UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA

DOMÁCE ZVIERATÁ – HOSTITELIA KLIEŠŤOV A SENTINELY KLIEŠŤAMI PRENÁŠANÝCH MIKROORGANIZMOV NA JUHOZÁPADNOM SLOVENSKU

Diplomová práca

2020 **Bc. Klaudia Kuchárová**

UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA

DOMÁCE ZVIERATÁ – HOSTITELIA KLIEŠŤOV A SENTINELY KLIEŠŤAMI PRENÁŠANÝCH MIKROORGANIZMOV NA JUHOZÁPADNOM SLOVENSKU

Diplomová práca

Študijný program:	Zoológia
Študijný odbor:	4.2.1 Biológia
Školiace pracovisko:	Katedra zoológie
Školiteľ:	RNDr. Mária Kazimírová, CSc.

Bratislava, 2020 **Bc. Klaudia Kuchárová**

89134394

Univerzita Komenského v Bratislave
Prírodovedecká fakulta

ZADANIE ZÁVEREČNEJ PRÁCE

Meno a priezvisko študenta: Bc. Klaudia Kuchárová
Študijný program: zoológia (Jednoodborové štúdium, magisterský II. st., denná forma)
Študijný odbor: biológia
Typ záverečnej práce: diplomová
Jazyk záverečnej práce: slovenský
Sekundárny jazyk: anglický

Názov: Domáce zvieratá - hostitelia kliešťov a sentinely kliešťami prenášaných mikroorganizmov na juhozápadnom Slovensku
Domestic animals - hosts for ticks and sentinels for tick-borne microorganisms in southwestern Slovakia

Literatúra:
Beugnet F., Chalvet-Monfray K. Impact of climate change in the epidemiology of vector-borne diseases in domestic carnivores. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2013, 36:559-566
Dantas-Torres F., Chomel B.B., Otranto D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. Trends Parasitol 2012, 28:437-46.
Millán et al. Molecular detection of vector-borne pathogens in wild and domesticcarnivores and their ticks at the human–wildlife interface. Ticks and Tick-borne Diseases 2016; 7:284–290
Salman M, Tarrés-Call J. Ticks and tick-borne diseases. Geographical distribution and control strategies in the Euro-Asia region. Wallingford: CABI; 2013

Kľúčové slová: Ixodes ricinus, Dermacentor spp., domáce zvieratá, kliešťami prenášané patogény

Anotácia: Domáce zvieratá sú bežnými hostiteľmi kliešťov a môžu zároveň slúžiť aj ako rezervoáre kliešťami prenášaných patogénov. V dôsledku ich parazitácie kliešťami sú aj významnými sentinelmi pre výskyt kliešťami prenášaných nákaz v sledovaných oblastiach. Ako nosiči potenciálne infikovaných kliešťov môžu ich prostredníctvom predstavovať navyše aj zdroj nákaz pre svojich majiteľov. V Európe patria medzi významné kliešťami prenášané patogény, ktoré môžu spôsobiť ochorenia domácich zvierat, baktérie Anaplasma phagocytophilum (hovädzí dobytok, ovce, kone, psy), Anaplasma ovis (ovce), Ehrlichia canis (psy) a krvné parazity Babesia canis a Hepatozoon canis (psy) a Babesia divergens (hovädzí dobytok). V dôsledku globálnych klimatických a socioekonomických zmien dochádza k posunu hraníc areálu rozšírenia kliešťov na sever a turizmom a importom spoločenských zvierat môže dôjsť k zavlečeniu exotických kliešťov a ich patogénov do strednej Európy (napr. baktéria Rickettsia conorii prostredníctvom kliešťa Rhipicephalus sanguineus, ktorý parazituje psy). V súvislosti s uvedenými javmi sa v strednej Európe vrátane Slovenska môžu objaviť doteraz neznáme patogény a nákazy, potenciálne nebezpečné pre domáce zvieratá aj človeka. Diplomová práca sa bude zaoberať druhovým spektrom kliešťov, ktoré parazitujú domáce zvieratá na vybraných lokalitách juhozápadného Slovenska. Molekulárnou analýzou

Univerzita Komenského v Bratislave
Prírodovedecká fakulta

vzoriek kliešťov sa bude sledovať výskyt a diverzita kliešťami prenášaných mikroorganizmov v kliešťoch parazitujúcich domáce zvieratá.

Vedúci:	RNDr. Mária Kazimírová, CSc.
Katedra:	PriF.KZ - Katedra zoológie
PriF vedúci katedry:	doc. RNDr. Ján Kodada, CSc.
Dátum zadania:	04.10.2018
Dátum schválenia:	08.12.2018

doc. RNDr. Ján Kodada, CSc.
vedúci katedry

.....
študent

.....
vedúci práce

Poďakovanie

Chcela by som sa poďakovať mojej školiteľke RNDr. Márii Kazimírovej, CSc. za odbornú pomoc a usmernenie pri písaní mojej práce, za odborné rady a informácie a v neposlednom rade za ochotu, ďalej by som sa chcela poďakovať MVDr. Lucii Anettovej za pomoc pri vyšetrení vzoriek, ochotu a trpezlivosť a Bc. Miriam Profotovej za pomoc pri vyšetrení vzoriek, poskytnuté vzorky a za podporu. Taktiež by som sa chcela poďakovať veterinárnym lekárom a majiteľom zvierat, ktorí nám odoberali a poskytli vzorky.

ABSTRAKT

KUCHÁROVÁ KLAUDIA: *Domáce zvieratá – hostitelia kliešťov a sentinely kliešťami prenášaných mikroorganizmov na juhozápadnom Slovensku*. Univerzita Komenského v Bratislave. Prírodovedecká fakulta; Katedra zoológie. Vedúca diplomovej práce: RNDr. Mária Kazimírová, CSc. – Bratislava PRIF UK, 2020. 114 s.

Babézie sú kliešťami prenášané parazity, ktoré infikujú červené krvinky domácich a divožijúcich zvierat vrátane ľudí. Hlavnými prenášačmi *Babesia* spp. sú kliešte z čeľade Ixodidae. Babezióza psov je jedno z veterinárne najvýznamnejších a celosvetovo rozšírených kliešťami prenášaných ochorení. V Európe je najrozšírenejším druhom *Babesia canis canis*, prenášaný kliešťom *Dermacentor reticulatus.* Prvý prípad babeziózy psov na Slovensku bol potvrdený v roku 2000 v Košiciach. *Anaplasma phagocytophilum* je zoonotický patogén prenášaný kliešťami rodu *Ixodes.* Má široké spektrum hostiteľov a spôsobuje granulocytárnu anaplazmózu u psov, mačiek, koní, voľne žijúcich prežúvavcov a tzv. tick-borne fever (TBF, pastevnú horúčku) u domácich prežúvavcov. Na Slovensku bola zistená prítomnosť *A. phagocytophilum* prvýkrát v roku 2002 v kliešťoch *Ixodes ricinus* na juhozápade Slovenska. Existuje viacero kmeňov *A. phagocytophilum* ktoré infikujú zvieratá alebo ľudí a líšia sa v patogenite. Domáce zvieratá sú často parazitované kliešťami, ktoré môžu byť zdrojom infekcie aj pre ľudí, a preto môžu slúžiť v urbánnych oblastiach ako sentinely pre sledovanie výskytu kliešťov a patogénov v nich. Hlavným cieľom diplomovej práce bolo zistiť prevalenciu a druhové zastúpenie *Babesia* spp. a prevalenciu *A. phagocytophilum* v kliešťoch ktoré parazitujú domáce zvieratá na juhozápadnom Slovensku. Kliešte sme získali z domácich zvierat v rokoch 2018- 2019 z rôznych okresov na juhozápadnom Slovensku. Zozbierali sme spolu 584 kliešťov, cicajúcich na psoch, mačkách a koňoch. Prevažoval druh *I. ricinus* (373 jedincov), za ktorým nasledovali *D. reticulatus* (186 jedincov), *Ixodes hexagonus* (13 jedincov) a *Haemaphysalis concinna* (12 jedincov) Okrem kliešťov nám veterinárna klinika v Malackách poskytla 345 krvných vzoriek psov a mačiek. Molekulárnymi metódami (PCR, real time PCR) sme krv a kliešte vyšetrili na prítomnosť DNA *Babesia* spp. (amplifikácia fragmentu génu 18S rRNA) a *A. phagocytophilum* (amplifikácia úseku génu msp2). Pozitivitu na *Babesia* spp. sme potvrdili u 2,45 % *I. ricinus* a 3,27 % *D. reticulatus*. V *I. ricinus*, ktoré parazitovali psy a mačky, sme detegovali druh *Babesia microti*. V jedincoch *D. reticulatus* zozbieraných zo psov a koní sme detegovali druh *B. canis canis*. Z krvi bola pozitívna jedna vzorka (0,28 %), odobratá zo psa z lokality Studienka, kde bol potvrdený druh *B. canis canis*. Prítomnosť *A. phagocy-*

tophilum sme detegovali v 19,01 % *I. ricinus*, z ktorých bolo 8,74 % jedincov zo psov a 10,26 % jedincov z mačiek. V krvi zvierat sa nám nepodarilo potvrdiť prítomnosť *A. phagocytophilum,* čo môže znamenať že kmene baktérie ktoré sa prevažne vyskytujú v kliešťoch v oblasti odkiaľ pochádzali vyšetrené zvieratá nie sú pre ne patogénne. Naše výsledky potvrdili že na juhozápadnom Slovensku existujú ohniská *B. canis canis*, čo predstavuje riziko najmä pre psy. Prítomnosť zoonotických patogénov ako *B. microti* a *A. phagocytophilum* v kliešťoch ktoré parazitujú domáce zvieratá na rôznych lokalitách juhozápadného Slovenska môže znamenať potenciálne riziko aj pre ľudí. Preto je potrebné venovať pozornosť ochrane domácich zvierat pred kliešťami.

Kľúčové slová: *Ixodes ricinus, Dermacentor* spp., domáce zvieratá, kliešťami prenášané patogény

ABSTRACT

KUCHÁROVÁ KLAUDIA: *Domestic animals – hosts for ticks and sentinels for tick-borne microorganisms in southwestern Slovakia*. Comenius University in Bratislava. Faculty of Natural Scienses; Department of zoology. Supervisor of the thesis: RNDr. Mária Kazimírová, CSc. – Bratislava, FNS CU, 2020. 114 s.

Babesia spp. are tick-borne parasites that infect red blood cells of domestic and wild animals, including humans. The main vectors of *Babesia* spp. are ticks of the family Ixodidae. Canine babesiosis is from the veterinary aspect one of the most widespread tick-borne diseases worldwide. The most widespread species in Europe is *Babesia canis canis*, transmitted by the tick *Dermacentor reticulatus*. The first case of canine babesiosis in Slovakia was confirmed in 2000 in Košice. *Anaplasma phagocytophilum* is a zoonotic pathogen transmitted by ticks of the genus *Ixodes*. It has a wide range of hosts and causes granulocytic anaplasmosis in dogs, cats, horses, wild ruminants and so-called tick-borne fever (TBF) in domestic ruminants. In Slovakia, the presence of *A. phagocytophilum* was detected for the first time in 2002 in *Ixodes ricinus* ticks in southwestern Slovakia. There are several strains of *A. phagocytophilum* that infect animals or humans and differ in their pathogenicity. Domestic animals are often parasitized by ticks, which can also be a source of infection for humans, and can therefore serve as sentinels in urban areas to monitor the presence of ticks and pathogens in them. The main aim of the diploma thesis was to determine the prevalence and species representation of *Babesia* spp. and the prevalence of *A. phagocytophilum* in ticks that parasitize domestic animals in southwestern Slovakia. We obtained ticks from domestic animals in the years 2018-2019 from various districts in southwestern Slovakia. We collected a total of 584 ticks freeding on dogs, cats and horses. The dominant species was *I. ricinus* (373 individuals), followed by *D. reticulatus* (186 individuals), *Ixodes hexagonus* (13 individuals) and *Haemaphysalis concinna* (12 individuals). In addition to ticks, the veterinary clinic in Malacky provided 345 blood samples of dogs and cats. By using molecular methods (PCR, real time PCR) we examined the blood and ticks for the presence of *Babesia* spp. DNA (amplification of the 18S rRNA gene fragment) and *A. phagocytophilum* (amplification of the msp2 gene segment). We confirmed positivity to *Babesia* spp. in 2.45% of *I. ricinus* and 3.27% of *D. reticulatus.* In *I. ricinus*, which parasitized dogs and cats, we detected the species *Babesia microti.* In individuals of *D. reticulatus* collected from dogs and horses, we detected the species *B. canis canis*. In one sample of blo-

od (0.28%) taken from a dog from the Studienka locality, the species *B. canis canis* was confirmed. The presence of *A. phagocytophilum* was detected in 19.01% of *I. ricinus*, of which 8.74% were from dogs and 10.26% from cats. We did not confirm the presence of *A. phagocytophilum* in the blood of any of the animals, which may suggest that strains of the bacterium that predominantly occur in ticks in the area where the examined animals came from are not pathogenic to them. Our results confirmed that there are foci of *B. canis canis* in southwestern Slovakia, which pose risk especially for dogs. The presence of zoonotic pathogens such as *B. microti* and *A. phagocytophilum* in ticks that parasitize domestic animals in various localities of southwestern Slovakia may also pose a potential risk to humans. Therefore, care must be taken to protect pets from ticks.

Key words: *Ixodes ricinus, Dermacentor* spp., domestic animals, tick-borne patogens

Čestné vyhlásenie

Čestne vyhlasujem, že predloženú diplomovú prácu som vypracovala samostatne, a že som v nej uviedla všetky použité literárne zdroje.

V Bratislave, 27. 07. 2020 .....

PREDHOVOR

Kliešte sú prirodzenou súčasťou ekosystému. Avšak v dôsledku globálneho otepľovania sa ich areál rozšírenia neustále zväčšuje . Toto predstavuje veľké riziko nie len pre ľudí ale aj zvieratá, pretože majú široké spektrum hostiteľov, na ktorých parazitujú a prenášajú veľký počet pôvodcov rôznych ochorení.

Domáce zvieratá predstavujú bežných hostiteľov kliešťov a zároveň slúžia ako rezervoáre pre rôzne kliešťami prenášané patogény. V dôsledku parazitácie kliešťami sú takisto významnými sentinelmi pre výskyt kliešťami prenášaných ochorení.

Výskumu kliešťov a kliešťami prenášaných ochorení sa venuje každý rok veľká pozornosť, no napriek tomu si myslím, že to je a bude stále aktuálna téma. Problémom nie je však len globálne otepľovanie ale aj urbanizácia, čím sa vytvárajú vhodné podmienky pre nárast početnosti kliešťov a takisto aj cestovanie so zvieratami do oblastí, kde sa vyskytujú rôzne nebezpečné patogény alebo dovoz zvierat z takýchto oblastí. Preto som sa aj ja rozhodla venovať tejto téme lebo by som svojim výberom a realizovaným výskumom rada prispela k tejto problematike.

OBSAH

ÚVOD 13

CIELE DIPLOMOVEJ PRÁCE 14

1 LITERÁRNY PREHĽAD 15

1.1 Všeobecná charakteristika kliešťov 15

1.1.1 Systematické zaradenie 15

1.1.2 Morfológia 16

1.1.3 Životný cyklus 18

1.1.4 Ekológia 20

1.2 Epidemiologicky významné druhy kliešťov Slovenska 22

1.2.1 *Ixodes ricinus* 22

1.2.2 *Ixodes hexagonus* 24

1.2.3 *Dermacentor reticulatus* 25

1.2.4 *Dermacentor marginatus* 27

1.2.5 *Haemaphysalis concinna* 28

1.2.6 *Haemaphysalis punctata* 30

1.2.7 *Haemaphysalis inermis* 31

1.3 Domáce zvieratá – hostitelia kliešťov a kliešťami prenášaných patogénov 32

1.4 Vybrané kliešťami prenášané patogény s veterinárnym významom 34

1.4.1 *Anaplasma phagocytophilum* 34

1.4.2 *Babesia* spp. 42

2 MATERIÁL A METÓDY 54

2.1 Zber materiálu 54

2.2 Sledované lokality a veterinárne ambulancie 54

2.3 Determinácia kliešťov 65

2.4 Izolácia DNA 65

2.4.1 Kliešte 66

2.4.2 Krv 66
2.5 PCR analýza pre *Babesia* spp. 67
2.5.1 Elektroforéza DNA 69
2.5.2 Sekvenovanie amplikónov a analýza sekvencií 69
2.6 Real time PCR pre *Anaplasma phagocytophilum* 70
3 VÝSLEDKY 72
3.1 Výskyt a druhové zloženie kliešťov na hostiteľoch 72
3.2 Sezónny výskyt kliešťov na domácich zvieratách na juhozápadnom Slovensku 78
3.2 Molekulárna detekcia *Babesia* spp. 79
3.3 Molekulárna detekcia *Anaplasma phagocytophilum* 85
4 DISKUSIA 88
4.1 Druhové zloženie a sezónny výskyt kliešťov na domácich zvieratách na juhozápadnom Slovensku 88
4.2 Molekulárna detekcia *Babesia* spp. 89
4.3 Molekulárna detekcia *Anaplasma phagocytophilum* 93
ZÁVER 95
ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY 97

ÚVOD

Kliešte sú krvcicajúce ektoparazity, ktoré prenášajú množstvo patogénov, či na ľudí alebo zvieratá (Estrada-Peña & de la Fuente 2014) a v súčasnosti patria medzi jedny z najvýznamnejších vektorov ľudských a zvieracích ochorení (Nava *et al.* 2009, Dantas-Torres *et al.* 2012). Epidemiologicky najvýznamnejšie druhy patria do čeľade Ixodidae tzv. tvrdé kliešte (Maurelli *et al.* 2018). V dôsledku klimatických zmien a zmien vo využívaní krajiny sa kliešte rozširujú do oblastí, kde sa predtým nevyskytovali, čo má za následok rozširovanie patogénov a ochorení, ktroré spôsobujú (Randolph 2004, Gray *et al.* 2009).

Babezióza je ochorenie spôsobené rodom *Babesia* patriacim do kmeňu Apicomplexa (Homer *et al.* 2000, Dantas-Torres *et al.* 2017). Sú to kliešťami prenášané parazity, ktoré napádajú červené krvinky domácich alebo divožijúcich zvierat a taktiež ľudí (Solano-Gallego & Baneth 2011). Ľudia nepatria medzi ich prirodzených hostiteľov ale slúžia len ako náhodní hostitelia (Yabsley & Shock 2013), napriek tomu je ľudská babezióza celosvetovo vynárajúce sa ochorenie (Gray *et al.* 2010). Hlavnými prenášačmi babézií sú kliešte z čelade Ixodidae (Homer *et al.* 2000). Ich životný cyklus spočíva v troch fázach a to, nepohlavné rozmnožovanie v krvinkách stavovcov, pohlavné rozmnožovanie v kliešťovi a produkcia sporozoitov v slinných žľazách kliešťa (Chauvin *et al.* 2009).

Granulocytárna anaplazmóza je ochorenie spôsobené gramnegatívnou pleomorfnou baktériou *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) Dumler *et al.*,2001 patriacou do triedy Alphaproteobacteria (Rikihisa 2011, Kocan *et al.* 2015). Viazaná je na membránu vakuoly v cytoplazme eukaryotickej bunky hostiteľa. Tam sa rozmnožuje a vyvára zhluky tzv. morule (Fritz 2009, Rikihisa 2011, Jin *et al.* 2012, Kocan *et al.* 2015). Jej hlavnými prenášačmi sú kliešte rodu *Ixodex* (Dugat 2014, Yang *et al.* 2016). Hostiteľmi môžu byť rôzne domáce a divo žijúce zvieratá a taktiež ľudia (Heikkilä *et al.* 2010, Kocan *et al.* 2015). V kliešťovi infikuje časť jeho tráviaceho traktu a slinné žľazy a v hostiteľovi infikuje jeho granulocyty (Ayllón *et al.* 2015).

CIELE DIPLOMOVEJ PRÁCE

Cieľom mojej diplomovej práce bolo:

- zistiť druhové spektrum kliešťov, ktoré parazitujú domáce zvieratá na vybraných lokalitách juhozápadného Slovenska
- molekulárnou analýzou sledovať výskyt a diverzitu kliešťami prenášaných mikro-organizmov v kliešťoch parazitujúcich domáce zvieratá

1 LITERÁRNY PREHĽAD

1.1 Všeobecná charakteristika kliešťov

Kliešte sú obligátne krv cicajúce ektoparazity, ktoré prenášajú rôzne patogény na ľudí alebo zvieratá (Estrada-Peña & de la Fuente 2014). Prenášajú väčšie spektrum druhov patogénnych mikroorganizmov, ako napríklad prvokov, ricketsií, spirochét alebo vírusov, ako ktorákoľvek iná skupina článkonožcov (Jongejan & Uilenberg 2004). V súčasnosti sú kliešte spolu s komármi úznávané ako hlavné vektory ľudských ochorení a taktiež ich veterinárny význam je všeobecne uznávaný (Nava *et al.* 2009, Dantas-Torres *et al.* 2012). Navyše môžu spôsobiť vážne toxické stavy, ako je paralýza a toxikóza, podráždenie a alergia (Jongejan & Uilenberg 2004). Existuje 899 opísaných druhov kliešťov vrátane Argasidae (185 druhov), Ixodidae (713 druhov) a Nuttalliellidae (1 druh) (Kaur *et al.* 2017), ktoré parazitujú rôzne druhy stavovcov ako sú obojživelníky, plazy, vtáky alebo cicavce vo všetkých oblastiach Zeme (Anderson & Magnarelli 2008). Hoci sa kliešte vyskytujú až po subarktické oblasti, ich druhová diverzita je najväčšia v tropických a subtropických oblastiach (Anderson & Magnarelli 2008). Epidemiologicky najvýznamnejšie sú tzv. tvrdé kliešte, ktoré patria do čeľade Ixodidae (Maurelli *et al.* 2018). Prenášajú ochorenia ako rickettsiózy tzv. „spotted fever group" (SFG), babeziózu, boreliózu, anaplasmózu, ehrlichiózu, kliešťovú encefalitídu (TBE), tzv. Krymsko-Konžskú hemoragickú horúčku „Crimean-Congo hemorrhagic fever" (CCHF) (Pavlidou *et al.* 2008), tzv. Kyasanur Forest disease (KFD), tzv. Indian tick typhus (ITT) a tularémiu. Avšak kliešte nepôsobia len ako potenciálne vektory, ale tiež ako rezervoáre niektorých ďalších infekčných agens, napr. *Pasteurella multocida*, *Brucella abortus* Bang, 1897 a *Salmonella typhimurium* (Kaur *et al.* 2017). Všeobecne sa ochorenia prenášané kliešťami označujú ako TBD (z anglického „tick borne diseases"). Napriek dostupným možnostiam chemickej kontroly sa celosvetový výskyt TBD stále zvyšuje (Maurelli *et al.* 2018).

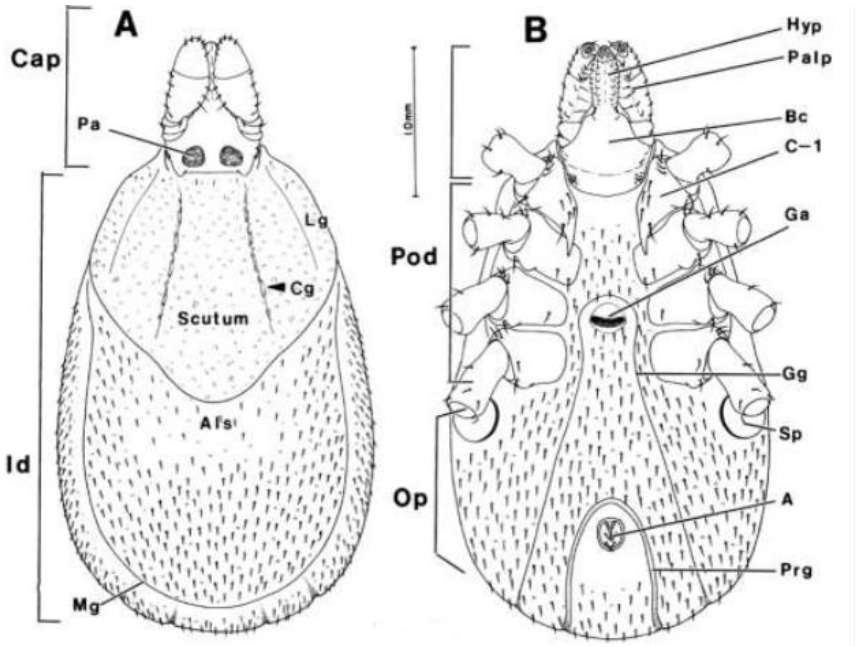
1.1.1 Systematické zaradenie

Kliešte, podrad Ixodida zaraďujeme do kmeňu Arthropoda, podkmeň Chelicerata, trieda Arachnida, podtrieda Acari a rad Parasitiformes (Anderson & Magnarelli 2008). Tento podrad zahŕňa 3 čeľade, čeľaď Argasidae, známa tiež ako mäkké kliešte alebo „soft ticks", ktoré sú charakteristické tým, že nemajú štítok tzv. scutum a ich ústne orgány sú uložené anterioventrálne, čeľaď Ixodidae, známa tiež ako tvrdé kliešte alebo „hard ticks", ktoré sú charakteristické prítomnosťou sklerotizovaného štítka a umiestnením ústneho or-

gánu apikálne. Treťou je čeľaď Nuttalliellidae, ktorá zahŕňa len jeden druh, *Nuttalliella namaqua* (Estrada-Peña 2015). Čeľaď Argasidae zahŕňa štyri rody a to rod *Argas, Carios, Ornithodoros* a *Otobius*. Do čeľade Ixodidae patria najvýznamnejšie rody *Amblyomma, Dermacentor, Haemaphysalis, Hyalomma, Ixodes, Rhipicephalus* a *Boophilus*, z čoho najviac druhov ich ma samotný rod *Ixodes* (Jongejan & Uilenberg 2004).

1.1.2 Morfológia

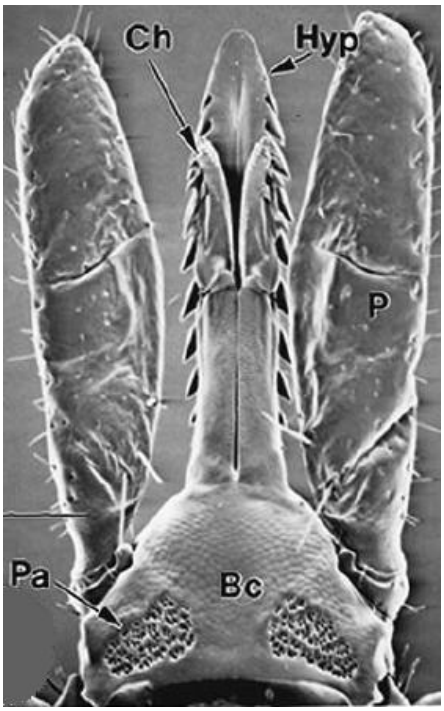
Telo kliešťov sa rozdeľuje na gnathosomu a idiosomu (Volf *et al* 2007, Anderson & Magnarelli 2008). Idiosoma pozostáva z anteriórnej podosómy a posteriórnej opisthosómy (Obr. 1).



Obrázok 1. Detailný popis tela kliešťa ilustrovaný na samičke *Ixodes cookei.* A. dorzálna strana, Cap = capitulum alebo gnathosoma, Id = idiosoma, Pa = porosa area, Lg = laterálna ryha, Cg = krčná ryha, Als = alloscutum, Mg = marginálna ryha; B. ventrálná strana, Pod = podozóma, Op = opistozóma, Hyp = hypostóm, Palpy, Bc = basis capituli, C – 1 = coxa I, Ga = genitálny otvor, Gg = genitálna ryha, Sp = stigmy, A = análny otvor, Prg = predanálna ryha. Prevzaté a upravené podľa **[1].**

Na gnathosome alebo capitulu sa nachádza ústne ústrojenstvo, ktoré tvoria chelicery, hypostóm a pedipalpy (Sonenshine & Roe 2014). Na bazálnej časti „basis capituli" z dorzálnej strany sa u samičiek nachádza „ porose area", ktorá je tvorená veľkým množstvom pórov, slúžiacich na pokrytie vajíčok voskom (Walker *et al.* 2003). Basis capituli je pripevnená k telu kliešťa pružnou membránou (Anderson & Magnarelli 2008). Hypostóm je hlavný orgán slúžiaci na príjem potravy (Obr. 2). Nachádza sa medzi palpamy a pokrytý

je dozadu smerujúcimi zúbkami, ktoré pomáhajú lepšiemu ukotveniu v koži počas cicania (Sonenshine & Roe 2014). Krv z hostiteľa prúdi cez potravný kanál (preorálny kanál), tvorený hypostómom z ventrálnej strany a chelicérami z dorzálnej. Sliny, ktoré obsahujú proteolitické enzými sa z kliešťa do hostiteľa dostanú cez tento kanál (Anderson & Magnarelli 2008). Niektoré druhy pri prichytení na hostiteľovi vylučujú bielkovinovú látku nazývanú „cement", ktorá po vylúčení stvrdne a tým si kliešť zaisťuje lepšie prichytenie k hostiteľovi (Volf *et al.* 2007, Anderson & Magnarelli 2008).

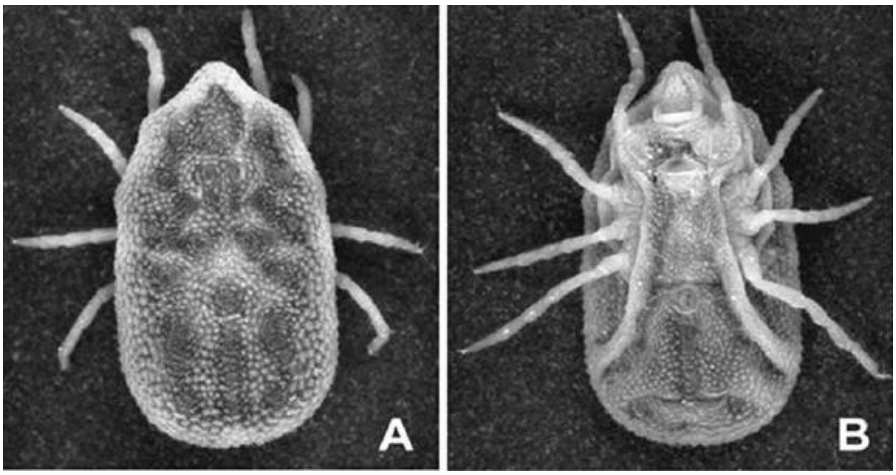


Obrázok 2. Detailný záber hypostómu pri rozlíšení 200 μm, kde Ch = chelicéry, Hyp = hypostóm, P = pedipalpy, Pa = porose area, Bc = basis capituli. Prevzaté a upravené od Sonenshine & Roe 2014.

Podosóma nesie kráčavé nohy a genitálny otvor (Sonenshine & Roe 2014). Genitálny otvor chýba u lariev aj nýmf (Walker *et al.* 2003). Na dorzálnej strane sa nachádza štítok tzv. scutum, ktorý u lariev, nýmf a samičiek pokrýva asi 1/3 tela a u samcov pokrýva celý povrch tela. Scutum nesie cervikálne ryhy a je prítomný len u druhov z čeľade Ixodidae (Sonenshine & Roe 2014). Na bočných okrajoch z každej strany sa môžu nachádzať jednoduché očká (ocelli), ktoré sa vyskytujú pri rodoch *Hyalomma, Rhipicephalus, Amblyomma* a *Dermacentor* (Volf *et al.* 2007).

Opistosómu tvorí alloscutum, ktoré sa nachádza za štítkom na chrbtovej strane. Na ventrálnej strane sa nachádza análny otvor, predanálna ryha (Sonenshine & Roe 2014) a po bokoch tela sa nachádzajú dýchacie otvory tzv. stigmy (Volf *et al.* 2007).

Telo kliešťov čeľade Argasidae je pokryté kožovitým alebo bradavičnatým integumentom. Štítok sa u nich nevyskytuje, len larvy majú vyvinutú akúsi napodobeninu. Gnathosoma u nýmf a adultov je z pohľadu zhora skrytá pod idiosomou (Volf *et al.* 2007) (Obr. 3). Ak sú prítomné oči, nachádzajú sa na supracoxálnych záhyboch (Anderson & Magnarelli 2008).



Obrázok 3. Druh kliešťa z čeľade Argasidae, *Carios kelleyi,* A - dorzálna strana, B - ventrálna strana. Prevzaté od Sonenshine & Roe (2014).

Dĺžka tela u dospelých sa pohybuje od 2 do 20 mm. U nacicaných samičiek sa môže pohybovať od 25 do 30 mm a ich váha môže dosahovať až 100-násobok ich pôvodnej váhy (Anderson & Magnarelli 2008).

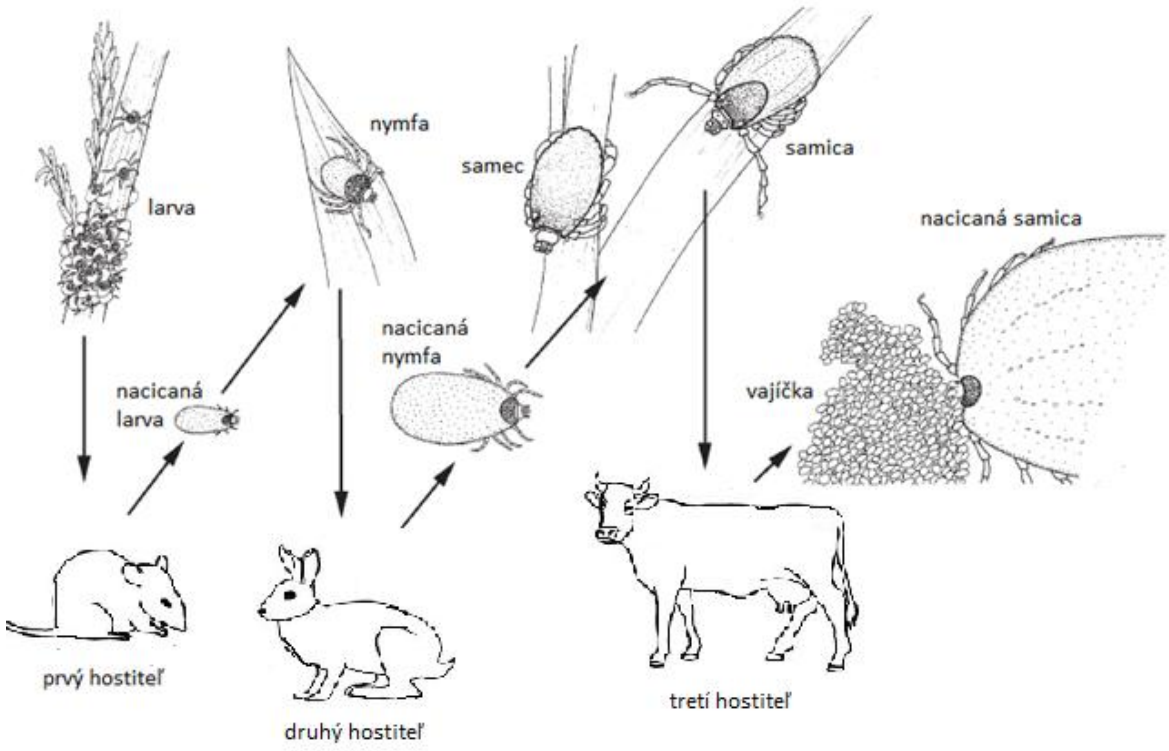
Kráčavé nohy pozostávajú zo šiestich článkov (coxa, trochanter, femur, pattela, tibia, tarsus) a jedného distálneho segmentu (pretarsus) (Sonenshine & Roe 2014). Dospelé jedince a nymfy majú štyri páry nôh, larvy majú len tri páry (Anderson & Magnarelli 2008, Walker *et al.* 2003, Sonenshine & Roe 2014). Na tarzálnych článkoch predného páru nôh sa nachádza Hallerov orgán, ktorý slúži ako zmyslový orgán. Obsahuje brvy, ktoré vnímajú teplo, CO_2 a iné chemické zlúčeniny (Dryden & Payne 2004, Volf *et al.* 2007, Sonenshine & Roe 2014).

