

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA**

KLIEŠTE A LOVNÁ ZVER

-

**PRENÁŠAČE A REZERVOÁRE KLIEŠŤAMI
PRENÁŠANÝCH MIKROORGANIZMOV NA
JUHOZÁPADNOM SLOVENSKU**

Diplomová práca

2020

Bc. Miriama Profotová

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE
PRÍRODOVEDECKÁ FAKULTA**

KLIEŠTE A LOVNÁ ZVER

-

**PRENÁŠAČE A REZERVOÁRE KLIEŠŤAMI
PRENÁŠANÝCH MIKROORGANIZMOV NA
JUHOZÁPADNOM SLOVENSKU**

Diplomová práca

Študijný program:
Študijný odbor:
Školiace pracovisko:
Školiteľ:

Zoológia
3 Biológia
Katedra Zoológie
RNDr. Mária Kazimírová, CSc.

Bratislava, 2020

Bc.Miriama Profotová



Univerzita Komenského v Bratislave
Prírodovedecká fakulta

ZADANIE ZÁVEREČNEJ PRÁCE

Meno a priezvisko študenta: Bc. Miriama Profotová
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: Kliešte a lovná zver - prenášače a rezervoáre kliešťami prenášaných mikroorganizmov na juhozápadnom Slovensku
Ticks and game animals - vectors and reservoirs of tick-borne microorganisms in southwestern Slovakia

Literatúra: Dantas-Torres F., Chomel B.B., Otranto D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends Parasitol* 2012, 28:437-46.
Kazimirová et al. Diverse tick-borne microorganisms identified in free-living ungulates in Slovakia. *Parasites & Vectors* 2018;11:495
Mackenstedt U, Jenkins D, Romig T. The role of wildlife in the transmission of parasitic zoonoses in peri-urban and urban areas. *Int J Parasitol Parasit Wildl*. 2015;4:71-79.
Rizzoli A, Silaghi C, Obiegala A, Rudolf I, Hubálek Z, Földvári G, et al. Ixodes ricinus and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. *Front Public Health*. 2014;2:251.
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, Haemaphysalis spp., Dermacentor spp., lovná zver, kliešťami prenášané patogény

Anotácia: Voľne žijúce cicavce vrátane lovnej zveri sú významnými hostiteľmi kliešťov a môžu byť rezervoármi kliešťami prenášaných mikroorganizmov. Výskumu hlodavcov sa v tejto súvislosti venovala na Slovensku už značná pozornosť, avšak úloha ďalších voľne žijúcich cicavcov v udržiavaní ohnisk kliešťami prenášaných agens v oblasti juhozápadného Slovenska sa zatiaľ študovala iba sporadicky. V dôsledku globálnych klimatických a socioekonomických zmien, vrátane zmien vo využití krajiny a narastajúcej urbanizácie, dochádza v posledných rokoch k rozšíreniu geografického areálu výskytu kliešťov do severnejších oblastí Európy a do vyšších nadmorských výšok. V neposlednej miere globálne zmeny podmieňujú aj objavenie tzv. vynárajúcich sa infekcií. Okrem toho je výskyt mnohých voľne žijúcich cicavcov (napr. srnky, diviaky, lišky) vo zvýšenej miere zaznamenaný v suburbaných oblastiach, záhradách a dokonca aj v mestských parkoch. Spolu s cicavcami dochádza v suburbaných a urbánnych oblastiach k nárastu početnosti kliešťov, s čím je spojené aj zvýšené riziko šírenia kliešťami prenášaných nákaz na človeka a domáce spoločenské zvieratá. Diplomová práca sa bude zaoberať druhovým spektrom kliešťov ktoré parazitujú lovnú zver na vybraných lokalitách juhozápadného Slovenska.



Univerzita Komenského v Bratislave
Prírodovedecká fakulta

Molekulárnou analýzou vzoriek (tkanivá, kliešte) získaných z lovej zveri sa bude sledovať výskyt a diverzita kliešťami prenášaných mikroorganizmov v prenášačoch a hostiteľoch.

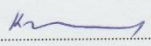
Vedúci: RNDr. Mária Kazimírová, CSc.
Katedra: PriF.KZ - Katedra zoológie
PriF vedúci doc. RNDr. Ján Kodada, CSc.
katedry:

Dátum zadania: 04.10.2018

Dátum schválenia: 08.12.2018


doc. RNDr. Ján Kodada, CSc.
vedúci katedry

.....
študent


vedúci práce

Pod'akovanie

V prvom rade by som sa chcela poďakovať mojej školiteľke RNDr. Márii Kazimírovej, Csc. za odbornú pomoc pri písaní mojej diplomovej práce, za rady a ochotu. Ďalej by som sa chcela poďakovať MVDr. Lucii Anettovej a Mgr. Diane Selyemovej, PhD. za pomoc a usmernenie pri vyšetrení vzoriek. Ďalej by som sa chcela poďakovať Bc. Klaudii Kuchárovej za pomoc pri určovaní kliešťov a laboratórnych prácach. Ďalej by som sa chcela poďakovať poľovníkom z juhozápadného Slovenska, ktorí poskytli vzorky. V neposlednom rade sa chcem poďakovať svojej rodine za podporu a trpezlivosť.

ABSTRAKT

PROFOTOVÁ MIRIAMA, Bc.: *Kliešte a lovná zver – prenášače a rezervoáre 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.

Kliešte ako ektoparazity a rezervoáre mikroorganizmov majú veľký medicínsky a veterinárny význam. Voľne žijúce cicavce predstavujú prirodzených hostiteľov pre kliešte. Malým cicavcom sa v tejto súvislosti venovala na Slovensku už značná pozornosť, výskumy týkajúce sa lovej zveri sa ale na Slovensku robili zatiaľ len sporadicky. Klimatické zmeny spôsobujú rozširovanie kliešťov do nových oblastí, čo predstavuje riziko tzv. vynárajúcich sa infekcií. Niektoré druhy piroplazmóz a anaplazmóz sú potenciálne nebezpečné pre ľudí, pričom môžu mať až fatálny priebeh. Cieľom diplomovej práce je zmapovať druhové spektrum kliešťov parazitujúcich lovnú zver na juhozápadnom Slovensku a molekulárnou analýzou vzoriek tkanív a kliešťov zistiť výskyt a diverzitu *Babesia* spp., *Theileria* spp. a *Anaplasma phagocytophilum*. Od októbra 2018 do decembra 2019 sme od poľovníkov získali vzorky slezín zo 127 jedincov lovej zveri a celkovo 1424 kliešťov parazitujúcich lovnú zver, ktoré sme zaradili do druhov *Ixodes ricinus*, *Haemaphysalis concinna* a *Dermacentor reticulatus*. Molekulárnymi metódami sme v tkanivách zvierat a vo vybraných vzorkách kliešťov detegovali prítomnosť *Babesia* spp./ *Theileria* spp. PCR amplifikáciou fragmentu génu 18S rRNA a následným sekvenovaním. Prítomnosť *Anaplasma phagocytophilum* sme detegovali amplifikáciou fragmentu msp2 pomocou real time PCR. Testovanie na prítomnosť Piroplasmida v slezinách zvierat odhalilo prítomnosť *Babesia vulpes* u jednej líšky a *Theileria capreoli* v 28 jedincoch rôznych druhov jeleňovitých. Spolu bolo pozitívnych 29 vzoriek slezín z celkovo 127 vyšetrených, čo predstavuje mieru prevalencie piroplazmiem 22,8 %. Testovanie na prítomnosť *A. phagocytophilum* ukázalo pozitivitu pri 42 vzorkách z testovaných 94, čo predstavuje prevalenciu 44,6 %. Koinfekcie boli celkovo zaznamenané v miere 23,4 %. Celkovo sme na prítomnosť Piroplasmida vyšetrili v 221 kliešťoch, z ktorých bolo 58 pozitívnych (26,2 %). Identifikovali sme *T. capreoli* a v jednom jedincovi *I. ricinus* parazita *Babesia venatorum*. Celkovo sme na prítomnosť *A. phagocytophilum* otestovali 180 kliešťov, z ktorých bolo 131 pozitívnych (72,77 %). Všetky kliešte *I. ricinus*, ktoré sme s pozitívnym výsledkom otestovali na prítomnosť piroplazmiem boli infikované aj baktériou *A. phagocytophilum* (t.j. 100 % prevalencia koinfekcie). Do budúca je potrebné

aj naďalej monitorovať situáciu, pretože lovná zver ako prirodzený hostiteľ kliešťov predstavuje rezervoár kliešťami prenášaných mikroorganizmov, ktoré môžu byť nebezpečné aj pre domáce zvieratá ale aj ľudí. V neposlednom rade je dôležité šíriť osvetu medzi širokou laickou verejnosťou.

KLÚČOVÉ SLOVÁ:

kliešte, lovná zver, *Babesia* spp., *Theileria* spp. *Anaplasma phagocytophilum*.

