumentovaný Mittermayerom v roku 1980 u pacienta so suspektnou meningoencefalitídou z východného Slovenska (Mittermayer *et al*. 1980), neskôr v roku

1997 u pacienta z Francúzka (Raoult *et al*. 1997). Podľa typických príznakov (zväčšenie lymfatických uzlín, kožné lézie) ochorenie dostalo viaceré pomenovania TIBOLA – tick-borne lymphadenopathy (Lakos 1997, 1999, 2002), DEBONEL – Dermacentor-borne necrosis-erythrema-lymphadenopathy (Ibarra *et al*. 2006, Oteo *et al*. 2003, 2004), SENLAT – scalp eschar and neck lymphadenopathy after tick bites (Angelakis *et al*. 2010). Pri infekcii sa vyskytujú bolesti hlavy, horúčka a bolestivá regionálna lymfadenopatia (zápal lymfatických uzlín) (Parola *et al*. 2005). Eschar (príškvar, vred) je zvyčajne väčší ako u iných rickettsióz a je obklopený erythémom (Obr. 6.) (Oteo & Portillo 2012, Sekeyová *et al*. 2012). Ochorenie bolo zaznamenané vo Francúzsku, Taliansku, Nemecku, Maďarsku, Španielsku, Portugalsku, Poľsku a boli potvrdené protilátky v sére pacientov zo Slovenska (Oteo & Portillo 2012). Na Slovensku je prevalencia *R. slovaca* kontinuálne monitorovaná (Řeháček *et al*. 1976, Špitalská *et al*. 2012, Sekeyová *et al*. 2013).

Obr. 6. Kožný prejav v mieste prisatia kliešťom infikovaným *R. slovaca* (DEBONEL) (prevzaté z www.vzbb.sk).

2. CIELE PRÁCE

Práca je súčasťou komplexnej štúdie niekoľkých projektov zameraných na riešenie problematiky štruktúry prírodných ohnísk v sídelných aglomeráciách a na územiach menej antropicky pozmenených. Dôraz výskumu je sústredený najmä na štúdium vzťahov vektor – patogén – hostiteľ a na objasnenie cirkulácie vybraných patogénov v prírodných ohniskách.

Dizertačná práca rieši aktuálnu problematiku výskumu vybraných vektormi prenášaných patogénov a význam hlodavcov ako rezervoárových hostiteľov. Cieľom dizertačnej práce je vykonať epidemiologický výskum so zámerom rozšíriť poznatky o prevalencii, diverzite a distribúcii vybraných patogénov (rickettsia, *B. miyamotoi*) vo viacerých druhoch článkonožcov a drobných cicavcov na modelových lokalitách východného Slovenska. Zistiť, či existujú špecifické asociácie patogénov s určitými druhmi článkonožcov a hostiteľov.

Zistiť aktuálne údaje o štruktúre ektoparazitov (kliešťov a bĺch) parazitujúcich na drobných cicavcoch v biotopoch s rôznym typom antropického využitia. Na základe získaných údajov stanoviť vplyv prostredia (typ habitatu) a druhového spektra kliešťov na výskyt a šírenie kliešťami prenášaných pôvodcov nákaz.

Významne rozšíriť poznatky o úlohe ektoparazitov ako potenciálnych vektorov viacerých patogénov (rickettsií, *B. miyamotoi*).

3. Materiál a metodika

V rámci výskumu vzťahov vektor – patogén – hostiteľ bola práca rozdelená do niekoľkých celkov. Prvá časť bola zameraná na výskum patogénov (*Rickettsia* spp., *B. miyamotoi*) vo vzorke odchytených drobných cicavcov. Druhá časť sa venuje výskumu modelových patogénov vo vektoroch (kliešťoch, blchách) odobratých zo skúmaných drobných cicavcov a ich asociáciam. Tretia časť je zameraná na vplyv viacerých druhov kliešťov a prostredia na diverzitu patogénov.

Pre účely výskumu boli vybrané tri modelové lokality na východnom Slovensku – Slovenský kras, Čermeľ a Botanická záhrada Košice reprezentujúce rurálne, suburbánne a urbánne ohniská pôvodcov ochorení. Lokality s rôznym stupňom antropického využitia boli vybrané kvôli štúdiu vplyvu prostredia na diverzitu vektorov a patogénov. Celkom bolo na modelových lokalitách v rokoch 2014 až 2016 odchytených 250 drobných cicavcov 11 druhov (*Apodemus agrarius*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus uralensis*, *Myodes glareolus*, *Crocidura leucodon*, *Crocidura suaveolens*, *Micromys minutus*, *Microtus arvalis*, *Microtus subterraneus*, *Neomys fodiens* a *Sorex minutus*). Z nich bolo odobratých 245 tkanivových vzoriek (ušnice), ktoré boli následne vyšetrené molekulárnymi metódami na prítomnosť patogénov. Z drobných cicavcov a z vegetácie bolo zozbieraných 2160 kliešťov 6 druhov (*I. ricinus, Ixodes trianguliceps, D. marginatus, D. reticulatus, H. concinna* and *H. inermis*) a 279 bĺch 9 druhov z 2 čeľadí (*Ctenophthalmus agyrtes*, *Ctenophthalmus solutus*, *Ctenophthalmus assimilis*, *Megabothris turbidus*, *Amalareus penicilliger*, *Hystrichopsylla orientalis*, *Ctenophthalmus uncinatus*, *Doratopsylla dasycnema* a *Nosopsyllus fasciatus*).

Hlodavce a hmyzožravce boli určované podľa morfologických znakov (veľkosť tela, uší, nôh, dĺžka chvosta a pod.) a boli zaradené do kategórií samec, samica, adult a subadult, resp. pohlavne aktívne – neaktívne podľa identifikačných kľúčov Pelikán (1965), Sládek & Mošanský (1985), a Anděra & Horáček (2005). Ektoparazity boli identifikované na základe špecifických morfologických znakov podľa určovacích kľúčov Rosický (1957), Filippova (1977), Slovák (2014) a Estrada-Peña et al. (2017).

Na izoláciu genomickej DNA zo získaných tkanív ušníc bol použitý komerčný kit na izoláciu DNA z tkanív NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) podľa postupu uvedeného výrobcom. Celková DNA z nacicaných aj navlajkovaných

kliešťov *I. ricinus* (n = 619*)*, *I. trianguliceps* (n = 24) *D. marginatus* (n = 131), *D. reticulatus* (n = 99*)*, *H. concinna* (n = 93), a *H. inermis* (n = 30) bola extrahovaná jednotlivo s použitím komerčného kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen®, Germany). Genomická DNA z navlajkovaných kliešťov *I. ricinus* (n = 1164) a z bĺch (n = 279) bola extrahovaná metódou alkalickej hydrolýzy (Rijpkema *et al.* 1996). Táto metóda bola použitá najmä z dôvodu jej časovej a finančnej nenáročnosti, avšak je vhodná najmä na izoláciu DNA z nenacicaných klieštov rodu *Ixodes* alebo bĺch.

Spolu 2684 vzoriek vyizolovanej DNA bolo prvotne podrobených skríningu na detekciu rickettsií nested polymerázovou reťazovou reakciou (nested PCR), následne boli pozitívne vzorky spracované pomocou konvenčnej PCR analýzy s využitím druhovo špecifických primerov pre rickettsie (Regnery *et al*. 1991, Roux *et al.* 1996, Roux & Raoult 2000, Sekeyová *et al*. 2001, Choi *et al.* 2005). Na skríning prítomnosti *B. miyamotoi* boli vzorky DNA získané z jednotlivých kliešťov, bĺch a tkanív drobných cicavcov poolované po 5 až 10 vzoriek v jednom poole. Spolu 445 poolov bolo prvotne vyšetrených pomocou real-time polymerázovej reťazovej reakcie (qPCR) s využitím druhovo špecifických primerov (Platonov *et al.* 2011). Následne všetky qPCR-pozitívne pooly boli spracované jednotlivo pomocou PCR a sekvenované (Hovius *et al.* 2013).

Na vyhodnotenie fylogenetických vzťahov rickettsií získaných z drobných cicavcov a kliešťov boli použité sekvencie úseku *gltA* spracované pomocou programu MEGA 6 (Tamura *et al*. 2013). Fylogenetický strom bol zostavený metódou Neighbor Joining s 1000 bootstrapových replikácií. Na fylogenetickú analýzau vzťahov *B. miyamotoi* boli použité sekvencie úseku *glpQ* spracované pomocou programu MAFFT v. 7.222 (Katoh & Standley 2013). Fylogenetický strom bol zostavený pomocou algoritmu Maximum Likelihood v RAxML so 100 bootstrapovými replikáciami (Stamatakis 2006).

Pre štatistické účely boli analyzované nasledovné údaje: typ biotopu, druh hostiteľa, vývinové štádium kliešťov, asociácie medzi rickettsiami a jednotlivými druhmi kliešťov. Testované boli rozdiely v prevalencii rickettsií u kliešťov z vegetácie a kliešťov z drobných cicavcov a medzi biotopmi. Dáta boli testované $\chi 2$ testom a Fisherovým presným testom. Na štatistické analýzy bol použitý softvér Statistica (StatSoft & Inc 2013), ďalej last version 2.17b softvér (Hammer *et al.* 2001) a program GraphPad Prism, verzia 8.1.0 a 8.3.1. pre Windows (GraphPad Software, San Diego, Kalifornia USA,

www.graphpad.com).

Materiál, metodika a výsledky sú podrobne opísané v jednotlivých článkoch v ďalšej kapitole dizertačnej práce.

4. Výsledky

4.1. *Rickettsia* spp.

Výsledky tejto problematiky sú publikované alebo odoslané do redakcie v štyroch článkoch.

Článok 1.: **Molecular evidence and diversity of the spotted-fever group *Rickettsia* spp. in small mammas from natural, suburban and urban areas of Eastern Slovakia**
Autori: Heglasová I., Víchová B., Kraljik J., Mošanský L., Miklisová D., Stanko M.
Časopis: Ticks and Tick-borne Diseases 9 (6): 1400–1406; Q2
Rok: 2018

Počas rokov 2014 až 2016 bol na východnom Slovensku vykonaný prieskum zameraný na cirkuláciu rickettsií v drobných cicavcov. Podrobne boli porovnávané výsledky z troch odchytových lokalít urbánneho, suburbánneho a rurálneho charakteru. PCR analýzou bolo celkom vyšetrených 245 tkanív z ušníc ôsmich druhov drobných cicavcov (*A. agrarius*, *A. flavicollis*, *A. uralensis*, *M. glareolus*, *C. leucodon*, *M. minutus*, *M. arvalis* a *M. subterraneus*). Rickettsie boli zachytené v celkovej prevalencii 11 % s druhovým zastúpením *R. helvetica*, *R. slovaca* a *Rickettsia* sp. druh blízko príbuzný *R. felis*. Tieto humánne patogény boli zaznamenané u dominantných druhov hlodavcov (*A. agrarius*, *A. flavicollis*, *M. glareolus*) v rurálnom a suburbánnom biotope. Najvyššia druhová diverzita rickettsií bola zistená u *A. flavicollis* a najvyššia prevalencia u *M. glareolus*. Najviac pozitívnych hlodavcov na rickettsie bolo zaznamenaných počas jarných a jesenných mesiacov (máj, jún a september), čo môže súvisieť so sezónnou aktivitou kliešťov. Z výsledkov vyplýva, že niektoré druhy drobných cicavcov, najmä tie, ktoré majú širšiu ekologickú valenciu, môžu prispievať k udržaniu, cirkulácii a šíreniu rickettsií v rámci i mimo prírodných ohnísk výraznejšie ako tie druhy, ktoré majú užší vzťah k určitému biotopu.

Článok 2.: **Molecular detection of *Rickettsia* spp. in several species of ixodid ticks in Slovakia**
Autori: Heglasová I., Víchová B., Miklisová D., Stanko M.

Časopis: Ticks and Tick-borne Diseases
Rok: (odoslané do redakcie časopisu TTBD v r. 2019)

Táto publikácia je zameraná na analýzu špecifických asociácií medzi určitými druhmi kliešťov a rickettsiami. V rámci výskumu bolo analyzovaných celkom 2160 kliešťov šiestich druhov (*I. ricinus*, *Ixodes trianguliceps*, *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *H. concinna* a *H. inermis*) navlajkovaných z vegetácie a zobieraných z drobných cicavcov z troch lokalít východného Slovenska. Celková prevalencia rickettsií u navlajkovaných kliešťov bola 12,5 % a 20 % u kliešťov z drobných cicavcov. V kliešťoch boli molekulárne identifikované druhy *R. helvetica*, *R. monacensis*, *R. raoultii* a *R. slovaca*. Najviac zastúpený druh *R. helvetica* (62, 9 %) bol identifikovaný v troch druhov kliešťov *I. ricinus*, *H. concinna* a *D. reticulatus*. *Rickettsia raoultii* bola potvrdená v *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *H. concinna* a vôbec po prvýkrát u kliešťa *I. trianguliceps*. *Rickettsia monacensis* (9, 0 %) bola zistená u *I. ricinus* a *R. slovaca* (3,6 %) u jej najbežnejšieho vektora *D. marginatus*. Výsledky naznačujú, že určité druhy rickettsií majú tendenciu asociovať s určitými druhmi alebo skupinami článkonožcov t.j. majú rozdielny hostiteľský rozsah. Výskyt jednotlivých druhov článkonožcov môže indikovať prítomnosť špecifických druhov rickettsií v konkrétnom prostredí čo môže pomôcť odhadnúť riziko infekcie.

Článok 3.: **Detection of *Rickettsia* spp. in fleas collected from small mammals in Slovakia, Central Europe**
Autori: Heglasová I., Víchová B., Stanko M.
Časopis: Vector-Borne and Zoonotic Diseases
Rok: (akceptované v r. 2020)

Táto práca nadväzuje na predchádzajúci výskum a rozširuje štúdium o diverzite rickettsií a ich asociáciam s inými vektorovými skupinami. Na tento účel bolo skúmaných 279 bĺch deviatich druhov (*Ctenophthalmus agyrtes*, *Ctenophthalmus solutus*, *Ctenophthalmus assimilis*, *Megabothris turbidus*, *Amalareus penicilliger*, *Hystrichopsylla orientalis*, *Ctenophthalmus uncinatus*, *Doratopsylla dasycnema* a *Nosopsyllus fasciatus*) odobratých zo 46 percent (115/250) odchytených drobných cicavcov 8 druhov na

vybraných lokalitách východného Slovenska. Celková prevalencia rickettsií bola 2,5 % (7/279) s potvrdeným výskytom u druhov *C. agyrtes*, *C. solutus*, *C. uncinatus*, *M. turbidus* a *A. penicilliger*. U bĺch boli molekulárne potvrdené *R. helvetica*, *R. felis* a *Rickettsia* sp., ide o druhy rickettsií, ktoré sa viažu na širšie hostiteľské spektrum. Výsledky práce poukazujú na to, že určité druhy rickettsií majú odlišný rozsah vektorov článkonožcov.

Článok 4.: ***Rickettsia* spp. infection in a patient from Slovakia: a case report**
Autori: Zubriková D., Heglasová I., Antolová D., Blaňarová L., Víchová B.
Časopis: Folia Microbiologica
Rok: (odoslané do redakcie časopisu FM v r. 2020)

Táto práca čiastočne nadväzuje na výskum rickettsií a dopĺňa údaje o epidemiológií rickettsióz na Slovensku. V roku 2014 sa u 29 ročného muža z východného Slovenska po uštipnutí neznámym hmyzom rozvinuli príznaky ako horúčka, zimnica, bolesť hlavy a kostí, myalgia a lymfadenitída. Okrem viacerých lekárskych vyšetrení bol pacient testovaný aj na Parazitologickom ústave SAV v Košiciach. Odobraté vzorky krvi z pacienta boli vyšetrené PCR analýzou génu *gltA* s pozitívnym výsledkom. Pacient bol následné úspešne liečený doxycyklínom.

Článok 1.

Contents lists available at ScienceDirect

Ticks and Tick-borne Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ttbdis

Original article

Molecular evidence and diversity of the spotted-fever group *Rickettsia* spp. in small mammals from natural, suburban and urban areas of Eastern Slovakia

Ivana Heglasová[a,b,*], Bronislava Víchová[a], Jasna Kraljik[a,c], Ladislav Mošanský[a], Dana Miklisová[a], Michal Stanko[a,c]

[a] Institute of Parasitology, Slovak Academy of Sciences, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovakia
[b] Department of Zoology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská dolina B-1, 842 15 Bratislava, Slovakia
[c] Institute of Zoology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovakia

ARTICLEINFO

Keywords:
Rickettsia spp.
Small mammals
Rodents Slovakia
gltA

ABSTRACT

Rickettsiae of the spotted fever group are considered as emerging pathogens; ticks, fleas and mites are known to be their vectors. However, the prevalence and species diversity of rickettsiae in small mammals and the role of these hosts in the circulation of bacteria are much less studied. During 2014–2016, a total of 250 small mammals (*Apodemus agrarius*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus uralensis*, *Myodes glareolus*, *Crocidura leucodon*, *Crocidura suaveolens, Micromys minutus, Microtus arvalis*, *Microtus subterraneus, Neomys fodiens* and *Sorex minutus*) were captured in natural, suburban and urban habitats of eastern Slovakia. Ear biopsies of 245 individuals were examined for the presence of SFG rickettsiae by molecular methods. The overall prevalence of *Rickettsia* spp. in small mammals was 11%. The predominant species, *Rickettsia helvetica* was confirmed in the striped field mouse (*A. agrarius*), the yellow-necked mouse (*A. flavicollis*), the bank vole (*M. glareolus*) and the common vole (*M. arvalis*) in natural and suburban habitats, followed by *Rickettsia* sp. closely related to *R. felis* identified in *A. flavicollis* captured in a suburban habitat. Finally, *R. slovaca* was found in only one yellow-necked mouse (*A. flavicollis*) captured in a natural habitat, with the sympatric occurrence of *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* ticks. We assume the presence of *R. slovaca* especially in sites with the occurrence of *Dermacentor* spp. All small mammals captured in the urban habitat tested were negative for the presence of rickettsiae. This study brings the first molecular evidence of *R. slovaca* in a rodent captured in Slovakia. *Rickettsia* sp. closely related to *R. felis* was first time detected in *A. flavicollis* in suburban site of Slovakia.

The highest species diversity of rickettsiae was observed in *A. flavicollis*, and the highest prevalence of bac- teria was recorded in *M. glareolus*. The highest occurrence of rickettsiae-positive small mammals was recorded during the spring and autumn months, May, June and September, respectively. This may be related with the seasonal activity of the tick vectors. This study confirms the long-term persistence of *Rickettsia* spp. in small mammals in natural and suburban habitats of Slovakia.

Some rodent species that have a wider ecological valency may contribute to the maintenance, circulation and dissemination of rickettsiae within and out the natural foci more significantly than those species that have narrower relation to the certain type of habitat.

1. Introduction

The genus *Rickettsia* (Rickettsiaceae, Rickettsiales) includes Gram-negative obligate, intracellular, aerobic α-Proteobacteria invading hosts' eukaryotic cells. Species of the genus *Rickettsia* are divided into two groups: the spotted fever group (SFG) and the typhus group (TG) (Raoult et al., 2005). The main vectors of rickettsiae are blood-sucking arthropods, mainly ticks, but also fleas, mites and human body lice. The highest occurrence of rickettsiae in ticks was detected in early spring and autumn (Řeháček et al., 1972). Řeháček et al. (1972) suggested that rickettsiae are able to hibernate in ticks. The most important vectors and probably also the main reservoirs of rickettsiae in Southern, Wes- tern and Central Europe are *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* ticks (Řeháček et al., 1972, 1977; Raoult et al., 2002).

Small rodents, hosting a wide spectrum of ectoparasites and ar- thropod vectors, are the most significant reservoirs of rickettsiae, many

* Corresponding author.
E-mail addresses: heglasova@saske.sk (I. Heglasová), vichova@saske.sk (B. Víchová), kraljik@saske.sk (J. Kraljik), mosansky@saske.sk (L. Mošanský), miklis@saske.sk (D. Miklisová), stankom@saske.sk (M. Stanko).

https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.06.011
Received 26 January 2018; Received in revised form 8 June 2018; Accepted 22 June 2018 1877959X/© 2018 Elsevier GmbH. All rights reserved.
Available online 23 June 2018

of which are responsible for serious zoonotic diseases (rickettsioses) of humans and animals (Řeháček et al., 1992; Burri et al., 2014; Han et al., 2015; Imhoff et al., 2015). Rickettsioses belong among the most fre- quent vector-borne infections in Europe (Fournier et al., 2012).

In Slovakia, six rickettsial species/strains of the SFG have thus far been identified by serological examination and/or different molecular methods. Among the identified species are *Rickettsia helvetica, Rickettsia slovaca*, *Rickettsia raoultii*, *Rickettsia monacensis* strain IRS3 and IRS4, *Rickettsia conorii* and *Rickettsia africae* (Brezina et al., 1969; Řehácek et al., 1975; Boldiš et al., 2008; Špitalská et al., 2012, 2014; Sekeyová et al., 2013). Recently, *Rickettsia* sp., closely related to *Rickettsia felis*, was detected in Slovakia (Špitalská et al., 2015). These species of rickettsiae are usually transmitted by the ticks, but *R. africae* and *R. felis* have also been identified in fleas (Sekeyová et al., 2013; Špitalská et al., 2015).

R. slovaca was isolated for the first time in 1968 from *D. marginatus* ticks in Central Slovakia (Brezina et al., 1969). After the first evidence of this agent in vector ticks, several patients with clinical signs similar to those associated with *R. slovaca* infection, confirmed in a French patient in 2003, have been reported (Parola et al., 2009; Cascio et al., 2013). Based on the most significant clinical symptoms in affected patients, such as eschar and cervical lymphadenopathies, several names have been proposed for diseases resulting from human infections, e.g. tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA), *Dermacentor*-borne necrosis- erythrema-lymphadenopathy (DEBONEL) and/or scalp eschar and neck lymphadenopathy (SENLAT) (Lakos, 1997, 1999; Oteo et al., 2003; Angelakis et al., 2010). The peak incidence of human rickettsioses usually occurs from March to May and during September and No- vember, except the dry summer season, and this is clearly connected with the seasonal activity of *Dermacentor* ticks (Estrada-Peña et al., 2004; Parola et al., 2009).

In Slovakia, the *Ixodes ricinus* tick is considered the main vector and natural reservoir of *R. helvetica* (Špitalská et al., 2008, 2014; Sekeyová et al., 2013).

Rickettsia felis is primarily associated with an arthropod reservoir and vector, the cat flea *Ctenocephalides felis*. It causes infection in hu- mans, known as flea-borne spotted fever or cat-flea typhus (Abdad et al., 2011). In Slovakia, *Rickettsia* sp. closely related to *R. felis* was detected for the first time in a *Ctenophthalmus solutus* flea removed from a striped field mouse (*A. agrarius*) (Špitalská et al., 2015).

In Slovakia, research on rickettsiae has a long tradition (Sekeyová et al., 2013), but the role of rodents in their circulation has been much less studied by molecular methods so far. Recently, only a few studies referring to the presence of *R. helvetica* and *R. monacensis* in *Apodemus flavicollis* and/or *M. arvalis* (Minichová et al., 2017), and *Rickettsia* spp. in *M. arvalis* (Smetanová et al., 2006) have been published.

In the works of Jablonskaja (1978), *R. slovaca* was found in three dominant rodent species, *A. agrarius*, *A. flavicollis* and *M. arvalis*, in Eastern Slovakia; however, these results were only based on serological analysis and cross-immunity studies, without further molecular evi- dence. Řeháček et al. (1972), have also confirmed the presence of an- tibodies against *R. slovaca* by serological analysis in small mammals from Slovakia.

Until now, mostly experimental studies of rickettsial infection of *A. flavicollis*, *Clethrionomys glareolus*, *M. arvalis* and *Mus musculus*, sus- ceptibility and antibody formation were conducted in Slovakia (Řehácek et al., 1976, 1992).

In order to update information on the occurrence and diversity of rickettsiae, in the present study we focused on investigation of SFG *Rickettsia* spp. in the wild small mammals from natural, suburban and rural environments in eastern part of the country.

2. Material and methods

2.1. Sampling sites

Rodents and rodent-attached ticks were collected at three study sites in Eastern Slovakia during the years 2014–2016. The first study site, a Botanical garden with deciduous forest vegetation is located in the city of Košice (208 m a.s.l.; 48°446·84″N; 21°14′16·14″ E).

It represents an urban habitat with a significant anthropogenic impact. The second site, Čermeľ, is characterized by the presence of mixed forest vegetation, with a predominance of

beech, hornbeam and spruce (208–600 m a.s.l.; 48°45′46·67″N; 21°8′8·17″E), and it represents a suburban habitat. The third site, with mixed forest vegetation and a predominance of beech, oak and horn- beam, is located in the Slovak Karst National Park, near the Hrhov village (200–220 m a.s.l., 48°34.899 N, 20°46.743 E), and it represents a natural habitat.

2.2. Rodents sampling

In total, 100 Swedish bridge metal traps filled with sunflower seeds were set at each site, 5 m away from each other, for one night, and these were checked next morning. Captured small mammals were transported to the laboratory and euthanized in accordance with the licences of the Ministry of Environment of the Slovak Republic No. 4874/2011–2.2 and 4559/2015–2.3. Subsequently, they were examined for the pre- sence of ectoparasites, which were removed, collected and stored in 70% ethanol.

Each individual was identified into species, weighed with an accu- racy of ± 0.5 g, measured, euthanized and dissected and the sexual condition of each animal was ascertained. Classification of mammals into categories subadults (immature) and adults (mature) was used according to Pelikán (1965) with respect to the sexual condition of individuals. The removed ticks and other ectoparasites were de- termined with the use of an identification key (Filippova, 1977), by light microscopy. An ear biopsy was obtained from 245 animals and stored at −20 °C until further molecular analysis.

2.3. Molecular analysis

Genomic DNA was extracted from each ear-tissue sample after in- cubation with a Proteinase K solution at 56 °C overnight, using the NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions.

The presence of *Rickettsia* spp. in the genomic DNA samples was evaluated by PCR (Polymerase Chain Reaction) amplification of the 381-bp long fragment of the citrate synthase gene (*gltA*), using the genus-specific primers RpCS.877p and RpCS.1258n (Regnery et al., 1991).

PCR amplifications were performed in a total of 25 µl of reaction mixture containing 14.9 µl of nuclease-free water, 2.5 µl of 10 × PCR buffer, 1 µl of 25 mM $MgCl_2$, 0.125 U of Taq DNA polymerase (Qiagen),
0.5 µl of 10 mM dNTP Mix, 0.5 µl of 10 µM primers and 5 µl of DNA template. Previously sequenced DNA of *Rickettsia* spp. isolated from infected rodents was used as a positive control and sterile water as a negative control in each reaction.

PCR products were analysed by electrophoresis in a 1.5% agarose gels stained with GoldView Nucleic Acid Stain (Beijing SBS Genetech, Beijing, China) and visualized with a UV transilluminator. After PCR analyses, several positive samples with amplified *gltA* gene fragments were purified for the sequencing. The aim was to choose the re- presentatives from each location, and from different rodent species and sex. The PCR products selected for further phylogenetic analyses were purified using Isolate II PCR and Gel Kit (Bioline) and sequenced (at the University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Slovakia) in both directions using the same primers as for the PCR amplification.

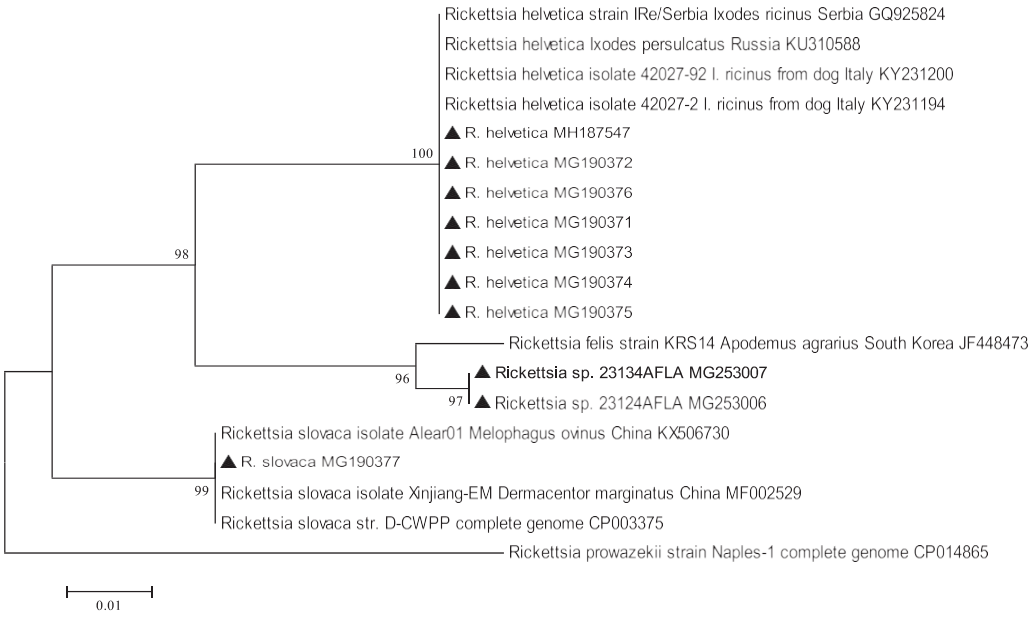


Fig. 1. Phylogenetic analysis of *Rickettsia* species.

The analysis involved 19 nucleotide sequences of *Rickettsia* spp. *gltA* gene fragment, ten obtained in this study and the representatives from GenBank database. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura 3-parameter model (Tamura, 1992). The tree with the highest log likelihood is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heur- istic search were obtained auto- matically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the to- pology with superior log likelihood value. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 19 nucleotide sequences. *R. prowazekii* (CP014865) was used as an outgroup. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 271 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6 software (Tamura et al., 2013).
Nucleotide sequences obtained in this study are marked with black triangles

2.4. Phylogenetic analysis

The obtained nucleotide sequences of *Rickettsia* spp. *gltA* gene fragment were manually edited in MEGA 6 and compared with GenBank entries by BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Tamura et al., 2013). Homologous sequences were aligned by the ClustalW program.

The evolutionary history of the sequences was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura 3-parameter model (Tamura, 1992). The best DNA substitution model was chosen by Model Selection (ML) analysis. The tree with the highest log likelihood is shown (Fig. 1).

2.5. Statistical analysis

The associations between the prevalences of rickettsiae in males and females of the most abundant rodent species and the variation of sea- sonal rickettsial occurrence in rodents were evaluated by the Fisher's exact test using Past version 2.17b software (Hammer et al., 2001). A p value < 0.05 was considered to be statistically significant.

3. Results

A total of 250 rodents and shrews, belonging to eleven species (*Apodemus agrarius*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus uralensis*, *Myodes glareolus*, *Crocidura leucodon*, *Crocidura suaveolens, Micromys minutus, Microtus arvalis*, *Microtus subterraneus, Neomys fodiens* and *Sorex minutus*), were captured during the study. The majority of rodents was captured in the Čermeľ locality in a suburban environment (50.4%; n = 126), followed by the natural habitat near the village Hrhov in the Slovak Karst National Park (46.4%; n = 116). The lowest number of small mammals was captured in the urban landscape in the Botanical Garden within Košice (3.2%; n = 8). Two species, *A. agrarius* and *A. flavicollis*, prevailed at all sampling sites. *M. glareolus* was absent only in the rural habitat. Species composition and the number of captured in- dividuals at the individual sampling sites are shown in Table 1.

In total, 1102 ixodid ticks were collected (920 larvae and 182 nymphs) from captured rodents. Based on morphological character- istics, at least five tick species belonging to genera *Ixodes*, *Dermacentor* and *Haemaphysalis* were identified.

The dominant tick species, *Dermacentor* sp. (52.1%, 427 larvae, 174 nymphs), was followed by *I. ricinus* (44.6%, 474 larvae, 18 nymphs), and *I. trianguliceps* (2.8%, 15 larvae, 16 nymphs). Moreover, four *H. concina* larvae and one *H. inermis* nymph were collected. In our in- vestigation, larvae prevailed over nymphs. The highest diversity of tick species was recorded in the natural habitat near Hrhov village, followed by suburban area in Čermeľ, with two species, and the urban site, the botanical garden, with one recorded tick species. In total, 124 out of 250 captured hosts did not carry any tick.

Ear biopsies of 245 rodents, belonging to eight species, were ana- lysed by PCR for the presence of rickettsiae. In total, 11% (27/245) of rodents tested positive for *Rickettsia* spp. In the Čermeľ locality the presence of *Rickettsia* spp. was confirmed in 16.0% (20/125) of rodents. In the natural habitat near Hrhov the prevalence of *Rickettsia* spp. reached 6.2% (7/113). In the urban area of the botanical garden, none of the seven examined species of rodents tested positive for rickettsiae. We did not observe a significant difference in infection rates be- tween males and females of small mammals ($p = 0.838$). Similarly, a sexual dimorphism was not confirmed in any of three dominant rodent species; *A. agrarius* ($p = 0.377$), *A. flavicollis* ($p = 0.320$), *M. glareolus* ($p = 0.352$) (Table 2).

Regarding the seasonal dynamics of rickettsial infection, the highest number of positive rodents was observed during the spring months, when the infection rate reached 15.3% and 21.1% in May and June, respectively; lower prevalence was recorded in September (6.1%) and the lowest prevalence rate was found in October (4.2%). By comparing the “spring-summer” months (May, June, July) with the autumn (September, October), a significant difference in infection rates of small mammals between seasons was confirmed ($p = 0.023$). On the con- trary, seasonal differences were not confirmed for most abundant ro- dent species such as *A. agrarius* ($p = 1.00$), *A. flavicollis* ($p = 0.44$) and *M. glareolus* ($p = 1.00$). The detailed results on the seasonal dynamics of rickettsial infection in tested small mammals are presented in Table 3.

3.1. Phylogenetic analysis

Out of 27 *Rickettsia* spp. *gltA*-PCR- positive samples, 18 were chosen

Table 1
Small mammals captured in eastern Slovakia during.2014–2016

	Sampling season Location												
	2014				2015				2016				Total
	BG	Č	H	∑	BG	Č	H	∑	BG	Č	H	∑	
Rodent species													
Apodemus agrarius	–	8	–	8	3	1	26	30	1	6	24	31	69
Apodemus flavicollis	–	47	–	47	1	–	14	15	2	8	27	37	99
Apodemus uralensis	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	1	1
Myodes glareolus	–	46	–	46	–	–	4	4	–	4	4	8	58
Crocidura leucodon	–	–	–	–	–	–	1	1	–	–	2	2	3
Crocidura suaveolens	–	–	–	–	–	–	–	–	1	–	–	1	1
Micromys minutus	–	–	–	–	–	–	–	–	–	4	–	4	4
Microtus arvalis	–	–	–	–	–	–	10	10	–	–	1	1	11
Microtus subterraneus	–	1	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	1
Neomys fodiens	–	1	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	1
Sorex minutus	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2	2	2
Total	–	103	–	103	4	1	55	60	4	22	61	87	250

- rodent species not captured.
BG – Botanical garden; Č – Čermeľ; H - Hrhov.

Table 2
Presence of rickettsiae in tested small mammals captured in eastern Slovakia.

Species	No. of *Rickettsia*-positive (No. ofsequenced) samples /No. of tested small mammals (males)	No. of *Rickettsia*-positive (no. of sequenced) samples / No. of tested small mammals (females)
Apodemus agrarius	0/43	1 (1)/26
Apodemus flavicollis	7 (4)/51	3 (3)/48
Apodemus uralensis	1 (1)/1	0
Myodes glareolus	5 (2)/30	8 (4)/28
Crocidura leucodon	0/2	1 (1)/1
Micromys minutus	0/3	0/1
Microtus arvalis	1 (1)/5	0/5
Microtus subterraneus	0	0/1
Total	14 (8)/135	13 (9)/110

for further sequencing. In total, 11 DNA amplicons were successfully sequenced. *Rickettsia helvetica* was the predominant species, with 7 out of 27 PCR- positive samples. It was confirmed in *A. agrarius* (1♀), *A. flavicollis* (1♀), *M. glareolus* (2♀, 2♂) and *M. arvalis* (1♀). *Rickettsia* sp., closely related to *R. felis*, was identified in *A. flavicollis* (2♀, 1♂) (3/27), and *R. slovaca* was found in only one *A. flavicollis* male (1/27). Sequencing of the remaining seven *gltA* positive samples failed, prob- ably due to the low concentration of DNA.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - NCBI) analysis of the *gltA* gene fragments confirmed the presence of *R. helvetica* in seven samples. Seven nucleotide sequences of *R. helvetica* were identical within the overlapping region and were submitted to GenBank. BLAST confirmed their 100% identity with at least 50 *R. helvetica* isolates from distinct vectors and/or hosts from all over the Europe (e.g. KY231194-KY231200; GQ925824; KJ40389, and others).

The nucleotide sequences of the *gltA* gene of *Rickettsia* sp. (23664AFLA, 23124AFLA, 23134AFLA) obtained in this study were 100% identical with isolate from the hedgehog flea (*Archaeopsylla eri- nacei*) removed from red fox in southern Slovakia (Víchová, un- published data). Additionally, these sequences showed 99% identity with *R. felis* strain KRS14 (JF448473) isolated from *A. agrarius* in South Korea.

Similar results were published by Špitalská et al. (2015). Phyloge- netic analysis based on the fragment of *gltA* gene nucleotide sequences showed that *Rickettsia* sp. detected in *C. solutus* flea collected from *A. agrarius* in Eastern Slovakia clustered together with the same *R. felis* Korean isolate. Unfortunately, the authors did not insert the mentioned sequences in the GenBank database; thus, it was impossible to compare them with our *Rickettsia* sp. sequences.

The nucleotide sequence of the *gltA* gene of *R. slovaca* obtained in this study was 98% identical with the *R. slovaca* isolate from the sheep ked (*Melophagus ovinus*) from China (KX506730). Altogether, 18 nu- cleotide sequences of *Rickettsia* spp. *gltA* gene fragment with a length of 271 bp, including sequences obtained in this study as well as those retrieved from the GenBank, were used for a subsequent phylogenetic

Table 3
Seasonal occurrence of *Rickettsia*-infected rodents in eastern Slovakia during 2014–2016.

Rodent species	Season					
	Prevalence (%) of *Rickettsia* spp. (No. of *Rickettsia*-positive rodents/No. of tested rodents)					
	May	June	July	September	October	Total
Apodemus agrarius	0 (0/9)	0/1	–	2.1 (1/48)	0 (0/11)	(1/69)
Apodemus flavicollis	9.4 (5/53)	25 (4/16)	0/5	5.5 (1/18)	0 (0/7)	(10/99)
Apodemus uralensis	–	–	–	0 (1/1)	–	(1/1)
Myodes glareolus	24.5 (12/49)	0 (0/2)	0/3	25 (1/4)	–	(13/58)
Crocidura leucodon	–	–	–	33.3 (1/3)	–	(1/3)
Micromys minutus	–	–	–	0 (0/4)	–	(0/4)
Microtus arvalis	–	–	–	0 (0/4)	16.6 (1/6)	(1/10)
Microtus subterraneus	0 (0/1)	–	–	–	–	(0/1)
Total	15.3 (17/111)	21.1 (4/19)	(0/8)	6.1 (5/82)	4.2 (1/24)	11 (27/245)

- rodent species not captured.

analysis.

All *R. helvetica* sequences (MG190371-376, MH187547) obtained in the present study are placed in a single, well-supported cluster with other *R. helvetica* isolates from *Ixodes* spp. ticks (e.g. from Italy, Serbia and/or Russia) (Fig. 1).

The second clade consists of *R. slovaca gltA* nucleotide sequences and comprises isolate (MG190377) from the yellow-necked mouse from eastern Slovakia as well as sequences isolated from the sheep ked (*Melophagus ovinus*) (KX506730), from *Dermacentor marginatus* (MF002529) from China and/or the *R. slovaca* type strain D-CWPP (CP003375) (Fig. 1).

Two nucleotide sequences, designated here as *Rickettsia* sp. 23134AFLA (MG253007) and 23124AFLA (MG253006) from the yellow-necked mice, are closely related (98.5% identity) with the *R. felis* strain isolated from the striped field mouse (*A. agrarius*) in South Korea and are identical with the isolate from the hedgehog flea (*A. erinacei*) removed from red fox in Southern Slovakia (data not shown). These nucleotide sequences created a separate cluster in the phyloge- netic tree (Fig. 1).

3.2. Nucleotide sequences accession numbers

Nucleotide sequences of the fragments of *gltA* genes obtained in this study were submitted to the GenBank database under the following accession numbers: *R. helvetica* MG190371, MG190372, MG190373, MG190374, MG190375, MG190376, MH187547, *R. slovaca* MG190377, *Rickettsia* sp. 23124AFLA (MG253006), and *Rickettsia* sp. 23134AFLA (MG253007).

4. Discussion

Small mammals are associated with several pathogenic micro- organisms and host a wide spectrum of ectoparasites. Some species of rodents (e.g. *A. flavicollis*) in particular are more heavily infested with *Ixodes* spp. ticks than others (Stanko and Miklisová, 2000). In general, a different composition of rodent species was found in individual habi- tats, suggesting that the character of the environment and the structure of habitat considerably influence the composition of the hosts and their ectoparasites. In total, 250 individuals of 11 species were captured, with *A. agrarius* and *A. flavicollis* being the most prevalent species at all three sampling sites during a three-year study.

Similarly, as it has been observed in the present study, the two above-mentioned *Apodemus* species prevailed in the lowland habitats of eastern Slovakia even in the past (Stanko and Miklisová, 2000). *M. glareolus* was absent only in the urban environment, in the botanical garden. The highest diversity of murid species as well as the highest diversity of tick species feeding on rodents was observed in the natural habitat, in the Slovak Karst National Park region. In addition, *M. arvalis* occurred solely at this natural site, preferring pastures with shrubs.

In this study, the wild small mammals were screened for the pre- sence of *Rickettsia* spp. in three different types of habitat in eastern Slovakia. The highest prevalence of *Rickettsia* spp. was observed in ro- dents captured in the suburban habitat. Rickettsial DNA was detected in ear samples of small mammals belonging to six species, namely *A. agrarius*, *A. flavicollis*, *A. uralensis, M. glareolus*, *M. arvalis*, and *C. leu- codon*. *Rickettsia* sp. closely related to *R. felis* and two pathogenic spe- cies, *R. helvetica* and *R. slovaca*, were identified in *A. agrarius*, *A. flavi- collis*, *M. glareolus* and *M. arvalis*.

The highest prevalence of rickettsiae was recorded in *M. glareolus* (13/58), followed by *A. flavicollis* (10/99). Only one rodent species, specifically *A. flavicollis* captured in the suburban and rural areas, carried DNA of different *Rickettsia* species (*R. helvetica*, *R. slovaca*, and *Rickettsia* sp. closely related to *R. felis*), suggesting that some species of rodents might play a more important role as hosts for different rick- ettsiae. The data indicate that bank voles and yellow-necked mice are probably more often infected with rickettsiae than other species of rodents.

Rickettsiae are considered to be emerging or re-emerging patho- gens, and there are limited data on their presence and prevalence in many regions of Europe (Sprong et al., 2009). Up to now, several cases of human rickettsioses have been recorded in Hungary (Lakos, 1997), France (Raoult and Roux, 1997; Raoult et al., 2002), Sweden (Nilsson et al., 1999, 2010), Switzerland (Baumann et al., 2003), Bulgaria (Komitova et al., 2003), Portugal (de Sousa et al., 2006, 2008), Italy (Selmi et al., 2008), Spain (Aguirrebengoa et al., 2008), Poland (Świtaj et al., 2012) and Slovakia (Sekeyová et al., 2012).

In the present study, the overall prevalence of *Rickettsia* spp. in wild small mammals reached 11%, without a significant difference in in- fection rates between males and females ($p = 0.838$).

The highest occurrence of *Rickettsia*-infected rodents in this study was observed during the spring in May–June (15.3–21.1%) and during the fall in September (6.1%), followed by a decreasing number of in- fected rodents to a minimum of 4.2% in October (Table 3). Similarly, the study of Špitalská et al. (2016) mentioned that the seasonal dy- namics of *Rickettsia*-infected *I. ricinus* in Slovakia showed two major peaks, in spring (April–June/6.8%–9.2%) and autumn (October 7.8%). The seasonal dynamics and the rates of *Rickettsia*-infection in small mammals is re- lated to the activity of their tick vectors.

Among the successfully genotyped samples, *R. helvetica* was the most prevalent species recorded in small mammals at two sampling sites, followed by *Rickettsia* sp. closely related to *R. fellis*. *R. slovaca* was confirmed in one of successfully sequenced samples.