1.1.3 Životný cyklus

Všetky kliešte z čeľade Ixodidae sú obligátne parazity stavovcov charakterizované komplexným životným cyklom (Anderson & Magnarelli 2008). Životný cyklus zahrňuje vajíčko, larvu, nymfu a dospelého jedinca (Estrada-Peña & de la Fuente 2014). Kŕmia sa iba raz v každej aktívnej fáze životného cyklu a prijímajú obrovské množstvo krvi. Každé vývinové štádium môže parazitovať rôznych hostiteľov. Larvy a nymfy zvyčajne parazitujú malé a stredne veľké zvieratá, ako sú hlodavce alebo vtáky, zatiaľ čo dospelé jedince

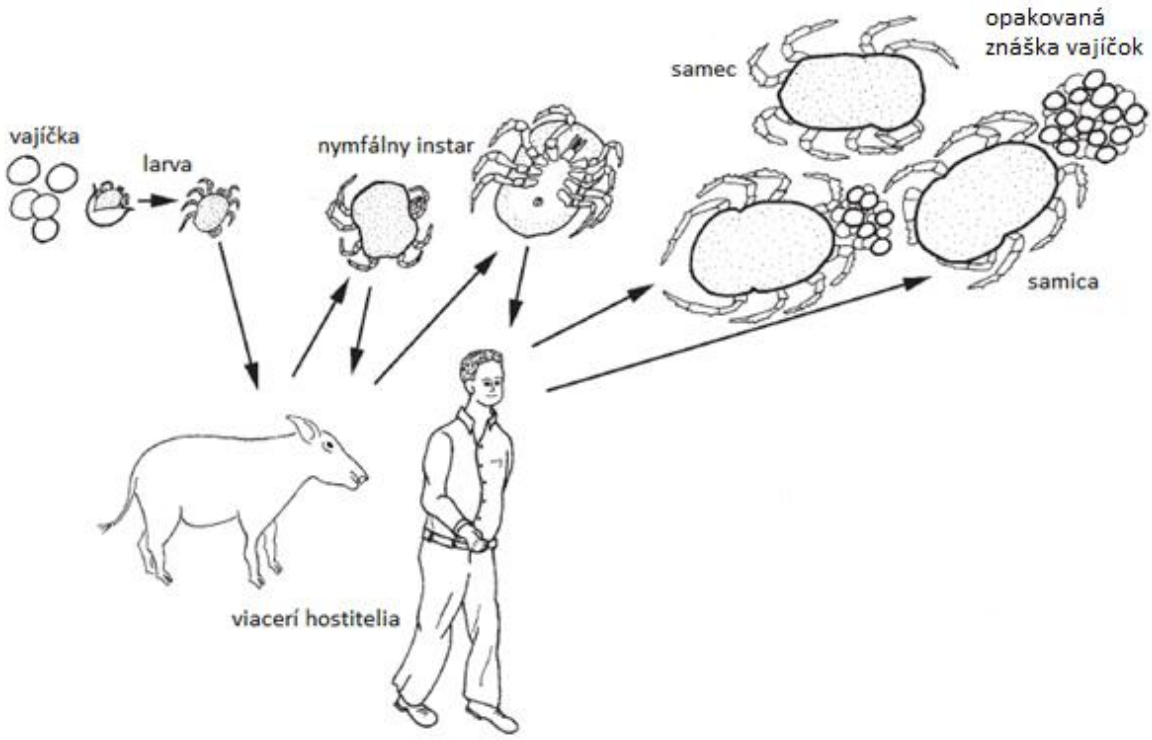
parazitujú väčšinou veľké zvieratá. Toto však nie je pravidlo (Estrada-Peña 2015). Kŕmenie je pomalé a trvá niekoľko dní. U lariev a nýmf je to priemerne od 2,5 do 8 dní a u dospelých jedincov od 5 do 12 dní. Počas prvých 24 hodín nenastáva žiadne alebo len minimálne zväčšenie hmotnosti, potom sa hmotnosť zväčšuje niekoľko dní a až v posledných dňoch nastane rýchly nárast hmotnosti (Anderson & Magnarelli 2008).

Životný cyklus môže byť troj-, dvoj- a taktiež jednohostiteľský. Pri jednohostiteľskom životnom cykle sa z vajíčka vyliahne larva, ktorá aktívne lezie na vegetáciu aby našla hostiteľa. Po prichytení a ukončení kŕmenia zostáva na hostiteľovi a mení sa na nymfu. Nymfa sa živí na tom istom hostiteľovi a po dostatočnom nakŕmení sa mení na dospelého jedinca, ktorý mení pozíciu na tom istom hostiteľovi kvôli páreniu. Jednohostiteľský cyklus je typický pre podrod *Boohpilus.* Pri dvoj hostiteľskom cykle sa larva a nymfa kŕmia na tom istom hostiteľovi a dospelý jedinec na inom. Dvojhostiteľský cyklus je typický pre druh *Hyalomma detritum* a *Rhipicephalus evertsi*. Pri trojhostiteľskom cykle sa larvy kŕmia na jednom hostiteľovi, potom sa oddelia od hostiteľa a schovajú sa do pôdy alebo vegetácie, kde sa menia na nymfy. Nymfy vyhľadávajú druhého hostiteľa a po dostatočnom nakŕmení sa menia na dospelého jedinca. Samička sa kŕmi raz za život, nakladie obrovské množstvo vajíčok a hynie. Samec sa môže kŕmiť viackrát (Walker *et al.* 2003) (Obr. 4).



Obrázok 4. Životný cyklus Ixodidae na príklade trojhostiteľského druhu. Prevzaté a upravené od Walker *et al.* (2003).

Životný cyklus mäkkých kliešťov (Argasidae) je odlišný a spočíva v striedaní viacerých hostiteľov (Jongejan & Uilenberg 1994). Ich cyklus, tak isto, ako aj u tvrdých kliešťov pozostáva z vajíčka, larvy, nymfy a dospelého jedinca. Aj keď existujú výnimky, väčšina druhov sa kŕmi rýchlo, od 30 minút do niekoľkých hodín. Pri nedostatočnom nakŕmení alebo prerušení sa jeden nymfálny instar môže kŕmiť dvakrát pred ďalším vývojom. Počet nymfálnych instarov sa líši v závislosti od druhu. Dospelé jedince sa kŕmia niekoľkokrát a po každom nakŕmení samička nakladie vajíčka (Oliver 1989, Aeschlimann 1991, Jongejan & Uilenberg 1994, Walker *et al.* 2003, Sonenshine & Roe 2014) (Obr. 5).



Obrázok 5. Životný cyklus Argasidae. Prevzaté a upravené od Walker *et al.* (2003).

1.1.4 Ekológia

Kliešte môžeme klasifikovať ako parazity hniezdno-norové (nidikolné) alebo parazity vo voľnej prírode. Takmer všetky mäkké kliešte (Argasidae), a niektoré tvrdé kliešte (Ixodidae) sú nidikolné, obývajúce jaskyne, hniezda, trhliny, dutiny stromov a iné. V takomto prostredí majú kliešte väčšinou stabilné klimatické podmienky (teplo, vlhkosť) (Anderson & Magnarelli 2008).

Kliešte žijúce vo voľnej prírode môžeme nájsť v lesoch, savanách, krovinách, rašeliniskách, pasienkoch, lúkach dokonca aj v púšťach. Ich tolerancia k vysychaniu je obmedzená, preto tieto straty vyrovnávajú pohybom po vegetácií, kde absorbujú vodu z prostre-

dia (Anderson & Magnarelli 2008). Medzi ďalšie dôležité ekologické faktory patria fotoperiodicita, podnebie a počasie a hostitelia. Fotoperiodicta ovplyvňuje aktivitu kliešťov a s tým spojené hľadanie hostiteľov, kŕmenie, opustenie hostiteľa a ovipozíciu. (Oliver 1989). Podnebie určuje ich geografické rozšírenie a počasie ich sezónnu aktivitu (Randolph 2004). Hostitelia hrajú dôležitú úlohu pri cirkulácií patogénov prenášaných kliešťami. Riziko prenosu patogéna prenášaného kliešťami je úmerné populačnej hustote infikovaných kliešťov, ktorá závisí nie len od klímy ale aj od populačnej hustoty infikovaných rezervoárových hostiteľov (Estrada-Peña & de la Fuente 2014, Król *et al.* 2014). Za prítomnosti vhodných podmienok ako je klíma, vegetácia, geologické podložie a hlavne prítomnosť vhodných hostiteľov a prenášačov vznikajú prírodné ohniská nákazy (Volf *et al.* 2007, Majláth & Majláthová 2015). Zmena klímy a zvýšená mobilita domácich zvierat vedie k rozširovaniu kliešťov do iných geografických oblastí. Jeden z príkladov je druh *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), vektor psích patogénov, ktorý má dobrú adaptívnu schopnosť a je pravdepodobné, že sa rozšíri do nových oblastí Európy (Földvári & Farkas 2005). *Ixodes ricinus* je ďaľším príkladom kliešťa, ktorého distribúcia sa rozšírila do severných oblastí a vyšších nadmorských výšok v porovnaní s predchádazjúcimi desaťročiami (Rizzoli *et al.* 2014). Preto má zmena klímy nepopierateľný vplyv na početnosť kliešťov a na zvýšený výskyt kliešťami prenášaných ochorení (Randolph 2004, Gray *et al.* 2009).

Pri hľadaní hostiteľa, kliešte buď čakajú na vegetácií na vhodného hostiteľa alebo pri hniezdnych druhoch aktívne vyliezajú až po zachytení pachu hostiteľa (Anderson & Magnarelli 2008).

1.2 Epidemiologicky významné druhy kliešťov Slovenska

1.2.1 *Ixodes ricinus*

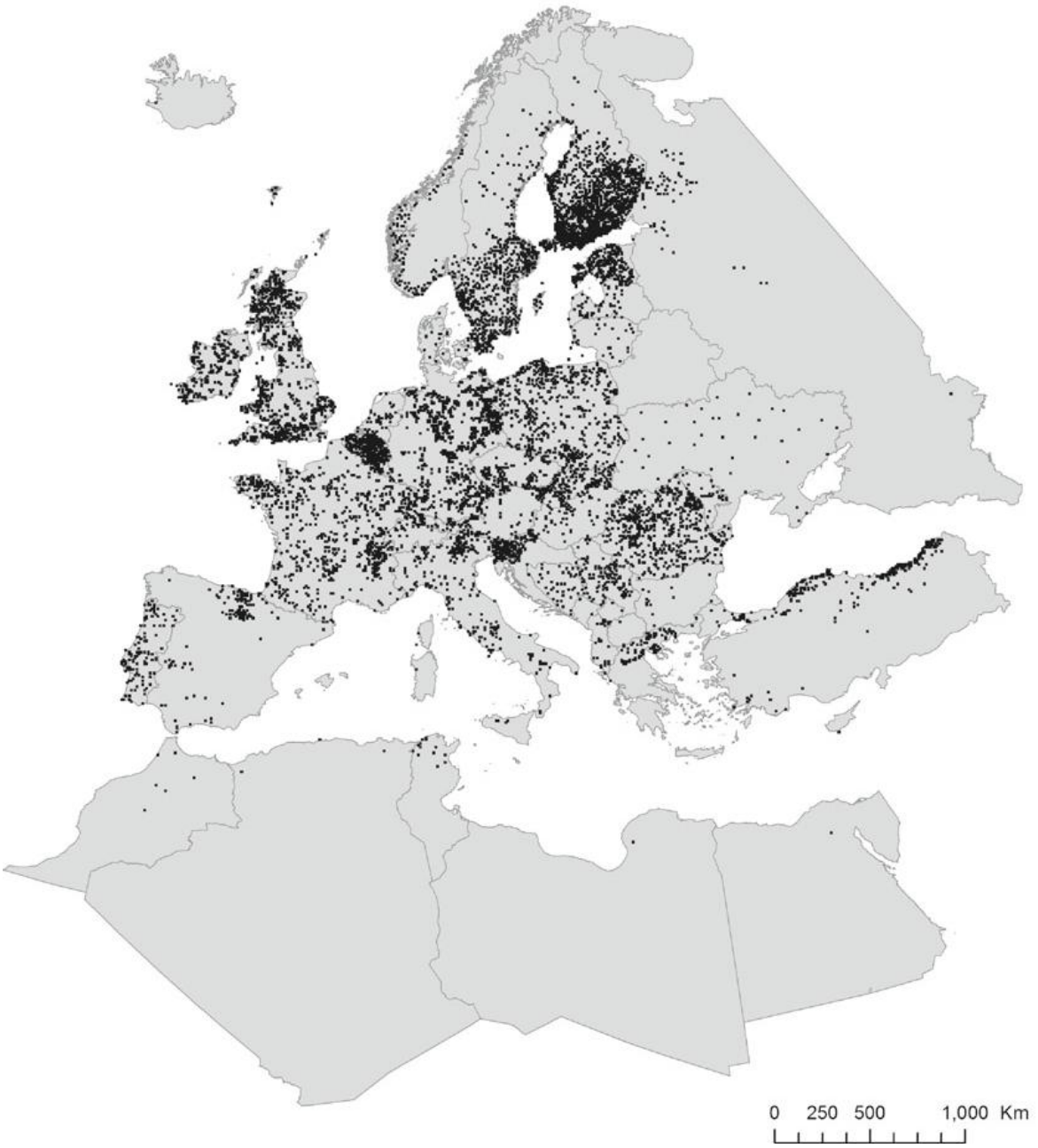
Ixodes ricinus (Linneaus, 1758) patrí k najrozšírenejšiemu, najviac študovanému a epidemiologicky najvýznamnejšiemu druhu kliešťa. Jeho životný cyklus je trojhostiteľský a trvá od dvoch do troch rokov. V oblastiach s dobrými podmienkami môže byť aktívny počas celého roka s kratším životným cyklom (Otranto *et al.* 2017). Jeho hostiteľmi môže byť asi 300 druhov stavovcov (Rizzoli *et al.* 2014). Larvy a nymfy zvyčajne parazitujú malé a stredne veľké cicavce, vtáky a jašterice, dospelé jedince parazitujú väčšie cicavce ako je napr. hovädzí dobytok a jeleňovité (Nosek *et al.* 1967, Otranto *et al.* 2017).

Nymfy a dospelé jedince sú v podmienkach Slovenska aktívne od marca do polovice novembra a vrchol ich aktivity nastáva na jar (máj – jún) a na jeseň (september – október) (Kazimírová *et al.* 2016). Larvy sú aktívne na začiatku leta (Nosek *et al.* 1967, Otranto *et al.* 2017).

Kliešte tohto druhu preferujú biotopy s listnatými a ihličnatými lesmi, nízke husté kríky, okraje lesov a zmiešané lesy. Majú nízku toleranciu na stratu vlhkosti, preto sa vyskytujú v oblastiach s vysokou vlhkosťou (Kazimírova *et al.* 2016, Otranto *et al.* 2017).

Ixodes ricinus je vektorom vírusu kliešťovej encefalitídy (TBEV), *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp. a *Borrelia burgdorferi*, a ďalších mikroorganizmov (Pangrácová *et al.* 2013, Gilbert *et al.* 2014, Otranto *et al.* 2017).

Geografické rozšírenie je zobrazené na Obr. 6.



Obrázok 6. Geografické rozšírenie *Ixodes ricinus* v Európe a severnej Afrike. Prevzaté a upravené podľa Otranto *et al.* (2017).

1.2.2 *Ixodes hexagonus*

Ixodes hexagonus Leach, 1815 je hniezdo-norový kliešť s trojhostiteľským životným cyklom, ktorý trvá jeden až dva roky. Jeho hlavným hostiteľom je jež ale taktiež parazituje aj mäsožravé cicavce z čeľade psovité (Canidae), lasicovité (Mustalidae) a mačkovité (Felidae). Hlásené boli aj prípady u ľudí (Sándor 2017).

Nie je u nich typická sezónna aktivita ale výskyt samičiek je prevažne v lete, larvy a nymfy sú aktívne počas celého roka (Sándor 2017).

Experimentálne bol dokázaný prenos *Borrelia burgdorferi* s.l. (Sándor 2017).

Geografické rozšírenie v Európe a severnej Afrike je zobrazené na Obr. 7.

Obrázok 7. Geografické rozšírenie *Ixodes hexagonus* v Európe a severnej Afrike. Prevzaté a upravené podľa Sándor (2017).

1.2.3 *Dermacentor reticulatus*

Dermacentor reticulatus (Fabricius, 1794) patrí na Slovensku k druhému epidemiologicky najvýznamnejšiemu druhu kliešťa (Bullová *et al.* 2009, Karbowiak 2014). Má trojhostiteľský životný cyklus, ktorý zvyčajne trvá jeden rok (Földvári *et al.* 2016, Rubel *et al.* 2016, Hornok 2017). Larvy a nymfy parazitujú hlodavce, malé a stredne veľké hmyzožravce (piskor, jež, krt) a zajace. Medzi hostiteľov nýmf patria taktiež párnokopytníky a mäsožravce zahŕňajúc psy. Hostiteľmi pre dospelé jedince sú kopytníky, mäsožravce (najmä psy), stredne veľké hmyzožravce a zajace. Dospelé jedince môžu parazitovať aj ľudí (Gray *et al.* 2009, Karbowiak 2014, Földvári *et al.* 2016, Rubel *et al.* 2016, Hornok 2017).

Dospelé jedince sa vyznačujú s vyššou jesennou a s nižšou jarnou sezónnou aktivitou. V strednej Európe je ich aktivita od konca augusta do mája až júna, vrátane zimných mesiacoch v prípade priaznivého počasia. Larvy a nymfy sú aktívne v lete (Hornok 2017).

Z biotopov uprednostňuje lúky a pasienky, zmiešané alebo dubové lesy, povodia riek, močaristé zmiešané lesy, pastvinu, vresoviská a vyskytnúť sa môže aj v prímestských oblastiach a v oblastiach s nadmorskou výškou do 1000 m.n.m. (Bullová *et al.* 2009, Földvári *et al.* 2016, Rubel *et al.* 2016, Hornok 2017).

Je vektorom rôznych patogénov, spôsobujúcich ochorenia ako je babezióza, tularémia, Q-horúčka, rickettsióza, anaplasmóza, kliešťova encefalitída a hemoragickú horúčkú OMSK (Bartosik *et al.* 2011, Bullová *et al.* 2009, Karbowiak 2014, Földvári *et al.* 2016, Rubel *et al.* 2016, Hornok 2017).

Geografické rozšírenie v Európe a severnej Afrike je zobrazené na Obr. 8.

Obrázok 8. Geografické rozšírenie *Dermacentor reticulatus* v Európe a severnej Afrike. Prevzaté a upravené podľa Hornok (2017).

1.2.4 *Dermacentor marginatus*

Dermacentor marginatus (Sulzer, 1776) je trojhostiteľský kliešť s jednoročným životným cyklom. Hostiteľmi lariev a nýmf sú hlodavce a malé až stredne veľké hmyzožravce (piskor, jež, krt), zajace a mäsožravce vrátane psov. Hostiteľmi dospelých jedincov sú kopytníky, mäsožravce (len zriedka domáce psy) a stredne veľké hmyzožravce. Dospelé jedince parazitujú aj na ľuďoch (Nosek *et al.* 1967, Rubel *et al.* 2016, Hornok 2017).

Aktivita dospelých jedincov je vyššia na jar a nižšia na jeseň. V strednej Európe ich aktivita začína koncom augusta a trvať môže až do mája a júna nasledujúceho roka, a v prípade optimálnych podmienok aj v zimných mesiacoch. Larvy a nymfy sú aktívne v lete (Hornok 2017).

Z biotopov uprednostňuje lúky a pasienky a v strednej Európe xerofilné rastlinné spoločenstvá. Vyskytnúť sa môže v nadmorskej výške do 1000 m.n.m. (Nosek *et al.* 1967, Rubel *et al.* 2016, Hornok 2017).

Môže byť vektorom druhov patogénov ako TBEV, CCHFV, OMSK vírus, *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. a *Theileria* spp. (Hornok 2017).

Geografické rozšírenie v Európe a severnej Afrike je zobrazené na Obr. 9.

Obrázok 9. Geografické rozšírenie *Dermacentor marginatus* v Európe a severnej Afrike. Prevzaté a upravené podľa Hornok (2017).

1.2.5 *Haemaphysalis concinna*

Haemaphysalis concinna Koch 1844 je kliešť s trojhostiteľským životným cyklom, ktorý trvá 2 - 3 roky (Nosek *et al.* 1967, Pfäffle *et al.* 2017). Hostiteľmi môžu byť malé a stredné veľké cicavce, vtáky a zriedka plazy. Dospelé kliešte parazitujú domáce a divo žijúce kopytníky, mäsožravce ako sú líšky a psy a stredne veľké hmyzožravce ako sú ježe (Nosek 1971, Pfäffle *et al.* 2017, Rubel *et al.* 2018). Ľudia môžu byť napadnutí nymfami a dospelými jedincami (Rubel *et al.* 2018).

Aktivita tohto kliešťa závisí od regiónu a roku. Vo všeobecnosti, väčšina dospelých je aktívna od apríla do októbra až novembra s jeho najvyššou aktivitou na konci jari alebo leta. Larvy sú aktívne od konca mája do novembra a nymfy od polovice apríla do októbra (Pfäffle *et al.* 2017). V strednej Európe sú dospelé jedince aktívne najmä od mája do júla s najvyššou aktivitou v júni, nymfy od polovice apríla do polovice októbra a larvy od konca mája do polovice októbra (Pfäffle *et al.* 2017, Rubel *et al.* 2018).

Z biotopov preferuje svetlé vlhké listnaté lesy a zmiešané lesy s borovicovým porastom, lúky a okraje dubových lesov. Nájsť ho môžeme aj v zmiešaných hrabavo-dubových lesoch. Taktiež sa vyskytuje v pobrežnej vegetácií v okolí riek a jazier (Nosek 1971, Pfäffle *et al.* 2017).

Je vektorom pôvodcov mnohých ochorení - babezióz, anaplasmóz, TBE, ricketssióz, ehrlichióz a tularémie (Pfäffle *et al.* 2017, Rubel *et al.* 2018).

Geografické rozšírenie v Európe je zobrazené na Obr. 10.

Obrázok 10. Geografické rozšírenie *Haemaphysalis concinna* v Európe. Prevzaté a upravené podľa Pfäffle *et al.* (2017).

1.2.6 *Haemaphysalis punctata*

Haemaphysalis punctata Canestrini & Fanzago, 1878 je trojhostiteľský kliešť s trvaním životného cyklu od jedného do troch rokov. Hostiteľmi lariev a nýmf môžu byť drobné cicavce, zajace, ježe, vtáky a dokonca aj jašterice. Dospelé jedince parazitujú voľne žijúce a domáce kopytníky, najmä dobytok, ovce a kozy. Ich hostiteľmi môžu byť taktiež psy, líšky, ježe, lasicovité (Mustelidae) a dvojitozubce (Lagomorpha). Ľudia môžu byť príležitostní hostitelia (Nosek 1971, Pfäffle *et al.* 2017).

Aktivita lariev býva od júna do septembra, nymfy sú aktívne od apríla do októbra a dospelé jedince od marca do júna a od septembra do novembra (Nosek 1971, Pfäffle *et al.* 2017).

Preferuje široké spektrum biotopov, od studeného po mierne a vlhké podnebie až po suchšie biotopy. Obýva okraje lesov, lesostep, umelo vysadené ihličnaté lesy, dubové lesy a vápencové pastviny (Nosek 1971, Pfäffle *et al.* 2017).

Môže byť vektorom rôznych patogénov ako vírusy Bhanja, Palma, Tribeč, TBEV, CCHFV, Louping ill vírus, rickettsie, babézie, anaplazmy, pôvodcu tularémie, a *Coxiella burnetii* (Derrick, 1939) Philip, 1948 (Nosek 1971, Pfäffle *et al.* 2017).

Geografické rozšírenie v Európe a severnej Afrike je zobrazené na Obr. 11.

Obrázok 11. Geografické rozšírenie *Haemaphysalis punctata* v Európe a severnej Afrike. Prevzaté a upravené podľa Pfäffle *et al.* (2017).

1.2.7 *Haemaphysalis inermis*

Haemaphysalis inermis Birula 1895 je kliešť s trojhostiteľským životným cyklom, ktorý v optimálnych podmienkach trvá jeden rok. Dospelé jedince parazitujú domáce a divo žijúce kopytníky, larvy a nymfy malé cicavce. Prípady u ľudí boli takisto hlásené (Otranto *et al.* 2017).

Larvy sú aktívne na jar a v lete, nymfy od konca jari do začiatku jesene a dospelé jedince od októbra do mája s výnimkou silných mrazov (Nosek *et al.* 1967, Otranto *et al.* 2017).Vyskytuje sa v lesoch mierneho pásma a zmiešaných lesoch (Otranto *et al.* 2017).

Prenos patogénov u *H. inermis* je málo známy. Experimentálne bol dokázaný prenos TBEV. Bol zaznamenaný ako údajný vektor ľudských patogénov rodu *Rickettsia* v Španielsku a Maďarsku a tiež vektorom *Babesia bigemina* (Smith et Kilborne, 1893) Wenyon, 1926 (Otranto *et al.* 2017).

Geografické rozšírenie v Európe a severnej Afrike je zobrazené na Obr. 12.

Obrázok 12. Geografické rozšírenie *Haemaphysalis inermis* v Európe a severnej Afrike. Prevzaté a upravené podľa Otranto *et al.* (2017).

1.3 Domáce zvieratá – hostitelia kliešťov a kliešťami prenášaných patogénov

Schopnosť kliešťov prenášať rôzne patogény a s tým súvisiace ochorenia predstavuje pretrvávajúce riziko pre ľudí a domáce a hospodárske zvieratá (Leschnik *et al.* 2012, Stuen 2013, Król *et al.* 2016, Stuen 2016). Kliešte sa čoraz viac prispôsobujú mestskému a prímestskému prostrediu. Okrem toho, niektoré druhy kliešťov sa rozšíria do nových oblastí v dôsledku abiotických a biotických faktorov, ako sú zmena podnebia, zmena biotopu alebo častejšie cestovanie s domácimi zvieratami, čo vedie k zvyšujúcemu sa výskytu kliešťov na domácich alebo hospodárskych zvieratách (Beugnet & Chalvet-Monfray 2013, Król *et al.* 2016, Licari *et al.* 2017). S týmito faktormi taktiež súvisí výskyt chorôb v predtým nezasiahnutých regiónoch (Billinis 2013). K šíreniu ochorení prispieva aj transport domácich zvierat (psy), ale aj hospodárskych zvierat (ovce, hovädzí dobytok) do iných krajín, dokonca aj na iné kontinenty (Stuen *et al.* 2013). Ďalším faktorom je urbanizácia prostredia, ktorá v Európe vykazuje najvyššiu úroveň. Urbanizácia dramaticky mení zloženie spoločenstiev voľne žijúcich zvierat a ovplyvňuje populáciu kliešťov. V európskych mestách sa verejné parky, záhrady alebo cintoríny stali dôležitými miestami, kde sa môžu ľudia a domáce zvieratá stretnúť s potenciálne infikovanými kliešťami. Urbanizácia môže zmeniť populačnú hustotu kliešťov a hostiteľov, čo môže viesť k zvýšenému prenosu patogénov. Následkom urbanizácie je taktiež zvýšená mobilita ľudí a spoločenských zvierat v prírode (Rizzoli *et al.* 2014). Fragmentácia a degradácia biotopov človekom spôsobuje väčší kontakt medzi ľuďmi, domácimi zvieratami a voľne žijúcou zverou a v dôseldku zmien vo využití krajiny sa rôzne druhy divožijúcich zvierat dokáže dobre prispôsobiť mestskému prostrediu, čo zvyšuje riziko nákazy nimi prenášanými patogénmi (Salman & Tarrés-Call 2013, Millán *et al.* 2016).

Psy sú dôležitým rezervoárom niekoľkých zoonotických patogénov a zároveň ako hostitelia kliešťov. Zvýšené cestovanie so psami alebo mačkami a dovoz zvierat z endemických oblastí predstavuje riziko prenosu (Menn *et al.* 2010). Najbežnejšie druhy parazitujúce na psoch a mačkách prenášajúce patogény na tieto zvieratá v Európe sú *I. ricinus,* vektor *A. phagocytophilum* (ochorenie granulocytárna anaplazmóza) a *B. burgdorferi* s. l. (ochorenie lymská borelióza), *I. hexagonus, D. reticulatus* vektor *Babesia canis* (ochorenie babezióza psov) *a R. sanguineus,* vektor patogénov rodov *Anaplasma, Rickettsia, Babesia, Hepatozoon* a *Ehrlichia* (Król *et al.* 2016).

Hospodárske zvieratá sú taktiež dôležitými hostiteľmi kliešťov (Stuen 2013, Stuen 2016). Fragmentovaná krajina, v ktorej sa nachádza rôznorodá zmes biotopov, ako sú prirodzené biotopy, pasienky a poľnohospodárska pôda, uľahčuje kontakt medzi divožijúcimi

a hospodárskymi zvieratami, čo vedie k cirkulácií patogénov medzi viacerými hostiteľmi (Chastagner *et al.* 2017). V Európe sú hlavnými druhmi kliešťov parazitujúce malé prežúvavce *I.* ricinus, *D. marginatus* a *H. punctata*. Môžu prenášať patogény *Anaplasma ovis* alebo *A. phagocytophilum* a taktiež *Babesia ovis, Babesia motasi* Wenyon, 1926 a *Babesia crassa* (Stuen 2013, Stuen 2016). V Európe je hovädzí dobytok hostiteľom kliešťov druhov *I. ricinus*, ktoré prenášajú *A. phagocytophilum* (Woldehiwet 2006) a *Babesia divergens* M´Fadyean & Stockman, 1911 (Bock *et al.* 2004, Lobo *et al.* 2019), *H. punctata*, prenášajúci *Babesia major* (Bock *et al.* 2004). Kone predstavujú hostiteľov kliešťov *Ixodes* spp., *Dermacentor* spp., *Rhipicephalus* spp., *Hyalomma* spp. a *Haemaphysalis* spp., ktoré prenášajú *A. phagocytophilum* a rôzne iné mikroorganizmy (Butler *et al.* 2008, Dzięgiel *et al.* 2013). Častá aktivita koní vo vonkajšom prostredí vedie k ich náchylnosti na napadnutie kliešťami, čo vedie k vyššiemu riziku infekcie patogénmi. Okrem toho transport infikovaných koní zohráva dôležitú úlohu pri geografickom šírení patogénov po celom svete (Saleem *et al.* 2018).

1.4 Vybrané kliešťami prenášané patogény s veterinárnym významom

1.4.1 *Anaplasma phagocytophilum*

1.4.1.1 Systematické zaradenie a všeobecná charakteristika

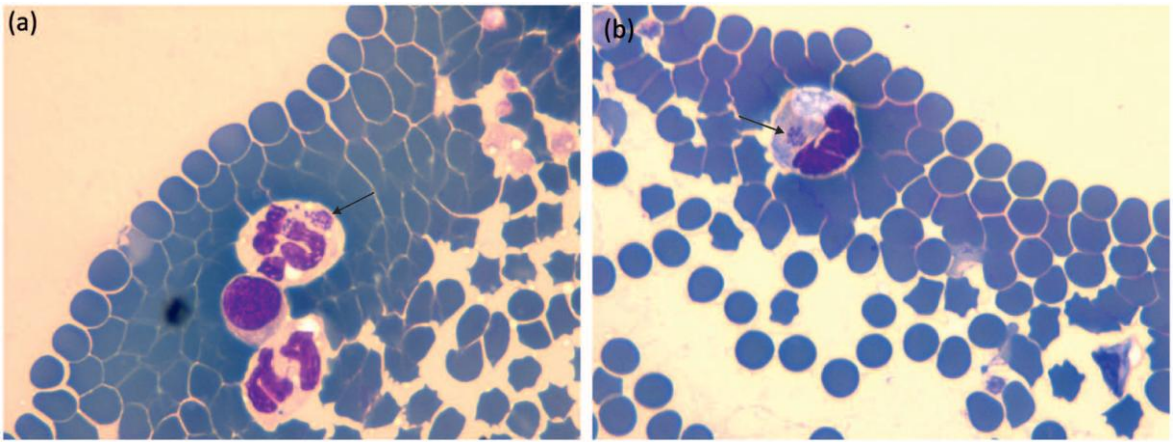
Anaplasma phagocytophilum je gramnegatívna pleomorfná baktéria, ktorá bola pôvodne označovaná ako pôvodca ľudskej granulocytárnej ehrlichiózy a známa ako patogén prežúvavcov (*Cytoecetes phagocytophila* a *Ehrlichia phagocytophila*) a koní (*Ehrlichia equi*) (Stuen 2007, Heikkilä *et al.* 2010, Rikihisa 2011, Jin *et al.* 2012, Härtwig *et al.* 2014, Kocan *et al.* 2015, Yang *et al.* 2016). Systematicky ju zaraďujeme do čeľade Anaplasmataceae, rad Rickettsiales a trieda Alphaproteobacteria. Do tejto čeľade patrí päť rodov, a to rod *Anaplasma, Ehrlichia, Neorickettsia, Aegyptianella* a *Wolbachia* (Rikihisa 2011, Kocan *et al.* 2015). Baktéria je obalená dvoma membránami a jej veľkosť sa pohybuje od 0,4 do 1,3 μm ale môže dosahovať veľkosť až 2 μm. Jej vonkajšia membrána je často zvlnená (Rikihisa 2011). Je viazaná na membránu vakuoly v cytoplazme eukariotickej hostiteľskej bunky, kde sa rozmnožuje (Rikihisa 2011, Karbowiak *et al.* 2016) a vytvára zhluky tzv. morule (Obr. 13) (Fritz 2009, Rikihisa 2011, Jin *et al.* 2012, Kocan *et al.* 2015). Nachádza sa na území USA, Európy a Ázie (Karbowiak *et al.* 2016). U ľudí je *A. phagocytophilum* vynárajúcim sa patogénom, ktorý spôsobuje ľudskú granulocytárnu anaplazmózu, sprevádzanú bolesťou hlavy a svalov (Obaidat & Alshehabat 2018).

Anaplasma phagocytophilum je zoonotický patogén prenášaný kliešťami rodu *Ixodes* (Ayllón *et al.* 2015). Baktéria v kliešťovi infikuje časť tráviaceho traktu a slinné žľazy, v hostiteľovi infikuje granulocyty (Ayllón *et al.* 2015). Má široké spektrum hostiteľov a môže spôsobiť granulocytárnu anaplazmózu u psov, mačiek, koní, voľne žijúcich prežúvavcov a tzv. tick-borne fever (TBF, pastevnú horúčku) u domácich prežúvavcov (Heikkilä *et al.* 2010, Kocan *et al.* 2015).

Epidemiológia infekcie *A. phagocytophilum* sa medzi USA a Európou veľmi líši. V USA predstavuje ľudská granulocytárna anaplazmóza rastúci problém v oblasti verejného zdravotníctva, zatiaľ čo TBF sa tam nevyskytuje. Naopak v Európe je ľudská granulocytárna anaplazmóza zriedkavejšia, aj keď počet prípadov v posledných rokoch stúpa, zatiaľ čo TBF bola hlásená vo veľa prípadoch s výraznými ekonomickými stratami (Dugat *et al.* 2014).

Prvý prípad ľudskej granulocytárnej anaplazmózy bol hlásený z USA v roku 1994 a prvý prípad z Európy bol zo Slovinska v roku 1995 (Jahfari *et al.* 2014, Karbowiak *et al.* 2016). Na Slovensku bola zistená prítomnosť *A. phagocytophilum* prvýkrát v roku 2002

v kliešťoch *I. ricinus* na juhozápade Slovenska (Špitalská & Kocianová 2002). Následne bol tento patogén izolovaný zo sleziny ryšavky žltohrdlej (*Apodemus flavicollis* Melchior,1834) a hrdziaka lesného (*Myodes glareolus* Schreber, 1780) z rovnakej časti krajiny. Prítomnosť tohto patogénu bola potvrdená aj u jeleňa lesného (*Cervus elaphus* Linnaeus, 1758), srnca lesného (*Capreolus capreolus* Linnaeus, 1758) a medveďa hnedého európskeho (*Ursus arctos arctos* Linnaeus, 1758). Prvý prípad ľudskej granulocytovej anaplazmózy bol potvrdený u 54 ročného pacienta z Ružomberka v roku 2009 (Nováková *et al.* 2010).