ABSTRACT

PROFOTOVÁ MIRIAMA, Bc.: *Ticks and game animals - vectors and reservoirs of tick-borne microorganisms in southwestern Slovakia*. Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Zoology. Supervisor of the thesis: RNDr. Mária Kazimírová, CSc. – Bratislava, FNS UC, 2020.

Ticks as ectoparasites and reservoirs of microorganisms are of great medical and veterinary importance. Wild mammals are the natural hosts for ticks. In this context, small mammals have already received considerable attention in Slovakia, but research on game has been carried out only sporadically in Slovakia so far. Climate change is causing the spread of ticks to new areas, which poses a risk of so-called emerging infections. Some types of piroplasmoses and anaplasmoses are potentially dangerous to humans and can be fatal. The aim of the diploma thesis is to map the species spectrum of ticks parasitizing game in southwestern Slovakia and to determine the occurrence and diversity of tick-borne microorganisms *Babesia* spp., *Theileria* spp. *Anaplasma phagocytophilum* by molecular analyses of tissue and tick samples. From October 2018 to December 2019, we obtained spleen samples from hunters from 127 individuals of game animals and a total of 1424 ticks parasitizing game animals, which we classified as *Ixodes ricinus*, *Haemaphysalis concinna* and *Dermacentor reticulatus*. By using molecular methods we detected in animal tissues and in selected samples of ticks the presence of *Babesia* spp./*Theileria* spp. By PCR amplification of the 18S rRNA gene fragment followed by sequencing. We detected the presence of *Anaplasma phagocytophilum* by amplifying the msp2 fragment by real time PCR. Testing for the presence of Piroplasmida in spleens of the animals revealed the presence of *Babesia vulpes* in one fox and *Theileria capreoli* in 28 individuals of different species of cervids. A total of 29 spleen samples out of a total of 127 were positive for Piroplasmida, which represents a prevalence of 22.8%. Testing for presence of *A. phagocytophilum* showed positivity in 42 samples out of 94 tested, representing a prevalence of 44.6%. Co-infections were recorded at an overall rate of 23.4%. In total, we examined the presence of Piroplasmida in 221 ticks, of which 58 were positive (26.2%). We identified *T. capreoli* and in one individual of *I. ricinus* the parasite *Babesia venatorum*. In total, we tested 180 ticks for the presence of *A. phagocytophilum*, of which 131 were positive (72.77%). All *I. ricinus* ticks that we tested positive for Piroplasmida were also infected with *A. phagocytophilum* (i.e., 100% prevalence of co-infection).. It is necessary to continue to monitor the situation in the future, because game

animals, as natural hosts of ticks, represent reservoirs of microorganisms transmitted by ticks, which can be dangerous for both pets and humans. Last but not least, it is important to spread awareness among the general public.

KEYWORDS:

Ticks, Game animals, *Babesia* spp., *Theileria* spp., *Anaplasma phagocytophilum*.

Čestné vyhlásenie

Čestne vyhlasujem, že predloženú diplomovú prácu som napísala samostatne s použitím všetkých uvedených zdrojov.

V Bratislave dňa 27.7.2020

PREDHOVOR

Problematika ektoparazitov a ochorení nimi prenášaných mi bola blízka už počas štúdia na Strednej odbornej škole veterinárnej. Zaujímala som sa už vtedy hlavne o kliešte, keďže som ako vášnivý psíčkar trávila vždy veľa času v prírode a neraz som si tohto neželaného návštevníka priniesla aj domov.

Pri pobyte v prírode zvykneme chrániť seba i svojich psov rôznymi antiparazitnými prípravkami, napríklad sprejmi, náramkami a obojkami s účinnými látkami, dlhým oblečením a podobne. Protivník je pritom jednoznačný – KLIEŠŤ.

Vplyvom urbanizácie a klimatických zmien sa areál rozšírenia kliešťov zväčšuje a preto sa s nimi stretávame čoraz častejšie. Kliešte, predovšetkým z čeľade Ixodidae, patria z medicínskeho hľadiska k jedným z najdôležitejších parazitov na stavovcoch. Stavovce, najmä voľne žijúce cicavce, patria medzi významných hostiteľov kliešťov a sú taktiež významnými rezervoármi kliešťami prenášaných mikroorganizmov. V tejto súvislosti prebehli na Slovensku už mnohé štúdie malých voľne žijúcich cicavcov. Lovnej zveri sa ale v minulosti na našom území nevenovala taká veľká pozornosť. Keďže lovná zver dochádza do pravidelného styku s človekom a domácimi zvieratami, predstavuje značné riziko v súvislosti s tzv. vynárajúcimi sa infekciami.

Moja diplomová práca sa bližšie pozrie na to, aké druhové spektrum kliešťov parazituje lovnú zver na vybranom území juhozápadného Slovenska, pomocou molekulárnych analýz stanovíme prítomnosť mikroorganizmov spôsobujúcich babeziózu a anaplazmózu v kliešťoch a taktiež u voľne žijúcich párnokopytníkov na tomto území.

Túto tému považujem za vysoko aktuálnu nielen pre vedeckú komunitu, ale aj pre širokú laickú verejnosť, pretože kliešte celosvetovo predstavujú významných hostiteľov širokej škály mikroorganizmov, ktoré spôsobujú závažné ochorenia zvierat, ale aj ľudí.

OBSAH

ÚVOD	13
CIELE PRÁCE.....	15
1 LITERÁRNY PREHĽAD	16
1.1 KLIEŠTE (IXODIDA, METASTIGMATA)	16
1.1.1 Ontogenéza Ixodidae.....	17
1.1.2 Epidemiologicky významné druhy na Slovensku.....	18
1.2 KLIEŠŤAMI PRENÁŠANÉ NÁKAZY	23
1.2.1 Piroplasmida	24
1.2.1.1 <i>Babesia</i> spp	24
1.2.1.2 <i>Theileria</i> spp.	28
1.2.2 <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	30
2 CHARAKTERISTIKA ÚZEMIA.....	33
2.1 Sledované lokality	34
3 MATERIÁL A METÓDY.....	36
3.1 Determinácia kliešťov.....	36
3.2 Izolácia DNA.....	36
3.3 PCR na detekciu <i>Babesia</i> spp.	39
3.3.1 Elektroforéza.....	41
3.3.2 Purifikácia PCR produktu.....	42
3.3.3 Sekvenovanie	42
3.3.4 Analýza sekvencií	42
3.4 Real time PCR na detekciu <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	43
4 VÝSLEDKY	46
4.1. Tkanivové vzorky.....	46
4.1.1 Piroplasmida	50
4.1.1.1 Prevalencia	50
4.1.1.2 Molekulárna analýza.....	51
4.1.2 <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	54
4.2 Kliešte.....	56
4.2.1 Druhové spektrum kliešťov	56
4.2.2 Vyšetrenie na Piroplasmida.....	57
4.2.2.1 Prevalencia	57
4.2.2.2 Molekulárna analýza.....	60
4.2.3 <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	61

6. DISKUSIA	64
6.1 Tkanivové vzorky	64
6.2 Kliešte.....	69
ZÁVER	72
POUŽITÁ LITERATÚRA.....	74

ÚVOD

V Európe ako aj na Slovensku sa v priebehu posledných rokov neustále zvyšuje početnosť voľne žijúcich zvierat (Burbaité *et al.* 2009, Burbaité *et al.* 2010, Massei *et al.* 2015), pričom práve tieto živočíchy tvoria prirodzených hostiteľov a rezervoáre pre kliešťami prenášané patogény. Pretože viac ako 75% chorôb ľudí je zoonotického pôvodu, je dôležité porozumieť dynamike medzi voľne žijúcimi druhmi, domácimi druhmi zvierat a ľuďmi v urbanizovaných oblastiach a za takýchto podmienok vykonávať cielenejší výskum kliešťov (Mackenstedt *et al.* 2015).

Kliešte (Acari, Ixodida) sú krvcicajúce ektoparazity stavovcov, ktoré sú schopné prenášať celý rad mikroorganizmov, pôvodcov ochorení ako napríklad Lymeská borelióza, anaplazmóza, babezióza, theilerióza, rickettsiózy, ehrlichioza a mnohé ďalšie. Na Slovensku sa vyskytujú druhy patriace do troch rodov a to *Ixodes*, *Haemaphysalis* a *Dermacentor*, pričom všetky rody zohrávajú úlohu v prenose patogénov.

Bolo zaznamenané, že vplyvom klimatických zmien, urbanizácie a mnohých iných faktorov sa zvyšuje početnosť kliešťov a taktiež sa zvyšuje hranica ich rozšírenia na sever aj do vyšších nadmorských výšok (Daniel *et al.* 2003, Bullová *et al.* 2009). Môžeme predpokladať, že tieto skutočnosti zvyšujú riziko tzv. vynárajúcich sa infekcií. V tejto súvislosti prebehli na Slovensku už mnohé štúdie malých voľne žijúcich cicavcov. Lovnej zveri sa ale v minulosti na našom území nevenovala taká veľká pozornosť, preto je táto téma vysoko aktuálna.