In study from Poland (Biernat et al., 2016) none of the examined *A. flavicollis* and *M. glareolus* blood samples tested were positive for *Rick- ettsia* spp., but rickettsial DNA was identified in rodent-attached *I. ri- cinus* ticks. The authors suggested a very short-lasting rickettsiemia in small mammals or the possibility of vertical transmission of infection. The presence of *R. slovaca* was originally confirmed in vector ticks *D. marginatus* and *D. reticulatus* (Brezina et al., 1969; Špitalská et al., 2012; Minichová et al., 2017). As mentioned in the introduction, *R. slovaca* was identified in ticks and small mammals by serological or microscopic methods in the past, but our study represents the first molecular evidence of *R. slovaca* in wild small mammals in Slovakia. In our study, *R. slovaca* was detected in *A. flavicollis* captured in the Slovak Karst region, where the sympatric occurrence of *D. marginatus* and *D. reticulatus* ticks, the main vectors of *R. slovaca*, is quite common. A previous examination of a smaller sample of *D. reticulatus* ticks from the same area, Slovak Karst (Hrhov village) region, confirmed 8.1% (6/74) prevalence of rickettsiae in adult ticks. Among other species of rick- ettsiae, the presence of *R. slovaca* was recorded too (Radzijevskaja et al., 2015). We assume a higher occurrence of *R. slovaca* in small mammals (and other potential vertebrate hosts), especially in areas with the presence of *D. marginatus* and *D. reticulatus* ticks. Species composition of vectors and their hosts influence the occurrence and distribution of pathogens in the studied area.

To analyze the tick species composition and the dominance of in- dividual tick species on small mammals in detail was not the aim of this study. However, the presence of several tick species, e.g. *Ixodes* spp., *Dermacentor* spp. and *Haemaphysalis* spp. on small mammals in the Slovak Karst region, reflects the sympatric occurrence of distinct tick species at the sampling site. This fact has already been published in the past (e.g., Nosek, 1971, 1972; Hubálek, 1986, and others).

The investigation of small-mammal populations for the presence of parasites and pathogens can help to improve knowledge about the oc- currence, circulation and spreading of infectious agents in a specific area. The data obtained in this study suggest that small mammals, mainly some predominant species (e.g. *Apodemus* spp., *Myodes* spp.), might play a more important role in the maintenance, circulation and dissemination of rickettsiae within and outside the natural foci. The prevalence of rickettsiae in small mammals depends on the type of habitat, species composition and seasonal activity of vectors and

vertebrate hosts, as well as on the fluctuations of small-mammal po- pulations.

The herein presented results suggest a higher risk of infection with zoonotic pathogens, *R. helvetica* and *R. slovaca* in natural and suburban habitats of Eastern Slovakia, especially during the spring and autumn season.

5. Conclusion

The presence of *R. helvetica*, *R. slovaca* and *Rickettsia* sp. closely related to *R. felis* was confirmed in small mammals in Eastern Slovakia.
R. helvetica was found to be the predominantly occuring species in the two investigated sites from several host species. *R. slovaca* was detected in *A. flavicollis* captured in the Slovak Karst region, where the sympatric occurrence of *D. marginatus* and *D. reticulatus* ticks is confirmed. We assume the presence of *R. slovaca* especially in sites with the occurrence of *Dermacentor* spp. In this study, *Rickettsia* sp. closely related to *R. felis* was first time detected in *A. flavicollis* in suburban site of Slovakia. Some rodent species that have a wider ecological valency may con- tribute to the maintenance, circulation and dissemination of rickettsiae within and out the natural foci more significantly than those species that have narrower relation to the certain type of habitat.

The yellow-necked mouse (*A. flavicollis*) might be an important re- servoir host of different *Rickettsia* spp., not only in Slovakia.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Monika Onderová for help with examination and DNA isolation from ear tissues of rodents. The study was supported by the projects VEGA 1/0084/18, VEGA 2/0126/16, APVV-15-0134 and APVV-14-0274.

References

Abdad, M.Y., Stenos, J., Graves, S., 2011. *Rickettsia felis*, an emerging flea-transmitted human pathogen. Emerg. Health Threats J. 4, 7168.

Aguirrebengoa, K., Portillo, A., Santibáñez, S., Marín, J.J., Montejo, M., Oteo, J.A., 2008. Human *Rickettsia sibirica mongolitimonae* infection. Spain. Emerg. Infect. Dis. 14, 528–529.

Angelakis, E., Pulcini, C., Waton, J., Imbert, P., Socolovschi, C., Edouard, S., Dellamonica, P., Raoult, D., 2010. Scalp eschar and neck lymphadenopathy caused by *Bartonella henselae* after tick bite. Clin. Infect. Dis. 50, 549–551.

Baumann, D., Pusterla, N., Péter, O., Grimm, F., Fournier, P.E., Schär, G., Bossart, W., Lutz, H., Weber, R., 2003. Fever after a tick bite: clinical manifestation and diagnosis of acute tick-borne infections in north-eastern Switzerland. Dtsch. Med. Wochenschr. 128, 1042–1047.

Biernat, B., Stanczak, J., Michalik, J., Sikora, B., Wierzbicka, A., 2016. Prevalence of infection with *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks feeding on nonrickettsiemic rodent hosts in sylvatic habitats of west-central Poland. Tick.s Tick.-Borne Dis. 7, 135–141.

Boldiš, V., Kocianová, E., Štrus, J., Tušek-Žnidarič, M., Sparagano, O.A., Štefanidesová, K., Špitalská, E., 2008. Rickettsial agents in Slovakian ticks (Acarina, Ixodidae) and their ability to grow in Vero and L929 cell lines. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1149, 281–285.

Brezina, R., Řeháček, J., Áč, P., Majerská, M., 1969. Two strains of rickettsiae of Rocky Mountain spotted fever group recovered from *Dermacentor marginatus* ticks in Czechoslovakia. Results of preliminary serological identification. Acta Virol. 13, 142–145.

Burri, C., Schumann, O., Schumann, C., Gern, L., 2014. Are *Apodemus* spp. mice and *Myodes glareolus* reservoirs for *Borrelia miyamotoi*, *Candidatus* Neoehrlichia mikur- ensis, *Rickettsia helvetica, R. monacensis* and *Anaplasma phagocytophilum*? Tick.s Tick.- Borne Dis. 5, 245–251.

Cascio, A., Torina, A., Valenzise, M., Blanda, V., Camarda, N., Bombaci, S., Iaria, C., De Luca, F., Wasniewska, M., 2013. Scalp eschar and neck lymphadenopathy caused by Rickettsia massiliae. Emerg. Infect. Dis. 19, 836–837.

De Sousa, R., Edouard-Fournier, P., Santos-Silva, M., Amaro, F., Bacellar, F., Raoult, D., 2006. Molecular detection of *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi* and two genotypes closely related to *Bartonella elizabethae*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 75, 727–731.

De Sousa, R., Duque, L., Anes, M., Poças, J., Torgal, J., Bacellar, F., et al., 2008. Lymphangitis in a Portuguese patient infected with *Rickettsia sibirica* [letter]. Emerg. Infect. Dis. 14, 529–530.

Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J.L., Walker, A.R., 2004. Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region. University of Zaragoza, Zaragoza, Spain.

Filippova, N.A., (1977). Ixodid Ticks of the Subfamily Ixodinae. Fauna SSSR, New Ser.

Fournier, P.E., El Karkouri, K., Robert, C., Médigue, C., Raoult, D., 2012. Complete genome sequence of *Rickettsia slovaca*, the agent of tick-borne lymphadenitis. J. Bacteriol. 1612.

Hammer, O., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontol. Electron. 4, 9.

Han, B.A., Schmidt, J.P., Bowden, S.E., Drake, J.M., 2015. Rodent reservoirs of future zoonotic diseases. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 112, 7039–7044.

Hubálek, Z., 1986. Comparative biogeography of Bhanja virus in Europe. Acta Sc. Nat. Brno. 20, 1–50.

Imhoff, M., Hagedorn, P., Schulze, Y., Hellenbrand, W., Pfeffer, M., Niedrig, M., 2015. Review: sentinels of tick-borne encephalitis risk. Tick.s Tick.-Borne Dis. 6, 592–600.

Jablonskaja, V.A., 1978. Identification of rickettsiae isolated from the brain of rodents trapped in the endemic areas in Czechoslovakia. In: Proceeding of the 2nd International Symposium on Rickettsiae and Rickettsial Diseases. Smolenice, June 21–25 1976. pp. 281–291.

Komitova, R., Lakos, A., Aleksandrov, A., Christova, I., Murdjeva, M., 2003. A case of tick-transmitted lymphadenopathy in Bulagria associated with *Rickettsia slovaca*. Scand. J. Infect. Dis. 35, 213.

Lakos, A., 1997. Tick-borne lymphadenopathy–a new rickettsial disease? Lancet 350, 1006.

Lakos, A., 1999. Tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA) – a new, probably rickettsial infection. Rev. Infect. Dis. 1, 114–116.

Minichová, L., Hamšíková, Z., Mahríková, L., Slovák, M., Kocianová, E., Kazimírová, M., Škultéty, Ľ., Katarína Štefanidesová, K., Špitalská, E., 2017. Molecular evidence of *Rickettsia* spp. in ixodid ticks and rodents in suburban, natural and rural habitats in Slovakia. Parasit. Vectors 10, 1–12.

Nilsson, K., Lindquist, O., Páhlson, C., 1999. Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. Lancet 354, 1169–1173.

Nilsson, K., Elfving, K., Páhlson, C., 2010. *Rickettsia helvetica* in patient with meningitis, Sweden 2006. Emerg. Infect. Dis. 16, 490–492.

Nosek, J., 1971. The ecology, bionomics and behaviour of *Haemaphysalis* (*Aboimisalis*) *punctata* tick. Z Parasitenkd 37, 198–210.

Nosek, J., 1972. The ecology and public health importance of *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks in Central Europe. Folia Parasitol. (Praha). 19, 93–102. Oteo, J.A., Ibarra, V., Blanco, J.R., Metola, L., Vallejo, M., De Artola, V.M., 2003. Epidemiological and clinical differences among DEBONEL-TIBOLA and other tick- borne diseases in Spain. Ann. N. Y. Acad. Sci. 990, 391–392.

Parola, P., Rovery, C., Rolain, J.M., Brouqui, P., Davoust, B., Raoult, D., 2009. *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii* in tick-borne rickettsioses. Emerg. Infect. Dis. 15, 1105–1108.

Pelikán, J., 1965. Reproduction, population structure and elimination of males in *Apodemus agrarius* (Pall.). Folia Zool. 14, 317–332.

Radzijevskaja, J., Paulauskas, A., Aleksandraviciene, A., Jonauskaite, I., Stanko, M., Karbowiak, G., Peťko, B., 2015. New records of spotted fever group rickettsiae in Baltic region. Microbes Infect. 17, 874–878.

Raoult, D., Roux, V., 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev. 10, 694–719.

Raoult, D., Lakos, A., Fenollar, F., Beytout, J., Brouqui, P., Fournier, P.E., 2002. Spotless rickettsiosis caused by *Rickettsia slovaca* and associated with *Dermacentor* ticks. Clin. Infect. Dis. 34, 1331–1336.

Raoult, D., Fournier, P.-E., Eremeeva, M., Graves, S., Kelly, P.J., Otteo, J.A., Sekeyová, Z., Tamura, A., Tarasevich, I., Zhang, L., 2005. Naming of rickettsiae and rickettsial diseases. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1063, 1–12.

Regnery, R.L., Spruill, C.L., Plikaytis, B.D., 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. J. Bacteriol. 173, 1576–1589.

Řeháček, J., Brezina, R., Župančičová, M., Kováčová, E., 1972. Contribution to the natural focality of rickettsiae belonging to the Rocky Mountain spotted fever (RMSF) group in Slovakia. Folia Parasitol. (Praha) 19, 41–52.

Řehácek, J., Župancicová, M., Kováčová, E., Urvölgyi, J., Brezina, R., 1975. Study of rickettsioses in Slovakia. II. Infestation of fleas and mites in mole nests in some lo- calities in Central Slovakia with *C. burneti* and Rickettsiae belonging to the spotted fever (SF) group. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 19, 329–339.

Řehácek, J., Župancicová, M., Kováčová, E., Urvölgyi, J., Brezina, R., 1976. Study of rickettsioses in Slovakia. III. Experimental infection of *Apodemus flavicollis* Melch. by rickettsiae of the spotted fever (SF) group isolated in Slovakia. J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 21, 306–313.

Řeháček, J., Župančičová, M., Kováčová, E., Brezina, R., 1977. Rickettsiae of the spotted fever group in Slovakia. Wiad Parazytol 23, 27–30.

Řeháček, J., Urvölgyi, J., Kocianová, E., Jedlička, L., 1992. Susceptibility of some species of rodents to rickettsiae. Folia Parasitol. (Praha). 39, 265–284.

Sekeyová, Z., Mediannikov, O., Subramanian, G., Kowalczewska, M., QuevedoDiaz, M., Kocianova, E., Raoult, D., 2012. Isolation of *Rickettsia helvetica* from ticks in Slovakia. Acta Virol. 56, 247–252.

Sekeyová, Z., Socolovschi, C., Špitalská, E., Kocianová, E., Boldiš, V., Diaz, M.Q., Berthová, L., Bohacsová, M., Valáriková, J., Fournier, P.E., Raoult, D., 2013. Update on rickettsioses in Slovakia. Acta Virol. 57, 180–199.

Selmi, M., Bertolotti, L., Tomassone, L., Mannelli, A., 2008. *Rickettsia slovaca* in *Dermacentor marginatus* and tick-borne lymphadenopathy, Tuscany, Italy. Emerg. Infect. Dis. 14, 817–820.

Smetanová, K., Schwarzová, K., Kocianová, E., 2006. Detection of *Anaplasma phagocyto- philum*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp., and *Borrelia burgdorferi* s.l. in ticks, and wild- living animals in western and middle Slovakia. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1078, 312–315. Špitalská, E., Boldiš, V., Košťanová, Z., Kocianová, E., Štefanidesová, K., 2008. Incidence

of various tick-borne microorganisms in rodents and ticks of central Slovakia. Acta Virol. 52, 175–179.
Špitalská, E., Štefanidesová, K., Kocianová, E., Boldiš, V., 2012. *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia raoultii* in *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* ticks from Slovak Republic. Exp. Appl. Acarol. 189–197.
Špitalská, E., Boldiš, V., Derdáková, M., Selyemová, D., Rusňáková Tarageľová, V., 2014. Rickettsial infection in *Ixodes ricinus* ticks in urban and natural habitats of Slovakia. Tick.s Tick.-Borne Dis. 5, 161–165.
Špitalská, E., Boldiš, V., Mošanský, L., Sparagano, O., Stanko, M., 2015. *Rickettsia* species in fleas collected from small mammals in Slovakia. Parasitol. Res. 114, 4333–4339. Špitalská, E., Stanko, M., Mošanský, L., Kraljik, J., Miklisová, D., Mahríková, L., Bona, M., Kazimírová, M., 2016. Seasonal analysis of *Rickettsia* species in ticks in an agricultural site of Slovakia. Exp. Appl. Acarol. 68, 315–324.
Sprong, H., Wielinga, P.R., Fonville, M., Reusken, C., Brandenburg, A.H., Borgsteede, F., Gaasenbeek, C., van der Giessen, J.W.B., 2009. *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne *Rickettsia* species. Parasit. Vectors 2, 41.
Stanko, M., Miklisová, D., 2000. Tick infestation patterns of two rodent species in a lowland ecosystem. In: Kazimírová, M., Labuda, M., Nuttall, P.A. (Eds.), Proceedings of the 3rd International Conference "Ticks and Tick-Borne Pathogens: Into the 21st Century", pp. 185–188.
Świtaj, K., Chmielewsk, T., Borkowski, P., Tylewska-Wierzbanowska, S., Olszynska- Krowicka, M., 2012. Spotted fever rickettsiosis caused by *Rickettsia raoultii*-case re- port. Przegl. Epidemiol. 66, 347–350.
Tamura, K., 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content biases. Mol. Biol. Evol. 9 (4), 678–687.
Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30, 2725–2729.

Článok 2.

Molecular detection of *Rickettsia* spp. in several species of ixodid ticks in Slovakia

Ivana Heglasová[a,b,*], Bronislava Víchová[a], Dana Miklisová[a], Michal Stanko[a,c]

[a] Institute of Parasitology, Slovak Academy of Sciences, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovakia
[b] Department of Zoology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská dolina B-1, 842 15 Bratislava, Slovakia
[c] Institute of Zoology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovakia

∗Corresponding author. Tel.: 0556325326
E-mail addresses: heglasova@saske.sk (I. Heglasová), vichova@saske.sk (B. Víchová), miklis@saske.sk (D. Miklisová), stankom@saske.sk (M. Stanko)

Abstract

A total of 1260 questing ticks of five species (*Ixodes ricinus, Dermacentor marginatus, Dermacentor reticulatus, Haemaphysalis concinna* and *Haemaphysalis inermis*) were collected from vegetation by flagging in three different habitats in eastern Slovakia. A representative sample of 900 rodent-attached ticks of six species (*I. ricinus, Ixodes trianguliceps, D. marginatus, D. reticulatus, H. concinna* and *H. inermis*) were collected from 149 small mammals of seven species (*Apodemus flavicollis*, *Apodemus agrarius*, *Microtus arvalis*, *Myodes glareolus*, *Microtus minutus*, *Crocidura leucodon* and *Crocidura suaveolens*). The overall prevalence of rickettsiae in questing ticks and rodent-attached ticks was 12.5% and 20%, respectively. The DNA of *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia monacensis*, *Rickettsia raoultii* and *Rickettsia slovaca* was detected in ticks. The dominant species, *R. helvetica* (62.9%), was identified in questing and rodent-attached ticks of three species, *I. ricinus*, *H. concinna* and *D. reticulatus*. *Rickettsia raoultii* (20.4%) was identified in questing and rodent-attached *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *H. concinna* and in one larva of *I. trianguliceps.* To our knowledge, this is the first evidence of *R. raoultii* in *I. trianguliceps* larva obtained from the striped field mouse (*A. agrarius*). *Rickettsia monacensis* (9.0%) was detected in questing as well as rodent-attached *I. ricinus*. *Rickettsia slovaca* (3.6%) was detected in questing and rodent-attached *D. marginatus* ticks, the most common vector across Europe. Seven different nucleotide sequences of rickettsiae, were detected in *H. inermis* and *I. ricinus* ticks. The data suggest that specific species of rickettsiae tend to occur in certain tick

species or arthropods. The occurrence of individual arthropod species may suggest the presence of specific species of rickettsiae in a particular habitat and might help to estimate the risk of infection.

Key words: Ticks; Small mammals; Rickettsiae; *GltA*, Slovakia

1. Introduction

Some rickettsiae are vector-borne intracellular bacteria that cause acute febrile illnesses throughout the world. Rickettsiae from the spotted fever group (SFG) are mainly detected in the ticks, but also with fleas and mites (Raoult and Roux, 1997; Portilo et al., 2017; Adem, 2019). It seems that specific species of rickettsiae tend to be detected in certain invertebrate species or groups of species. Regarding the invertebrate species, we have observed that one group of rickettsiae, including species such as *R. africae*, *R. felis*, *R. helvetica* and/or *R. monacensis*, is detected in several different species of ticks belonging to different genera and/or subfamilies, as well as with some species of fleas and mites. These riskettsiae seem to have less specific preferences for potential vectors.

In contrast, there are some species of rickettsiae that seem to be detected mainly in one tick species. For instance, *Rickettsia conorii* sub. *conorii*, etiologic agent of Mediterranean spotted fever in Europe is detected especially in *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato ticks (Parola et al., 2009a; Socolovschi et al., 2009). Finally, the last group of rickettsiae, including *R. slovaca* and *R. raoultii,* etiologic agents of scalp eschar and neck lymphadenopathy (SENLAT) are detected mainly in several tick species within the same genus, namely with *D. marginatus* and *D. reticulatus* across Europe. Similar findings were published by Socolovschi et al. (2009) and/or Merhej and Raoult (2010).

In Slovakia, *R. slovaca*, *R. raoultii*, *R. monacensis* IRS3 and IRS4, *R. helvetica*, *R. felis* and *R. africae* have thus far been identified in arthropods and hosts (e. g. small mammals) by different molecular methods (Boldiš et al., 2008; Sekeyová et al., 2012a; Sekeyová et al., 2013; Špitalská et al., 2015; Minichová et al., 2017; Heglasová et al., 2018). *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulatus*, *Haemaphysalis concinna*, *Haemaphysalis punctata* and *Haemaphysalis inermis* are epidemiologically significant exophilic tick species in Slovakia (Černý, 1972; Řeháček et al., 1991). These ticks species are involved in the transmission of a large variety of bacteria, viruses and protozoan parasites of medical and veterinary importance not only in Slovakia. In study of Heglasová et al. (2018) *R. slovaca* was detected in rodents, only in the habitat with the sympatric occurrence of *D.*

marginatus and *D. reticulatus* ticks. The authors assume the presence of *R. slovaca* especially in sites with the occurrence of *Dermacentor* spp. In the present study, we aimed at evaluation of the presence and diversity of rickettsiae in a wide spectrum of questing and host-attached ticks.

2. Material and methods

2.1. Tick sampling

The questing and rodent-attached ticks were obtained from three sampling sites in eastern Slovakia during 2014–2016. The first study site represents an urban habitat, a Botanical garden with deciduous forest vegetation, is located in the center of the city of Košice (208 m a.s.l.; 48°446·84″N; 21°14′16·14″ E). The second site, Čermeľ valley, is characterized by the presence of mixed forest vegetation, with a predominance of beech, hornbeam, and spruce (220–410 m a.s.l.; 48°45′46·67″N; 21°8′8·17″E), and it represents a suburban habitat. The third site, with mixed forest vegetation and a predominance of beech, oak, and hornbeam, is located in the Slovak Karst National Park, near the village Hrhov (200–220 m a.s.l.; 48°34'53.9"N; 20°46'44.4"E), and it represents a natural habitat.

Questing ticks were collected around vole-trapping transects by dragging a 1 m^2 white wool blanket over the vegetation for an hour, in May – July and September – October 2014 and 2016, respectively. Trapped rodents and rodent-attached ticks were collected in the same three study sites in eastern Slovakia as the questing ticks from vegetation. The live-trapping of small mammals was carried out during May/June and September/October in 2014 and 2016, respectively. Rodent sampling was described in detail in Heglasová et al. (2018). The captured small mammals were euthanized in accordance with the licenses of the Ministry of Environment of the Slovak Republic No. 4874/2011–2.2 and 4559/2015–2.3. The rodents and insectivores were identified to species according to morphological features (size of body, tail, ears, legs, etc.), sex and age classes (juvenile, subadult, adult) using the identification keys by Pelikán et al. (1979); Sládek and Mošanský (1985); and Anděra and Horáček (2005).

Each small mammal individual was checked for the presence of ticks. All collected ticks were stored in 70% ethanol until identification. The species and developmental stage of the ticks were determined based on morphological characteristics under a light microscope using the identification keys by Filippova (1977), Slovák (2014) and Estrada-Peña et al. (2017).

2.2. DNA extraction and molecular analyses

Ticks were washed with sterile water, dried on-air, transferred to individual tubes and crushed with a sterile scalpel. Genomic DNA of questing *I. ricinus* (n = 1164) was extracted individually from each tick by using the alkaline hydrolysis method (Rijpkema et al., 1996). Total DNA of rodent-attached *I. ricinus* (n = 619*)*, *I. trianguliceps* (n = 24) *D. marginatus* (n = 131), *D. reticulatus* (n = 99*)*, *H. concinna* (n = 93), and *H. inermis* (n = 30) was extracted individually from each tick using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen®, Germany) according to the manufacturer's instructions. All DNA samples were stored at -20˚C for further processing.

Subsequently, all DNA samples were screened for the presence of *Rickettsia* spp. by nested PCR (Polymerase Chain Reaction) amplification of the 381-bp long fragment of the citrate synthase gene (*gltA*), using the genus-specific primers RpCS.877p and RpCS.1258n (Regnery et al., 1991) and inner primer pair RpCS.896p and RpCS.1233n (Choi et al., 2005) resulting in 337-bp PCR product. To further characterize *Rickettsia* species, selected *gltA* positive amplicons were analyzed for the presence of the fragments of the gene loci (*ompA*, *ompB* and *sca4*) encoding outer membrane proteins A, B and surface cell antigen 4, as previously described (Regnery et al., 1991; Roux et al., 1996; Roux and Raoult, 2000; Sekeyová et al., 2001) with primers 120–2788, 120–3599, RR190.70F, RR190.701R and D1390r, D767f, respectively. *Rickettsia helvetica* identification was based on the *gltA*, *ompB* and *sca4* genes PCR amplification, and *R. monacensis*, *R. raoultii* and *R. slovaca* identification was based on the *gltA*, *ompA*, *ompB* and *sca4* genes amplification followed by sequencing (Roux et al., 1996; Roux and Raoult, 2000; Sekeyová et al., 2001; Portilo et al., 2017). In each PCR, previously sequenced *Rickettsia* spp. DNA was used as positive control and nuclease-free water as a negative control.

A selected number of PCR *Rickettsia*-positive samples from questing and rodent-attached ticks were purified using Isolate II PCR and Gel Kit (Bioline) and sequenced (Sanger sequencing, dye terminator method) at the University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice, Slovakia, in both directions using the same primers as for the PCR amplification.

2.3. Accession Numbers of obtained nucleotide sequences

Nucleotide sequences of the fragments of the *gltA* gene obtained in this study from questing ticks were submitted to the GenBank database under the following accession numbers: *R. helvetica* MK792533-MK792584, *R. monacensis* MK792585-MK792594*, R. raoultii* MK792595-MK792604, *R. slovaca* MK792605.

Nucleotide sequences of the fragments of the *gltA* gene obtained in this study from

rodent-attached ticks were submitted to the GenBank database under the following accession numbers: *R. helvetica* MK875680-MK875725, *R. monacensis* MK875726-MK875734, *R. raoultii* MK875735-MK875757, *R. slovaca* MK875758-MK875762.

2.4. Phylogenetic analysis

Phylogenetic analyses were conducted in MEGA X (Kumar et al., 2018). The obtained nucleotide sequences of *gltA* gene fragments of *Rickettsia* spp. from questing ticks and ticks removed from rodents were processed separately. They were manually edited and compared with the GenBank entries by BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - NCBI - NIH) (Tamura et al., 2013).–Homologous sequences were aligned by the Clustal W program in Alignment Explorer of MEGA X. In order to infer the evolutionary history between the SFG rickettsiae from questing ticks and from the ticks removed from small mammals, the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987) was used, and the phylogenetic trees were constructed. The best DNA substitution model for both analyses was chosen by the Model Selection (ML) tool.

The evolutionary distances were computed using the Tamura 3-parameter method (Tamura, 1992). All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). The trees with the highest log likelihood are shown for the rickettsiae from the questing ticks (Figure 1) and rickettsiae from the ticks removed from small mammals (Figure 2).

2.5. Statistical analysis

The differences in the prevalence of rickettsial infection for ticks from vegetation and from rodent-attached ticks between habitats were tested with the χ^2 test or Fisher exact test. The subset of positive tick was selected to confirm the preference of *Dermacentor* tick species to *R. raoultii* and *I. ricinus* to *R. helvetica* and *R. monacensis*. The occurrence of *Rickettsia* spp. found in ixodid ticks was tested with the Fisher exact test. Both groups of tick species were tested separately for the questing and rodent-attached ticks. GraphPad Prism, version 8.1.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com) was used for statistical testing.

3. Results

3.1. Ticks and small mammals collection

In total, 1260 questing ticks of five species (1164 *I. ricinus,* 12 *D. marginatus,* 12 *D.*

reticulatus, 45 *H. concinna* and 27 *H. inermis*) were collected by flagging the vegetation during spring and summer (May/June/July) as well as in autumn (September/October) of 2014–2016 (Table 1). At the same time, a total of 250 small mammals of 11 species (*Apodemus agrarius*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus uralensis*, *Myodes glareolus*, *Crocidura leucodon*, *Crocidura suaveolens*, *Micromys minutus*, *Microtus arvalis*, *Microtus subterraneus*, *Neomys fodiens* and *Sorex minutus*) were captured in natural, suburban and urban habitats of eastern Slovakia. In total, 149 (59.6%) out of 250 trapped small mammals were infested with ticks. A representative sample of 900 rodent-attached ixodid ticks (868 larvae and 32 nymphs) of six species (*I. ricinus, Ixodes trianguliceps, D. marginatus, D. reticulatus, H. concinna* and *H. inermis*) were chosen for further molecular analyses (Table 2). The dominant tick species on small mammals was *I. ricinus* 68.8% (594 larvae and 25 nymphs), followed by *D. marginatus* 13.2% (119 larvae), *D. reticulatus* 9.7% (87 larvae), *H. concinna* 5.3% (48 larvae), *I. trianguliceps* 2.7% (18 larvae and 6 nymphs) and *H. inermis* 0.3% (2 larvae and 1 nymph).

The highest diversity of questing tick species was recorded in the sylvatic/natural habitat (423 *I. ricinus*, 12 *D. marginatus,* 12 *D. reticulatus,* 45 *H. concinna* and 27 *H. inermis*). Overall, 116 small mammals of seven species (*A. agrarius*, *A. flavicollis*, *A. uralensis*, *M. glareolus*, *C. leucodon*, *M. arvalis*, *S. minutus*) were captured here, and six species of rodent-attached ticks (*I. ricinus*, *I. trianguliceps*, *D. marginatus, D. reticulatus, H. concinna*) were removed from small mammals. In the suburban habitat, only *I. ricinus* (n = 546) was recorded on the vegetation. In total, 126 small mammals of six species (*A. agrarius*, *A. flavicollis*, *M. glareolus*, *M. minutus*, *M. subterraneus*, *N. fodiens*) were captured, and two tick species (*I. ricinus*, *I. trianguliceps*) were collected from animal hosts. In the urban habitat, questing *I. ricinus* dominated (n = 195). Eight rodents of three species (*A. agrarius*, *A. flavicollis*, *C. suaveolens*,) were captured, and rodent-attached *I. ricinus* ticks were collected.

3.2. The presence of SFG Rickettsia spp. in questing and rodent-attached ticks

All 1260 guesting ticks were individually analyzed for the presence of SFG *Rickettsia* spp. The overall prevalence of rickettsiae in ticks from vegetation was 12.5% (158/1260). *Rickettsia* spp. were confirmed in all developmental stages of four species of ixodid ticks from all studied sites (Table 1). Only *H. inermis* ticks tested negative for the presence of rickettsiae. The overall prevalence of rickettsial infection was 14.5% in the natural habitat, 13.3% in the urban habitat and 10.4% in the suburban habitat (Table 1), with no significant differences recorded ($\chi^2 = 4.04$, df=2, $p = 0.133$).

In total, 900 randomly chosen rodent-attached ticks were individually screened for the presence of *Rickettsia* spp. Rickettsial DNA was confirmed in 20% (180/900) of ticks; larvae and nymphs of six species of ixodid ticks from all study sites (Table 2). The overall prevalence of rickettsial infection was 21.5% in the natural habitat, 11.3% in the suburban habitat and 27.3% (6/22) in the urban habitat (Table 2). A significant difference was confirmed between the natural and suburban habitats (Fisher exact test, P=0.004); the urban habitat was not included in the test because the overall number of ticks was too small.

Out of a total of 338 *Rickettsia* spp. *gltA*-PCR-positive DNA samples from rodent-attached and questing ticks, more than half (n=181) was chosen for further sequencing. In total, 168 nucleotide sequences were obtained. Based on sequencing of four genetic markers (*gltA*, *ompA*, *ompB* and *sca4*) we confirmed the presence of *R. helvetica* (n = 105) in *I. ricinus*, *H. concinna*, and *D. reticulatus*, *R. raoultii* (n = 34) in *D. reticulatus*, *D. marginatus*, *H. concinna*, and *I. trianguliceps*, *R. monacensis* (n = 16) in *I. ricinus*, *R. slovaca* (n = 6) in *D. marginatus* and *Rickettsia* sp. (n = 7) in *I. ricinus* and *H. inermis* ticks (Table 3, 4).

Partial nucleotide sequences of the *gltA* gene of predominant *R. helvetica* from questing and rodent-attached Ixodid ticks of all developmental stages showed 100% identity with each other, 100% identity with *R. helvetica* (MG190375) identified in *A. agrarius* captured in eastern Slovakia and 99.12-99.41% similarity with at least 50 more *R. helvetica* isolates from *Ixodes* spp. ticks from all over Europe (e.g. MF673863, MF673861, MF673859, KY231194-KY231199, KM288466-KM288468 and others). The sequencing of the above-mentioned *ompB* positive amplicons was not successful. A partial nucleotide sequence of the *sca4* gene fragment from rodent-attached *I. ricinus* larva showed 99.68% similarity with the nucleotide sequence of *R. helvetica* isolated from *I. ricinus* (MF163040).

BLAST analysis of the *gltA* gene fragments confirmed the presence of *R. monacensis* in questing and rodent-attached *I. ricinus* of all developmental stages and showed 100% identity of all isolates obtained in this study with each other and 100% identity with the *R. monacensis* isolate (KU961970) identified in dog from Cape Verde (Maio Island). The *ompB* gene fragment sequences from questing *I. ricinus* showed 100% identity with *R. monacensis* isolated from ixodid tick (*Ixodes* spp., *Haemaphysalis* spp.) from all over Europe (e.g. KU961543, LN794217, KC137254), and those from rodent-attached *I. ricinus* ticks showed 99.71% similarity with *R. monacensis* strain D-2 (EU330640) and/or *R. monacensis* strain IrR/Munich (JN036418) from *I. ricinus*, Germany. The obtained nucleotide sequences of the *sca4* gene fragment from both questing and rodent-attached ticks were 100% identical with the homologous sequences of the *sca4* gene from *R. monacensis* strain IrR/Munich,

(LN794217) and with *Rickettsia* sp. IRS 4 (AF163010) from *I. ricinus* previously isolated in Slovakia. The sequencing of *ompA*-positive amplicons of *R. monacensis* failed.

Partial sequencing of the *gltA* gene of *R. slovaca* from a questing male of *D. marginatus* showed 100% identity with the *R. slovaca* isolate Crimea-2016-4 (KY940286) from *D. marginatus*, *R. slovaca* strain D.CWPP(CP003375) and *R. slovaca* 13-B(CP002428), which was isolated from a *Dermacentor* tick in Slovakia in 1968. Moreover, the *gltA* gene fragments of *R. slovaca* from rodent-attached larvae of *D. marginatus* showed 99.11-99.12% similarity with at least 20 *R. slovaca* isolates (e.g. MH064455-MH064462, KY940286, CP003375, EU853832 and others) from *Dermacetor marginatus* ticks from Europe and Russia. One nucleotide sequence of *ompB* gene fragment from a questing male of *D. marginatus* showed 99.68-99.84% similarity with 12 isolates of *R. slovaca* from *Dermacentor* spp. ticks collected in China, the USA and/or Europe (e.g. MF002539, MF002538, KR559553, JX683122, CP003375, CP002428, HQ232242, AF123723 and others). Similarly, the sequence of *ompB* gene fragment from the rodent-attached larva of *D. marginatus* was 100% identical with at least 11 isolates of *R. slovaca* from the GenBank database (e.g. MG973876, MF002539, KR559553, KM587633, CP003375, MG973868 and others). The obtained sequences of the *sca4* gene fragment from questing and rodent-attached *D. marginatus* were 100% identical with the type strains of *R. slovaca* (CP003375, CP002428). The amplification of the *ompA* gene fragment of *R. slovaca* from questing and rodent-attached ticks failed.

Out of 34 *R. raoultii* positive DNA samples from questing ticks altogether 10 samples (3 larvae of *H. concinna*, 1 female of *D. reticulatus*, 3 males and 3 females of *D. marginatus*) were sequenced. Seven out of ten sequences were 100% identical. Three sequences (MK792601, MK792602, MK792604) carried a single nucleotide polymorphism each, and the similarity between these three sequences and the subset of the remaining seven identical sequences was 99.7%. Seven identical sequences of the *gltA* gene of *R. raoultii* from questing larvae of *H. concinna* and a *D. marginatus* female (MK792595-MK792600 and MK792603) showed 100% identity with *R. raoultii* strain ST-28 (KR131756) identified in *Ixodes persulcatus* in China and/or 99.41-99.42% similarity with *R. raoultii* (JQ792112) from *Dermacentor niveus* from China, *R. raoultii* (MH267733) from human blood and/or *R. raoultii* (MH064454) from *D. marginatus* from Italy. Three nucleotide sequences of the *R. raoultii gltA* gene, 2 from *H. concinna* questing larvae and one from a *D. reticulatus* male, carried a single nucleotide polymorphism each within the amplified *gltA* gene fragment and were 99.70% similar with *R. raoultii* (KR131756) from *I. persulcatus* from China, and/or

99.12% similar with *R. raoultii* (JQ792112) from *Dermacentor niveus* or *R. raoultii* (MH267733) from a Chinese human patient.

The *gltA* gene fragments of *R. raoultii* from rodent-attached larvae of *D. reticulatus* and *D. marginatus* were 100% identical with *R. raoultii* (KR131756) from *I. persulcatus* from China. A partial nucleotide sequence of the *ompA* gene fragment from a questing male of *D. marginatus* and *D. reticulatus* female showed 100% identity with six *R. raoultii* isolates from *Dermacentor* spp. ticks from all over Europe (e. g. MF166732, MF166730, MF166729, KX506737, HM161792, HM161789). Amplification of the *ompA* gene fragment–failed. Partial sequences of the *ompB* gene of *R. raoultii* from a questing female of *D. reticulatus* showed 100% identity with at least 40 *R. raoultii* isolates from mainly *Dermacentor* ticks from all over Europe and China (e. g. MG973880, MG973878, HQ232252-HQ232258, EU036984 and others). Similarly, *ompB* gene fragment of *R. raoultii* from rodent-attached larvae of *D. reticulatus* showed 100% identity with at least 50 *R. raoultii* isolates mainly from *Dermacentor* ticks from Europe, Russia, Asia and/or China (e. g. MG973877, KY073128, CP019435, KU310592, CP010969, JN242189, HQ232261-HQ232264, HQ232277, FN651764, EU036984 and others).

Seven unspecified *Rickettsia* spp. were detected in larvae and nymphs of *H. inermis* and *I. ricinus* ticks removed from *A. flavicollis*, *A. agrarius* and *M. arvalis* from the natural habitat of the Slovak Karst region, respectively. The occurrence of *R. helvetica* in *I. ricinus* as well as *R. monacensis* in *I. ricinus* was found to be statistically significant ($p < 0.0001$). In total, 56 out of 60 nucleotide sequences from rodent-attached *I. ricinus* ticks were determined as one of these two rickettsial species. A similar statistical significance ($p < 0.0001$) of the occurrence the pathogen in tick species was confirmed in the case of *R. slovaca*/*R. raoultii* and *Dermacentor* spp. (27 out of 28 *Dermacentor* spp. ticks carried *R. raoultii* or *R. slovaca*). The statistical analysis confirmed the significance of the occurence *Rickettsia* spp. in speific tick species.

3.3. The phylogenetic analysis of SFG rickettsiae from questing and rodent-attached *Ixodid ticks removed from small mammals*

The phylogenetic analysis of SFG rickettsiae obtained from questing as well as rodent-attached ticks removed from small mammals in this study was inferred using the nucleotide sequences of the *gltA* gene fragment encoding citrate synthase. Sequences of the *gltA* gene portion from different rickettsial species isolated in this study as well as homologous sequences of SFG rickettsiae and/or type strains retrieved from the GenBank database were

used for phylogeny tests. Two phylogenetic trees were constructed in order to show the identity of rickettsiae obtained in this study and to illustrate the relationships between the different species within the SFG.

Altogether, 51 nucleotide sequences of the *Rickettsia* spp. *gltA* gene fragment obtained in this study from questing ticks, and homologous sequences from the GenBank database with a length of 326 bp, were used for phylogenetic analysis (Figure 1). All *R. helvetica* isolates obtained in this study from questing ticks collected at the three different sampling sites were identical, and created a single well-supported clade together with other *R. helvetica* isolates from Europe and/or Russia. The second clade includes sequences of *R. monacensis* from ticks collected from vegetation in all three studied areas, and they cluster together with the *R. monacensis* Munich type strain (LN794217) and/or other *R. monacensis* isolates from Europe (e.g. the Sigurta isolate from Italy/MH589996 and/or the SK1 isolate from Slovakia/KC996728). *R. slovaca* from questing *D. marginatus* (MK792605) is located within the clade containing 2 type strains of *R. slovaca* with the completely sequenced genome, 13-B strain (CP002428) and *R. slovaca* strain D-CWPP (CP003375).

As mentioned above, altogether 10 nucleotide sequences of the *R. raoultii gltA* gene fragment were used for phylogenetic analysis. Three sequences were identical with each other but different from the subset of the remaining seven identical sequences. This is also obvious from the phylogenetic tree. All obtained nucleotide sequences of *R. raoultii* clustered together in the tree with the *R. raoultii* type strains Khabarovsk (CP010969) and/or IM16 strain (CP019435). However, within this cluster, these 10 *R. raoultii* sequences are divided into two separate groups. They all are isolated from *Dermacentor* spp. and/or *Haemaphysalis concinna* ticks from the same sampling site located in the Slovak Karst National park, near the village Hrhov, which is considered to be a biodiversity hotspot with the sympatric occurrence of at least six tick species. This fact, together with the presence of a wide spectrum of wild animal hosts, could contribute to the existence of diverse strains and/or the presence of intraspecific genetic variations within the genomes of some pathogens.

In total, 84 nucleotide sequences of rickettsial *gltA* gene fragment obtained from ticks removed from small mammals as well as homologous sequences from GenBank, with a length of 327 bp, were included in phylogenetic analysis (Figure 2). Similarly, the individual species of rickettsiae obtained in this study created four well-supported clades. All but one originally obtained *R. helvetica* sequences are identical with each other and with the *R. helvetica* type strains from Europe (MG190375, GQ925824) and Russia (KP866150, KU310588), and they are placed together within a single clade.

The second clade contains all *R. monacensis* isolates from the ticks removed from different species of small mammals and the homologous sequences of *R. monacensis* from the GenBank database. The third cluster includes sequences of *R. raoultii* from rodent-attached ticks. All but one are 100% identical with each other, and they cluster with the *R. raoultii* strains IM16 and/or Khabarovsk strain (CP010969) with completely sequenced genomes. The fourth clade within the tree is created by the group of *R. slovaca gltA* nucleotide sequences, all obtained from *Dermacentor marginatus* ticks removed from yellow-necked mice (*A. flavicollis*) from the Slovak Karst area.

Beside the genotyping of the rickettsiae species from the study, our intention was, on the basis of the data obtained in this study as well as those previously published, to create a schematic diagram of the relationships between the different species of rickettsiae and the arthropods involved in their circulation in natural foci. Considering that some other rickettsiae also show specific relationships with certain invertebrate species, specifically *R. felis*, *R. africae* and/or *R. conorii*, we included nucleotide sequences of these species from GenBank in both phylogenetic analyses.

4. Discussion

In total, 2160 ixodid ticks were tested for the presence of rickettsial DNA. The overall prevalence of rickettsiae was 15.6% (338/2160). Rickettsial DNA was confirmed in 20% (180/900) of rodent-attached ticks and in 12.5% (158/1260) of questing ticks. The results of this study confirmed the presence of rickettsial DNA in six tick species (*I. ricinus*, *I. trianguliceps*, *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *H. concinna* and *H. inermis*). The highest prevalence of *Rickettsia* spp. in questing (14.5%) and rodent-attached ticks (21.5%) was confirmed in the natural habitat of the Slovak Karst region, followed by an urban habitat and a suburban habitat for both questing and rodent-attached ticks. The prevalence of rickettsiae was not counted for rodent-attached ticks from the Botanical garden sampling site because of the low number of positive samples (Table 1, 2). Only *I. ricinus* ticks were found in the urban habitat, and this species seems to be the most significant tick of rickettsiae in the central area.

Based on the sequencing of four genetic markers (*gltA*, *ompA*, *ompB* and *sca4*) we confirmed the presence of *R. helvetica*, *R. monacensis*, *R. raoultii*, *R. slovaca* and *Rickettsia* sp. in ixodid ticks. We found that *R. slovaca* is bound to tick species belonging to the genus *Dermacentor*, mainly *D. marginatus*, and *R. raoultii* is frequently found in both *D. reticulatus* and *D. marginatus* but also in tick species from the genus *Haemaphysalis*. In our study, the sympatric occurrence of six ticks species – *I. ricinus*, *I. trianguliceps*, *D. marginatus, D.*

reticulatus, H. concinna and *H. Inermis*, was recorded in the natural habitat of the Slovak Karst region. Similarly, a relatively wide spectrum of *Ixodes* spp., *Dermacentor* spp. and *Haemaphysalis* spp. was recorded at this location in the past (Nosek, 1971, 1972; Hubálek, 1986, and others).