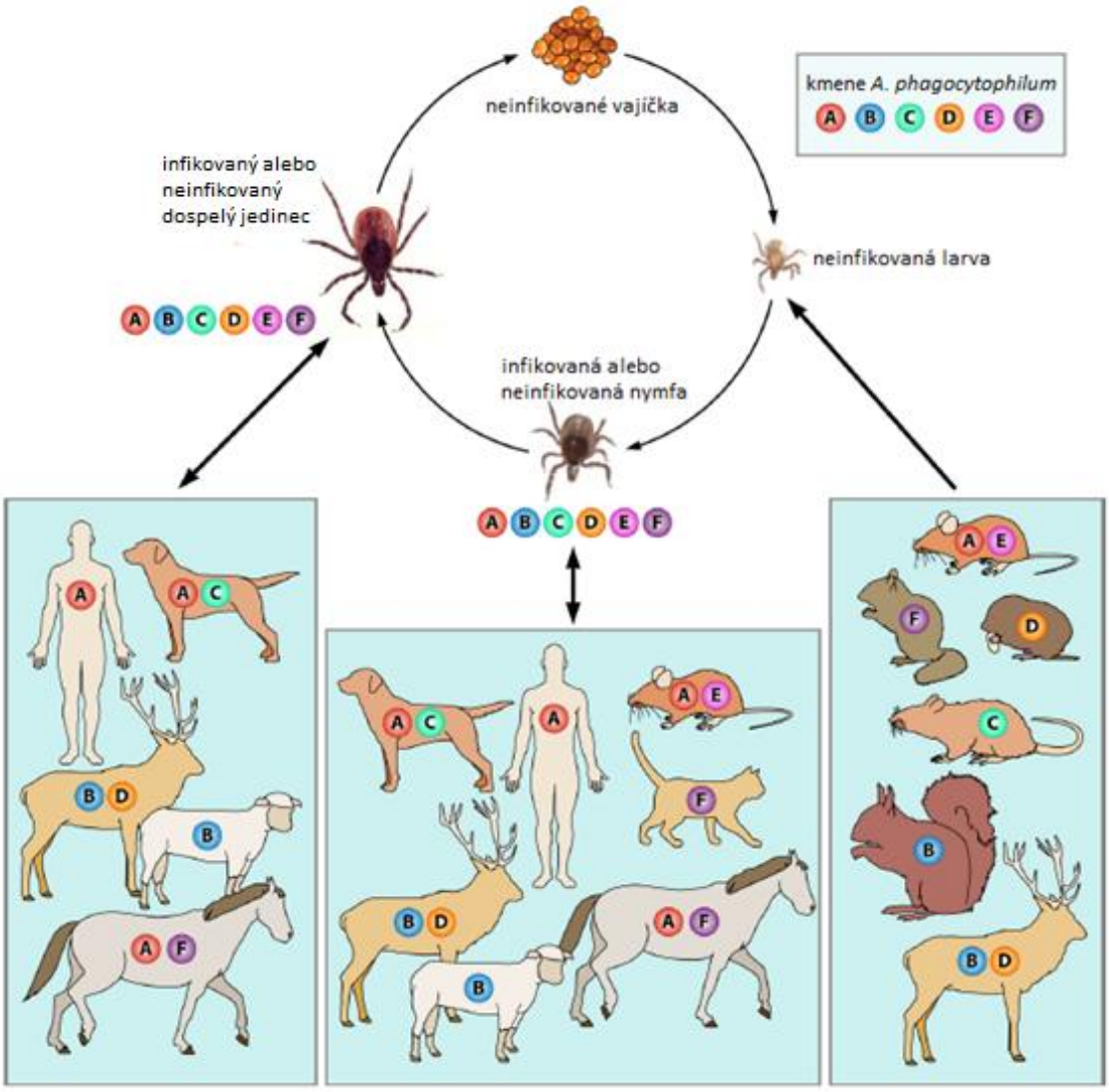
Obrázok 13. Mikroskopický pohľad na infikované neutrofily mačky baktériou *A. phagocytophilum*, tzv. moruly. Prevzaté od Adaszek *et al.* (2012).

1.4.1.2 Variabilita *A. phagocytophilum* a životný cyklus

Existuje viacero kmeňov *A. phagocytophilum* infikujúcich zvieratá alebo ľudí a ich náchylnosť na tieto kmene je rôzna (Rikihisa 2011). Prvé záznamy o variabilite genetických a patogénnych vlastnostiach a hostiteľských preferencií *A. phagocytophilum* pochádzajú zo severnej Ameriky. Za kompetentného rezervoára sa tam považovala myš *Peromyscus leucopus* Rafinesque, 1818. Následné štúdie však preukázali prítomnosť baktérie vo vzorkách krvi alebo tkanív z väčšieho počtu hlodavcov a hmyzožravcov (myši, hraboše, piskory), stredne veľkých (veveričky, mývali) a veľkých cicavcov (kone, jeleník bielochvostý). Sekvencia DNA 16S rRNA génu *A. phagocytophilum* amlifikovaného z kliešťov *I. scapularis* a z jeleníka bielochvostého (*Odocoileus virginianus* Zimmermann, 1780) ukázala, že nový genetický variant, AP-variant 1, sa líši od pôvodne opísaného variantu AP-ha. Tento nový variant nebol preukázaný u ľudí, a ľudský agens, variant AP-ha, nebol preukázaný u jeleníka bielochvostého (Karbowiak *et al.* 2016). Tento variant, AP-variant 1, môže taktiež infikovať kozy ale nie myši (Rikihisa 2011, Dugat *et al.* 2014, Karbowiak *et al.* 2016). Ďalším príkladom je kalifornský kmeň, ktorý je infekčný pre kone ale nie pre

prežúvavce (Rikihisa 2011). Variabilita tejto baktérie je aj medzi kontinentmi, čo podporujú aj experimentálne štúdie: americký kmeň infekčný pre kone nebol infekčný pre prežúvavce, zatiaľ čo európsky kmeň infekčný pre dobytok nebol infekčný pre kone (Dugat *et al.* 2014). V Európe je variabilita baktérie *A. phagocytophilum* omnoho väčšia ako v USA. Výskumy kliešťov *I. ricnus* v Európe na základe sekvencie 16S rRNA génu preukázali niekoľko rôznych variantov (Karbowiak *et al.* 2016). Podľa štúdie Jahfari *et al.* (2014) sa zistila prítomnosť štyroch ekotypov *A. phagocytophilum*. Štúdia sa robila zo vzoriek kliešťov *I. ricinus* z vegetácie a voľne žijúcich a domácich zvierat v Holandsku a Belgicku na základe sekvencie groEl génu. Ďalšie sekvencie z Európy sa získali z GenBank a sekvencie od ľudí boli získané pomocou literatúry. Ekotyp I mal najširší rozsah hostiteľov a najvyšší počet bol zistený zo zvierat: jež, jeleň lesný, kone, ľudia, ovce a kozy, muflón, psy a dobytok. Ekotyp II bol zistený zo srnca lesného, ekotyp III sa nachádzal v hlodavcoch a ekotyp IV sa vyskytoval u vtákov (Jahfari *et al.* 2014) Dôvodom tejto variability je schopnosť *I. ricinus* parazitovať na širokej škále hostiteľov (Karbowiak *et al.* 2016) a schopnosti baktérie infikovať široké spektrum hostiteľov. *Anaplasma phagocytophilum* sa považuje za jediný bakteriálny druh, ktorý dokáže infikovať toľko hostiteľov. Je pravdepodobné, že výskyt rôznych variantov závisí od štruktúry biotopu a výskytu rezervoárových hostiteľov (Stuen *et al.* 2013).

Životný cyklus *A. phagocytophilum* začína počas kŕmenia kliešťa na infikovanom hostiteľovi. Baktéria najprv napadne časť tráviaceho traktu kliešťa, kde sa uskutoční primárna replikácia. Potom sa presunie do jeho slinných žliaz a napadá epitelové bunky. Tam nastáva druhé delenie a baktéria prechádza do slín pri kŕmení kliešťa na ďalšom hostiteľovi (Kocan *et al.* 2015, Karbowiak *et al.* 2016). Tu nastáva prenos na hostiteľa v závislosti na jeho náchylnosť na konkrétny kmeň. Ľudia sú náchylní len na obmedzený počet kmeňov a nie sú hlavnými hostiteľmi (Rikihisa 2011). Prenos v kliešťovi je možný len transštadiálne teda z larvy na nymfu alebo z nymfy na dospelého jedinca, transovariálny prenos nebol dokázaný (Rikihisa 2011, Kocan *et al.* 2015, Karbowiak *et al.* 2016) (Obr. 14).



Obrázok 14. Životný cyklus *Anaplasma phagocytophilum* v kliešťoch *Ixodes* spp. s rôznymi kmeňmi. Prevzaté a upravené podľa Rikihisa (2011).

1.4.1.3 Ekológia

Dôležitými vektormi baktérie *A. phagocytophilum* sú kliešte rodu *Ixodes*. V Amerike je hlavným vektorom kliešť *I. scapularis* Say, 1821 na východe a v strede USA a *I. pacificus* Cooley & Kohls, 1943 na západe USA (Keesing *et al.* 2012). V Ázii a Rusku je hlavným vektorom *I. persulcatus* (Schulze, 1930) (Dugat 2014, Yang *et al.* 2016) a v Európe *I. ricinus* (Jin *et al.* 2012, Farkas *et al.* 2014, Ayllón *et al.* 2015, Karbowiak *et al.* 2016). V Európe sa okrem spomínaného vektora vyskytovala táto baktéria aj v kliešťoch *I. trianguliceps* Birula, 1895 a *D. reticulatus* (Karbowiak *et al.* 2016) a spájaná bola aj s inými druhmi ako *H. punctata* a *R. sanguineus* (Stuen 2007). Ich epidemiologický význam je však zanedbateľný (Karbowiak *et al.* 2016, Stuen 2007).

Miera infekcie baktériou *A. phagocytophilum* je zvyčajne vyššia u dospelých jedincov než u nýmf, a taktiež u samičiek než u samcov. Na základe údajov z rôznych európskych krajín sú samičky infikované častejšie než nymfy a samce, čo naznačuje významnú úlohu samičiek pri prenose patogénu na hostiteľa (Karbowiak *et al.* 2016). Prenos baktérie v kliešťovi je možný len transštadiálne, preto sú rezervoároví hostitelia rozhodujúci pre udržanie a cirkuláciu patogéna v prírode (Víchová *et al.* 2014, Härtwig *et al.* 2014, Chastagner *et al.* 2017). Nymfy sú prvým vývojovým štádiom, ktorý môže prenášať baktériu na hostiteľa (Chastagner *et al.* 2017). Patogén dokáže v kliešťovi prežiť viac ako rok, kým kliešť čaká na nového hostiteľa. Co-feeding prenos patogéna z infikovaného kliešťa na neinfikovaného, kŕmiaceho sa na tom istom hostiteľovi, nebol preukázaný (Karbowiak *et al.* 2016).

Cyklus *A. phagocytophilum* v prírode závisí od prítomnosti rezervoárových hostiteľov, ktorými sú najčastejšie drobné cicavce alebo jeleňovité. Avšak, baktéria má široký rozsah hostiteľov, ktorý sa zhoduje s rozsiahlym rozšírením jej vektorov, *Ixodes* spp. V Európe je *A. phagocytophilum* významným patogénom malých prežúvavcov, najmä oviec. Medzi ďalších hostiteľov patria kozy, hovädzí dobytok, kone, psy, mačky, srnce, soby a ľudia. Genetické varianty tohto patogéna sa líšia v závislosti od hostiteľa a geografickej polohy. Závažnosť a vývoj klinického ochorenia spôsobeného daným genetickým variantom závisí od kombinácie hostiteľ/variant (Severo *et al.* 2015). Ďalším faktorom môže byť pretrvávanie infekcie u hostiteľov ako nosičov infekcie, ktoré závisí od jednotlivých genetických variantov *A. phagocytophilum* a hostiteľov. Pretrvávanie infekcie bolo zistené napr. u oviec, psov, hovädzieho dobytka a jeleňovitých. Pohyb takýchto zvierat ako nosičov môže prispievať k rozšíreniu ochorenia do nových geografických oblastí (Stuen 2007).

Prenos *A. phagocytophilum* je možný aj prostredníctvom krvnej transfúzie. Potvrdený ľudský prípad transfúziou bol v USA v Minnesote. Prenos je možný aj transplacentárne, ktorý sa potvrdil u ľudí a hovädzieho dobytka (Little 2010). Hlásený bol aj prípad troch mužov s infekciou, ktorí si neboli vedomí uhryznutia kliešťom ani práce v prírode. Avšak všetci traja sa dostali do kontaktu s jeleňou krvou, ktorá mohla spôsobiť prenos infekcie, hoci sa to nedalo definitívne dokázať ako priamy zdroj infekcie (Bakken *et al.* 1996, Little 2010).

1.4.1.4 Ochorenia s dôrazom na domáce zvieratá

1.4.1.4.1 Anaplazmóza psov a mačiek

Anaplazmóza psov je významné veterinárne kliešťami prenášané ochorenie s celosvetovou distribúciou (Sainz *et al.* 2015). Prvý prípad tohto ochorenia bol potvrdený okolo roku 1980 u psa z Kalifornie (Little 2010), kedy bol spájaný s druhom baktérie *Ehrlichia canis*. Vylepšené molekulárne techniky však ukázali, že ide o fylogeneticky iný druh baktérie preklasifikovaný do rodu *Anaplasma* (Sainz *et al.* 2015). Prípady granulocytárnej anaplazmózy v severnej Amerike boli hlásené zo štátov Kalifornie, Washingtonu, Illinois, Minnesoty, Wisconsinu, Missouri a Britskej Kolumbie. Dôkazy o možnom kontakte psov s baktériou *A. phagocytophilum* boli zistené najmenej v 39 štátoch USA (Carrade *et al.* 2009). Hlásená bola aj z Kanady a južnej Ameriky (Rikihisa 2011). V Európe bola prítomnosť infekcie psov touto baktériou opísaná hlavne zo severnej a strednej Európy (Sainz *et al.* 2015).

Inkubačná doba ochorenia trvá 1 až 2 týždne (Sainz *et al.* 2015). Infikované psy však často bývajú bez závažných klinických prejavov a doposiaľ neboli hlásené žiadne prípady úmrtnosti (Carrade *et al.* 2009). V prípade klinických príznakov, medzi najčastejšie patrí letargia, nechutenstvo a s tým súvisiaca anorexia a horúčka. Ďalšími príznakmi môžu byť bledé sliznice, zvracanie alebo hnačka. Môžu sa vyskytnúť zväčšené lymfatické uzliny a povrchové krvácanie. Medzi zriedkavé príznaky patrí kolaps, mierny kašeľ, opuchy končatín a nadmerný smäd (Sainz *et al.* 2015). Anaplazmóza psov je liečená doxycyklínom počas dvoch týždňov. Klinické zlepšenie vo väčšine prípadov psy vykazujú do 24 – 48 hodín od začatia liečby (Carrade *et al.* 2009).

Granulocytárna anaplazmóza mačiek je menej častá v porovnaní so psami. Napriek tomu sa prípady čoraz viac vyskytujú v Spojených štátoch a Európe (Rikihisa 2011). Experimentálne bola dokázaná náchylnosť mačiek na infekciu *A. phagocytophilum* (Gorna *et al.* 2013). Prvý potvrdený prípad infekcie u mačky bol vo Švédsku v roku 1999 (Bjöersdorff *et al.* 1999, Galemore *et al.* 2017) a zo severnej Ameriky v roku 2004 (Lappin *et al.* 2004, Billeter *et al.* 2007). V Európe boli hlásené ďalšie prípady ochorenia domácich mačiek z Talianska, Švajčiarska (Gorna *et al.* 2013), z Fínska (Heikkilä *et al.* 2010, Gorna *et al.* 2013) a Poľska (Adaszek *et al.* 2012). Medzi klinické prejavy patrí horúčka, letargia a anorexia (Little 2010).

1.4.1.4.2 Anaplazmóza koní

Granulocytárna anaplazmóza koní je významné kliešťami prenášané ochorenie (Saleem *et al.* 2018). Pôvodne sa za etiologický agens považovala baktéria *Ehrlichia equi* a ochorenie sa označovalo ako granulocytárna ehrlichióza koní. Neskôr sa na základe sekvencie DNA tento druh zaradil ako *A. phagocytophilum* (Lewis *et al.* 2009). Prvý prípad tohto ochorenia je z roku 1960 zo severnej Kalifornie. Z Európy boli hlásené prípady: v roku 1984 z Nemecka, v roku 1985 zo Švajčiarska a v roku 1990 zo Švédska. Ďalšími európskymi krajinami, kde sa toto ochorenie vyskytuje sú Veľká Británia, Denmark, Rakúsko, Česká republika, Holandsko, Francúszko, Taliansko, Poľsko (Dzięgiel *et al.* 2013, Jahn *et al.* 2010), a tiež Ukrajina, Španielsko a Slovensko. Z amerického kontinentu je hlásená z Kanady, USA a Guatemala. Taktiež sa vyskytuje v južnej Afrike, južnej Kórei, Pakistane a v Taiwane (Saleem *et al.* 2018).

Klinické príznaky garnulocytárnej anaplazmózy koní sa líšia v závislosti od veku zvieraťa a od trvania ochorenia (Lewis *et al.* 2009). Priebeh ochorenia môže byť subklinický alebo akútny. Inkubačná doba je zvyčajne 10 dní. Na začiatku ochorenia býva zviera apatické, oslabené a so zvýšenou teplotou. Neskôr sa objaví averzia k pohybu kvôli bolestivému opuchu kĺbov, čo môže byť sprevádzané krívaním (Dzięgiel *et al.* 2013, Butler *et al.* 2008). Kone mladšie ako jeden rok bývajú častejšie postihnuté ako staršie kone (Lewis *et al.* 2009). Priebeh ochorenia u jednoročných alebo mladších koní býva nezávažného charakteru, sprevádzaný nechutenstvom a averziou k pohybu (Dzięgiel *et al.* 2013). U koní od 1 do 3 rokov začína ochorenie horúčkou, depresiou, opuchom končatín a porušenou koordináciou pohybov (Lewis *et al.* 2009). Typický priebeh ochorenia sa pozoruje u koní starších ako 3 roky. Ďalšími príznakmi akútnej anaplazmózy je strata hmotnosti, krvácanie zo sliznice a zväčšené lymfatické uzliny (Dzięgiel *et al.* 2013). Príznaky ochorenia u neliečených koní sa môžu zhoršiť počas prvých troch až siedmych dní od nakazenia (Lewis *et al.* 2009).

Možnosti liečby *A. phagocytophilum* je obmedzená pretože ide o intracelulárneho patogéna. Najúčinnejšie látky proti anaplazmóze sú tetracyklíny. Náhradnou voľbou je liečba oxytetracyklínom, ktorý blokuje syntézu proteínov (Dzięgiel *et al.* 2013, Saleem *et al.* 2018).

1.4.1.4.3 Anaplazmóza domácich prežúvavcov

Anaplazmóza domácich prežúvavcov sa v Európe uznáva ako významné ochorenie viac ako 70 rokov. Ochorenie sa nazýva kliešťová horúčka oviec, kôz a hovädzieho dobytka (z angličtiny „Tick-Borne Fever"). Ochorenie bolo prvýkrát opísané v roku 1940, osem rokov po tom, čo sa choroba prvýkrát objavila v Škótsku. Neskôr bolo zistené, že ten istý patogén spôsobil toto ochorenie u oviec a dobytka v iných častiach Spojeného kráľovstva, Írska, Škandinávie a iných častí Európy, zahŕňajúc Holandsko, Rakúsko, Švajčiarsko, Španielsko a Francúzsko (Woldehiwet 2006, Woldehiwet 2010). Napriek tomu, že existujú dôkazy o prítomnosti patogéna po celom svete, kliešťová horúčka prežúvavcov s klinickými príznakmi mimo Európy nebola hlásená (Granquist 2016). Dôvodom môže byť odlišné riadenie pastvy, nevedomosť alebo nedostatok diagnostických nástrojov, hostiteľské druhy, plemená a genetické varianty patogéna (Stuen 2016).

Inkubačná doba ochorenia býva zvyčajne medzi 3 a 14 dňami. Infekcia môže byť subklinická, mierna až závažná. Samotná infekcia nie je smrteľná ale môže zhoršiť zdravotný stav sekundárnymi infekciami. Ochorenie môže obmedziť schopnosť organizmu reagovať na podnet tvorbou protilátok, čo môže spôsobiť, že infikované zviera je citlivé na sekundárne infekcie, ako napríklad *Saphylococcus* spp., *Bibersteinia trehalosi* alebo *Mannheimia haemolytica*. Najvýraznejším príznakom ochorenia je horúčka, ktorá môže stúpnuť až na 42 ^{o}C. Jej priebeh sa však môže líšiť v závislosti od veku zvieraťa, jeho imunologického stavu a variantu baktérie (Stuen 2013, Stuen 2016, Granquist 2016). Počas vrcholu infekcie môže byť napadnutých až 90 % granulocytov a pozoruje sa výrazná neutropénia (Granquist 2016, Woldehiwet 2010). Ochorenie môže taktiež spôsobiť potrat a zníženú produkciu mlieka u samíc. U samcov môže byť zhoršená tvorba pohlavných buniek a u mladých zvierat znížený hmotnostný prírastok (Stuen 2013, Granquist 2016).

Ochorenie sa lieči tetracyklínom, avšak liečba musí byť dlhšia ako päť dní. Alternatívnou liečbou v prípade zvierat intolerantných na tetracyklín sú chinolónové antibiotiká a rifampín (Stuen 2016, Granquist 2016).

Dôležitým aspektom tejto baktérie u prežúvavcoch je jej možnosť spôsobiť perzistentnú infekciu niekoľko mesiacov alebo dokonca rokov. Preto existuje možnosť prenosu infekcie z jednej sezóny do druhej alebo predajom nakazeného zvieraťa do iných geografických oblastí (Woldehiwet 2006, Woldehiwet 2010, Stuen 2016).

1.4.2 *Babesia* spp.

1.4.2.1 Systematické zaradenie a všeobecná charakteristika

Babézie sú protozoárne parazity, ktoré sa systematicky zaraďujú do kmeňa Apicomplexa triedy Piroplasmida, čeľade Babesiidae a rodu *Babesia* (Homer *et al.* 2000, Dantas-Torres *et al.* 2017). Opísaných bolo viac ako 100 druhov, napriek tomu existuje podozrenie, že mnoho z týchto druhov môže byť podobných alebo identických (Homer *et al.* 2000). Piroplasmida sú charakteristické ich intraerytrocitickou formou, ktorá má hruškovitý tvar (Obr. 15), apikálnym orgánom, nepohlavným rozmnožovaním v hostiteľovi – stavovcovi a pohlavným rozmnožovaním v kliešťoch (Homer *et al.* 2000). Podľa veľkosti merozoitov sa babézie rozdeľujú na tzv. „veľké babézie", ktorých veľkosť je od 2,5 – 5,0 μm, a tzv. „malé babézie", ktorých veľkosť je od 1,0 – 2,5 μm (Dantas-Torres *et al.* 2017).

Babézie sú kliešťami prenášané parazity červených krviniek, ktoré napádajú domáce a divé zvieratá a taktiež ľudí. Na konci 19. storočia Dr. Victor Babes idendtifikoval prítomnosť organizmu v erytrocytoch dobytka v Rumunsku, ako pôvodcu bovínnej hemoglobinúrie alebo ochorenia „red water fever". Neskôr sa našli podobné organizmy v krvinkách oviec a boli nazvané *Babesia bovis* Babes, 1888 a *Babesia ovis* (Solano-Gallego & Baneth 2011). V tom istom roku, Smith a Kilbourne (1893) identifikovali pôvodcu texaskej horúčky dobytka („Texas cattle fever") v Spojených štátoch a nazvali ho *Pyrosoma bigeminum*, neskôr premenovaného na *Babesia* (Uilenberg 2006, Dantas-Torres *et al.* 2017).

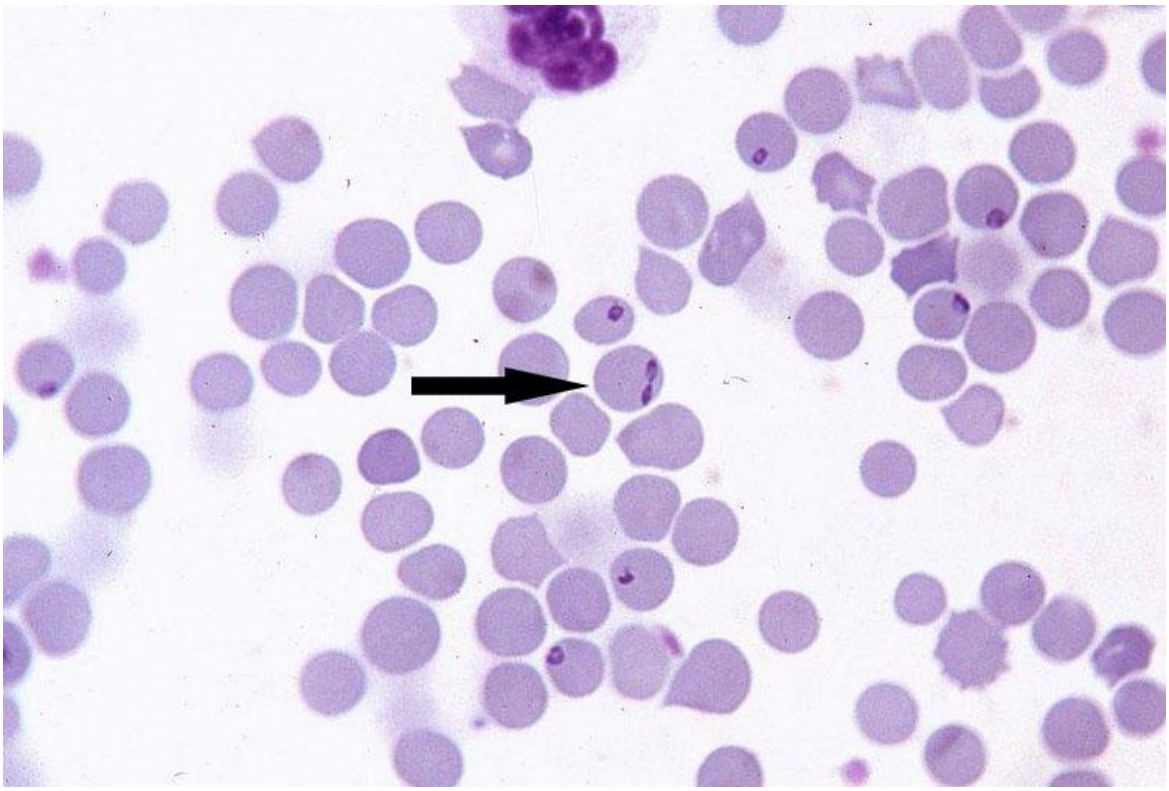
Babézie patria k jedným z najvýznamnejších hemoparazitov po celom svete, ktoré napádajú široké spektrum cicavčích hostiteľov a niektoré druhy vtákov. Ľudia nepatria medzi ich prirodzených hostiteľov ale môžu slúžiť ako náhodný hostitelia (Yabsley & Shock 2013). Hoci ľudia slúžia ako náhodný hostitelia, ľudská babezióza je celosvetovo vynárajúce sa zoonotické ochorenie (Gray *et al.* 2010).

Prvý prípad ľudskej babeziózy v Európe bol hlásený z Chorvátska v roku 1957. Odvtedy počet prípadov rapídne vzrástol (Yabsley & Shock 2013). V Európe boli hlásené prípady spôsobené *B. divergens* alebo druhmi podobným *B. divergens* z Juhoslávie, Francúzska, Veľkej Británie, Írska, Portugalska, Španielska, Švédska, Švajčiarska. Ďalšie prípady boli spôsobené *B. venatorum* (EU1) z Rakúska, Talianska a Nemecka (Gray *et al.* 2010).

V USA je ľudská babezióza spôsobená druhmi podobným *B. divergens* a druhom *B. microti* (França, 1912), ktorého prirodzeným hostiteľom sú hlodavce z čeľade hrabošovité (Arvicolinae) (Gray *et al.* 2010). Prvý prípad ľudskej babeziózy zo severnej Ameriky bol hlásený v roku 1966 z Kalifornie. Pôvodca nebol identifikovaný ale podobný bol druhu

B. duncani alebo *Babesia* sp. CA-type. V roku 1969 bol hlásený prípad z Massachusetts spôsobený druhom *B. microti* (Yabsley & Shock 2013).

Hlavnými prenášačmi *Babesia* spp. sú kliešte z čeľade Ixodidae. Jediným druhom kliešťa, ktorý nepatrí do tejto čeľade a je schopný prenášať tohto parazita je druh *Ornithodoros erraticus* Clifford, Kohls, & Sonenshine, 1964. Patrí do čeľade Argasidae a prenáša druh *Babesia meri* (Homer *et al.* 2000).



Obrázok 15. Mikroskopický pohľad červených krviniek napadnutých *Babesia divergens*. Prevzaté z (Fotografia: Alan R Walker, https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/11/Babesia-divergens.jpg citované dňa 24.04.20)

1.4.2.2 Životný cyklus

Životný cyklus babézií vo všeobecnosti zahŕňa tri fázy reprodukcie. Prvou fázou je gamogónia, ktorá predstavuje tvorbu a splynutie gamét vo vnútri čreva kliešťa. Druhou fázou je sporogónia, pri ktorej dochádza k nepohlavnému rozmnožovaniu v slinných žľazách kliešťa a treťou fázou je merogónia, nepohlavné rozmnožovanie v hostiteľovi (stavovec) (Homer *et al.* 2000) (Obr. 16).

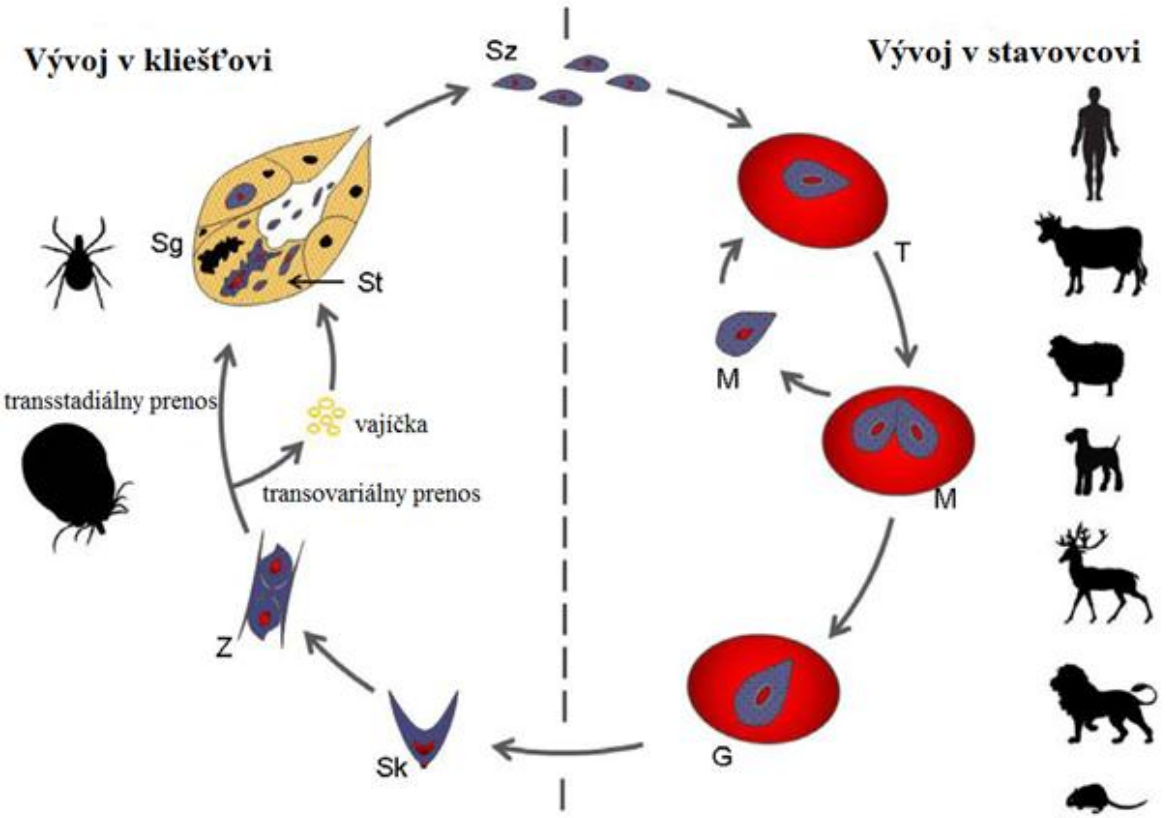
Gamogónia. Sexuálne rozmnožovanie tvorbou gametocytov začína v krvnom riečisku hostiteľa (stavovec). Po požití infikovaných červených krviniek počas kŕmenia kliešťom, gamogónia pokračuje v kliešťovi. Gametocyty smerujú do čreva kliešťa, kde sa viac-

násobne delia procesom schizogónie a menia na gaméty. Na základe morfologickej stavby gamét dostali názov „Strahlenkörper" alebo „ spiky-rayed bodies". Nastáva splynutie gamét a tvorba pohyblivej zygoty – ookineta, ktorá vstupuje do črevných epitelových buniek kliešťa a cez hemolymfu sa presúva do slinných žliaz (Homer *et al.* 2000, Jalovecká *et al.* 2019). Kinety, ktoré sa vyvíjajú v kliešťových bunkách nie sú infekčné pre hostiteľa/stavovca na rozdiel od sporozoitov vytvorených sporogóniou v slinných žľazách kliešťa, ktoré sú infekčné len pre hostiteľa/stavovca (Young & Morzaria 1986).

Sporogónia. Vývoj sporozoitov v slinných žľazách je možne rozdeliť do troch krokov. Parazit najprv napáda hostiteľskú bunku a vytvára sporoblast. V druhom kroku sa sporoblast aktivuje pri opätovnom kŕmení kliešťa. V poslednom kroku zrelé sporozoity migrujú do hostiteľskej bunky (Homer *et al.* 2000, Jalovecká *et al.* 2019).

Merogónia. Počas merogónie dochádza k množeniu merozoitov v červených krvinkách hostiteľa (stavovec). Sporozoity migrujú do krvného obehu hostiteľa počas kŕmenia infikovaného kliešťa a menia sa na trofozoity. Dochádza k nepohlavnému rozmnožovaniu a k produkcii merozoitov (Jalovecká *et al.* 2019). Po rozpade červenej krvinky, merozoity prenikajú do ďalších (Chauvin *et al.* 2009).

V kliešťoch sa babézie môžu prenášať transovariálne a/alebo transštadiálne. Pri transovariálnom prenose sa babézie prenášajú zo samičky na potomstvo. Tento prenos je známy aj ako vertikály prenos. Kliešte získajú primárne infekciu pri kŕmení na infikovanom hostiteľovi. Po komplikovanom životnom cykle parazita v kliešťovi nastáva vývin infekčného štádia, sporozoit, v potomstve kliešťa. Parazit sa môže udržiavať v kliešťoch niekoľko generácií bez toho aby sa kliešť musel znova kŕmiť na infikovanom hostiteľovi. Pri transštadiálnom prenose, larvy alebo nymfy získajú infekciu počas kŕmenia na infikovanom hostiteľovi. Sporozoity sa prenášajú do ďalšieho vývojového štádia, buď z larvy na nymfu alebo z nymfy na dospelého jedinca. Do vajíčok sa infekcia neprenáša a nová generácia nie je infekčná (Young & Morzaria 1986).



Obrázok 16. Životný cyklus *Babesia* spp. Sz – sporozoit, T- trofozoit, M – merozoit, merogónia, G – gametocyt, Sk – gaméty, proces gamogónie a vznik Z – zygota, transštadiálny a/alebo tarnsovariálny prenos, Sg – sporogónia v slinných žľazách kliešťa, St – sporoblast. Prevzaté a upravené podľa Schnittger *et al.* (2012).

1.4.2.3 Ekológia

Babézie môžeme zaradiť ako druhé po trypanozómach v ich rozšírení a v schopnosti napádať rôznych hostiteľov. Spravidla majú dve triedy hostiteľov a to hostiteľa – stavovec a hostiteľa – kliešť. Udržanie druhu *Babesia* spp. je závislá od oboch hostiteľov, kde špecifický vektor sa musí kŕmiť na vhodnom rezervoárovom hostiteľovi, ktorý je schopný udržiavať patogéna (Homer *et al.* 2000). Babézie sú hemoprotozoánne celosvetovo rozšírené, kliešťami prenášané parazity napádajúce hlavne cicavce. Ich úspech spočíva vo veľkom počte opísaných druhov. V životnom cykle striedajú fázy nepohlavného rozmnožovania v červených krvinkách stavovcov, pohlavného rozmnožovanie v kliešťovi a produkciu sporozoitov v slinných žľazách kliešťa, čo znamená, že sú špecifický prispôsobené na svojho kliešťového vektora. Ide o komplexný systém, ktorý ako prvé predstavuje kontakt medzi kliešťom a jeho hostiteľom, v trvaní od dvoch dní do dvoch týždňov v závislosti od vývojového štádia a druhu kliešťa. Ďalej je to štádium sporozoita v slinných žľazách kliešťa, kde babézie môžu asymptomaticky pretrvávať vo svojom hostiteľovi niekoľko rokov

a možný transovariálny alebo transštadiálny prenos v kliešťovi cez niekoľko generácií kliešťov (Chauvin *et al.* 2009).

Vektory *Babesia* spp. sa vyskytujú v tropických, stredomorských a holoarktických oblastiach. V niektorých prípadoch je rozšírenie vektora rozsiahlejšie ako rozšírenie príslušnej babeziózy, ale aj naopak Ide napríklad o druh kliešťa *I. scapularis* a *B. microti*., alebo *B. gibsoni*, pôvodca psej babeziózy, ktorý má väčší areál rozšírenia než jeho vektor *Haemaphysalis longicornis* Neumann, 1901, pravdepodobne z dôvodu ďalšieho vektora *R. sanguineus* alebo priameho prenosu patogénu medzi bojovými plemenami psov. Jednohostiteľské kliešte patriace do rodu *Rhipicephalus*, podrodu *Boophilus*, prenášajú rôzne druhy babézií. Rozšírené sú najmä v Ázii ale taktiež v stredenej a južnej Amerike, v časti Afriky a Austrálii. V mediteránnej oblasti sú najvýznamnejšími prenášačmi *Rhipicephalus bursa* Canestrini & Fanzago, 1878, *R. sanguineus, Hyalomma marginatum* Koch, 1844, prenášajúce patogény *Babesia* spp. na malé prežúvavce, kone a psy a *H. punctata*, ktorý sa vyskytuje aj v častiach stredného a západného Palearktu, prenášajúci nepatogénny druh *B. major* na hovädzí dobytok. V miernom pásme je navýznamnejším vektorom *I. ricinus*, prenášajúci druhy babézií na hovädzí dobytok a ľudí. V USA a Kanade je hlavným vektorom *I. scapularis* prenášajúci patogéna ľudskej babeziózy *B. microti* (Gray *et al.* 2019).