Babesia spp. sú kliešťami prenášané mikroorganizmy, ktoré infikujú krvinky množstva cicavcov a niektorých druhov vtákov a spolu s *Theileria* spp. sa označujú ako pirop-lazmy (Piroplasmida). Prvý prípad babesiózy u ľudí bol zaznamenaný v roku 1957 v Chorvátsku a odvtedy počet nákaz spôsobených *Babesia* spp. vo svete narastá (Yabsley & Shock 2013), preto možno babeziózu pokladať za vynárajúcu sa zoonotickú infekciu. Na Slovensku boli od roku 1991 hlásené zatiaľ tri prípady ľudskej babesiózy (Hamšíková *et al.* 2016). *Babesia* spp. sú krvné parazity spôsobujúce infekciu erytrocytov, no *Theileria* spp. sú schopné infikovať okrem erytrocytov aj leukocyty (Fuehrer *et al.* 2013). Prítomnosť *Theileria* spp. u voľne žijúcich prežúvavcov je na Slovensku veľmi málo prebádaná, pričom do dnešného dňa to dokumentujú len dve práce (Černý 1958, Kazimírová *et al.* 2018).

Anaplazmóza je ochorenie lekárskeho i veterinárneho významu s rôznymi klinickými prejavmi, od subklinických po život ohrozujúce (Štefanidesová *et al.* 2011). Pôvodom ochorenia je baktéria *Anaplasma phagocytophilum*. Vo svete bolo hlásených viacero prípadov

anaplazmózy u ľudí, na Slovensku bol doteraz potvrdený len jediný klinický prípad granulocytárnej anaplazmózy (Nováková *et al.* 2010). U voľne žijúcich zvierat boli ale na Slovensku opakovane zistené vysoké prevalencie výskytu tohto mikroorganizmu (Smetanová *et al.* 2006, Víchová *et al.* 2014, Reiterová *et al.* 2016, Kazimírová *et al.* 2018).

Cieľom mojej diplomovej práce bolo zmapovať druhové spektrum kliešťov parazitujúcich lovnú zver na juhozápade Slovenska a molekulárno biologickými metódami zistiť prítomnosť a diverzitu kliešťami prenášaných mikroorganizmov *Babesia* spp., *Theileria* spp. a *A. phagocytophilum* u lovnej zveri a v kliešťoch parazitujúcich lovnú zver na tomto území.

CIELE PRÁCE

Cieľom mojej diplomovej práce bolo:

1. Zmapovať druhové spektrum kliešťov parazitujúcich lovnú zver na juhozápade Slovenska.
2. Molekulárno biologickými metódami zistiť výskyt a diverzitu kliešťami prenášaných mikroorganizmov (*Babesia* spp., *Theileria* spp., *Anaplasma phagocytophilum*) u kliešťov parazitujúcich lovnú zver na lokalitách juhozápadného Slovenska.
3. Molekulárnou analýzou vzoriek tkanív poľovnej zveri z lokalít juhozápadného Slovenska zistiť výskyt a diverzitu kliešťami prenášaných mikroorganizmov (*Babesia* spp., *Theileria* spp., *Anaplasma phagocytophilum*).

1 LITERÁRNY PREHLAD

1.1 KLIEŠTE (IXODIDA, METASTIGMATA)

Kliešte sú roztoče (Acarina, Parasitiformes) patriace do podradu Metastigmata (Ixodida). Stigmy kliešťov sú umiestnené za posledným párom nôh. Až na malé výnimky sú to krvcicajúce ektoparazity (Volf *et al.* 2007). Telo je delené na capitulum (gnathosoma), na ktorom sa nachádzajú palpy a mohutný ozubený hypostom a tela (idiosoma), na ktorom sú umiestnené nohy. Larvy majú 3 páry nôh, nymfy a dospelce 4 páry nôh. Chýba výrazná hlava (Anderson & Magnarelli 2008).

Podrad Ixodida zahŕňa celkovo 907 doteraz známych druhov kliešťov patriacich do troch čeľadí: Nutalliellidae, Argasidae a Ixodidae (Farkas *et al.* 2013).

Čeľaď Nutalliellidae v sebe spája znaky nasledujúcich čeľadí a patrí do nej jediný druh *Nutalliella namaqua* Schulze, 1935 (Farkas *et al.* 2013).

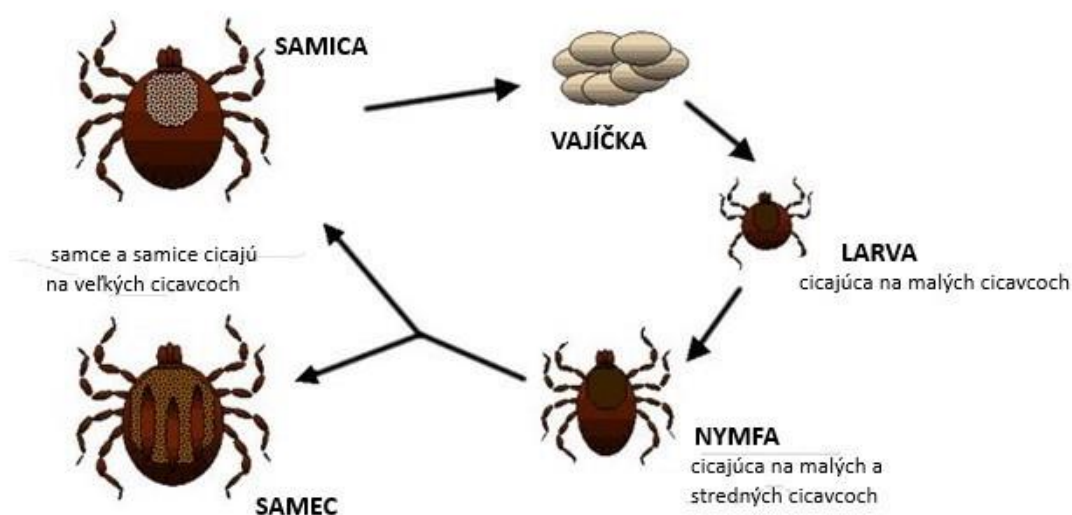
Kliešte patriace do čeľade Argasidae sú označované aj ako tzv. soft ticks, mäkké kliešte. Ich telo je mäkké, kožovité a chýba im na chrbtovej strane štítok scutum. Na rozdiel od kliešťov patriacich do čeľade Ixodidae majú ich nymfálne a adultné štádiá gnathosomu krytú pod idiosomou. Majú sploštené telo, ktoré je prispôsobené na ukrývanie sa, nakoľko žijú v hniezdach stavovcov a krv cicajú krátko a často, pričom niektoré druhy môžu hladovať aj niekoľko rokov. Taktiež majú v porovnaní s kliešťami z čeľade Ixodidae dlhší ontogenetický vývin, ktorý zahŕňa 3 až 4 nymfálne štádiá (Volf *et al.* 2007). Do čeľade Argasidae patrí 186 druhov (Farkas *et al.* 2013). Prípady parazitovania ľudí mäkkými kliešťami sú hlásené sporadicky, no tieto kliešte môžu byť tiež vektormi pôvodcov ochorení (Dantas-Torres & Otranto 2012). U nás sa najbežnejšie môžeme stretnúť s druhmi *Argas reflexus* Fabricius, 1794, ktorý príležitostne parazituje aj ľudí a *Argas persicus* Oken, 1818, ktorý je nebezpečný pre domácu hydinu, ktorú pri masívnej parazitácii výrazne oslabuje (Volf *et al.* 2007). V teplejších oblastiach môžu byť niektoré druhy mäkkých kliešťov vektormi rickeysie *Aegyptianella pullorum* Carpano, 1929 a borélie *Borrelia anserina* (Sakharoff, 1891) Bergey *et al.* 1925 (Farkas *et al.* 2013).

Čeľaď Ixodidae (hard ticks, tzv. tvrdé kliešte) je nielen medicínsky a veterinárne najvýznamnejšou skupinou, ale aj najväčšou, čo sa týka počtu druhov. Kliešte z čeľade Ixodidae sú charakteristické prítomnosťou sklerotizovaného štítka scutum na dorzálnnej strane tela, ktorý u samcov pokrýva celú chrbtovú časť, no u samičiek a subadultných štádií len prednú

dorzálnu časť, čo znamená, že telo samcov sa pri kŕmení zväčšuje len nepatrne, kým telo samičiek a subadultov má schopnosť až niekoľkonásobného zväčšenia (Sonenshine & Roe 2014). Patrí sem celkovo 720 druhov (Farkas *et al.* 2013). Čelád' Ixodidae zahŕňa rody *Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Cornupalpatum*, *Cosmiomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicentor* a *Rhipicephalus* (Barker & Murrell 2008).