Rickettsia slovaca and *R. raoultii* have thus far not been found in any *Ixodes* spp. tick from this area. In a previous study carried out in this region, one *A. flavicollis* tested positive for *R. slovaca* (Heglasová et al., 2018). Similarly, *R. slovaca* and *R. raoultii* are commonly found in *Dermacentor* spp. and *Haemaphysalis* spp. ticks in Eurasian regions (Sekeyová et al., 1998; Raoult et al., 2002; Oteo et al., 2004; Ibarra et al., 2005; Boldiš et al., 2008; Mediannikov et al., 2008; Špitalská et al., 2012; Földvári et al., 2013; Radzijevskaja et al., 2015; Parola et al., 2005, 2009, 2013; Minichová et al., 2017, and others). Based on our own results, obtained during several years of the research of rickettsiae, as well as on the results of other authors, we assume the occurrence of *R. slovaca* and *R. raoultii* mainly in habitats with the sympatric occurrence of *Dermacentor* spp. and *Haemaphysalis* spp. ticks.

However, in this study, *R. raoultii* was also detected in one rodent-attached larva of *I. trianguliceps* removed from a host captured in the suburban area without the occurrence of questing *Dermacentor* spp. and/or *Haemaphysalis* spp. ticks. In this case, we assume the presence of infection in larva obtained from the host or transovarial transmission of rickettsiae from the tick female. According to our knowledge, this is the first evidence of *R. raoultii* infection in the endophilic tick's species *I. trianguliceps*.

The most prevalent *R. helvetica* was detected in all developmental stages of *I. ricinus, D. reticulatus* and *H. concinna* collected all studied sites in eastern Slovakia. The most common tick species, *I. ricinus* represents a potential vector and natural reservoir of *R. helvetica*, which is responsible for the several cases of human rickettsioses diagnosed in Slovakia so far (Parola et al., 2005; Sekeyová et al., 2012b; Švehlová et al., 2014; Špitalská et al., 2014, 2016; Minnichová et al., 2017). In many other European countries and Japan, *R. helvetica* has also been confirmed in *Ixodes arboricola* and *Ixodes redikorzevi* (Mărcuțan et al., 2016), *Ixodes hexagonus* (Nijhof et al., 2007), *Ixodes acuminatus* and *Ixodes ventalloi* (Tomassone et al., 2013), *Ixodes persulcatus* (Parola et al., 2005), *Ixodes ovatus* and *Ixodes monospinosus* (Fournier et al., 2002), *H. inermis, H. concinna* and *H. punctata* (Hornok et al., 2010) and *D. reticulatus* (Dobec et al., 2009; Tijsse-Klasen et al., 2013). *Rickettsia monacensis* was identified in larvae and nymphs of *I. ricnius* in all studied habitats. The rickettsia has also been detected in *I. arboricola* and *H. concinna* in Romania (Mărcuțan et al., 2016), and recently also in the flea *Ctenophthalmus agyrtes* in Lithuania (Radzijevskaja et

al., 2018).

In this study, the most diverse spectrum of rickettsiae species (*R. helvetica*, *R. monacensis*, *R. slovaca*, *R. raoultii*) was observed in the natural habitat of the Slovak Karst region. It is obvious that the diversity and/or composition of tick species influence the diversity of pathogens and parasites in the studied locality. In the natural habitat, we found several species of rickettsiae in different tick species removed from one rodent host. *Rickettsia raoultii* and *R. slovaca* were identified in *D. marginatus* from rickettsia-negative *A. flavicollis*. *Rickettsia helvetica* and *R. monacensis* were detected in *I. ricinus* larvae from rickettsia-negative *A. agrarius* and *M. glareolus*, respectively. Due to the lack of infection in the host, we assume that ticks obtained the infection after transovarial transmission from a tick female to the offspring. For the above-mentioned species of rickettsiae, transovarial and transstadial transmission are quite common (Parola et al., 2013; Obiegala et al., 2017).

Several years of the research on rickettsiae have shown that most species of rickettsiae are detected in specific arthropods. The results of a Japanese study by Thu et al. (2019) suggested that most rickettsiae have a limited host range and are maintained in nature by certain tick species. One group of rickettsiae, includes species such as *R. africae*, *R. felis*, *R. helvetica*, *R. monacensis*, or *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia massiliae* and *Rickettsia sibirica*. These are often detected in several different species of ticks belonging to different genera and/or subfamily, and moreover with fleas and mites. These rickettsiae seem to have less specific preferences for potential vectors. The second group includes rickettsiae which seem to be detected mainly in one tick species. For instance, *Rickettsia conorii* sub. *conorii* is detected especially in the *R. sanguineus* sensu lato tick (Socolovschi et al., 2009; Parola et al., 2013). Finally, rickettsial species in the last group, including *R. slovaca* and *R. raoultii*, are detected mainly in several tick species within the same genus, namely with *D. marginatus* and *D. reticulatus*, across Europe. Socolovschi et al. published similar findings in 2009. The data suggest that specific species of rickettsiae tend to occur in certain tick species or arthropods.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

The study was supported by the projects VEGA 1/0084/18 and APVV-16-0518.

References

Adem, P.V., 2019. Emerging and re-emerging rickettsial infections. Semin. Diagn. Pathol. 36, 146–151.

Anděra, M., Horáček, I., 2005. Poznávame Naše Savce. 2. Přepracované vydání. Sobotáles, Praha.

Boldiš, V., Kocianová, E., Štrus, J., Tušek-Žnidarič, M., Sparagano, O.A., Štefanidesová, K., Špitalská, E., 2008. Rickettsial agents in Slovakian ticks (Acarina, Ixodidae) and their ability to grow in Vero and L929cell lines. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1149, 281–285.

Černý, V., 1972. The tick fauna of Czechoslovakia. Folia Parasitol. 19, 87–92.

Dobec, M., Golubic, D., Punda-Polic, V., Kaeppeli, F., Sievers, M., 2009. *Rickettsia helvetica* in *Dermacentor reticulatus* ticks. Emerg. Infect. Dis. 15, 98–100.

Estrada-Peña, A., Mihalca, A.D., Petney, T.N., 2017. Ticks of Europe and North Africa: a Guide to Species Identification. Springer, Switzerland.

Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution. 39, 783–791.

Filippova, N.A., 1977. Ixodid Ticks of the Subfamily Ixodinae. Fauna SSSR, New Ser.

Földvári, G., Rigó K., Lakos, A., 2013. Transmission of *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia raoultii* by male *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* ticks to humans. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 76, 387–389.

Fournier, P.E., Fujita, H., Takada, N., Raoult, D., 2002. Genetic identification of rickettsiae isolated from ticks in Japan. J. Clin. Microbiol. 40, 2176–2181.

Heglasová, I., Víchová, B., Kraljik, J., Mošanský, L., Miklisová, D., Stanko, M., 2018. Molecular evidence and diversity of the spotted-fevergroup *Rickettsia* spp. in small mammals from natural, suburban and urban areas of Eastern Slovakia. Ticks Tick Borne Dis. 9, 1400–1406.

Hornok, S., Meli, M.L., Perreten, A., Farkas, R., Willi, B., Beugnet, F., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., 2010. Molecular investigation of hard ticks (Acari: Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. Vet. Microbiol. 140, 98–104.

Hubálek, Z., 1986. Comparative biogeography of Bhanja virus in Europe. Acta Sc. Nat. Brno. 20, 1–50.

Choi ,Y.J., Jang, W.J., Ryu, J.S., Lee, S.H., Park, K.H., Paik, H.S., Koh, Y.S., Choi, M.S., Kim, I.S., 2005. Spotted fever group and typhus group rickettsioses in humans, South

Korea. Emerg. Infect. Dis. 11, 237–244.

Ibarra, V., Portillo, A., Santibáñez, S., Blanco, J.R., Pérez-Martínez, L., Márquez, J., Oteo, J.A., 2005. DEBONEL/TIBOLA: is *Rickettsia slovaca* the only etiological agent? Ann. N. Y. Acad. Sci. 1063, 346–348.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Mol. Biol. Evol. 35, 1547–1549.

Mărcuţan, I.D., Zsuzsa, K., Ionică, A.M., D'Amico, G., Mihalca, A.D., Vasile, C., Sándor A.D., 2016. Spotted fever group rickettsiae in ticks of migratory birds in Romania. Parasit Vectors. 9, 294.

Mediannikov, O., Matsumoto, K., Samoylenko, I., Drancourt, M., Roux, V., Rydkina, E., Davoust, B., Tarasevich, I., Brouqui, P., Fournier, P.E., 2008. *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with *Dermacentor* ticks in Europe and Russia. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58, 1635–1639.

Merhej, V., Raoult, D., 2010. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. Biol. Rev. 86, 379–405.

Minichová, L., Hamšíková, Z., Mahríková, L., Slovák, M., Kocianová, E., Kazimírová, M., Škultéty, Ľ., Katarína Štefanidesová, K., Špitalská, E., 2017. Molecular evidence of *Rickettsia* spp. in ixodid ticks and rodents in suburban, natural and rural habitats in Slovakia. Parasit. Vectors 10, 1–12.

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.

Nosek, J., 1971. The ecology, bionomics and behaviour of *Haemaphysalis* (*Aboimisalis*) *punctata* tick in central Europe. Z Parasitenkd. 37, 198–210.

Nosek, J., 1972. The ecology and public health importance of *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks in central Europe. Folia Parasitol. (Praha). 19, 93–102.

Obiegala, A., Król, N., Oltersdorf, C., Nader, J., Pfeffer, M., 2017. The enzootic life-cycle of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) and tick-borne rickettsiae: an epidemiological study on wild-living small mammals and their ticks from Saxony, Germany. Parasit Vectors.

10, 115.

Oteo, J.A., Ibarra, V., Blanco, J.R., Martínez de Artola, V., Márquez, F.J., A. Portillo, A., Raoult, D., Anda, P., 2004. Dermacentor-borne necrosis erythema and lymphadenopathy: clinical and epidemiological features of a new tick-borne disease. Clin. Microbiol. Infect. 10, 327–331.

Parola, P., Paddock, C.D., Raoult, D., 2005. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. Clin. Microbiol. Rev. 18, 719–756.

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, 657–702.

Parola, P., Rovery, C., Rolain, J.M., Brouqui, P., Davoust, B., Raoult, D., 2009b. *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii* in tick-borne rickettsioses. Emerg. Infect. Dis. 15, 1105–1108.

Parola, P., Socolovschi, C., Raoult, D., 2009a. Deciphering the relationships between *Rickettsia conorii conorii* and *Rhipicephalus sanguineus* in the ecology and epidemiology of Mediterranean spotted fever. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1166, 49–54.

Pelikán, J., Gaisler, J., Rődl, P., 1979. Naši savci. Academia, Praha.

Portillo, A., de Sousa, R., Santibáñez, S., Duarte, A., Edouard, S., Fonseca, I.P., Marques, C., Novakova, M., Palomar, A.M., Santos, M., Silaghi, C., Tomassone, L., Zúquete, S., Oteo, J.A., 2017. Guidelines for the detection of *Rickettsia* spp. Vector Borne Zoonotic Dis. 17, 23–32.

Radzijevskaja, J., Kaminskienė, E., Lipatova, I., Mardosaitė-Busaitienė, D., Balčiauskas, L., Stanko, M., Paulauskas, A., 2018. Prevalence and diversity of Rickettsia species in ectoparasites collected from small rodents in Lithuania. Parasit Vectors. 11, 375.

Radzijevskaja, J., Paulauskas, A., Aleksandraviciene, A., Jonauskaite, I., Stanko, M., Karbowiak, G., Peťko, B., 2015. New records of spotted fever group rickettsiae in Baltic region. Microbes Infect. 17, 874–878.

Raoult, D., Berbis, P., Roux, V., Xu, W., Maurin M., 1997. A new tick-transmitted disease due to *Rickettsia slovaca*. Lancet. 350, 112–113.

Raoult, D., Lakos, A., Fenollar, F., Beytout, J., Brouqui, P., Fournier, P.E., 2002. Spotless

rickettsiosis caused by *Rickettsia slovaca* and associated with *Dermacentor* ticks. Clin. Infect. Dis. 34, 1331–1336.

Raoult, D., Roux, V., 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev. 10, 694–719.

Regnery, R.L., Spruill, C.L., Plikaytis, B.D., 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. J. Bacteriol. 173, 1576–1589.

Rijpkema, S., Golubic, D., Moelkenboer, M., Verbeek-De Kruif, N., Schellekens, J., 1996. Identification off our genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. Exp. Appl. Acarol. 20, 23–30.

Roux, V., Fournier, P.E., Raoult, D., 1996. Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. J. Clin. Microbiol. 34, 2058–2065.

Roux, V., Raoult, D., 2000. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50, 1449–1455.

Řeháček, J., Úrvolgyi, J., Kocianová, E., Sekeyová, Z., Vavreková, M., Kováčová, E., 1991. Extensive examination of different tick species for infestation with *Coxiella burnetii* in Slovakia. Eur. J. Epidemiol. 7, 299–303.

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406–425.

Sekeyová, Z., Mediannikov, O., Roux, V., Subramanian, G., Špitalská, E., Krištofík, J., Darolová, A., Raoult D., 2012a. Identification of *Rickettsia africae* and *Wolbachia* sp. in *Ceratophyllus garei* fleas from passerine birds migrated from Africa. Vector Borne Zoonotic Dis. 12, 539–543.

Sekeyová, Z., Mediannikov, O., Subramanian, G., Kowalczewska, M., Quevedo-Diaz, M., Kocianová, E., Raoult, D., 2012b. Isolation of *Rickettsia helvetica* from ticks in Slovakia. Acta Virol. 56, 247–252.

Sekeyová, Z., Roux, V., Raoult, D., 2001. Phylogeny of *Rickettsia* spp. inferred by comparing sequences of 'gene D', which encodes an intracytoplasmic protein. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 1353–1360.

Sekeyová, Z., Roux, V., Xu, W., Řeháček, J., Raoult, D., 1998. *Rickettsia slovaca* sp. nov., a member of the spotted fever group rickettsiae. Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 1455–1462.

Sekeyová, Z., Socolovschi, C., Špitalská, E., Kocianová, E., Boldiš, V., Diaz, M.Q., Berthová, L., Bohacsová, M., Valáriková, J., Fournier, P.E., Raoult, D., 2013. Update on rickettsioses in Slovakia. Acta Virol. 57, 180–199.

Sládek, J., Mošanský, A., 1985. Cicavce Okolo Nás. Osveta, Martin.

Slovák, M., 2014. Obrázkový kľúč lariev a nýmf kliešťov (Acari: Ixodida) fauny Slovenska. Entomofauna carpathica. 26, 12–18.

Socolovschi, C., Mediannikov, O., Raoult, D., Parola, P., 2009. The relationship between spotted fever group Rickettsiae and ixodid ticks. Vet. Res. 40, 34.

Špitalská, E., Boldiš, V., Derdáková, M., Selyemová, D., Rusňáková Tarageľová, V., 2014. Rickettsial infection in *Ixodes ricinus* ticks in urban and natural habitats of Slovakia. Ticks Tick Borne Dis. 5, 161–165.

Špitalská, E., Boldiš, V., Mošanský, L., Sparagano, O., Stanko, M., 2015. Rickettsia species in fleas collected from small mammals in Slovakia. Parasitol. Res. 114, 4333–4339.

Špitalská, E., Stanko, M., Mošanský, L., Kraljik, J., Miklisová, D., Mahríková, L., Bona, M., Kazimírová, M., 2016. Seasonal analysis of *Rickettsia* species in ticks in an agricultural site of Slovakia. Exp. Appl. Acarol. 68, 315–324.

Špitalská, E., Štefanidesová, K., Kocianová, E., Boldiš, V., 2012. *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia raoultii* in *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* ticks from Slovak Republic. Exp. Appl. Acarol. 57, 189–197.

Švehlová, A., Berthová, L., Sallay, B., Boldiš, V., Sparagano, O.A.E., Špitaská, E., 2014. Sympatric occurrence of *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* ticks and *Rickettsia* and *Babesia* species in Slovakia. Ticks Tick Borne Dis. 5, 600–605.

Tamura, K., 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. Mol. Biol. Evol. 9, 678–687.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30, 2725–2729.

Thu, M.J., Qiu, Y., Matsuno, K., Kajihara, M., Mori-Kajihara, A., Omori, R., Monma, N., Chiba, K., Seto, J., Gokuden, M., Andoh, M., Oosako, H., Katakura, K., Takada, A., Sugimoto, Ch., Isoda, N., Nakao, R., 2019. Diversity of spotted fever group rickettsiae and their association with host ticks in Japan. Sci. Rep. 9, 1500.

Tijsse-Klasen, E., Hansford, K.M., Jahfari, S., Phipps, P., Sprong, H., Medlock J.M., 2013. Spotted fever group rickettsiae in *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis punctata* ticks in the UK. Parasit Vectors. 6, 212.

Tomassone, L., Grego, E., Auricchio, D., Iori, A., Giannini, F., Rambozzi, L., 2013. Lyme borreliosis spirochetes and spotted fever group rickettsiae in ixodid ticks from Pianosa Island, Tuscany Archipelago, Italy. Vector Borne Zoonotic Dis.13, 84–91.

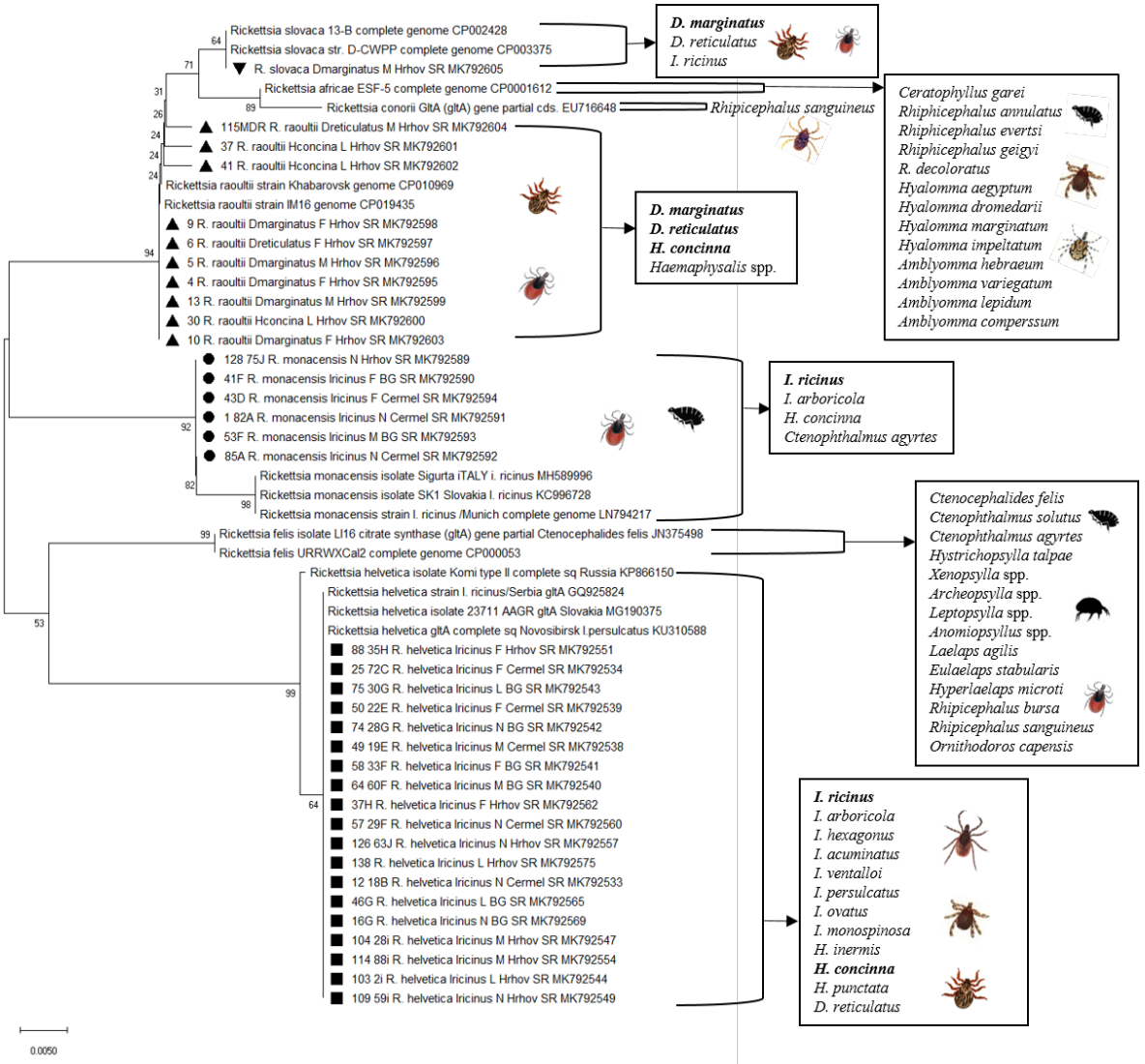


Figure 1. Evolutionary relationships of SFG *Rickettsiae* from questing ticks with corresponding arthropods responsible for their transmission.

The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches (Felsenstein, 1985). The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances are in the units of the number of base substitutions per site. The rate variation among sites was modeled with a gamma distribution (shape parameter = 1). This analysis involved 51 nucleotide sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There were a total of 326 positions in the final dataset. The vector species from which rickettsial DNA has been isolated in the present study are in bold in the corresponding boxes for both trees.

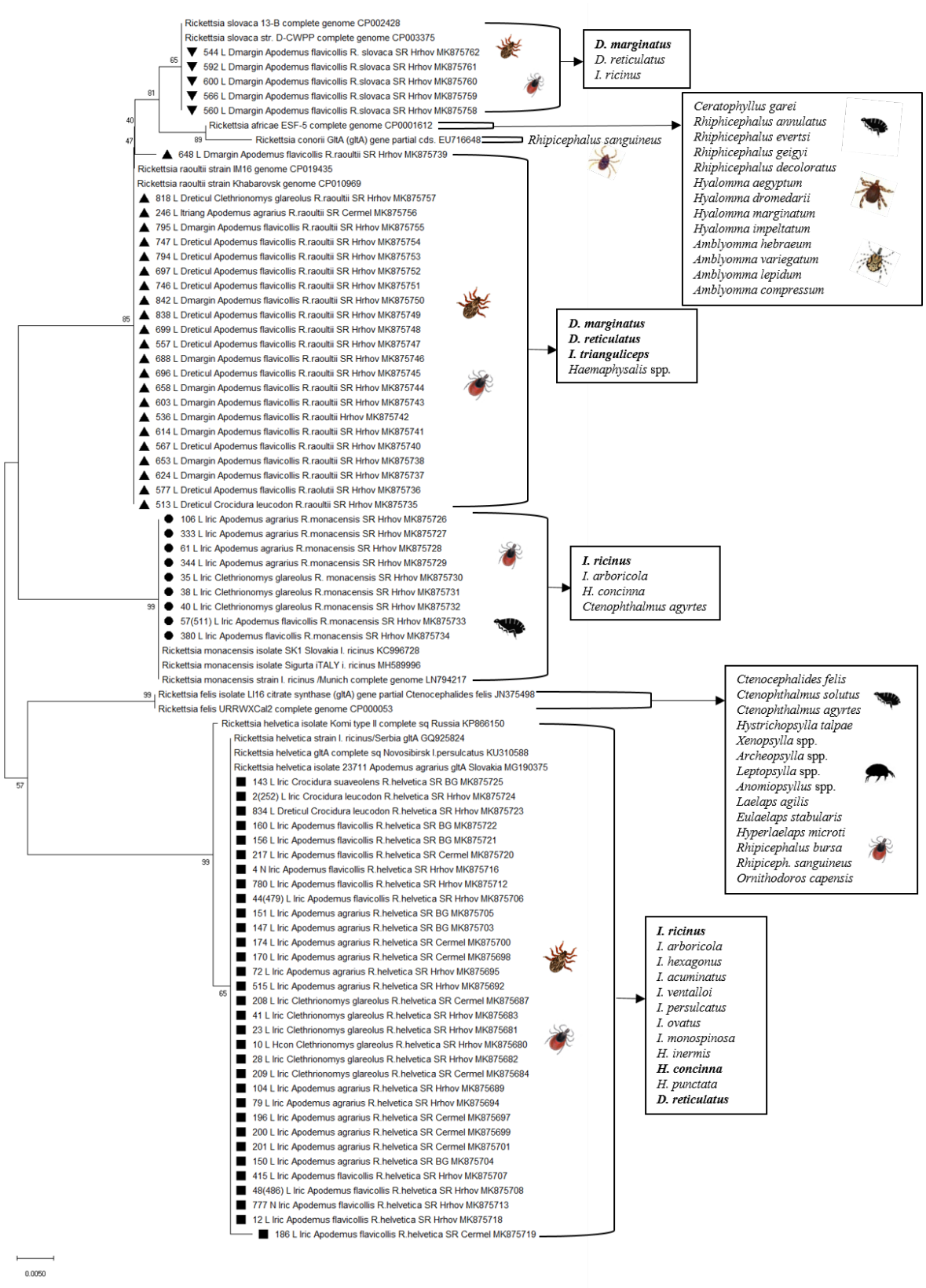


Figure 2. Evolutionary relationships of SFG *Rickettsiae* from engorged ticks removed from small mammals with corresponding arthropods involved in their transmission.

The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches (Felsenstein, 1985). The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances are in the units of the number of base substitutions per site. This analysis involved 84 nucleotide sequences. All ambiguous positions were removed for each sequence pair (pairwise deletion option). There were a total of 327 positions in the final dataset.

Table 1
Prevalence[a] of *Rickettsia* spp. in questing ticks in three habitat types in Slovakia.

Habitat /tick stage	*I. ricinus*		*D. reticulatus*		*D. marginatus*		*H. concinna*		*H. inermis*		Total
Slovak Karst (natural)	M F N L	10/67 8/44 37/245 5/67	M F N L	1/7 1/5 0 0	M F N L	4/4 4/8 0 0	M F N L	0/3 0/2 0/10 5/30	M F N L	0/10 0/17 0 0	75/519 (14.5%)[a]
Čermeľ (suburban)	M F N L	8/62 15/92 34/383 0/9	-		-		-		-		57/546 (10.4%)
Botanical garden (urban)	M F N L	6/22 2/13 13/106 5/54	-		-		-		-		26/195 (13.3%)
Total	143/1164		2/12		8/12		5/45		0/27		158/1260 (12.5%)

No. of *Rickettsia*-positive/no. of tested ticks

Table 2
Prevalence[a] of *Rickettsia* spp. in rodent-attached ticks in three habitat types in Slovakia.

Habitat /tick stage	*I. ricinus*		*I. trianguliceps*		*D. reticulatus*		*D. marginatus*		*H. concinna*		*H. inermis*		Total
Slovak Karst (natural)	N L	5/20 84/441	N L	0/2 0/16	N L	- 20/87	N L	- 46/119	N L	- 1/4 8	N L	1/1 1/2	158/736 (21.5%)[a]
Čermeľ (suburban)	N L	0/5 15/131	N L	0/4 1/2	-		-		-		-		16/142 (11.3%)
Botanical garden (urban)	N L	0/0 6/22	-		-		-		-		-		6/22 (27.3%)
Total	110/619		1/24		20/87		46/119		1/48		2/3		180/900 (20%)

No. of *Rickettsia*-positive/no. of tested tick

Table 3 Different *Rickettsia* spp. in questing ticks.

Ticks	No. of *rickettsia*-positive ticks/no. of tested ticks	*Rickettsia* spp.
Ixodes ricinus	143/1164	*R. helvetica,* (n = 56) *R. monacensis* (n = 6) *Rickettsia* sp. (n = 2)
Dermacentor reticulatus	2/12	*R. raoultii* (n = 2)
Dermacentor marginatus	8/12	*R. slovaca,*(n = 1) *R. raoultii* (n = 6)
Haemaphysalis concinna	5/45	*R. raoultii* (n = 3) *R. helvetica* (n = 1)
Haemaphysalis inermis	0/27	-

Table 4 Different *Rickettsia* spp. in ticks from small mammals.

Ticks	No. of *rickettsia*-positive ticks/no. of tested ticks	*Rickettsia* spp.
Ixodes ricinus	110/619	*R. helvetica* (n = 46) *R. monacensis* (n = 10) *Rickettsia* sp. (n = 3)
Ixodes trianguliceps	1/24	*R. raoultii* (n = 1)
Dermacentor reticulatus	20/87	*R. raoultii* (n = 12) *R. helvetica* (n = 1)
Dermacentor marginatus	46/119	*R. raoultii* (n = 10) *R. slovaca* (n = 5)
Haemaphysalis concinna	1/48	*R. helvetica* (n = 1)
Haemaphysalis inermis	2/3	*Rickettsia* sp. (n = 2)

Článok 3.

Detection of *Rickettsia* spp. in fleas collected from small mammals in Slovakia, Central Europe

Ivana Heglasová[1,2,*], Bronislava Víchová[1], Michal Stanko[1,3]

[1] *Institute of Parasitology, Slovak Academy of Sciences, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovakia*

[2] *Department of Zoology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská dolina B-1, 842 15 Bratislava, Slovakia*

[3] *Institute of Zoology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovakia*

∗Corresponding author: Ivana Heglasová, Institute of Parasitology, Slovak Academy of Sciences, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovakia, heglasova@saske.sk

Bronislava Víchová (vichova@saske.sk); Michal Stanko (stankom@saske.sk)

Abstract

The present survey is aimed at investigation of species composition of fleas removed from small terrestrial mammals captured in rural, suburban and urban-type of habitat and molecular screening of the presence and diversity of *Rickettsia* species in collected ectoparasites. In total, 279 fleas (Siphonaptera) belonging to 9 species of 2 families, Ceratophyllidae and Hystrichopsyllidae, were collected from 115 (46 %) out of 250 trapped small mammals of eight species (*Apodemus agrarius*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus uralensis*, *Myodes glareolus*, *Microtus arvalis*, *Microtus subterraneus*, *Crocidura leucodon* and *Sorex minutus*). *Rickettsia* spp. were found in 2.5 % (7/279) of tested fleas, namely in *Ctenophthalmus agyrtes*, *Ctenophthalmus solutus, Ctenophthalmus uncinatus, Megabothris turbidus* and *Amalareus penicilliger*. *Rickettsia felis*, *Rickettsia helvetica* and unidentified *Rickettsia* species were detected in fleas infesting small mammals in Eastern Slovakia. The results of the study suggest that some species of rickettsiae have a different range of arthropod vectors.

Key words: fleas, *Rickettsia felis*, *Rickettsia helvetica*, small mammals, Slovakia

Introduction

Rickettsiae are obligate intracellular Gram-negative bacteria from the order

Rickettsiales with a worldwide distribution. Many species are responsible for serious diseases in humans and other mammals (Raoult and Roux, 1997; Parola et al., 2013). They are transmitted via arthropod vectors such as ticks, mites, fleas and lice (Raoult and Roux, 1997; Weinert, 2009; Miťková et al., 2015). Recent studies have shown that genus *Rickettsia* could be divided into several different phylogenetic groups: the spotted fever group (e.g. *R. africae*, *R. sibirica*, *R. slovaca*); the typhus group (*R. typhi, R. prowazekii*); transitional group (*R. akari* and *R. felis*); and as own groups *R. helvetica*, *R. canadensis* and *R. bellii* (Murray et al., 2016).

In Slovakia, six species of rickettsiae have thus far been identified in vectors (*Rickettsia slovaca, Rickettsia raoultii, Rickettsia monacensis* strains IRS3 and IRS4, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia africae* and *Rickettsia felis*) (Sekeyová et al., 2012, 2013; Špitalská et al., 2015). In this region, *R. africae*, *R. felis* and *R. helvetica* have been detected in fleas. *Rickettsia africae* the etiological agent of African tick-bite fever was identified in *Ceratophyllus garei* flea collected from migrating bird species, *Acrocephalus scirpaceus*, during spring migration from Africa to Europe (Sekeyová et al., 2012). In the world, *Rickettsia africae* has also been detected in several species of ticks (*Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Haemaphysalis* or *Amblyomma*) (Mediannikov et al., 2012; Orkun et al., 2014).

In Slovakia, *R. felis* was detected in *Ctenophthalmus solutus* flea collected from *Apodemus agrarius* (Špitalská et al., 2015). *Rickettsia felis*, the causative agent of flea-borne spotted fever, also known as cat flea typhus, is primarily associated with the cat flea *Ctenocephalides felis*, which is the main arthropod reservoir as well as the vector (Abdad et al., 2011). *Rickettsia felis* has also been identified molecularly in other species of fleas, ticks, mites, lice, and mosquitoes (*Aedes* sp.) (Socolovschi et al., 2012; Brown and Macaluso, 2016). Members of the *genus Rickettsia* are primarily transmitted vertically, by transstadial and transovarial transmission, within a flea population. However, horizontal transmission of *R. felis* between cat fleas was also documented (Wedincamp and Foil, 2002; Hirunkanokpun et al., 2011).

Fleas are holometabolous insects with hematophagous imagos. They are significant ectoparasites of many mammals and birds but are mainly associated with wild small mammals (Krasnov, 2008). In previous surveys in Slovakia, more than 30 species of fleas infesting small mammals were recorded (Rosický, 1957; Jurík, 1962; Stanko, 1987, 1992 and others). Fleas are known vectors of various pathogens including the etiologic agents of plague (*Yersinia pestis*), bartonellosis (*Bartonella henselae*), and rickettsiosis (*Rickettsia*

typhi, *Rickettsia prowazeki*, *R. africae*, *R. felis*) (Raoult and Roux, 1997; Bitman et al., 2010). The host becomes usually infected by flea feces coming into contact with injured skin (Azad and Beard, 1998).

Recently, several studies regarding the fleas and rickettsiae they transmit were published in Slovakia (Sekeyová et al., 2012; Špitalská et al., 2015; Víchová et al., 2018). However, information on the diversity of rickettsiae in fleas in different regions of Slovakia is still limited. Therefore, the main aim of the present study was to screen fleas collected from small mammals which were captured in Eastern Slovakia (Central Europe), for the presence and diversity of *Rickettsia* spp. In this publication, examinations of fleas represent only one part of the complex results focused on the role of arthropods parasitic on small mammals in the circulation of rickettsia.

Material and methods

Fleas sampling

Fleas were collected from rodents and shrews at three sampling sites in Eastern Slovakia during the years 2014–2016. The sampling sites were described in detail in Heglasová et al. (2018). The first study site, a Botanical garden, with deciduous forest vegetation, is located in the center of Košice city (208 m a.s.l.; 48°446·84″N; 21°14′16·14″ E). It represents an urban habitat with a significant anthropogenic impact. The second site, Čermeľ valley, is characterized by the presence of mixed forest vegetation, with a predominance of beech, hornbeam, and spruce (208–600 m a.s.l.; 48°45′46·67″N; 21°8′8·17″E), and it represents a suburban habitat. The third site, with mixed forest vegetation and a predominance of beech, oak, and hornbeam, is located in the Slovak Karst National Park, near the Hrhov village (200–220 m a.s.l.,48°34.899N,20°46.743E), and it represents a rural habitat.

Live-trapping of small mammals was carried (two times per year) out during May/June and September/October in years from 2014 to 2016, respectively. Rodent sampling was described in detail in Heglasová et al. (2018). Captured small mammals were euthanized in accordance with the licenses of the Ministry of Environment of the Slovak Republic No. 4874/2011–2.2 and 4559/2015–2.3. Each rodent individual was checked for the presence of fleas. All collected fleas were stored in 70% ethanol until identification. The species and sex of fleas were determined based on morphological characteristics under a light microscope using the morphological keys and published descriptions (Rosický, 1957).

DNA extraction and molecular analyses

Fleas were washed with sterile water, dried on-air, transferred to individual tubes and crushed with a sterile scalpel. Genomic DNA was extracted individually from each flea using alkaline hydrolysis method (Rijpkema et al. 1996). All DNA samples were stored at -20˚C for further processing.

Subsequently, all DNA samples were screened for the presence of *Rickettsia* spp. by nested PCR (Polymerase Chain Reaction) amplification of the 381-bp long fragment of the citrate synthase gene (*gltA*), using the genus-specific primers RpCS.877p and RpCS.1258n (Regnery et al., 1991) and inner primer pair RpCS.896p and RpCS.1233n (Choi et al., 2005) resulting in 337-bp long PCR product. To further characterize *Rickettsia* species, chosen three out of seven *gltA* positive amplicons were subsequently analyzed for the presence of the fragments of another gene loci (*ompA* and *ompB*) encoding outer membrane proteins A and B, (Regnery et al., 1991; Roux et al., 1996; Roux and Raoult, 2000) with primers RR190.70F/RR190.701R and 120–2788/120–3599, respectively.

Rickettsia helvetica identification was based on the PCR amplification of the *gltA* and *ompB* genes, and *R. felis* was identified based on amplification of the *gltA, ompA* and *ompB* genes (Roux et al., 1996; Roux and Raoult, 2000; Portillo et al., 2017). After PCR analyses, all positive samples with amplified *gltA*, *ompA* and *ompB* gene fragments were purified using Isolate II PCR and Gel Kit (Bioline) and sequenced.

Accession Numbers of obtained nucleotide sequences

Nucleotide sequences of the fragments of *gltA* gene obtained in this study from fleas were submitted to the GenBank database under the following accession numbers: *R. felis* (MN276063), *R. helvetica* (MN276064, MN276065).

Results

Flea communities

In total, 279 fleas (Siphonaptera) belonging to nine species of two families, Ceratophyllidae, and Hystrichopsyllidae were screened for *Rickettsia* spp. The most frequent flea species was *Ctenophthalmus agyrtes* (n=105), followed by *Ctenophthalmus solutus* (n=63), *Ctenophthalmus assimilis* (n=49), *Megabothris turbidus* (n=17), *Amalareus penicilliger* (n=15), *Hystrichopsylla orientalis* (n=15), *Ctenophthalmus uncinatus* (n=12), *Doratopsylla dasycnema* (n=2) and *Nosopsyllus fasciatus* (n=1). The greatest abundance and diversity of the fleas removed from small mammals were detected in rural habitat of

Slovak Karst region with totally collected 169 fleas of 8 species, followed by suburban habitat, Čermeľ, with 97 fleas of 4 species, and urban area of Botanical Garden in the Košice city, with 13 fleas of 2 species. Two most common flea species (*C. agyrtes*, *C. solutus*) were detected in all surveyed regions (Table 1).

All 250 small mammals trapped in the previous study by Heglasová et al. (2018) were screened for the presence of fleas in this study. Totally, fleas were removed from 115 (46 %) out of 250 trapped small mammals belonging to eight species (*A. agrarius*, *A. flavicollis*, *A. uralensis*, *M. glareolus*, *M. arvalis*, *M. subterraneus*, *C. leucodon* and *S. minutus*).

The presence of Rickettsia spp. *in fleas*

The presence of rickettsiae was identified in *C. agyrtes*, *C. solutus, C. uncinatus, M. turbidus* and *A. penicilliger* fleas collected from *A. flavicollis, A. agrarius* and *M. glareolus*, respectively. Fleas infesting small mammals tested negative for SFG rickettsiae in the previous study realized in this region (Heglasová et al., 2018). The overall prevalence of *Rickettsia* spp. in the tested fleas was 2.5 % (7/279). Five infected fleas originated from Čermeľ, one flea from Botanical garden and one from the Slovak Karst region.

All seven *gltA*-PCR positive amplicons were sequenced. Nucleotide sequence of *gltA* gene (MN276065), amplified from *C. agyrtes* male flea, collected from rickettsia-negative *A. agrarius* from Čermeľ, showed 100% identity with at least 50 *R. helvetica* isolates (MK875721-MK875725, MK875700-MK875719) from *Ixodes* spp. ticks from Slovakia which are deposited in the Genbank database. Nucleotide sequence of *gltA* gene (MN276064), amplified from *C. uncinatus* female flea collected from rickettsia-negative *A. flavicollis* from the locality Čermeľ showed 99.69% similarity with *Rickettsia helvetica* (MG190375) from small mammal's ear biopsy from Slovakia and 99.08% similarity with *R. helvetica* (MF673863) from *I. ricinus* tick from Slovakia. The fragments of the *ompB* gene were not successfully amplified in tested samples of *R. helvetica*.

The third partial nucleotide sequence of *gltA* gene (MN276063), amplified from *C. solutus* female flea collected from rickettsia-negative *A. agrarius* from Botanical Garden in Košice city showed 99.08% similarity with *R. felis* (JF448471-JF448473) from South Korean *A. agrarius* mice. The *ompA* gene fragment sequences from *C. solutus* showed 98.08% similarity with *R. felis* (AF191026) and 98.07% similarity with *R. felis* (HM636635, EU012496) from infected fleas from dogs in Yucatan and Mexico,

respectively. The nucleotide sequence of the *ompB* gene fragment sequences showed 99.87% similarity with *R. felis* (MG266432) from *Arvicola amphibius* rodent in Germany.

Four out of seven *gltA*-PCR positive amplicons were not closely identified. Three partial nucleotide sequence of *gltA* gene amplified from two male and one female of *A. penicilliger* collected from *M. glareolus* captured in Čermeľ showed 96.83% similarity with uncultured *Rickettsia* sp. clone 42-2 (MF459640) from *Ctenocephalides felis* in Uganda and 96.78% similarity with uncultured *Rickettsia* sp. isolate Turbo (MK860201) from *Homo sapiens* in Colombia. One partial nucleotide sequence of *gltA* gene amplified from one *M. turbidus* male from *M. glareolus* captured in Hrhov, Slovak Karst region showed 99.66% similarity with uncultured *Rickettsia* sp. clone (KX179467) from *Megabothris turbidus* fleas collected from *A. agrarius* in Slovakia.

Discussion

In this study, *R. felis*, *R. helvetica* and *Rickettsia* sp. were detected in fleas removed from wild small mammals captured in three different habitat types in Eastern Slovakia. The overall prevalence of rickettsiae was 2.5% (7/279). The low prevalence of *Rickettsia* spp. indicates that fleas seem to be less important in the transmission of *Rickettsia* species than ticks. Small mammals were analyzed for the presence of rickettsiae in the previous study of Heglasová et al. (2018) with prevalent 11% (27 positive/245 tested rodents).

In total 250 small mammals of 11 species: *Apodemus agrarius*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus uralensis, Micromys minutus* (Muriade), *Myodes glareolus*, *Microtus arvalis*, *Microtus subterraneus* (Cricetidae) and *Crocidura leucodon*, *Crocidura suaveolens*, *Neomys fodiens* and *Sorex minutus* (Soricidae) were captured in rural, suburban and urban habitats of eastern Slovakia. Ear biopsies of 245 individuals, belonging to eight species, were examined for the presence of SFG rickettsiae in the study previously published by Heglasová et al. (2018). All seven *Rickettsia*-positive fleas from this study were collected from *Rickettsia*-negative rodents.

Different degrees of host specificity was observed in individual flea species. Most of the fleas collected in this study have a broad host range and infest wild mice, voles as well as insectivores. *Rickettsia*-positive flea species from this study belong into generalists (*A. penicilliger*, *C. agyrtes, M. turbidus*) and species with narrower host range (*C. solutus*, *C. uncinatus*) (Rosický, 1957). Previous surveys showed a similar composition of flea communities in small mammals.

Rickettsia felis was identified in *C. solutus* female flea collected from *A. agrarius*

inhabiting the urban area of Košice city. Similar findings were published by Špitalská et al. (2015), *R. felis* was identified in *C. solutus* male flea collected from *A. agrarius*. *Rickettsia felis* circulates through a broader spectrum of vectors and has been detected in at least 30 species of fleas, ticks, mites and lice (Abdad et al., 2011; Brown and Macaluso, 2016; Thu et al., 2019). This species of rickettsia is primarily associated with the cat flea *Ctenocephalides felis*, which is the main arthropod reservoir as well as the vector (Abdad et al., 2011), but it was also identified in other species of fleas from the genera *Xenopsylla*, *Archeopsylla*, *Anomiopsyllus, Hystrichopsylla* and *Ctenophthalmus* removed from rodents and insectivores (Bitam et al., 2006; Stevenson et al., 2005; Radzijevskaja et al., 2018). This rickettsia species have been identified in ticks from genera *Rhipicephalus*, *Ornithodoros* and in mites from the genera *Laelaps*, and *Hyperlaelaps* (Reeves et al., 2006; Oliveira et al., 2008; Parola et al., 2013; Radzijevskaja et al., 2018).

In this study, *R. helvetica* was identified in *C. agyrtes* males collected from *A. agrarius* and *C. uncinatus* female from *A. flavicollis*. Similarly, Špitalská et al. (2015) identified *R. helvetica* in *C. agyrtes* males collected from *A. agrarius*. In the study of Sprong et al. (2009), *R. helvetica* was identified in fleas amplified from *M. glareolus* and *Apodemus sylvaticus* in the Netherlands. *Ixodes ricinus* tick is the main vector of the most common species *R. helvetica* across Europe (Oteo and Portillo, 2012). *Rickettsia helvetica* has been identified in more than ten tick species of genera *Ixodes*, *Haemaphysalis* and *Dermacentor* (Parola et al., 2005, Hornok et al., 2010, Tijsse-Klasen et al., 2013, Mărcuțan et al., 2016). In Slovakia, the presence of *R. helvetica* and so *R. monacensis* was also identified in ectoparasitic mites Laelapidae and Trombiculidae infesting rodents (Miťková et al., 2015).