Medzi hostiteľov patrí mnoho druhov cicavcov, ktoré sú najčastejšie hlodavce, a niekoľko druhov vtákov. Takmer každý cicavec, ktorý slúži ako hostiteľ pre infikovaného kliešťa, je potenciálnym rezervoárom. Najväčší rozsah hostiteľov majú druhy *B. microti* a *B. divergens*. Od najmenších cicavcov až po ľudí napáda druh *B. microti* a od hovädzieho dobytka, rôzne druhy hlodavcov až po ľudí napáda druh *B. divergens* (Homer *et al.* 2000).

Hovädzí dobytok je hostiteľom pre ekonomicky najvýznamnejšie druhy babézií, *B. bovis, B. bigemina* a *B. divergens*. Prvé dva druhy sa vyskytujú v tropických a subtropických oblastiach a ich vektormi sú kliešte rodu *Rhipicephalus* a podrodu *Boophilus*. V Európe sa vyskytuje *B. divergens,* ktorého vektorom je *I. ricinus* (Schnittger *et al.* 2012). Malé prežúvavce sú hostiteľmi druhov *B. ovis*, prenášaná kliešťom *R. bursa*, a *B. motasi* prenášaná kliešťami rodu *Haemaphysalis*. *B. motasi* pozostáva z dvoch poddruhov s rozličnou patogenitou, nižšou v severnej Európe a s vyššou v južnej Európe a Sterdomorskej oblasti (Uilenberg 2006).

Kone slúžia ako hostitelia pre druh *B. caballi* (Nuttall & Strickland, 1910), ktorého prenášajú kliešte rodu *Hyalomma, Dermacentor* a *Rhipicephalus* (Uilenberg 2006, Schnittger *et al.* 2012).

Psy sú hostiteľmi pre rôzne druhy babézií. Medzi najvýznamnejšie druhy patrí *B. vogeli*, prenášaná kliešťom *R. sanguineus*, ktorý sa vyskytuje v tropických a subtropických oblastiach ale taktiež v chladnejších oblastiach. *Babesia canis* (Piana & Galli-Valerio, 1895), prenášaná kliešťami rodu *Dermacentor* v Európe, *B. rossi*, prenášaná kliešťami rodu *Haemaphysalis*, nachádzajúcich sa hlavne v južnej Afrike, *B. conradae* v USA, ktorého vektor nie je určený a *B. gibsoni*, prenášaná druhom *H. longicornis* v Ázií. Mačky sú hostiteľmi najmä pre druh *B. felis*, ktorého vektor nie je známy (Schnittger *et al.* 2012).

Prenos babézií je možný aj prostredníctvom krvnej transfúzie. Prvý prípad takéhoto prenosu bol v USA v roku 1979 (Villatoro & Karp 2019). V severnej Amerike je babezióza najčastejším ochorením prenášaným krvnou transfúziou. Ďalšou možnosťou prenosu je transplacentárny prenos *B. microti* hlásený zo severovýchodu USA (Yabsley & Shock 2013).

1.4.2.4 Ochorenia s dôrazom na domáce zvieratá

1.4.2.4.1 Babezióza psov a mačiek

Babezióza psov je jedno z veterinárne najvýznamnejších a celosvetovo rozšírených kliešťami prenášaných ochorení. Existuje až 12 druhov babézií, ktoré sú schopné infikovať psov (Víchová *et al.* 2015). Morfologicky sa babézie infikujúce psov delili na malé (*B. gibsoni*) a veľké druhy babézií (*B. canis*). Avšak na základe molekulárnych metód sa zistilo, že psy infikuje viac druhov piroplasiem, a to *B. conradae*, ktorá patrí medzi malé babézie, babézie podobné *B. microti*, ktorá sa označovala aj ako *Theileria annaei* a nesôr bola opísaná ako nový druh *Babesia vulpes* (Baneth *et al.* 2015), a doteraz nepomenované veľké formy *Babesia* spp. (Solano-Gallego & Baneth 2011). Druhy *B. rossi, B. canis* a *B. vogeli*, ktoré sú morfologicky identické sa považovali za poddruhy *B. canis*. Avšak na základe ich geografického rozšírenia, vektorovej špecifickosti, genetických vlastnostiach a príznakov ochorenia, ktoré vykazujú obrovské rozdiely sa tieto druhy v súčasnosti považujú za samostatné (Solano-Gallego & Baneth 2011, Solano-Gallego *et al.* 2016).

Babesia vogeli má celosvetovú distribúciu v tropických a subtropických oblastiach, *B. canis* sa nachádza v Európe, *B. rossi* v Afrike, *B. gibsoni* v Ázií a *B. conradae* v USA (Irwin 2009). V roku 2000 Zahler *et al.* objavili nový druh napádajúci psy, ktorý patrí medzi malé babézie, druh podobný *B. microti*, nazvaný *B. vulpes* a opísaný zo severného Španielska. Nájdený bol aj v iných častiach Európy a severnej Ameriky (Zahler *et al.* 2000, Baneth 2018). Nedávno bol v severnej Karolíne opísaný nový druh patriaci medzi veľké

babézie, *Babesia* sp. (*Coco*), ktorý dostal meno po psovi, ktorý bol babéziou napadnutý (Birkenheuer *et al.* 2004, Matijatko *et al.* 2012, Beugnet & Moreau 2015, Baneth 2018) (Tab. 1).

Prvý prípad babeziózy psov bol hlásený z južnej Afriky v roku 1893 (Beugnet & Moreau 2015). Prvý prípad babeziózy psov na Slovensku bol v roku 2000, kedy do košickej kliniky priniesli 1,5 ročného psa Sibírskeho huskyho s apatiou, stratou chuti do jedla a tmavým močom (Chandoga *et al.* 2002). Prvý potvrdený prípad *B. gibsoni* na Slovensku bol v roku 2013. Na veterinárnu kliniku v Bratislave bol prinesený 3-ročný pes miešanca pit bull teriéra, ktorý mal prítomnosť hemoglobínu v moči a podanú následnú transfúziu krvi na inej klinike. O pár mesiacov prišiel ten istý majiteľ s druhým 2-ročným pitbull teriérom, ktorý bol ospalý a slabý. Molekulárna analýza potvrdila 100 % identitu patogéna z oboch psov a na základe BLAST analýzy sa zistilo, že ide o druh *B. gibsoni*. Avšak na Slovensku sa vektor tohto druhu *R. sanguineus* nenachádza. Dôvodom nákazy bolo zrejme cestovanie so psami na výstavy, kde sa mohli stretnúť s inými psami, ktorí sa nachádzali v endemických oblastiach (Víchová *et al.* 2015).

Prenos babeziózy psov je možný transfúziou krvi alebo prostredníctvom krvi z infikovaného psa na neinfikovaného. Prenos bol preukázaný u druhov *B. canis* a *B. gibsoni*. Prenos z jedného psa na druhého prostredníctvom uhryznutia je pravdepodobný pre druh *B. gibsoni* a vyskytuje sa predovšetkým u bojovných plemien ako je Pit Bull teriér a pri plemene Tosa (Baneth 2018).

Príznaky babeziózy psov sa pohybujú od subklinických až po hyperakútne. Priebeh ochorenia závisí od druhu patogéna, imunitnej odpovedi hostiteľa, veku hostiteľa, prítomnosti súbežných infekcií a od predchádzajúceho stavu organizmu. Príznakom spoločným pre malé aj veľké babézie je hemolytická anémia (Boozer & Macintire 2003). Babezióza spôsobená druhom *B. rossi* je sprevádzaná horúčkou, dehydratáciou, letargiou, anorexiou. Medzi závažné život ohrozujúce príznaky patrí napríklad zlyhanie obličiek a zastáva tvorby moču, nízky krvný tlak, syndróm akútnej dychovej tiesne, zápal pankreasu a iné. *Babesia vogeli* spôsobuje mierne až stredne závažne ochorenie. Najbežnejšie sa vyskytuje anémia a nedostatok krvných doštičiek. (Baneth 2018). Pri *B. canis* sa vyskytuje dehydratácia, letargia, anorexia, horúčka, strata krvných doštičiek, ťažká anémia, rozpad červených krviniek alebo neutropénia charakteristická nízkym počtom neutrofilov. Pri *B. gibsoni* sa vyskytuje anémia, horúčka, letargia, zväčšená slezina alebo zväčšená pečeň (Boozer & Macintire 2003, Baneth 2018). Pre *B. conradae* bola opísaná väčšia virulencia než pre *B. gibsoni*, ktorá vedie k vyššej parazitémií, výraznejšej anémií a k vyššej úmrtnosti. *Babe-*

sia vulpes zahŕňa príznaky ako horúčka, letargia, slabosť, zvýšená hladina močoviny a tmavý moč (Baneth 2018).

Na liečbu ochorení spôsobených veľkými druhmi babézií sa zvyčajne používa imidocarb dipropinát v dávke 5 – 6 mg na kilogram hmotnosti psa s opakovanou dávkou o 14 dní. *Babesia gibsoni* a *B. conradae* sú často rezistentné na toto liečivo preto sa pre tieto malé babézie podáva kombinácia liekov antimalarík Atovaquon v množstve 13,5 mg na kilogram hmotnosti s antibiotikom Azitromycín v množstve 10 mg na kilogram hmotnosti každých 8 hodín počas 10 dní (Baneth 2018).

Tabuľka 1. Rozšírenie, vektor, veľkosť a druh babézií infikujúcich psov. Prevzaté od Baneth 2018.

Druh	Geografické rozšírenie	Potenciálny alebo potvrdený vektor	Veľkosť
B. rossi	Južná Afrika, Nigéria, Sudán	*H. elliptica, H. leachi*	2 x 5 µm (veľká forma)
B. canis	Európa	*D. reticulatus*	2 x 5 µm (veľká forma)
B. vogeli	Afrika, Ázia, Európa, severná, stredná a južná Amerika, Austrália	*R. sanguineus* s.l.	2,5 x 4,5 µm (veľká forma)
***Babesia* sp. (Coco)**	Východná časť USA	Neznámy	2 x 6 µm (veľká forma)
B. gibsoni	Juhovýchodná Ázia, USA, Austrália, Európa	*H. longicornis, H. bispinosa*?, *R. sanguineus*?	1 x 3 µm (malá forma
B. conradae	USA (Kalifornia)	*R. sanguineus* s.l.?	0,3 x 3 µm (malá forma)
***B. vulpes* (*Babesia* podobná *B. microti, Theileria annae*)**	Európa, severná Amerika	*D. reticulatus*?, *I. hexagonus*?, *I. ricinus*?, *I. canisuga*?, *R. sanguineus* s.l.?	1 x 2,5 µm (malá forma)

Babezióza domácich mačiek je ochorenie, ktoré je endemické v južnej Afrike ale vyskytuje sa aj v Európe, Ázií a iných častiach Afriky. Medzi druhy napádajúce domáce mačky patrí *B. felis*, *B. cati*, babézie podobné *B. microti*, *B. canis* subsp. *presentii* a *B. canis* subsp. *canis* (Ayoob *et al.* 2010) (tab. 2).

Prvý prípad ochorenia bol hlásený z južnej Afriky v roku 1937, spôsobený druhom *B. felis*. V Európe bol hlásený prvý prípad v roku 1992 z Francúzska (Penzhorn & Oosthuizen 2020).

Príznaky ochorenia sú zdokumentované len pre druh *B. felis* z dôvodu malého počtu vedeckých správ o iných druhoch infikujúcich domáce mačky. Forma ochorenia môže byť akútna, komplikovaná a chronická (Ayoob *et al.* 2010). Na rozdiel od iných babezióz domácich zvierat, babezióza mačiek nie je sprevádzaná horúčkou (Penzhorn *et al.* 2004). Medzi typické príznaky patrí strata hmotnosti a stým súvisiaca anorexia a anémia (Penzhorn *et al.* 2004, Kumar *et al.* 2008).

Na liečbu sú podávané antimalariká v množstve 1 mg každých 36 hodín štyrikrát a potom 1 mg každých 7 dní taktiež štyrikrát (Kumar *et al.* 2008, Ayoob *et al.* 2010).

Tabuľka 2. Rozšírenie, vektor, veľkosť a druh babézií infikujúcich domáce mačky. Prevzaté od Ayoob *et al.* (2010).

Druh	Geografická rozšírenie	Vektor	Veľkosť
B. felis	Afrika, južná Ázia, Európa, India	Neznámy	0,9 x 0,7 (malá forma)
B. cati	India	Neznámy	1 x 1,5 (malá forma)
babézie podobné *B. microti*	Portugalsko	Neznámy	1 x 2,5 (malá forma
B. canis* subsp. *presentii	Izrael	Neznámy	2,7 x 1,7 (veľká forma)
B. canis* subsp. *canis	Španielsko, Portugalsko	Neznámy	3 x 5 (veľká forma)

1.4.2.4.2 Babezióza koní

Babezióza koní je ochorenie vyskytujúce sa celosvetovo s veľkým hospodárskym významom z dôvodu chorobnosti a úmrtnosti zvierat, nákladov spojených s liečbou, diagnostikou ochorenia a vplyvom na medzinárodný pohyb koní kvôli predaju alebo súťažiam. Veľkým problémom je pretrvávanie infekcie a kone tak zostávajú celoživotnými nosičmi. Zostávajú tak nepretržitým zdrojom infekcie prostredníctvom kliešťov (Ueti & Knowles 2018). Kone zostávajú bez známok ochorenia a pohyb zvierat predstavuje riziko pre iné krajiny (Scoles & Ueti 2015). Ochorenie spôsobuje druh *B. caballi* a okrem koní napáda zebry, somáre a muly (Adamska & Skotarczak 2017). Babezióza koní zatiaľ nebola hlásená z Japonska, a napriek výskytu potenciálnych kliešťových vektorov nebola hlásená zo severnej Európy vrátane Veľkej Británie (Ueti & Knowles 2018).

Parazit bol prvýkrát opísaný v 20. storočí a klasifikovaný do rodu *Piroplasma* ako *Piroplasma caballi*. V roku 1912 v južnej Afrike bol prvýkrát odlíšený od druhu *Thieleria equi*, kedy bol kôň infikovaný oboma parazitmi. Parazit bol následné preradený do rodu *Babesia* (Nuttall & Strickland 1912, Scoles & Ueti 2015).

Priebeh ochorenia môže byť veľmi rýchly, akútny, menej náhly a chronický. Pri veľmi rýchlom nástupe ochorenia nastáva poškodenie orgánov, dysfunkcia spôsobená nepriechodnosťou kapilár alebo iných ciev. Príznaky sa teda líšia v závislosti, či ide o žriebä alebo dospelého koňa. Taktiež sa zaznamenalo postihnutie centrálneho nervového systému. Akútna forma je charakteristická horúčkou, miernou anorexiou, nevoľnosťami, dehydratáciou, opuchom končatín a anémiou, ktorá môže skončiť smrťou. Pri menej náhlej forme ochorenia sú príznaky ako malátnosť, strata hmotnosti, opuchy končatín, vysoký tep, sliznice menia sfarbenie od svetloružovej, svetlo žltej až po jasne žltú, zápcha a následná hnačka, tmavý moč. Pri chronickej infekcii má zviera znížený počet červených krviniek, počet krvných doštičiek a koncentráciu hemoglobínu (Rothschild 2013).

Na liečbu ochorenia u dospelého koňa sa podáva imidocarb dipropinát v množstve 2,2 mg na kilogram hmotnosti pri dvoch ošetreniach po 24 hodinách. U niektorých zvierat môže však tento liek spôsobiť toxicitu so smrteľnými následkami (Rothschild 2013).

Tabuľka 3. Rozšírenie vektorov *B. caballi* a prítomnosť ochorenia Prevzaté od Ueti & Knowles (2018).

Kontinent výskytu	Vektor	Prítomnosť ochorenia
Afrika	*D. marginatus, Hy. anatolicum, Hy. detritum, Hy. marginatum, Hy. truncatum, R. bursa, R. evertsi, R. sasnguineus*	Endemické
Austrália	*R. microplus*	Neprítomné
Ázia	*Hy. anatolicum, Hy. detritum, Hy. marginatum,*	Endemické okrem Japonska
Európa	*D. marginatus, D. nuttalli, D silvarum, D. reticulatus, Hy. anatolicum, Hy. detritum, Hy. marginatum, R. bursa*	Endemické okrem severnej Európy
Severná Amerika	*D. albipictus, D. nitens, D. variabilis*	Endemické okrem Kanady a USA
Južná Amerika	*D. nitens*	Endemické

1.4.2.4.3 Babezióza hovädzieho dobytka a malých prežúvavcov

Babezióza hovädzieho dobytka tiež známa ako „red water" patrí celosvetovo k hospodársky najdôležitejším ochoreniam, ktoré spôsobujú vysokú chorobnosť a úmrtnosť. Ochorenie je spôsobné viacerými druhmi babézií. *Babesia bigemina* a *B. bovis* sú najdôležitejšie druhy infikujúce dobytok v tropických a subtropických oblastiach (Abdela & Jilo 2016). Okrem európskeho hovädzieho dobytka (*Bos taurus* Linnaeus, 1758), *B. bovis* a *B. bigemina* môžu spôsobiť subklinické infekcie u hovädzieho dobytka zebu (*Bos indicus* Linnaeus, 1758) a byvola arni (*Bubalus bubalis* Linnaeus, 1758). V Európe patrí medzi najdôležitejší druh infikujúci dobytok *B. divergens* (Ganzinelli *et al.* 2018) (Tab. 4).

Malé prežúvavce ako sú ovce alebo kozy môžu infikovať druhy *B. ovis, B. motasi* a *B. crassa,* z ktorých najvýznamnejší je druh *B. ovis*, hlásená z Európy, Afriky, Ázie, južnej Ameriky a z Ďalekého Východu, spôsobuje horúčku, anémiu, prítomnosť hemoglobínu v moči a žltačku (Ozubek & Aktas 2017) (Tab. 4).

Babezióza ohrozuje viac ako miliardu dobytka na celom svete. Plemená, ktoré sa prirodzene vyskytujú v endemických oblastiach majú určitý stupeň prirodzenej odolnosti voči týmto parazitom a následky nie sú až také závažné ako v prípade plemien *Bos taurus*. Okrem toho, dobytok si v týchto oblastiach vytvára prirodzenú odolnosť už v rannom veku

a preto je neskôr imúnny ako dospelý jedinec. Teľatá získavajú pasívne rezistenciu z mledziva približne dva mesiace, potom nasleduje vrodená imunita od 3 do 9 mesiacov. Zvieratá vystavené infekcie v tomto období si rozvíjajú dlhotrvajúcu imunitu (Bock *et al.* 2004).

Ochorenie je sprevádzané vysokou teplotou, stratou chuti do jedla, zastavenie prežúvania, ťažkým dýchaním, anémiou, žltačkou, zrýchlené dýchanie, tep alebo pokles produkcie mlieka. Horúčka môže spôsobiť potrat pri gravidnej samici. Akútne ochorenie trvá 3 až 7 dní s vysokou horúčkou, potom nasleduje nechutenstvo, depresia, slabosť. V pokročilom štádiu prichádza ochabenie svalstva, chvenie a ležanie a zviera sa dostane až do kómy. Cerebrálna babezióza postihuje centrálny nervový systém s fatálnymi následkami (Yusuf 2017).

Úspešná liečba závisí od včasnej diagnózy ochorenia, po ktorej nasleduje rýchle podanie liekov. Na liečbu ochorenia sa podáva diminazén aceturát a imidocarb dipropinát (Ganzinelli *et al.* 2018).

Tabuľka 4. Rozšírenie, vektor a druh babézií infikujúcich dobytok a malé prežúvavce. Prevzaté od Bock *et al.* (2004), Ganzinelli *et al.* (2018).

Druh babézie	Vektor	Geografická rozšírenie	Druh zvieraťa
B. bigemina	*R. (B.) microplus,R. (B.) decoloratus, R. (B.) annulatus, R. (B.) geigyi, R. evertsi*	Afrika, Ázia, Amerika, Austrália, Európa	Dobytok, byvol arni
B. bovis	*R. (B.) microplus, R. (B.) annulatus, R. (B.) geigyi*	Afrika, Ázia, Amerika, Austrália, Európa	Dobytok, byvol arni
B. divergens	*I. ricinus, I. persulcatus*	Európa, severná Afrika	Dobytok
B. major	*H. punctata*	Ázia, Európa	Dobytok
B. ovata	*H. longicornis*	Ázia	Dobytok
B. ovis	*R. bursa*	Afrika, Ázia, Európa	Kozy a ovce
B. motasi	*R. bursa, H. punctata*	Afrika, Ázia, Európa	Kozy a ovce
B. crassa	*Haemaphysalis* spp.	Stredný Východ, Ázia Európa	Kozy a ovce

2 MATERIÁL A METÓDY

2.1 Zber materiálu

Zber kliešťov z domácich a spoločenských zvierat sme uskutočnili od októbra 2018 do decembra 2019. Ako prvé sme kontaktovali veterinárne ambulancie, ktoré by boli ochotné s nami spolupracovať a kliešte nám odoberať zo zvierat. Vzorky v ambulanciách sa odoberali primárne zo psov a mačiek. Kliešte nám takisto odoberali majitelia hospodárskych zvierat (kone, kravy) alebo sme si vzorky zbierali samy zo zvierat. Zbierali sme všetky vývinové štádia kliešťov (larvy, nymfy a dospelé jedince) a obe pohlavia. Tie sme následne vložili do 1,5 ml skúmaviek, v ktorých bol 70 % etanol a vzorky uskladnili v chladničke. Každá skúmavka mala svoje označenie, ku ktorému boli zaznamenané informácie o dátume odobratia vzorky, lokalite, odkiaľ zviera pochádzalo a o aký druh zvieraťa išlo. Zber prebiehal v rôznych lokalitách juhozápadného Slovenska (okres Komárno, Nové Zámky, Dunajská streda, Bratislava, Senec, Malacky, Pezion a Senica).

Zber krvných vzoriek prebiehal od októbra 2018 do decembra 2019. Krvné vzorky nám odoberali veterinári z kliniky Mavet v Malackách. Krv sa odoberala zo psov a mačiek do EDTA skúmaviek a tie sa uskladňovali v mrazničke. Každá skúmavka bola označená o aký druh zvieraťa išlo (pes, mačka), zaznamenané bolo miesto, z ktorého zviera pochádzalo a mesiac, v ktorom bola krv odobratá.

2.2 Sledované lokality a veterinárne ambulancie

Vybrané lokality, kde bol realizovaný odber vzoriek, sa nachádzali v rôznych častiach juhozápadného Slovenska, v okresoch Senica, Malacky, Pezinok, Bratislava, Senec, Dunajská Streda, Nové Zámky a Komárno (Tab. 5).

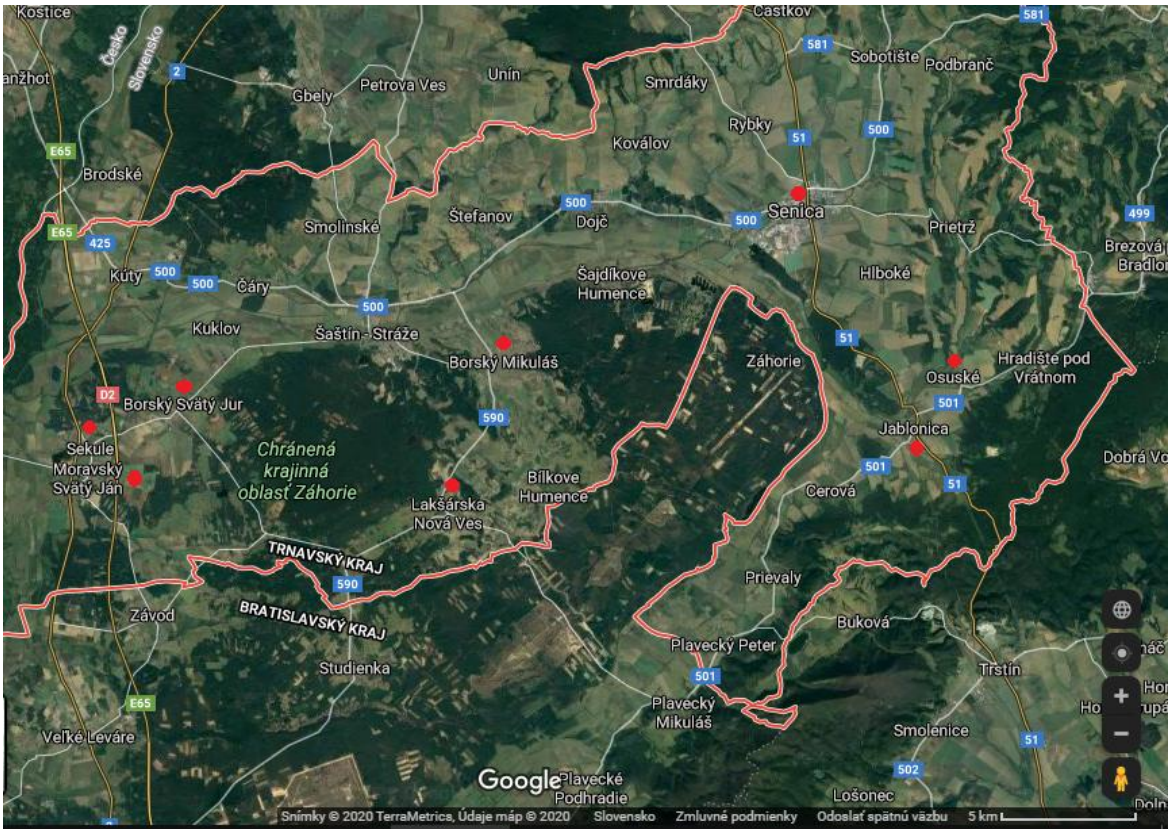
Tabuľka 5. Zoznam okresov s mestami a obcami, odkiaľ zvieratá pochádzali.

Okres	Mesto. obec
Senica	Senica
	Lakšárska Nová Ves
	Jablonica
	Osuské
	Moravský Svätý Ján
	Borský Mikuláš
	Sekule
	Borský Svätý Jur
Malacky	Malacky

Okres	Mesto, obec
Malacky	Plavecký Štvrtok
	Stupava
	Gajary
	Kuchyňa
	Marianka
	Rohožník
	Veľké Leváre
	Sološnica
	Kostolište
	Láb
	Pernek
	Lozorno
	Jakubov
	Závod
	Vysoká pri Morave
	Záhorská Ves
	Suchohrad
	Zohor
	Jablonové
Pezinok	Pezinok
	Viničné
	Častá
Senec	Zálesie
	Malinovo
	Most pri Bratislave
	Tomášov
	Ivanka pri Dunaji
	Hamuliakovo
	Studené
	Bernolákovo
	Vlky
	Miloslavov
Bratislava	Bratislava - lesopark
	Ba - Karlova Ves
	Ba - Rača
	Ba - Dúbravka
	Ba - Petržalka
	Ba - Devínska Nová Ves
	Ba - Staré Mesto
	Ba - Lamač
	Ba - Ružinov

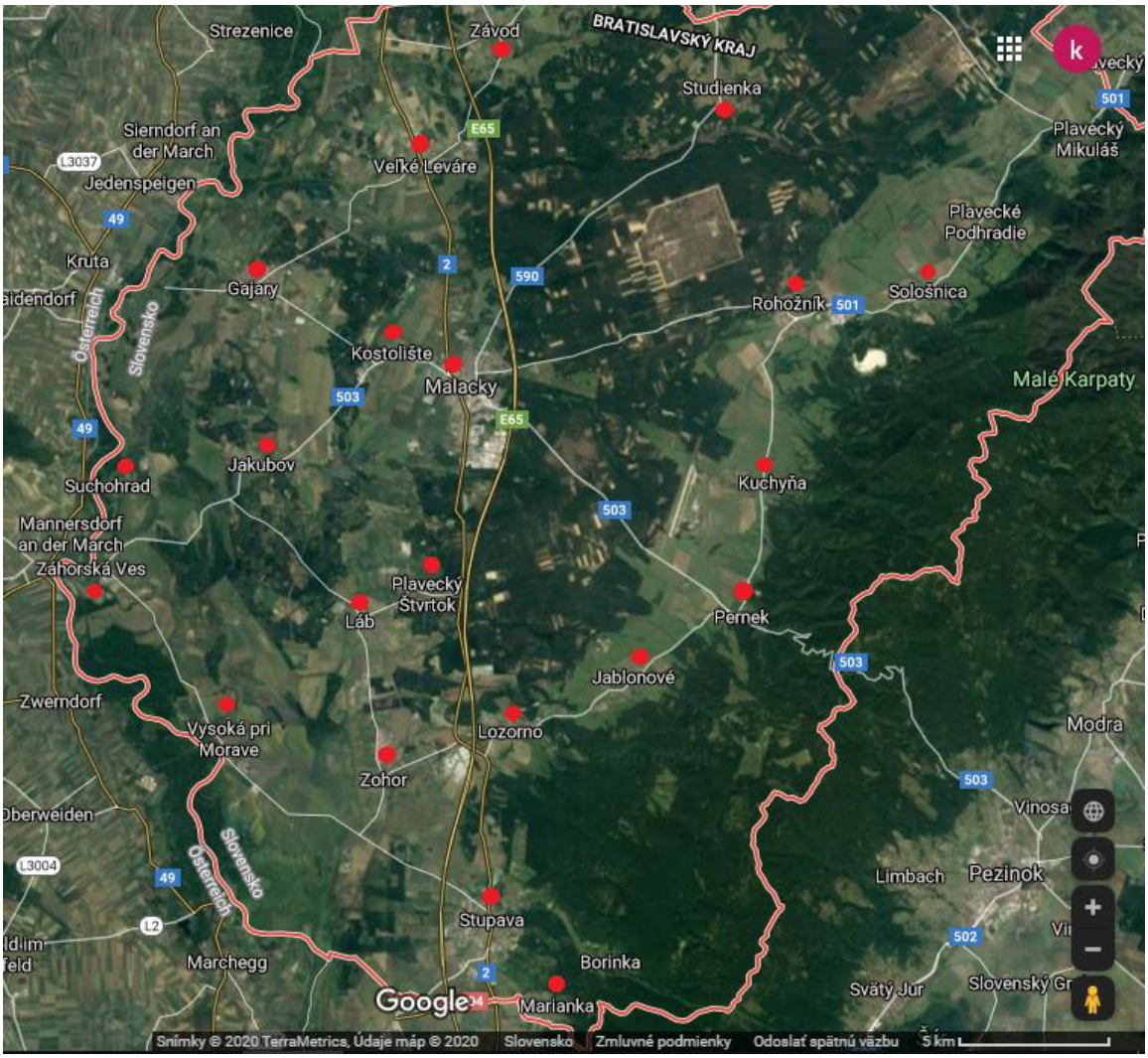
Okres	Mesto
Dunajská Streda	Dunajská Streda
	Oľdza
	Lehnice
	Nový Život
	Hubice
	Hviezdoslavov
	Štvrtok na Ostrove
	Dolné Janíky
	Bellova Ves
Nové Zámky	Nové Zámky
	Jatov
	Andovce
	Palárikovo
	Tvrdošovce
	Bešeňov
	Semerovo
	Radava
	Bánov
	Komoča
	Komjatice
Komárno	Aňala
	Kolárovo

Okres Senica (geografické súradnice 48°40′50″ S, 17°22′00″ V) sa nachádza v severozápadnej časti Záhorskej nížiny a východný okraj okresu lemuje chrbát Malých Karpát. Na takmer polovici územia okresu sa nachádza poľnohospodárska pôda a okrem ornej pôdy ju tvoria aj lúky, pasienky, vinice a ovocné sady [2]. Na mape (Obr. 17) sú vyznačené konkrétne lokality, odkiaľ zvieratá pochádzali.



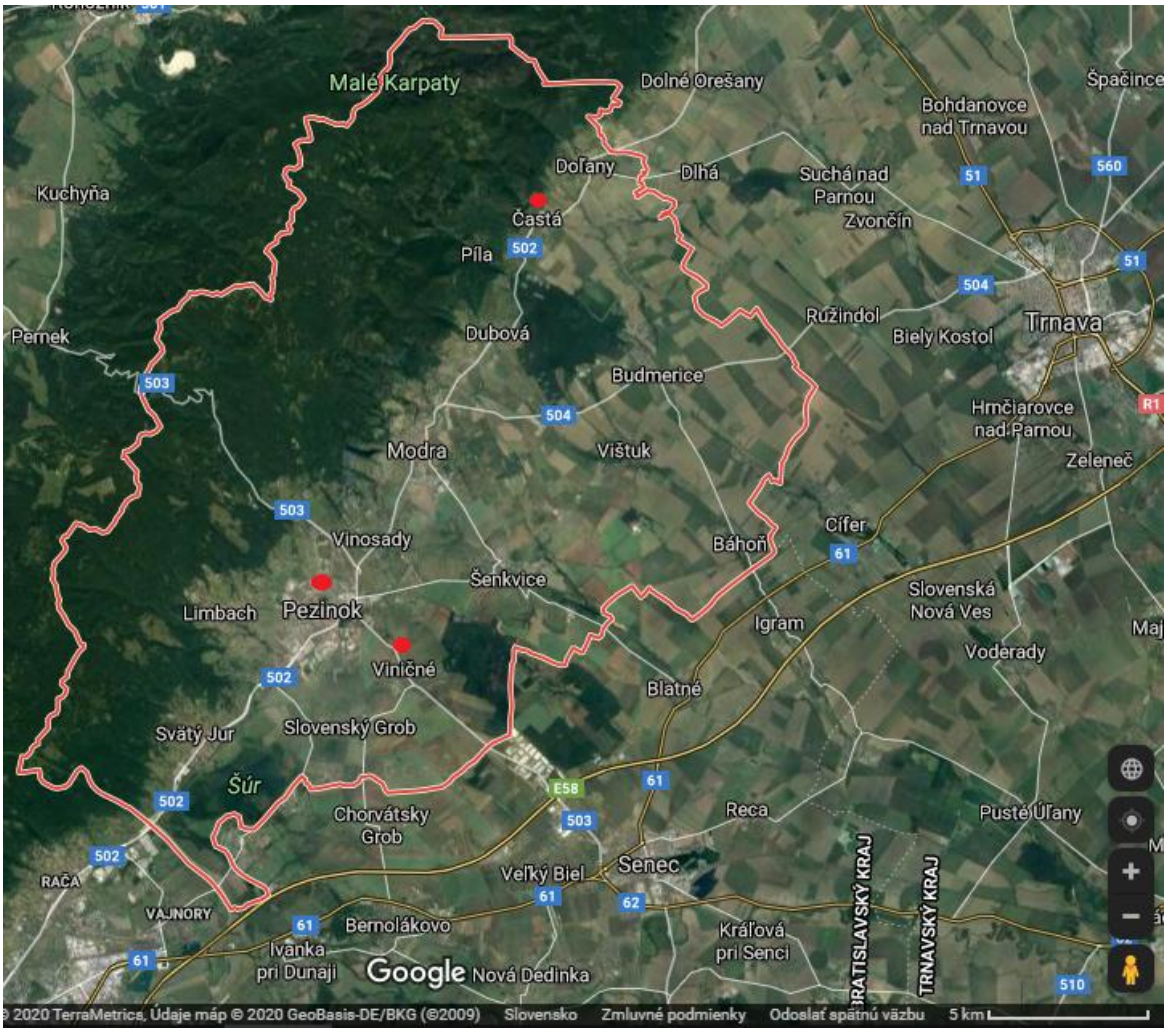
Obrázok 17. Lokality okresu Senica odkiaľ zvieratá pochádzali, znázornené červenou bodkou.

Okres Malacky (geografické súradnice 48°26′09″ S, 17°01′04″ V) je situovaný do centra južnej časti Záhorskej nížiny na nive a terase. Západne od mesta tečie rieka Morava, východne sa tiahnu Malé Karpaty. Od Malých Karpát smerom na západ k Malackám cez Bor preteká rieka Malina. Okres leží v teplej klimatickej oblasti, v teplom a mierne suchom okrsku s miernou zimou [3]. Charakteristická časť Záhoria – Bor sa rozprestiera od Lozorna až po Borský Jur. Tvorená je naviatymi pieskami, ktoré sú porastené borovicovými lesmi. Priemerná nadmorská výška sa pohybuje okolo 200 metrov a v oblasti Malých Karpát vyše 700 metrov [4]. Na mape (Obr. 18) sú vyznačené konkrétne lokality, odkiaľ zvieratá pochádzali.