1.1.1 Ontogenéza Ixodidae

Ontogenéza tvrdých kliešťov (Obr. 1) zahŕňa vajíčka a tri aktívne štádiá: šesťnohú larvu, osemnohú nymfu a dospelého jedinca. V prípade trojhostiteľských kliešťov, čo zahŕňa všetky druhy vyskytujúce sa v strednej Európe, sa každé aktívne štádium živí ektoparaziticky krvou rôznych stavovcov. Každé štádium cicá len raz po dobu niekoľkých dní. Sliny kliešťov obsahujú farmakologicky aktívne látky (antikoagulanty, inhibítory agregácie trombocytov, vazodilatačné molekuly, imunomodulátory a inhibítory svrbenia a bolesti), ktoré zabezpečujú vyhnutie sa obranným mechanizmom hostiteľa a úspešné nakŕmenie sa (Alarcon-Chaidez 2014).



Obr.1: Životný cyklus Ixodidae. Zdroj: <https://www.liverpool.ac.uk/infection-and-global-health/research/zoonotic-infections/tick-activity-project/uk-ticks/> Upravené. (13.4.2020)

Dospelá samička strávi po kopulácii 6-11 dní (u niektorých druhov aj dlhšie) cicaním krvi hostiteľa a počas nasledujúcich mesiacov kladie 1000-2000 vajíčok (Sonenshine & Roe

2014), z ktorých sa po niekoľkých týždňoch vyľahnu larvy. Šesťnohá larva aktívne hľadá hostiteľa a po nácicaní krvi metamorfuje na osemnohú nymfu, ktorá vyzerá ako dospelý jedinec, len je menšia a chýba jej pohlavný otvor. Po úspešnom nácicaní nymfa metamorfuje na dospelého jedinca. Dĺžka metamorfózy a života jednotlivých štádií je rôzna, závisí od dostupnosti vhodných hostiteľov a abiotických faktorov. Napríklad u druhu *Ixodes ricinus* Linnaeus, 1758 môže trvať obdobie premeny do ďalšieho štádia aj jeden rok. V závislosti od dostupnosti hostiteľov a vhodných klimatických podmienok môže trvať kompletný životný cyklus u tohto druhu od dvoch do šiestich rokov (Donoso-Mantke *et al.* 2011).

1.1.2 Epidemiologicky významné druhy na Slovensku

Ako už bolo spomenuté, medzi epidemiologicky a z veterinárneho hľadiska najvýznamnejšie kliešte patria druhy z čelade Ixodidae, ktorým sa aj budeme v nasledujúcej kapitole venovať.

Ixodes ricinus (Obr. 2) je epidemiologicky najdôležitejším druhom kliešťa v Európe aj na Slovensku. Pre svoj život vyhľadáva husté porasty, prevažne listnaté a zmiešané lesy s vysokou vlhkosťou (Farkas *et al.* 2013). Okrem lesov však obľubuje aj v mestské parky a záhrady (Rizzoli *et al.* 2014). Kliešť *I. ricinus* je mezofilný druh, jarná aktivita začína, keď teplota stúpne na 4 až 5 °C a pozitívne koreluje s obsahom vlhkosti presahujúcim 80 % (Macko *et al.* 2016).

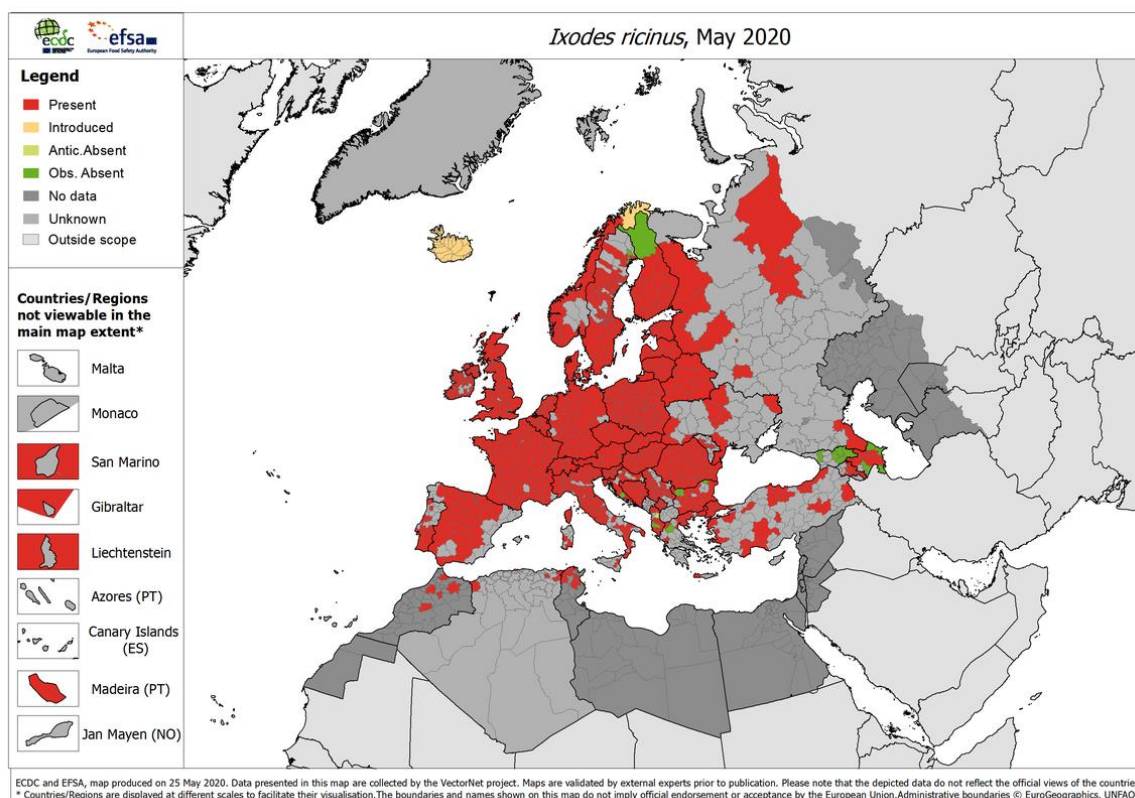
Má široký okruh hostiteľov, zahŕňajúc plazy, vtáky a cicavce. Len vo Švédsku boli ako hostitelia pre tento druh kliešťa zaznamenané dva druhy plazov, 56 druhov vtákov a 29 cicavcov (Farkas *et al.* 2013). Výskyt druhu (Obr. 3) bol zaznamenaný v Írsku, Británii a Škandinávii, vo Fínsku a západnom Rusku, južne pozdĺž Európy do stredomorských oblastí a zasahuje až do severnej Afriky a východného Iránu (Farkas *et al.* 2013).

Na Slovensku je bežným druhom a v niektorých oblastiach sa vyskytuje súbežne s inými druhmi kliešťov, ako sú *Ixodes trianguliceps* Birula, 1895, *Dermacentor reticulatus* Fabricius, 1794 a *Haemaphysalis concinna* Koch, 1844 (Hamšíková *et al.* 2016). V Európe je *I. ricinus* vektorom pôvodcov mnohých zoonóz, napríklad Lymskej boreliózy, kliešťovej encefalitídy, anaplazmózy, babeziózy, tularémie, rickettsií a iných (Farkas *et al.* 2013). Bolo zaznamenané, že výskyt *I. ricinus* sa vplyvom klimatických zmien v Európe posúva do

vyšších nadmorských výšok, tento druh bol zaznamenaný aj vo výškach vyšších ako 1000 m n.m. (Daniel *et al.* 2003).



Obr. 2: *Ixodes ricinus*, samička. Zdroj: <https://scienceinpoland.pap.pl/en/node/81997> (11.7.2020)



Obr. 3: Geografické rozšírenie druhu *I. ricinus* v máji 2020. Zdroj: <https://www.liverpool.ac.uk/infection-and-global-health/research/zoonotic-infections/tick-activity-project/uk-ticks/> (8.7.2020)

Ixodes hexagonus Linnaeus, 1758 sa vyskytuje pozdĺž východnej, strednej a južnej Európy, vrátane Írska, Veľkej Británie, Nórska, Švédska, Poľska, Portugalska, Španielska, Grécka, Talianska, Ukrajiny a Rumunska. Primárnym hostiteľom sú ježe a malé a stredne veľké mäsožravce, ako napríklad mačka a pes. Je vektorom borélií, vírusu kliešťovej encefalitídy a babézií, prevažne *Babesia microti* (França, 1912) (Farkas *et al.* 2013).

Ixodes trianguliceps (Birula, 1895) je nidikolný ektoparazit malých cicavcov, ľudia nepatria medzi jeho prirodzených hostiteľov. Jeho rozšírenie je na väčšine územia Európy. Je napríklad vektorom *B. microti* (Farkas *et al.* 2013).