Research and study of rickettsiae have revealed the great diversity of the hosts involved in their circulation. Species of rickettsiae such as *R. felis, R. helvetica, R. africae* or *R. monacensis* are associated with several different species of ticks belonging to different genera or subfamilies, as well as with fleas or mites. These species belong to a group of rickettsiae which seem to have less specific preferences on arthropod vectors (Heglasová et al. unpublished data).

In contrast, there is a group of rickettsiae that seem to be associated with several tick species within the same genus. For instance, *R. slovaca* associated with several tick species within the same genus, mainly with *D. marginatus* and *D. reticulatus* across Europe (Sekeyová et al., 1998; Špitalská et al., 2012; Parola et al., 2005, 2013; Minichová et al., 2017). Similar findings were published by Socolovschi et al. (2009), Merhej and

Raoult (2011). The results of the study suggest that some species of rickettsiae have a different range of arthropod vectors.

Conclusions

Altogether, nine flea species were recorded on sampled small mammals from Slovakia. The occurrence of human pathogenic *R. felis* and *R. helvetica* was recorded in fleas removed from small mammals collected in habitats with various degree of anthropogenic use (urban, suburban, rural).

Acknowledgments

The authors thank RNDr. Ladislav Mošanský, Ph.D. and Monika Onderová for help with rodent trapping, flea collections, and technical assistance. The study was supported by the projects VEGA 1/0084/18, APVV-16-0518 and by the Research & Development Operational Program funded by the ERDF: Environmental protection against parasitozoonoses under the influence of global climate and social changes (code ITMS: 26220220116; 0.2).

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

References

Abdad MY, Stenos J, Graves S. *Rickettsia felis*, an emerging flea-transmitted human pathogen. Emerg Health Threats J 2011;4:7168.

Azad AF, Beard CB. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. Emerg Infect Dis 1998;4(2):179–186.

Bitman I, Dittmar K, Parola P, Whiting MF, Raoult D. Fleas and flea-borne diseases. Int J Infect Dis 2010;14(8):667–676.

Bitam I, Parola P, De La Cruz KD, Matsumoto K, Baziz B, Rolain JM, Belkaid M, Raoult D. First molecular detection of *Rickettsia felis* in fleas from Algeria. Am J Trop Med Hyg 2006;74(4):532–535.

Brown LD, Macaluso KR. *Rickettsia felis*, an emerging flea-borne rickettsiosis. Curr Trop Med Rep 2016;3:27–39.

Heglasová I, Víchová B, Kraljik J, Mošanský L, Miklisová D, Stanko M. Molecular

evidence and diversity of the spotted-fevergroup *Rickettsia* spp. in small mammals from rural, suburban and urban areas of Eastern Slovakia. Ticks Tick Borne Dis 2018;9(6):1400–1406.

Hirunkanokpun S, Thepparit C, Foil LD, Macaluso KR. Horizontal transmission of *Rickettsia felis* between cat fleas, *Ctenocephalides felis*. Mol Ecol 2011;20(21):4577–4586.

Hornok S, Mel ML, Perreten A, Farkas R, Willi B, Beugnet F, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. Molecular investigation of hard ticks (Acari: Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. Vet Microbiol 2010;140(1–2):98–104.

Choi YJ, Jang WJ, Ryu JS, Lee SH, Park KH, Paik HS, Koh YS, Choi MS, Kim IS. Spotted fever group and typhus group rickettsioses in humans, South Korea. Emerg Infect Dis 2005;11(2):237–244.

Jurík M. Príspevok k poznaniu afanipter ČSSR II (*Nosopsylus* Jordan, 1933). Biológia Bratislava 1962;16:383–388.

Krasnov BR. Functional and evolutionary ecology of fleas: a model for ecological parasitology. Cambridge: Cambridge University press; 2008:1–593.

Mărcuţan ID, Zsuzsa K, Ionică AM, D'Amico G, Mihalca AD, Vasile C, Sándor AD. Spotted fever group rickettsiae in ticks of migratory birds in Romania. Parasit Vectors 2016;9:294.

Mediannikov O, Diatta G, Zolia Y, Balde MC, Kohar H, Trape JF, Raoult D. Tick-borne rickettsiae in Guinea and Liberia. Ticks Tick Borne Dis 2012;3(1):43–48.

Merhej V, Raoult D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. Biol Rev Camb Philos Soc 2011;86(2):379–405.

Minichová L, Hamšíková Z, Mahríková L, Slovák M, Kocianová E, Kazimírová M, Škultéty Ľ, Štefanidesová K, Špitalská E. Molecular evidence of *Rickettsia* spp. in ixodid ticks and rodents in suburban, natural and rural habitats in Slovakia. Parasit Vectors 2017;10(1):158.

Miťková K, Berthová L, Kalúz S, Kazimírová M, Burdová L, Kocianová L. First detection of *Rickettsia helvetica* and *R.monacensis* in ectoparasitic mites (Laelapidae and Trombiculidae) infesting rodents in south-western Slovakia. Parasitol Res 2015;114(7):2465–2472.

Murray GGR, Weinert LA, Rhule EL, Welch JJ. The phylogeny of *Rickettsia* using different evolutionary signatures: how tree-like is bacterial evolution? Syst Biol 2016;65(2):265–279.

Oliveira KA, Oliveira LS, Dias CC, Silva AJr, Almeida MR, Almada G, Bouyer DH, Galvao MA, Mafra C. Molecular detection of *Rickettsia felis* in ticks and fleas from an endemic area for Brazilian spotted fever. Mem Inst Oswaldo Cruz 2008;103(2):191–194.

Orkun Ö, Karaer Z, Çakmak A, Nalbantoğlu S. Spotted fever group rickettsiae in ticks in Turkey. Ticks Tick Borne Dis 2014;5(2):213–218.

Oteo JA, Portillo A. Tick-borne rickettsioses in Europe. TicksTick Borne Dis 2012;3(5–6):271–278.

Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. Clin Microbiol Rev 2005;18(4):719–756.

Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, Abdad MY, Stenos J, Bitam I, Fournier PE, Raoult D. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. Clin Microbiol Rev 2013;26(4):657–702.

Portillo A, de Sousa R, Santibáñez S, Duarte A, Edouard S, Fonseca IP, Marques C, Novakova M, Palomar AM, Santos M, Silaghi C, Tomassone L, Zúquete S, Oteo JA. Guidelines for the detection of *Rickettsia* spp. Vector Borne Zoonotic Dis 2017;17(1):23–32.

Radzijevskaja J, Kaminskienė E, Lipatova I, Mardosaitė-Busaitienė D, Balčiauskas L, Stanko M, Paulauskas A. Prevalence and diversity of *Rickettsia* species in ectoparasites collected from small rodents in Lithuania. Parasit Vectors 2018;11(1):375.

Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin Microbiol Rev 1997;10(4):694–719.

Reeves WK, Loftis AD, Sanders F, Spinks MD, Wills W, Denison AM, Gregory A, Dasch AD. *Borrelia*, *Coxiella*, and *Rickettsia* in *Carios capensis* (Acari: Argasidae) from a Brown Pelican (*Pelecanus occidentalis*) Rookery in South Carolina, USA. Exp Appl Acarol 2006;39(3–4):321–329.

Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. J

Bacteriol 1991;173(5):1576–1589.

Rijpkema S, Golubic D, Moelkenboer M, Verbeek-De Kruif N, Schellekens J. Identification off our genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. Exp Appl Acarol 1996;20(1):23–30.

Rosický B. Blechy – Aphaniptera. Fauna ČSR 1957;10:1–439. Nakladatelství Československé akademie věd, Praha (in Czech).

Roux V, Fournier PE, Raoult D. Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. J Clin Microbiol 1996;34(9):2058–2065.

Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). Int J Syst Evol Microbiol 2000;50:1449–1455.

Sekeyová Z, Mediannikov O, Roux V, Subramanian G, Špitalská E, Krištofík J, Darolová A, Raoult D. Identification of *Rickettsia africae* and *Wolbachia* sp. in *Ceratophyllus garei* fleas from passerine birds migrated from Africa. Vector Borne Zoonotic Dis 2012;12(7):539–543.

Sekeyová Z, Roux V, Xu W, Řeháček J, Raoult D. *Rickettsia slovaca* sp. nov., a member of the spotted fever group rickettsiae. Int J Syst Bacteriol 1998;48(4):1455–1462.

Sekeyová Z, Socolovschi C, Špitalská E, Kocianová E, Boldiš V, Diaz MQ, Berthová L, Bohacsová M, Valáriková J, Fournier PE, Raoult D. Update on rickettsioses in Slovakia. Acta Virol 2013;57(2):180–199.

Socolovschi C, Mediannikov O, Raoult D, Parola P. The relationship between spotted fever group Rickettsiae and ixodid ticks. Vet Res 2009;40(2):34.

Socolovschi C, Pages F, Raoult D. *Rickettsia felis* in *Aedes albopictus* mosquitoes, Libreville, Gabon. Emerg Infect Dis 2012;18(10):1687–1689.

Sprong H, Wielinga PR, Fonville M, Reusken C, Brandenburg AH, Borgsteede F, Gaasenbeek C, van der Giessen JWB. *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne Rickettsia species. Parasite Vector 2009;2(1):41.

Stanko M. Blchy (Siphonaptera) drobných cicavcov severnej časti Krupinskej planiny.

Stredné Slovensko1987;6:108–117.

Stanko M. Súčasný stav poznania bĺch (Siphonaptera) drobných cicavcov Košickej aglomerácie. Zborník Východoslovenského múzea v Košiciach, Prírodné vedy 1992;32–33:87–95.

Stevenson HL, Labruna MB, Montenieri JA, Kosoy MY, Gage KL, Walker DH. Detection of *Rickettsia flelis* in a new world flea species *Anomiopsyllus nudata* (Siphonaptera: Ctenophthalmidae). J Med Entomol 2005;42(2):163–167.

Špitalská E, Boldiš V, Mošanský L, Sparagano O, Stanko M. *Rickettsia* species in fleas collected from small mammals in Slovakia. Parasitol Res 2015;114(11):4333–4339.

Špitalská E, Štefanidesová K, Kocianová E, Boldiš V. *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia raoultii* in *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* ticks from Slovak Republic. Exp Appl Acarol 2012;57(2):189–197.

Thu MJ, Qiu Y, Matsuno K, Kajihara M, Mori-Kajihara A, Omori R, Monma N, Chiba K, Seto J, Gokuden M, Andoh M, Oosako H, Katakura K, Takada A, Sugimoto Ch, Isoda N, Nakao R. Diversity of spotted fever group rickettsiae and their association with host ticks in Japan. Sci Rep 2019;9:1500.

Tijsse-Klasen E, Hansford KM, Jahfari S, Phipps P, Sprong H, Medlock JM. Spotted fever group rickettsiae in *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis punctata* ticks in the UK. Parasit Vectors 2013;6:212.

Víchová B, Bona M, Miterpáková M, Kraljik J, Čabanová V, Nemčíková G, Hurníková Z, Oravec M. Fleas and ticks of red foxes as vectors of canine bacterial and parasitic pathogens, in Slovakia, Central Europe. Vector Borne Zoonotic Dis 2018;18(11):611–619.

Wedincamp JJr, Foil LD. Vertical transmission of *Rickettsia felis* in the cat flea (*Ctenocephalides felis* Bouché). J Vector Ecol 2002;27(1):96–101.

Weinert LA, Werren JH, Aebi A, Stone GN, Jiggins FM. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. BMC Biol 2009;7:6.

Table 1

Examined fleas (Siphonaptera) from small mammals in three different sites of East Slovakia.

Flea species	Slovak Karst (natural)	Čermeľ (suburban)	Botanical garden (urban)	Hosts of fleas
Amalareus penicilliger	–	15 (9♀, 6♂)	–	*A. flavicollis* *M. glareolus*
Ctenophthalmus agyrtes	49 (32♀, 17♂)	54 (32♀, 22♂)	2♀	*A. agrarius* *A. flavicollis* *M. glareolus* *M. arvalis* *M. subterraneus*
Ctenophthalmus assimilis	49 (27♀,22♂,)	–	–	*A. agrarius* *A. flavicollis* *M. arvalis*
Ctenophthalmus solutus	35 (19♀, 16♂)	17 (8♀, 9♂)	11(7♀, 4♂)	*A. agrarius* *A. flavicollis* *M. arvalis* *M. glareolus*
Ctenophthalmus uncinatus	1♀	11 (4♀, 7♂)	–	*A. flavicollis* *M. glareolus*
Doratopsylla dasycnema	2♂	–	–	*C. leucodon* *S minutus*
Hystrichopsylla orientalis	15 (7♀, 8♂)	–	–	*A. agrarius* *A. flavicollis* *C. leucodon* *M. arvalis*
Megabothris turbidus	17 (11♀, 6♂)	–	–	*A. agrarius* *A. flavicollis* *M. glareolus*
Nosopsyllus fasciatus	1♂	–	–	*A. flavicollis*
Total	169 (97♀, 72♂)	97 (53♀, 44♂)	13 (9♀, 4♂)	

Článok 4.

Rickettsia spp. infection in a patient from Slovakia: a case report

Dana Zubriková[1], Ivana Heglasová[1, 2], Daniela Antolová[1,*], Lucia Blaňarová[1], Bronislava Víchová[1]

[1] Institute of Parasitology of the Slovak Academy of Sciences, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovak Republic

[2] Department of Zoology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská dolina B-1, 842 15 Bratislava, Slovakia

Dana Zubriková: cernanska@saske.sk

Ivana Heglasová: heglasova@saske.sk

Lucia Blaňarová: blanarova@saske.sk

Bronislava Víchová: vichova@saske.sk

***Corresponding author:**

Daniela Antolová

Institute of Parasitology of the Slovak Academy of Sciences

Hlinkova 3

040 01 Košice

Slovak Republic,

antolova@saske.sk

Tel: +421-55-633 14 11

Acknowledgments

The research was financed by research grants of the Slovak Research and Development Agency, grant APVV 16-0518 and by the Research & Development Operational Program funded by the ERDF: Environmental protection against parasitozoonoses under the influence of global climate and social changes (code ITMS: 26220220116; 0.2).

Summary

Rickettsiae are considered as emerging pathogens with ticks, fleas and mites known to be their main vectors. Herein we report a case of a 29-year-old man bitten by unknown flying insect to both ear lobes in Slovakia. Patient developed symptoms of fever, headache and

bilateral swelling of cervical lymph nodes (lymphadenitis). He described also perspiration, shivering, chills, fever, myalgia and bone pains. Differential blood count showed a lower number of neutrophils, increased number of lymphocytes and a higher mean platelet volume. In urine, the presence of white blood cells, squamous epithelial cells and mucus were recorded. Direct molecular detection of *Rickettsia* spp. was performed by PCR targeting *gltA* gene from a blood sample with positive result. The patient was successfully treated with doxycycline. To our knowledge, this is the first report of molecularly confirmed rickettsiosis in Slovakia. As the patient did not report the tick bite before the development of clinical symptoms, the possibility ricketsial infection should be considered when symptoms typical for the diseases appear.

Key words: Febrile illness; Lymphadenitis; *Rickettsia*

Introduction

Rickettsiae are obligate intracellular Gram-negative bacteria from the order Rickettsiales with a worldwide distribution. Many species are responsible for serious diseases in humans and other mammals (Raoult and Roux 1997; Parola et al. 2013). However, the pathogenicity of rickettsiae varies widely between species (Abdad et al. 2011).

They are transmitted via arthropod vectors such as ticks, mites, fleas and lice (Raoult and Roux 1997; Weinert 2009, Miťková et al. 2015). Recent studies have shown that genus *Rickettsia* could be divided into four different phylogenetic groups: the spotted fever group (consisting of *R. helvetica* and/or *R. monacensis*), the typhus group (*Rickettsia typhi, Rickettsia prowazekii*), ancestral group (*R. bellii* and *R. canadensis*) and transitional group (*R. akari* and *R. felis*) (Murray et al. 2016). Nowadays, novel *Rickettsia* species of undetermined pathogenicity continue to be detected from arthropod vectors around the world (Parola et al. 2013).

In Slovakia, six pathogenic species of rickettsiae have so far been confirmed (*Rickettsia slovaca, Rickettsia raoultii, Rickettsia monacensis* strains IRS3 and IRS4, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia africae* and *Rickettsia felis*) mainly in *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* ticks (Boldiš et al. 2008; Sekeyová et al. 1998, 2012, 2013; Heglasová et al., 2018; Špitalská et al. 2008, 2015). In humans, *Rickettsia helvetica*, *R. slovaca* and *Rickettsia conori* have been identified by serological examination and/or molecular methods (Kovácová et al., 2006, Sekeyová et al., 2012).

Recently the bacterial microbiome of field-collected *Dermacentor marginatus* and

Dermacentor reticulatus from Slovakia was analysed and *Rickettsia* showed high abundance in both tick species (Zhang et al., 2019). In the study, a rare case of human rickettsiosis caused by *Rickettsia* spp. acquired in Slovakia and confirmed molecularly is presented.

Case presentation

A 29-year-old man was bitten by unknown flying insect in December 2014 to both ear lobes near Spišska Nová Ves town in the vicinity of sewage disposal plant. His both ear lobes started to suppurate and one week after the bite the patient developed symptoms of fever, headache and bilateral swelling of cervical lymph nodes (lymphadenitis). The patient did not report any tick bite history within the time period when his health problems started. In January 2015 he developed strong headache and his swollen cervical lymph nodes reached 5 cm in diameter. He started to be weak and lost on the weight. He described also perspiration, shivering, chills, fever, myalgia and bone pains.

In February 2015, the patient was hospitalized at the Department of Neurology since he suffered from strong headache and pre-collapse states. At the time of the hospitalization, his lymph nodes were only moderately swollen, not painful and patient was without fever. The blood laboratory analysis showed a lower number of neutrophils (NEU 44.2%; reference range 46 – 73%), increased number of lymphocytes (LYM 48.9%; reference range 18 – 44%) and a higher mean platelet volume (MPV 13.5 fL; reference range 7.5 – 12 fL). In urine, the presence of white blood cells (26.7/µl), squamous epithelial cells (16.7/µl) and mucus were recorded. All other blood and urine parameters in were within reference range.

In May 2015, the blood sample was sent to Institute of Parasitology SAS, where nested PCR targeting *gltA* gene of *Rickettsia* spp. (Regnery et al. 1991, Choi et al., 2005) [16, 17], and PCRs targeting *msp2* gene of *Anaplasma phagocytophilum* (Massung and Slater, 2003) [18] and *18S rRNA* gene of *Babesia* spp. (Casati et al., 2006) [19] were performed. PCR targeting *gltA* gene of *Rickettsia* spp. gave the 337 bp positive PCR product. The sequence was submitted to the Genbank® (the accession number MN722421).

The patient underwent the treatment with doxycycline 200 mg/day for 10 days. After the therapy a malaise subsided and clinical status improved. Second and third blood samples were taken 10 days and 30 days after the doxycycline treatment, respectively. Both samples were negative in PCR targeting *Rickettsia gltA* gene.

The nucleotide sequence of the *gltA* gene of *Rickettsia* sp. (MN722421) obtained in this

study was 99.37% identical to several *Rickettsia* species: one isolate of *Rickettsia aeschlimannii* (MK732478), 15 isolates of *Candidatus* Rickettsia barbariae (e.g. MH675633, MF002503, DQ423369, KY233232, JF803910), one isolate of *Rickettsia sibirica* (MF098405) and one isolate of *Rickettsia raoultii* (KR131756). Therefore, according to the acquired sequence of *gltA* gene it was unable to determine the causative agent of the infection at the species level.

Discussion

For the classification of rickettsial isolates, multiple gene sequencing is recommended (Fournier et al., 2003). As in the presented study the obtained nucleotide sequence was identical to several *Rickettsia* species, it was impossible to specifically determine the causative agent of infection on the species level. Similarly, Thu et al. (2019) detected 15 *gltA* genotypes of *Rickettsia* in a nationwide study in Japan, however sequencing of additional five genes of each *gltA* genotype (16S rRNA, *ompA*, *ompB, htrA,* and *sac4* genes) did not allow to assign nine *gltA* genotypes into the species due to lack of consensus between the trees and/or absence of sequences from previously validated rickettsial species in the same phylogenetic clusters.

The patient in the presented study did not report any tick bite but he mentioned the bite of unknown flying insect to both ear lobes and subsequent health problems. Although, the possibility that he was bitten also by the tick cannot be excluded, information from the patient cannot be ignored.

Members of the genus *Rickettsia* are very variable and except from the ticks, they were amplified from a huge variety of host organisms (mites, lice, fleas, beetles, flies, true bugs, leeches, and amoebae) (see review of Perlman et al., 2006). Therefore, the possibility that unknown insect infected the patient with *Rickettsia* spp. cannot be excluded.

In 2014, the National Reference Centre for Rickettsioses in Slovakia was established in order to support the surveillance of rickettsioses in the country. From 2016 to 2018, two cases of “unspecified spotted fever” assigned as A77.9 diagnosis in the International Diseases Classification, ten cases of diagnosis “other specified rickettsioses” (A79.8), and one case of “unspecified rickettsiosis” (A79.9) were recorded. The diagnoses were based on anamnesis of patients, reported symptoms and results ELISA tests. However, since people often do not exhibit symptoms specific for rickettsiosis and the diagnosis is frequently neglected by doctors, the real number of human rickettsioses in Slovakia is supposed to be higher (Sekeyová et al., 2012).

In conclusion, to our knowledge this is the first report of molecularly confirmed rickettsiosis in Slovakia. Moreover, clinical symptoms and results of blood and urine analyses are presented. As the patient did not report the tick bite before the development of clinical symptoms, the possibility ricketsial infection should be considered when symptoms typical for the diseases appear in the patient.

Conflict of interest

Authors declare that they have no competing interests.

Ethical standards

The patient agreed with all examinations and publication of case report and signed the informed content. No identifying data are presented in the paper. Study was performed in accordance with the ethical standards as laid down in the Declaration of Helsinki of 1975 and revised in 2008.

References

Abdad MY, Stenos J, Graves S. *Rickettsia felis*, an emerging flea-transmitted human pathogen. Emerg Health Threats J. 2011;4:7168. doi: 10.3402/ehtj.v4i0.7168

Boldiš V, Kocianová E, Štrus J, Tušek-Žnidarič M, Sparagano OA, Štefanidesová K, et al. Rickettsial agents in Slovakian ticks (Acarina, Ixodidae) and their ability to grow in Vero and L929 cell lines. Ann N Y Acad Sci. 2008;1149:281-285. doi: 10.1196/annals.1428.090

Casati S, Sager H, Gern L, Piffaretti JC. Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. Ann Agric Environ Med. 2006;13(1):65-70.

Choi YJ, Jang WJ, Ryu JS, Lee SH, Park KH, Paik HS, et al. Spotted fever group and typhus group rickettsioses in humans, South Korea. Emerg Infect Dis. 2005;11(2):237-244. doi: 10.3201/eid1102.040603

Fournier PE, J. Dumler S, Greub G, Zhang J, Wu Y, Raoult D. Gene sequence based criteria for identification of new *Rickettsia* isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. J Clin Microbiol. 2003;41:5456–5465. doi:10.1128/jcm.41.12.5456-5465.2003

Heglasová I, Víchová B, Kraljik J, Mošanský L, Miklisová D, Stanko M. Molecular evidence and diversity of the spotted-fever group *Rickettsia* spp. in small mammals

from natural, suburban and urban areas of Eastern Slovakia. Ticks Tick Borne Dis. 2018; 9(6):1400-1406. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.06.011

Kovácová E, Sekeyová Z, Trávnicek M, Bhide MR, Mardzinová S, Curlik J, et al. Monitoring of humans and animals for the presence of various *Rickettsiae* and *Coxiella burnetii* by serological methods. Ann N Y Acad Sci. 2006;1078:587-9. doi: 10.1196/annals.1374.117

Massung RF, Slater KG. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. J Clin Microbiol. 2003;41(2):717-22. doi: 10.1128/JCM.41.2.717-722.2003

Miťková K, Berthová L, Kalúz S, Kazimírová M, Burdová L, Kocianová E. First detections of *Rickettsia helvetica* and *R. monacensis* in ectoparasitic mites (Laelapidae and Trombiculidae) infesting rodents in south-western Slovakia. Parasitol Res. 2015;114(7):2465-72. doi: 10.1007/s00436-015-4443-x

Murray GG, Weinert LA, Rhule EL, Welch JJ. The Phylogeny of Rickettsia Using Different Evolutionary Signatures: How Tree-Like is Bacterial Evolution? Syst Biol. 2016;65(2):265-79. doi: 10.1093/sysbio/syv084

Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. Clin Microbiol Rev. 2013;26(4):657-702. doi: 10.1128/CMR.00032-13

Perlman SJ, Hunter MS and Zchori-FeinE. The emerging diversity of *Rickettsia*. Proc R Soc B. 2006;273:2097–2106. doi:10.1098/rspb.2006.3541

Raoult D., Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin Microbiol Rev. 1997;10:694-719.

Regnery RL, Spruill CL, and Plikaytis BD. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. J Bacteriol. 1991;173:1576-1589. doi: 10.1128/jb.173.5.1576-1589.1991

Sekeyová Z, Roux V, Xu W, Rehácek J, Raoult D. *Rickettsia slovaca* sp. nov., a member of the spotted fever group rickettsiae. Int J Syst Bacteriol. 1998;48(4):1455-62. doi: 10.1099/00207713-48-4-1455

Sekeyová Z, Mediannikov O, Subramanian G, Kowalczewska M, QuevedoDiaz M, Kocianova E, et al. Isolation of *Rickettsia helvetica* from ticks in Slovakia. Acta Virol. 2012;56:247-252.

Sekeyová Z, Socolovschi C, Špitalská E, Kocianová E, Boldiš V, Diaz MQ, et al. Update on rickettsioses in Slovakia, Acta Virol. 2013;57:180-199. doi:

10.4149/av_2012_03_247

Špitalská E., Boldiš V., Košťanová Z, Kocianová E, Štefanidesová K. Incidence of various tick-borne microorganisms in rodents and ticks of central Slovakia. Acta Virol. 2008;52:175-179.

Špitalská E, Boldiš V, Mošanský L, Sparagano O, Stanko M. Rickettsia species in fleas collected from small mammals in Slovakia. Parasitol. Res. 2015;114:4333-4339. doi: 10.1007/s00436-015-4713-7

Thu MJ, Qiu Y, Matsuno K, Kajihara M, Mori-Kajihara A, Omori R, et al. Diversity of spotted fever group rickettsiae and their association with host ticks in Japan. Sci Rep. 2019;9(1):1500. doi: 10.1038/s41598-018-37836-5

Weinert LA, Werren JH, Aebi A, Stone GN, Jiggins FM. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. BMC Biol. 2009;7:6. doi: 10.1186/1741-7007-7-6

Zhang, Y., Yu, Z., Wang, D., Vichova, B., Petko, B., Liu, J. The bacterial microbiome of field - collected *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* from Slovakia. In Parasite Vector, 2019;12(325). https://doi.org/10.1186/s13071-019-3582-9

4.2. *Borrelia miyamotoi*

Výsledky tejto časti dizertačnej práce boli zhrnuté do jedného článku.

Článok: **Ticks, fleas and rodent-hosts analyzed for the presence of *Borrelia miyamotoi* in Slovakia: the first record of *Borrelia miyamotoi* in a *Haemaphysalis inermis* tick**
Autori: Heglasová I., Rudenko N., Golovchenko M., Zubriková D., Miklisová D., Stanko M.
Časopis: Ticks and Tick-borne Diseases
Rok: (akceptované v r. 2020)

Cieľom tohto výskumu bolo prispieť k najnovším údajom o výskyte, rozšírení a diverzite potenciálnych vektorov a hostiteľov nedávno identifikovanej spirochéty *Borrelia miyamotoi* patogénnej pre človeka. Pre tento účel bolo vyšetrených celkom 2160 kliešťov 6 druhov (*I. ricinus, I. trianguliceps*, *D. marginatus, D. reticulatus, H. concinna* a *H. inermis*), 279 bĺch 9 druhov (*C. agyrtes*, *C. solutus*, *C. assimilis*, *M. turbidus*, *A. penicilliger*, *H. orientalis*, *C. uncinatus*, *D. dasycnema* a *N. fasciatus*) a tkanivové vzorky (ušnice) z 245 drobných cicavcov 8 druhov (*A. agrarius*, *A. flavicollis*, *A. uralensis*, *M. glareolus*, *C. leucodon*, *M. minutus*, *M. arvalis* a *M. subterraneus*). *Borrelia miyamotoi* bola identifikovaná v kliešťoch *I. ricinus*, *H. inermis* a v jednom hrabošovi *M. arvalis*, avšak nebola zistená v žiadnej z testovaných bĺch. Celková prevalencia *B. miyamotoi* bola 1,8 % (23/1260) v kliešťoch z vegetácie a 3,4 % (31/900) v kliešťoch z drobných cicavcov. Na základe získaných výsledkov sa rurálne typy biotopov s odlišnými druhmi kliešťov a hostiteľov javia ako vhodné na výskyt a prenos *B. miyamotoi*. Výsledky naznačujú, že na udržiavaní a šírení *B. miyamotoi* v Európe sa môžu podieľať aj iné druhy kliešťov než z rodu *Ixodes*.

Článok 5.

Ticks, fleas and rodent-hosts analyzed for the presence of *Borrelia miyamotoi* in Slovakia: the first record of *Borrelia miyamotoi* in a *Haemaphysalis inermis* tick

Ivana Heglasová[a, b,*], Natalie Rudenko[c], Maryna Golovchenko[c], Dana Zubriková[a], Dana Miklisová[a], Michal Stanko[a, d]

[a] Institute of Parasitology, Slovak Academy of Sciences, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovakia

[b] Department of Zoology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Mlynská dolina B-1, 842 15 Bratislava, Slovakia

[c] Biology Centre, Czech Academy of Sciences, Institute of Parasitology, Branisovska 31, 37005, Ceske Budejovice, Czech Republic

[d] Institute of Zoology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovakia

∗Corresponding author. Tel.: 0556325326

E-mail addresses: heglasova@saske.sk (I. Heglasová), natasha@paru.cas.cz (N. Rudenko), marina@paru.cas.cz (M. Golovchenko), cernanska@saske.sk (D. Zubriková), miklis@saske.sk (D. Miklisová), stankom@saske.sk (M. Stanko)

Abstract

In Slovakia, little knowledge is available on the occurrence, hosts and vectors of *Borrelia miyamotoi* of the relapsing fever group. In the current study, 2160 questing and rodent-attached ticks of six species (*Ixodes ricinus, Ixodes trianguliceps*, *Dermacentor marginatus, Dermacentor reticulatus, Haemaphysalis concinna* and *Haemaphysalis inermis*), 279 fleas belonging to 9 species (*Ctenophthalmus agyrtes*, *Ctenophthalmus solutus*, *Ctenophthalmus assimilis*, *Megabothris turbidus*, *Amalareus penicilliger*, *Hystrichopsylla orientalis*, *Ctenophthalmus uncinatus*, *Doratopsylla dasycnema* and *Nosopsyllus fasciatus*) and skin biopsies from 245 small mammals belonging to eight species (*Apodemus agrarius*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus uralensis*, *Myodes glareolus*, *Crocidura leucodon*, *Micromys minutus*, *Microtus arvalis*, *Microtus subterraneus*) were screened for the presence of *B. miyamotoi* DNA. The overall prevalence of *B. miyamotoi* found in questing and rodent-attached ticks was 1.8% (23 positive/1260 examined) and 3.4% (31 positive/900 examined), respectively. *Borrelia*

miyamotoi was detected in questing *I. ricinus*, rodent-attached *I. ricinus* and *H. inermis* ticks, and in one male of the common vole (*M. arvalis*) in different habitats (mainly rural) in eastern Slovakia. However, *B. miyamotoi* was not found in any of the tested fleas. Our findings indicate that rural habitats with different species of tick vectors and hosts are appropriate for the occurrence of *B. miyamotoi*.

Key words: *Borrelia miyamotoi*, ticks, fleas, rodents, Slovakia

1. Introduction

Borrelia miyamotoi, a member of the relapsing fever group in the genus *Borrelia*, was first described in 1994 in *Ixodes persulcatus* ticks in Japan (Fukunaga et al., 1995). The majority of relapsing fever (RF) spirochete infections occur through soft ticks (e.g. *Ornithodoros* spp.). However, a few RF spirochete species, such as *Borrelia theileri*, *Borrelia lonestari* or *B. miyamotoi*, are transmitted by hard ticks (*Rhipicephalus* spp., *Amblyomma* spp., *Ixodes* spp.) (Talagrand-Reboul et al., 2018). *Borrelia miyamotoi* relies on transovarial and transstadial survival in ticks and may coexist with *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) (Scoles et al., 2001; Barbour et al., 2009). Small mammals have been indicated as the reservoir hosts of *B. miyamotoi* in Europe (Burri et al., 2014; Cosson et al., 2014; Szekeres et al., 2015; Hamšíková et al., 2017), Japan (Taylor et al., 2013) and North America (Barbour et al., 2009). Human cases of infection with *B. miyamotoi* have been reported from Europe (Hovius et al., 2013; Boden et al., 2016), Russia (Platonov et al., 2011), the USA (Krause et al., 2013) and Japan (Sato et al., 2014).

Borrelia miyamotoi has a global distribution and is represented by three geographically separated clades/genotypes. The European genotype is associated with *Ixodes ricinus* ticks (Fraenkel et al., 2002; Richter et al., 2003; Subramanian et al., 2012; Burri et al., 2014; Cochez et al., 2015; Nunes et al., 2015; Szekeres et al., 2015; Kalmár et al., 2016; Potkonjak et al., 2016; Venczel et al., 2016; Wagemakers et al., 2017; Vaculová et al., 2019; and others). The American genotype is associated with the ticks *Ixodes scapularis, Ixodes pacificus* and *Ixodes dentatus* (Scoles et al., 2001; Mun et al., 2006; Hamer et al., 2012; Crowder et al., 2014). And the Siberian (or Asian) genotype is associated with the ticks *Ixodes persulcatus, Ixodes ovatus* and *Ixodes pavlovskyi* (Fukunaga et al., 1995; Korotkov et al., 2008; Fomenko et al., 2011; Borgoyakov et al., 2011; Geller et al., 2012; Takano et al., 2014; Khasnatinov et al., 2016; Rar et al., 2017).

The presence of *B. miyamotoi* in Slovakia was confirmed in questing *I. ricinus* ticks

in 2012 by Subramanian et al. (2012) and subsequently by Venczel et al. (2016). Co-infections of *B. miyamotoi* and *B. burgdorferi* s. l. found in questing ticks and rodents suggested that they share amplifying hosts (Hamšíková et al., 2017). In Slovakia, no clinical cases of tick-borne relapsing fever have been reported (Public Health Authority of the Slovak Republic, http://www.uvzsr.sk/en/). However, the finding of *B. miyamotoi* in questing ticks and ticks collected from humans suggest a possible risk of this infection in Slovakia (Derdáková et al., 2016). Of the 20 known tick species inhabiting Slovakia, six belong to epidemiologically significant exophilic ticks (*Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulatus*, *Haemaphysalis concinna*, *Haemaphysalis punctata* and *Haemaphysalis inermis*) (Černý, 1972; Řeháček et al., 1991). The most common and epidemiologically the most important tick species in Slovakia and Europe is *I. ricinus*.

In the present study, we aimed to determine the prevalence of *B. miyamotoi* in several species of questing and rodent-attached ticks, fleas and small mammals collected in urban, suburban and rural sites in eastern Slovakia, as well as to provide a molecular and phylogenetic characterization of the *B. miyamotoi* samples detected.

2. Material and methods

2.1. Small mammals, ticks and fleas sampling

Small mammals, questing ticks and rodent-attached ticks and fleas were collected at three sampling sites in eastern Slovakia during the years 2014 to 2016. The first study site, a Botanical Garden with deciduous forest vegetation, is located in the center of the Košice, the second-largest city in Slovakia (208 m a.s.l.; 48°446·84″N; 21°14′16·14″ E). It represents an urban habitat with a significant anthropogenic impact. The second site, Čermeľ, is characterized by the presence of mixed forest vegetation with a predominance of beech, hornbeam and spruce (220–410 m a.s.l.; 48°45′46·67″N; 21°8′8·17″E) and represents a suburban habitat. The third site, the Slovak Karst National Park near the village of Hrhov, has mixed forest vegetation with predominance of beech, oak, and hornbeam (200–220 m a.s.l., 48°34.899N, 20°46.743E); it represents a rural habitat.

The live-trapping of small mammals was carried out twice each year, in May/June and September/October, from 2014 to 2016, respectively. Small mammals were trapped alive using Swedish bridge metal traps following the protocol of Stanko (1995). Small mammals trapping were carried out using 100 live-traps/per one night the same for all studied localities. The captured rodents and insectivores were euthanized in accordance with licenses from the Ministry of Environment of the Slovak Republic, No. 4874/2011–

2.2 and 4559/2015–2.3. The rodents and insectivores were identified to species according to morphological features (size of body, tail, ears, legs, etc.), sex and age classes (juvenile, subadult, adult) using the identification keys by Pelikán et al. (1979); Sládek and Mošanský (1985); and Anděra and Horáček (2005). An ear biopsy was obtained from each of 245 small mammals and stored at −20 °C until further molecular analysis.

Each rodent individual was checked for the presence of ectoparasites. All ticks and fleas collected were stored in 70% ethanol until identification. The species and developmental stage of the ectoparasites were determined based on morphological characteristics under a light microscope using the identification keys by Rosický (1957); Filippova (1977); Slovák (2014); and Estrada-Peña et al. (2017). Questing ticks were collected around mammal-trapping transects by dragging with a $1m^2$ white wool blanket over the vegetation for one hour twice each year, in May/July and September/October, from 2014 to 2016, respectively.

2.2. DNA isolation and molecular analyses

Genomic DNA from rodent skin (ear tissue) and rodent-attached ticks was extracted individually with the NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen®, Germany), respectively, according to the manufacturers' instructions. Genomic DNA from each questing *Ixodes* tick and flea was extracted individually using the alkaline hydrolysis method (Rijpkema et al., 1996). All DNA samples were stored at -20˚C until further processing.

DNA samples derived from individual ticks, fleas and rodent-tissues (5 µl each) were pooled. In total, 445 pooled samples from questing ticks (198 pools), rodent-attached ticks (169), ear tissues of small mammals (50) and fleas (28) (pool size 4–5 individuals for ticks; pool size 10 individuals for fleas; pool size 4–5 individuals for small mammals) were examined for *B. miyamotoi* by a real-time polymerase chain reaction (qPCR) using *B. miyamotoi*–specific forward and reverse primers at 360 nmol/L, respectively, Brm1 5′-CGCTGTAAACGATGCACACTTGGTGTTAATC-3′ and Brm2 5′-CGGCAGTCTCGTCTGAGTCCCCATCT-3′. The corresponding dye-labeled probe (final concentration 100 nmol/L) was R6G-CCTGGGGAGTATGTTCGCAAGAATGAAACTC-BQH1 according to a published protocol (Platonov et al., 2011). Subsequently, all individual DNA lysates of all positive pools were individually examined using qPCR (Platonov et al., 2011).

All qPCR-positive samples were examined by conventional PCR and sequencing.

We targeted the 920-bp long fragment of the glycerophosphodiester phosphodiesterase gene (*glpQ*) of *B. miyamotoi* with the forward primer glpQ-BM-F2 (5' ATGGGTTCAAACAAAAAGTCACC 3') and the reverse primer glpQ-BM-R1 (5'CCAGGGTCCAATTCCATCAGAATATTGTG CAAC 3') (Hovius et al., 2013).

PCR products were purified using Isolate II PCR and Gel Kit (Bioline) and then sequenced. Nucleotide sequences were aligned, compared and analyzed using the MEGA6 program (www.megasoftware.net). Nucleotide sequences were compared with GenBank entries using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., 1990). Three newly obtained sequences from the present study were submitted to the GenBank database.

2.3. Accession numbers of obtained nucleotide sequences

Nucleotide sequences of the fragments of the *glpQ* gene obtained in this study from two *I. ricinus* and one *H. inermis* rodent-attached ticks were submitted to the GenBank database and were assigned the following accession numbers: *B. miyamotoi* MN595157, MN595158 and MN595159.

2.4. Phylogenetic analysis

Multiple sequence alignment was generated in MAFFT v. 7.222 (Katoh and Standley, 2013). Gaps were eliminated and the length of the *glpQ* sequences was adjusted to 367 bp. The analysis consisted of 46 non-duplicating sequences in total: 3 were obtained in the present study, 7 were obtained in 2019 in an independent study in the Czech Republic, and 36 were downloaded from GenBank. A phylogenetic tree was constructed using a maximum likelihood algorithm in RAxML with 100 bootstraps (Stamatakis, 2006).

2.5. Statistical analysis

Statistical analysis of *B. miyamotoi* prevalence in both questing ticks and rodent-attached ticks was performed using log-linear analysis of contingency tables of data with the factors *Borrelia* infection, habitat, host species (if relevant) and tick stadium, with consequent optimal model selection in the Statistica software (StatSoft and Inc, 2013). Fisher's exact test and the χ^2 test was performed using GraphPad Prism, version 8.3.1 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com).

3. Results

3.1. Borrelia miyamotoi in questing ticks

In total, 1260 questing ticks of five species (1164 *I. ricinus,* 12 *D. marginatus,* 12 *D. reticulatus,* 45 *H. concinna* and 27 *H. inermis*) were collected by flagging the vegetation at the three collection sites (Table 1). *Borrelia miyamotoi* was detected in 23 of 1260 tested questing ticks (all positive ticks were *I. ricinus*: 2 larvae, 14 nymphs, 3 females, 4 males) with a total prevalence of 1.8%. Ticks infected with *B. miyamotoi* were found in all studied habitats with an overall prevalence of 3.3% in the rural habitat Slovak Karst, 2.1% in the urban habitat Botanical Garden and 0.4% in the suburban habitat Čermeľ (Table 1).

For questing ticks, the highest infection prevalence was detected for *I. ricinus* males with 2.3% (4 positive/175 examined), followed by nymphs at 1.9% (14 positive/744 examined), females at 1.6% (3 positive/181 examined) and finally larvae with 1.2% (2 positive/160 examined) with non-significant differences ($\chi^2 = 0.544$, P = 0.91, D.F. = 3). The prevalence of infection in questing ticks was in spring (May–July) 1.6% (15/927) and 2.4% (8/333) in autumn (September–October) without significant difference (Fisher exact test, $p > 0.05$, D.F. = 1).

The optimal model selection (factors *B. miyamotoi* infection on questing ticks, habitat and tick stadium) resulted in the best model which includes two-way interactions: infection × habitat and tick stadium × habitat (Maximum likelihood $\chi2 = 8.38$, D.F. = 9, P= 0.496). Habitat showed a significant influence on *B. miyamotoi* prevalence, with the rural habitat infected more frequently than the urban and suburban (3.3 vs 2.1 and 0.4%, respectively; $\chi2 = 12.63$, P= 0.0018, D.F. = 2).

3.2. Borrelia miyamotoi in small mammals and their ectoparasites

In total, 245 out of 250 captured small mammals belonging to eight species (*Apodemus agrarius*, *Apodemus flavicollis*, *Apodemus uralensis*, *Myodes glareolus*, *Crocidura leucodon*, *Micromys minutus*, *Microtus arvalis*, *Microtus subterraneus*) were examined. Five individuals could not be tested due to an insufficient amount of ear tissue. *Borrelia miyamotoi* was detected by qPCR in only one *Microtus arvalis* male collected in the rural habitat Slovak Karst (0.4%, 1/245).

A representative sample of 900 rodent-attached ixodid ticks (868 larvae and 32 nymphs) of six species (*I. ricinus, I. trianguliceps, D. marginatus, D. reticulatus, H. concinna* and *H. inermis*) were determined to species, developmental stage and in the next step were examined for the presence of *B. miyamotoi*. *Borrelia miyamotoi* was detected in

31 of the 900 tested rodent-attached ticks (1 *I. ricinus* nymph, 1 *H. inermis* nymph, 29 *I. ricinus* larvae) corresponding to a total prevalence of 3.4%. Ticks infected with *B. miyamotoi* were found in the rural Slovak Karst (3.7%) and suburban habitat Čermeľ (2.8%) with a non-significant difference (Fisher's exact test, P = 0.805, D.F. = 1) (Table 2). The prevalence of infection in rodent-attached ticks was higher in autumn (8.88%; 23/259) than in spring (1.25%; 8/641) with significant difference (Fisher exact test, p = 0.001, D.F. = 1).

The optimal model with the factors *B. miyamotoi* infection on rodent-attached ticks, habitat and tick stadium was not confirmed, so rodent species was added to the modeling process as a factor. Only the most abundant host species (*A. agrarius* and *A. flavicollis*) with the total dominance of 79% were tested. Analysis of intrinsic factors influencing *B. miyamotoi* prevalence was conducted using a model with a four-way interaction of categorical factors (*B. miyamotoi* infection × habitat × host species × tick stadium). The optimal model selection resulted in the best model which includes two-way interaction *B. miyamotoi* infection × host species, habitat and tick stadium (Maximum likelihood $\chi 2$ = 13.11, D.F. = 17, P = 0.73). Rodent species had a significant influence on *B. miyamotoi* prevalence, with *A. agrarius* infected more frequently than *A. flavicollis* (10.4 vs. 1.5%, respectively; Fisher's exact test, P = 0.0001, D.F. = 1).