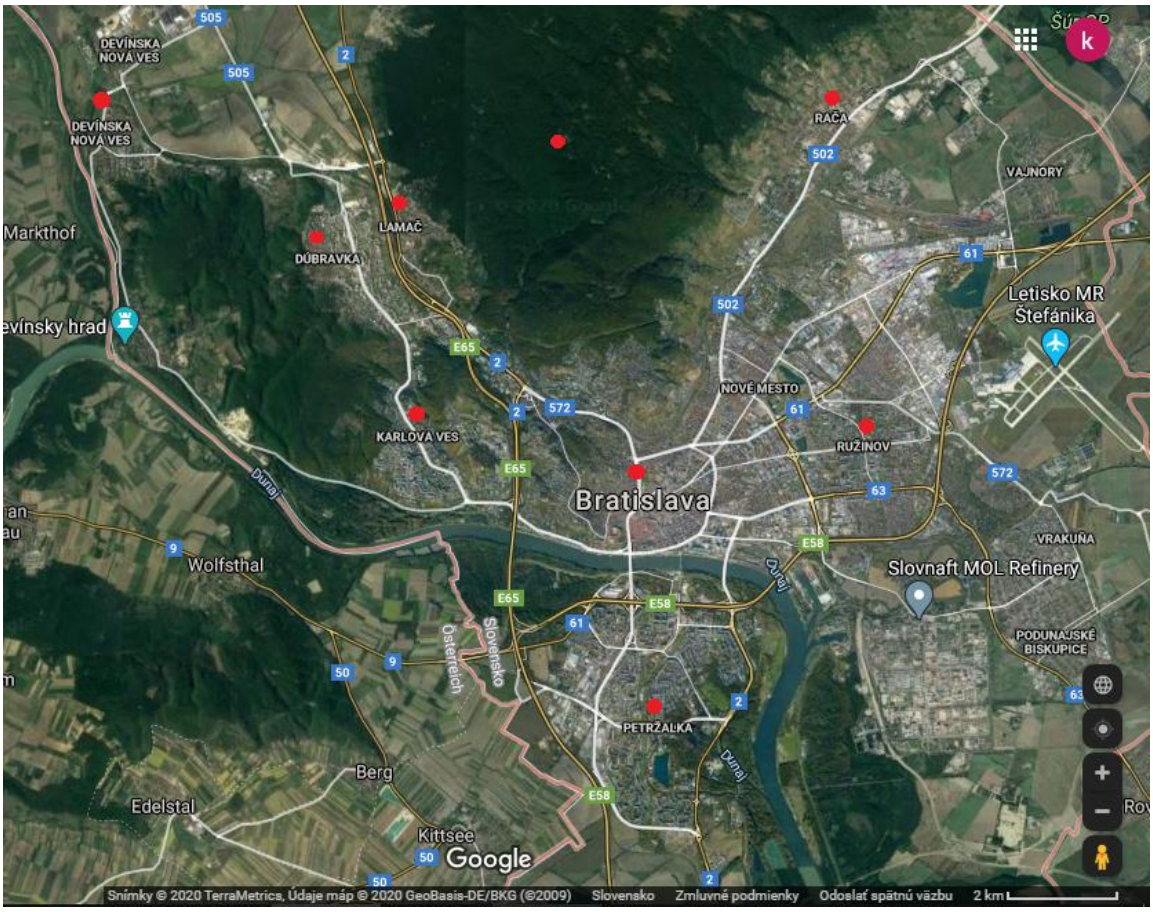
Obrázok 18. Lokality okresu Malacky odkiaľ zvieratá pochádzali, znázornené červenou bodkou.

Okres Pezinok (geografické súradnice 48°17′31″ S, 17°15′58″ V) má západnú časť situovanú v Malých Karpatoch, nazývanú Pezinské Karpaty, východnú časť v Podunajskej nížine, prevažne v Podmalokarpatskej pahorkatine a južnú časť na Podunajskej rovine. Najvyššie položené miesto je Čertov kopec v Malých Karpatoch (752 m n. m.). Územím tohto okresu preteká málo tokov, ktoré sú málo vodnaté a krátke. Nížinné oblasti spadajú do teplej klimatickej oblasti a Malé Karpaty do mierne teplej klimatickej oblasti. Lesné ekosystémy v Podunajskej nížine sa postupne vyrúbali, len miestami sa zachovali dubové lesy na pahorkatine a lužné lesy v Jurskom Šúri. Vyššie polohy Malých Karpát sú porastené bučinami, pod nimi dubovými lesmi a v najnižších polohách sú odlesnené svahy premenené na vinohrady [5]. Na mape (Obr. 19) sú vyznačené konkrétne lokality odkiaľ zvieratá pochádzali.



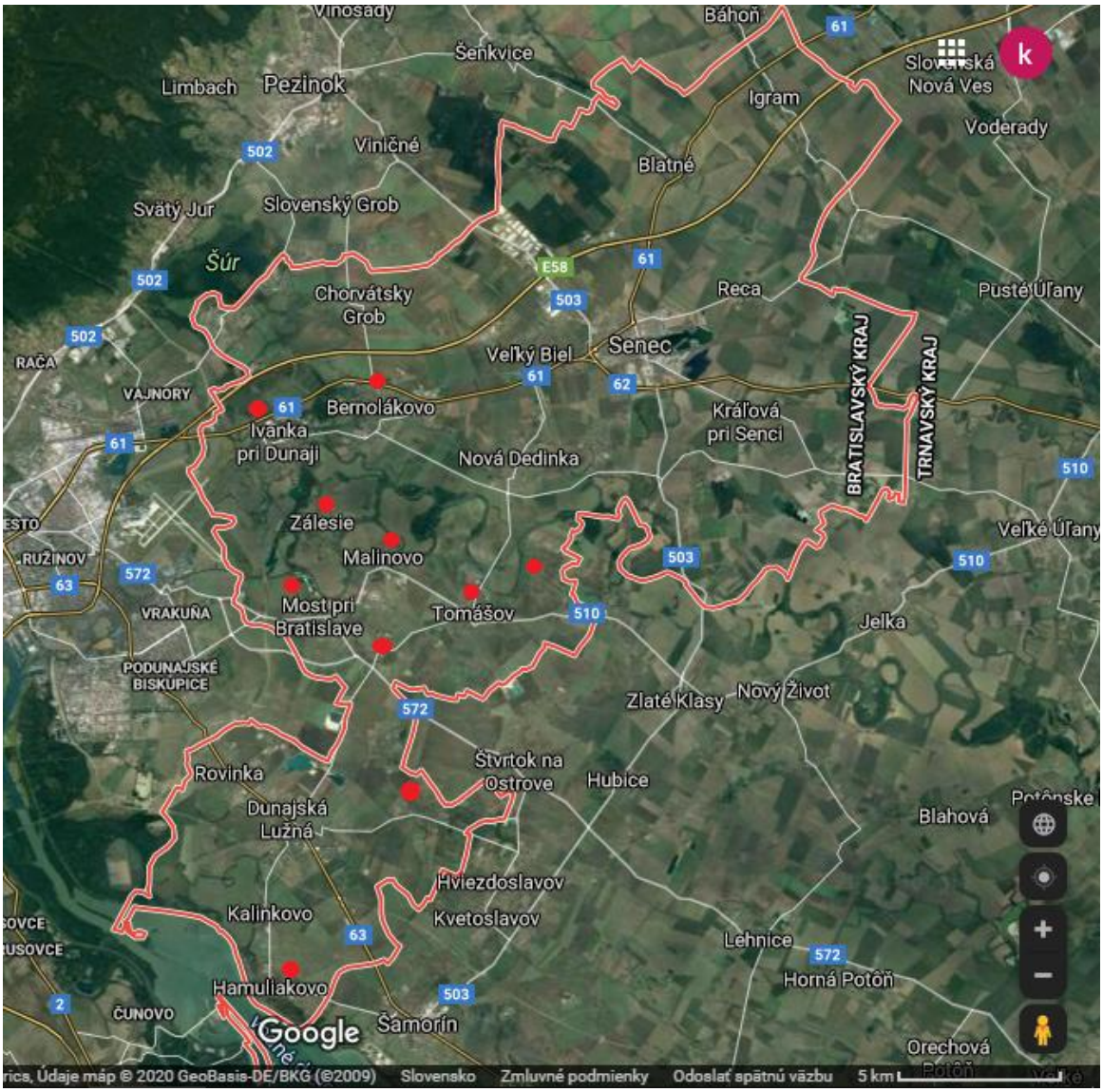
Obrázok 19. Lokality okresu Pezinok odkiaľ zvieratá pochádzali, znázornené červenou bodkou.

Okres Bratislava sa nachádza v juhozápadnej časti Slovenska (geografické súradnice 48°08′38″ S, 17°06′35″ V). Územie pretínajú Malé Karpaty a rieka Dunaj. Malé Karpaty sú prevažne pokryté listnatými lesmi, v ktorých dominujú buky, v nižších polohách duby a hraby. Do severozápadnej časti územia mesta zasahuje Záhorská nížina. Jej povrch je prevažne rovinatý. Na západe ju ohraničuje rieka Morava, pozdĺž ktorej sa tiahne lužný les. Z hľadiska klimatických podmienok leží Bratislava v najteplejšej a najsuchšej klimatickej oblasti Slovenska [6]. Na mape (Obr. 20) sú vyznačené konkrétne lokality, odkiaľ zvieratá pochádzali.



Obrázok 20. Lokality okresu Bratislava odkiaľ zvieratá pochádzali, znázornené červenou bodkou.

Okres Senec (geografické súradnice 48°13′14″ S, 17°23′54″ V) sa nachádza v západnej časti Podunajskej nížiny, na rozhraní Podunajskej roviny a Trnavskej pahorkatiny. Územie okresu sa nachádza v teplej klimatickej oblasti. Z hľadiska klímy patrí k najteplejším a najsuchším oblastiam Slovenska. Okresom južne preteká Dunaj, severnejšie Malý Dunaj a na severe Čierna voda. V okrese prevládajú odlesnené plochy, ktoré sú poľnohospodársky využívané. Dubový les sa zachoval severozápadne od Senca. Lužný les sa nachádza medzi hlavným tokom Dunaja a jeho mŕtvym ramenom [7]. Na mape (Obr. 21) sú vyznačené konkrétne lokality odkiaľ zvieratá pochádzali.

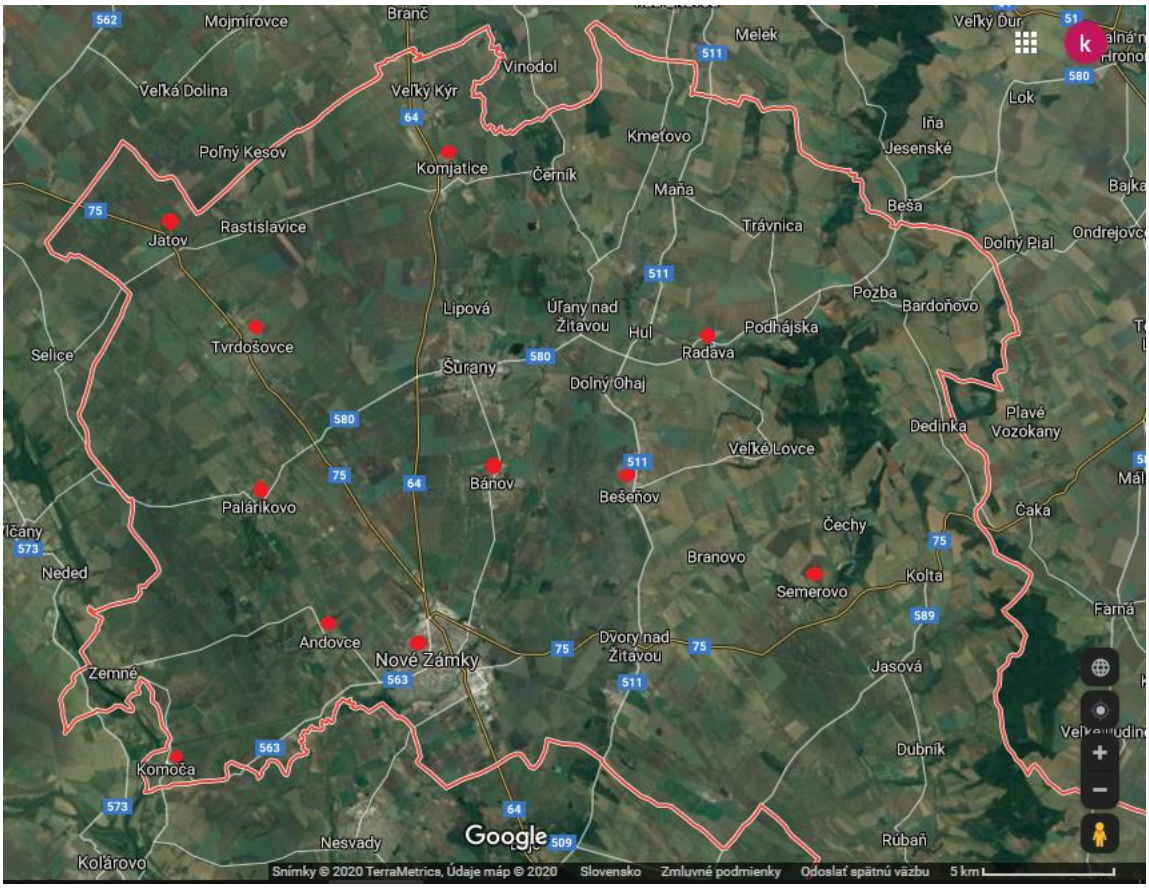


Obrázok 21. Lokality okresu Senec odkiaľ zvieratá pochádzali, znázornené červenou bodkou.

Okres Dunajská Streda (geografické súradnice 47°59'30" S, 17°37'15" V) sa nachádza na juhozápade Slovenska na území tzv. Žitného ostrova, ktorý je súčasťou Podunajskej nížiny. Svojou geografickou polohou patrí k oblastiam s priaznivými prírodnými podmienkami (nížinná oblasť, teplá klíma, vodné zdroje, kvalitná pôda). Z hľadiska prírodných pomerov zohráva mimoriadne významnú úlohu prítomnosť rieky Dunaj [7]. Charakter pôvodnej prírodnej krajiny si najviac zachovalo inundačné územie Dunaja, popretkávané systémom ramien, močiarov, jazier, porastené rozľahlými trstinami a bujným vŕbovo-topoľovým lužným lesom [8]. Na mape (Obr. 22) sú vyznačené konkrétne lokality, odkiaľ zvieratá pochádzali.

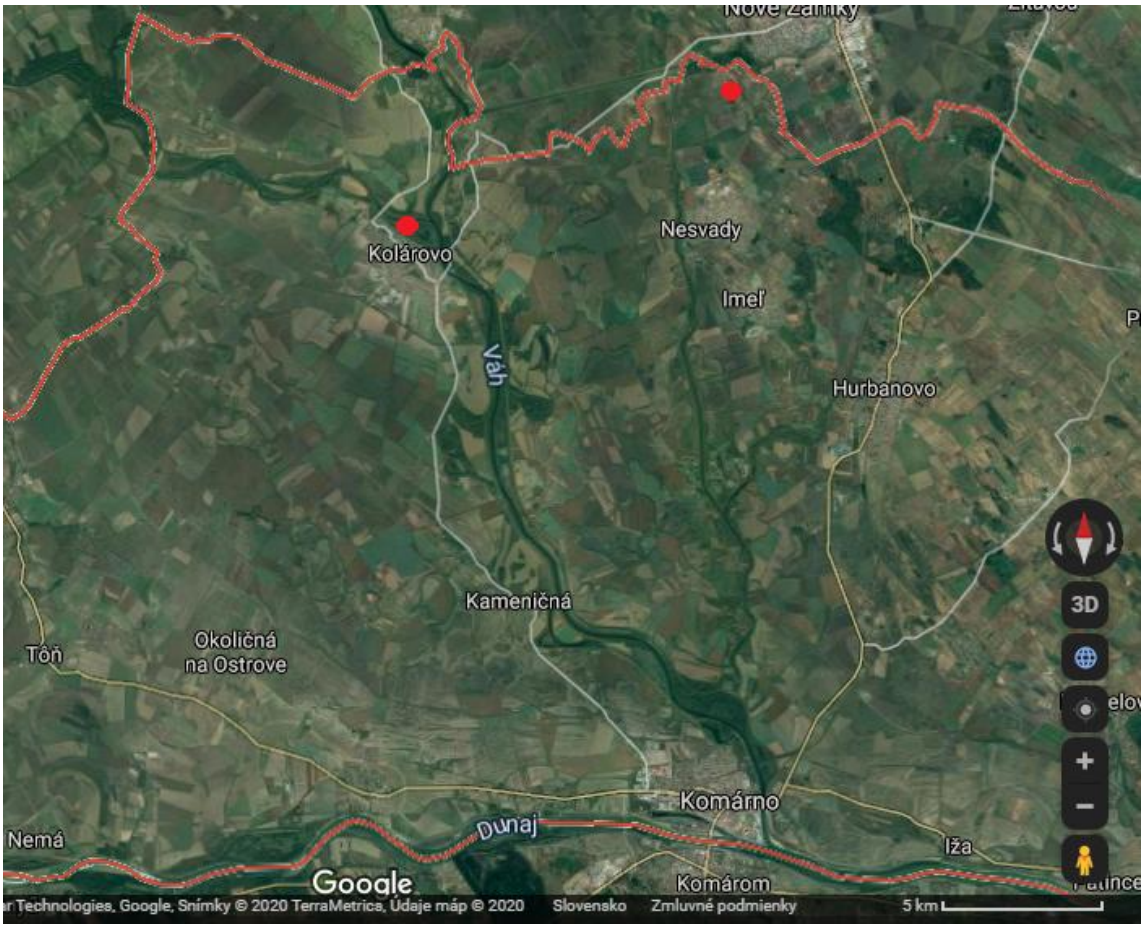
Obrázok 22. Lokality okresu Dunajská Streda odkiaľ zvieratá pochádzali, znázornené červenou bodkou.

Okres Nové Zámky (geografické súradnice 47° 59′ 15.45″ S, 18° 9′ 44.86″ V) sa nachádza v strednej časti Podunajskej nížiny, ktorá je súčasťou Malej dunajskej kotliny. Pôvodne vznikol na rozsiahlom Novozámockom močiari a leží v nadmorskej výške 119 m [9]. Z hľadiska klímy sa okres Nové Zámky radí medzi najsuchšie, najteplejšie, ale aj najúrodnejšie oblasti Slovenska. Fauna a flóra je ovplyvnená podnebím a povrchom, teda močiarmi, rašeliniskami, piesčinami, lesostepmi a lužnými lesmi [10]. Na mape (Obr. 23) sú vyznačené konkrétne lokality, odkiaľ zvieratá pochádzali.



Obrázok 23. Lokality okresu Nové Zámky odkiaľ zvieratá pochádzali, znázornené červenou bodkou.

Okres Komárno (geografické súradnice 47°45′27″ S, 18°07′47″ V) sa nachádza v južnej časti západného Slovenska, kde zaberá časť Podunajskej nížiny. Okres leží na najjužnejšej časti s nadmorskou výškou 110 m. Patrí medzi najnižšie položené územie na Slovensku. Na rovinách sa nachádzajú agátové lesy, pri vodných hladinách vŕby a topole [11]. Na mape (Obr. 24) sú vyznačené konkrétne lokality, odkiaľ zvieratá pochádzali.



Obrázok 24. Lokality okresu Komárno odkiaľ zvieratá pochádzali, znázornené červenou bodkou.

S odberom vzoriek nám pomáhali veterinárni lekári z rôznych lokalít juhozápadného Slovenska, ktorí nám odoberali kliešte zo zvierat (psy, mačky). Spoluprácu sme naviazali s ôsmimi veterinárnymi ambulanciami. Veterinárni lekári nám kliešte uskladňovali v nami prinesených skúmavkách so 70 % etanolom v chladničke. Údaje s dátumom, druhom zvieraťa a lokalitou zapisovali na osobitné hárky. Tieto údaje sme spracovali v tabuľke. Krv zo zvierat (psy, mačky) nám odoberali a uskladňovali veterinárni lekári z kliniky Mavet v Malackách. Krv sa odoberala do EDTA skúmaviek. Niekoľko vzoriek s kliešťami nám poskytol aj útulok Cerberus v Senici. Zoznam veterinárnych ambulancií, s ktorými sme spolupracovali je uvedený v Tabuľke 6.

Tabuľka 6. Zoznam veterinárnych ambulancií, s ktorými sme spolupracovali.

Lokalita	Názov a adresa veterinárnej ambulancie
Malacky	Mavet – veterinárna klinika, M.R. Štefánika 36
Bratislava - Dúbravka	VET-SVET – veterinárna ambulancia, Koprivnická 26
Bratislava – Karlova Ves	AHA-VET – veterinárna klinika, Ľ. Fullu 3112
Bratislava – Rača	Primavet – veterinárna klinika, Rustaveliho 11
Most pri Bratislava	Medi-vet – veterinárna klinika, Nálepkova 313
Pezinok	Veterinárna klinika Pezinok - MVDr. Miklošovičová, F. P. Drobiševa 2376
Dunajská Streda	Amazonas – veterinárna ambulancia, Kúpeľná 2174/32
Nové Zámky	Veterinárna klinika, Slovenská 52

2.3 Determinácia kliešťov

Určovanie kliešťov prebiehalo v laboratóriu na Ústave zoológie Slovenskej akadémie vied (SAV) v Bratislave. Na určovanie sme použili stereoskopický mikroskop, Petriho misku s 70 % etanolom, kde sme kliešte vložili a pinzetu. Na determináciu sme použili Obrázkový kľúč lariev a nymf kliešťov (Acari: Ixodida) fauny Slovenska (Slovák 2014), Obrázkový kľúč dospelých kliešťov (Acari: Ixodida) fauny Slovenska (Slovák 2010), knihu Kleszcze Polski (Acari: Ixodida) (Siuda 1993) a knihu Ticks of Europe and North Africa (Estrada-Peña *et al.* 2017). Kliešte sme určili do druhu. Pohlavie u dospelých jedincov sme určovali podľa prítomnosti/neprítomnosti štítku tzv. scutum. Vývinové štádium sme určovali na základe počtu nôh a prítomnosti/neprítomnosti genitálneho otvoru. Larvy od nymf sme rozlišovali podľa počtu nôh, ktorých počet u lariev je 6, u nymf 8. Nymfy od imág sme rozlišovali podľa genitálneho otvoru, ktorého neprítomnosť znamenala, že ide o nymfu. Na základe druhu, pohlavia a vývojového štádia sme kliešte roztriedili do samostatných skúmaviek.

2.4 Izolácia DNA

Izolácia DNA prebiehala v laboratóriu na Ústave zoológie Slovenskej Akadémie Vied. Pri manipulácií s krvou alebo kliešťami sme pracovali v sterilných rukaviciach a v digestore, ktorý bolo potrebné pred samotnou prácou vyžiariť UV svetlom po dobu 20 minút. Na izoláciu sme použili kit Macherey Nagel Nucleospin® Tissue pre izoláciu DNA z kliešťov a Macherey Nagel Nucleospin® Blood pre izoláciu DNA z krvi.

2.4.1 Kliešte

Izolácia DNA z kliešťov prebiehala počas dvoch nasledujúcich dní.. Prvý deň sme pracovali v digestore a pripravili 20 alebo 48 vzoriek. Pinzety použité na výber kliešťov zo skúmaviek sme po každom použití prepálili v liehovom kahane. Kliešte sme poukladali na filtračný papier, ak bol kliešť plne nacicaný, bolo ho potrebné skalpelom pozdĺžne rozrezať v Petriho miske a na izoláciu sme použili len polovicu. Následne sme z kliešťov nechali odpariť zvyšný etanol po dobu 10 minút. Po vysušení sme kliešte vložili do 1,5 ml safe lock skúmaviek a rozdrvili skalpelom. Potom sme pridali 180 µl lyzačného pufru T1 a proteinázu K v množstve 25 µl. Vzorky sme zvortexovali na vortexe (BioSan V-1) a nechali cez noc inkubovať v termobloku s trepačkou pri 56 ^{o}C (Biosan TS-100).

Na druhý deň sme vybrali vzorky z termobloku a zvortexovali. Postupovali sme podľa protokolu priloženom ku kitu. K vzorkám sme pridali 200 µl pufru B3, zvortexovali a nechali inkubovať pri teplote 70 ^{o}C po dobu 10 minút. Vzorky sme zvortexovali, pridali 210 µl 96 % etanolu a opäť zvortexovali. S použitím špičiek s filtrom sme približne 700 µl vzorky odpipetovali do kolóniek vložených do zberných skúmaviek. Tie sme scentrifugovali po dobu 1 minúty pri 11 000 xg na centrifúge Mikro 120 (HETTICH D-78532). Filtrát sme odstránili, kolónky vložili späť do zberných skúmaviek, pridali 500 µl premývacieho pufru BW, opäť scentrifugovali. Filtrát sme odstránili, vložili do zberných skúmaviek a pridali 600 µl premývacieho pufru B5 a scentrifugovali. Filtrát sme odstránili, kolónky sme vložili do zberných skúmaviek a znova scentrifugovali aby sa vysušila membrána. Kolónky sme premiestnili do čistých 1,5 ml skúmaviek a pridali 50 µl elučného pufru BE nahriateho na 70 ^{o}C a nechali inkubovať 1 minútu pri izbovej teplote a scentrifugovali po dobu 1 minúty. Postup s elučným pufrom, inkubáciou a centrifugáciou sme zopakovali ešte raz. Konečný filtrát s DNA sme rozdelili na dve alikvótne časti prenesením 50 µl do dvoch 1,5 ml skúmaviek a uskladnili v mrazničke pri -20 ^{o}C.

2.4.2 Krv

Pred začatím izolácie DNA z krvi sme nechali krv rozmraziť pri izbovej teplote. Do 1,5 ml safe lock skúmaviek sme odobrali 200 µl krvi. Počas jednej izolácie sme spracovali 20 alebo 48 ks vzoriek. Do každej skúmavky s krvou sme napipetovali 25 µl proteinázy K, potom sme pridali 200 µl pufru B3. Takto pripravené vzorky sme zvortexovali po dobu 10 – 20 sekúnd a dali inkubovať do termobloku zohriateho na 70 ^{o}C po dobu 15 minút. Po inkubácii sme pridali 210 µl 96 % etanolu do každej vzorky a opäť zvortexovali. Obsah sme prepitovali s použitím špičiek s filtrom do kolóniek vložených do zberných skúmaviek

a dali scentrifugovať po dobu 1 minúty pri 11 000 xg. Filtrát sme odstránili a kolónky sme vložili do prázdnych skúmaviek. Pridali sme 500 µl premývacieho pufru BW a opäť scentrifugovali po dobu 1 minúty pri 11 000 xg. Obsah sme opäť vyliali, a do kolóniek sme pridali 600 µl druhého premývacieho pufru B5 a rovnako scentrifugovali. Na vysušenie membrány sme kolonky ešte raz scentrifugovali. Do kolóniek sme napipetovali 100 µl elučného pufru BE zohriateho na 70 ^{o}C a opäť scentrifugovali pri 11 000 xg 1 minútu. Konečný filtrát s DNA sme prepipetovali v množstve po 50 µl do dvoch 1,5 ml skúmaviek a uskladnili v mrazničke pri -20 ^{o}C.

Pred ďalším použitím je potrebné zmerať v každej vyizolovanej vzorke koncentráciu extrahovanej DNA pre prípadnú potrebu riedenia a ďalšie charakteristiky ako čistota DNA na základe pomerov absorbancie 260/280 a 260/230. Tie sme merali na spektrofotometri Nanodrop 2000c. Pred meraním sme použili elučný pufor ako blank a následne 1 µl vyizolovanej DNA.

2.5 PCR analýza pre *Babesia* spp.

Polymerázova reťazová reakcia PCR (z anglického jazyka „ Polymerase Chain Reaction") je metóda založená na schopnosti DNA polymerázy, ktorá syntetizuje vlákno DNA v smere 5′ - 3′. Na to aby mohla DNA polymeráza syntetizovať nové vlákno od začiatku, potrebný je tzv. primer. Primer je krátky úsek DNA, ktorý je presne komplementárny s vláknom DNA, ktorý potrebujeme amplifikovať (tzv. tepmplátové vlákno alebo templát) (Pastoráková & Petrovič 2016).

Na PCR analýzu sme si najprv pripravili PCR mix, ktorý sme pripravovali v sterilnom laboratóriu (tzv. clean room). Pracovali sme v PCR boxe (BioAir INSTRUMENTS, aura PCR) ktorý sme pred použitím vyžiarili UV svetlom po dobu 20 minút. Všetky potrebné chemikálie na prípravu PCR mixu boli uskladnené v mrazničke pri – 20 ^{o}C. Pred použitím bolo potrebné tieto zložky nechať rozmraziť.

Na amplifikáciu 450 bp fragmentu 18S rRNA génu sa používajú primery BJ1 a BN2, špecifické pre rod *Babesia*. PCR reakcia jednej vzorky prebieha v objeme 25 µl, z čoho 5 µl je templátová DNA a 20 µl PCR mix, ktorý pozostáva z 0,125 µl enzýmu HotStarTaq Plus DNA polymerázy (5 U/µl; Qiagen, Hilden, Nemecko), 0,5 z každého primera (10µM), 0,5 µl dNTP (10 mM), 2,5 of Coral Load PCR buffer (s obsahom 15 mM MgCl2), 1 µl MgCl2 (25 mM) a 14,875 µl nuclease free (NF) voda. V každej reakcii bola zahrnutá pozitívna aj negatívna kontrola (Tab. 7)

Primery

18S rRNA gén (Casati et al. 2006)

BJ1 (forward) 5′ - GTCTTGTAATTGGAATGATGG – 3′

BN2 (reverse) 5′ - TAGTTTATGGTTAGGACTAGG – 3′

Tabuľka 7. Príprava objemov potrebných pre PCR mix na 1 vzorku.

Nuclease free H_2O	14,875 µl
PCR pufor	2,5 µl
MgCl2 (25 mM)	1 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
Primer forward (10 µM)	0,5 µl
Primer reverse (10 µM)	0,5 µl
Hot Start DNA Polymeráza	0,125 µl
Templátová DNA alebo NF voda	5 µl
Objem spolu	25 µl

Pozitívna kontrola DNA: 5 µl

Negatívna kontrola NF voda: 5µl

PCR mix sme si napipetovali po 20 µl do 0,2 ml PCR skúmaviek. Tie sme označili a presunuli sme sa do druhého laboratória. Do každej skúmavky s PCR mixom sme pridali 5 µl templátovej DNA a zvortexovali. Tie sme potom vložili do centrifúgy (BIOSAN Multi-Spin) a na pár sekúnd scentrifugovali. Takto pripravené vzorky sme vložili do termocykléra značky BioRad (BioRad t 100 thermal cycler, USA), kde sme nastavili podmienky pre PCR (Tab. 8).

Tabuľka 8. Nastavenie podmienok PCR v termocykléri.

Počiatočná denaturácia	95 °C	5 minút	
Denaturácia	94 °C	1 minúta	35 cyklov
Anelácia	55 °C	1 minúta	
Elongácia	72 °C	2 minúty	
Finálna elongácia	72 °C	5 minút	
Hold	4 °C	Infinite	

2.5.1 Elektroforéza DNA

Elektroforéza patrí medzi separačnú analytickú metódu, ktorá je založená na migrácii iónogénnych látok v roztoku pôsobením jednosmerného elektrického poľa. Elektroforéza v agarózovom géle patrí medzi základné metódy na separáciu a identifikáciu nukleových kyselín. Počas elektroforézy sa molekuly nukleovej kyseliny pohybujú v elektrickom poli, pričom DNA je záporne nabitá, v agarózovom géle a separujú sa na základe ich veľkosti (bázových párov), kde malé molekuly sa pohybujú rýchlejšie a veľké pomalšie (Pastoráková & Petrovič 2016).

Na prípravu 1,5 % agarózoveho gélu sme použili 1,125 g agarózy v prášku (Agarose SERVA for DNA electrophoresis), pridali 75 ml tlmivého roztoku TAE (Thermofisher) a 3,5 µl farbičky (Invitrogen SYBR Safe DNA Gel Stain). Takto pripravený roztok sme dali zohriať na minútu do mikrovlnnej trúby a vyliali do OWL vaničky pre horizontálnu elektorforézu, v ktorej boli umiestnené hrebene pre 40 jamiek a nechali stuhnúť. Po stuhnutí gélu sme do vaničky naliali tlmivý roztok TAE a hrebene sme vytiahli. Do prvej jamky sme napipetovali 3 µl GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) a do ďalších jamiek po 5 µl PCR produktu, z negatívnej a pozitívnej kontroly a z testovaných vzoriek. Po napipetovaní všetkých vzoriek sme vaničku zapojili do zdroja vysokého napätia (Bio-Rad) nastaveného na 120 V a nechali separovať po dobu 45 minút. Odseparovaný DNA úsek v géle sme následne nechali vyzualizovať pod UV svetlom v transilluminátori Benchtop 3UV^{TM} Transilluminator LMS-12 (Veľká Británia) a gély sme odfotili.

2.5.2 Sekvenovanie amplikónov a analýza sekvencií

Vzorky, ktoré boli pozitívne na prítomnosť *Babesia* spp. DNA sme ďalej zaslali na sekvenáciu do externého laboratória. Prvýkrát sa vzorky posielali do laboratória Microsynth Austria, ďalšie vzorky boli sekvenované v laboratóriu Macrogen Europe (Amsterdam).

Na purifikáciu DNA z PCR produktu sme použili komerčný kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up. PCR produkt sme zmiešali s pufrom NTI v pomere 1:2. Nachystali sme si kolónky do zberných skúmaviek a odpipetovali 700 µl vzorky. Takto pripravené skúmavky sme vložili to centrifúgy a scentrifugovali 30 s pri 11 000 xg. Do kolóniek sme pridali 700 µl premývacieho pufru NT3 a dali opäť scentrifugovať na 30 s pri 11 000 xg. Na vysušenie membrány sme vzorky scentrifugovali ešte raz. Kolónky sme vložili do čistých zberných skúmaviek a pridali 30 µl pufru NE, nechali inkubovať pri izbovej teplote 1 mi-

nútu a scentrifugovali 1 minútu pri 11 000 xg. Výsledný produkt sme prepipetovali do 1,5 ml skúmaviek.

Sekvencie fragmentu hypervariabilnej oblasti génu 18S rRNA pre *Babesia* spp. sme ediovali v programe UniproUGENE. Sekvencie sme zarovnali použitím programu UniproUGENE a následne sme ich porovnali so sekvenciami uloženými v génovej banke (GenBank) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) pomocou BLAST (Basic Local Aligment Search Tool, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.

Pre fylogenetickú analýzu a vytvorenie dendrogramu sme z databázy GenBank získali sekvencie reprezentatívnych druhov *Babesia* spp.. Vybrané sekvencie sme spolu s našimi zarovnali (multiple alignment) pomocou ClustalW metódy. Pozície v jednotlivých sekvenciách obsahujúce medzery a tiež chýbajúce údaje sme vylúčili. Dendogramy sme vytvorili použitím metódy maximálnej vierohodnosti (maximum likelihood) (počet bootstrap replikácií = 1000) v programe MEGAX (Kumar *et al.* 2018) podľa modelu Tamura-Nie (Tamura & Nei 1993).

2.6 Real time PCR pre *Anaplasma phagocytophilum*

Real-time PCR metóda, nazývaná aj kvantitatívna PCR (qPCR) je metóda, ktorá umožňuje vizualizáciu a kvantifikáciu amplifikácie DNA v reálnom čase za použitia fluorescenčných chemikálií. Umožňuje presnú kvantifikáciu špecifických nukleových kyselín aj v prípade, ak sú vzorky vo veľmi nízkej koncentrácií (Pastoráková & Petrovič 2016).

Na detekciu prítomnosti *A. phagocytophilum* vo vzorkách sme amplifikovali 77-bp dlhý úsek génu *msp2* (z angl. major surface protein) (Courtney *et al.* 2004, Svitálková *et al.* 2015). Na PCR analýzu sme si najprv pripravili PCR mix v PCR boxe v sterilných podmienkach. Potrebné chemikálie sme dali rozmraziť na izbovú teplotu a potom s nimi ďalej pracovali. Na prípravu PCR mixu sme použili komerčný PCR kit SuperHot Master Mix (BIORON, Nemecko). Zloženie reakčnej zmesi PCR mixu na jednu vzorku je zobrazené v Tabuľke 9.

Tabuľka 9. Príprava objemov potrebných pre PCR mix na 1 vzorku.

SuperHot Master Mix (2x)	12,5 µl
$MgCl_2$ (100mM)	2,6 µl
ApMSP2f (10 µM)	2,3 µl
ApMSP2r (10 µM)	2,3 µl
Próba ApMSP2p – FAM-TAMARA (10 µM)	0,3 µl

Hotový PCR mix sme zvortexovali a odpipetovali do vopred pripravených 0,2 ml PCR stripov po 20 µl do každej mikroskúmavky v stripe. Stripy sme preložili do stojana a v druhom laboratóriu sme pridali po 5 µl PCR produktu. Do posledných dvoch mikroskúmaviek v stripe sme napipetovali 5 µl NF vody (negatívna kontrola) a pozitívnu vzorku.

Primery použité na amplifikáciu úseku génu msp2 *A. phagocytophilum*:
ApMSP2f (5´-ATGGAAGGTAGTGTTGGTTATGGTATT-3´)
ApMSP2r (5´-TTGGTCTTGAAGCGCTCGTA-3´)

Komplementárna próba TaqMan:
ApMSP2p TaqMan probe (5´-TGGTGCCAGGGTTGAGCTTGAGATTG-3´),
značená 5'-FAM – TAMRA-3'
Vzorky s objemom 25 µl sme vložili do termocykléra (CFX96 Real-Time PCR System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).
Podmienky PCR reakcie:
- úvodná denaturácia pri 94^{o} C, 2 minúty
- 39 cyklov denaturácie pri 94^{o} C, 15 sekúnd a anelácia pri 60 ^{o} C, 1 minúta

Na vyhodnotenie výsledkov sme použili program CFX Manager (Bio-Rad, CA, USA), do ktorého sme zapísali čísla vzoriek. Pri vyhodnocovaní výsledkov sme sledovali ich Ct (threshold cycle), či bol nárast exponenciálny a ich Ct-hodnota bola nižšia ako 37,5, vtedy sa vzorky považovali za pozitívne.