Haemaphysalis punctata (Canestrini & Fangazo, 1878) sa hojne vyskytuje v celej Eurázii. Je vektorom pôvodcov mnohých zoonóz, ako napríklad tularémie, kliešťovej encefalitídy ale aj babeziózy (*Babesia major*, *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Babesia motasi*) a theileriózy (*Theileria ovis*, *Theileria mutans*, *Theileria recondite*) (Farkas *et al.* 2013).

Haemaphysalis concinna Koch, 1844 (Obr. 5) je pomerne rozšíreným druhom v Európe (Farkas *et al.* 2013).



Obr. 5: *Haemaphysalis concinna*, samička. Zdroj: <https://www.biolib.cz/en/taxonimage/id17507/?taxonid=76117> Autor: MVDr. David Modrý, PhD. (11.7.2020)

Na Slovensku sa vyskytuje v bažinatých lesoch pozdĺž rieky Moravy, v hrabových a dubových lesoch medzi Bratislavou a Gabčíkovom a v dubových lesoch pri Nitre. Na východnom Slovensku sa vyskytuje súbežne s pastvinami a listnatými lesmi pri rieke Latorica (Nosek *et al.* 1967).

Najbežnejším hostiteľom pre *H. concinna* je lovná zver, ale kliešte parazitujú aj hovädzí dobytok, kone, psy a mačky (Farkas *et al.* 2013). V Maďarsku dosahujú vrchol sezónnej aktivity v máji, pričom sú napríklad vektormi *F. tularensis* (Farkas *et al.* 2013).

Dermacentor marginatus (Schulzer, 1776) je jeden z dvoch druhov rodu *Dermacentor*, ktoré sú v Európe endemické (Rubel *et al.* 2015). Rod *Dermacentor* je málo početný, celosvetovo zahŕňa približne 30 druhov (Farkas *et al.* 2013). Areál rozšírenia druhu *D. marginatus* zasahuje od Portugalska, pozdĺž južnej Európy až po Irán, Kazachstan až po horskú oblasť strednej Ázie (Rubel *et al.* 2015). Významnými voľne žijúcimi hostiteľmi dospelých kliešťov sú diviaky, larvy a nymfy cicajú na malých cicavcoch a vtákoch (Farkas *et al.* 2013). Je vektorom *C. burnetti*, *Rickettsia slovaca*, *Rickettsia conori*, *Rickettsia sibirica sibirica* a *F. tularensis* (Farkas *et al.* 2013).

Dermacentor reticulatus (Fabricius, 1794) (Obr. 6) je po *I. ricinus* druhým najrozšírenejším druhom kliešť'a v strednej Európe (Rubel *et al.* 2014).



Obr. 6: *Dermacentor reticulatus*. Zdroj: <https://www.deviantart.com/dark-raptor/art/Dermacentor-reticulatus-54960409> (11.7.2020)

Pre svoj život preferuje najmä lužné lesy a močiare, v ktorých môže prežiť v určitých obdobiach aj záplavy (Nosek 1972). Na vlhkých biotopoch sa často vyskytuje sympatricky s druhom *I. ricinus* (Rubel *et al.* 2015). Jeho aktivita je známa okrem jari a jesene aj v zimných mesiacoch počas miernych zím (Farkas *et al.* 2013). Je vektorom *Babesia* spp. (*Babesia canis* (Piana & Galli-Valerio, 1895), *Babesia ovis*, *B. divergens*, *Babesia caballi*), *Rickettsia* spp, ale aj *F. tularensis* (Farkas *et al.* 2013)

1.2 KLIEŠŤAMI PRENÁŠANÉ NÁKAZY

Tvrdé kliešte (Ixodidae) sa radia k medicínsky a veterinárne najvýznamnejším článkonožcom. Spektrum kliešťami prenášaných nákaz je vskutku impozantný, sú vektormi mnohých vírusov, ale aj patogénnych mikroorganizmov. Z vírusových ochorení prenášaných kliešťami je to napríklad ochorenie oviec známe od roku 1807 z Britských ostrovov, označované podľa točivého pohybu chorých zvierat ako louping ill (Grešíková 1999), či kliešťová encefalitída (TBE), ktorá spôsobuje u ľudí meningitídu a encefalitídu a je na Slovensku známa od roku 1951, kedy vypukla epidémia v Rožnave (Grešíková 1999). Kliešte sú tiež vektormi širokého spektra mikroorganizmov, ktoré spôsobujú ochorenia zvierat aj ľudí, ako napríklad boreliózu, babeziózu, anaplazmózu, ehrlichiozu, rickettsiozu a mnohé ďalšie.

Divožijúce zvieratá (Obr. 7) môžu zohrávať dôležitú úlohu v epidemiológii chorôb prenášaných kliešťami, pri šírení do nových regiónov a v udržiavaní populácií kliešťov (Szeres *et al.* 2018).



Obr. 7: Srnec lesný *Capreolus capreolus* Linnaeus, 1758. Zdroj: http://en.naturephoto.lt/img/photos/original/zinduoliai/1414700528_stirn.jpg (30.4.2020)

Charakteristiky vybraných patogénov s dôrazom na voľne žijúce živočíchy sú spracované v nasledujúcich podkapitolách.

1.2.1 Piroplasmida

Pirop plazmy (Apicomplexa: Piroplasmida) sú kliešťami prenášané mikroorganizmy, ktoré infikujú červené a biele krvinky ich hostiteľov, stavovcov (Hornok *et al.* 2017). Mnohé druhy pirop plazmiem sú významné patogény a kmeň Apicomplexa zahŕňa aj množstvo ďalších patogénov veterinárneho a lekárskeho významu vrátane *Plasmodium* spp. (pôvodca malárie), *Cryptosporidium* spp., *Isospora* spp., *Eimeria* spp. a *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux 1908) (Yabsley & Shock 2013). Piroplasmida sú pomenované podľa ich hruškovitého tvaru po znásobení (Andersson *et al.* 2017). Zahŕňajú rod *Babesia* a s ním úzko spätý rod *Theileria*. Na základe klasickej taxonómie pirop plazmy zahŕňajú tri skupiny: 1. *Theileria*, napríklad druh *Theileria capreoli*; 2. *Babesia* (sensu stricto), napríklad *Babesia canis*, *Babesia venatorum*, *Babesia odocoilei*, *Babesia divergens* a *Babesia capreoli* (Enigk and Friedhoff 1962); a 3. *Babesia* (sensu lato), t.j. *Babesia microti* (Schnittger *et al.* 2012). V Európe a na Slovensku patria medzi hlavných vektorov kliešte *I. ricinus*, *H. concinna* a *D. reticulatus* (Hamšíková *et al.* 2016 ; Hornok *et al.* 2017).

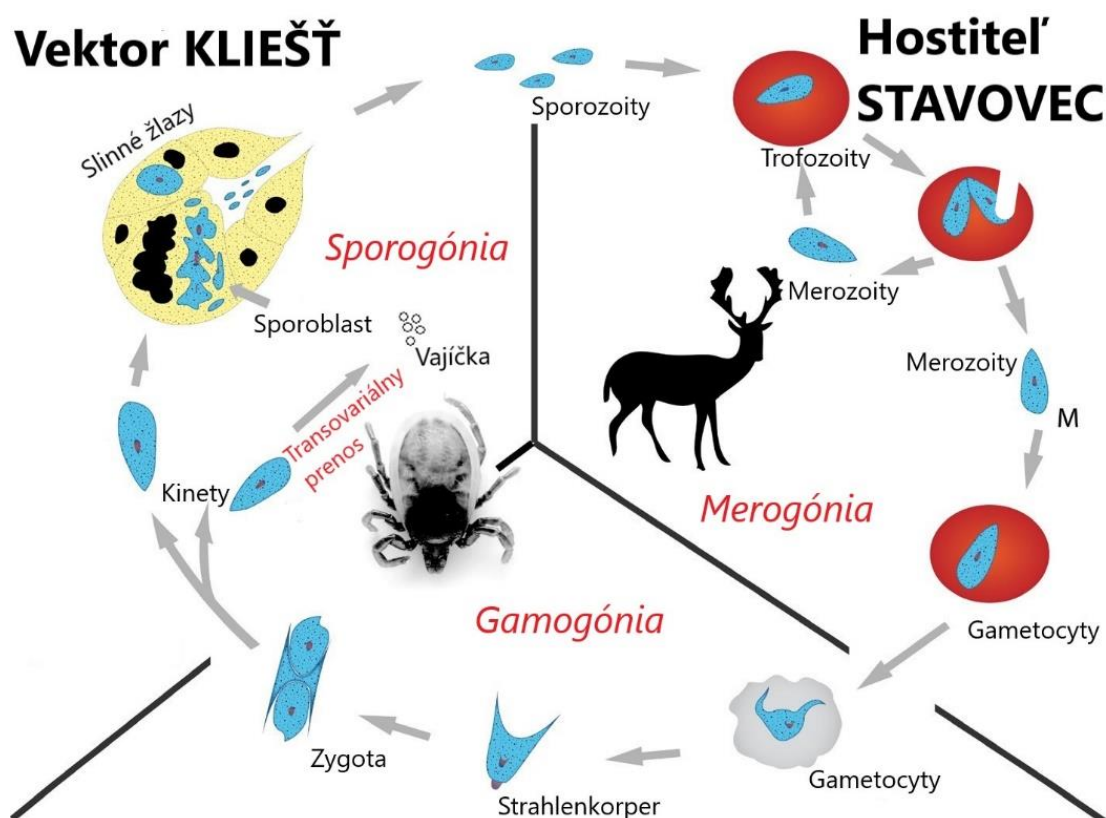
Údaje o prítomnosti pirop plazmidov vo voľne žijúcich zvieratách a ich lekárskom a veterinárnom význame na Slovensku sú zriedkavé a obmedzené na niekoľko štúdií (Černý 1958; Blaňarová *et al.* 2016; Hamšíková *et al.* 2016; Koneval *et al.* 2017; Kazimírová *et al.* 2018).