A higher significant prevalence was found in rodent-attached ticks (3.4%; 31 positive/examined 900) than in questing ticks (1.8%; 23 positive/1260 examined) (Fisher's exact test, P = 0.002, D.F. = 1). The highest prevalence of *B. miyamotoi* in questing (3.3%) and rodent-attached ticks (3.6%) with a non-significant difference (Fisher's exact test, P = 0.876, D.F. = 1) was confirmed in the rural habitat, Slovak Karst.

A total of 279 tested fleas were collected from small mammals in three habitats of eastern Slovakia. In the rural habitat Slovak Karst 8 species were identified: *Ctenophthalmus agyrtes* (49 ex.), *Ctenophthalmus assimilis* (49), *Ctenophthalmus solutus* (35), *Ctenophthalmus uncinatus* (1), *Doratopsylla dasycnema* (2), *Hystrichopsylla orientalis* (15), *Megabothris turbidus* (17) and *Nosopsyllus fasciatus* (1); in suburban habitat Čermeľ 4 specimens: *Amalareus penicilliger* (15), *C. agyrtes* (54), *C. solutus* (17) and *C. uncinatus* (11); and in the urban habitat Botanical Garden 2 specimens: *C. agyrtes* (2) and *C. solutus* (11). None of the 279 tested fleas belonging to 9 species was qPCR-positive for *B. miyamotoi*.

3.3. Genotyping of B. miyamotoi from ticks based on BLAST analysis of partial nucleotide

sequences of the glpQ gene

Analysis of the *glpQ* sequences confirmed the presence of *B. miyamotoi* in ticks. In total, 24 out of 31 qPCR-positive samples were *glpQ*-PCR-positive in rodent-attached ticks, and 21 DNA amplicons were successfully sequenced from them. Twenty of these 21 sequences were 100% identical. The sequence (acc. no. MN595158) carried a single nucleotide polymorphism, and the identity between this sequence and the subset of the remaining 20 identical sequences was 98.2%.

The partial sequences of the *glpQ* gene of *B. miyamotoi* from 19 rodent-attached *I. ricinus* larvae collected in eastern Slovakia were 100% identical with *B. miyamotoi* isolates (MF678600, MF678599, MF576179, MF678597 and others). The partial sequence of the *glpQ* gene of *B. miyamotoi* from one *H. inermis* nymph from this study (acc. no. MN595157) was 100% identical with *B. miyamotoi* isolates (MG451835, MG136725, MF678600, MF678599, KJ003844, KY986528, MF678598 and others) identified in *I. ricinus* in Italy, Spain and Hungary. The sequence of the *B. miyamotoi glpQ* gene from an *I. ricinus* larva collected in Slovakia (acc. no. MN595158), which carried a single nucleotide polymorphism, was 100% identical to *B. miyamotoi* (MF678598) from *I. ricinus* from Hungary.

In total, 17 of 23 qPCR-positive samples were *glpQ*-PCR-positive in questing ticks. The partial nucleotide sequences of the *glpQ* gene of *B. miyamotoi* from *I. ricinus* (2 female, 3 male, 10 nymphs, 2 larvae) were 100% identical with each other and 100% identical with *B. miyamotoi* (MG451835) from *I. ricinus* collected in Italy.

3.4. Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis of partial *glpQ* sequences of 46 representative samples of *B. miyamotoi* with wide geographic distribution revealed the clear clustering of them into 3 well-defined clades – European, American and Asian – as described earlier (Figure 1). While the well-supported sub-clade consists mainly of *B. miyamotoi* sequences originating from China, Japan, the far eastern and eastern parts of Russia, Estonia, Germany and Poland, the second sub-clade consists the sequences from the vast majority of states in Central Europe, Western Europe and Southern Europe (Austria, Czech Republic, Germany, Hungary, Romania, Slovakia, France, Sweden, Spain, Italy).

Borrelia miyamotoi sequences detected in the presented study cluster together with the sequences from the second sub-clade. The separation of sequences into two subclades is most likely linked to the distribution of specific hosts or tick vectors.

4. Discussion

In this study, DNA of *B. miyamotoi* spirochetes was detected in questing, rodent-attached ticks and one male *M. arvalis* captured in the eastern part of Slovakia. The overall prevalence of *B. miyamotoi* found in questing and rodent-attached ticks was 1.8% (23 positive/1260 examined) and 3.4% (31 positive/900 examined), respectively. The low infection rates in questing *I. ricinus* ticks ranged from 0.4% to 3.5%, which is typical in Europe, although a lot of studies have reported a range between 1 and 2% (Geller et al., 2012; Crowder et al., 2014; Hamšíková et al., 2017; Szekeres et al., 2017; Wagemakers et al., 2017; Kubiak et al., 2019; Vaculová et al., 2019). The more frequent detection of *B. miyamotoi* in host-attached ticks in comparison to questing ticks could be caused by faster reproduction of spirochetes in blood-sucking ticks, which increases the possibility of their molecular detection. It might also be connected to the fact that the hosts were highly infected with *B. miyamotoi* and blood-sucking ticks caught infection when blood-feeding (Han et al., 2016).

In the current study, ticks infected with *B. miyamotoi* were found in the urban habitat Botanical Garden, the suburban habitat Čermeľ and the rural habitat Slovak Karst. In the rural habitat Slovak Karst the sympatric occurrence of *I. ricinus, I. trianguliceps, D. marginatus, D. reticulatus, H. concinna* and *H. inermis* was confirmed (e.g., Nosek, 1971, 1972; Hubálek, 1986; Heglasová et al., 2018). The absence of *B. miyamotoi*-positive rodent-attached ticks in the urban habitat was probably due to the low number of small mammals trapped and ticks collected at this site. In the Slovak Karst, *B. miyamotoi* was found in all developmental stages of *I. ricinus* collected from vegetation and small mammals. The majority of the infected ticks were found on tested *A. agrarius* and *A. flavicollis* (Table 3). *Borrelia miyamotoi* was also confirmed in one *H. inermis* nymph collected from *B. miyamotoi*-negative *A. flavicollis*. To our knowledge, this is the first report of the detection of *B. miyamotoi* in the winter tick *H. inermis*.

Asian and American strains of *B. miyamotoi* detected in at least seven species of ticks from the genus *Ixodes* (Hamer et al., 2012; Mukhacheva et al., 2015; Cook et al., 2016; Siński et al., 2016), while the European strains have been found only in *I. ricinus* (Geller et al., 2012). On the other hand, Asian clade representatives of *B. miyamotoi* were also confirmed in other species of ticks, such as *H. concinna* (Jiang et al., 2018) and *Haemaphysalis longicornis* (Yang et al., 2018). Whether these tick species play some role in *B. miyamotoi* survival or maintaining in hosts still remains unclear (Cutler et al., 2019).

In total, only one of the 245 small mammals tested (ear tissue), a common vole (*M.*

arvalis) captured in the rural habitat Slovak Karst, was *B. miyamotoi*-positive. This specimen did not carry any tick at the time of capture. Due to the retrospective design of study, the skin biopsy was used for the search of *B. burgdorferi* s.l. However, our results demonstrated that this material is not suitable for the detection of *B. miyamotoi* infection in mammals. Other authors recommended using blood or blood-filled organs (spleen, lung, etc.) of rodents (Barbour et al., 2009; Szekeres et al., 2015). In several European countries, small mammals (*Apodemus* spp., *M. glareolus*) were found to be positive for *B. miyamotoi* with infection prevalences up to 5.5% (Burri et al., 2014; Cosson et al., 2014; Cerar et al., 2015; Szekeres et al., 2015). On the other hand, Hamšíková et al. (2017) detected a high prevalence of infection (up to 9.3%) in the skin of *A. flavicollis* in Slovakia.

We analyzed 279 fleas belonging to 9 species for the presence of *B. miyamotoi*, since fleas parasitize the same hosts as *B. miyamotoi*-positive ticks. We did not detect any *B. miyamotoi* in fleas collected from small mammals in the eastern part of Slovakia. To our knowledge, *B. miyamotoi* has not yet been identified in fleas, which indicates that fleas are not important for its survival or maintenance.

Phylogenetic analysis confirmed the already known pattern of separation of existing genotypes of *B. miyamotoi.* All samples analyzed in the present study formed well-supported clades, the clustering of Asian, North American and European genotypes of *B. miyamotoi*. However, the presence of two sub-clades among the European genotype was also evident. While the sub-clade that included, along with others, the samples from Slovakia formed the group connected to the main European tick *I. ricinus,* the samples from the second sub-clade were strictly connected to *I. persulcatus*, a tick distributed from the eastern part of Europe to central and northern Asia, China and Japan. The phylogenetic tree reveals a strong correlation between the genotype/sub-type of *B. miyamotoi* and the species of ticks that transmit the pathogen regardless of the geographic region: Asian genotype – *I. ovatus*; North American – *I. scapularis*, West/Central European – *I. ricinus,* Eurasian – *I. persulcatus*. As an example, the clustering of multiple samples from Japan was defined by the species of their tick vector, either *I. ovatus* or *I. persulcatus* (Figure 1).

5. Conclusion

The presence of *B. miyamotoi* has been recorded in questing *I. ricinus*, rodent-attached *I. ricinus* and *H. inermis* ticks, and in one common vole male (*M. arvalis*) in different habitats in eastern Slovakia. To our knowledge, this is the first report of evidence of *B. miyamotoi* in *H. inermis*, and a tick species other than *Ixodes* from Europe, which may

indicate a wider spectrum of tick species for *B. miyamotoi*. The low prevalence of *B. miyamotoi* in small mammals may be due to the type of tested tissue. *Borrelia miyamotoi* was not identified in the tested fleas belonging to 9 species collected from small mammals, which may suggest that fleas are not important vectors for its survival and/or maintenance in hosts. Our findings indicate that rural habitats with different species of tick vectors and hosts are appropriate for the establishment of a local population of *B. miyamotoi* and its further spread. We confirmed the strong association of tick vector species with the genotype of *B. miyamotoi* that these species transmit.

Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

The study was financially supported by the project VEGA 1/0084/18 and by the project Environmental protection against parasitozoonoses under the influence of global climate and social changes (code IMTS: 26220220116), supported by the Research & Development Operational Programme funded by the ERDF (0.5). This work was partially supported by grant QK1920258 from the Ministry of Agriculture of the Czech Republic to MG and NR.

References

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403–410.

Anděra, M., Horáček, I., 2005. Poznávame naše savce. 2. Přepracované vydání. Sobotáles, Praha.

Barbour, A.G., Bunikis, J., Travinsky, B., Hoen, A.G., Diuk-Wasser, M.A., Fish, D., Tsao, J.I., 2009. Niche partitioning of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia miyamotoi* in the same tick vector and mammalian reservoir species. Am. J. Trop. Med. Hyg. 81, 1120–1131.

Boden, K., Lobenstein, S., Hermann, B., Margos, G., Fingerle, V., 2016. *Borrelia miyamotoi*-associated neuroborreliosis in immunocompromised person. Emerg. Infect. Dis. 22, 1617–1620.

Borgoyakov, V.Y., Fomenko, N.V., Panov, V.V., Chikova, E.D., 2011. Infestation of taiga

ticks with borrelias in the territory of Novosibirsk Scientific Center (Siberian Branch, Russian Academy of Sciences). Entomol. Rev. 91, 396–404.

Burri, C., Schumann, O., Schumann, C., Gern, L., 2014. Are *Apodemus* spp. mice and *Myodes glareolus* reservoirs for *Borrelia miyamotoi*, *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis, *Rickettsia helvetica*, *R. monacensis* and *Anaplasma phagocytophilum*? Ticks Tick Borne Dis. 5, 245–251.

Cerar, T., Korva, M., Avšič-Županc, T., Ružić-Sabljić, E., 2015. Detection, identification and genotyping of *Borrelia* spp. in rodents in Slovenia by PCR and culture. BMC. Vet. Res. 11, 188.

Cochez, C., Heyman, P., Heylen, D., Fonville, M., Hengeveld, P., Takken, W., Simons, L., Sprong, H., 2015. The presence of *Borrelia miyamotoi*, a relapsing fever spirochaete, in questing *Ixodes ricinus* in Belgium and in the Netherlands. Zoonoses Public Health. 62, 331–333.

Cook, V.J., Fedorova, N., Macdonald, W.P, Lane, R.S., Barbour, A.G., 2016. Unique strain of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes pacificus* ticks, California, USA. Emerg. Infect. Dis. 22, 2205–2207.

Cosson, J.F., Michelet, L., Chotte, J., Le Naour, E., Cote, M., Devillers, E., Poulle, M.L., Huet, D., Galan, M., Geller, J., Moutailler, S., Vayssier-Taussat, M., 2014. Genetic characterization of the human relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in vectors and animal reservoirs of Lyme disease spirochetes in France. Parasit Vectors. 7, 233.

Crowder, C.D., Carolan, H.E., Rounds, M.A., Honig, V., Mothes, B., Haag, H., Nolte, O., Luft, B.J., Grubhoffer, L., Ecker, D.J., Schutzer, S.E., Eshoo, M.W., 2014. Prevalence of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes* ticks in Europe and the United States. Emerg. Infect. Dis. 20, 1678–1682.

Cutler, S., Vayssler-Taussat, M., Estrada-Peña, A., Potkonjak, A., Mihalca, A.D., Zeller, H., 2019. A new *Borrelia* on the block: *Borrelia miyamotoi* – a human health risk? Euro Surveill. 24, 1800170.

Černý, V., 1972. The tick fauna of Czechoslovakia. Folia Parasitol. 19, 87–92.

Derdáková, M., Chvostáč, M., Vaculová, T., Václav, R., Ďurovská, J., Pancák, J., Rusňáková Tarageľová, V., 2016. Molecular eco-epidemiology of borreliosis in Slovakia. Zoonoses – Protection of Public and Animal Health. 5 th Scientific Congress. 41–44.

Estrada-Peña, A., Mihalca, A.D., Petney, T.N., 2017. Ticks of Europe and North Africa: a

Guide to Species Identification. Springer, Switzerland.

Filippova, N.A., 1977. Ixodid Ticks of the Subfamily Ixodinae. Fauna SSSR, New Ser.

Fomenko, N.V., Borgoyakov, V.Yu., Panov, V.V., 2011. Genetic Features of DNA of *Borrelia miyamotoi* transmitted by *Ixodes persulcatus*. Mol. Genet. Microbiol. Virol. 26, 60–65.

Fraenkel, C.J., Garpmo, U., Berglund, J., 2002. Determination of novel *Borrelia* genospecies in Swedish *Ixodes ricinus* ticks. J. Clin. Microbiol. 40, 3308–3312.

Fukunaga, M., Takahashi, Y., Tsuruta, Y., Matsushita, O., Ralph, D., McClelland, M., Nakao, M., 1995. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. Int. J. Syst. Bacteriol. 45, 804–810.

Geller, J., Nazarova, L., Katargina, O., Järvekülg, L., Fomenko, N., Golovljova, I., 2012. Detection and genetic characterization of relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in Estonian ticks. PLoS One. 7, e51914. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051914.

GraphPad Prism version 8.3.1 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com.

Hamer, S.A., Hickling, G.J., Keith, R., Sidge, J.L., Walker, E.D., Tsao, J.I., 2012. Associations of passerine birds, rabbits, and ticks with *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia andersonii* in Michigan, U.S.A. Parasit Vectors. 5, 231.

Hamšíková, Z., Coipan, C., Mahríková, L., Minichová, L., Sprong, H., Kazimírová, M., 2017. *Borrelia miyamotoi* and co-infection with *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks and rodents from Slovakia. Microb. Ecol. 73, 1000–1008.

Han, S., Hickling, G.J., Tsao, J.I., 2016. High prevalence of *Borrelia miyamotoi* among adult blacklegged ticks from white-tailed deer. Emerg. Infect. Dis. 22, 316–318.

Heglasová, I., Víchová, B., Kraljik, J., Mošanský, L., Miklisová, D., Stanko, M., 2018. Molecular evidence and diversity of the spotted-fever group *Rickettsia* spp. in small mammals from natural, suburban and urban areas of Eastern Slovakia. Ticks Tick Borne Dis. 9, 1400–1406.

Hovius, J.W.R., de Wever, B., Sohne, M., Brouwer, M.C., Coumou, J., Wagemakers, A., Oei, A., Knol, H., Narasimhan, S., Hodiamont, C.J., Jahfari, S., Pals, S.T., Horlings, H.M., Fikrig, E., Sprong, H., van Oers, M.H., 2013. A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochaete *Borrelia miyamotoi* in

Europe. Lancet. 382, 658.

Hubálek, Z., 1986. Comparative biogeography of Bhanja virus in Europe. Acta Sc. Nat. Brno. 20, 1–50.

Jiang, B.G., Jia, N., Jiang, J.F., Zheng, Y.Ch., Chu, Y.L., Jiang, R.R., Wang, Y.W., Liu, H.B., Wei, R., Zhang, W.H., Li, Y., Xu, X.W., Ye, J.L., Yao, N.N., Liu, X.J., Huo, Q.B., Sun, Y., Song, J.L., Liu, W., Cao, W.Ch., 2018. *Borrelia miyamotoi* infections in humans and ticks, Northeastern China. Emerging Infect. Dis. 24, 236–241.

Kalmár, Z., Sprong, H., Mihalca, A.D., Gherman, C.M., Dumitrache, M.O., Coipan, E.C., Fonville, M., Cozma, V., 2016. *Borrelia miyamotoi* and *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis in *Ixodes ricinus* ticks, Romania. Emerg. Infect. Dis. 22, 550–551.

Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol. Biol. Evol. 30, 772–780.

Khasnatinov, M.A., Danchinova, G.A., Takano, A., Kawabata, H., Ohashi, N., Masuzawa, T., 2016. Prevalence of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes persulcatus* in Irkutsk city and its neighboring territories, Russia. Ticks Tick Borne Dis. 7, 394–397.

Korotkov, Y.S., Kislenko, G.S., Burenkova, L.A., Rudnikova, N.A., Karan, L.S., 2008. Spatial and temporal variability of *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* infection with the Lyme disease agent in Moscow Region. Parazitologia. 42, 441–451.

Krause, P.J., Narasimhan, S., Wormser, G.P., Rollend, L., Fikrig, E., Lepore, T., Barbour, A., Fish, D., 2013. Human *Borrelia miyamotoi* infection in the United States. N. Engl. J. Med. 368, 291–293.

Kubiak, K., Dziekońska-Rynko, J.,·Szymańska, H., Kubiak, D.,·Dmitryjuk, M., Dzika, E., 2019. Questing *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Borrelia miyamotoi* in an urban area of north-eastern Poland. Exp. Appl. Acarol. 78, 113–126.

Mukhacheva, T.A., Salikhova I.I., Kovalev, S.Y., 2015. Multilocus spacer analysis revealed highly homogeneous genetic background of Asian type of *Borrelia miyamtmoi*. Infect. Genet. Evol. 31, 257–262.

Mun, J., Eisen, R.J., Eisen, L., Lane, R.S., 2006. Detection of a *Borrelia miyamotoi* sensu lato relapsing-fever group spirochete from *Ixodes pacificus* in California. J. Med. Entomol. 43: 120–123.

Nosek, J., 1971. The ecology, bionomics and behaviour of *Haemaphysalis* (*Aboimisalis*)

punctata tick in central Europe. Z. Parasitenkd. 37, 198–210.

Nosek, J., 1972. The ecology and public health importance of *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks in central Europe. Folia Parasitol. 19, 93–102.

Nunes, M., Parreira, R., Lopes, N., Maria, C., Carreira, T., Sousa, C., Faira, S., Campino, L., Vieira, M.L., 2015. Molecular identification of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes ricinus* from Portugal. Vector Borne Zoonotic Dis. 15, 515–517.

Pelikán, J., Gaisler, J., Rődl, P., 1979. Naši savci. Academia, Praha.

Platonov, A.E., Karan, L.S., Kolyasnikova, N.M., Makhneva, N.A., Toporkova, M.G., Maleev, V.V., Fish, D., Krause, P.J., 2011. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. Emerg. Infect. Dis. 17, 1816–1823.

Potkonjak, A., Kleinerman, G., Gutiérrez, R., Savić, S., Vračar, V., Nachum-Biala, Y., Jurišić, A., Rojas, A., Petrović, A., Ivanović, I., Harrus, S., Baneth, G., 2016. Occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks with first identification of *Borrelia miyamotoi* in Vojvodina, Serbia. Vector Borne Zoonotic Dis. 16, 631–635.

Rar, V., Livanova, N., Tkachev, S., Kaverina, G., Tikunov, A., Sabitova, Y., Igolkina, Y., Panov, V., Livanov, S., Fomenko, N., Babkin, I., Tikunova, N., 2017. Detection and genetic characterization of a wide range of infectious agents in *Ixodes pavlovskyi* ticks in Western Siberia, Russia. Parasit. Vectors. 10, 258.

Richter, D., Schlee, D.B., Matuschka, F.R., 2003. Relapsing fever-like spirochetes infecting European vector tick of Lyme disease agent. Emerg. Infect. Dis. 9, 697–701.

Rijpkema, S., Golubic, D., Moelkenboer, M., Verbeek-De Kruif, N., Schellekens, J., 1996. Identification off our genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. Exp. Appl. Acarol. 20, 23–30.

Rosický, B., 1957. Blechy – Aphaniptera. Fauna ČSR. Nakladatelství Československé akademie věd, Praha.

Řeháček, J., Úrvolgyi, J., Kocianová, E., Sekeyová, Z., Vavreková, M., Kováčová, E., 1991. Extensive examination of different tick species for infestation with *Coxiella*

burnetii in Slovakia. Eur. J. Epidemiol. 7, 299–303.

Sato, K., Takano, A., Konnai, S., Nakao, M., Ito, T., Koyama, K., Kaneko, M., Ohnishi, M., Kawabata, H., 2014. Human infections with *Borrelia miyamtmoi*, Japan. Emerg. Infect. Dis. 20, 1391–1393.

Scoles, G.A., Papero, M., Beati, L., Fish, D., 2001. A relapsing fever group spirochete transmitted by *Ixodes scapularis* ticks. Vector Borne Zoonotic Dis. 1, 21–34.

Siński, E., Welc-Falęciak, R., Zajkowska, J., 2016. *Borrelia miyamotoi*: A human tick-borne relapsing fever spirochete in Europe and its potential impact on public health. Adv. Med. Sci. 61, 255–260.

Sládek, J., Mošanský, A., 1985. Cicavce okolo nás. Osveta, Martin.

Slovák, M., 2014. Obrázkový kľúč lariev a nýmf kliešťov (Acari: Ixodida) fauny Slovenska. Entomofauna carpathica. 26, 12–18.

Stamatakis, A., 2006. Raxml-vi-hpc: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics. 22, 2688–2690.

Stanko, M., 1995. Ecology of *Ixodes ricinus* immature on *Apodemus agrarius* (Muridae) in the lowland ecosystems conditions. Wiad. Parazytol. 41, 329–336.

StatSoft, Inc., 2013. Statistica (data analysis software system), version 12. www.statsoft.com.

Subramanian, G., Sekeyová, Z., Raoult, D., Mediannikov, O., 2012. Multiple tick-associated bacteria in *Ixodes ricinus* from Slovakia. Ticks Tick Borne Dis. 3, 406–410.

Szekeres, S., Coipan, E.C., Rigó, K., Majoros, G., Jahfari, S., Sprong, H., Földvári, G., 2015. Eco-epidemiology of *Borrelia miyamotoi* and Lyme borreliosis spirochetes in a popular hunting and recreational forest area in Hungary. Parasit. Vectors. 8, 309.

Szekeres, S., Lügner, J., Fingerle, V., Margos, G., Földvári, G., 2017. Prevalence of *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in questing ticks from a recreational coniferous forest of East Saxony, Germany. Ticks Tick Borne Dis. 8, 922–927.

Takano, A., Toyomane, K., Konnai, S., Ohashi, K., Nakao, M., Ito, T., Andoh, M., Maeda,

K., Watarai, M., Sato, K., Kawabata, H., 2014. Tick surveillance for relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in Hokkaido, Japan. PloS One. 9, e104532. https://doi. org/10.1371/journal.pone.0104532.

Talagrand-Reboul, E., Boyer, P.H., Bergström, S., Vial, L., Boulanger, N., 2018. Relapsing fevers: neglected tick-borne diseases. Front. Cell. Infect. Microbiol. 8, 98.

Taylor, K.R., Takano, A., Konnai, S., Shimozuru, M., Kawabata, H., Tsubota, T., 2013. *Borrelia miyamotoi* infections among wild rodents show age and month independence and correlation with *Ixodes persulcatus* larval attachment in Hokkaido, Japan. Vector Borne Zoonotic Dis. 13, 92–97.

Vaculová, T., Derdáková, M., Špitalská, E., Václav, R., Chvostáč, M., Rusňáková Tarageľová, V., 2019. Simultaneous occurrence of *Borrelia miyamotoi*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in urban foci in Bratislava, Slovakia. Acta Parasitol. 64, 19–30.

Venczel, R., Knoke, L., Pavlovic, M., Dzaferovic, E., Vaculová, T., Silaghi, C., Overzier, E., Konrad, R., Kolenčík, S., Derdáková, M., Sing, A., Schaub, G.A., Margos, G., Fingerle, V., 2016. A novel duplex real-time PCR permits simultaneous detection and differentiation of *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Infection. 44, 47–55.

Wagemakers, A., Jahfari, S., de Wever, B., Spanjaard, L., Starink, M.V., de Vries, H.J.C., Sprong, H., Hovius, J.W., 2017. *Borrelia miyamotoi* in vectors and hosts in the Netherlands. Ticks Tick Borne Dis. 8, 370–374.

Yang, Y., Yang, Z., Kelly, P., Li, J., Ren, Y., Wang, C., 2018. *Borrelia miyamotoi* sensu lato in Père David deer and *Haemaphysalis longicornis* ticks. Emerg. Infect. Dis., 24, 928–931.

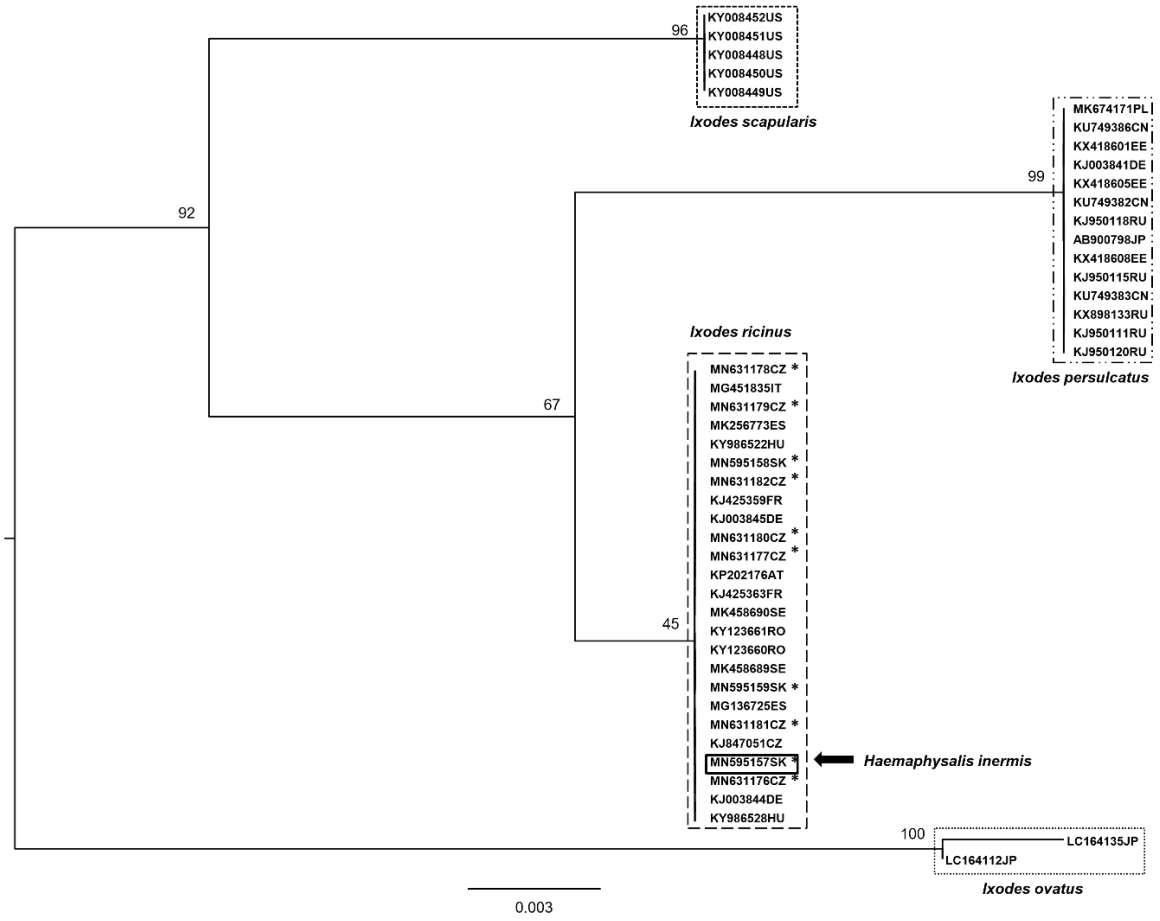


Figure 1. Phylogenetic analysis of *Borrelia miyamotoi* isolates based on comparison of partial *glpQ* gene.

The analysis involved 46 partial sequences of *B. miyamotoi glpQ* gene and the final dataset contained a total of 367 positions. Out of 46 sequences, 10 were obtained in this study: 3 from Slovakia and 7 from the Czech Republic (marked by asterisks). The remaining 36 representative sequences were obtained from the GenBank database. Multiple sequence alignment was generated in MAFFT v. 7.222 (Katoh and Stadley, 2013). The phylogenetic tree was constructed by using a maximum likelihood algorithm in RAxML with 100 bootstraps (Stamatakis, 2006). *Borrelia miyamotoi* isolates are represented by their *glpQ* GenBank accession numbers followed by Aplha-2 country code of their origin: AT-Austria, CN-China, CZ-Czech Republic, EE-Estonia, ES-Spain, FR-France, DE-Germany, HU-Hungary, IT-Italy, JP-Japan, PL-Poland, RO-Romania, RU-Russian Federation, SE-Sweden, SK-Slovakia, US- United States of America. Arrow indicates a framed accession number of the *B. miyamotoi glpQ* sequence detected in *Haemaphysalis inermis.*

Table 1

Prevalence of *Borrelia miyamotoi* in questing ticks in three habitat types in Slovakia.

Habitat /tick stage	*Ixodes ricinus*		*Dermacentor reticulatus*		*Dermacentor marginatus*		*Haemaphysalis concinna*		*Haemaphysalis inermis*	
Slovak Karst (rural)	M	4/67[a]	M	0/7	M	0/4	M	0/3	M	0/10
	F	2/44	F	0/5	F	0/8	F	0/2	F	0/17
	N	11/24	N	-	N	-	N	0/10	N	-
	L	5	L	-	L	-	L	0/30	L	-
		0/67								
Čermeľ (suburban)	M	0/62	-		-		-		-	
	F	1/92								
	N	1/383								
	L	0/9								
Botanical garden (urban)	M	0/22	-		-		-		-	
	F	0/13								
	N	2/106								
	L	2/54								
Total	23/1164 (1.9%)		0/12		0/12		0/45		0/27	

[a]No. of *Borrelia miyamotoi*-positive/no. of tested tick; M–males, F–females, N–nymphs, L–larvae

Table 3

Number of *Borrelia miyamotoi* in rodent-attached ticks.

Host species	N of hosts	N of hosts with *B. miyamotoi*-positive ticks	Sum of positive total ticks	Total ticks
Apodemus agrarius	52	8	22	229
Apodemus flavicollis	64	3	6	536
Myodes glareolus	19	0	0	111
Crocidura leucodon	4	1	1	7
Crocidura suaveolens	1	0	0	2
Microtus arvalis	4	1	2	7
Micromys minutus	4	0	0	8
Sum	150	13	31	900

Table 2 Prevalence of *Borrelia miyamotoi* in developmental stages of rodent-attached tick in three habitat types in Slovakia.

Habitat	Hosts (No.)	*Ixodes ricinus*		*Ixodes trianguliceps*		*Dermacentor reticulatus*		*Dermacentor marginatus*		*Haemaphysalis concinna*		*Haemaphysalis inermis*	
Slovak Karst (rural)	*Apodemus flavicollis* (37)	N	0/12[a]	N	0/1	N	-	N	-	N	-	N	1/1
		L	5/237	L	0/1	L	0/65	L	0/100	L	0/35	L	-
	Apodemus agrarius (43)	N	1/6	N	-	N	-	N	-	N	-	N	-
		L	17/152	L	0/15	L	0/6	L		L	0/4	L	0/1
	Crocidura leucodon (4)	N	0/1	N	-	N	-	N	-	N	-	N	-
		L	1/4	L		L	0/2	L		L		L	
	Microtus arvalis (4)	N	0/1	N	-	N	-	N	-	N	-	N	-
		L	2/5	L		L		L		L	0/1	L	
	Myodes glareolus (9)	N	-	N	0/1	N	-	N	-	N	-	N	-
		L	0/43	L	-	L	0/14	L	0/19	L	0/8	L	0/1
Čermeľ (suburban)	*Apodemus flavicollis* (26)	N	-	N	0/2	-		-		-		-	
		L	0/69	L	0/1								
	Apodemus agrarius (7)	N	0/2	N	-	-		-		-		-	
		L	4/34	L	0/1								
	Micromys minutus (4)	N	0/1	N	-	-		-		-		-	
		L	0/7	L									
	Myodes glareolus (10)	N	0/2	N	0/2	-		-		-		-	
		L	0/21	L	-								
Botanical garden (urban)	*Apodemus flavicollis* (1)	N	-	-		-		-		-		-	
		L	0/12										
	Apodemus agrarius (2)	N	-	-		-		-		-		-	
		L	0/8										
	Crocidura suaveolens (1)	N	-	-		-		-		-		-	
		L	0/2										
Total		30/619 (4.8%)		0/24		0/87		0/119		0/48		1/3	

[a]No. of *Borrelia miyamotoi*-positive/no. of tested rodent-attached tick; M–males, F–females, N–nymphs, L–larva

5. Diskusia

5.1. *Rickettsia* spp.

Rickettsie sú gram-negatívne obligátne intracelulárne baktérie napádajúce eukaryotické bunky. Mnohé z nich sú pôvodcami rickettsiálnych ochorení ľudí a zvierat prenášané vektormi z rôznych skupín (kliešte, blchy, vši, roztoče) (Raoult & Roux 1997, Weinert 2009, Parola *et al*. 2013, Portilo *et al.* 2017, Adem 2019). Dlhodobo prebiehajúci výskum na Slovensku odhalil prítomnosť šiestich patogénnych druhov rickettsií. V rámci monitoringu na Slovensku sú rickettsie pravidelne zaznamenávané najmä v kliešťoch rodov *Ixodes*, *Dermacentor* a *Haemaphysalis*, ale aj v blchách, roztočoch a v humánnych vzorkách. Dlhodobý výskyt rickettsií na našom území potvrdzujú aj výsledky výskumu, ktoré sú prezentované v tejto práci. Výsledky práce dopĺňajú údaje ku komplexnej štúdií niekoľkých projektov zameranej na výskum patogénov (*Borrelia*, *Bartonella*, *Rickettsia*, *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis, *Anaplasma*) v rôznych skupinách hostiteľov a potenciálnych vektorov v rozdielnych typoch habitatov.

Výskyt, prevalencia a diverzita rickettsií v drobných cicavcoch, ich ektoparazitoch a kliešťoch navlajkovaných z vegetácie boli študované pomocou metód polymerázovej reťazovej reakcie, sekvenovania a následne boli získané údaje spracované štatistickými a fylogenetickými analýzami. Celková prevalencia rickettsií v ušniciach drobných cicavcov dosiahla hodnotu 11 % bez signifikantného rozdielu v miere infekcie medzi samcami a samicami. Signifikantne významný rozdiel bol potvrdený v miere infekcie u drobných cicavcov medzi sezónami s najvyšším počtom pozitívnych jedincov v mesiacoch máj a jún (Fisherov presný test P = 0,023), čo môže súvisieť so sezónnou aktivitou kliešťov. Najvyššia druhová diverzita rickettsií bola pozorovaná u *A. flavicollis* a najvyššia prevalencia u *M. glareolus*. Ide o druhy hlodavcov s dominantným zastúpením na študovaných lokalitách a vysokou intenzitou a prevalenciou zaklieštenia, podobne vysoké sú i hodnoty napadnutia blchami. Druhy drobných cicavcov so širokou ekologickou valenciou môžu prispieť k udržaniu, cirkulácii a šíreniu rickettsií v rámci i mimo prírodných ohnísk výraznejšie ako tie druhy, ktoré majú užší vzťah k určitému typu biotopu (Heglasová *et al.* 2018). Podobné výsledky boli publikované v práci Stanko & Miklisová (2000) kde bola pozorovaná výrazne vyššia infestácia kliešťami u dominantných

druhov hlodavcov ako napr. u *A. flavicollis*, než u menej zastúpených druhov.

Prevalencia u navlajkovaných kliešťov dosiahla hodnotu 12,5 %, u kliešťov z drobných cicavcov 20 % a u bĺch 2,5 %. Z výsledkov vyplýva, že kliešte sa javia ako vhodné potenciálne vektory rickettsií. V rurálnom a urbánnom type biotopu bola zaznamenaná najvyššia prevalencia pozitívnych kliešťov na rickettsie. Z drobných cicavcov bolo najviac pozitívnych jedincov zistených v suburbánnom a rurálnom type biotopu. Zistená neprítomnosť pozitívnych hlodavcov v urbánnom prostredí môže súvisieť s nízkym počtom odchytených hlodavcov v tomto type habitatu. Prítomnosť hostiteľov a potenciálnych vektorov viacerých skupín (rodov) na lokalite sa javia ako vhodné podmienky na udržanie a šírenie viacerých druhov rickettsií v prostredí.

V rámci výsledkov tejto práce boli molekulárnou analýzou potvrdené rickettsie u 5 druhov dominantných hlodavcov a u hmyzožravca *C. leucodon*. Ďalej u kliešťov všetkých zistených druhov *I. ricinus*, *I. trianguliceps*, *D. reticulatus*, *D. marginatus*, *H. concinna*, *H. inermis* a u bĺch *C. agyrtes*, *C. solutus, C. uncinatus, M. turbidus* a *A. penicilliger*. Uvedené druhy bĺch boli odobraté z dominantných druhov hlodavcov *A. flavicollis, A. agrarius* a *M. glareolus*. Pozitívne druhy bĺch patria ku generalistom ako aj ku špecialistom s úzkym hostiteľským rozsahom (Rosický 1957) a boli zistené vo všetkých typoch študovaných habitatov. Aj v tomto prípade sa potvrdil význam dominantných druhov hlodavcov so širokou ekologickou valenciou. Keďže ako najpočetnejšie a najrozšírenejšie druhy majú významný vplyv na šírenie a prenos ektoparazitov a patogénov v prostredí.

V tejto štúdii bola na základe sekvenovania štyroch genetických markerov (*gltA*, *ompA*, *ompB* a *sca4*) potvrdená prítomnosť *R. helvetica*, *R. monacensis*, *R. slovaca*, *R. raoultii a R. felis*. Výsledky naznačujú, že určité druhy rickettsií majú tendenciu asociovať s určitými/špecifickými druhmi alebo skupinami článkonožcov. Najviac zastúpená *R. helvetica* bola zistená na všetkých študovaných lokalitách východného Slovenska u všetkých vývinových štádií kliešťov *I. ricinus*, *H. concinna* a *D. reticulatus*, ďalej u bĺch *C. agyrtes, C. uncinatus* a u dominantných hlodavcov (*A. agrarius*, *A. flavicollis*, *M. glareolus*, *M. arvalis*). *Rickettsia helvetica* je najčastejšie asociovaná s najbežnejším a najrozšírenejším druhom kliešťa *I. ricinus*. V mnohých ďalších európskych krajinách a Japonsku bola rickettsia zistená najmenej u ôsmych druhov kliešťov z rodu *Ixodes*

a taktiež u kliešťov z rodov *Haemaphysalis* a *Dermacentor* (Fournier *et al.* 2002, Parola *et al.* 2005, Nijhof *et al*. 2007, Dobec *et al.* 2009, Hornok *et al.* 2010, Tijsse-Klasen *et al.* 2013, Tomassone *et al.* 2013, Mărcuțan *et al.* 2016).

Rickettsia monacensis bola zaznamenaná na všetkých študovaných lokalitách východného Slovenska u kliešťov *I. ricinus* z drobných cicavcov a navlajkovaných z vegetácie. *Rickettsia monacensis* bola tiež identifikovaná v kliešťoch *I. arboricola* a *H. concinna* (Mărcuțan *et al.* 2016), a nedávno tiež v blchách *Ctenophthalmus agyrtes* (Radzijevskaja *et al.* 2018). Sekvencia pochádzajúca z blchy *C. solutus* odobratej z rickettsia-negatívneho hlodavca *A. agrarius* odchyteného v suburbánnom type biotopu bola na 99,87 % podobná so sekvenciou *R. felis* (MG266432) pochádzajúcou z *Arvicola amphibius* z Nemecka. *Rickettsia* sp. blízko príbuzná *R. felis* bola tiež zistená u *A. flavicollis* v suburbánnom biotope. U *R. felis* bol dokázaný transovariálny aj transštadiálny prenos v blchách (Adams *et al.* 1990, Azad *et al.* 1992). Keďže pozitívne blchy boli zistené aj u hlodavcov negatívnych na prítomnosť rickettsií, pravdepodobne došlo u bĺch ku vertikálnemu alebo horizontálnemu prenosu baktérií. Na Slovensku bola *R. felis* zistená tiež v blchách *C. solutus* odobratých z *A. agrarius* (Špitalská *et al.* 2015). Kozmopolitne rozšírená *R. felis* bola identifikovaná vo viacerých druhoch bĺch, kliešťov, roztočov, vší a dokonca v komároch (*Aedes* sp.) (Abdad *et al.* 2011, Socolovschi *et al.* 2012, Brown & Macaluso 2016). *Rickettsia raoultii* bola v rámci tejto štúdie zistená u *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *H. concinna* a v jednej larve *I. trianguliceps.* Podľa dostupných informácii ide o prvý známy dôkaz *R. raoultii* v tomto nidikolnom druhu kliešťa. *Rickettsia slovaca* bola v rámci tejto štúdie zistená u *D. marginatus* a v hlodavcovi *A. flavicollis* len na území so sympatrickým výskytom kliešťov *D. marginatus* a *D. reticulatus* (Slovenský kras, Hrhov). Podobné výsledky asociácie *R. slovaca* a *R. raoultii* s niekoľkými druhmi kliešťov z rodov *Dermacentor* a *Haemaphysalis* boli zaznamenané aj v rámci Európy (Sekeyová *et al.* 1998, Raoult *et al.* 2002, Oteo *et al.* 2004, Ibarra *et al.* 2005, Parola *et al*. 2005, 2009, 2013, Boldiš *et al.* 2008, Mediannikov *et al.* 2008, Socolovschi *et al.* 2009, Merhej & Raoult 2011, Špitalská *et al.* 2012, Földvári *et al.* 2013, Radzijevskaja *et al.* 2015, Minichová *et al.* 2017).

Z výsledkov tejto práce ako aj z výsledkov iných autorov vyplýva, že prítomnosť *R. slovaca* a *R. raoultii* možno predpokladať najmä v biotopoch so sympatrickým

výskytom kliešťov *Dermacentor* spp. a *Haemaphysalis* spp. Avšak v tejto štúdii bola *R. raoultii* zistená aj v kliešťovi z rodu *Ixodes*. Konkrétne išlo o larvu *I. triangulicpes* získanú z hostiteľa *A. agrarius* odchyteného v suburbánnom type habitatu (Čermeľ) bez zaznamenaného sympatrického výskytu kliešťov *Dermacentor* a *Haemaphysalis* na danej lokalite. U *R. raoultii* bol dokázaný transovariálny aj transštadiálny prenos v kliešťoch (Samoylenko *et al.* 2009, Moore *et al.* 2018). V tomto prípade je predpoklad, že larva sa mohla infikovať transovariálnym prenosom rickettsie z infikovanej samice kliešťa, keďže hostiteľ bol negatívny na prítomnosť rickettsií. Hoci priamo na študovanej lokalite neboli počas výskumu zistené iné druhy kliešťov než kliešte rodu *Ixodes*, v ďalších častiach košickej aglomerácie boli potvrdené aj kliešte z iných rodov. Konkrétne ide o výskyt kliešťov *D. reticulatus* a *D. marginatus*, prípadne kliešťov rodu *Haemaphysalis* na viacerých lokalitách urbánneho a suburbánneho charakteru (Stanko *et al.* 2019). Z výsledkov vyplýva, že na šírení a prenose *R. raoultii* sa môže podieľať viac skupín hostiteľov (drobné cicavce, hmyzožravce, vtáky), ktorí v rámci daného územia mohli prísť do kontaktu s rôznymi druhmi kliešťov.