3 VÝSLEDKY

3.1 Výskyt a druhové zloženie kliešťov na hostiteľoch

V období od októbra 2018 do decembra 2019 bolo zozbieraných spolu 584 kliešťov. Prevažne boli získané veterinárnymi lekármi priamym odberom zo zaklieštеného zvieraťa, alebo majiteľmi zvierat. Kliešte sa zbierali zo psov, mačiek a koní z čoho najviac ich bolo zozbieraných zo psov v počte 315 jedincov, potom z mačiek v počte 164 jedincov a z koní v počte 105 jedincov. Druhové zloženie kliešťov zozbieraných zo psov bolo nasledovné: *Ixodes ricinus* v celkovom počte 220 jedincov (69,84 %) (Tab. 10), *Ixodes hexagonus* v celkovom počte 10 jedincov (3,17 %) (Tab. 11), *Haemaphysalis concinna* v celkovom počte 6 jedincov (1,90 %) (Tab. 12) a *Dermacento reticulatus* v celkovom počte 79 jedincov (25,07 %) (Tab. 13). Z mačiek sa získali druhy *I. ricinus* v počte 151 jedincov (92,07 %) (Tab. 10), *I. hexagonus* v počte 3 dospelé samičky (1,82 %) (Tab. 11), *H. concinna* v počte 6 lariev (3,65 %) (Tab. 12) a *D. reticulatus* v počte 4 jedince (2,43 %) (Tab. 13). Z koní bol zozbierané druhy *I. ricinus* v počte dvoch dospelých samičiek (1,90 %) a *D. reticulatus* v počte 103 jedincov (98,09 %), len z lokalít Gajary a Studienka.

Kliešte zo psov a mačiek boli zbierané v okresoch Senica, Malacky, Pezinok, Senec, Bratislava, Dunajská Streda a Nové Zámky. Najviac získaných kliešťov druhu *I. ricinus* bolo z okresov Bratislava a Senec a najmenej z okresu Komárno, odkiaľ sme nemali ani jedného kliešťa tohto druhu. Najviac získaných kliešťov druhu *D. reticulatus* bolo z okresu Malacky. Kliešte druhu *I. hexagonus* a *H. concinna* boli získané len z okresu Senec, Bratislava a Nové Zámky.

Tabuľka 10. Výskyt kliešťov druhu *Ixodes ricinus* cicajúcich na psoch a mačkách na juhozápadnom Slovensku.

	Pes			Mačka		
Okres	**Samičky**	**Samčeky**	**Nymfy**	**Samičky**	**Samčeky**	**Nymfy**
Senica	9	2	0	16	1	0
Malacky	14	2	0	11	4	0
Pezinok	9	0	0	3	0	0
Senec	49	2	1	32	2	1
Bratislava	52	1	1	31	5	0
D. streda	23	2	0	30	7	2
Nové Zámky	40	13	0	6	0	0
Komárno	0	0	0	0	0	0
Celkom	196	22	2	129	19	3

Tabuľka 11. Výskyt kliešťov druhu *Ixodes hexagonus* cicajúcich na psoch a mačkách na juhozápadnom Slovensku.

	Pes			Mačka		
Okres	**Samičky**	**Samčeky**	**Nymfy**	**Samičky**	**Samčeky**	**Nymfy**
Senica	0	0	0	0	0	0
Malacky	0	0	0	0	0	0
Pezinok	0	0	0	0	0	0
Senec	0	0	9	0	0	0
Bratislava	0	0	0	3	0	0
Dunajská streda	0	0	0	0	0	0
Nové Zámky	1	0	0	0	0	0
Komárno	0	0	0	0	0	0
Celkom	1	0	9	3	0	0

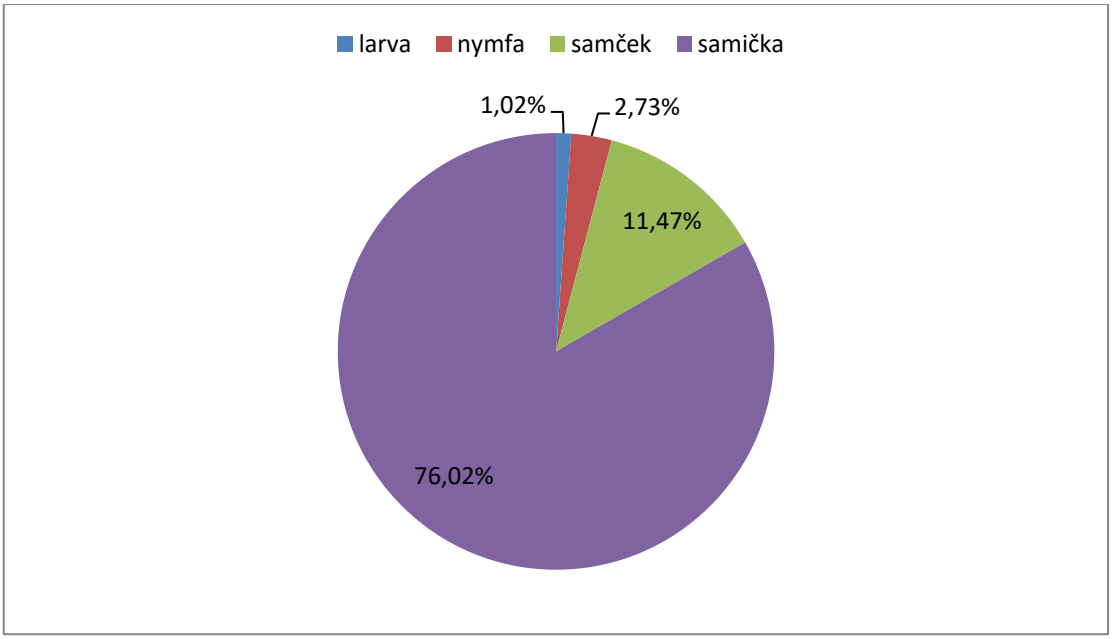
Tabuľka 12. Výskyt kliešťov druhu *Haemaphysalis concinna* cicajúcich na psoch a mačkách na juhozápadnom Slovensku.

	Pes			Mačka			
Okres	**Samičky**	**Samčeky**	**Nymfy**	**Samičky**	**Samčeky**	**Nymfy**	**Larvy**
Senica	0	0	0	0	0	0	0
Malacky	0	0	0	0	0	0	0
Pezinok	0	0	0	0	0	0	0
Senec	1	1	0	0	0	0	0
Bratislava	1	0	0	0	0	0	0
Dunajská streda	0	0	0	0	0	0	6
Nové Zámky	1	1	1	0	0	0	0
Komárno	0	0	0	0	0	0	0
Celkom	3	2	1	0	0	0	6

Tabuľka 13. Výskyt kliešťov druhu *Dermacentor reticulatus* cicajúcich na psoch a mačkách na juhozápadnom Slovensku.

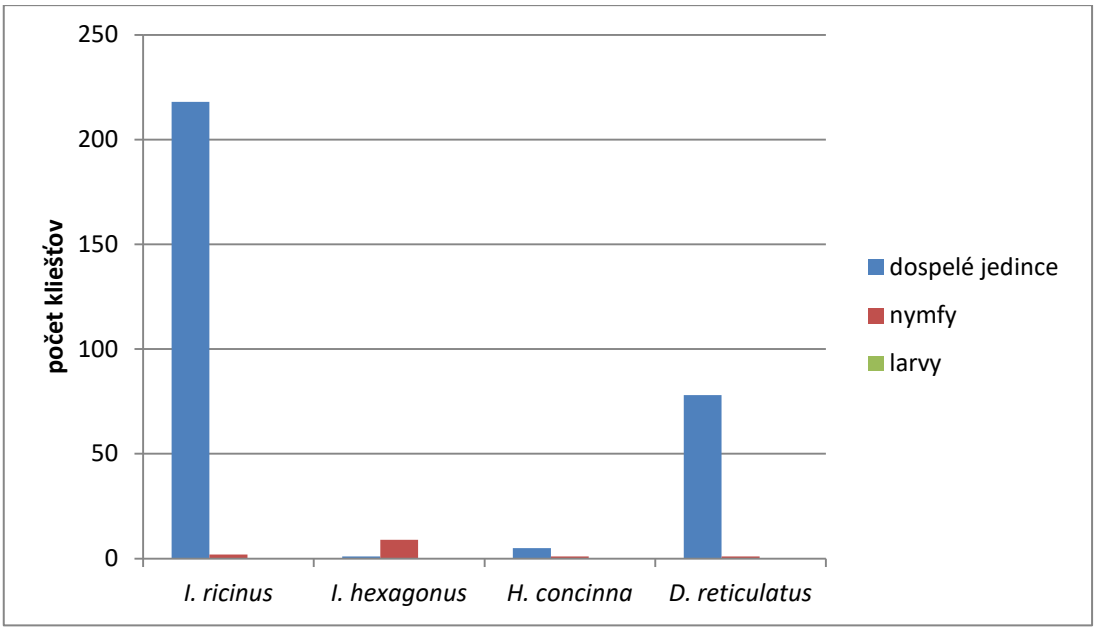
	Pes			Mačka		
Okres	**Samičky**	**Samčeky**	**Nymfy**	**Samičky**	**Samčeky**	**Nymfy**
Senica	23	9	0	3	1	0
Malacky	1	3	0	0	0	0
Pezinok	0	0	0	0	0	0
Senec	4	0	0	0	0	0
Bratislava	1	1	1	0	0	0
Dunajská streda	5	2	0	0	0	0
Nové Zámky	20	5	0	0	0	0
Komárno	1	3	0	0	0	0
Celkom	55	23	1	3	1	0

Celkovo boli vývinové štádia kliešťov na domácich zvieratách zastúpené v počte 511 dospelých jedincov, z toho bolo 444 samičiek a 67 samčekov, 16 nýmf a 6 lariev, čo znamená, že prevažnú väčšinu zozbieraných kliešťov tvorili dospelé samičky 76,02 % (Obr. 25).



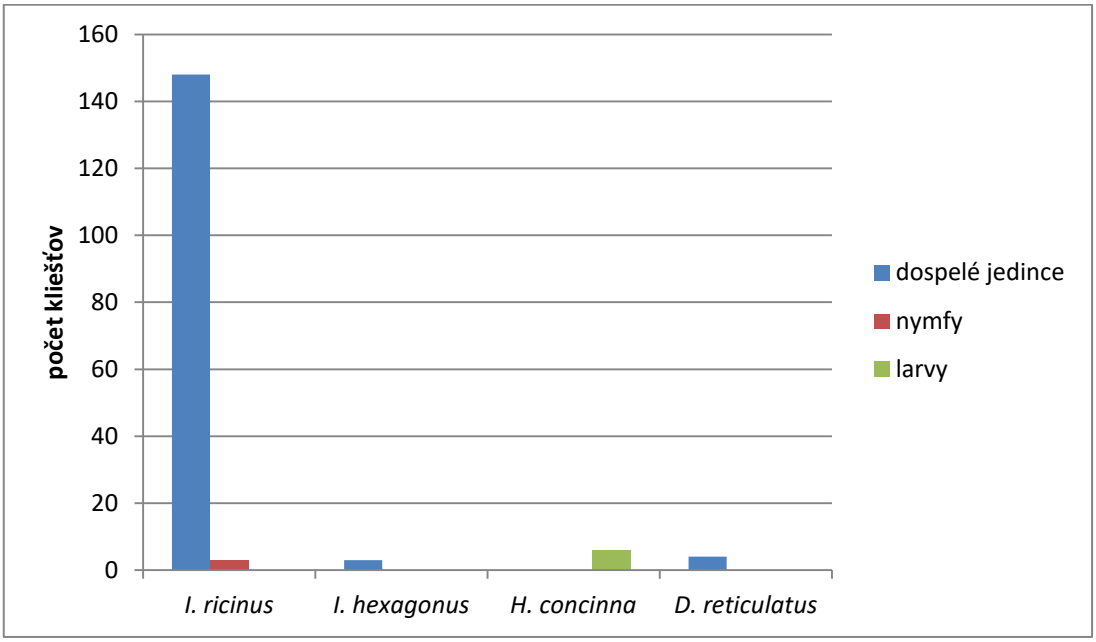
Obrázok 25. Percentuálne zastúpenie vývinových štádií všetkých kliešťov na domácich zvieratách na juhozápadnom Slovensku.

Vývinové štádia kliešťov druhu *I. ricinus* cicajúcich na psoch boli zastúpené v počte 218 dospelých jedincov, z toho bolo 196 samičiek a 22 samčekov a 2 nymfy. Druh *I. hexagonus* bol zastúpený v počte jednej samičky a deviatich nýmf. Druh *H. concinna* bol zastúpený v počte troch samičiek, dvoch samčekov a jednej nymfy a druh *D. reticulatus* bol zastúpený v počte 78 dospelých jedincov, z toho 55 samičiek a 23 samčekov a jedna nymfa (Obr. 26).



Obrázok 26. Zastúpenie vývinových štádií jednotlivých druhov kliešťov cicajúcich na psoch.

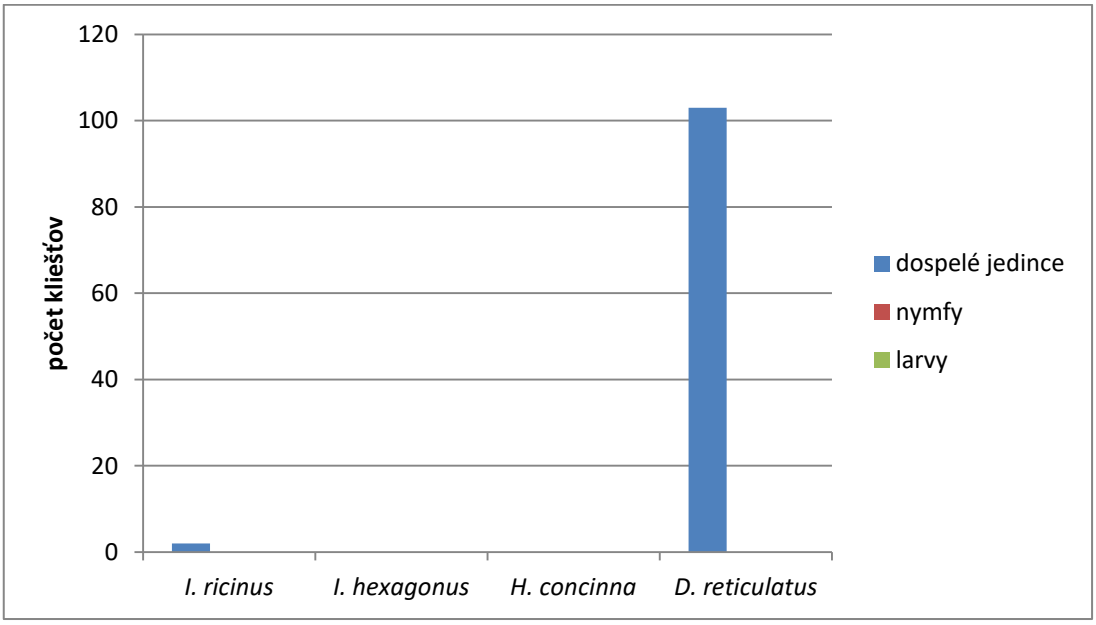
Vývinové štádia kliešťov druhu *I. ricinus* cicajúcich na mačkách boli zastúpené v počte 148 dospelých jedincov, z toho bolo 129 samičiek a 19 samčekov a 3 nymfy. Druh *I. hexagonus* bol zastúpený v počte troch samičiek. Druh *H. concinna* bol zastúpený v počte 6 lariev a druh *D. reticulatus* bol zastúpený v počte 3 dospelých samičiek a jedného samčeka (Obr. 27).



Obrázok 27. Zastúpenie vývinových štádií jednotlivých druhov kliešťov cicajúcich na mačkách.

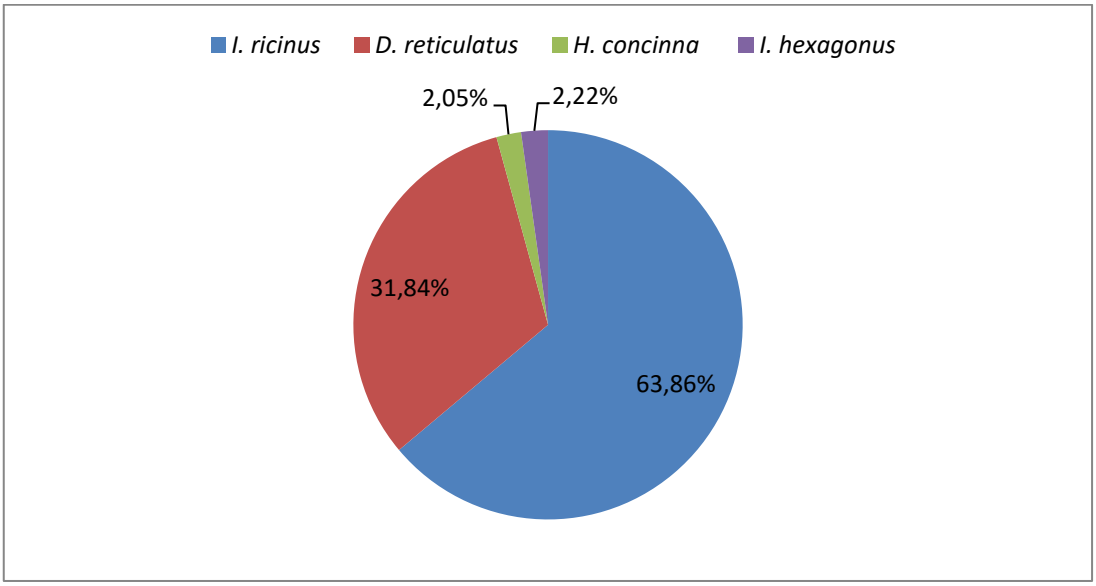
Vývinové štádia kliešťov druhu *I. ricinus* cicajúcich na koňoch boli zastúpené v počte 2 dospelých samičiek. Druhy *I. hexagonus* a *H. concinna* sa na koňoch nevyskyto-

vali a druh *D. reticulatus* bol zastúpený v počte 103 dospelých jedincov, z toho 54 samičiek a 49 samčekov (Obr. 28).



Obrázok 28. Zastúpenie vývinových štádií jednotlivých druhov kliešťov cicajúcich na koňoch.

Najväčšie zastúpenie mal druh *I. ricinus* v počte 373/584 (63,86 %), čo znamená, že viac ako polovicu z celkového počtu zozbieraných kliešťov predstavoval tento druh. Druhým najviac sa vyskytujúcim druhom bol *D. reticulatus* 186/584 (31,84 %). Menej boli zastúpené druhy *H. concinna*, ktorý sa vyskytoval v počte 12/584 (2,05 %) a *I. hexagonus* v počte 13/584 (2,22 %) (Obr. 29).

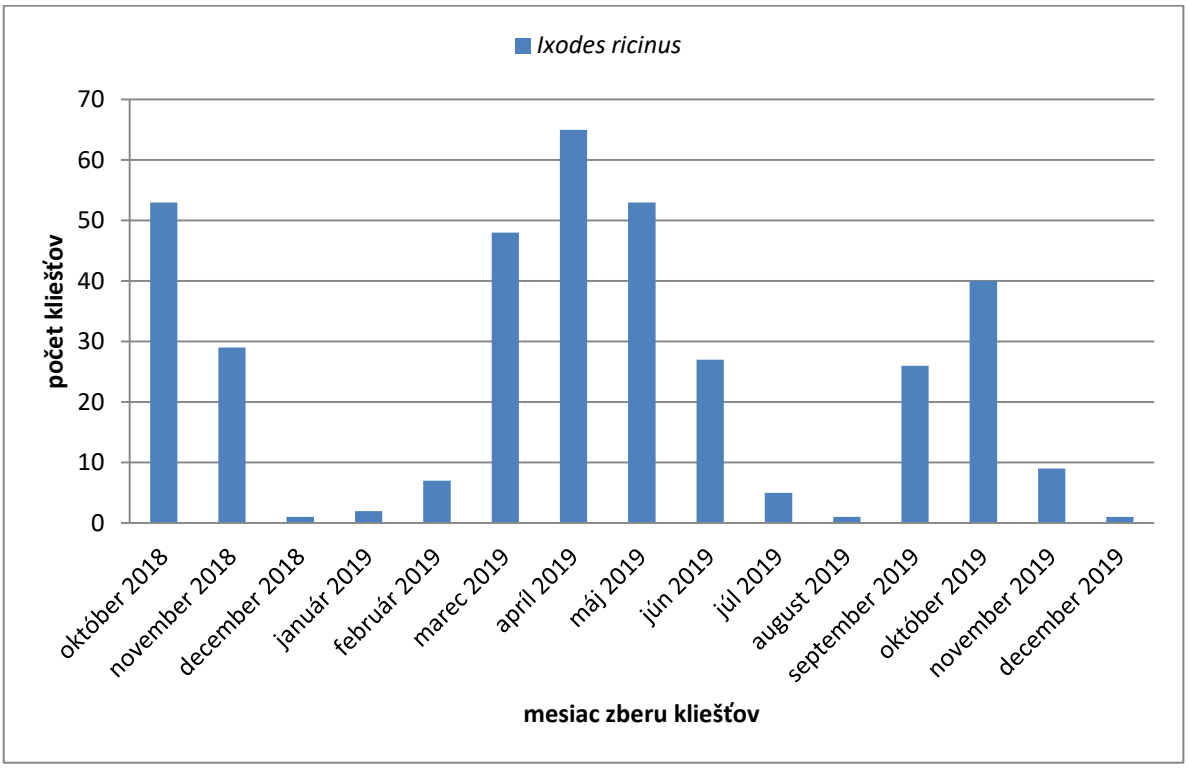


Obrázok 29. Percentuálne zastúpenie jednotlivých druhov kliešťov na domácich zvieratách na juhozápadnom Slovensku.

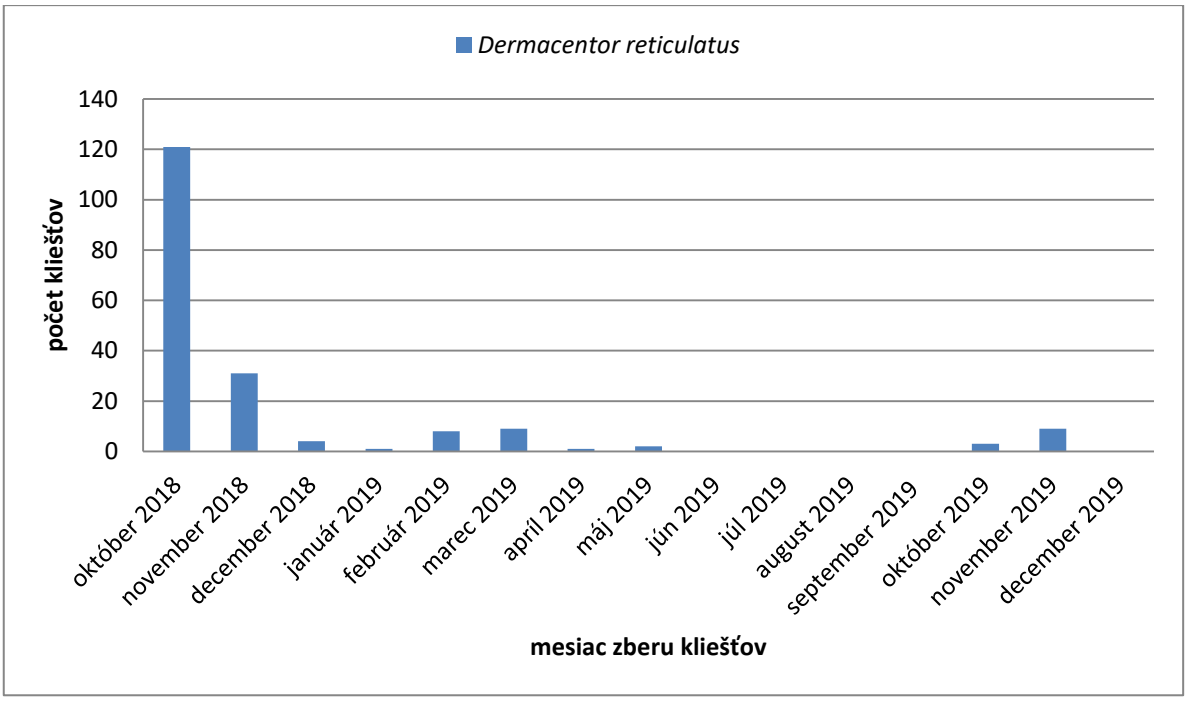
3.2 Sezónny výskyt kliešťov na domácich zvieratách na juhozápadnom Slovensku

Na základe údajov o dátume, kedy bol kliešť odobratý zo zvieraťa sme zostavili grafy o ich sezónnom výskyte, a to pre druhy *I. ricinus* a *D. reticulatus.* Zahrnuté boli všetky vývinové štádia zo všetkých druhov zvierat, z ktorých boli kliešte odobraté. Pre druhy *I. hexagonus* a *H. concinna* sme grafy ich sezónneho výskytu nezostavovali z dôvodu ich nízkeho počtu.

Z uvedených grafov môžeme vidieť, že druh *I. ricinus* bol najpočetnejšie zastúpený v roku 2018 v mesiacoch október a november a v roku 2019 v jarných mesiacoch marec, apríl, máj a jún a v jesenných mesiacoch september a október. V novembri už je vidieť pokles výskytu tohto kliešťa (Obr. 30). Graf sezónneho výskytu kliešťa *I. ricinus* dokazuje jeho dvojvrcholovú aktivitu počas roka v jarných a jesenných mesiacoch. Druh *D. reticulatus* sa najviac vyskytoval v roku 2018 v mesiacoch október a november, v roku 2019 bol počet zozbieraných kliešťov menší ale nárast bol v mesiacoch február a marec, október a november (Obr. 31).



Obrázok 30. Sezónny výskyt kliešťov druhu *I. ricinus* na domácich zvieratách na juhozápadnom Slovensku



Obrázok 31. Sezónny výskyt kliešťov druhu *D. reticulatus* na domácich zvieratách na juhozápadnom Slovensku.

3.2 Molekulárna detekcia *Babesia* spp.

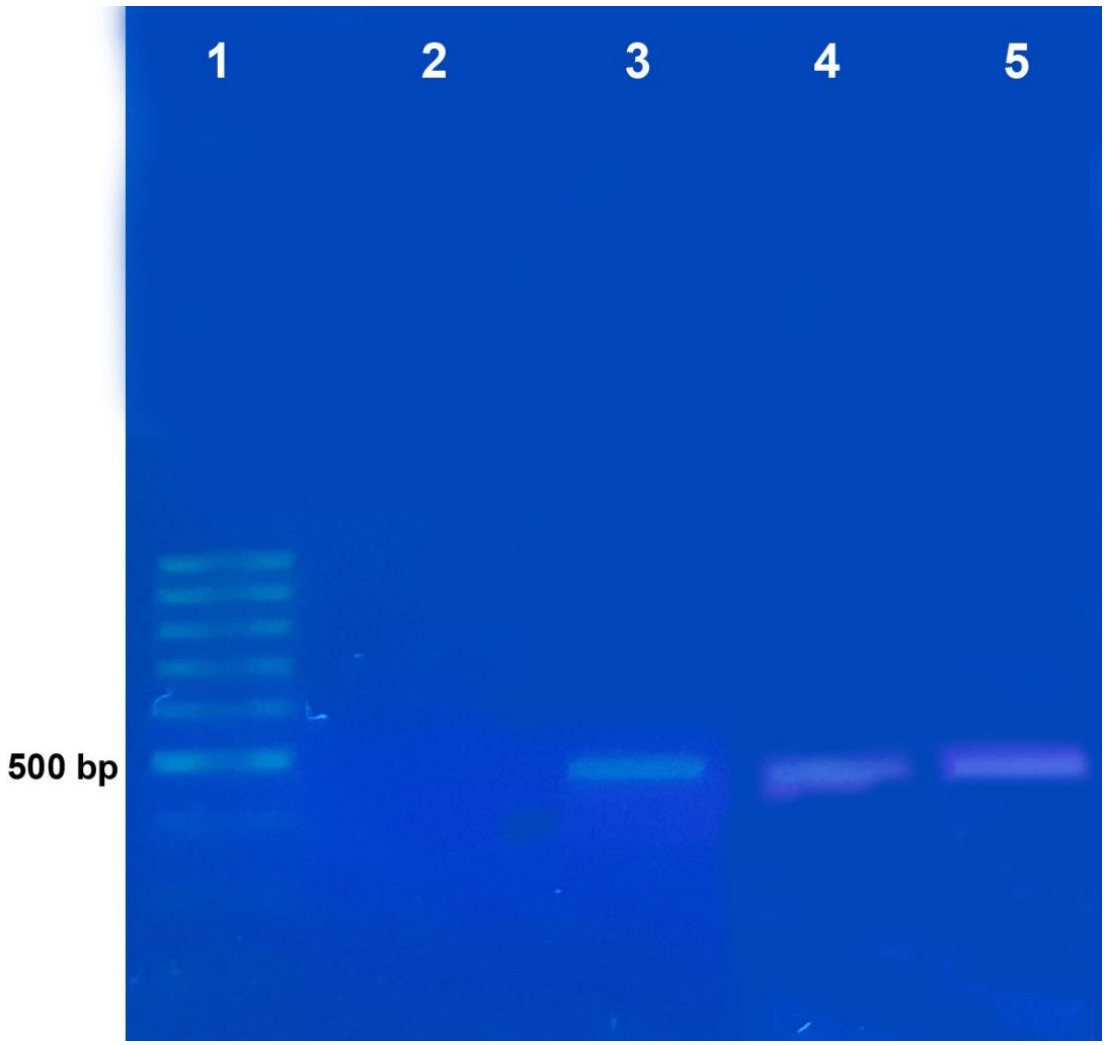
Na molekulárnu detekciu parazita *Babesia* spp. sme použili vzorky kliešťov, ktoré parazitovali psy, mačky a kone, ktoré sme získali od veterinárnych lekárov a majiteľov zvierat. Spolu bolo vyšetrených 366 kliešťov druhov *I. ricinus, I. hexagonus, H. concinna* a *D. reticulatus*. Na detekciu sme použili vzorky krvi získané z veterinárnej kliniky Mavet – Malacky. Vyšetrili sme spolu 345 vzoriek krvi.

Pozitívnych bolo 21 kliešťov (5,73 %), z toho 15 samičiek (4,09 %) a 6 samčekov (1,63 %). Z toho bolo pozitívnych 9 jedincov druhu *I. ricinus* (2,45 %) a 12 jedincov druhu *D. reticulatus* (3,27 %). Zo psov sme získali pozitívnych 5 jedincov druhu *I. ricinus* (1,36 %), a to z lokalít Bratislava – Dlhé Diely, Senica, Nový Život, Dunajská Streda a Most pri Bratislave a 11 jedincov druhu *D. reticulatus* (3 %), a to z lokalít Lakšárska Nová Ves, Senica, Bratislava, Nové Zámky, Kollárovo a Studienka. Z mačiek boli pozitívne 4 kliešte druhu *I. ricinus* (1,09 %), a to z lokalít Most pri Bratislave, Dunajská Streda a Malacky. Z koní bol pozitívny jeden jedinec *D. reticulatus* (0,27 %) z lokality Gajary (Tab. 14).

Po amplifikácií fragmentu 18S rRNA génu pre *Babesia* spp. sa podarilo osekvenovať so 100 % zhodou desať vzoriek. V kliešťoch druhu *I. ricinus*, ktoré sme získali zo psov a mačiek sme detegovali druh *Babesia microti* (Obr. 32). Jeden jedinec tohto druhu zo psa

bol pozitívny na druh *Babesia canis canis*. V jedincoch *D. reticulatus* zozbieraných zo psov a koní sme detegovali druh *B. canis canis.* Ostatné sekvencie, ktoré na základe porovnania so sekvenciami v GenBank nevykazovali vysoké percento zhody so žiadnym iným druhom Piroplasmida, uvádzame ako *Babesia* spp. (Tab. 14).

Z krvi bola pozitívna jedna vzorka (0,28 %), odobratá zo psa z lokality Studienka, kde bol potvrdený druh *B. canis canis* (Obr. 32).



Obrázok 32. Vizualizácia fragmentu 18S rRNA génu *Babesia microti* v pozitívnej vzorke kliešťa *Ixodes ricinus* a *Babesia canis canis* v pozitívnej vzorke krvi psa na agarózovom géli. Dráhy (z ľava do prava): 1 – GeneRuler 100 bp DNA Ladder, 2 – negatívna kontrola, 3 – pozitívna kontrola, 4 – *B. microti*, 5 - *B. canis canis.*

Tabuľka 14. Prehľad kliešťov zozbieraných zo psov, mačiek a koní, v ktorých sa detegovala prítomnosť DNA *Babesia* spp.

Druh zvieraťa	Lokalita	Dátum	Kliešť	Druh babézie
Pes	Senica	Október 2018	*I. ricinus*	*B. microti*
Pes	Bratislava – Dlhé Diely	November 2018	*I. ricinus*	*Babesia* spp.
Pes	Most pri Bratislave	Apríl 2019	*I. ricinus*	*B. microti*
Pes	Dunajská Streda	Máj 1019	*I. ricinus*	*B. microti*
Pes	Nový Život	Október 2019	*I. ricinus*	*B. canis canis*
Pes	Lakšárska Nová Ves	Október 2018	*D. reticulatus*	*Babesia* spp.
Pes	Senica	Október 2018	*D. reticulatus*	*Babesia* spp.
Pes	Senica	Október 2018	*D. reticulatus*	*Babesia* spp.
Pes	Senica	Október 2018	*D. reticulatus*	*Babesia* spp.
Pes	Nové Zámky	Október 2018	*D. reticulatus*	*B. canis canis*
Pes	Bratislava	November 2018	*D. reticulatus*	*Babesia* spp.
Pes	Nové Zámky	November 2018	*D. reticulatus*	*Babesia* spp.
Pes	Studienka	November 2018	*D. reticulatus*	*Babesia* spp.
Pes	Kollárovo	Február 2019	*D. reticulatus*	*B. canis canis*
Pes	Lakšárska Nová Ves	Marec 2019	*D. reticulatus*	*Babesia* spp.
Pes	Lakšárska Nová Ves	Marec 2019	*D. reticulatus*	*Babesia* spp.
Mačka	Most pri Bratislave	Október 2018	*I. ricinus*	*Babesia* spp.
Mačka	Dunajská Streda	Máj 1019	*I. ricinus*	*B. microti*
Mačka	Dunajská Streda	Jún 2019	*I. ricinus*	*B. microti*
Mačka	Malacky	Jún 2019	*I. ricinus*	*B. microti*
Kôň	Gajary	Október 2018	*D. reticulatus*	*B. canis canis*

Na základe nami získaných sekvencií fragmentu génu 18S rRNA vybraných pozitívnych vzoriek a vybraných sekvencií *B. microti*, ktoré sú uložené v GenBank, sme zostrojili fylogenetický strom, v ktorom všetky sekvencie tvoria jeden klaster. Tým sme potvrdili totožnosť nami detegovanej babézie s izolátmi z hlodavcov zo Slovenska ako aj patogénnym kmeňom Jena z ľudskej krvi (Obr. 33). Pomocou BLAST analýzy sme potvrdili 100 % zhodu našich sekvencií so sekvenciami fragmentu 18S rRNA *B. microti* KU550682 (číslo GenBank), izolát z hlodavca *Apodemus flavicollis* a KU362895, izolát z hlodavca

Microtus arvalis, obe pôvodom zo Slovenska, a EF413181, izolát z ľudskej krvi z Nemecka.

Obrázok 33. Fylogenetický strom sekvencie 18S rRNA *Babesia microti* zostrojený pomocou metódy maximálnej vierohodnosti (maximum likelihood) a modelu Tamura-Nei**.** Metóda zobrazuje fylogenetický strom s najvyššou pravdepodobnosťou vierohodnosti. V konečnom súbore bolo celkovo 474 pozícií. Percento stromov, v ktorých sa zoskupili združené taxóny sú zobrazené vedľa vetiev. Počiatočný strom/stromy pre heuristické vyhľadávanie boli získané automaticky použitím algoritmov Neighbor-Join a BionNJ pre maticu párových vzdialeností odhadovaných pomocou princípu modelu Tamura-Nie a výber topológie s vyššou hodnotou pravdepodobnosti vierohodnosti. Diskrétna distribúcia Gamma bola použitá na modelovanie vývojových rozdielov medzi miestami (5 kategórii (+G, parameter = 186,4131)). Strom sme nakreslili do mierky s dĺžkami vetiev meranými v počte substitúcií na mieste. Analýza zahŕňala 9 nukleotidových sekvencií. Všetky polohy

obsahujúce medzery a chýbajúce údaje boli eliminované (možnosť kompletnej delécie). Mierka znázorňuje 50 substitúcií na 100 nukleotidových pozícii. Izoláty získané v našej práci sú označené hviezdičkami. Izoláty uložené v databáze GenBank sú označené číslom (accession number), hostiteľom a krajinou pôvodu. *Cardiosporidium cionae* (podľa Schnittger *et al.* 2012) slúži ako vonkajšia skupina (outgroup) na zakorenenie stromu.