1.2.1.1 *Babesia* spp.

Babezióza je ochorenie prenášané kliešťami spôsobujúce infekciu erytrocytov protozoárnymi parazitmi rodu *Babesia*, patriacich do kmeňa Apicomplexa. Objavená bola v roku 1888 profesorom Victorom Babesom, ktorý v Rumunsku opísal výskyt babeziózy u hovädzieho dobytku (Andersson *et al.* 2017). Babézie parazitujú široké spektrum domácich a voľne žijúcich cicavcov, vrátane ľudí (Wiegmann *et al.* 2015). Dodnes bolo opísaných približne 100 druhov babézií, no len málokto sú schopné spôsobiť infekciu u ľudí (Young *et al.* 2019).

Druhy *Babesia* spp. boli historicky klasifikované dvomi metódami. Prvou metódou bola klasifikácia na základe relatívnej veľkosti trofozoitov v erythrocytoch a počte merozoitov. Na základe veľkosti zahŕňa malé a veľké babézie, ale toto rozdelenie nesúvisí s fylogenetickou príbuznosťou. Druhým spôsobom rozdelenia bola klasifikácia na základe hostiteľov, pretože sa predpokladalo, že dané parazity sú špecifické pre daného hostiteľa, ale dnes vieme, že to nie je celkom pravdivé (Yabsley & Shock 2013).

Životný cyklus rodu *Babesia* spp. (Obr. 8) zahŕňa vektorov (kliešte) a rezervoárových hostiteľov (stavovce) (Yabsley & Shock 2013).

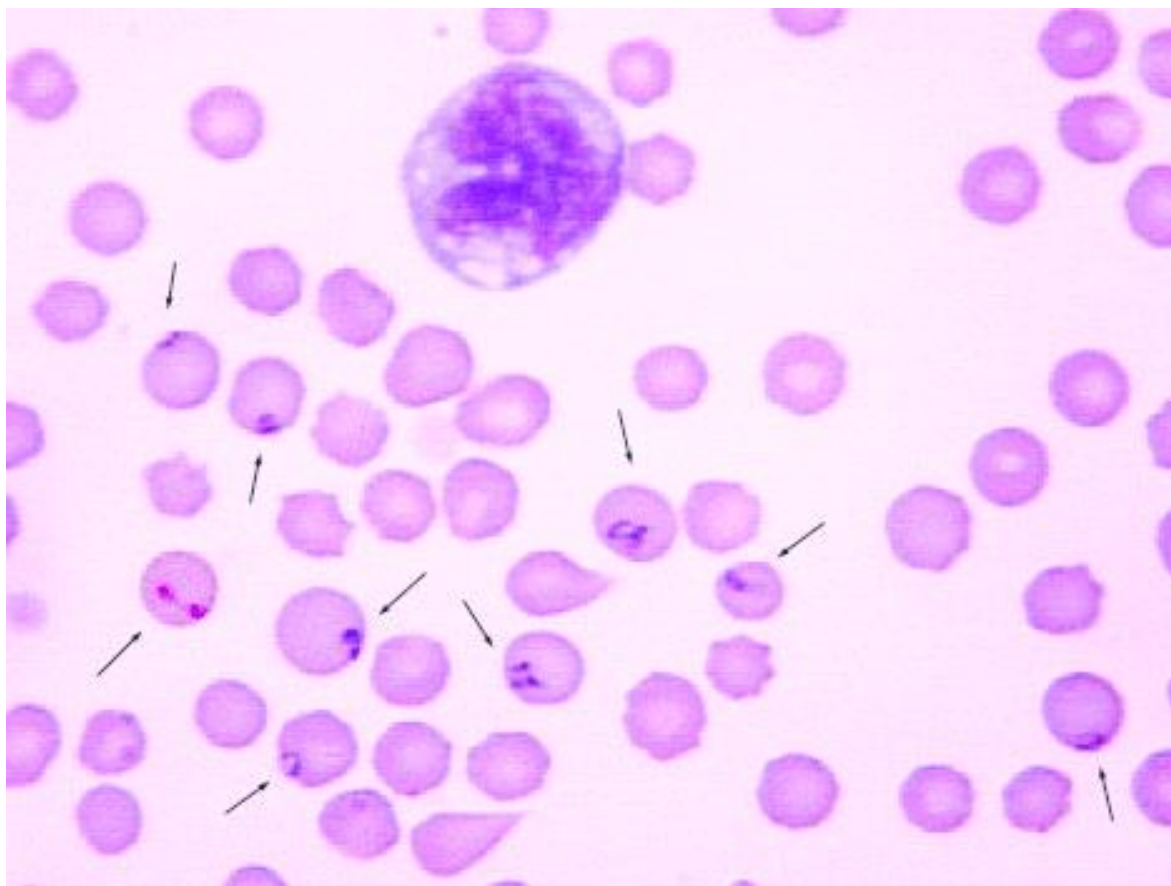


Obr. 8: Životný cyklus *Babesia* spp. Zdroj: Hunfeld *et al.* (2008) (Upravené.)

Životný cyklus babézií pozostáva z merogónie, gamogónie a sporogónie. Infekciu hostiteľ získa, keď sa sporozoity prenásu počas kŕmenia kliešťami. Sporozoity potom napádajú erythrocyty a vyvíjajú sa na trofozoity. Trofozoity sa delia binárnou fúziou a produkujú merozoity, ktoré pokračujú v infekcii a obnovujú replikačný cyklus v hostiteľovi. Niektoré trofozoity sa vyvíjajú na gametocyty, ktoré môžu vyvolať infekciu v kliešťovi. V črevách kliešťov sa gametocyty vyvíjajú na “ Strahlenkorper “, ktoré sa spájajú a vytvárajú zygoty, ktoré sa vyvíjajú na kinety. Kinety infikujú hemolymfu kliešťa, replikujú sa a napádajú rôzne orgány. Príslušníci skupiny *Babesia* spp. sensu stricto môžu infikovať vaječníky kliešťov a

prenášať sa transovariálne cez vajíčka, takže všetky ontogenetické štádiá sú potenciálne infekčné, zatiaľ čo príslušníci skupiny *Babesia* spp. sensu lato sa prenášajú iba z jedného štádia na ďalšie (transstadiálne), takže larvy sú zriedkavo, ak vôbec, infikované. Sporogónia sa iniciuje, keď kinety napadnú slinné žľazy kliešťa. Tu parazit vytvára viacjadrový sporoblast. Novo vyvinuté sporozoity sa pri cicaní kliešťa dostávajú pomocou slín do tela hostiteľa (Hunfeld *et al.* 2008). Ľudia nepredstavujú prirodzených hostiteľov pre žiadny druh babezie, napriek tomu niektoré druhy sú schopné ľudí infikovať (Yabsley & Shock 2013).

Prvý prípad ochorenia babeziózou u ľudí bol zaznamenaný v roku 1957 v Chorvátsku a odvtedy počet nákaz vo svete narastá (Yabsley & Shock 2013), preto možno babeziózu pokladať za vynárajúcu sa zoonotickú infekciu. Väčšina prípadov bola zaznamenaná v USA, v Európe bola identifikovaná prevažne u ľudí s oslabenou imunitou (Lempereur *et al.* 2012). Od roku 1991 sú zo Slovenska hlásené tri prípady ľudskej babeziózy (Hamšíková *et al.* 2016). Medzi najčastejšie uvádzaného pôvodcu babeziózy v Severnej Amerike patrí *Babesia microti*. V Európe je najčastejšie skloňované v súvislosti s infekciou ľudí meno *Babesia divergens* (Obr. 9).