V predloženej štúdií bola najväčšia druhová diverzita rickettsií (*R. helvetica*, *R. monacensis*, *R. slovaca*, *R. raoultii*) pozorovaná v rurálnom type biotopu na lokalite Hrhov v Slovenskom krase. Na tejto lokalite a v blízkom okolí je dlhodobo zaznamenávaný sympatrický výskyt najmenej šiestich druhov ixodových kliešťov (Rosický *et al.* 1954, Nosek 1971, 1972, Hubálek *et al.* 1986, Heglasová *et al.* 2018). Z výsledkov vyplýva, že druhová diverzita kliešťov môže ovplyvňovať diverzitu patogénov a parazitov na danej lokalite. Z dlhoročného výskumu tiež vyplýva, že väčšina rickettsií je asociovaná s určitými druhmi alebo skupinami článkonožcov (potenciálnymi vektormi). Výsledky japonskej štúdie Thu et al. (2019) naznačujú, že väčšina rickettsií má úzky hostiteľský rozsah a v prírode sú udržiavané určitými druhmi kliešťov. Na základe predchádzajúcich publikovaných výsledkov mnohých autorov (e.g. Parola *et al.* 2009a, Socolovschi *et al.* 2009, Thu *et al.* 2019) ako aj na základe výsledkov tejto práce sa zdá, že jednotlivé druhy rickettsií majú rôzny hostiteľský rozsah.

Jedna skupina rickettsií asociuje s viacerými druhmi kliešťov patriacich do rôznych rodov/alebo podčeľadí a tiež s ďalšími skupinami článkonožcov ako sú blchy a roztoče. Táto skupina zahŕňa druhy ako *R. africae*, *R. felis*, *R. helvetica*, *R. monacensis*, alebo

Rickettsia aeschlimannii, *Rickettsia massiliae* a *Rickettsia sibirica*. Zdá sa, že tieto druhy rickettsií majú menej špecifické preferencie pre potenciálne vektory – teda majú širší hostiteľský rozsah. Druhá skupina zahŕňa druhy rickettsií, ktoré sa zdajú byť spojené najmä s jedným druhom kliešťa. Príkladom je *Rickettsia conorii* sub. *conorii* asociovaná s kliešťom *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Socolovschi *et al.* 2009, Parola *et al.* 2013). Posledná skupina rickettsií zahŕňa druhy ako *R. slovaca* asociované s niekoľkými druhmi kliešťov najmä v rámci jedného rodu, konkrétne s *D. marginatus* a *D. reticulatus*. Štatistická analýza (Fisherov presný test) potvrdila význam špecifickej asociácie medzi jednotlivými druhmi rickettsií a kliešťov. Konkrétne štatisticky významná asociácia ($P < 0,0001$) bola potvrdená medzi *R. helvetica*/*R. monacensis* a *I. ricinus* a medzi *R. slovaca*/*R. raoultii* a *Dermacentor* spp. *Rickettsia helvetica* bola zistená vo viacerých druhoch kliešťov, avšak významná asociácia bola potvrdená s *I. ricinus*, keďže tento druh kliešťa bol najviac zastúpený vo vzorke. Uvedené skupiny neodrážajú fylogenetické vzťahy medzi rickettsiami, ale súvisia s ekologicko-epidemiologickými asociáciami.

V poslednom období sú na Slovensku čoraz častejšie zaznamenávané humánne prípady rickettsióz aj vďaka zlepšeniu diagnostických metód. Na našom území bola sérologicky potvrdená prítomnosť protilátok na *R. conorii conorii* a *R. helvetica* v sére u ľudí (Kováčová *et al*. 2006, Sekeyová *et al*. 2012). Ďalší zdokumentovaný je prípad sedemročného dieťaťa u ktorého sa po nacicaní kliešťom rozvinula lymfadenopatia, horúčka a vytvorila sa vyrážka. U odobratého kliešťa *D. reticulatus* bola molekulárne potvrdená *R. raoultii* a v sére dieťaťa bola potvrdená prítomnosť protilátok proti SFG rickettsiám (Špitalská *et al.* 2017). Ricketsióza (*Rickettsia* sp.) bola potvrdená aj molekulárne (PCR) u 29 ročného pacienta z východného Slovenska po cicaní bližšie nešpecifikovaným hmyzom (Zubriková, nepubl. údaje). Pomerne vysoká prevalencia rickettsií v kliešťoch naznačuje, že skutočný počet humánnych prípadov môže byť omnoho vyšší a lekári môžu infekciu často prehliadať alebo charakterizovať pod inou diagnózou. Pravidelný monitoring hostiteľov a vektorov je nutný a významný z hľadiska prevencie, t.j. pri predchádzaní vektormi prenášaných ochorení. Z výsledkov práce je zrejmé, že na základe výskytu špecifických druhov kliešťov/článkonožcov v určitom prostredí môžeme predpokladať výskyt určitých druhov patogénov.

5.2. *Borrelia miyamotoi*

Borrelia miyamotoi patriaca do skupiny borélií spôsobujúcich návratné horúčky je jediný známy druh z tejto skupiny, ktorý je prenášaný tzv. tvrdými kliešťami z rodu *Ixodes*. Prvé humánne prípady ochorenia *B. miyamotoi* boli potvrdené v roku 2011 sérologicky a PCR analýzou u niekoľkých pacientov z Ruska. Ochorenie sa vyznačovalo horúčkou až do 39,5 °C so symptómami podobnými chrípke (Platonov *et al.* 2011, Cutler *et al.* 2019). Ochorenie bolo neskôr zaznamenané aj v USA, Kanade, Ázii a Európe (Krause *et al.* 2013, 2016, Jahfari *et al.* 2014, Sato *et al.* 2014, Kadkhoda *et al.* 2017, Jiang *et al.* 2018). Aj napriek prebiehajúcim výskumom mnoho údajov o vektoroch a rezervoárových hostiteľoch borélie stále chýba. Nastávajú otázky či sa *B. miyamotoi* vyskytuje aj v iných druhoch kliešťov a článkonožcov a či sú tieto schopné jej prenosu.

Na Slovensku bola *B. miyamotoi* objavená v kliešťoch *I. ricinus* len nedávno (Subramanian *et al.* 2012). V súčasnosti prebieha na našom území výskum zameraný na eko-epidemiológiu *B. miyamotoi*. Táto práca taktiež prispieva k najnovším údajom a prináša poznatky o rozšírení *B. miyamotoi* v rozličných typoch habitatov a jej výskyte v rôznych druhov článkonožcoch a hostiteľov. Na detekciu *B. miyamotoi* v drobných cicavcoch, ich ektoparazitoch a kliešťoch navlajkovaných z vegetácie bola použitá metóda kvantitatívnej real-time PCR, konvenčnej PCR, sekvenovania a následne boli získané údaje spracované štatistickými a fylogenetickými analýzami. Pre tento účel bolo skúmaných celkom 2160 kliešťov 6 druhov (*I. ricinus, I. trianguliceps*, *D. marginatus, D. reticulatus, H. concinna* a *H. inermis*), 279 bĺch 9 druhov (*C. agyrtes*, *C. solutus*, *C. assimilis*, *M. turbidus*, *A. penicilliger*, *H. orientalis*, *C. uncinatus*, *D. dasycnema* a *N. fasciatus*) a tkanivové vzorky (ušnice) z 245 drobných cicavcov 8 druhov (*A. agrarius*, *A. flavicollis*, *A. uralensis*, *M. glareolus*, *C. leucodon*, *M. minutus*, *M. arvalis* a *M. subterraneus*). Celková prevalencia *B. miyamotoi* bola 1,8 % (23/1260) v kliešťoch z vegetácie a 3,4 % (31/900) v kliešťoch z drobných cicavcov. Nízka miera infekcie (0,75 – 1,7%) v kliešťoch *I. ricinus* z vegetácie je typická nielen pre Slovensko (Hamšíková *et al.* 2017, Vaculová *et al.* 2019), ale podobne nízke hodnoty (0,4 – 3,5%) dosahuje aj u kliešťov v mnohých častiach Európy (Geller *et al.* 2012, Crowder *et al.* 2014, Szekeres *et al.* 2017, Wagemakers *et al.* 2017, Kubiak *et al.* 2019). Vyššia prevalencia u kliešťov z drobných cicavcov v porovnaní s kliešťami z vegetácie môže súvisieť s priamou infekciou kliešťov z krvi infikovaného

hostiteľa. Následne sa v infikovaných nacicaných kliešťov zvyšuje reprodukcia spirochét čo zvyšuje možnosť ich molekulárnej detekcie (Han *et al.* 2016).

Prevalencia infekcie bola u kliešťov z vegetácie 1,6 % (15/927) počas jarnej sezóny a 2,4 % (8/333) počas jesennej bez signifikantného rozdielu (Fisherov presný test, P > 0.05, D.F. = 1). Prevalencia infekcie bola u kliešťov zozbieraných z drobných cicavcov vyššia na jeseň 8,88 % (23/259) než na jar 1,25 % (8/641) so signifikantným rozdielom (Fisherov presný test, P = 0.001, D.F. = 1). Tento rozdiel v prevalencii infekcie by mohol súvisieť so sezónnou aktivitou kliešťov. Vrchol aktivity lariev a nýmf u druhu *I. ricinus* je v máji až júni, pri výskyte druhov rodu *Dermacentor* alebo *Haemaphysalis* až koncom júla a v auguste. Pričom častejšie na jeseň sa môže prejaviť infekcia u hostiteľov a vektorov. Avšak porovnávanie kliešťov rôznych druhov získaných z prírody je bez xenodiagnostických testov, ktoré neboli súčasťou tejto štúdie, problematické.

V rámci tejto štúdie, kliešte infikované *B. miyamotoi* boli zaznamenané vo všetkých skúmaných habitatoch. V rurálnom type habitatu v Slovenskom krase bolo zistených najviac pozitívnych kliešťov z vegetácie (3,3 %) aj z drobných cicavcov (3,7 %). Lokalita sa od ostatných skúmaných lokalít líši spoločným výskytom šiestich druhov kliešťov *I. ricinus, I. trianguliceps, D. marginatus, D. reticulatus, H. concinna* a *H. inermis* (Nosek 1971, 1972, Hubálek 1986, Heglasová *et al.* 2018). Na danej lokalite bola *B. miyamotoi* molekulárne potvrdená vo všetkých vývinových štádiách *I. ricinus* zozbieraných z vegetácie aj z drobných cicavcov. Väčšina infikovaných kliešťov z drobných cicavcov bola nájdená na dominantne zastúpených druhov *A. agrarius* a *A. flavicollis*. *Borrelia miyamotoi* bola nájdená aj v jednej nymfe *H. inermis* získanej z *B. miyamotoi*-negatívneho hlodavca *A. flavicollis*. Podľa dostupných informácii ide o prvý záznam *B. miyamotoi* v tomto druhu kliešťa. Na základe získaných výsledkov, sa rurálne typy biotopov s odlišnými druhmi kliešťov a hostiteľov javia ako vhodné na výskyt a prenos *B. miyamotoi*. Taktiež optimálny model vyhodnotil významnosť rurálneho typu biotopu na výskyt *B. miyamotoi* v kliešťoch. Ázijské a americké kmene *B. miyamotoi* boli zistené najmenej u siedmich druhov kliešťov z rodu *Ixodes* (Hamer *et al.* 2012, Mukhacheva *et al.* 2015, Cook *et al.* 2016, Siński *et al.* 2016), zatiaľ čo európske kmene boli nájdené u druhu *I. ricinus* (Geller *et al.* 2012). Ázijské kmene *B. miyamotoi* boli tiež potvrdené aj v ďalších druhoch kliešťov, ako *H. concinna* (Jiang *et al.* 2018) a *Haemaphysalis longicornis* (Yang *et al.*

2018). Avšak nie je preukázané či sa aj tieto druhy kliešťov podieľajú na udržiavaní a prenose borélie na hostiteľov.

Z 245 testovaných drobných cicavcov (ušnice) bol pozitívny na *B. miyamotoi* iba jeden hraboš *M. arvalis* odchytený v rurálnom type biotopu v Slovenskom krase. Na tomto jedincovi neboli nájdené v čase odchytu žiadne kliešte. Nízky počet pozitívnych jedincov môže súvisieť s typom testovaného tkaniva. Na štúdium *B. burgdorferi* s. l. v drobných cicavcoch sú využívané najmä vzorky z biopsie kože (ušnice). Naše výsledky však ukázali, že tento materiál nie je vhodný na detekciu infekcie *B. miyamotoi* u cicavcov. Niektorí autori odporúčajú testovať krv alebo vnútroné orgány (slezinu, pľúca) (Barbour *et al.* 2009, Szekeres *et al.* 2015). Na prítomnosť *B. miyamotoi* boli testované aj blchy, keďže parazitovali na rovnakých hostiteľoch ako *B. miyamotoi*-pozitívne kliešte. Z 279 bĺch 9 druhov boli všetky jedince negatívne testované. Podľa dostupných informácií *B. miyamotoi* nebola doposiaľ zistená v blchách. Z doposiaľ získaných údajov vyplýva, že blchy sa nepodieľajú na udržiavaní borélie v enzootických cykloch.

Fylogenetická analýza potvrdila už známy model separácie existujúcich genotypov *B. miyamotoi*. Z analýzy úseku *glpQ* vyplýva, že *B. miyamotoi* získaná z kliešťov *I. ricinus* a nymfy *H. inermis* v rámci tejto štúdie tvorí dobre podporenú vetvu európskych genotypov. Medzi európskymi genotypmi bola zjavná prítomnosť dvoch podskupín. Sekvencie získané zo Slovenska spolu so sekvenciami z prevažnej väčšiny štátov strednej, východnej a južnej Európy tvorili podskupinu spojenú s najrozšírenejším kliešťom *I. ricinus* spolu so sekvenciou z kliešťa *H. inermis*. Sekvencie z druhej podskupiny pochádzajú z Číny, Japonska, východnej časti Ruska, Estónska, Nemecka, a Poľska sú úzko spojené s kliešťom *I. persulcatus*. Sekvencie *B. miyamotoi* detegované v predkladanej štúdii tvoria zoskupenie so sekvenciami z prvej podskupiny. Rozdelenie sekvencii do dvoch klastrov je pravdepodobne spojené s distribúciou špecifických hostiteľov alebo kliešťových vektorov. Fylogenetický strom odhaľuje silnú koreláciu medzi genotypmi *B. miyamotoi* a druhmi kliešťov, ktoré ju prenášajú bez ohľadu na geografickú oblasť - ázijský genotyp - *I. ovatus*; severoamerický - *I. scapularis*, západný/stredoeurópsky - *I. ricinus*, euroázijský - *I. persulcatus*.

ZÁVER

Dizertačná práca prispieva k najnovším údajom týkajúcich sa výskytu a prevalencie vybraných pôvodcov prírodne ohniskových nákaz (rickettsií a *B. miyamotoi*) v rezervoárových hostiteľoch a vektoroch a čiastočne objasňuje ich ekologicko-epidemiologické vzťahy.

Výsledky práce zdôrazňujú význam rurálneho typu biotopu na výskyt patogénov v rezervoárových hostiteľoch a vektoroch. Prírodné prostredie sa vyznačovalo väčšou druhovou diverzitou hostiteľov aj ektoparazitických článkonožcov, čo malo v konečnom dôsledku vplyv na abundanciu a diverzitu patogénov. U rickettsií boli pozorované asociácie s určitými druhmi článkonožcov. Z výsledkov práce vyplýva, že výskyt špecifických druhov kliešťov/článkonožcov v určitom prostredí vplýva na diverzitu a výskyt určitých druhov patogénov. Najväčšie druhové spektrum rickettsií (*R. helvetica*, *R. monacensis*, *R. slovaca*, *R. raoultii, Rickettsia* sp.) bolo zaznamenané v kliešťoch, blchách a drobných cicavcoch v Slovenskom krase. Toto prostredie sa vyznačuje výskytom najmenej šiestich druhov kliešťov. Ďalším príkladom je *R. slovaca*, ktorá bola detegovaná iba v kliešťoch rodu *Dermacentor*, vyskytujúcich sa v rurálnom type biotopu. Z testovaných drobných cicavcov bola *R. slovaca* potvrdená iba u hlodavca *A. flavicollis* odchyteného v Slovenskom krase. Prítomnosť tohto patogénneho druhu rickettsie teda predpokladáme predovšetkým na lokalitách s výskytom kliešťov rodu *Dermacentor*. Opačným príkladom je *R. helvetica*, ktorá má širší hostiteľský rozsah a teda jej výskyt môžeme predpokladať v rôznych typoch biotopov a článkonožcov, čím sa zvyšuje aj riziko nákazy u človeka.

Taktiež *B. miyamotoi* radená do západnej/stredoeurópskej skupiny spájanej s kliešťom *I. ricinus*, bola v rurálnom prostredí zistená aj v kliešťovi druhu *H. inermis*. Výsledky naznačujú, že *B. miyamotoi* by sa v rámci Európy mohla vyskytovať vo viacerých druhov kliešťov. Avšak nie je jasné či tento druh kliešťa zohráva nejakú úlohu v transmisii *B. miyamotoi*. Preto je potrebný ďalší výskum na bližšie objasnenie eko-epidemiológie borélie. Výskyt *B. miyamotoi* vo viacerých druhov potenciálnych vektorov zvyšuje riziko nákazy. Z hľadiska zistenia širšieho hostiteľského spektra *B. miyamotoi* bolo na jej prítomnosť okrem kliešťov skúmaných aj 279 bĺch 9 druhov. Predpokladali sme možnú prítomnosť borélie v blchách, keďže parazitovali na rovnakých hostiteľoch ako

pozitívne kliešte. V rámci tejto práce boli všetky blchy testované negatívne na prítomnosť *B. miyamotoi*. Z doposiaľ získaných údajov vrátane výsledkov tejto práce, nebola borélia detegovaná v blchách, čo naznačuje, že blchy nie sú dôležité v udržiavaní a transmisii borélie. Výsledky práce zdôrazňujú dôležitú úlohu dominantných druhov drobných cicavcov ako hostiteľov ektoparazitov a rezervoárov patogénov. Ide najmä o druhy rodu *Apodemus* spp. a *Myodes*, ktoré mali dominantné zastúpenie na študovaných lokalitách. Tieto hlodavce patrili k najviac pozitívnym druhom na študované patogény a zároveň boli zaznamenané s najväčším počtom pozitívnych ektoparazitov. Na základe získaných údajov je zrejmé, že drobné cicavce, najmä niektoré dominantne zastúpené druhy môžu zohrávať dôležitú úlohu pri udržiavaní, prenose a šírení študovaných patogénov v rámci i mimo prírodných ohnísk. Na základe výsledkov práce môžeme konštatovať nutnosť zvolenia správneho typu testovaného tkaniva hostiteľov na štúdium vybraných patogénov. U rickettsií ide najmä o periférne časti tela cicavcov a odporúčame používať na testovanie ušnice, keďže rickettsie sa koncentrujú prevažne v chladnejších častiach tela. Naopak u *B. miyamotoi* aj na základe výsledkov iných autorov odporúčame testovať krv alebo vnútorné orgány (slezina, pľúca) hlodavcov, než ušnice. Na základe získaných výsledkov môžeme predpokladať prítomnosť a vyššiu prevalenciu patogénov najmä na lokalitách s výskytom viacerých druhov kliešťov a s tým aj spojené väčšie riziko infekcie u ľudí.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

Abdad M.Y., Stenos F.J. & Graves S. 2011. *Rickettsia felis*, an emerging flea-transmitted human pathogen. Emerging Health Threats Journal 4: 7168.

Adams J.R., Schmidtmann E.T. & Azad A.F. 1990. Infection of colonized cat fleas, *Ctenocephalides felis* (Bouche), with a rickettsia-like microorganism. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 43: 400–409.

Adem P.V. 2019. Emerging and re-emerging rickettsial infections. Seminars in Diagnostic Pathology 36: 146–151.

Adeolu M. & Gupta R.S. 2014. A phylogenomic and molecular marker based proposal for the division of the genus *Borrelia* into two genera the emended genus *Borrelia* containing only the members of the relapsing fever *Borrelia*, and the genus *Borreliella* gen. nov. containing the members of the Lyme disease Borrelia (*Borrelia burgdorferi* sensu lato complex). Antonie van Leeuwenhoek 105: 1049–1072.

Alekseev A.N. 2008. Vector Capability of Blood-Sucking Arthropods: A Forecasting Matrix. In: Capinera L.J. (ed.). Encyclopedia of entomology, 2nd ed. Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht, The Netherlands, pp. 4049–4052.

Amaro M., Bacellar F. & França A. 2003. Report of eight cases of fatal and severe Mediterranean spotted fever in Portugal. Annals of the New York Academy of Sciences 990: 331–343.

Ambros M., Dudich A., Miklós P., Stollmann A. & Žiak D. 2010. Ryšavka tmavopása (*Apodemus agrarius*) – nový druh cicavca Podunajskej roviny (Rodentia: Muridae). Lynx, n. s. (Praha), 41: 5–13.

Anděra M. & Horáček I. 2005. Poznáváme naše savce. 2nd ed. Nakladatelství Sobotáles, Praha. 328 pp.

Anderson J.F. & Magnarelli L.A. 2008. Biology of ticks. Infectious disease clinics of North America 22: 195–215.

Angelakis E., Pulcini C., Waton J., Imbert P., Socolovschi C., Edouard S., Dellamonica P. & Raoult D. 2010. Scalp eschar and neck lymphadenopathy caused by *Bartonella henselae* after tick bite. Clinical Infectious Diseases 50 (4): 549–551.

Antolová D., Reiterová K., Miterpáková M., Stanko M. & Dubinský P. 2004. Circulation

of *Toxocara* spp. in suburban and rural ecosystems in the Slovak Republic. Veterinary Parasitology 126 (3): 317–324.

Arthur D.R. 1960. Ticks. A monograph of the Ixodoidea. Part V. On the genera *Dermacentor*, *Anocentor*, *Cosmiomma*, *Boophilus* and *Margaropus*. Cambridge University Press, London. 251 pp.

Azad A.F. & Beard C.B. 1998. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. Emerging Infectious Diseases 4 (2): 179–186.

Azad A.F., Sacci J.B., Nelson W.M., Dasch G.A., Schmidtmann E.T. & Carl M. 1992. Genetic characterization and transovarial transmission of a typhus-like rickettsia found in cat fleas. Proceedings of the National Academy of Science USA 89 (1): 43–46.

Bacellar F., Beati L. & Franca A. 1999. Israeli spotted fever rickettsia (*Rickettsia conorii* complex) associated with human disease in Portugal. Emerging Infectious Diseases 5 (6): 835–836.

Baláž I. & Ambros M. 2010. Distribution and biology of Muridae family (Rodentia) in Slovakia. 1st part: *Chionomys nivalis*, *Microtus tatricus*, *Microtus subterraneus*, *Myodes glareolus*. Prírodovedec No. 412. Constantine the Philosopher University in Nitra, Faculty of Natural Sciences, ŠEVT a.s., Bratislava. 115 pp.

Baláž I., Ambros M. & Tulis F. 2012. Biology and distribution of the species of the family Muridae (Rodentia) in Slovakia. 2nd part: *Apodemus flavicollis*, *Apodemus sylvaticus*, *Apodemus uralensis*, *Apodemus agrarius*. Prírodovedec No. 518. Constantine the Philosopher University in Nitra, Faculty of Natural Sciences, 174 pp.

Baláž I., Ambros M., Tulis F., Veselovský T., Klimant P. & Augustiničová G. 2013. Hlodavce a hmyzožravce Slovenska. Prírodovedec No. 547. Constantine the Philosopher University in Nitra, Faculty of Natural Sciences, 198 pp.

Balčiauskas L., Trakimas G., Juökaitis, R., Ulevičius A. & Balčiauskienė L. 1999. Atlas of Lithuanian mammals, amphibians and reptiles. Second edition. Akstis, Vilnius. 120 pp.

Baltadziev I.G. & Popivanova N.I. 2012. Some epidemiological features of the Mediterranean spotted fever re-emerging in Bulgaria. Folia Medica (Plovdiv) 54

(1): 36–43.

Barandika J.F., Hurtado A., García-Esteban C., Gil H., Escudero R., Barral M., Jado I., Juste R.A., Anda P. & García-Pérez A.L. 2007. Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. Applied and Environmental Microbiology 73 (19): 6166–6171.

Barandika J.F., Hurtado A., García-Sanmartín J., Juste R.A., Anda P. & García-Pérez A.L. 2008. Prevalence of tick-borne zoonotic bacteria in questing adult ticks from northern Spain. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 8 (6): 829–835.

Baranton G. & De Martino S.J. 2009. *Borrelia burgdorferi* sensu lato Diversity and Ist Influoence on Pathogenicity in Humans. In: Lipsker D. & Jaulhac B. (eds) Lyme Borreliosis: biological and clinical aspects. Current Problems in Dermatology, 37. Karger, Basel, Switzerland, pp. 1–17.

Barbour A.G., Bunikis J.,Travinsky B., Hoen A.G., Diuk-Wasser M.A., Fish D. & Tsao J.I. 2009. Niche partitioning of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia miyamotoi* in the same tick vector and mammalian reservoir species. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 81 (6): 1120–1131.

Barbour A.G. & Hayes S.F. 1986. Biology of *Borrelia* species. Microbiological Reviews 50 (4): 381–400.

Barker S.C. & Murrell A. 2004. Systematic and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. Parasitology 129: 15–36.

Barker S.C. & Murrell A. 2008. Systematic and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. In: Bowman A.S. & Nuttall P. (eds.) Ticks: biology, disease and control. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1–39.

Beati L., Peter 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. International Journal of Systematic Bacteriology 43 (3): 521–526.

Bitam I., Parola P., Matsumoto K., Rolain J.M., Baziz B., Boubidi S.C., Harrat Z., Belkaid M. & Raoult D. 2006. First molecular detection of *R. conorii*, *R. aeschlimannii*, and *R. massiliae* in ticks from Algeria. Annals of the New York Academy of Sciences 1078: 368–372.

Blaňarová L., Stanko M., Carpi G., Miklisová D., Víchová B., Mošanský L., Bona M. &

Derdáková M. 2014. Distinct *Anaplasma phagocytophilum* genotypes associated with *Ixodes trianguliceps* ticks and rodents in Central Europe. Ticks and Tick-Borne Diseases 5 (6): 928–938.

Blaňárová L., Stanko M., Miklisová D., Víchová B., Mošanský L., Kraljik J., Bona M. & Derdáková M. 2016. Presence of *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis and *Babesia microti* in rodents and two tick species (*Ixodes ricinus* and *Ixodes trianguliceps*) in Slovakia. Ticks and Tick-Borne Diseases 7 (2): 319–326.

Boden K., Lobenstein S., Hermann B., Margos G. & Fingerle V. 2016. *Borrelia miyamotoi*-associated neuroborreliosis in immunocompromised person. Emerging Infectious Diseases 22 (9): 1617–1620.

Boldiš V., Kocianová E., Štrus J., Tušek-Žnidarič M., Sparagano O.A., Štefanidesová K. & Špitalská E. 2008. Rickettsial agents in Slovakian ticks (Acarina, Ixodidae) and their ability to grow in Vero and L929 cell lines. Annals of the New York Academy of Sciences 1149: 281–285.

Boldiš V., Štrus J., Kocianová E., Tušek-Žnidaric M., Štefanidesová K. & Špitalská E. 2009. Ultrastructural study of the life cycle of *Rickettsia slovaca*, wild and standard type, cultivated in L929 and Vero cell lines. Folia Microbiologica (Praha) 54 (2): 130–136.

Borgoiakov V., Fomenko N.V., Panov V.V. & Chikova E.D. 2011. Study on the infection of taiga ticks with *Borrelia* in the territory of Novosibirsk Scientific Center SB PAS. Parazitologiia 44 (6): 543–556.

Botelho-Nevers E., Foucault C., Lepidi H. & Brouqui P. 2005. Cerebral infarction: an unusual complication of Mediterrane an spotted fever. European Journal of Internal Medicine 16 (7): 525–527.

Bown K.J., Begon M., Bennett M., Birtles R.J., Burthe S., Lambin X., Telfer S., Woldehiwet Z. & Ogden N.H. 2006. Sympatric *Ixodes trianguliceps* and *Ixodes ricinus* ticks feeding on field voles (*Microtus agrestis*): potential for increased risk of *Anaplasma phagocytophilum* in the United Kingdom? Vector Borne and Zoonotic Diseases 6 (4): 404–410.

Bown K.J., Begon M., Bennett M., Woldehiwet Z. & Ogden N.H. 2003. Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*)

system, United Kingdom. Emerging Infectious Diseases 9 (1): 63–70.

Bown K.J., Lambin X., Ogden N.H., Begon M., Telford G., Woldehiwet Z. & Birtles R.J. 2009. Delineating *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in coexisting, discrete enzootic cycles. Emerging Infectious Diseases 15 (12): 1948–1954.

Bown K.J., Lambin X., Telford G.R., Ogden N.H., Telfer S., Woldehiwet Z. & Birtles R.J. 2008. Relative importance of *Ixodes ricinus* and *Ixodes trianguliceps* as vectors for *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in field vole (*Microtus agrestis*) populations. Applied and Environmental Microbiology 74 (23): 7118–7125.

Brezina R., Řeháček J., Áč P. & Majerská M. 1969. Two strains of rickettsiae of Rocky Mountain spotted fever group recovered from *Dermacentor marginatus* ticks in Czechoslovakia. Results of preliminary serological identification. Acta Virologica 13 (2): 142–145.

Brinkerhoff R.J., Kabeya H., Inoue K., Bai Y. & Maruyama S. 2010. Detection of multiple *Bartonella* species in digestive and reproductive tissues of fleas collected from sympatric mammals. Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology 4 (7): 955–958.

Brorson O. & Brorson S.H. 1998. A rapid method for generating cystic forms of *Borrelia burgdorferi*, and their reversal to mobile spirochetes. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica 106: 1131–1141.

Brouqui P., Bacellar F., Baranton G, Birtles R.J., Bjoërsdorff A., Blanco J.R., Caruso G., Cinco M., Fournier P.E., Francavilla E., Jensenius M., Kazar J., Laferl H., Lakos A., Lotric Furlan S., Maurin M., Oteo J.A., Parola P., Perez-Eid C., Peter O., Postic D., Raoult D., Tellez A., Tselentis Y. & Wilske B. 2004. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. Clinical Microbiology and Infection 10: 1108–1132

Brouqui P., Parola P., Fournier P.E. & Raoult D. 2007. Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe. FEMS Immunology and Medical Microbiology 49 (1): 2–12.

Brown L.D. & Macaluso K.R. 2016. *Rickettsia felis*, an emerging flea-borne rickettsiosis. Current Tropical Medicine Reports 3: 27–39.

Bullová E., Lukáň M., Stanko M. & Peťko B. 2009. Spatial distribution of *Dermacentor*

reticulatus tick in Slovakia in the beginning of the 21st century. Veterinary Parasitology 165 (3–4): 357–360.

Burgdorfer W., Aeschlimann A., Peter O., Hayes S.F. & Philip R.N. 1979. *Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. Acta Tropica 36: 357–367.

Burri C., Moran Cadenas F., Douet V., Moret J. & Gern L. 2007. *Ixodes ricinus* density and infection prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a North-facing alitudinal gradient in the Rhône Valley (Switzerland). Vector-Borne and Zoonotic Diseases 7 (1): 50–58.

Burri C., Schumann O., Schumann C. & Gern L. 2014. Are *Apodemus* spp. mice and *Myodes glareolus* reservoirs for *Borrelia miyamotoi*, *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis, *Rickettsia helvetica*, *R. monacensis* and *Anaplasma phagocytophilum*? Ticks and Tick-Borne Diseases 5 (3): 245–251.

Capinera L.J. 2008. Costs and benefits of Insects. In: Capinera L.J. (ed.). Encyclopedia of entomology, 2nd ed. Springer Netherlands, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1076–1093.

Cochez C., Heyman P., Heylen D., Fonville M., Hengeveld P., Takken W., Simons L. & Sprong H. 2015. The presence of *Borrelia miyamotoi*, a relapsing fever spirochaete, in questing *Ixodes ricinus* in Belgium and in The Netherlands. Zoonoses and Public Health 62 (5): 331–333.

Coipan E.C. & Sprong H. 2016. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. In: Braks M. A.H., Van Wieren S.E., Takken W. & Sprong H. (eds.) Ecology and prevention of Lyme borreliosis. Ecology and Control of Vector-borne diseases. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, pp. 44–61.

Colomba C., Saporito L., Polara V.F., Rubino R. & Titone L. 2006. Mediterranean spotted fever: clinical and laboratory characteristics of 415 Sicilian children. BMC Infectious Diseases 6: 60.

Cook V.J., Fedorova N., Macdonald W.P, Lane R.S. & Barbour A.G. 2016. Unique strain of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes pacificus* ticks, California, USA. Emerging Infectious Diseases 22: 2205–2207.

Corrain R., Drigo M., Fenati M., Menandro M.L., Mondin A., Pasotto D. & Martini M.

2012. Study on ticks and tick-borne zoonoses in public parks in Italy. Zoonoses and Public Health 59 (7): 468–476.

Cosson J.F., Michelet L., Chotte J., Le Naour E., Cote M., Devillers E., Poulle M.L., Huet D., Galan M., Geller J., Moutailler S. & Vayssier-Taussat M. 2014. Genetic characterization of the human relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in vectors and animal reservoirs of Lyme disease spirochetes in France. Parasites & Vectors 7: 233.

Crowder C.D., Carolan H.E., Rounds M.A., Honig V., Mothes B., Haag H., Nolte O., Luft B.J., Grubhoffer L., Ecker D.J., Schutzer S.E. & Eshoo M.W. 2014. Prevalence of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes* ticks in Europe and the United States. Emerging Infectious Diseases 20: 1678–1682.

Cutler S., Vayssler-Taussat M., Estrada-Peña A., Potkonjak A., Mihalca A.D. & Zeller H. 2019. A new *Borrelia* on the block: *Borrelia miyamotoi* – a human health risk? Euro Surveillance 24: 1800170.

Cyprich D. & Krumpál M. 2006. Blchy (Siphonaptera) vtákov viazaných na vodu. Sylvia 42: 81–93.

Cyprich D., Krumpál M., Siryová S. & Karaska D. 2006. Vyskyt bĺch (Siphonaptera) v hniezdach dravcov a sov na Slovensku. Sylvia 42: 94–103.

Cyprich D. & Lukáš J. 2006. On the flea (Siphonaptera) fauna on carnivores (Carnivora) in Slovakia. Folia Faunistica Slovaca 11 (11): 63–70.

Černý V. 1972. The tick fauna of Czechoslovakia. Folia Parasitologica (Praha) 19 (1): 87–92.

Černý V., Rosický B., Ašmera J., Kadlčík K., Kobík V., Kratochvílová E., Lauterer P., Novák D., Pauleová E., Šebek Z. &Těmín K. 1965. Výsledky sledování fenologie klíštěte obecného *Ixodes ricinus* L. v československých zemích v letech 1960-1962. Československá parasitologie 12: 125 –131.

Čisláková L., Stanko M., Fričová J., Mošanský L., Trávniček M., Halánová M., Mardzinová S. & Štefančíková A. 2004. Small mammals (Insectivora, Rodentia) as a potential source of chlamydial infection in East Slovakia. Annals of Agricultural and Environmental Medicine 11 (1): 139–143.

Daniel M., Malý M., Danielová V., Kříž B. & Nuttall P. 2015. Abiotic predictors and

annual seasonal dynamics of *Ixodes ricinus*, the major disease vector of Central Europe. Parasites & vectors 8 (1): 1–12.

Danielová V., Rudenko A., Daniel M., Holubová J., Materna J., Golovchenko M. & Schwarzová L. 2006. Extension of *Ixodes ricinus* and agents of tick-borne diseases to mountain areas in the Czech Republic. International Journal of Medical Microbiology 296 (1): 48–53.

Danielová V., Schwarzová L., Materna J., Daniel M., Metelka L., Holubová J. & Kříž B. 2008. Tick-borne encephalitis virus expansion to higher altitudes correlated with climate warming. International Journal of Medical Microbiology 298 (1): 68–72.

Danišová O., Valenčáková A., Stanko M., Luptáková L., Hatalová E. & Čanády A. 2017. Rodents as a reservoir of infection caused by multiple zoonotic species/genotypes of *C. parvum*, *C. hominis*, *C. suis*, *C. scrofarum*, and the first evidence of *C. muskrat* genotypes I and II of rodents in Europe. Acta tropica 172: 29–35.

Dautel H., Dippel C., Oehme R., Hartelt K. & Schettler E. 2006. Evidence for an increased geographical distribution of *Dermacentor reticulatus* in Germany and detection of *Rickettsia* sp. RpA4. International Journal of Medical Microbiology 296 (1): 149–156.

Davis S. & Bent S.J. 2011. Loop analysis for pathogens: niche partitioning in the transmission graph for pathogens of the North American tick *Ixodes scapularis*. Journal of Theoretical Biology 269 (1): 96–103.

Davoust B., Socolovschi C., Revelli P., Gibert P., Marie J.L., Raoult D. & Parola P. 2012. Detection of *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks collected from Pyrenean chamois in France. Ticks and Tick-Borne Diseases 3 (5–6): 387–388.

Derdáková M., Beati L., Pet'ko B., Stanko M. & Fish D. 2003. Genetic variability within *B. burgdorferi* sensu lato genospecies established by PCR–SSCP analysis of the rrfA-rrlB intergenic spacer in *I. ricinus* ticks from the Czech Republic. Applied and Environmental Microbiology 69 (1): 509–516.

Derdáková M., Chvostáč M., Vaculová T., Václav R., Ďurovksá J., Pancák J. & Rusňáková Tarageľová V. 2016. Molecular eco-epidemiology of borreliosis in Slovakia. In: Krištúfková Z. (ed.). Zborník abstratktov z piateho vedeckého kongresu Zoonoses-protection of public and animal health, Bratislava 18.–20. 2016. Slovenská

zdravotnícka univerzita, Bratislava, pp. 41–44.

Derdáková M., Štefančíková A., Špitalská E., Tarageľová V., Košťalová T., Hrklová G., Kybicová K., Schanilec P., Majláthová V., Varády M. & Peťko B. 2011. Emergence and genetic variability of *Anaplasma* species in small ruminants and ticks from Central Europe. Veterinary Microbiology 153 (3–4): 293–298.

Dib L., Bitam I., Bensouilah M., Parola P. & Raoult D. 2009. First description of *Rickettsia monacensis* in *Ixodes ricinus* in Algeria. Clinical Microbiology and Infection 15 (2): 261–262.

Dobec M., Golubic D., Punda-Polic V., Kaeppeli F. & Sievers M. 2009. *Rickettsia helvetica* in *Dermacentor reticulatus* ticks. Emerging Infectious Diseases 15 (1): 98–100.

Dryden M.W. & Blakemore J.C. 1989. A review of flea allergy dermatitis in the dog and cat. Companion Animal Practice 19: 10–17.

Dudich A. 1983a. Blchy (Siphonaptera, Insecta) parazitujúce na drobných zemných cicavcoch žijúcich v Ľubochnianskej doline vo Veľkej Fatre (Západné Karpaty). Ochrana Prírody 4: 223–244.

Dudich A. 1983b. Siphonaptera (Insecta) drobných zemných cicavcov pohoria Vihorlat (Východné Karpaty). Zborník Východoslovenského múzea, Prírodné vedy 23: 153–181.

Dudich A. 1984a. Blchy (Siphonaptera) vtákov a cicavcov južnej časti Krupinskej planiny. Zborník Slovenského národného múzea, Prírodné vedy 30: 115–126.

Dudich A. 1984b. Fleas (Insecta, Siphonaptera) from small mammals in Čergov Mountains (Western Carpathians, Czechoslovakia). Miscellanea zoologica 2: 29–34.

Dudich A. 1984c. Fleas (Siphonaptera) of small terrestrial mammals in the Slánske vrchy Zemplén Mountains (Western Carpathians). Parasitologia hungarica 17: 86–98.

Dudich A. 1985a. Blchy (Siphonaptera), hmyzožravcov a hlodavcov (Insectivora, Rodentia) Chránenej krajinnej oblasti Poľana. Ochrana prírody 6: 241–261.

Dudich A. 1985b. Ektoparazity (Siphonaptera) drobných cicavcov pohoria Burdy (Kováčovské kopce). Spravodaj Oblastného Podunajského múzea v Komárne, Prírodné vedy 5: 145–156.

Dudich A., Ambros M., Štollmann A. & Kováčik J. 1987. Ektoparazitické článkonožce

drobných zemných cicavcov Chránenej krajinnej oblasti Slovenský kras. 1. Plešivecká planina a Koniar. Ochrana prírody 8: 101–122.

Dudich A., Ambros M., Štollmann A., Uhrin M. & Urban P. 2003. Ryšavka tmavopása *Apodemus agrarius* (Pallas) v Novohrade. In: Urban P. (ed.). Príroda okresu Veľký Krtíš – 15 rokov od celoslovenského tábora ochrancov prírody. Environmentálna spoločnosť Lutra, Čebovce, pp. 110–115.

Dudich A. & Štollmann A. 1983. Súčasný stav poznania fauny drobných zemných cicavcov prírodných regiónov Slovenska. Lynx (Praha), n. s. 21 (1982): 67–78.

Dudich A. & Štollmann A. 1986. Doplnky a dodatky k rozšíreniu ryšavky tmavopásej– *Apodemus agrarius* (Pallas) na území Slovenskej socialistickej republiky. Biologia (Bratislava) 41: 597–604.

Duh D., Petrovec M. & Avšič-Zupanc T. 2001. Diversity of babesia infecting European sheep ticks (*Ixodes ricinus*). Journal of Clinical Microbiology 39 (9): 3395–3397.

Duh D., Slovák M., Saksida A., Strašek K., Petrovec M. & Avšič-Županc T. 2006. Molecular detection of *Babesia canis* in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in Slovakia. Biologia 61 (2): 231–233.

Dumpis U., Crook D. & Oksi J. 1999. Tick-borne encephalitis. Clinical Infectious Diseases 28 (4): 882–890.

Dusbábek F. 2002. Klíšťata a klíšťáci – dva různe směry evoluce. Živa 2, pp. 73–76

Dyk V. 1957. Klíště obecné v tatranských vysokohorských polohách. Sbornik Vysoké školy zemědelské a lesnícke, Brno řada B 5: 265–271.

Elchos B.N. & Goddard J. 2003. Implications of presumptive fatal Rocky Mountain spotted fever in two dogs and their owner. Journal of the American Veterinary Medical Association 223 (10): 1450–1452.

Estrada-Peña A., Mihalca A.D. & Peteny T.N. 2017. Ticks of Europe and North Africa. A Guide to Species Identification. Springer International Publishing AG, Switzerland. 404 pp.

Estrada-Peña A., Oteo J.A., Estrada-Peña R., Gortazar C., Osacar J.J., Moreno J.A. & Castella J. 1995. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks (Acari: *Ixodidae*) from two differen loci in Spain. Experimental and Applied Acarology 19 (3): 173–180.

Farhang-Azad A., Radulovic S., Higgins J.A., Noden B.H. & Troyer J.M. 1997. Flea-borne

rickettsioses: ecological considerations. Emerging Infectious Diseases 3 (3): 319–327.

Farhang-Azad A., Traub R. & Bagar S. 1985. Transovarial transmission of murine typhus rickettsiae in *Xenopsylla cheopis* fleas. Science 227 (4686): 543–545.

Felsenfeld O. 1965. Borreliae, human relapsing fever, and parasite-vector-host relationships. Bacteriological Reviews 29 (1): 46–74.

Fenďa P., Krištofík J. & Stanko M. 2012a. Hraboš poľný – *Microtus arvalis*. Parazity. In: Krištofík J. & Danko Š. (eds.). Cicavce Slovenska rozšírenie, bionómia a ochrana. Veda, vydavateľstvo SAV, Bratislava, pp. 114–115.

Fenďa P., Krištofík J. & Stanko M. 2012b. Hrdziak lesný – *Clethrionomys glareolus*. Parazity. In: Krištofík J. & Danko Š. (eds.). Cicavce Slovenska rozšírenie, bionómia a ochrana. Veda, vydavateľstvo SAV, Bratislava, p. 137.

Fenďa P., Krištofík J. & Stanko M. 2012c. Ryšavka tmavopása – *Apodemus agrarius*. Parazity. In: Krištofík J. & Danko Š. (eds.). Cicavce Slovenska rozšírenie, bionómia a ochrana. Veda, vydavateľstvo SAV, Bratislava, pp. 153–154.