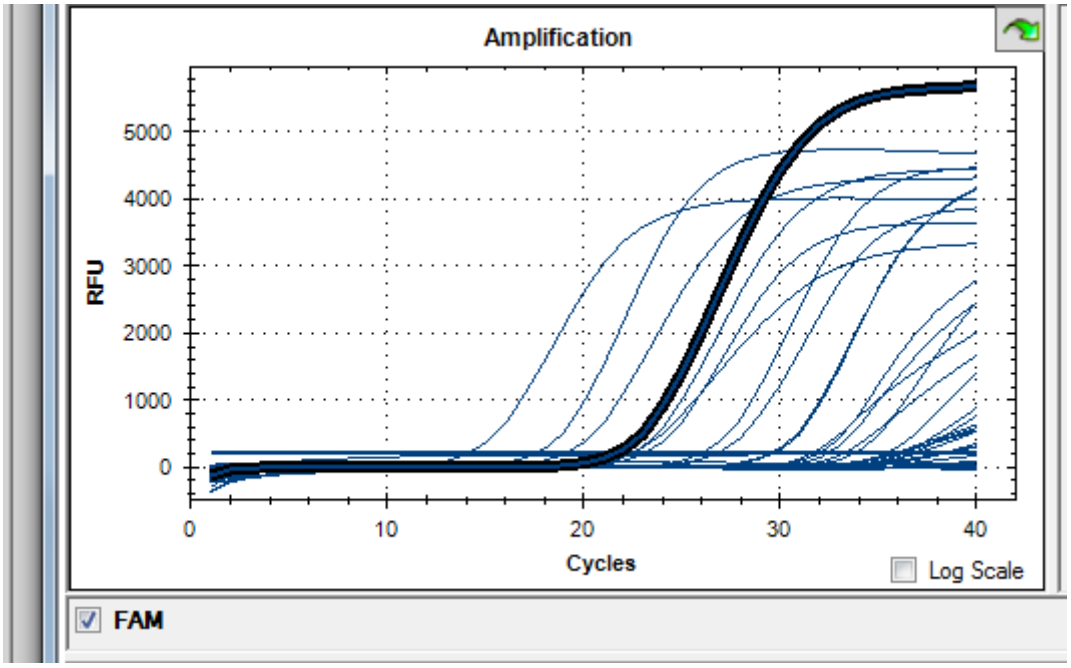
Na základe vybraných sekvencií pozitívnych vzoriek *B. canis canis* a sekvencií, ktoré sú uložené v GenBank, sme zostrojili fylogenetický strom, v ktorom väčšina sekvencií tvorí jeden klaster. Dve sekvencie získané z *D. reticulatus* z koňa a zo psa z Kollárova tvoria subklaster. Potvrdili sme tak totožnosť *B. canis canis* v niektorých našich izolátoch s izolátmi z krvi psov zo Slovenska, Českej republiky, Chorvátska a Poľska (Obr. 34). Pomocou BLAST analýzy sme potvrdili 100 % zhodu našich sekvencií so sekvenciami fragmentu 18S rRNA *B. canis canis* MK508874, izolát z krvi psa zo Slovenska, KY021188, izolát z krvi psa z Českej republiky, KY359360, izolát z krvi psa z Chorvátska a KT844912, izolát z krvi psa z Poľska.

Obrázok 34. Fylogenetický strom sekvencie 18S rRNA *Babesia canis canis* zostrojený pomocou metódy maximálnej vierohodnosti (maximum likelihood) a modelu Tamura-Nei. Metóda zobrazuje fylogenetický strom s najvyššou pravdepodobnosťou vierohodnosti. V konečnom súbore bolo celkovo 330 pozícií. Percento stromov, v ktorých sa zoskupili združené taxóny sú zobrazené vedľa vetiev. Počiatočný strom/stromy pre heuristické vyhľadávanie boli získané automaticky použitím algoritmov Neighbor-Join a BionNJ pre maticu párových vzdialeností odhadovaných pomocou princípu modelu Tamura-Nie a výber topológie s vyššou hodnotou pravdepodobnosti vierohodnosti. Diskrétna distribúcia Gamma bola použitá na modelovanie vývojových rozdielov medzi miestami (5 kategórii (+G, parameter = 200,0000)). Strom sme nakreslili do mierky s dĺžkami vetiev meranými v počte substitúcií na mieste. Analýza zahŕňala 11 nukleotidových sekvencií. Všetky polohy obsahujúce medzery a chýbajúce údaje boli eliminované (možnosť kompletnej delécie). Mierka znázorňuje 5 substitúcií na 100 nukleotidových pozícii. Izoláty získané v našej práci sú označené hviezdičkami. Izoláty uložené v databáze GenBank sú označené číslom (accession number), hostiteľom a krajinou pôvodu. *Cardiosporidium cionae* (podľa Schnittger et al. 2012) slúži ako vonkajšia skupina (outgrooup) na zakorenenie stromu.

3.3 Molekulárna detekcia *Anaplasma phagocytophilum*

Na detekciu prítomnosti *A. phagocytophilum* vo vzorkách sme amplifikovali 77-bp dlhý úsek génu msp2 pomocou metódy real-time PCR. Na detekciu sme urobili výber vzoriek z kliešťov samičiek *I. ricinus* (260 vzoriek) a *I. hexagonus* (3 vzorky) získaných zo psov a mačiek. Spolu sme otestovali 263 vzoriek kliešťov, z toho 139 vzoriek kliešťov bolo zo psov a 124 z mačiek. Prítomnosť *A. phagocytophilum* sme detegovali v 50 kliešťoch (19,01 %) druhu *I. ricinus*, z ktorých 23 jedincov sme získali zo psov (8,74 %) z lokalít Dunajská Streda, Bratislava – Dúbravka, Stupava, Most pri Bratislava, Zálesie, Malinovo, Dolné Janíky, Pezinok, Senica, Bratislava – Dlhé Diely, Jablonica a Plavecký Štvrtok (Tab. 15) a 27 jedincov sme získali z mačiek (10,26 %) z lokalít Bellova Ves, Dunajská Streda, Lakšárska Nová Ves, Bratislava – Dlhé Diely, Sobotište, Malinovo, Bratislava – Pekná cesta, Most pri Bratislave a Slovenský Grob (Tab. 16). Príklad pozitívnej detekcie *A. phagocytophilum* v našich vzorkách je zobrazený na Obr. 35.

Na detekciu prítomnosti *A. phagocytophilum* v krvi zvierat sme takisto spravili výber a spolu sme otestovali 155 vzoriek zo psov a mačiek. Pozitívna nám nevyšla ani jedna vzorka (0 %).



Obrázok 35. Grafické znázornenie priebehu amplifikácie fragmentu génu *msp2* *A. phagocytophilum* počas real-time PCR v pozitívnych vzorkách z kliešťov *I. ricinus* z mačiek. Tmavo označená krivka je pozitívna vzorka otestovaného kliešťa, ktorej hodnota ct = 21,71.

Tabuľka 15. Kliešte zozbierané zo psov pozitívne na *A. phagocytophilum*.

Lokalita	Dátum	Druh kliešťa
Jablonica	Október 2018	*I. ricinus*
Senica	Október 2018	*I. ricinus*
Senica	Október 2018	*I. ricinus*
Senica	Október 2018	*I. ricinus*
Plavecký Štvrtok	November 2018	*I. ricinus*
Bratislava – Dlhé Diely	November 2018	*I. ricinus*
Pezinok	Marec 2019	*I. ricinus*
Dunajská Streda	Marec 2019	*I. ricinus*
Zálesie	Marec 2019	*I. ricinus*
Bratislava – Dúbravka	Apríl 2019	*I. ricinus*
Bratislava – Dúbravka	Apríl 2019	*I. ricinus*
Bratislava – Dlhé Diely	Apríl 2019	*I. ricinus*
Zálesie	Apríl 2019	*I. ricinus*
Zálesie	Apríl 2019	*I. ricinus*
Zálesie	Apríl 2019	*I. ricinus*
Dolné Janíky	Apríl 2019	*I. ricinus*
Most pri Bratislave	Apríl 2019	*I. ricinus*
Stupava	Máj 2019	*I. ricinus*
Stupava	Máj 2019	*I. ricinus*
Pezinok	Máj 2019	*I. ricinus*
Dunajská Streda	Máj 2019	*I. ricinus*
Malinovo	Jún 2019	*I. ricinus*
Most pri Bratislave	September 2019	*I. ricinus*

Tabuľka 16. Kliešte zozbierané z mačiek pozitívne na *A. phagocytophilum*.

Lokalita	Dátum	Druh kliešťa
Studienka	Október 2018	*I. ricinus*
Bratislava	Október 2018	*I. ricinus*
Bratislava	Október 2018	*I. ricinus*
Bratislava – Pekná cesta	November 2018	*I. ricinus*
Dunajská Streda	Február 2019	*I. ricinus*
Lakšárska Nová Ves	Marec 2019	*I. ricinus*
Dunajská Streda	Marec 2019	*I. ricinus*
Dunajská Streda	Marec 2019	*I. ricinus*
Lakšárska Nová Ves	Apríl 2019	*I. ricinus*
Lakšárska Nová Ves	Apríl 2019	*I. ricinus*
Bratislava – Dlhé Diely	Apríl 2019	*I. ricinus*
Bratislava – Dlhé Diely	Apríl 2019	*I. ricinus*
Malinovo	Apríl 2019	*I. ricinus*
Sobotište	Apríl 2019	*I. ricinus*
Lakšárska Nová Ves	Máj 2019	*I. ricinus*
Lakšárska Nová Ves	Máj 2019	*I. ricinus*
Bratislava – Dlhé Diely	Máj 2019	*I. ricinus*
Dunajská Streda	Máj 2019	*I. ricinus*
Dunajská Streda	Máj 2019	*I. ricinus*
Dunajská Streda	Máj 2019	*I. ricinus*
Most pri Bratislave	Jún 2019	*I. ricinus*
Bratislava	September 2019	*I. ricinus*
Bellova Ves	September 2019	*I. ricinus*
Bellova Ves	September 2019	*I. ricinus*
Bellova Ves	September 2019	*I. ricinus*
Bratislava	Október 2019	*I. ricinus*
Slovenský Grob	Október 2019	*I. ricinus*

4 DISKUSIA

Cieľom diplomovej práce bolo zistiť druhové spektrum kliešťov, ktoré parazitujú domáce zvieratá na vybraných lokalitách juhozápadného Slovenska a v týchto kliešťoch sledovať molekulárnymi metódami výskyt a diverzitu niektorých kliešťami prenášaných mikroorganizmov. Spolupracovali sme s veterinárnymi ambulanciami aj majiteľmi zvierat od ktorých sme v období od októbra 2018 do decembra 2019 získali kliešte primárne zo psov a mačiek. Kliešte pochádzali z rôznych lokalít juhozápadného Slovenska (okres Komárno, Nové Zámky, Dunajská Streda, Bratislava, Senec, Malacky, Pezinok a Senica).

4.1 Druhové zloženie a sezónny výskyt kliešťov na domácich zvieratách na juhozápadnom Slovensku

Spolu sa nám podarilo zozbierať 584 kliešťov (315 zo psov, 164 z mačiek a 105 z koní). Dominoval druh *I. ricinus* (63,86 %), ale na zvieratách boli prichytené aj *I. hexagonus, D. reticulatus* a *H. concinna.* Najrozšírenejším a z epidemiologického hľadiska najdôležitejším kliešťom na území Slovenska je *I. ricinus*, čo sme potvrdili aj našou štúdiou. Aj Špitalská *et al.* (2014) a Kazimírová *et al.* (2016) potvrdili, že *I. ricinus* je na juhozápadnom Slovensku najviac sa vyskytujúci druh. *Dermacentor reticulatus* bol druhý najhojnejší (31,84 %). Tento druh je hneď po *I. ricinus* druhý najviac sa vyskytujúci kliešť v strednej Európe (Rubel *et al.* 2016, Földvári *et al.* 2016). Na Slovensku jeho areál rozšírenia predstavuje hlavne juhovýchod Slovenska pozdĺž rieky Latorica a juhozápad Slovenska pozdĺž rieky Dunaj (Nosek *et al.* 1972, Bullová *et al.* 2009, Karbowiak 2014).

Zo psov sme zozbierali najviac kliešťov druhu *I. ricinus* (69,84 %) a druhu *D. reticulatus* (25,07 %). Z mačiek sme získali najviac kliešťov druhu *I. ricinus* (92,07 %) a z koní najviac kliešťov druhu *D. reticulatus* (98,09 %). Naše výsledky sa zhodujú s výsledkami iných štúdií. Napríklad Nosek *et al.* (1967) uvádza, že medzi prirodzených hostiteľov *I. ricinus* patria aj domáce psy a mačky. Druh *D. reticulatus* sa v našej štúdii vyskytoval najviac na psoch a koňoch, čo sa zhoduje aj s výsledkami Karbowiaka (2014), ktorý uvádza, že prežúvavce, psy a kone sú hlavnými hostiteľmi dospelých jedincov tohto kliešťa.

Z vývinových štádií kliešťov bolo najviac zozbieraných samičiek (76,02 %), samčeky tvorili 11,47 %. Svojho hostiteľa samičky potrebujú nie len na príjem živín, ale predovšetkým na produkciu vajíčok. Samčeky nami zistených druhov kliešťov cicajú krv výnimočne (*I. ricinus*), alebo obmedzene (ostatné druhy), ale na hostiteľovi dochádza ku kopulácií so samičkou (Volf *et al.* 2007). Larvy *I. ricinus* ani *D. reticulatus* sa na sledovaných

zvieratách nevyskytovali vôbec. Je to preto, lebo larvy druhu *I. ricinus* neparazitujú nami vybrané zvieratá, čo potvrdzuje aj Nosek *et al.* (1967). Larvy druhu *D. reticulatus* sa radia medzi nidikolné (Földvári *et al.* 2016), teda žijú v hniezdach alebo norách, predovšetkým drobných cicavcov, zatiaľ čo dospelé jedince sú exofilné, t,j, na hostiteľov číhajú na vegetácii.

Pokiaľ ide o sezónny výskyt, *I. ricinus* bol na zvieratách najpočetnejšie zastúpený od marca do júna a v mesiacoch september - október. *Ixodes ricinus* je známy svojou bimodálnou aktivitou na jar a na jeseň (Anderson & Magnarelli 2008, Pangrácová *et al.* 2013), čo sme potvrdili aj v našej práci. Podobné výsledky prezentovali aj Kazimírová *et al.* (2016), ktorí zaznamenali vrchol aktivity kliešťa *I. ricinus* v jarných mesiacoch (apríl-jún) v rokoch 2011 - 2013 na dvoch lokalitách na juhozápadnom Slovensku (Bratislava a Fúgelka), a menší vrchol v septembri-októbri. Druh *D. reticulatus* je podľa Földvári *et al.* (2016) taktiež známy svojou bimodálnou aktivitou, kedy prvý vrchol nastáva v mesiacoch marec – apríl a druhý v mesiacoch september – október. Počas miernych zím môže tento druh byť aktívny aj v decembri a januári. Vrchol výskytu *D. reticulatus* na zvieratách sme v našej práci zaznamenali v mesiacoch február, marec, október a november.

4.2 Molekulárna detekcia *Babesia* spp.

Na molekulárnu detekciu parazita *Babesia* spp. sme vyšetrili kliešte druhov *I. ricinus, I. hexagonus, H. concinna* a *D. reticulatus,* ktoré parazitovali psy. mačky a kone. Pozitívnych bolo celkovo 5,73 % kliešťov, z toho 2,45 % *I. ricinus* a 3,27 % *D. reticulatus*. V kliešťoch *I. ricinus* zo psov a mačiek sme detegovali druh *Babesia microti.* V jedincoch *D. reticulatus* zozbieraných zo psov a koní sme detegovali druh *B. canis canis.* Infekciu parazitom *B. canis* sme potvrdili v jednej vzorke krvi psa z lokality Studienka. Z ústneho podania veterinárov sme sa dozvedeli, že v Studienke bolo potvrdených už viac prípadov babeziózy psov. Z tejto lokality sme okrem pozitívnej krvi prítomnosť parazita potvrdili aj v kliešťoch *D. reticulatus* čo naznačuje, že v Studienke sa nachádza ohnisko babeziózy psov.

Dermacentor reticulatus patrí k endemickým kliešťom Európy. Je v poradí druhý najviac rozšírený druh v strednej Európe a je hlavným vektorom patogénu *B. canis* (Rubel *et al.* 2016). Jeho areál rozšírenia sa v posledných rokoch zväčšuje a v súčasnosti je zaznamenaný na lokalitách, kde sa predtým nevyskytoval (Rubel *et al.* 2016, Földvári *et al.* 2016). Prvý autochtónny prípad babeziózy psov na Slovensku bol potvrdený v roku 2000, kedy v Košiciach priviezli na veterinárnu kliniku psa, ktorý vykazoval známky apatie,

zvracanie, nechuti do jedla a tmavého moču. Pes pochádzal z juhovýchodného Slovenska. Druhý prípad bol z toho istého roka, ale pes pochádzal z Čiernej nad Tisou a tretí prípad bol z roku 2001 z tej istej lokality. U všetkých troch prípadov bola mikroskopicky potvrdená prítomnosť *B. canis* v krvinkách (Chandoga *et al.* 2002). Na Slovensku odvtedy prebehlo niekoľko štúdií zameraných na sledovanie infekcie psov aj kliešťov týmto patogénom, nakoľko od roku 2004 kedy sa zaznamenala prvá epidémia babeziózy u psov, počet prípadov babeziózy psov sa zvýšil na rôznych lokalitách, najmä v južných oblastiach (Majláthová *et al.* 2011). V roku 2002 začal výskum, počas ktorého sa prvý krát na Slovensku molekulárnymi metódami zistila prítomnosť *B. canis* v kliešťovi *D. reticulatus* (Duh *et al.* 2006). Zber prebiehal v októbri metódou vlajkovania v lužných lesoch neďaleko obce Čunovo. Zozbieraných bolo spolu 113 kliešťov *D. reticulatus.* Autori DNA izolovali zo sto kliešťov a PCR metódou zistili prítomnosť *B. canis* v jednom zo sto testovaných kliešťov. Zistili teda relatívne nízke percento (1%) infekcie kliešťov babéziami, čo mohlo byť spôsobené buď nízkym počtom zozbieraných kliešťov, testovaním iba dospelých kliešťov alebo zozbierané kliešte niesli nízky počet babézií, ktoré nebolo možné detegovať použitou PCR metódou.

Majláthová *et al.* (2011) sa zamerala na zistenie miery infekcie patogénmi *B. canis canis* a *A. phagocytophilum* v kliešťoch *D. reticulatus* z vegetácie a z krvi psov v južných oblastiach Slovenska. Kliešte z vegetácie zbierali z lokalít so zvýšenou prítomnosťou psov, najmä parky pri sídliskách a pri riekach. Vyšetrili 87 vzoriek krvi psov, ktorí vykazovali klinické príznaky babeziózy. Až 80 vzoriek bolo pozitívnych na *B. canis canis,* ktorá bola potvrdená aj u 35,6 % dospelých jedincov kliešťa *D. reticulatus*. Získané sekvencie DNA zo vzoriek krvi vykazovali 99,7 % a z kliešťov *D. reticulatus* z vegetácie 99,4 % podobnosť s izolátmi *B. canis canis* z infikovaných psov v Chorvátsku. V štúdii Majláthovej *et al.* (2011) bola v šiestich vyšetrených psoch zistená prítomnosť *A. phagocytophilum,* pričom bol jeden pes bol pozitívny na oba patogény. V tejto štúdii bola prvýkrát na Slovensku zaznamenaná prítomnosť baktérie *A. phagocytophilum* v krvi psov.

Kubelová *et al.* (2011) metódou PCR-RFLP zisťovali prevalenciu *B. canis canis* v jeho prirodzenom vektore *D. reticulatus* v juhovýchodnej, juhozápadnej a západnej časti Slovenska. Najvyššiu prevalenciu zistili na východnom Slovensku v okolí Michaloviec (14,7 %), kým na juhozápade (okolie Gabčíkova) zistili výrazne nižšiu prevalenciu (2,3 %). Na Záhorskej nížine výskyt patogéna nezaznamenali. Touto štúdiou zistili, že východné Slovensko predstavuje oblasť s vysokým výskytom *B. canis*, zatiaľ čo západné Slovensko bolo bez výskytu. Řeháčková *et al.* (2016) potvrdili prítomnosť *B. canis*

v kliešťoch *D. reticulatus* odchytených z vegetácie (prevalencia 2,2 %) aj z kliešťov ktoré získali zo psov (prevalencia 4,8 %) z lokalít v okolí Komárna. V Bratislavskom kraji sledovali infekciu kliešťov *D. reticulatus* babéziami Vrbová (2016) a Vrbová *et al.* (2016) a parazity sa im podarilo detegovať len v kliešťoch ktoré cicali na psoch (prevalencia 5,3 %). Sekvencie zo získaných izolátov boli identické s druhom *B. canis,* pričom infikované kliešte získali zo psov z Malaciek, Bratislavy a Bernolákova, čím potvrdili aj nové lokality výskytu. V našej práci sme babéziami infikované kliešte *D. reticulatus* našli na ďalších lokalitách a potvrdili sme prítomnosť parazitov aj z lokalít na Záhorí, kde sa systematický výskum babeziózy psov zatiaľ nerobil.

Babesia microti, kmeň Jena, je patogénny druh pre ľudí a na štúdium druhu *B. microti* v kliešťoch *I. ricinus* a v rezervoárových hostiteľoch, ktorými sú drobné hlodavce, sa zamerali na východnom Slovensku Blaňarová *et al.* (2015) a na juhozápadnom Slovensku Hamšíková *et al.* (2016). Celková prevalencia tohto patogénu v kliešťoch z vegetácie bola nižšia než 1%, pričom na juhozápadnom Slovensku boli všetky vyšetrené kliešte infikované kmeňom Jena. O niečo vyššiu prevalenciu *B. microti* (1,63 %) v kliešťoch *I. ricinus* cicajúcich na psoch a mačkách sme zistili v našej práci a takisto sme potvrdili identitu s kmeňom Jena. Prítomnosť *B. microti* v *I. ricinus* získaných zo psov z Bratislavy potvrdili aj Selyemová *et al.* (2013) rovnako ako prítomnosť *Babesia* spp. v *D. reticulatus*. Na južnom Slovensku v okolí Komárna Řeháčková *et al.* (2016) zaznamenali doteraz najvyššiu prevalenciu *Babesia* spp. v kliešťoch *I. ricinus* cicajúcich na psoch - 12.5 %. V jednom prípade potvrdili identitu s *B. canis*.

V našej práci sme tiež potvrdili prítomnosť *B. canis canis* v jednom jedincovi *I. ricinus* zo psa. Prítomnosť *B. canis* v *I. ricinus* z vegetácie na juhozápadnom Slovensku zaznamenali Hamšíková *et al.* (2016) a na južnej Morave a západnom Slovensku Rybářová *et al.* (2017). Navyše, Rybářová *et al.* (2017) zistili že aj sekvencie DNA *Babesia* spp. z druhu *H. concinna* boli podobné so sekvenciami *B. canis.* Napriek uvedeným výsledkom a podľa dostupných informácií *I. ricinus* nebol potvrdený ako vektor pôvodcu babeziózy psov.

Podobne ako na Slovensku, ani v Českej republike psia babezióza nebola pôvodne autochtónne ochorenie. V roku 2010 sa problémom tohto patogénu zaoberali Konvalinová *et al.* (2012), ktorí vyšetrili 68 vzoriek krvi psov, ktorí neopustili republiku. Psy pochádzali z Břeclavi a Lanžhotu. Pomocou PCR metódy detegovali prítomnosť *B. canis* v piatich vzorkách (12,21 %). Na základe tejto štúdie sa problémom ochorenia babeziózy začali zaoberať Mitková *et al.* (2017). Ich výskum potvrdil prítomnosť *B. canis* v krvi psov

s prevalenciou 1 % na južnej Morave a 3 % v južných Čechách. Ich štúdia bola prvá, ktorá potvrdila autochtónu infekciu *B. canis* v psoch z Česka z lokalít, kde sa nachádza ich prirodzený vektor, *D. reticulatus*.

V Maďarsku sa babezióza psov radí medzi endemické už dlhé roky (Földvári *et al.* 2007). Prvú štúdiu na zistenie prítomnosti *B. canis* v kliešťoch *D. reticulatus* vykonali Földvári *et al.* (2007). Získali 144 vzoriek kliešťov z 54 psov. Pozitívnych ich bolo 43 na *Babesia* spp. Desať psov vykazovalo PCR pozitivitu na *Babesia* spp. a tri kliešte odobraté zo psov pozitívnych na babézie nevykazovali pozitivitu. Údaje tejto štúdie naznačili, že infikovaný pes nemusí prenášať infekciu aj na kliešte.

V Poľsku je *D. reticulatus* hlavný vektor *B. canis* endemický v severovýchodnej a strednej časti Poľska (Król *et al.* 2016). V rokoch 2013 – 2014 vykonali Król *et al.* (2016) štúdiu zameranú na výskyt druhov kliešťov parazitujúcich domáce zvieratá a prítomnosť patogénu *Babesia* spp v Poľsku meste Wrocław. Medzi dominantné druhy, ktoré sa vyskytovali na mačkách a psoch patrili dospelé jedince kliešťov *I. ricinus* a *D. reticulatus*. V našej štúdií sme získali podobné výsledky, kde taktiež medzi dominantné druhy kliešťov parazitujúce psy a mačky patrili *I. ricinus* a *D. reticulatus.* Król *et al.* (2016) zisťovali prítomnosť *B. canis* v kliešťoch z vegetácie, ktoré boli všetky negatívne, zatiaľ čo 9 % vzoriek krvi psov bolo pozitívnych na *Babesia* spp.

Z dôvodu rozširovania geografického areálu *D. reticulatus* vykonali Sprong *et al.* (2019) štúdiu, ktorá bola zameraná na sledovanie prítomnosti *B. canis* a iných patogénov v niekoľkých štátoch Európy, a to Belgicko, Nemecko, Holandsko a Veľká Británia. Zozbierali 1741 kliešťov *D. reticulatus.* Prítomnosť *B. canis* však potvrdili len v 16 vzorkách z Veľkej Británie s prevalenciou 0,9 %.

Rumunsko možno považovať za „miesto zrodenia“ týchto parazitov, odkedy V. Babes opísal výskyt baboziózy u hovädzieho dobytka. Medzi najčastejšie sa vyskytujúci druh v tejto krajine patrí *B. canis* (Andersson *et al.* 2017). Výskyt *Babesia* spp., *Theileria* spp. a *Hepatozoon* spp. skúmali v rokoch 2014 – 2015 Andersson *et al.* (2017) v rôznych druhoch kliešťov. Prevalencia *B. canis* v kliešťoch *D. reticulatus* v ich výskume bola 4,2 % a prevalencia *B. canis* v kliešťoch *I. ricinus* bola 0,8 %. V našej práci sme zistili o niečo nižšiu prevalenciu *B. canis* v kliešťoch *I. ricinus,* ktorá bola 0,27 %.

Psia babezióza je v Nemecku rozširujúce sa autochtónne ochorenie. Spôsobené to môže byť geografickým šírením vektora *D. reticulatus* v dôsledku zmien podnebia, ale aj zmenou populačnej hustoty a distribúcie hostiteľov (Silaghi *et al.* 2020). Štúdiu zameranú na výskyt kliešťa *D. reticulatus* a *B. canis* v týchto kliešťoch vykonali Silaghi *et al.* (2020)

v rokoch 2010 – 2013 v Nemecku v štáte Bavorsko. Z 339 kliešťov z vegetácie tohto druhu potvrdili pozitívitu iba v jednom jedincovi.

4.3 Molekulárna detekcia *Anaplasma phagocytophilum*

Na detekciu prítomnosti *A. phagocytophilum* sme vybrali samičky *I. ricinus* (260 vzoriek) a *I. hexagonus* (3 vzorky), ktoré boli získané zo psov a mačiek. Prítomnosť *A. phagocytophilum* sme detegovali v 50 kliešťoch (19,01 %) druhu *I. ricinus*, z ktorých 23 pozitívnych jedincov sme získali zo psov (8,74 %) a 27 pozitívnych jedincov sme získali z mačiek (10,26 %). Prítomnosť *A. phagocytophilum* v krvi zvierat sme nepotvrdili.

Anaplasma phagocytophilum je baktéria, ktorej hlavný vektor v Európe je *I. ricinus.* ale jej prítomnosť bola potvrdená aj v *I. trianguliceps* a *D. reticulatus* (Karbowiak *et al.* 2016). Medzi hlavných rezervoárov patria jeleňovité, ovce, hovädzí dobytok a kozy. V kliešťoch *I. trianguliceps* sa vyskytujú genotypy, ktorého rezervoármi sú hlodavce. Výskyt tejto baktérie je závislý na výskyte divo žijúcich jeleňovitých, v oblastiach, kde je ich populačná hustota väčšia, býva prevalencia baktérie v kliešťoch vyššía. Na Slovensku sa prevalencia v kliešťoch *I. ricinus* pohybuje medzi 1,1 % až 8 % (Chvostáč *et al.* 2018).

V roku 2002, Špitalská & Kocianová (2002) po prvýkrát objavili tohto patogéna na Slovensku v kliešťoch *I. ricinus.* Zber kliešťov z vegetácie robili na juhozápade Slovenska v lokalite Martinský les v rokoch 2000 – 2001. V štúdií zisťovali prítomnosť rôznych patogénov. Spolu získali 3221 kliešťov *I. ricinus, H. concinna* a *D. reticulatus*. Metódou PCR na základe amplifikácie 16S rDNA génu zistili prítomnosť *A. phagocytophilum (Ehrlichia phagocytophila)* v šiestich vzorkách kliešťa *I. ricinus* a v jednej vzorke kliešťa *H. concinna.*

Ďalšími prácami v ktorých sa študovala prevalencia *A. phagocytophilum* v kliešťoch z vegetácie na juhozápadnom Slovensku vrátane mesta Bratislava sú štúdie Svitálkovej *et al.* (2015), Vaculovej *et al.* (2018) a Chvostáča *et al.* (2018). Svitálková *et al.* (2015) zistili vvššiu prevalenciu v urbánnej oblasti mesta Bratislava (7,2 %) než v lesnom ekosystéme v Malých Karpatoch (3,1 %). Vaculová *et al.* (2018) v dvoch mestských parkoch, Železná studienka a Horský park v Bratislave, potvrdili prevalenciu *A. phagocytophilim* 5,6 % v *I. ricinus* a Chvostáč *et al.* (2018) v mestskom lese v Bratislave zistil prevalenciu patogéna 5,9 %. Tieto štúdie potvrdili prítomnosť patogéna v lokalitách, ktoré sa využívajú na rekreačné účely a prechádzky so psami. V porovnaní s týmito štúdiami bola prevalencia *A. phagocytophilum* v kliešťoch zo psov a mačiek v našej štúdii podstatne vyššia - 19,01 %. Dôvodom môže byť to, že vzorky pochádzali z rôznych lokalít juhozápadného Slovenska,

zatiaľ čo citované štúdie boli zamerané len na lokality v Bratislave a okolí. Molekulárnymi metódami potvrdili prítomnosť *A. phagocytophilum* v klinickej vzorke zo psa na Slovensku ako prví Majláthová *et al.* (2011). Tým dokázali prítomnosť patogénneho kmeňa baktérie ktorý spôsobuje anaplazmózu psov.

V Európe existuje veľká genetická variabilita baktérie *A. phagocytophilum*, pričom len niektoré kmene sú patogénne pre psy (Stuen *et al.* 2013, Karbowiak *et al.* 2016). Podľa nám dostupných údajov zo Slovenska zatiaľ neexistujú štúdie ktoré sa zaoberajú mapovaním prevalencie anaplazmózy u psov alebo mačiek. Predpokladáme, že psy a mačky ktorých krv sme vyšetrili neboli v kontakte s pre nich patogénnym kmeňom *A. phagocytophilum.*

ZÁVER

Cieľom mojej diplomovej práce bolo zistiť druhové spektrum kliešťov, ktoré parazitujú domáce zvieratá na vybraných lokalitách juhozápadného Slovenska a molekulárnymi metódami sledovať výskyt a diverzitu kliešťami prenášaných mikroorganizmov v kliešťoch parazitujúcich domáce zvieratá.

V rokoch 2018-2019 sme získali kliešte zo psov, mačiek a koní z veterinárnych ambulancií z Bratislavy a okolitých obcí, Pezinka, Dunajskej Stredy a Nových Zámkov a od majiteľov zvierat. Krvné vzorky psov a mačiek nám poskytla veterinárna klinika v Malackách. Molekulárnymi metódami sme kliešte a krv vyšetrili na prítomnosť *Babesia* spp. (amplifikácia fragmentu génu 18S rRNA pomocou PCR, následné sekvenovanie DNA) a *Anaplasma phagocytophilum* (amplifikácia fragmentu génu msp2 pomocou real time PCR).

Spolu sme získali 584 kliešťov (315 zo psov, 164 z mačiek, 105 z koní) a 345 vzoriek krvi. Identifikovali sme nasledujúce druhy kliešťov: *Ixodes ricinus* (63,86 %), *Ixodes hexagonus* (2,22 %), *Haemaphysalis concinna* (2,05 %) a *Dermacentor reticulatus* (31,84 %). Zo psov sme získali druhy *I. ricinus, I. hexagonus, H. concinna* a *D. reticulatus,* z mačiek *I. ricinus, I. hexagonus* a *H. concinna* a z koní *I. ricinus* a *D. reticulatus*. Prevažovali dospelé jedince (76,02 %), ale získali sme aj nymfy a larvy *H. concinna* (1,19 %). Sezónna aktivita druhu *I. ricinus* mala dva vrcholy, na jar (marec-jún) a jeseň (september-november). Druh *D. reticulatus* sa najviac vyskytoval v mesiacoch február a marec a október a november.

Molekulárnymi metódami sme prítomnosť *Babesia* spp. potvrdili v 5,73 % vyšetrených kliešťov (4,09 % samičiek a 1,63 % samcov). Z toho bolo pozitívnych 2,45 % jedincov *I. ricinus* (1,36 % zo psov, ostatné z mačiek) z lokalít Bratislava – Dlhé Diely, Senica, Nový Život, Dunajská Streda a Most pri Bratislave a 3,27 % jedincov druhu *D. reticulatus* (3 % zo psov). z lokalít Lakšárska Nová Ves, Senica, Bratislava, Nové Zámky, Kollárovo a Studienka. Pozitívne *I. ricinus* z mačiek pochádzali z lokalít Most pri Bratislave, Dunajská Streda a Malacky. Z koní bol pozitívny 1 jedinec druhu *D. reticulatus* z lokality Gajary. V kliešťoch druhu *I. ricinus*, ktoré sme získali zo psov a mačiek sme detegovali druh *Babesia microti*. Jeden jedinec tohto druhu zo psa bol pozitívny na druh *Babesia canis canis*. V jedincoch *D. reticulatus* zozbieraných zo psov a koní sme detegovali druh *B. canis canis.* Z krvi bola pozitívna jedna vzorka odobratá zo psa z lokality Studienka, kde bol potvrdený výskyt druhu *B. canis canis*.

Prítomnosť *A. phagocytophilum* sme detegovali v 19,01 % jedincoch druhu *I. ricinus:* 8,74 % pochádzalo zo psov z lokalít Dunajská Streda, Bratislava – Dúbravka, Stupava, Most pri Bratislava, Zálesie, Malinovo, Dolné Janíky, Pezinok, Senica, Bratislava – Dlhé Diely, Jablonica a Plavecký Štvrtok a 10,26 % pochádzalo z mačiek z lokalít Bellova Ves, Dunajská Streda, Lakšárska Nová Ves, Bratislava – Dlhé Diely, Sobotište, Malinovo, Bratislava – Pekná cesta, Most pri Bratislave a Slovenský Grob. V krvi zvierat sa nám prítomnosť baktérie nepodarilo detegovať.

Naše výsledky dokazujú prítomnosť *B. canis canis* v kliešťoch na viacerých lokalitách juhozápadného Slovenska, čo predstavuje potenciálny problém najmä pre majiteľov psov. Preto by sa výskumu tejto problematiky mala venovať v budúcnosti väčšia pozornosť. Prítomnosť zoonotických patogénov *B. microti* a *A. phagocytophilum* v kliešťoch ktoré parazitujú domáce zvieratá na rôznych lokalitách juhozápadného Slovenska predstavuje potenciálne riziko infekcie pre domáce zvieratá aj ľudí. I keď sme nepotvrdili infekciu *A. phagocytophilum* v krvi psov a mačiek ktoré pochádzali z Malaciek a okolia, čo môže naznačovať že v tejto oblasti necirkuluje kmeň baktérie patogénny pre tieto zvieratá, je v budúcnosti potrebné sledovať výskyt tejto baktérie a patogenitu jej kmeňov, ktoré sa nachádzajú v kliešťoch v prírode aj tých, ktoré parazitujú domáce zvieratá. Navyše je nevyhnutné chrániť domáce zvieratá pred kliešťami.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

Abdela N. & Jilo K. 2016. Bovine babesiosis and its current status in Ethiopia: A Systematic review. Advances in Biological Research. 10(3): 138–146. DOI: 10.5829/idosi.abr.2016.10.3.10398.