Obr. 9: Infekcia *Babesia divergens* v erythrocytoch hostiteľa. Zdroj: http://gallery.site.hu/d/1842184-1/babesia_divergens.gif (30.4.2020)

Medzi ďalšie zoonotické druhy patrí *B. duncani*, *B. venatorum* a ďalšie príbuzné nepomenované babézie (Young *et al.* 2019). Symptómy ochorenia môžu byť rôzne, od asymptomatického priebehu, akútnych priebehov charakterizovaných horúčkou, anémiou, hemoglobínúriou a žltáčkou (Wiegmann *et al.* 2015) až po maláriu podobné príznaky, ktoré môžu príležitostne viesť až k úmrtiu zvierat a ľudí (Casati *et al.* 2006). Infekcia u ľudí môže nastať po uhryznutí infikovaným kliešťom, transfúziou krvi alebo transplacentárne z infikovanej matky na plod (Young *et al.* 2019).

V Európe sú pri voľne žijúcich prežúvavcoch osobitne zaujímavé tri druhy, a to *Babesia divergens*, *B. capreoli* a *Babesia* sp. EU1, ktorá bola neskôr pomenovaná aj ako *B. venatorum* (Michel *et al.* 2014). Charakteristika týchto druhov je založená na porovnaní kompletných sekvencií 18 S rRNA génov (Lempereur *et al.* 2012).

Babesia divergens je pôvodcom babeziózy u hovädzieho dobytku, ale je schopná infikovať aj iné domáce a voľne žijúce prežúvavce. Ojedinele bola hlásená ako pôvodca smrteľných ochorení u imunosuprimovaných ľudí, prípadne ľudí po splenektómii (odstránenie sleziny) (Michel *et al.* 2014). Celosvetovo prvý prípad ľudskej nákazy babeziózou bol hlásený v roku 1957 v Európe a pôvodcom pri tejto nákeze bola *B. divergens* (Skrabalo & Denanovic 1957). Druh *B. divergens*, vyžaduje u ľudí rýchlu diagnostiku, pretože klinické ochorenie je často závažné (Yabsley & Shock, 2013).

Babesia capreoli vykazuje rozdiel len v troch nukleotidoch v géne 18S rRNA v porovnaní s *B. divergens* (Lempereur *et al.* 2012), preto výskumy kliešťov využívajúce konzervované alebo krátke oblasti génu 18S rRNA môžu viesť k nesprávnej identifikácii *B. capreoli* a ďalších tzv. „*B. divergens*-like“ druhov ako *B. divergens* (Yabsley & Shock 2013). *Babesia capreoli* sa vyskytuje asymptomaticky u voľne žijúcich srncov (*Capreolus capreolus* Linnaeus, 1758). Príležitostne dokáže spôsobiť ochorenie u divožijúcich zástupcov podčľade Caprinae. Nie je známe, či má schopnosť infikovať aj hospodárske zvieratá alebo ľudí (Michel *et al.* 2014).

Babesia sp. EU1, alebo tiež *B. venatorum*, bola prvýkrát identifikovaná v Európe v roku 1998 u asplenických pacientov z Talianska a Rakúska, z čoho pochádza aj jej názov EU (Európa) 1 (Yabsley & Shock 2013). Odvtedy bola hlásená ako parazit voľne žijúcich srncov v mnohých štátoch Európy (Michel *et al.* 2014). Na základe molekulárnych analýz sa predpokladá, že *Babesia* sp. EU1 úzko súvisí s *Babesia odocoilei*, ktorá parazituje jeleňov bielych *Odocoileus virginianus* (Zimmermann, 1780) a je fylogeneticky v sesterskej skupine s *B. divergens* (Lempereur *et al.* 2012).

Babesia vulpes sp. nov. je malá piroplazma, ktorá bola po prvýkrát zaznamenaná ako pôvodca infekcie u psa v Španielsku a bola nesprávne zaradená do rodu *Theileria* a pomenovaná ako *Theileria annae*. V roku 2003 bola *T. annae* po prvýkrát zaznamenaná u líšok *Vulpes vulpes* (Linnaeus, 1758), ktoré predstavujú prírodný rezervoár pre tohoto parazita a sú zdrojom infekcie pre domácich psov. Neskôr sa na základe molekulárnych analýz zistila príbuznosť k rodu *Babesia* a druh bol premenovaný podľa hostiteľa ako *Babesia vulpes* sp. nov (Baneth *et al.* 2015).

1.2.1.2 *Theileria* spp.

Najstaršie záznamy o theilerióze u hovädzieho dobytku pochádzajú z misijných kroník Sv. Monclaro z roku 1569, ale až začiatkom dvadsiateho storočia získala viac pozornosti zo strany vedeckej komunity (Dantas-Torres & Otranto 2017).

Rod *Theileria* úzko súvisí s rodom *Babesia* (Fuehrer *et al.* 2013). Theilerie sú patogény prenášané kliešťami parazitujúcimi domáce a voľne žijúce zvieratá v rôznych častiach sveta (Sawczuk *et al.* 2006). *Babesia* spp. sú intracelulárne parazity spôsobujúce infekciu erytrocytov, zatiaľ čo *Theileria* spp. (Obr. 10) sú schopné infikovať okrem erytrocytov aj leukocyty (Fuehrer *et al.* 2013). Theilerie sa prenášajú kliešťami z čeľade Ixodidae a vyvíjajú sa v črevných epitelových bunkách a v slinných žľazách svojich vektorov. Majú komplexný životný cyklus zahŕňajúci dvoch rôznych hostiteľov, a to kliešte a prežúvavce (Kiara *et al.* 2018). Do dnešného dňa nebola potvrdená žiadna infekcia theileriózy u ľudí (Dantas-Torres & Otranto 2017).

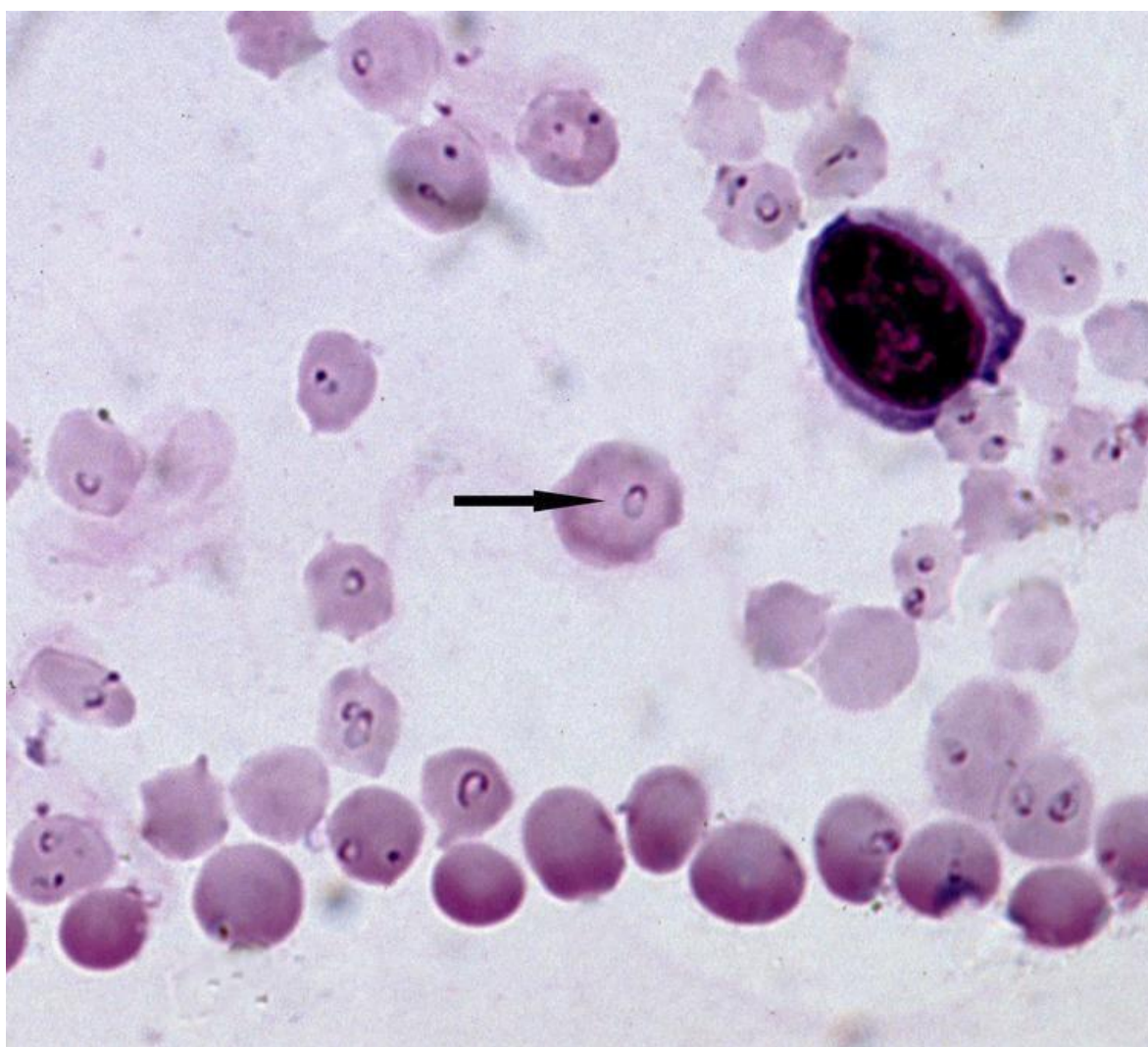
Medzi vysoko patogénne druhy patria *Theileria parva* (Theiler, 1904) a *Theileria annulata* u prežúvavcov s významnou úmrtnosťou a hospodárskymi stratami v tropických a subtropických zemepisných šírkach (Fuehrer *et al.* 2013). Najmenej osem druhov *Theileria* má schopnosť infikovať hovädzí dobytok a päť je schopných infikovať malé prežúvavce po celom svete a spôsobiť choroby s rôznym stupňom závažnosti (Dantas-Torres & Otranto 2017). Iné druhy *Theileria* boli označené ako mierne patogénne alebo benígne, pravdepodobne kvôli dlhému vývojovému vzťahu medzi parazitom a hostiteľom. Klinické príznaky sa ale napriek tomu môžu objaviť u oslabených živočíchov, ktoré sú parazitované inými organizmami alebo trpia podvýživou (Sawczuk *et al.* 2006).