Fenďa P., Krištofík J. & Stanko M. 2012d. Ryšavka žltohrdlá – *Apodemus flavicollis*. Parazity. In: Krištofík J. & Danko Š. (eds.). Cicavce Slovenska rozšírenie, bionómia a ochrana. Veda, vydavateľstvo SAV, Bratislava, pp. 162–163.

Feriancová-Masárová Z. & Hanák V. 1965. Stavovce Slovenska IV. Cicavce. Vydavateľstvo SAV, Bratislava. 336 pp.

Fernandez-Soto P., Perez-Sanchez R., Encinas-Grandes A. & Sanz R.A. 2004. Detection and identification of *Rickettsia helvetica* and *Rickettsia* sp. IRS3/IRS4 in *Ixodes ricinus* ticks found on humans in Spain. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 23 (8): 648–649.

Filippova N.A. 1977. Ixodid ticks of the subfamily Ixodinae. Fauna of the USSR. Nauka, Leningrad. 396 pp.

Filippova N.A. 1994. Classification of the subfamily Amblyomminae (Ixodidae) in connection with a reinvestigation of the chaetotaxy of the anal valves. Parazitologiya 28: 3–12.

Filippova N.A. 1997. Fauna of Russia and Neighboring Countries. Ixodid ticks of subfamily Amblyomminae. Nauka, St. Peterburg, Russia. 436 pp.

Földvári G. & Farkas R. 2005. Ixodid tick species attaching to dogs in Hungary. Veterinary Parasitology 129 (1–2): 125–131.

Földvári G., Márialigeti M., Solymosi N., Lukács Z., Majoros G., Kósa J.P. & Farkas R. 2007. Hard ticks infesting dogs in Hungary and their infection with *Babesia* and *Borrelia* species. Parasitology Research 101 (1): 25–34.

Földvári G., Rigó K. & Lakos A. 2013. Transmission of *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia raoultii* by male *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* ticks to humans. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 76 (3): 387–389.

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

Fomenko N.V., Borgoyakov V.Yu. & Panov V.V. 2011. Genetic features of DNA of *Borrelia miyamotoi* transmitted by *Ixodes persulcatus*. Molecular Genetics, Microbiology and Virology 26 (2): 60–65.

Fomenko N.V., Epikhina T.I. & Chernousova N.Y. 2010. Detection of *Borrelia miyamotoi* in the blood of patients got disease in the spring-summer epidemiological period. Molekuliarnaya medusina 28–31.

Fournier P.E., Allombert C. & Supputamongkol Y. 2004. An eruptive fever associated with antibodies to *Rickettsia helvetica* in Europe and Thailand. Journal of Clinical Microbiology 42 (2): 816–818.

Fournier P.E., Dumler J.S., Greub G., Zhang J., Wu Y. & Raoult D. 2003. Gene sequence-based criteria for identification of new rickettsia isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. Journal of Clinical Microbiology 41 (12): 5456–5465.

Fournier P.E., Fujita H., Takada N. & Raoult D. 2002. Genetic identification of rickettsiae isolated from ticks in Japan. Journal of Clinical Microbiology 40 (6): 2176–2181.

Fournier P.E., Gouriet F., Brouqui P., Lucht F. & Raoult D. 2005. Lymphangitis-associated rickettsiosis, a new rickettsiosis caused by *Rickettsia sibirica mongolotimonae*: seven new cases and review of the literature. Clinical Infectious Diseases 40 (10): 1435–1444.

Fournier P.E. & Raoult D. 2007. Bacteriology, Taxonomy, and Phylogeny of *Rickettsia*. In: Fournier P.E. & Raoult D. (ed.). Rickettsial Diseases. Informa Healthcare USA,

Inc., New York, pp. 379.

Fraenkel C.J., Garpmo U. & Berglund J. 2002. Determination of novel *Borrelia* genospecies in Swedish *Ixodes ricinus* ticks. Journal of Clinical Microbiology 40 (9): 3308–3312.

Fukunaga M. & Koreki Y. 1995. The flagellin gene of *B. miyamotoi* sp. nov and its phylogenetic relationship among *Borrelia* species. FEMS Microbiology Letters 134 (2–3): 255–258.

Fukunaga M., Takahashi Y., Tsuruta Y., Matsushita O. & Ralph D. 1995. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. International Journal of Systematic Bacteriology 45 (4): 804–810.

Gage K.L. & Kosoy M.Y. 2005. Natural history of plague: Perspectives from more than a century of research. Annual Review of Entomology 50: 505–528.

García-Sanmartín J., Barandika J.F., Juste R.A., García-Pérez A.L. & Hurtado A. 2008. Distribution and molecular detection of *Theileria* and *Babesia* in questing ticks from northern Spain. Medical and Veterinary Entomology 22 (4): 318–325.

Geller J., Nazarova L., Katargina O., Järvekülg L., Fomenko N. & Golovljova I. 2012. Detection and genetic characterization of relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in Estonian ticks. PLoS ONE 7 (12): 1–7.

Gern L. 2009. Life cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and transmission to humans. Current Problems in Dermatology 37: 18–30.

Gern L., Douet V., López Z., Rais O. & Morán Cadenas F. 2010. Diversity of *Borrelia* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in a Lyme borreliosis endemic area in Switzerland identified by using new probes for reverse line blotting. Ticks and Tick-Borne Diseases 1 (1): 23–29.

Gern L. & Humair P.F. 2002. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. In: Gray J.S., Kahl O., Lane R.S. & Stanek G. (eds.) Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control. CABI International, Wallingford, UK, pp. 347.

Gern L., Siegenthaler M., Hu C.M., Leuba-Garcia S., Humair P.F. & Moret J. 1994. *Borrelia burgdorferi* in rodents (*Apodemus flavicollis*) and *A. sylvaticus*): duration and enhancement of infectivity for Ixodes ricinus ticks. European Journal of

Epidemiology. 10: 75–80.

Gillespie J.J., Beier M.S., Rahman M.S., Ammerman N.C., Shallom J.M., Purkayastha A., Sobral B.S & Farhang-Azad A. 2007. Plasmids and rickettsial evolution: insight from *Rickettsia felis*. PLoS One 2 (3): 266.

Gillespie J.J., Williams K., Shukla M., Snyder E.E., Nordberg E.K., Ceraul S.M., Dharmanolla C., Rainey D., Soneja J., Shallom J.M., Vishnubhat N.D., Wattam R., Purkayastha A., Czar M., Crasta O., Setubal J.C., Azad A F. & Sobral B.S. 2008. *Rickettsia* phylogenomics: unwinding the intricacies of obligate intracellular life. PloS One 3 (4): e2018.

Gliwicz J. & Kryštufek B. 1999. *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771). In: (ed.). The atlas of European Mammals. Academic Press, London, pp. 496.

Gorelova N.B., Korenberg E.I., Kovalevskii Ju.V., Postic D. & Baranton G. 1996. The isolation of *Borrelia* from the tick *Ixodes trianguliceps* (*Ixodidae*) and the possible significance of this species in the epizootiology of ixodid tick-borne borreliosis. Parazitologia 30 (1): 13–18.

Görner M. & Hackethal H. 1988. Säugetiere Europas. 2. Auflage. Neuman Verlag, Leiptzig. 371 pp.

GraphPad Prism version 8.3.1 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com.

Gray J.S., Dautel H., Estrada-Pena A., Kahl O. & Lingren E. 2009. Effects of climate change on tick and tick-borne diseases in Europe. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases 2009: 11–12.

Gray J.S., Kahl O., Lane R.S. & Stanek G. 2002. Lyme borreliosis: biology, epidemiology and control. CABI Publishing, Oxford, England. 347 pp.

Grešíková M. 1999. Kliešťová encefalitída – trvalý verejno-zdravotnícky problém. Veda, Bratislava. 100 pp.

Grešíková M. & Nosek J. 1981. Arbovírusy v Československu. Veda, Bratislava. 132 pp.

Gritsun T.S., Nuttall P.A. & Gould E.A. 2003. Tick-borne Flaviviruses. Advances in Virus Research 61: 317–371.

Guglielmone A.A., Robbins R.G., Apanaskevich D.A., Petney T.N., Estrada- Peña A. & Horak I.G. 2013. The hard ticks of the world: (Acari: Ixodida: Ixodidae). Springer,

Netherlands. 738 pp.

Guglielmone A.A., Robbins R.G., Apanaskevich D.A., Petney T.N., Estrada- Peña A., Horak I.G., Shao R.F. & Barker S.C. 2010. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. Zootaxa (2528): 1–28.

Gugliotta J.L., Goethert H.K., Berardi V.P. & Telford S.R. 2013. Meningoencephalitis from *Borrelia miyamotoi* in an immunocompromised patient. The New England Journal of Medicine 368: 240–245.

Guryčová D., Kocianová E., Výrosteková V. & Řeháček J. 1995. Prevalence of ticks infected with *Francisella tularensis* in natural foci of tularemia in western Slovakia. Eur J Epidemiol 11 (4): 469–474.

Guryčová D. & Letkovský J. 1973. Desať rokov výskumu tularémie na Slovensku. Bratislavské lekárske listy 60 (3): 282–292.

Guryčová D., Lysý M., Výrosteková V. & Dudich A. 1982. Sledovanie prírodného ohniska tularémie v pohorí Malých Karpát. Bratislavske Lekarske Listy (78): 155–164.

Hajduskova E., Literak I., Papousek I., Costa F.B., Novakova M., Labruna M.B. & Zdrazilova-Dubska L. 2016. '*Candidatus* Rickettsia mendelii', a novel basal group rickettsia detected in *Ixodes ricinus* ticks in the Czech Republic. Ticks and Tick-Borne Diseases 7 (3): 482–486.

Halánová M., Stanko M., Čisláková L., Valenčáková A., Malčeková B., Kalinová Z. & Štefančíková A. 2010. Predstavujú drobné cicavce riziko pre šírenie mikrosporídiových nákaz? Slovenský veterinárny časopis 35 (6): 339–341.

Halouzka J., Wilske B., Stunzner D., Sanogo Y.O. & Hubálek Z. 1999. Isolation of *Borrelia afzelli* from overwintering *Culex pipiens* biotype molestus mosquitoes. Infection 27 (4–5): 275–277.

Hamer S.A., Hickling G.J., Keith R., Sidge J.L., Walker E.D. & Tsao J.I. 2012. Associations of passerine birds, rabbits, and ticks with *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia andersonii* in Michigan, U.S.A. Parasites & Vectors 5: 231.

Hammer O., Harper D.A.T. & Ryan P.D. 2001. PAST: paleontological statistic software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 4: 9.

Hamšíková Z., Coipan C., Mahríková L., Minichová L., Sprong H. & Kazimírová M.

2017. *Borrelia miyamotoi* and co-infection with *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks and rodents from Slovakia. Microbial Ecology 73 (4): 1000–1008.

Han S, Hickling G.J. & Tsao J.I. 2016. High prevalence of *Borrelia miyamotoi* among adult blacklegged ticks from white-tailed deer. Emerging Infectious Diseases 22 (2): 316–318.

Hanák V. & Mazák V. 1962. Správa o výskumu savců v Malé Fatře. Lynx 1: 23–26.

Hanincová K., Schäfer S.M., Etti S., Sewell H.S., Tarageľová V., Žiak D., Labuda M. & Kurtenbach K. 2003. Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. Parasitology 126 (1): 11–20.

Hanzák J. & Rosický B. 1949. Nové poznatky o některých zástupcích řádu Insectivora a Rodentia na Slovensku. Sborník Národního muzea v Praze 5 (4): 3–77.

Heglasová I., Rudenko N., Golovchenko M., Zubriková D., Miklisová D. & Stanko M. 2020. Ticks, fleas and rodent-hosts analyzed for the presence of *Borrelia miyamotoi* in Slovakia: the first record of *Borrelia miyamotoi* in a *Haemaphysalis inermis* tick. Ticks and Tick-borne Diseases 11 (5): 101456.

Heglasová I., Víchová B., Kraljik J., Mošanský L., Miklisová D. & Stanko M. 2018. Molecular evidence and diversity of the spotted-fever group *Rickettsia* spp. in small mammals from natural, suburban and urban areas of Eastern Slovakia. Ticks and Tick-borne Diseases 9 (6): 1400–1406.

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.

Higgins J.A., Sacci J.B., Jr., Schriefer M.E., Endris R.G. & Azad A.F. 1994. Molecular identification of rickettsia-like microorganisms associated with colonized cat fleas (*Ctenocephalides felis*). Insect Molecular Biology 3 (1): 27–33.

Hinaidy H.K. 1991. The biology of *Dipylidium caninum*. Part 2. Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe B 38 (5): 329–336.

Hoogstraal H. & Aeachlimann A. 1982. Tick-host specificity. Bulletin de la Société Entomologique Suisse 55: 5–32.

Hornok S. & Farkas R. 2009. Influence of biotope on the distribution and peak activity of

questing ixodid ticks in Hungary. Medical and Veterinary Entomology 23 (1): 41–46.

Hornok S., Fuente J., Horváth G., Fernández de Mera I.G., Wijnveld M., Tánczos B., Farkas R. & Jongejan F. 2013. Molecular evidence of *Ehrlichia canis* and *Rickettsia massiliae* in ixodid ticks of carnivores from South Hungary. Acta Veterinaria Hungarica 61 (1): 42–50.

Hornok S., Meli M.L., Perreten A., Farkas R., Willi B., Beugnet F., Lutz H. & Hofmann-Lehmann R. 2010. Molecular investigation of hard ticks (Acari: Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. Veterinary Microbiology 140 (1–2): 98–104.

Hornok S., Takács N., Kontschán J., György Z., Micsutka A., Iceton S., Flaisz B., Farkas R. & Hofmann-Lehmann R. 2015. Diversity of *Haemaphysalis*-associated piroplasms of ruminants in Central-Eastern Europe, Hungary. Parasites & Vectors 8 (1): 627.

Hovius J.W.R., deWeyer B., Sohne M., Brouwer M.C., Coumou J., Wagemakers A., Oei A., Knol H., Narasimhan S., Hodiamont C.J., Jahfari S., Pals S.T., Horlings H.M., Fikrig E., Sprong H. & van Oers M.H.J. 2013. A case of meningoencephalitis by the repalsing fever spirochaete *Borrelia miyamotoi* in Europe. The Lancet 382 (9892): 658.

Huang H.N., Ding Z,. He J., Wu X.M., Jiang B.G., Gao Y., Chu C.Y., Zhan L., Zhao Q.M., Wang Y.F. & Cao W.C. 2006. Study on the coinfection status of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and spotted fever group *Rickettsia* in ticks from Hunchun, Jilin province. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi 27 (5): 379–383.

Hubálek Z. 2000. Mikrobiální zoonózy a sapronózy. Učební text. Přírodovědecká fakulta MU, Brno. 153 pp.

Hubálek Z., Černý V., Mittermayer T., Kilík J., Halouzka J., Juřicová Z., Kuhn I. & Bárdoš V. 1986. Arbovirological survey in Silica plateau area, Rožňava district, Czechoslovakia. Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology 30 (1): 87–98.

Hubálek Z., Halouzka J. & Juřicová Z. 1998. Investigation of haematophagous arthropods for borreliae - summarized data, 1988 – 1996. Folia Parasitologica (Praha) 45: 67–

72.

Hubálek Z., Juricová Z., Halouzka J., Pellantová J. & Hudec K. 1989. Arboviruses associated with birds in southern Moravia, Czechoslovakia. Nakladatelství Československé Akademie Věd, Brno. 50 pp.

Hubálek Z., Juricová Z. & Halouzka J. 1990. *Francisella tularensis* from ixodid ticks in Czechoslovakia. Folia Parasitologica 37 (3): 255–260.

Hubálek Z. & Rudolf I. 2007. Mikrobiální zoonózy a sapronózy. Masarykova univerzita, Brno. 176 pp.

Hubálek Z. & Rudolf I. 2011. Microbial zoonoses and sapronoses. Springer, New York. 457 pp.

Hulínská D. 2006. Mikrobiologie. In: Bartůněk P., Bojar M., Hulínska D., Janovská D. *et al*. (ed.). Lymeská borelióza. Grada Publishing, Praha, pp.14–15.

Humair P.F. & Gern L. 1998. Relationship between *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. Acta Tropica 69 (3): 213–227.

Chmela J. 1969. On the developmental cycle of the common tick (*Ixodes ricinus* L.) in the northmoravian natural focus of tick-borne encephalitis. Folia Parasitologica 16: 313–319.

Chmielewski T., Andrzejewski K., Maczka I., Fiecek B., Radlinska M. & Tylewska-Wierzbanowska S. 2011. Tick infected with bacteria pathogenic to human in municipal parks in Warsaw. Przeglad Epidemiologiczny 65 (4): 577–581.

Chmielewski T., Podsiadly E., Karbowiak G. & Tylewska-Wierzbanowska S. 2009. *Rickettsia* spp. in ticks, Poland. Emerging Infectious Diseases 15 (3): 486–488.

Choi Y.J., Jang W.J., Ryu J.S., Lee S.H., Park K.H., Paik H.S., Koh Y.S., Choi M.S. & Kim I.S. 2005. Spotted fever group and typhus group rickettsioses in humans, South Korea. Emerging Infectious Diseases 11 (2): 237–244.

Chu C.Y., Liu W., Juany B.G., Wang D.M., Juany W.J., Zhao Q.M., Zhang P.H., Wang Z.X., Tang G.P., Yang H. & Cao W.C. 2008. Novel genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks in southwestern China. Journal of Clinical Microbiology 46 (9): 3130–3133.

Chvostáč M., Špitalská E., Václav R., Vaculová T., Minichová L. & Derdáková M. 2018.

Seasonal patterns in the prevalence and diversity of tick-borne *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. in an urban temperate forest in south western Slovakia. International Journal of Environmental Research and Public Health 15 (5): 994.

Ibarra V., Oteo J.A., Portillo A., Santibáñez S., Blanco J.R., Metola L., Eiros J.M., Pérez-Martínez L. & Sanz M. 2006. *Rickettsia slovaca* infection: DEBONEL/TIBOLA. Annals of the New York Academy of Sciences 1078: 206–214.

Ibarra V., Portillo A., Santibáñez S., Blanco J.R., Pérez-Martínez L., Márquez J. & Oteo J.A. 2005. DEBONEL/TIBOLA: is *Rickettsia slovaca* the only etiological agent? Annals of the New York Academy of Sciences 1063: 346–348.

Jacquot M., Gonnet M., Ferquel E., Abrial D., Claude A., Gasqui P., Choumet V., Charras-Garrido M., Garnier M., Faure B., Sertour N., Dorr N., De Goër J., Vourc'h G. & Bailly X. 2014. Comparative population genomics of the *Borrelia burgdorferi* species complex reveals high degree of genetic isolation among species and underscores benefits and constraints to studying intra-specific epidemiological processes. PloS One 9 (4): 94384.

Jado I., Oteo J.A., Aldamiz M., Gil H., Escudero R. & Ibarra V. 2007. *Rickettsia monancensis* and human disease, Spain. Emerging Infectious Diseases 13 (9): 1405–1407.

Jaenson T.G., Jaenson D.G., Eisen L., Petersson E. & Lindgren E. 2012. Changes in the geographical distribution and abundance of the tick *Ixodes ricinus* during the past 30 years in Sweden. Parasites and Vectors 5: 8.

Jahfari S., Fonville M., Hengeveld P., Reusken C., Scholte E.J., Takken W., Heyman P., Medlock J. M., Heylen D., Kleve J. & Sprong H. 2012. Prevalence of *Neoehrlichia mikurensis* in ticks and rodents from North-west Europe. Parasites & Vectors 5: 74.

Jahfari S., Herremans T., Platonov A.E., Kuiper H. Karan L.S., Vasilieva O., Koopmans M.P.G., Hovius J.W.R. & Sprong H. 2014. High seroprevalence of *Borrelia miyamotoi* antibodies in forestry workers and individuals suspected of human granulocytic anaplasmosis in the Netherlands. New Microbes and New Infections 2 (5): 144–149.

Jiang B.G., Jia N., Jiang J.F., Zheng Y.Ch., Chu Y.L., Jiang R.R., Wang Y.W., Liu H.B.,

Wei R., Zhang W.H., Li Y., Xu X.W., Ye J.L., Yao N.N., Liu X.J., Huo Q.B., Sun Y., Song J.L., Liu W. & Cao W.Ch. 2018. *Borrelia miyamotoi* infections in humans and ticks, Northeastern China. Emerging Infectious Diseases 24 (2): 236–241.

Jongejan F., Ringenier M., Putting M., Berger L., Burgers S., Kortekaas R., Lenssen J., van Roessel M., Wijnveld M. & Madder M. 2015. Novel foci of *Dermacentor reticulatus* ticks infected with *Babesia canis* and *Babesia caballi* in the Netherlands and in Belgium. Parasites & Vectors 8: 232.

Jongejan F. & Uilenberg G. 2004. The global importance of ticks. Parasitology 129 (1): 3–14.

Kadkhoda K., Dumouchel C., Brancato J., Gretchen A. & Krause P.J. 2017. Human seroprevalence of *Borrelia miyamotoi* in Manitoba, Canada, in 2011-2014: a cross-sectional study. CMAJ Open 5 (3): 690–693.

Kalmár Z., Sprong H., Mihalca A.D., Gherman C.M., Dumitrache M.O., Coipan E.C., Fonville M. & Cozma V. 2016. *Borrelia miyamotoi* and *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis in *Ixodes ricinus* ticks, Romania. Emerging Infectious Diseasses 22 (3): 550–551.

Karbowiak G., Stanko M., Fričová J., Wita I., Hapunik J. & Peťko B. 2009. Blood parasites of the striped field mouse *Apodemus agrarius* and their morphological characteristics. Biologia (Lahore, Pakistan) 64: 1219–1224.

Karbowiak G., Víchová B., Slivinska K, Werszko J., Didyk J., Peťko B., Stanko M. & Akimov I. 2014. The infection of questing *Dermacentor reticulatus* ticks with *Babesia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in the Chernobyl exclusion zone. Veterinary Parasitology 204 (3–4): 372–375.

Karpathy S.E., Dasch G.A. & Eremeeva M.E. 2007. Molecular typing of isolates of *Rickettsia rickettsii* by use of DNA sequencing of variable intergenic regions. Journal of Clinical Microbiology 45 (8): 2545–2553.

Katoh K. & Standley D.M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Molecular Biology and Evolution 30 (4): 772–780.

Kawabata H., Masuzawa T. & Yasutakw Y. 1993. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from Ixodes ovatus in Japan. Microbiology and Immunology 37

(11): 843–848.

Kelly P.J., Beati L., Mason P.R., Matthewman L.A., Roux V. & Raoult D. 1996. *Rickettsia africae* sp. nov., the etiological agent of African tick bite fever. International Journal of Systematic Bacteriology 46 (2): 611–614.

Khasnatinov M.A., Danchinova G.A., Takano Ai., Kawabata H., Ohashi N. & Masuzawa T. 2016. Prevalence of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes persulcatus* in Irkutsk City and its neighboring territories, Russia. Tick and Tick-Borne Diseases 7 (2): 394–397.

Klempa B., Stanko M., Labuda M., Ulrich R., Meisel H. & Kruger D.H. 2005. Central European Dobrava Hantavirus isolate from a striped field mouse (*Apodemus agrarius*). Journal of Clinical Microbiology 43 (6): 2756–2763.

Klompen J.S.H., Black W.C., Keirans J.E. & Oliver Jr. J.H. 1996. Evolution of ticks. Annual Review of Entomology 41: 141–161.

Klompen J.S.H. & Oliver Jr. J.H. 1993. Systematic realtionship in the soft ticks (Acari: Ixodida: Argasidae. Systematic Entomology 18 (4): 313–331.

Konopásek I. 2014. Mor, *Yersinia pestis*, blecha a člověk. Živa 4: 151–155.

Korotkov Y.S., Kislenko G.S., Burenkova L.A., Rudnikova N.A. & Karan L.S. 2008. Spatial and temporal variability of *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* infection with the Lyme disease agent in Moscow Regio. Parazitologiia 42 (6): 441–451.

Kováčová E., Sekeyová Z., Trávniček M., Bhide M. R., Mardzinová S., Čurlik J. & Španelová D. 2006. Monitoring of humans and animals for the presence of various Rickettsiae and *Coxiella burnetii* by serological methods. Annals of the New York Academy of Sciences 1078: 587–589.

Kovalevskii Y.V., Korenberg E.I., Gorelova N.B. & Nefedova V.V. 2013. The ecology of *Ixodes trianguliceps* ticks and their role in the natural foci of Ixodid tick-borne borrelioses in the Middle Urals. Entomological Review 93 (8): 1073–1083.

Kožuch O. & Nosek J. 1971. Transmission of tick-borne encephalitis (TBE) virus by *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus*. Acta Virologica 15 (4): 334.

Kožuch O. & Nosek J. 1980. Experimental transmission of tick-borne encephalitis (TBE) virus by *Haemaphysalis concinna* ticks. Acta Virologica 24 (5): 377.

Kraljik J., Paziewska-Harris A., Miklisová D., Mošanský L., Bona M. & Stanko M. 2016. Genetic diversity of *Bartonella* genotypes found in the striped field mouse

(*Apodemus agrarius*) in Central Europe. Parasitology 143 (11): 1437–1442.

Krasnov B.R. 2008. Functional and evolutionary ecology of fleas: a model for ecological parasitology. Cambridge University Press, Cambridge. 593 pp.

Krasnov B.R., Shenbrot G.I., Mouillot D., Khokhlova I.S. & Poulin R. 2006. Ecological characteristics of flea species relate to their suitability as plague vectors. Oecologia 149 (3): 474–481.

Kratochvíl J., Balát F., Folk Č., Grulich I., Havlín J., Holišová V., Hudec K., Pelikán J., Rosický B., Sýkora I., Šebek Z. & Zapletal M. 1959. Hraboš polní *Microtus arvalis*. Nakladatelství Československé akademie věd, Praha. 359 pp.

Kratochvíl J. & Pelikán J. 1955. Poznámky k pronikání hraboše polního do Tatranského národního parku. Zoologické a entomologické listy 4: 303–312.

Kratochvíl J. & Rosický B. 1953. K binomii a taxonomii myší rodu *Apodemus* žijících v Československu. Zoologické a entomologické listy 2: 3–24.

Kratochvíl J. & Rosický B. 1954. K rozšíření a rozmnožování myšice temnopásé (*Apodemus agrarius*) v ČSR. Zoologické a entomologické listy 3 (2): 97–108.

Krause P.J., Fish D., Narasimhan S. & Barbour A.G. 2015. *Borrelia miyamotoi* infection in nature and in humus. Clinical Microbiology and Infection 21 (7): 631–639.

Krause P.J., Narasimhan S., Wormser G.P., Rollend L., Fikrig E., Lepore T., Barbour A. & Fish D. 2013. Human *Borrelia miyamotoi* infection in the United States. The New England Journal of Medicine 368 (3): 291–293.

Krause P.J., Schwab J., Narasimhan S., Brancato J., Xu G. & Rich S.M. 2016. Hard tick relapsing fever caused by *Borrelia miyamotoi* in a child. The Pediatric Infectious Disease Journal 35 (12): 1352–1354.

Krištofík J. 2012a. Hraboš poľný (*Microtus arvalis*). In: Krištofík J. & Danko Š. (ed.). Cicavce Slovenska – rozšírenie, bionómia a ochrana. Veda-vydavateľstvo SAV, Bratislava, pp. 107–114.

Krištofík J. 2012b. Hrdziak lesný (*Clethrionomys glareolus*). In: Krištofík J. & Danko Š. (ed.). Cicavce Slovenska – rozšírenie, bionómia a ochrana. Veda-vydavateľstvo SAV, Bratislava, pp. 128–137.

Krištofík J. & Danko Š. 2012. Cicavce Slovenska – rozšírenie, bionómia a ochrana. Veda-vydavateľstvo SAV, Bratislava. 711 pp.

Kubiak K., Dziekońska-Rynko J.,·Szymańska H., Kubiak D.,·Dmitryjuk M. & Dzika E. 2019. Questing *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Borrelia miyamotoi* in an urban area of north-eastern Poland. Experimental and Applied Acarology 78 (1): 113–126.

Kuloglu F., Rolain J.M., Akata F., Eroglu C., Celik A.D. & Parola P. 2012. Mediterranean spotted fever in the Trakya region of Turkey. Ticks and Tick-borne Diseases 3 (5–6): 298–304.

Kuloglu F., Rolain J.M., Aydoslu B., Akata F., Tugrul M. & Raoult D. 2006. Prospective evaluation of rickettsioses in the Trakya (European) region of Turkey and atypic presentations of *Rickettsia conorii*. Annals of the New York Academy of Sciences 1078 (1): 173–175.

Kurtenbach K., Peacey M., Rijpkema S.G., Hoodless A.N., Nuttall P.A. & Randolph S.E. 1998. Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. Applied and Environmental Microbiology 64 (4): 1169–1174.

Kvíčerová J. 2012. Phylogeny of coccidia and coevolution with their hosts. Ph.D. Thesis Series, No. 3. Faculty of science University of South Bohemia, České Budějovice. 115 pp.

Labuda M., Lysý J. & Krippel E. 1989. Kliešte *Ixodes ricinus*, *Haemaphysalis concinna* a *Dermacentor reticulatus* (Acarina, Ixodidae) na drobných cicavcoch vybraných lokalít západného Slovenska. Biologia (Bratislava) 44: 897–909.

Labuda M., Nuttall P.A., Kožuch O., Elečková E., Williams T., Žuffová E. & Sabó A. 1993. Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature. Experientia 49 (9): 802–805.

Lakos A. 1997. Tick-borne lymphadenopathy--a new rickettsial disease? Lancet 350 (9083): 1006.

Lakos A. 1999. Tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA) – a new, probably rickettsial infection. Reviews of Infectious Diseases 1: 114–116.

Lakos A. 2002. Tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA). Wiener Klinische Wochenschrift 114 (13–14): 648–654.

Lane R.S., Piesman J. & Burgdorfer W. 1991. Lyme borreliosis: relation of its causative

agent to its vectors and hosts in North America and Europe. Annual Review of Entomology 36: 587–609.

Lichard M. 1965. Poznámky k výskytu a ekológii kliešťa *Ixodes triangulicеps* Birula, 1895. Biologia (Bratislava) 20: 348–358.

Lindblom A., Severinson K. & Nilsson K. 2010. *Rickettsia felis* infection in Sweden: report of two cases with subacute meningitis and review of the literature. Scandinavian Journal of Infectious Diseases 42 (11–12): 906–909.

Lommano E., Bertaiola L., Dupasquier C. & Gern L. 2012. Infections and coinfections of questing *Ixodes ricinus* ticks by emerging zoonotic pathogens in Western Switzerland. Applied and Environmental Microbiology 78 (13): 4606–4612.

Lukáň M., Bullová E. & Peťko B. 2010. Climate warming and tick-borne encephalitis, Slovakia. Emerging and Infectious Diseases 16 (3): 524–526.

Lünemann J.D., Zarmas S., Priem S., Franz J., Zschenderlein R., Aberer E., Klein R., Schouls L., Burmester G.R. & Krause A. 2001. Rapid Typing of *Borrelia burgorferi* sensu lato species in specimens from patients with different manifestations of Lyme borreliosis. Journal of Clinical Microbiology. 39 (3): 1130–1133.

Lykov V.A. 1975. Distribution and some problems in the ecology of the tick, *Ixodes triangulicеps* Bir. in the southern Urals. Parazitologiia 9 (4): 348–351.

Mačička O. 1955. O výškovom rozvrstvení kliešťa obyčajného (*Ixodes ricinus* L., 1758) vo Vysokých Tatrách. Zoologické a entomologické listy 4: 384–388.

Mačička O. 1958. K bionomii *Haemaphysalis inermis* Birula u nás. Československá parasitologie 2: 121–124.

Madeddu G., Mancini F., Caddeo A., Ciervo A., Babudieri S., Maida I., Fiori M.L., Rezza G. & Mura M.S. 2012. *Rickettsia monacensis* as cause of Mediterranean spotted fever-like illness, Italy. Emerging Infectious Diseases 18 (4): 702–704.

Máderová E. 2005. Kliešťová encefalitída na Slovensku. Via Practica 2 (1): 51–54.

Magnarelli L.A. & Anderson J.F. 1988. Ticks and biting insects infected with the etiologic agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*. Journal of Clinical Microbiology 26 (8): 1482–1486.

Majláth I. & Majláthová V. 2015. Atlas kliešťov Slovenska. 1. vydanie. Parazitologický

ústav SAV, Košice. 109 pp.

Majláthová V., Majláth I., Víchová B., Guľová I., Derdáková M., Sesztáková E. & Peťko B. 2011. Polymerase chain reaction confirmation of *Babesia canis canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs suspected of babesiosis in Slovakia. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 11 (11): 1447–1451.

Manilla G. 1998. Fauna d'Italia. Acari: Ixodida. Calderini, Bologna. 280 pp.

Mărcuţan I.D., Sándor A.D., Mihalca A.D., Gherman C.M., Kalmár Z., D'Amico G., Dumitrache M.O. & Cozma V. 2014. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in ticks collected from migratory birds in Danube Delta, Romania. Parasites & Vectors 7 (1): 16.

Mărcuţan I.D., Zsuzsa K., Ionică A.M., D'Amico G., Mihalca A.D., Vasile C. & Sándor A.D. 2016. Spotted fever group rickettsiae in ticks of migratory birds in Romania. Parasites & Vectors 9: 294.

Margos G., Vollmer S.A., Ogden N.H. & Fish D. 2011. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Infection, Genetics and Evolution 11 (7): 1545–1563.

Marie J.L., Fournier P.E., Rolain J.M., Briolant S., Davoust B. & Raoult D. 2006. Molecular detection of *Bartonella quintana*, *B. elizabethae*, *B. koehlerae*, *B. doshiae*, *B. taylorii*, and *Rickettsia felis* in rodent fleas collected in Kabul, Afghanistan. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 74 (3): 436–439.

Markeshin S.I.a., Smirnova S.E. & Evstafev I.L. 1992. An assessment of the status of natural foci of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the Crimea. Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, I Immunobiologii 4: 28–31.

Márquez F.J. 2008. Spotted fever group *Rickettsia* in ticks from southeastern Spain natural parks. Experimental and Applied Acarology 45 (3–4): 185–194.

Materna J., Daniel M. & Danielova V. 2005. Altitudinal distribution limit of the tick *Ixodes ricinus* shifted considerably towards higher altitudes in central Europe: results of three years monitoring in the Krkonose Mts. (Czech Republic). Central European Journal of Public Health 13 (1): 24–28.

Materna J., Daniel M., Metelka L. & Harčarik J. 2008. The vertical distribution, density and the development of the tick *Ixodes ricinus* in mountain areas influenced by

climate changes (The Krkonoše Mts., Czech Republic). International Journal of Medical Microbiology 298 (1): 25–37.

Matuschka F.R., Endepols S., Richter D. & Spielman A. 1997. Competence of urban rats as reservoir hosts for Lyme disease spirochetes. Journal of Medical Entomology 34 (4): 489–493.

McNaught J.G. 1911. Paratyphoid fevers in South Africa. Journal of the Royal Army Medical Corps 16: 505–514.

Mediannikov O., Matsumoto K., Samoylenko I., Drancourt M., Roux V., Rydkina E., Davoust B., Tarasevich I., Brouqui P. & Fournier P. E. 2008. *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with *Dermacentor* ticks in Europe and Russia. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58 (7): 1635–1639.

Mediannikov O., Trape J.F., Diatta G., Parola P., Fournier P.E. & Raoult D. 2010. *Rickettsia africae*, Western Africa. Emerging Infectious Diseases 16 (3): 571–573.

Medvedev S.G. 2016. The Distribution of Fleas. [Cit. 16. 11. 2017]. Dostupné na DOI: https://www.zin. ru/Animalia/Siphonaptera/article.htm.

Mehlhorn H. 2001. Encyclopedic reference of parasitology: Diseases, Treatment, Therapy. 2nd ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Germany. 676 pp.

Merhej V. & Raoult D. 2011. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society 86 (2): 379–405.

Merhej V., Angelakis E., Socolovschi C. & Raoult D. 2014. Genotyping, evolution and epidemiological findings of *Rickettsia* species. Infection Genetics and Evolution 25: 122–137.

Mierzejewska E.J., Welc-Faleciak R., Karbowiak G., Kowalec M., Behnke J.M. & Bajer A. 2015. Dominance of *Dermacentor reticulatus* over *Ixodes ricinus* (Ixodidae) on livestock, companion animals and wild ruminants in eastern and central Poland. Experimental and Applied Acarology 66 (1): 83–101.

Miklossy J., Kasas S., Zurn A.D., McCall S., Yu S. & McGeer P.L. 2008. Persisting atypical and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* and local inflammation in Lyme neuroborreliosis. Journal of Neuroinflammation 5 (40): 1176–1194.

Minichová L., Hamšíková Z., Mahríková L., Slovák M., Kocinová E., Kazimírová M.,

Škultéty Ľ., Štefanidesová K. & Špitalská E. 2017. Molecular evidence of *Rickettsia* spp. in ixodid ticks and rodents in suburban, natural and rural habitats in Slovakia. Parasites & Vectors 10 (1): 158.

Mitchell-Jones A.J., Amori G., Bogdanowicz W., Kryštufek B., Reijnders P.J.H., Spitzenberg F., Stubbe M., Thissen J.B.M., Vohralík V. & Zima J. 1999. The atlas of European mammals. Academic Press, London. 501 pp.

Mittermayer T., Brezina R. & Úrvolgyi J. 1980. First report of an infection with *R. slovaca*. Folia Parasitologica 27: 373–376.

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.

Morick D., Baneth G., Avidor B., Kosoy M.Y., Mumcuoglu K.Y., Mintz D., Eyal O., Goethe R., Mietze A., Shpigel N. & Harrus S. 2009. Detection of *Bartonella* spp. in wild rodents in Israel using HRM real-time PCR. Veterinary Microbiology 139 (3–4): 293–297.

Morick D., Krasnov B.R., Khokhlova I.S., Shenbrot G.I., Kosoy M.Y. & Harrus S. 2010. *Bartonella* genotypes in fleas (Insecta: Siphonaptera) collected from rodents in the negev desert, Israel. Applied and Environmental Microbiology 76 (20): 6864–6869.

Mošanský A. 1957. Príspevok k poznaniu rozšírenia a taxonómie niektorých druhov drobných cicavcov na východnom Slovensku. Prírodovedné práce slovenských múzeí 3 (5): 1–42.

Mošanský A. 1981. Teriofauna východného Slovenska a katalóg mamaliologických zbierok Východoslovenského múzea. I. časť (Insectivora, Rodentia). Zborník Východoslovenského múzea v Košiciach, Prírodné vedy 21 (1980): 29–87.

Mošanský A. 1986. Poznámky k výskytu niektorých druhov drobných cicavcov okresu Trebišov. In: Voskár J. & Renčík M. (eds.). IX. východoslovenský tábor ochrancov prírody Borša – 1985. Prehľadm odborných výsledkov. ONV a OV SZOPK Trebišov, 143–154 pp.

Mošanský A. 1993. Teriofauna východného Slovenska a katalóg mamaliologických zbierok Východoslovenského múzea. V. časť. (Rodentia 2). Zborník

Východoslovenského múzea v Košiciach, Prírodné vedy 34: 129–144.

Mošanský A. 1995. Teriofauna východného Slovenska a katalóg mamaliologických zbierok Východoslovenského múzea. VI. časť. (Rodentia 3). Zborník Východoslovenského múzea v Košiciach, Prírodné vedy 35 (1994): 113–150.

Mošanský L. & Stanko M. 1998. Príspevok k poznaniu fauny vtákov a drobných zemných cicavcov NPR Tajba (Východoslovenská nížina, Slovensko). Ochrana Prírody 16: 193–202.

Mošanský L. & Stanko M. 2001. Príspevok k poznaniu fauny stavovcov (Amphibia, Aves, Mammali) dolného toku Bodrogu (Kováčovské lúky, Východoslovenská rovina). Natura Carpatica 42: 145–154.

Mukhacheva T.A., Salikhova I.I. & Kovalev S.Y. 2015. Multilocus spacer analysis revealed highly homogeneous genetic background of Asian type of *Borrelia miyamtmoi*. Infection, Genetics and Evolution 31: 257–262.

Mun J., Eisen R.J., Eisen L. & Lane R.S. 2006. Detection of a *Borrelia miyamotoi* relapsing-fever group spirochete from *Ixodes pacificus* in California. Journal of Medical Entomology 43 (1): 120–123.

Murray G.G.R., Weinert L.A., Rhule E.L. & Welch J.J. 2016. The phylogeny of *Rickettsia* using different evolutionary signatures: how tree-like is bacterial evolution? Systematic Biology 65 (2): 265–279.

Mysterud A., Byrkjeland R., Qviller L. & Viljugrein H. 2015. The generalist tick *Ixodes ricinu* and the specialist tick *Ixodes trianguliceps* in shrews and rodents in a northern forest ecosystem– a role of body size even among small hosts. Parasites & Vectors 8: 639.

Naumov R.L. & Guttova V.P. 1984. Experimantal study of the participation of gamasid mites and fleas in circulating the tick-borne encephalitis virus (a review). Parazitologiia 18 (2): 106–115.

Nefedova V.V., Korenberg E.I., Kovalevskii Y.V., Samokhvalov M.V. & Gorelova N.B. 2013. The role of *Ixodes trianguliceps* tick larvae in circulation of *Babesia microti* in the Middle Urals. Entomological Review 93 (2): 258–266.

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 and Zoonotic Diseases 7 (4): 585–595.

Nilsson K., Lindquist O. & Påhlson C. 1999. Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac dech. Lancet 354 (9185): 1169–1173.

Nosek J. 1971. The ecology, bionomics and behaviour of *Haemaphysalis* (*Haemaphysalis*) *concinna* tick. Zeitschrift fűr Parasitenkunde 36: 233–241.

Nosek J. 1972. The ecology and public health importance of *Dermacentor marginatus* a *D. reticulatus* ticks in Central Europe. Folia Parasitologica 19 (1): 93–102.

Nosek J. 1973. Some characteristic features of the life history, ecology and behaviour of the ticks *Haemaphysalis inermis*, *H. concina* and *H. punctata*. In: Daniel M. & Rosický B. (eds.). Proceedings of the 3 rd international congress of acarology, Prague, 31. 8.–6. 9. 1971. Institute of Parasitology, Czechoslovak Academi of Sciences, Prague, pp. 479–482.

Nosek J., Kožuch O. & Lysý J. 1981. The survival of the tick-borne encephalitis (TBE) virus in nymphs of *Haemaphysalis inermis* tick and its transmission to pygmy mouse (*Micromys minutus*). Cahiers ORSTOM Ser. Entomol. Med. Parasitol. 19 (1): 67–69.

Nosek J., Lichard M. & Sztankay M. 1967. The ecology of ticks in the Tribec and Hronský Inovec Mountains. Bull World Health Organ 36 (1): 49–59.

Nosek J., Sixl W., Kvíčala P. & Waltinger H. 1972. Central Europaean ticks (Ixodoidea), keys for determination. Mitteilungen der Abteilung fűr Zoologie am Landesmuseum, Joanneum in Graz 1 (2): 61–92.

Nováková M., Víchová B., Majláthová V., Lesnáková A., Pochybová M. & Peťko B. 2010. First case of human granulocytic anaplasmosis from Slovakia. Annals of Agricultural and Environmental Medicine 17 (1): 173–175.

Nunes M., Parreira R., Lopes N., Maia C., Carreira T., Sousa C., Faria S., Campino L. &Vieira M.L. 2015. Molecular Identification of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes ricinus* from Portugal. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 15 (8): 515–517.

Obiegala A., Król N., Oltersdorf C., Nader J. & Pfeffer M. 2017. The enzootic life-cycle of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) and tick-borne rickettsiae: an epidemiological study on wild-living small mammals and their ticks from Saxony, Germany. Parasites & Vectors 10 (1): 115.

Ogden N.H., Bown K., Horrocks B.K., Woldehiwet Z. & Bennett M. 1998. Granulocytic Ehrlichia infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K. Medical and Veterinary Entomology 12 (4): 423–429.

Øines Ø., Radzijevskaja J., Paulauskas A. & Rosef O. 2012. Prevalence and diversity of *Babesia* spp. in questing *Ixodes ricinus* ticks from Norway. Parasites & Vectors 5: 156.

Olsén B., Jaenson T.G., Noppa L., Bunikis J. & Bergström S. 1993. A Lyme borreliosis cycle in seabirds and *Ixodes uriae* ticks. Nature 362 (6418): 340–342.

Oteo J.A., Ibarra V., Blanco J.R., Martínez de Artola V., Márquez F.J., Portillo A., Raoult D. & Anda P. 2004. *Dermacentor*-borne necrosis erythema and lymphadenopathy: clinical and epidemiological features of a new tick-borne disease. Clinical Microbiology and Infection 10 (4): 327–331.

Oteo J.A., Ibarra V., Blanco J.R., Metola L., Vallejo M. & De Artola V.M. 2003. Epidemiological and clinical differences among DEBONEL-TIBOLA and other tick-borne diseases in Spain. Annals of the New York Academy of Sciences 990: 391–392.