Adamska M. & Skotarczak B. 2017. Molecular detection of piroplasm in feeding and questing *Ixodes ricinus* ticks. Annals of Parasitology. 63 (1): 21–26. DOI: 10.17420/ap6301.80.

Adaszek Ł., Górna M., Skrzypczak M., Buczek K., Balicki I. & Winiarczyk S. 2012. Three clinical cases of *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats in Poland. Journal of Feline Medicine and Surgery. 15 (4): 333–337. DOI: 10.1177/1098612X12466552.

Aeschlimann A. 1991. Ticks and disease: susceptible hosts, reservoir hosts, and vectors. Parasite-Host Associations. 8: 148-156.

Anderson J.F. & Magnarelli L.A. 2008. Biology of ticks. Infectious Disease Clinics of North America. 22: 195-215. DOI: 10.1016/j.idc.2007.12.006.

Andersson M.O., Tolf C., Tamba P., Stefanache M., Radbea G., Rubel F., Waldenström J., Dobler G. & Chiţimia-Dobler L. 2017. *Babesia*, *Theileria*, and *Hepatozoon* species in ticks infesting animal hosts in Romania. Parasitology Research. 116: 2291–2297. DOI: DOI 10.1007/s00436-017-5537-4.

Ayllón N., Villar M., Galingo R.C., Kocan K.M., Šíma R., López J.A., Vázquez J., Alberdi P., Cabezas-Cruz A., Kopáček P. & de la Fuente J. 2015. Systems biology of tissue-specific response to *Anaplasma phagocytophilum* reveals differentiated apoptosis in the tick vector *Ixodes scapularis.* PLOS Genetics. 11(3): 1-29. DOI: http://dx.doi.org/10.5061/dryad.50kt0.

Ayoob A.L., Prittie J. & Hackner S.G. 2010. Feline babesiosis. Journal of Veterinary Emergency and Critical Care. 20(1): 90–97. DOI: 10.1111/j.1476-4431.2009.00493.x.

Bakken J.S., Krueth J.K., Lund T., Malkovitch D., Asanovich K. & Dumler J.S. 1996. Exposure to deer blood may be a cause of human granulocitic ehrlichiosis. Clinical Infectious Diseases. 23: 198.

Baneth G. 2018. *Babesia* of domestic dogs. In: Florin-Christensen M. & Schnittger L. (eds). Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets. Springer International Publishing AG, Švajčiarsko. Pp. 241–258. ISBN: 978-3-319-70132-5.

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

Bartosik K., Wiśniowski Ł. & Buczek A. 2011. Abundance and seasonal activity of adult *Dermacntor reticulatus* (Acari: Amblyommidae) in eastern Poland in relation to meteorological conditions and the photoperiod. Annals of Agricultural and Enviromental Medicine. 18(2): 340-344.

Beugnet F. & Chalvet-Monfray K. 2013. Impact of climate change in the epidemiology of vector-borne diseases in domestic carnivores. Comparative Immunology, Microbiology and Infections Diseases. 36: 559–566. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2013.07.003.

Beugnet F. & Moreau Y. 2015. Babesiosis. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics). 34(2): 627–639. DOI: 10.20506/rst.34.2.2385.

Billeter S.A., Spencer J.A., Griffin B., Dykstra Ch.C. & Blagburn B.L. 2007. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in domestic felines in the United States. Veterinary Parasitology. 147: 194–198. DOI: 10.1016/j.vetpar.2007.03.028.

Billinis C. 2013. Wildlife diseases that pose a risk to small ruminants and their farmers. Small Ruminant Research. 110: 67-70. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.11.005

Birkenheuer A.J., Neel J., Ruslander D., Levy M.G. & Breitschwerdt. 2004. Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog. Veterinary Parasitology. 124: 151–160. DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.07.008.

Bjöersdorff A., Svendenius L., Owens J.H. & Massung R.F. 1999. Feline granulocytic ehrlichiosis a report of a new clinical entity and characterisation of the infectious agent. Journal of Small Animal Practice. 40: 20–24.

Blaňarová L., Stanko M., Miklisová D., Víchová B., Mošanský L., Kraljik J., Bona M. & Derdáková M. 2015. 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. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2015.11.008.

Bock R., Jackson L., De Vos A. & Jorgensen W. 2004. Babesiosis of cattle. Parasitology. 129: 247-269. DOI: 10.1017/S0031182004005190.

Boozer A.L. & Macintire D.K. 2003. Canine babesiosis. The Veterinary Clinics Small Animal Practice. 33: 885–904. DOI: 10.1016/S0195-5616(03)00039-1.

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: 357-360. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.07.023.

Butler C.M., Nijhof A.M., Jongejan F. & van der Kolk J.H. 2008. *Anaplasma phagocytophilum* in horses in the Netherlands. The Veterinary Record. 162: 216-217. DOI: 10.1136/vr.162.7.216.

Carrade D.D., Foley J.E., Borjesson D.L. & Sykes J.E. 2009. Canine granulocytic anaplasmosis: A review. Journal of Veterinary Internal Medicine. 23: 1129–1141. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2009.0384.x.

Courtney J.W., Kostelnik L.M., Zeidner N.S. & Massung R.F. 2004. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. Journal of Clinical Microbiology. 42:3164-3168.

Dantas-Torres F., Alves L.C. & Uilenberg G. 2017. Babesiosis. In: Marcondes C.B. (eds). Arthropod Borne Diseases. Springer International Publishing, Švajčiarsko. Pp. 347–354. ISBN: 978-3-319-13884-8.

Dantas-Torres F., Chomel B.B. & Otranto D. 2012. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. Trends in Parasitology. 28(10): 437–446. DOI: 10.1016/j.pt.2012.07.003.

Dryde M.W. & Payne P.A. 2004. Biology and control of ticks infesting dogs and cats in North America. Veterinary Therapeutics. 5(2): 139-154.

Dugat T., Chastagner A., Lagrée A.-C., Petit E., Durand B., Thierry S., Corbiére F., Vergeyden H., Chabanne L., Bailly X., Leblond A., Vourc´h G., Boulouis H.-J., Maillard

R. & Haddad N. 2014. A new multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals different clusters for *Anaplasma phagocytophilum* circulating in domestic and wild ruminants. Parasites and Vectors. 7: 1-11. DOI: 10.1186/1756-3305-7-439.

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. DOI: 10.2478/s11756-006-0035-7.

Dzięgiel B., Adaszek Ł., Kalinowski M. & Winiarczyk S. 2013. Equine granulocytic anaplasmosis. Research in Veterinary Science. 95: 316-320. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.05.010.

Estrada-Peña A. & de la Fuente J. 2014. The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. Antiviral Research. 108: 104-128. DOI: 10.1016/j.antiviral.2014.05.016

Estrada-Peña A. 2015. Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics). 34 (1): 53-65.

Farkas R., Gyurkovszky M., Lukács Z., Aladics B. & Solymosi N. 2014. Seroprevalence of some vector-borne infections of dogs in Hungary. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 4: 1-5. DOI: 10.1089/vbz.2013.1469.

Földvári G. & Farkas R. 2005. Ixodid tick species attaching to dogs in Hungary. Veterinary Parasitology. 129: 125-131. DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.11.032.

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: 25–34. DOI: 10.1007/s00436-007-0608-6.

Földvári G., Široký P., Szekeres S., Majoros G. & Sprong H. 2016. *Dermacentor reticulatus:* a vector on the rise. Parasites and Vectors. 9: 314. DOI: 10.1186/s13071-016-1599-x.

Fritz C.L. 2009. Emerging tick-borne diseases. Veterinary Clinics: Small Animal Practice. 39: 265-278. DOI: 10.1016/j.cvsm.2008.10.019.

Galemore E.R., Labato M.A. & O´Neil E. 2017. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in feral cats in Massachusetts. Journal of Feline Medicine and Surgey Open Reports. 4(1). DOI: 10.1177/2055116917753804.

Ganzinelli S., Rodriguez A., Schnittger L. & Florin-Christensen M. 2018. *Babesia* in domestic ruminants. In: Florin-Christensen M. & Schnittger L. (eds). Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets. Springer International Publishing AG, Švajčiarsko. Pp. 215–239. ISBN: 978-3-319-70132-5.

Gilbert L., Aungier J. & Tomkins J.L. 2014. Climate of origin affects tick (*Ixodes ricinus*) host-seeking behavior in response to temperature: implications for resilence to climate change? Ecology and Evolution. 4(7): 1186-1198. DOI: 10.1002/ece3.1014.

Gorna M., Adaszek L., Policht K. Skrzypczak M. & Winiarczyk S. 2013. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in a cat. Veterinari Medicina. 1: 39–43.

Granquist E.G. 2016. *Anaplasma phagocytophilum* in sheep. Rickettsiales. Pp: 137–154. DOI: 10.1007/978-3-319-46859-4_7.

Gray J., Zintl A., Hildebrandt A., Hunfeld K.-P. & Weiss L. 2010. Zoonotic babesiosis: Overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. Ticks and Tick-borne Diseases. 1: 3–10. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2009.11.003.

Gray J.S., Estrada-Peña A. & Zintl A. 2019. Vectors of babesiosis. Annual Review of Entomology. 64: 149–165. DOI: 10.1146/annurev-ento-011118-111932.

Gray J.S., Estrada-Peña A., Kahl O. & Lindgren E. 2009. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. 6: 1-13. DOI: 10.1155/2009/593232.

Hamšíková Z., Kazimírová M., Haruštiaková D., Mahríková L., Slovák M., Berthová L., Kocianová E. & Schnittger L. 2016. *Babesia* spp. in ticks and wildlife in different habitat types of Slovakia. Parasites & Vectors. 9:292. DOI: 10.1186/s13071-016-1560-z.

Härtwig V., von Loewenich D., Schulze Ch., Straubinger R.K., Daugschies A. & Dyachenko V. 2014. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in red foxes (*Vulpes vul-*

pes) and raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) from Brandenburg, Germany. Ticks and Tick-borne Diseases. 5:277-280. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2013.11.001.

Heikkilä H.M., Bondarenko A., Mihalkov A., Pfister K. & Spillmann T. 2010. *Anaplasma phagocytophilum* infection in a domestic cat in Finland: Case report. Acta Veterinaria Scandinavica. 52: 1-5. DOI: 10.1186/1751-0147-52-62.

Homer M.J., Aguilar-Delfin I., Telford III S.R., Krause P.J. & Persing D.H. 2000. Babesiosis. Clinical Microbiology Reviews. 13(3): 451–469. DOI: 10.1128/CMR.13.3.451.

Hornok S. 2017. *Dermacentor marginatus* (Sulzer, 1776) (Figs. 111–113). In: Estrada-Peña A., Mihalca A.D. & Petney T.N (eds). Ticks of Europe and North Africa. Springer International Publishing AG, Švajčiarsko. Pp. 281-285. ISBN: 978-3-319-63760-0.

Hornok S. 2017. *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) (Figs. 114–116). In: Estrada-Peña A., Mihalca A.D. & Petney T.N (eds). Ticks of Europe and North Africa. Springer International Publishing AG, Švajčiarsko. Pp. 287-291. ISBN: 978-3-319-63760-0.

Chandoga P., Goldová M., Baranová D. & Kozák M. 2002. First case of canine babesiosis in the Slovak Republic. The Veterinary Record. 150: 82–84. DOI: 10.1136/vr.150.3.82.

Chastagner A., Pion A., Verheyden H., Lourtet B., Crgnelutti B., Picot D., Poux V., Bard E., Plantard O., McCoy K.D., Leblond A., Vourc´h G. & Bailly X. .2017. Host specifity, pathogen exposure, and superinfections impact the distribution of *Anaplasma phagocytophilum* genotypes in ticks, roe deer, and livestock in a fragmented agricultural landscape. Infection, Genetics and Evolution. 55: 31-44. DOI: 10.1016/j.meegid.2017.08.010.

Chauvin A., Moreau E., Bonnet S., Plantard O. & Malandrin L. 2009. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. Veterinary Research. 40: 37. DOI: 10.1051/vetres/2009020.

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. DOI: 10.3390/ijerph15050994.

Irwin P.J. 2009. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. Parasites & Vectors. 2: S4. DOI: 10.1186/1756-3305-2-S1-S4.

Jahfari S., Coipan E.C., Fonville M., van Leeuwen A.D., Hengeveld P., Heylen D., Heymann P., van Maanen C., Butler C.M., Földvári G., Szekeres S., van Duijvendijk G., Tack W., Rijks J.M., van der Giessen J., Takken W., van Wieren S.E., Takumi K. & Sprong H. 2014. Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. Parasites & Vectors. 7: 365. DOI: 10.1186/1756-3305-7-365.

Jahn P., Zeman P., Bezdekova B. & Praskova I. 2010. Equine granulocytic anaplasmosis in the Czech Republic. Veterinary Record. 166: 646–649. DOI: 10.1136/vr.4852.

Jalovecká M., Sojka D., Ascencio M. & Schnittger L. 2019. *babesia* life cycle – when phylogeny meets biology. Trends in Parasitology. 35(5): 356–368. DOI: 10.1016/j.pt.2019.01.007.

Jin H., Wei F., Liu Q. & Qian J. 2012. Epidemiology and control of human granulocytic anaplasmosis: A systematic review. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 12(4): 269-274. DOI: 10.1089/vbz.2011.0753.

Jongejan F. & Uilenberg G. 1994. Ticks and control methods. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics). 13(4): 1201-1226. DOI: 10.20506/rst.13.4.818.

Jongejan F. & Uilenberg G. 2004. The global importance of ticks. Parasitology. 129: 3-14. DOI: 10.1017/S0031182004005967.

Karbowiak G. 2014. The occurrence of the *Dermacentor reticulatus* tick – its expansion to new areas and possible causes. Annals of Parasitology. 60(1): 37-47.

Karbowiak G., Biernat B., Stańczak J., Werszko J., Wróblewski P., Szewczyk T. & Sytykiewicz H. 2016. The role of particular ticks developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens in Central Europe. 4. Anaplasmataceae. Annals of Parasitology. 62(4): 267-284. DOI: 10.17420/ap6204.62.

Kaur D., Jaiswal K. & Mishra S. 2017. Epidemiological study of ixodid ticks infesting cattle reared by small holder farmers. Journal of Entomology and Zoology Studies. 5(4): 284-291.

Kazimírová M, Hamšíková Z., Kocianová E., Marini G., Mojšová M., Mahríková L., Berthová L., Slovák M. & Rosá R. 2016. Relatively density of host-seeking ticks in different habitat types of south-western Slovakia. Experimental and Applied Acarology. 69: 205-224. DOI: 10.1007/s10493-016-0025-6.

Keesing F., Hersh M.H., Tibbetts M., McHenry D.J., Duerr S., Brunner J., Killilea M., LoGiudice K., Schmidt K.A. & Ostfeld R.S. 2012. Reservoir competence of vertebrate hosts for *Anaplasma phagocytophilum.* Emerging Infectious Diseases. 12: 2013-2016. DOI: 10.3201/eid1812.120919.

Kocan K.M., de la Fuente J. & Cabezas-Cruz A. 2015. The genus *Anaplasma*: new challenges after reclassification. Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics). 34(2): 577-586. DOI: 10.20506/rst.34.2.2381.

Konvalinová J., Rudolf I., Šikutová S., Hubálek Z., Svobodová V. & Svoboda M. 2012. Contribution to canine babesiosis in the Czech Republic. Acta Veterinaria. 81: 91–95. DOI: 10.2754/avb201281020091.

Król N., Kiewra D., Lonc E., Janaczyk B., Chodorowska-Skubiszewska A., Dzięcioł M., Gola M., Gruszka R., Jackowska-Szlachcic E., Jagiełło M., Kawski S., Łukaszewski Z., Mizgalski P., Narajowska T., Niedzielska J., Noczyński M., Rudkowska M., Rzepka D., Samulska K., Senze M., Sieczko P., Silny A., Staniewska A., Stańczyk J., Stańczyk W., Stasiak M., Włodarczyk M. & Zimniak S. 2016. *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) and *Babesia canis* (Piana et Galli-Valerio, 1895) as the parasites of companion animals (dogs and cats) in the Wrocław area, south-western Poland. Annals of Parasitology. 62(2): 125–130. DOI: 10.17420/ap6202.44.

Król N., Kiewra D., Szymanowski & Lonc E. 2014. The role of domestic dogs and cats in the zoonotic cycles of ticks and pathogens. Preliminary studies in the Wrocław Agglomeration (SW Poland). Veterinary Parasitology. 214: 208-212. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.09.028.

Król N., Obiegala A., Pfeffer M., Lonc E. & Kiewra D. 2016. Detection of selected pathogens in ticks collected from cats and dogs in the Wrocław Agglomeration, South-West Poland. Parastes &Vectors. 9: 351. DOI: 10.1186/s13071-016-1632-0.

Kubelová M., Tkadlec E., Bednář M., Roubalová E. & Široký P. 2011. West-to-east differences of *Babesia canis canis* prevalence in *Dermacentor reticulatus* ticks in Slovakia. Veterinary Parasitology. 180: 191–196. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.03.033.

Kumar M., Shekhar P., Haque S. & Mahto D. 2008. Feline babesiosis. Veterinary World. 1(4): 120–121.

Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. & Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution. 35:1547-1549.

Lappin M.R., Breitschwerdt E.B., Jensen W.A., Dunnigan B., Rha J.-Y., Williams C.R., Brewer M. & Fall M. 2004. Molecular and serologic evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in cats in North America. Journal of the American Veterinary Medical Association. 6: 893–896.

Leschnik M.W., Khanakah G., Duscher G., Wille-Piazzai W., Hörweg C., Joachim A. & Stanek G. 2012. Species, developmental stage and infection with microbial pathogens of engorged ticks removed from dogs and questing ticks. Medical and Veterinary Entomology. 26: 440-446. DOI: 10.1111/j.1365-2915.2012.01036.x.

Lewis S.R., Zimmerman K., Dascanio J.J., Pleasant R.S. & Witonsky S.G. 2009. Equine granulocytic anaplasmosis: A case report and review. Journal of Equine Veterinary Science. 29(3): 160–166. DOI: 10.1016/j.jevs.2009.01.002.

Licari E., Takács N., Solymosi N. & Farkas R. 2017. First detection of tick-borne pathogens of dogs from Malta. Ticks and Tick-borne Diseases. 8(3): 396-399. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2017.01.002.

Little S.E. 2010. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. The Veterinary clinics of North America. Small Animal Practice. 40: 1121–1140. DOI: 10.1016/j.cvsm.2010.07.004.

Lobo Ch.A., Cursino-Santos J.R., Singh M. & Rodriguez M. 2019. *Babesia divergens:* A drive to survive. Pathogens. *8*(3): 95. DOI: 10.3390/pathogens8030095.

Majláth I. & Majláthová V. 2015. Atlas kliešťov Slovenska (Prvé Vydanie). Parazitologický ústav, Košice.

Majláthová V., Majláth I., Víchová B., Guľová I., Derdáková M., Sesztáková E. & Peťko B. 2011. Polymerase chain reaction confirmation of *Babesia canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs suspected of babesiosis in Slovakia. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 11: 1447–1451. DOI: 10.1089/vbz.2010.0276.

Matijatko V., Torti M. & Schetters T.P. 2012. Canine babesiosis in Europe: how many diseases? Trends in Parasitology. 28(3): 99-105. DOI: 10.1016/j.pt.2011.11.003.

Maurelli M.P., Pepe P., Colombo L., Armstrong R., Battisti E., Morgoglione M.E., Counturis D., Rinaldi L., Cringoli G., Ferroglio E. & Zanet S. 2018. A national suvey of Ixodidae ticks on privately owned dogs in Italy. Parasites & Vectors. 11: 420. DOI: 10.1186/s13071-018-2994-2.

Menn B., Lorentz S. & Naucke T.J. 2010. Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. Parasites & Vectors. 3: 34. DOI: 10.1186/1756-3305-3-34.

Millán J., Proboste T., Fernández de Mera I.G., Chirife A.D., de la Fuente J. & Altet L. 2016. Molecular detection of vector-borne pathogens in wild and domestic carnivores and their ticks at the human-wildlife interface. Ticks and Tick-borne Diseases. 7(2): 284–290. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2015.11.003.

Mitková B., Hrazdilová K., Novotná M., Juranková J., Hofmannová L., Forejtek P. & Modrý D. 2017. Autochtonous *Babesia canis*, *Hepatozoon canis* and imported *Babesia gibsoni* infection in dogs in the Czech Republic. Veterinarni Medicina. 3: 138–146. DOI: 10.17221/152/2016-VETMED.

Nava S., Guglielmone A.A. & Mangold A.J. 2009. An overview of systematics and evolution of ticks. Frontiers in Bioscience. 14: 2857-2877. DOI: 10.2735/3418.

Nosek J., Lichard M. & Sztankay M. 1967. The ecology of ticks in the Tribeč and Hronský Inovec Mountains. Bulletin of the World Health Organization. 36: 49-59.

Nosek J. 1971. The ecology, bionomics, and behaviour of *Haemaphysalis (Aboimisalis) punctata* tick in Central Europe. Zeitschrift für Parasitenkunde. 37: 198-210. DOI: 10.1007/BF00259499.

Nosek J. 1971. The ecology, bionomics, and behaviour of *Haemaphysalis (Haemaphysalis) concinna* tick. Zeitschrift für Parasitenkunde. 36: 233-241. DOI: 10.1007/BF00348561.

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

Nováková M., Víchová B., Majláthová V., Lesňáková A., Pochybová M. & Peťko B. 2010. First case of human granulocytic anaplasmosis from Slovakia. Annals of Agricultural and Environmental Medicine. 17: 173-175.

Nuttall G.H,F. & Strickland C. 1912. On the occurrence of two species of parasites in equine ´´piroplasmosis´´ or ´´biliary´´ fever. Parasitology. 5(1): 65–96. DOI: 10.1017/S003118200000010X.

Obaidat M.M. & Alshehabat M.A. 2018. Zoonotic *Anaplasma phagocytophilum, Ehrlichia canis, Dirofilaria immitis, Borrelia burgdorferi,* and spotted fever group rickettsiae (SFGR) in different types of dogs. Parasitology Research. 117: 3407-3412. DOI: 10.1007/s00436-018-6033-1.

Oliver J.H. 1989. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). Annual Review of Ecology and Systematics. 20: 397-430. DOI: 10.1146/annurev.es.20.110189.00 2145.

Otranto D., Dantas-Torres F. & Santos-Silva M.M. 2017. *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) (Figs. 67–69). In: Estrada-Peña A., Mihalca A.D. & Petney T.N. (eds). Ticks of Europe and North Africa. Springer International Publishing AG, Švajčiarsko. Pp. 189-195. ISBN: 978-3-319-63760-0.

Otranto D., Danta-Torres F., Santos-Silva M.M. & Vatansever Z. 2017. *Haemaphysalis inermis* Birula, 1895 (Figs. 85–87). In: Estrada-Peña A., Mihalca A.D. & Petney T.N. (eds). Ticks of Europe and North Africa. Springer International Publishing AG, Švajčiarsko. Pp. 231-235. ISBN: 978-3-319-63760-0.

Ozubek S. & Aktas M. 2017. Molecular evidence of a new *Babesia* sp. in goats. Veterinary Parasitology. 233: 1–8. DOI: 10.1016/j.vetpar.2016.11.016.

Pangrácová L., Derdáková 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: 238. DOI: 10.1186/1756-3305-6-238.

Pastoráková A. & Petrovič R. 2016. Molekulárne metódy aktuálne používané v klinickej genetike. Prvé vydanie. Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta. Pp. 50. ISBN: 978-80-223-4231-5.

Pavlidou V., Gerou S., Kahrimanidou M. & Papa A. 2008. Ticks infesting domestic animals in northern Greece. Experimental and Applied Acarology. 45: 195-198. DOI: 10.1007/s10493-008-9167-5.

Penzhorn B. & Oosthuizen M.C. 2020. *Babesia* species of domestic Cats: Molecular characterization has opened Pandora´s Box. Frontiers in Veterinary Science. 7: 134. DOI: 10.3389/fvets.2020.00134.

Penzhorn B.L., Schoeman T. & Jacobson L.S. 2004. Feline babesiosis in South Africa. Annals of the New York Academy of Sciences. 1026: 183–186. DOI: 10.1196/annals.1307.027.

Pfäffle M.P., Santos-Silva M.M., Jaenson T.G.T., Vatansever Z. & Petney T.N. 2017. *Haemaphysalis punctata* Canestrini and Fanzago, 1878 (Figs. 88–90). In: Estrada-Peña A., Mihalca A.D. & Petney T.N. (eds). Ticks of Europe and North Africa. Springer International Publishing AG, Švajčiarsko. Pp. 237-242. ISBN: 978-3-319-63760-0.

Pfäffle M.P., Vatansever Z. & Petney T.N. 2017. *Haemaphysalis concinna* Koch, 1844 (Figs. 97–99). In: Estrada-Peña A., Mihalca A.D. & Petney T.N. (eds). Ticks of Europe and North Africa. Springer International Publishing AG, Švajčiarsko. Pp. 253-258. ISBN: 978-3-319-63760-0.

Randolph S.E. 2004. Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. Parasitology. 129: 37-65. DOI: 10.1017/S0031182004004925.

Randolph S.E. 2004. Evidence that climate change has caused ´emergence´ of tick-borne diseases in Europe? International Journal of Medical Microbiology. 37: 5-15. DOI: 10.1016/S1433-1128(04)80004-4.

Řeháčková K. Haláková M., Víchová B. & Kočišová A. 2016. Epizootiological study of the occurrence of canine babesiosis in southwestern Slovakia. Folia Veterinaria. 3: 39–42. DOI: 10.1515/FV-2016-0027.

Rikihisa Y. 2011. Mechanism of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum.* Clinical Microbiology Reviews. 3: 469-489. DOI: 10.1128/CMR.00064-10.

Rizzoli A., Silaghi C., Obiegala A., Rudolf I., Hubálek Z., Földvári 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. DOI: 10.3389/fpubh.2014.00251.

Rothschild Ch.M. 2013. Equine piroplasmosis. Journal of Equine Veterinary Science. 33: 497–508. DOI: 10.1016/j.jevs.2013.03.189.

Rubel F., Brugger K., Pfeffer M., Chitima-Dobler L., Didyk Y.M., Leverenz S., Dautel H. & Kahl O. 2016. Geographical distribution of *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* in Europe. Ticks and Tick-borne Diseases. 7: 224-233. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2015.10.015.

Rubel F., Brugger K., Walter M., Vogelgesang J.R., Didyk Y.M., Fu S. & Kahl O. 2018. Geographical distribution, climate adaptation and vector competence of the Eurasian hard tick *Haemaphysalis concinna.* Ticks and Tick-borne Diseases. 9: 1080-1089. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2018.04.002.

Rybářová M., Honsová M., Papoušek I. & Široký P. 2017. Variability of species of *Babesia* Starcovici, 1893 in three sympatric ticks (*Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna*) at the edge of Pannonia in the Czech Republic and Slovakia. Folia Parasitologica. 64: 1–6. DOI: 10.14411/fp.2017.028.

Sainz Á., Roura X., Miró G., Estrada-Peña A., Kohn B. Harrus S. & Solano-Gallego L. 2015. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. Parasites & Vectors. 8: 75. DOI: 10.1186/s13071-015-0649-0.

Saleem S., Ijaz M., Farooqi S.H., Awais G., Ali A., Iqbal K., Mehmood K. & Zhang H. 2018. Equine granulocytic anaplasmosis 28 years later. Microbial Pathogenesis. 119: 1–8. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.04.001.

Salman M, Tarrés-Call J. 2013. Ticks and Tick-Borne Diseases. Geographical Distribution and Control Strategies in the Euro-Asia region. Wallingford: CABI. 292 p.

Sándor A.D. 2017. *Ixodes hexagonus* Leach, 1815 (Figs. 49–51). In: Estrada-Peña A., Mihalca A.D. & Petney T.N. (eds). Ticks of Europe and North Africa. Springer International Publishing AG, Švajčiarsko. Pp. 147-151. ISBN: 978-3-319-63760-0.

Scoles G.A. & Ueti M.W. 2015. Vector ecology of equine piroplasmosis. Annual Review of Entomology. 60: 561–580. DOI: 10.1146/annurev-ento-010814-021110.

Selyemová D., Rusňáková Tarageľová V., Reichwalder M. & Derdáková M. 2013. Úloha psov v mestských ohniskách kliešťami prenášaných patogénov. Info VET. 4: 181–184.

Severo M.S., Pedra J.H.F., Ayllón N., Kocan K.M. & de la Fuente J. 2015. *Anaplasma.* Molecular Medical Microbiology. 3: 2033-2042. DOI: 10.1016/B978-0-12-397169-2.00110-4.

Schnittger L., Rodriguez A.E., Florin-Christensen M. & Morrison D.A. 2012. *Babesia:* A world emerging. Infection, Genetics and Evolution. 12: 1788–1809. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.07.004.

Silaghi C., Weis L. & Pfister K. 2020. *Dermacentor reticulatus* and *Babesia canis* in Bavaria (Germany) – A georeferenced field study with digital habitat characterization. Pathogens. 541: 1–10. DOI: 10.3390/pathogens9070541.

Siuda K. 1993. Kleszcze Polski (Acari: Ixodida). Część II. Systematyka i rozmieszczenie. Monogragie Parazytologiczne PTP, Warszawa. ISBN: 83-901349-0-X.

Slovák M. 2010. Obrázkový kľúč dospelých kliešťov (Acari: Ixodida) fauny Slovenska. Entomofauna carpathica. 22: 8–13.

Slovák M. 2014. Obrázkový kľúč lariev a nymf kliešťov (Acari: Ixodida) fauny Slovenska. Entomofauna carpathica. 26(1): 12–18.

Solano-Gallego L. & Baneth G. 2011. Babesiosis in dogs and cats – Expanding parasitological and clinical spectra. Veterinary Parasitology. 181: 48–60. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.04.023.

Solano-Gallego L., Sainz Á., Estrada-Peña A. & Miró G. 2016. A review of canine babesiosis: the European perspective. Parasites & Vectors. 9: 336. DOI: 10.1186/s13071-016-1596-0.

Sonenshine D.E. & Roe R.M. 2013. External and internal anatomy of ticks. In: Sonenshine D.E. & Roe R.M (eds). Biology of Ticks (Druhé vydanie). Oxford University Press, New York. Pp. 74-98. ISBN: 978-0-19-974405-3.

Stuen S. 2007. *Anaplasma phagocytophilum* – the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. Veteriary Research Communications. 31(1): 79-84. DOI: 10.1007/s11259-007-0071-y.

Stuen S. 2013. Tick-borne infections in small ruminants in northern Europe. Small Ruminants Research. 110: 142-144. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2012.11.022.

Stuen S. 2016. Haemoparasites in small ruminants in European countries: Challenges and clinical relevance. Small Ruminant Research. 142: 22-27. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2016.03.005.

Stuen S. 2016. Tick-borne fever (*Anaplasma phagocytophilum)* infection in sheep – a review. Journal of Veterinary Medicine and Research. 3(5): 1–6.

Stuen S., Granquist E.G. & Silaghi C. 2013. *Anaplasma phagocytophilum* – a widespread multi-host pathogen with higly adaptive strategies. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 31: 1-33. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00031.

Špitalská E. & Kocianová E. 2002. Agents of *Ehrlichia phagocytophila* group and other microorganisms co-infecting ticks in southwestern Slovakia. Acta Virologica. 46(1): 49–50.

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: 161–165.

Sprong H., Fonville M., Docters van Leeuwen A., Devillers E., Ibañez-Justicia A., Stroo A., Hansford K., Cull B., Medlock J., Heyman P., Cochez Ch. Weis L., Silaghi C. & Moutailler S. 2019. Detection of pathogens in *Dermacentor reticulatus* in northwestern Europe: evalution of a high-throughput array. Heliyon. 5: 1–23. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e01270.

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. DOI: 10.1186/s13071-015-0880-8.

Tamura K. & Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution. 10: 512-526.

Ueti M.W. & Knowles D.P. 2018. Equine piroplasmids. In: Florin-Christensen M. & Schnittger L. (eds). Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets. Springer International Publishing AG, Švajčiarsko. Pp. 259-269. ISBN: 978-3-319-70132-5.

Uilenberg G. 2006. *Babesia* – A historical overview. Veterinary Parasitology. 138: 3–10. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.01.035.

Vaculová T., Derdáková M., Špitalská E., Václav R., Chvostáč M. & Rusňaková Tarageľová V. 2018. Simultaneous occurence 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. DOI: 10.2478/s11686-018-00004-w.

Víchová B., Horská M., Blaňarová L., Švihran M., Andersson M. & Peťko B. 2015. First molecular identification of *Babesia gibsoni* in dogs from Slovakia, central Europe. Ticks and Tick-borne Diseases. 7(1): 54–59. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2015.08.004.

Víchová B., Majláthová 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. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.06.003.

Villatoro T. & Karp J.K. 2019. Transfusion-transmitted babesiosis. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 143(1): 130–134. DOI: 10.5858/arpa.2017-0250-RS.

Volf P. & Horák P. 2007. Paraziti a jejich biologie. Praha: Triton. Prvé vydanie. Pp. 318. ISBN: 978-80-7387-008-9.

Vrbová E. 2016. Kliešťami prenášané nákazy u spoločenských zvierat v Bratislavskom kraji. Diplomová práca. Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta. Pp. 85.

Vrbová E., Kazimírová M. & Hamšíková Z. 2016. Kliešťami prenášané nákazy u spoločenských zvierat v Bratislavskom kraji. In: Študentská vedecká konferencia PriF UK 2016, Zborník recenzovaných príspevkov, Bratislava. Pp. 836-840.

Walker A.R., Bouattour A., Camicas J.-L., Estrada-Peña A., Horak I.G., Latif A.A., Pegram R.G. & Preston P.M (eds). 2003. Ticks of domestic animals in Africa: a Guide to identification of species. Bioscience Reports, Edinburg. Pp. 221. ISBN: 0-9545173-0-X.

Woldehiwet Z. 2006. *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants in Europe. Annals of the New York Academy of Sciences. 1078: 446-460. DOI: 10.1196/annals.1374.084.

Yabsley M.J. & Shock B.C. 2013. Natural history of zoonotic *Babesia:* Role of wildlife reservoirs. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife. 2: 18–31. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2012.11.003.

Yang J., Liu Z., Niu Q., Liu J., Xie J., Chen Q., Chen Z., Guan G., Liu G., Luo J. & Yin H. 2016. Evalution of different nested PCRs for detection of *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants and ticks. Veterinary Research. 35: 1-6. DOI: 10.1186/s12917-016-0663-2.

Young A.S. & Morzaria S.P. 1986. Biology of *Babesia.* Parasitology Today. 2(8): 211–219.

Yusuf J.J. 2017. Review on bovine babesiosis and its economical importance. Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry. 4(2): 1–8.

Zahler M., Rinder H., Schein E. & Gothe R. 2000. Detection of a new pathogenic *Babesia microti* – like species in dogs. Veterinary Parasitology. 89: 241–248.

Internetové zdroje:

[1] http://www.afrivip.org/sites/default/files/identification_complete_1.pdf (citované dňa 8.4.2020)

[2] https://www.slovensko.sk/sk/lokality/_2914d43b-b767-4958-8cb6-688387618c63 (citované dňa 1.4. 2020)

[3] https://www.malacky.sk/index.php?page=mesto&menuid=188&nastavJazyk=sk (citované dňa 1.4. 2020)

[4] https://www.slovensko.sk/sk/lokality/_50d8c01b-dfe2-401f-8d4c-3ac6294aabe8 (citované dňa 1.4. 2020)

[5] https://www.slovensko.sk/sk/lokality/_0d4f2f94-fa36-4ddf-a6fd-82792dab1f3c (citované dňa 1.4. 2020)

[6] https://www.slovensko.sk/sk/lokality/_a9a73232-f853-4d69-9b13-189650e28842 (citované dňa 1.4. 2020)

[7] https://www.slovensko.sk/sk/lokality/_5b653799-373d-4b15-902d-d82bcae6fc01 (citované dňa 1.4. 2020)

[8] https://www.slovensko.sk/sk/lokality/_a314f315-8ff3-42c8-b179-508e4ef96c62 (citované dňa 1.4. 2020)

[9] http://www.rraister.sk/rastlinstvo-zivocisstvo (citované dňa 1.4. 2020)

[10] https://sk.wikipedia.org/wiki/Nov%C3%A9_Z%C3%A1mky (citované dňa 1.4. 2020)

[11] https://www.novezamky.sk/priroda/ds-1403 (citované dňa 1.4. 2020)

[12] https://www.slovensko.sk/sk/lokality/_6dea55f6-4df9-40d8-b151-ee8aaa44e201 (citované dňa 1.4. 2020)