Oteo J.A. & Portillo A. 2012. Tick-borne rickettsioses in Europe. Ticks and Tick-borne Diseases 3 (5–6): 271–278.

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. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 66 (2): 197–199.

Pangrácová L., Derdaková M., Pekárik L., Hviščová I., Víchová B., Stanko M., Hlavatá H. & Peťko B. 2013. *Ixodes ricinus* abundance and its infection with the tick-borne pathogens in urban and suburban areas of Eastern Slovakia. Parasites & Vectors 6 (1): 238.

Papa A., Dalla V., Petala A., Maltezou H.C. & Maltezos E. 2010. Fatal Mediterranean spotted fever in Greece. Clinical Microbiology and Infection 16 (6): 589–592.

Parola P., Inokuma H., Camicas J.L., Brouqui P. & Raoult D. 2001. Detection and identification of spotted fever group Rickettsiae and Ehrlichiae in African ticks. Emerging Infectious Diseases 7 (6): 1014–1017.

Parola P., Paddock C.D. & Raoult D. 2005. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. Clinical Microbiology Reviews 18 (4): 719–756.

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. Clinical Microbiology Reviews 26 (4): 657–702.

Parola P. & Raoult D. 2001a. Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. Clinical Microbiology and Infection 7 (2): 80–83.

Parola P. & Raoult D. 2001b. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. Clinical Infectious Diseases 32 (6): 897–928.

Parola P. & Raoult D. 2006. Tropical rickettsioses. Clinics in Dermatology 24 (3): 191–200.

Parola P., Rovery C., Rolain J. M., Brouqui P., Davoust B. & Raoult D. 2009b. *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii* in tick-borne Rickettsioses. Emerging Infectious Diseases 15 (7): 1105–1108.

Parola P., Socolovschi C. & Raoult D. 2009a. Deciphering the relationships between *Rickettsia conorii conorii* and *Rhipicephalus sanguineus* in the ecology and epidemiology of Mediterranean spotted fever. Annals of the New York Academy of Sciences 1166: 49–54.

Pelikán J. 1955. Studie o stanovištích hraboše polního (*Microtus arvalis* Pall.). Práce Brněnské základny Československé akademie věd 27 (1): 1–32.

Pelikán J. 1965. Reproduction, population structure and elimination of males in *Apodemus agrarius* (Pall). Folia Zoologica 14: 317–332.

Perlman S.J., Hunter M.S. & Zchori-Fein E. 2006. The emerging diversity of *Rickettsia*. Proceedings: Biological Sciences 273 (1598): 2097–2106.

Peťko B. 2005. Kliešte v podmienkach globálnych zmien. In: Dubinský P. Vybrané kapitoly zo všeobecnej parazitológie. 1. vydanie. PaU SAV, Košice, pp. 115–130.

Peťko B., Černý V. & Jurášek V. 1991. Parasite-host relationships of the tick *Ixodes trianguliceps* and coincidence of its ecological niches with those of *Ixodes ricinus* (L.). In: Dusbábek F. & Bukva V. (ed.). Modern Acarology Academia, Prague and

SPB Academic Publishing bv, The Hague, pp. 455–460.

Peťko B., Peterková J., Tresová G., Prokopčáková H., Čisláková I. & Stanko M. 1996. Sezónna dynamika prevalencie *Borrelia burgdorferi* v kliešťoch *Ixodes ricinus* v Lesoparku Košíc. In: Venglovský J., Juriš P., Ondrašovič M. & Sokol J. (ed.). Hygienické a ekologické problémy vo vzťahu k veterinárnej medicíne. Košice, pp. 213–220.

Pfäffle M., Littwin N. & Petney T. 2015. Host preferences of immature *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae) in a forest habitat in Germany. Ticks Tick-Borne Diseases 6 (4): 508–515.

Philip C.B. 1959. Some epidemiological considerations in Rocky Mountain spotted fever. Public Health Reports 74 (7): 595–600.

Pietrobelli M., Cancrini G., Moretti A. & Tampieri M.P. 2007. Animal babesiosis: an emerging zoonosis also in Italy? Parassitologia 49 (1): 33–38.

Plachý J. 2012. Taxonómia vtáčích bĺch rodu *Ceratophyllus* s dôrazom na Strednú Európu. Dizertačná práca. Katedra zoológie. Prírodovedecká fakulta UK, Bratislava. 120 pp.

Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., Makhneva N.A., Toporkova M.G., Maleev V.V., Fish D. & Krause P.J. 2011. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. Emerging Infectious Diseases 17 (10): 1816–1823.

Pokorný P. 1989. Incidence of the spirochete *Borrelia burgdorferi* in arthropods (*Arthropoda*) and antibodies in vertebrates (Vertebrata). Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie 38 (1): 52–60.

Portillo A., Santibanez P., Santibanez S., Pérez-Martínez L. & Oteo J.A. 2008. Detection of *Rickettsia* spp. in *Haemaphysalis* ticks collected in La Rioja, Spain. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 8 (5): 653–658.

Potkonjak A., Kleinerman G., Gutiérrez R., Savić S., Vračar V., Nachum-Biala Y., Jurišič A., Rojas A., Petrović A., Ivanović I., Harrus S. & Baneth G. 2016. Occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks with first identification of *Borrelia miyamotoi* in Vojvodina, Serbia. Vector-borne and Zoonotic Diseases 16 (10): 631–365.

Radzijevskaja J., Kaminskienė E., Lipatova I., Mardosaitė-Busaitienė D., Balčiauskas L., Stanko M. & Paulauskas A. 2018. Prevalence and diversity of *Rickettsia* species in

ectoparasites collected from small rodents in Lithuania. Parasites & Vectors 11 (1): 375.

Radzijevskaja J., Paulauskas A., Aleksandraviciene A., Jonauskaite I., Stanko M., Karbowiak G. & Peťko B. 2015. New records of spotted fever group rickettsiae in Baltic region. Microbes and Infection 17 (11–12): 874–878.

Randolph S.E. 1975. Patterns of distribution of the tick *Ixodes trianguliceps* Birula on its hosts. Journal of Animal Ecology 44 (2): 451–474.

Randolph S.E. 1980. Population regulation in ticks: the effect of delayed mating on fertility in *Ixodes trianguliceps* (Acarina: Ixodidae). Journal of Parasitology 66 (2): 287–292.

Randolph S.E. 1995. Quantifying parameters in the transmission of *Babesia microti* by the tick *Ixodes trianguliceps* amongst voles (*Clethrionomys glareolus*). Parasitology 110 (3): 287–295.

Randolph S.E. 1998. Ticks are not Insects: Consequences of contrasting vector biology for transmission potential. Parasitology Today 14 (5): 186–192.

Randolph S.E., Gern L. & Nuttall P.A. 1996. Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. Parasitol Today 12 (12): 472–479.

Raoult D., Berbis P., Roux V., Xu W. & Maurin M. 1997. A new tick-transmitted disease due to *Rickettsia slovaca*. Lancet 350 (9071): 112–113.

Raoult D., Lakos A., Fenollar F., Beytout J., Brouqui P. & Fournier P.E. 2002. Spotless rickettsiosis caused by *Rickettsia slovaca* and associated with *Dermacentor* ticks. Clinical Infectious Diseases 34 (10): 1331–1336.

Raoult D. & Roux V. 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clinical Microbiology Reviews 10 (4): 694–719.

Rar V., Livanova N., Tkachev S., Kaverina G., Tikunov A., Sabitova Y., Igolkina Y., Panov V., Livanov S., Fomenko N., Babkin I. & Tikunova N. 2017. Detection and genetic characterization of a wide range of infectious agents in *Ixodes pavlovskyi* ticks in western siberia, Russia. Parasites & Vectors. 10: 258.

Regnery R.L., Spruill C.L. & Plikaytis B.D. 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial

genes. Journal of Bacteriology 173 (5): 1576–1589.

Řeháček J., Brezina R., Áč P., Županovičová M. & Kováčová E. 1972. Contribution to the natural focality of rickettsiae belonging to the Rocky Mountain spotted fever (RMSF) group in Slovakia. Folia Parasitologica 19 (1): 41–52.

Řeháček J., Kováčová E., Lisák V. & Rumin W. 1990. Occurence of *Coxiella burnetii*, *Rickettsia slovaca,* and organisms resembling bacillary rickettsiae in their natural foci in Slovakia 20 years after first detection. Folia Parasitologica 37 (3): 285–286.

Řeháček J., Úrvölgyi J., Kocianová E., Sekeyová Z., Vavreková M. & Kováčová E. 1991. Extensive examination of different tick species for infestation with *Coxiella burnetii* in Slovakia. European Journal of Epidemiology 7 (3): 299–303.

Řeháček J., Županovičová M., Áč P., Brezina R., Úrvölgyi J., Kováčová E., Tarasevič I.V., Jablonskaja V.A., Pospíšil R. & Baloghová D. 1976. Rickettsioses studies. 2. Natural foci rickettsioses in east Slovakia. Bulletin of the World Health Organization 53 (1): 31–38.

RÚVZ BB [Regionálny úrad verejného zdravotníctva Banská Bystrica] 2018. [Cit. 16. 01. 2018]. Dostupné na http://www.vzbb.sk/sk/tlacove_spravy/2016/ts898.php

Reif K.E. & Macaluso K.R. 2009. Ecology of *Rickettsia felis*: a review. Journal of Medical Entomology 46 (4): 723–736

Reis C., Cote M., Le Rhun D., Lecuelle B., Levin M.L., Vayssier-Taussat M. & Bonnet S.I. 2011. Vector competence of the tick *Ixodes ricinus* for transmission of *Bartonella birtlesii*. PLoS Neglected Tropical Diseases 5 (5): 1186.

Reiter M., Schötta A.M., Müller A., Stockinger H. & Stanek G. 2015. A newly established real-time PCR for detection of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes ricinus* ticks. Ticks and Tick-Borne Diseases 6 (3): 303–308.

Reiterová K., Antolová D., Zaleśny G., Stanko M., Špilovská S. & Mošanský L. 2013. Small rodents – permanent reservoirs of toxocarosis in different habitats of Slovakia. Helminthologia 50 (1): 20–26.

Reiterová K.,Stanko M., Špilovská S., Fričová J., Mošanský L. & Dvorožňáková E. 2010. Úloha drobných cicavcov – dôležitých rezervoárov v cirkulácii larválnej toxokarózy. Slovenský veteriárny časopis 4: 217–222.

Renvoisé A., Joliot A-Y. & Raoult D. 2009. *Rickettsia felis* infection in man, France.

Emerging Infectious Diseases 15 (7): 1126–1127.

Reye A.L., Arinola O.G., Hubschen J.M. & Muller C.P. 2012. Pathogen prevalence in ticks collected from the vegetation and livestock in Nigeria. Applied and Environmental Microbiology 78 (8): 2562–2568.

Richards A.L., Jiang J., Omulo S., Dare R., Abdirahman K., Ali A., Sharif S.K., Feikin D.R., Breiman R.F. & Njenga M.K. 2010. Human infection with *Rickettsia felis*, Kenya. Emerging Infectious Diseases 16 (7): 1081–1086.

Richter J. Fournier P.E., Petridou J., Häussinger D. & Raoult D. 2002. *Rickettsia felis* infection acquired in Europe and documented by polymerase chain reaction. Emerging Infectious Diseases 8 (2): 207–208.

Richter D., Postic D., Sertour N., Livey I., Matuschka F.R. & 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.

Richter D., Schlee D.B. & Matuschka F-R. 2003. Relapsing fever-like spirochetes infecting European vector tick of Lyme disease agent. Emerging Infectious Diseases 9 (6): 697–701.

Rigó K., Gyuranecz M., Tóth A.G. & Földvári G. 2011. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in small mammals and ectoparasites in Hungary.Vector-Borne and Zoonotic Diseases 11 (11): 1499–1501.

Rijpkema S., Golubic D., Moelkenboer M., Verbeek-De Kruif N. & Schellekens J. 1996. Identification off our genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. Experimental and Applied Acarology 20 (1): 23–30.

Rizzoli A., Silaghi C., Obiegala A., Rudolf I., Hubalek Z., Földváti G., Plantard O., Vayssier-Taussat M., Bonnet S., Špitalská E. & Kazimírová M. 2014. *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri.urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. Frontiers in Public Health 2: 251.

Rollend L., Fish D. & Childs J.E. 2013. Transovarial transmission of *Borrelia* spirochetes by *Ixodes scapularis*: a summary of the literature and recent observations. Ticks and

Tick-borne Diseases 4 (1–2): 46–51.

Rosa P.A., Tilly K. & Stewart P.E. 2005. The burgeoning molecular genetics of the Lyme disease spirochaete. Nature Reviews Microbiology 3 (2): 129–143.

Rosický B. 1951. Savci z území Československa jako hostitelé blech (Aphaniptera). Sborník Klubu přírodovědeckého v Brně 19: 120–133.

Rosický B. 1953. Význam míst styku savčích druhů různých biotopů pro předávaní ektoparasitů. Československá biologie 2: 347–351.

Rosický B. 1957. Blechy – Aphaniptera. Fauna ČSR. ČSAV, Praha. 439 pp

Rosický B. & Černý V. 1954. Drobní středoevropští savci jako hostitelé klíštěte *Ixodes ricinus* L. Zoologické a entomologické listy 3. 37–46.

Rosický B. & Hanzák J. 1947. Nové nálezy některých vzácných savců na Slovensku. Časopis národního musea, oddíl přírodovědný 116: 209.

Rosický B. & Kratochvíl J. 1953. Synantropie savců a úloha synantropních a exoantropních hlodavců v přírodních ohniscích nákaz. Československá biologie 2: 278–289.

Rosický B. & Kratochvíl J. 1955. Drobní savci Tatranského národního parku. Ochrana Prirody 10: 3447.

Rosický B., Kratochvíl J. & Mačička O. 1954. Charakteristika okolia Rožňavy po stránke teriologickej a parazitologickej, p. 145 – 190. In: Blaškovič D. (ed.): Epidémia encefalitídy v Rožňavskom prírodnom ohnisku nákaz. Vydavateľstvo SAV, Bratislava. 314 pp.

Rosický B. & Weiser J. 1952. Škůdci lidského zdraví. 1. vydání. Přírodovědecké vydyvatelství, Praha. 830 pp.

Roux V., Fournier P.E. & Raoult D. 1996. Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. Journal of Clinical Microbiology 34 (9): 2058–2065.

Roux V. & 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 Microbiology 50 (4): 1449–1455.

Rubel F., Brugger K., Monazahian M., Habedank B., Dautel H., Leverenz S. & Kahl O.

2014. The first German map of georeferenced ixodid tick locations. Parasites & Vectors 7: 477.

Rubel F., Brugger K., Pfeffer M.,Chitimia-Dobler L., Didyk Y.M., Levernez S., Dautel H. & Kahl O. 2016. Geographical distribution of *Dermacentor marginatus* and *Dermacentror reticulatus* in Europe. Tick and Tick-borne Diseases 7 (1): 224–223.

Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L. & Jr.Oliver J.H. 2009b. *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from the southeastern region of the United States. Journal of Clinical Microbiology 47 (1): 134–141.

Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L. & Jr.Oliver J.H. 2011. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. Ticks and Tick-borne Diseases 2 (3): 123–128.

Rudenko N., Golovchenko M., Lin T., Gao L., Grubhoffer L. & Jr. Oliver J.H. 2009a. Delineation of a New Species of the *Borrelia burgdorferi* sensu Lato Complex, *Borrelia americana* sp. nov. Journal of Clinical Microbiology 47 (12): 3875–3880.

Rybářová M. & Široký P. 2017. Occurrence of *Anaplasma phagocytophilum* in three sympatric tick species in the South Moravia, Czech Republic. Biologia 72 (4): 365–369.

Samoylenko I., Shpynov S., Raoult D., Rudakov N. & Fournier P.-E. 2009. Evaluation of *Dermacentor* species naturally infected with *Rickettsia raoultii*. Clinical Microbiology and Infection 15 (2): 305–306.

Sant'Anna J.F. 1911. On a disease in man following tick-bites and occurring in Lourenço Marques. Parasitology 4: 87–88.

Sato K., Takano A., Konnai S., Nakao M., Ito T., Koyama K., Kaneko M., Ohnishi M. & Kawabata H. 2014. Human Infections with *Borrelia miyamotoi*, Japan. Emerging Infectious Diseases 20 (8): 1391–1394.

Schex S.Y. 2011. *Rickettsia* spp. in free ranging small mammals in South-Eastern Germany. Dizertačná práca. Der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, Mníchov. 124 pp.

Schmidt B.L. 1997. PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infection. Clinical Microbiology Reviews 10 (1): 185–201.

Schriefer M.E., Sacci J.B., Jr. Dumler J.S., Bullen M.G. & Azad A.F. 1994. Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. Journal of Clinical Microbiology 32 (4): 949–954.

Schwan T.G. & Piesman J. 2002. Vector interactions and molecular adaptations of lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. Emerging Infectious Diseases 8 (2): 115–121.

Scoles G.A., Papero M., Beati L. & Fish D. 2001. A relapsing fever group spirochete transmitted by *Ixodes scapularis* ticks. Vector Borne Zoonotic Diseases 1 (1): 21–34.

Scott M.C., Rosen M.E., Hamer S.A., Baker E., Edwards H., Crowder C., Tsao J.I. & Hickling 2010. High prevalence *Borrelia miyamotoi* infection among wild turkeys (*Meleagris gallopavo*) in Tennessee. Journal of Medical Entomology 47 (6): 1238–1242.

Sedláček I. 2007. Taxonomie prokaryot. 1. vydání. Masarykova univerzita, Brno. pp. 270.

Sekeyová Z., Fournier P.E., Rehacek J. & Raoult D. 2000. Characterization of a new spotted fever group rickettsia detected in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) collected in Slovakia. Journal of Medical Entomology 37 (5): 707–713.

Sekeyová Z., Kováčová E., Fournier P.E. & Raoult D. 2003. Isolation and characterization of a new *Rickettsia* from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. Annals of the New York Academy of Sciences 990: 54–56.

Sekeyová Z., Mediannikov O., Subramanian G., Kowalczewska M., Quevedo-Diaz M., Kocianová E. & Raoult D. 2012. Isolation of *Rickettsia helvetica* from ticks in Slovakia. Acta Virologica 56 (3): 247–252.

Sekeyová Z., Roux V. & Raoult D. 2001. Phylogeny of *Rickettsia* spp. inferred by comparing sequences of 'gene D', which encodes an intracytoplasmic protein. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51: 1353–1360.

Sekeyová Z., Roux V., Xu W., Řeháček J. & Raoult D. 1988. *Rickettsia slovaca* sp. nov., a member of the spotted fever group rickettsiae. International Journal of Systematic Bacteriology 48 (4): 1455–1462.

Sekeyová Z., Socolovschi C., Špitalská E., Kocianová E., Boldiš V., Diaz M.Q., Berthová L., Bohacsová M., Valáriková J., Fournier P.E. & Raoult D. 2013. Update on

rickettsioses in Slovakia. Acta Virologica 57 (2): 180–199.

Sherman I.W. 2003. Bubonic plague. In: Resh V.H. & Cardé R.T. (ed.). Encyclopedia of Insect. Elsevier Science, USA, pp. 147–150.

Shpynov S.N., Fournier P.-E., Rudakov N.V., Samoilenko I.E., Reshetnikova T.A., Yastrebov V.K., Schaiman M.S., Tarasevich I.V. & Raoult D. 2006. Molecular identification of a collection of spotted fever group rickettsiae obtained from patients and ticks from Russia. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 74 (3): 440–443.

Shpynov S.N, Parola P., Rudakov N., Samoilenko I., Tankibaev M., Tarasevich I. & Raoult D. 2001. Detection and identification of spotted fever group rickettsiae in *Dermacentor* ticks from Russia and central Kazakhstan. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 20 (12): 903–905.

Silverman D.J. 1991. Some contributions of electron microscopy to the study of the rickettsiae. European Journal of Epidemiology 7 (3): 200–206.

Simser J.A., Palmer A.T., Fingerle V., Wilske B., Kurtti T.J. & Munderloh U.G. 2002. *Rickettsia monacensis* sp. nov., a spotted fever group *Rickettsia*, from ticks (*Ixodes ricinus*) collected in a European city park. Applied and Environmental Microbiology 68 (9): 4559–4566.

Siński E., Welc-Faleciak R. & Zajkowska J. 2016. *Borrelia miyamotoi*: A human tick-borne relapsing fever spirochete in Europe and its potential impact on public health. Advances in Medical Sciences 61 (2): 255–260.

Siuda K. 1993. Kleszce polski (Acari: Ixodida). Systematya i Rozmieszczenie czest II. Polsie Towaryzstvo Parazytologiczne, Warszawa. 376 pp.

Siuda K., Majszyk A. & Nowak M. 2006. Ticks (Acari: Ixodida) parasitizing birds (Aves) in Poland. Biology Letters 43 (2): 147–151.

Skuballa J., Peteny 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 and Tick-borne Diseases 3 (1): 8–13.

Sládek J. & Mošanský A. 1985. Cicavce okolo nás. Osveta, Martin. 246 pp.

Slovák M. 2014. Obrázkový kľúč lariev a nýmf kliešťov (Acari: Ixodida) fauny Slovenska.

Entomofauna carpathica 26: 12–18.

Smetanová K., Schwarzová K. & Kocianová E. 2006. Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp., and *Borrelia burgdorferi* s. l. in ticks, and wild-living animals in western and middle Slovakia. Annals of the New York Academy of Sciences 1078: 312–315.

Socolovschi C., Mediannikov O., Raoult D. & Parola P. 2009. The relationship between spotted fever group Rickettsiae and ixodid ticks. Veterinary Research 40 (2): 34.

Socolovschi C., Pagés F. & Raoult D. 2012. *Rickettsia felis* in *Aedes albopictus* mosquitoes, Libreville, Gabon. Emerging Infectious Diseases 18 (10): 1687–1689.

Sonenshine D.E. 1991. Biology of Ticks. Oxford University Press, New York. 472 pp.

Sonenshine D.E. 2003. Ticks. In: Resh V.H. & Cardé R.T. (ed.). Encyclopedia of Insect. Elsevier Science, USA, pp. 1132–1141.

Sonnleitner S.T., Simeoni J., Lang S., Dobler G., Speck S., Zelger R., Schennach H., Lass-Flörl C. & Walder G. 2012. Spotted Fever Group–Rickettsiae in the Tyrols: Evidence by seroepidemiology and PCR. Zoonoses and Public Health 60 (4): 284–290.

Sousa R., Franca A., Doria N.S., Belo A., Amaro M., Abreu T., Pocas J., Proenca P., Vaz J., Torgal J., Bacellar F., Ismail N. & Walker D.H. 2008. Host- and microbe-related risk factors for and pathophysiology of fatal *Rickettsia conorii* infection in Portuguese patients. Journal of Infectious Diseases 198: 576–585.

Spitzenberger F., Bauer K., Mayer A. & Weiss E. 2001. Die Säugetierfauna Österreichs. Austria medien service Gmbh, Graz. 895 pp.

Sprong H., Wielinga P.R., Fonville M., Reusken C., Brandenburg A.H., Borgsteede F., Gaasenbeek C. & Van Der Giessen J.W. 2009. *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for *Rickettsia helvetica* and potentially carry flea-borne *Rickettsia* species. Parasites & Vectors 2 (1): 41.

Stamatakis A. 2006. Raxml-vi-hpc: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics 22 (21): 2688–2690.

Stanko M. 1987. Blchy (Siphonaptera) drobných cicavcov severnej časti Krupinskej planiny. Zborník Stredoslovenského múzea v Banskej Bystrici. Stredné Slovensko, Prírodné vedy 6: 108–117.

Stanko M. 1988. Blchy (Siphonaptera) drobných zemných cicavcov východnej časti Volovských vrchov (Slovenské rudohorie). Zborník Slovenského národného múzea, Prírodné vedy 34: 29–40.

Stanko M. 1994a. Fleas synusy (Siphonaptera) of small mammals from the central part of the East Slovakian lowlands. Biologia (Bratislava) 49 (2): 239–246.

Stanko M. 1994b. Small mammal communities of windbreaks and adjacent fields in the Easter Slovakian lowlands. Folia Zoologica 43: 135–143.

Stanko M. 1996. Ektoparazity drobných cicavcov (Insectivora, Rodentia) územia dolného toku Ondavy (Východoslovenská nížina). 3. Kliešte (Ixodida). Natura Carpatica 37: 151–160.

Stanko M. 2012a: Ryšavka tmavopása - *Apodemus agrarius*. In: Krištofík J. & Danko Š. (eds.). Cicavce Slovenska rozšírenie, bionómia a ochrana, Veda vydavateľstvo SAV, Bratislava, pp. 147–153.

Stanko M. 2012b. Ryšavka žltohrdlá (*Apodemus flavicollis*). In: Krištofík J. & Danko Š. (ed.). Cicavce Slovenska – rozšírenie, bionómia a ochrana. Veda vydavateľstvo SAV, Bratislava, pp. 154–162.

Stanko M. 2014a. Metódy ekologického výskumu drobných cicavcov. Parazitologický ústav SAV, Tretia s.r.o., Banská Bystrica. 26 pp.

Stanko M. 2014b. Ryšavka tmavopása (*Apodemus agrarius*, Rodentia) na Slovensku. Parazitologický ústav SAV, Equilibria, s.r.o., Košice. 182 pp.

Stanko M., Krasnov B.R., Miklisová D. & Morand S. 2007. Simple epidemiological model predicts the relationships between prevalence and abundance in ixodid ticks. Parasitology 134 (1): 59–68.

Stanko M., Krasnov B.R. & Morand S. 2006. Relationship between host abundance and parasite distribution: inferring regulating mechanisms from census data. Journal of Animal Ecology 75 (2): 575–583.

Stanko M. & Miklisová D. 2000. Tick infestation patterns of two rodent species in a lowland ecosystem. In: Kazimírová M., Labuda M., Nuttall P.A. (Eds.). Proceedings of the 3rd International Conference Ticks and Tick-Borne Pathogens: Into the 21st Century, Slovakia, pp. 185–188.

Stanko M., Miklisová D., Goüy De Bellocq J. & Morand S. 2002. Mammal density and

patterns of ectoparasite species richness and abundance. Oecologia 131 (2): 289–295.

Stanko M., Mošanský L., Heglasová I., Miklisová D. & Karbowiak G. 2019. Long-term monitoring of ticks and their relative densities in Košice City agglomeration (Slovakia). In: The 21st International Symposium Parasitic and Allergic Arthropods - Medical and Sanitary Significance. Janowiec nad Wisla, KOLIBER, p. 39.

Stanko M., Prokopčaková H., Fričová J. & Peťko B. 1996. Occurrence of antibodies to leptospira in small mammals in Eastern Slovakia. Veterinární Medicína Czech. 41: 373–377.

StatSoft Inc. 2013. Statistica (data analysis software system), version 12. www.statsoft.com.

Stevenson H.L., Labruna M.B., Montenieri J.A., Kosoy M.Y., Gage K.L. & Walker D.H. 2005. Detection of *Rickettsia felis* in a New World flea species, *Anomiopsyllus nudata* (Siphonaptera: Ctenophthalmidae). Journal of Medical Entomology 42 (2): 163–167.

Stothard D.R. & Fuerst P.A. 1995. Evolutionary analysis of the spotted fever and typhus groups of *Rickettsia* using 16S rRNA gene sequences. Systematic and Applied Microbiology (18): 52–61.

Subramanian G., Sekeyová Z., Raoult D. & Mediannikov O. 2012. Multiple tick-associated bacteria in *Ixodes ricinus* from Slovakia. Ticks and Tick-Borne Diseases 3 (5–6): 406–410.

Sulis G., Rodari P., Caligaris S., Tomasoni L.R, MD, Castelli F. & Gulletta M. 2015. A case of *Rickettsia felis* infection imported from Nepal. Journal of Travel Medicine 22 (4): 276–278.

Sun J.G, Li K.J, Wei H. & Zhong-Wu H. 2006. Studies of *Haemaphysalis concinna* outbreaks in Cangxi Country of Sichuan Province. Veterinary Science in China 36: 601–605.

Süss J. 2003. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. Vaccine 21 (1): 19–35.

Süss J., Klaus C., Gerstengarbe F.W. & Werner P.C. 2008. What makes ticks tick? Climate change, ticks, and tick-borne diseases. Journal of Travel Medicine 15 (1): 39–45.

Svitálková Z., Haruštiaková D., Mahríková L., Berthová L., Slovák M., Kocianová E. & Kazimírová M. 2015. *Anaplasma phagocytophilum* prevalence in ticks and rodents in an urban and natural habitat in South-Western Slovakia. Parasites & Vectors 8: 276.

Swan M., Jurášik D. & Kovačičová H. 2001. Babesióza na západnom Slovensku. Veterinářství 51: 60–62.

Switaj K., Chmielewski T., Borkowski P., Tylewska-Wierzbanowska S. & Olszynska-Krowicka M. 2012. Spotted fever rickettsiosis caused by *Rickettsia raoultii*–case report. Przeglad Epidemiologiczny 66 (2): 347–350.

Szekeres S., Coipan E.C., Rigó K., Majoros G., Jahfari S., Sprong H. & Földvári G. 2015. Eco-epidemiology of *Borrelia miyamotoi* and Lyme borreliosis spirochetes in a popular hunting and recreational forest area in Hungary. Parasites & Vectors 8: 309.

Szekeres S., Lügner J., Fingerle V., Margos G. & Földvári G. 2017. Prevalence of *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in questing ticks from a recreational coniferous forest of East Saxony, Germany. Ticks and Tick-borne Diseases 8 (6): 922–927.

Špitalská E., Boldiš V., Derdáková M., Selyemová D. & Rusňáková Tarageľová V. 2014. Rickettsial infection in *Ixodes ricinus* ticks in urban and natural habitats of Slovakia. Ticks and Tick-Borne Diseases 5 (2): 161–165.

Špitalská E., Boldiš V., Košťanová Z., Kocianová E. & Štefanidesová K. 2008b. Incidence of various tick-borne microorganisms in rodents and ticks of Central Slovakia. Acta Virologica 52 (3): 175–179.

Špitalská E., Boldiš V., Mošanský L., Sparagano O. & Stanko M. 2015. *Rickettsia* species in fleas collected from small mammals in Slovakia. Parasitology Research 114 (11): 4333–4339.

Špitalská E. & Kocianová E. 2003. Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected in Slovakia and Hungary. European Journal of Epidemiology 18 (3): 263–266.

Špitalská E., Literák I., Kocianová E. & Tarageľová V. 2011. The importance of *Ixodes arboricola* in transmission of *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and

Borrelia burgdorferi sensu lato in the Czech Republic, Central Europe. Vector Borne and Zoonotic Diseases 11 (9): 1235–1241.

Špitalská E., Literák I., Sparagano O.A., Golovchenko M. & Kocianová E. 2006. Ticks (Ixodidae) from passerine birds in the Carpathian region. Wiener Klinische Wochenschrift 118 (23–24): 759–764.

Špitalská E., Palkovičová K, Škultéty Ľ. & Štefanidesová K. 2017. Human infection with *Rickettsia raoultii* in Slovakia. In: International Symposium on Tick-Borne Pathogens and Disease ITPD 2017, Viennna, Austria, p. 104.

Špitalská E., Štefanidesová K., Kocianová E. & Boldiš V. 2008a. Specific detection of *Rickettsia slovaca* by restriction fragment length polymorphism of sca4 gene. Acta Virologica 52 (3): 189–191.

Špitalská E., Štefanidesová K., Kocianová E. & Boldiš V. 2012. *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia raoultii* in *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* ticks from Slovak Republic. Experimental and Applied Acarology 57 (2): 189–197.

Štefančíková A., Bhide M., Peťko B., Stanko M., Mošanský L., Fričová J., Derdáková M. & Trávniček M. 2004. Anti-Borrelia antibodies in rodents: important hosts in ecology of Lyme disease. Annals of Agricultural and Environmental Medicine 11 (2): 209–213.

Štefančíková A., Derdáková M., Lenčáková D., Ivanová R., Stanko M., Čisláková L. & Peťko B. 2008. Serological and molecular detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Anaplasmataceae in rodents. Folia Microbiologica (Praha) 53 (6): 493–499.

Štefanidesová K., Kocianová E., Boldiš V., Košťanová Z., Kanka P., Nemethová D. & Špitalská E. 2008. Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* infection in free ranging ungulates in central Slovakia. European Journal of Wildlife Research 54 (3): 519–524.

Švehlová A., Berthová L., Sallay B., Boldiš V., Sparagano O.A. & Špitalská E. 2014. Sympatric occurrence of *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* ticks and *Rickettsia* and *Babesia species* in Slovakia. Ticks and tick-borne diseases *5* (5): 600–605.

Takano A., Toyomane K., Konnai S., Ohashi K., Nakao M., Ito T., Andoh M., Maeda K., Watarai M., Sato K. & Kawabata H. 2014. Tick surveillance for relapsing fever

spirochete *Borrelia miyamotoi* in Hokkaido, Japan. PloS One. 9, e104532. DOI: org/10.1371/journal.pone.0104532

Talagrand-Reboul E., Boyer P.H., Bergström S., Vial L. & Boulanger N. 2018. Relapsing fevers: neglected tick-borne diseases. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 8: 98.

Tälleklint L & Jaenson T.G.T. 1994. Transmission of *Borrelia burgdorferi* s. l. from mammal reservoirs to the primary vector of Lyme borreliosis, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), in Sweden. Journal of Medical Entomology 31 (6): 880–886.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. & Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30 (12): 2725–2729.

Tarageľová V.R., Mahríková L., Selyemová D., Václav R. & Derdáková M. 2016. Natural foci of *Borrelia lusitaniae* in a mountain region of Central Europe. Ticks and Tick-borne Diseases 7 (2): 350–356.

Taylor K.R., Takano A., Konnai S., Shimozuru M., Kawabata H. & Tsubota T. 2013. *Borrelia miyamotoi* infections among wild rodents show age and month independence and correlation with *Ixodes persulcatus* larval attachment in Hokkaido, Japan. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 13 (2): 92–97.

Tekin S., Bursali A., Mutluay N., Keskin A. & Dundar E. 2012. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in various ixodid tick species from a highly endemic area. Veterinary Parasitology 186 (3–4): 546–552.

Thomas R.E. 1996. Fleas and the agents they transmit. In: Beaty B.J. & Marquardt W.C. (eds.) The biology of disease vectors. University Press of Colorado, Niwot, Colorado pp. 146–159.

Thu M.J., Qiu Y., Matsuno K., Kajihara M., Mori-Kajihara A., Omori R., Monma N., Chiba K., Seto J., Gokuden M., Andoh M., Oosako H., Katakura K., Takada A., Sugimoto Ch., Isoda N. & Nakao R. 2019. Diversity of spotted fever group rickettsiae and their association with host ticks in Japan. Scientific Reports 9 (1): 1500.

Tijsse-Klasen E., Hansford K.M., Jahfari S., Phipps P., Sprong H. & Medlock J.M. 2013. Spotted fever group rickettsiae in *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis punctata* ticks in the UK. Parasites & Vectors 6: 212.

Tomassone L., Grego E., Auricchio D., Iori A., Giannini F. & Rambozzi L. 2013. Lyme borreliosis spirochetes and spotted fever group rickettsiae in ixodid ticks from Pianosa Island, Tuscany Archipelago, Italy. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 13 (2): 84–91.

Toutoungi L. & Gern L. 1993. Ability of transovarially and subsequent transstadially infected *Ixodes hexagonus* ticks to maintain and transmit *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. Experimental and Applied Acarology 17 (8): 581–586.

Tovornik D. 1988. Geographic distribution and other population parameters of *Ixodes* (Exopalpiger) *triangulicep*s (Birula, 1895) in Yugoslavia. Biološki Vestnik 36 (1): 33–54.

Trávniček M., Štefančíková A., Nadzamová D., Stanko M., Čisláková L., Peťko B., Mardzinová S. & Bhide M. 2003. Immunoglobulin G antibodies to *Borrelia burgdorferi* in game animals and small mammals in eastern Slovakia. Revue Scientifique et Technique 22 (3): 1035–1041.

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 and Tick-Borne Diseases 3 (5–6): 293–296.

Václav R., Ficová M. Prokop P. & Betáková I. 2011. Associations between coinfection prevalence of *Borrelia lusitaniae*, *Anaplasma* sp., and *Rickettsia* sp. in hard ticks feeding on reptile hosts. Microbial Ecology 61 (2): 245–253.

Vaculová T., Derdáková M., Špitalská E., Václav R., Chvostáč M. & Rusňáková Tarageľová V. 2019. Simultaneous occurrence of *Borrelia miyamotoi*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in urban foci in Bratislava, Slovakia. Acta Parasitologica 64 (1): 19–30.

van Duijvendijk G., Coipan C., Wagemakers A., Fonville M., Ersöz J., Oei A., Földvári G., Hovius J., Takken W. & Sprong H. 2016. Larvae of *Ixodes ricinus* transmit *Borrelia afzelii* and *B. miyamotoi* to vertebrate hosts. Parasites & Vectors 9: 97.

Vayssier-Taussat M., Kazimírová M., Hubálek Z., Hornok S., Farkas R., Cosson J.F., Bonnet S., Vourch G., Gasqui P., Mihalca A. D., Plantard O., Silaghi C., Cutler S. & Rizzoli A. 2015. Emerging horizons for tick-borne pathogens: from the 'one pathogen-one disease' vision to the pathobiome paradigm. Future Microbiology 10 (12): 2033–2043.

Venczel R., Knoke L., Pavlovic M., Dzaferovic E., Vaculova T., Silaghi C., Overzier E., Konrad R., Kolenčík S., Derdáková M., Sing A., Schaub G.A., Margos G. & Fingerle V. 2016. A novel duplex real-time PCR permits simultaneous detection and differentiation of *Borrelia miyamotoi* and *Borreli burgdorferi* sensu lato. Infection 44 (1): 47–55.

Víchová B., Majlathová V., Nováková M., Stanko M., Hviščová I., Pangrácová L., Chrudimský T., Čurlík J. & Peťko B. 2014. Anaplasma infections in ticks and reservoir host from Slovakia. Infection Genetics and Evolution 22: 265–272.

Vitorino L., De Sousa R., Bacellar F. & Ze-Ze L. 2007. *Rickettsia* sp. strain RpA4 detected in Portuguese *Dermacentor marginatus* ticks. Vector Borne and Zoonotic Diseases 7 (2): 217–220.

Volf P., Horák P., Čepička I., Flegr J., Lukeš J., Mikeš L., Svobodová M., Vávra J. & Votýpka J. 2007. Paraziti a jejich biologie. Triton, Praha. pp. 318.

Wagemakers A., Jahfari S., de Wever B., Spanjaard L.,. Starinkd M.V., de Vries H.J.C., Sprong H. & Hovius J.W. 2017. *Borrelia miyamotoi* in vectors and hosts in the Netherlands. Tick and Tick-borne Diseases 8 (3): 370–374.

Wagemakers A., Staarink P.J., Sprong H. & Hovius J.W. 2015. *Borrelia miyamotoi*: a widespread tick-borne relapsing fever spirochete. Trends in Parasitology 31 (6): 260–269.

Walker D.H., Valbuena G.A. & Olano J.P. 2003. Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia*. Annals of the New York Academy of Sciences 990: 1–11.

Wang G., van Dam A.P., Le Fleche A., Postic D., Peter O., Baraton G., de Boer R., Spanjaard L. & Dankert J. 1997. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia*

valaisiana sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 47 (4): 926–932.

Wang G., Liveris D., Mukherjee P., Jungnick S., Margos G. & Schwartz I. 2014. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi*. Current Protocols in Microbiology 34: 12C.5.1–12C.5.31.

Weinert L.A., Werren J.H., Aebi A., Stone G.N. & Jiggins F.M. 2009. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. BMC Biology 7: 6.

Whiting M.F. 2002. Mecoptera is paraphyletic: multiple genes and phylogeny of Mecoptera and Siphonaptera. Zoologica Skripta (31): 93–104.

Whiting M.F., Whiting A.S., Hastriter M.W. & Dittmar K. 2008. A molecular phylogeny of fleas (Insecta: Siphonaptera): origins and host associations. Cladistics 24 (5): 677–707.

Williams M., Izzard L, Graves S.R., Stenos J. & Kelly J.J. 2011. First probable Australian cases of human infection with *Rickettsia felis* (cat-flea typhus). Medical Journal of Australia 194 (1): 41–43.

Yang Y., Yang Z., Kelly P., Li J., Ren Y. & Wang C. 2018. *Borrelia miyamotoi* sensu lato in Père David deer and *Haemaphysalis longicornis* ticks. Emerging Infectious Diseases Emerg. Infect. Dis 24 (5): 928–931.

Zavala-Velazquez J.E., Sosa-Ruiz J.A., Sanchez-Elias R. A., Becessa-Carmona G. & Walker D.H. 2000. *Rickettsia felis* rickettsiosis in Yucatan. The Lancet 356 (9235): 1079–1080.

Zhu Y., Fournier P.-E., Eremeeva M. & Raoult D. 2005. Proposal to create subspecies of *Rickettsia conorii* based on multi-locus sequence typing and an emended description of *Rickettsia conorii*. BMC Microbiology 5: 11.

Žákovská A., Čapková L., Sery O., Halouzka J. & Dendis M. 2006. Isolation of *Borrelia afzelli* from overwintering *Culex pipiens* biotype molestus mosquitoes. The Annals of Agricultural and Environmental Medicine 13 (2): 345–348.

PRÍLOHA

Zoznam jednotlivých druhov ektoparazitov uvedených v práci

Blchy (Siphonaptera)

Amalaraeus arvicolae (Ioff, 1950)
Amalaraeus penicilliger (Grube) 1852
Amphipsylla rossica Wagner, 1912
Amphipsylla sibirica (Wagner, 1898)
Anomiopsyllus nudatus (Baker, 1898)
Archaeopsylla erinacei (Bouché, 1835)
Atyphloceras nuperus (Jordan, 1931)
Ceratophyllus gallinae (Schrank, 1803)
Ceratophyllus garei Rothschild, 1902
Ceratophyllus sciurorum (Schrank, 1803)
Ctenocephalides canis (Curtis, 1826)
Ctenocephalides felis (Bouche, 1835)
Ctenophthalmus bisoctodentatus Kolenati, 1863
Ctenophthalmus agyrtes (Heller, 1896)
Ctenophthalmus assimilis (Taschenberg, 1880)
Ctenophthalmus congener Rothschild, 1907
Ctenophthalmus obtusus Jordan et Rothschild, 1912
Ctenophthalmus orientalis (Wagner, 1898)
Ctenophthalmus solutus Jordan et Rothschild, 1920
Ctenophthalmus uncinatus (Wagner, 1898)
Doratopsylla dasycnema (Rothschild, 1897)
Hystrichopsylla orientalis Smit, 1956
Hystrichopsylla talpae (Curtis, 1826)
Leptopsylla segnis (Schönherr, 1811)
Megabothris rectangulatus (Wahlgren, 1903)
Megabothris turbidus (Rothschild, 1909)
Nosopsyllus fasciatus (Bosc, 1800)
Palaeopsylla kohauti (Dampf, 1911)
Palaeopsylla similis Dampf, 1910
Palaeopsylla soricis (Dale, 1878)
Peromyscopsylla bidentata (Kolenati, 1863)
Peromyscopsylla fallax (Rothschild, 1909)
Peromyscopsylla silvatica (Meinert, 1896)
Pulex irritans Linné, 1758
Rhadinopsylla isacantha (Rothschild, 1907)
Rhadinopsylla integella Jordan et Rothschild, 1921
Rhadinopsylla mesoides Smit, 1957
Rhadinopsylla pentacantha (Rothschild, 1897)
Stenoponia tripectinata (Tiraboschi, 1902)
Tarsopsylla octodecimdentata (Kolenati, 1863)
Tunga penetrans (Linnaeus, 1758)
Xenopsylla cheopis (Rothschild, 1903)

Kliešte (Ixodida)
Amblyomma hebraeum Koch, 1844
Amblyomma lepidum Dönitz, 1909
Amblyomma variegatum (Fabricius, 1794)
Dermacentor marginatus (Sulzer, 1776)
Dermacentor reticulatus (Fabricius, 1794)
Haemaphysalis concinna Koch 1844,
Haemaphysalis inermis Birula, 1895,
Haemaphysalis punctata Canestrini & Franzago, 1877
Hyalomma dromedarii Koch, 1844
Ixodes apronophorus Schulze, 1924
Ixodes arboricola Schulze & Schlottke, 1930
Ixodes lividus Koch, 1844
Ixodes ovatus Neumann, 1899
Ixodes pacificus Cooley & Kohls, 1943
Ixodes pavlovskyi Pomerantsev, 1946
Ixodes persulcatusn Schulze, 1930
Ixodes ricinus (Linnaeus, 1758)
Ixodes scapularis Say, 1821
Ixodes simplex Neuman, 1906
Ixodes trianguliceps (Birula, 1895)
Ixodes vespertilionis Koch, 1844
Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806)

Vši (Anoplura)
Pediculus humanus Linnaeus, 1758