Prítomnosť patogénov *Theileria* spp. bola opätovne zistená u niekoľkých druhov jeleňovitých (Galuppi *et al.* 2010).

Theileria cervi Bettencourt Françaet Borges, 1907 bola identifikovaná u jeleňov obyčajných (*O. virginianus*) a losov (*Cervus canadensis* Erxleben, 1777) (Galuppi *et al.* 2010).

Theileria capreoli Rukhlyadev, 1939 bola prvýkrát morfológicky opísaná v srncoch (*C. capreolus*) (Galuppi *et al.* 2010).

Nové druhy *Theileria* boli izolované zo vzoriek získaných z lovej zvery v severnom Španielsku: *Theileria* sp. OT3 v jeleňoch (*Cervus elaphus* Linnaeus, 1758), srncoch a kamzíkoch (*Rupicapra rupicapra* (Linnaeus, 1758)) a *Theileria* sp. 3185/02 v jeleňoch a srncoch (Galuppi *et al.* 2010).



Obr. 10: Mikroskopický záber infekcie *Theileria* spp. v krvi. Zdroj: <https://alchetron.com/Theileria> (30.4.2020)

Zo Slovenska existuje doteraz veľmi málo informácií o výskyte theilerií vo voľne žijúcich zvieratách a kliešťoch. V roku 1958 Černý (1958) mikroskopickými technikami opísal *Theileria* sp. v krvi jeleňov z Topolčianok. Následne až v roku 2018 bola u

jeleňovitých (jeleň lesný, daniel škvrnitý, srnec hôrny) žijúcich v Malých Karpatoch a v kliešťoch cicajúcich na týchto zvieratách (*I. ricinus*, *H. concinna*) zaznamenaná vysoká prevalencia parazitácie theileriou, ktorá bola na základe molekulárnych analýz zaradená do druhu *T. capreoli* (Kazimírová *et al.* 2018).

1.2.2 *Anaplasma phagocytophilum*

Prvé správy o anaplazmóze pochádzajú z konca 19. Storočia z Južnej Afriky. Identita pôvodcu choroby sa však odhalila až v roku 1910, keď Max Theiler opísal druh *Anaplasma marginale*, ktorý spôsobil závažné ochorenie hovädzieho dobytku (Dantas-Torres & Otranto 2017).

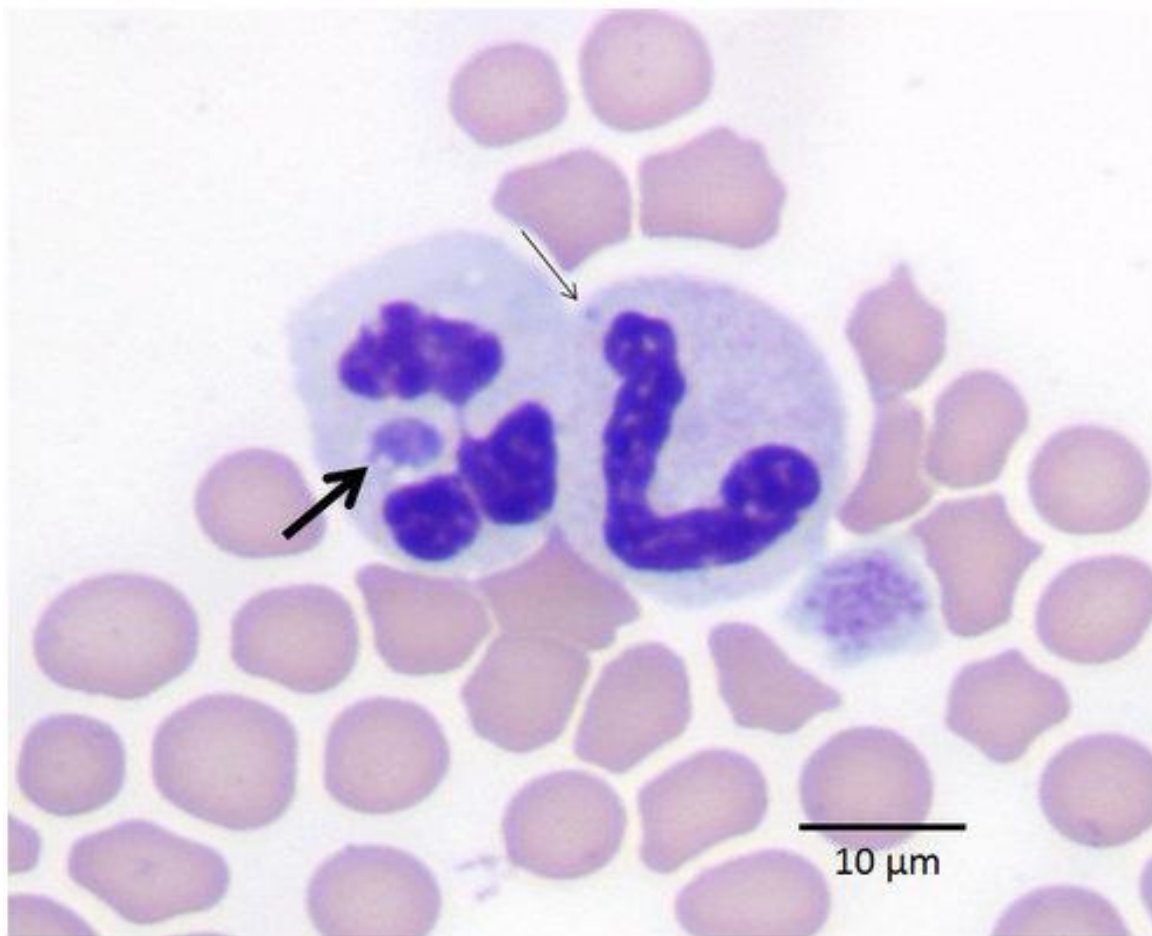
Anaplazmóza je spôsobená baktériami rodu *Anaplasma*, ktoré patria do čeľade *Anaplasmataceae*, radu *Rickettsiales*. Rod zahŕňa malé (približne 0,3 µm) gramnegatívne pleomorfne baktérie (Dantas-Torres & Otranto 2017).

Niektoré z týchto organizmov sú známe ako ľudské a veterinárne patogény (Stefanidesova *et al.* 2008).

V súčasnosti existuje sedem platných druhov rodu *Anaplasma* (*A. bovis*, *A. caudatum*, *A. centrale*, *A. marginale*, *A. ovis*, *A. phagocytophilum* a *A. platys*) (Dantas-Torres & Otranto 2017).

Anaplazmóza spôsobená *A. phagocytophilum* (Obr. 11) je ochorenie lekárskeho a veterinárneho významu s rôznymi klinickými prejavmi, od subklinických po život ohrozujúce (Stefanidesova *et al.* 2011). Je to akútne nešpecifické systémové horúčkové ochorenie, ktoré môže sprevádzať vysoká horúčka (> 39 ° C), myalgia, bolesť hlavy, zimnica, nevoľnosť, artralgia, anorexia, nevoľnosť a kašeľ (Stefanidesova *et al.* 2008).

Anaplasma phagocytophilum je geneticky heterogénny druh, ako sa ukázalo na základe analýz sekvencií rôznych génov, ako napríklad 16S rRNA, groEL, msp4, msp2 a ankA a niekoľkých ďalších (Jahfari *et al.* 2014 ; Stuen *et al.* 2014; Kauffmann *et al.* 2017).



Obr. 11: Granulocyty v krvi človeka infikované *A. phagocytophilum*. Zdroj: <https://www.lymemcw.org/anaplasmosis> (30.4.2020)

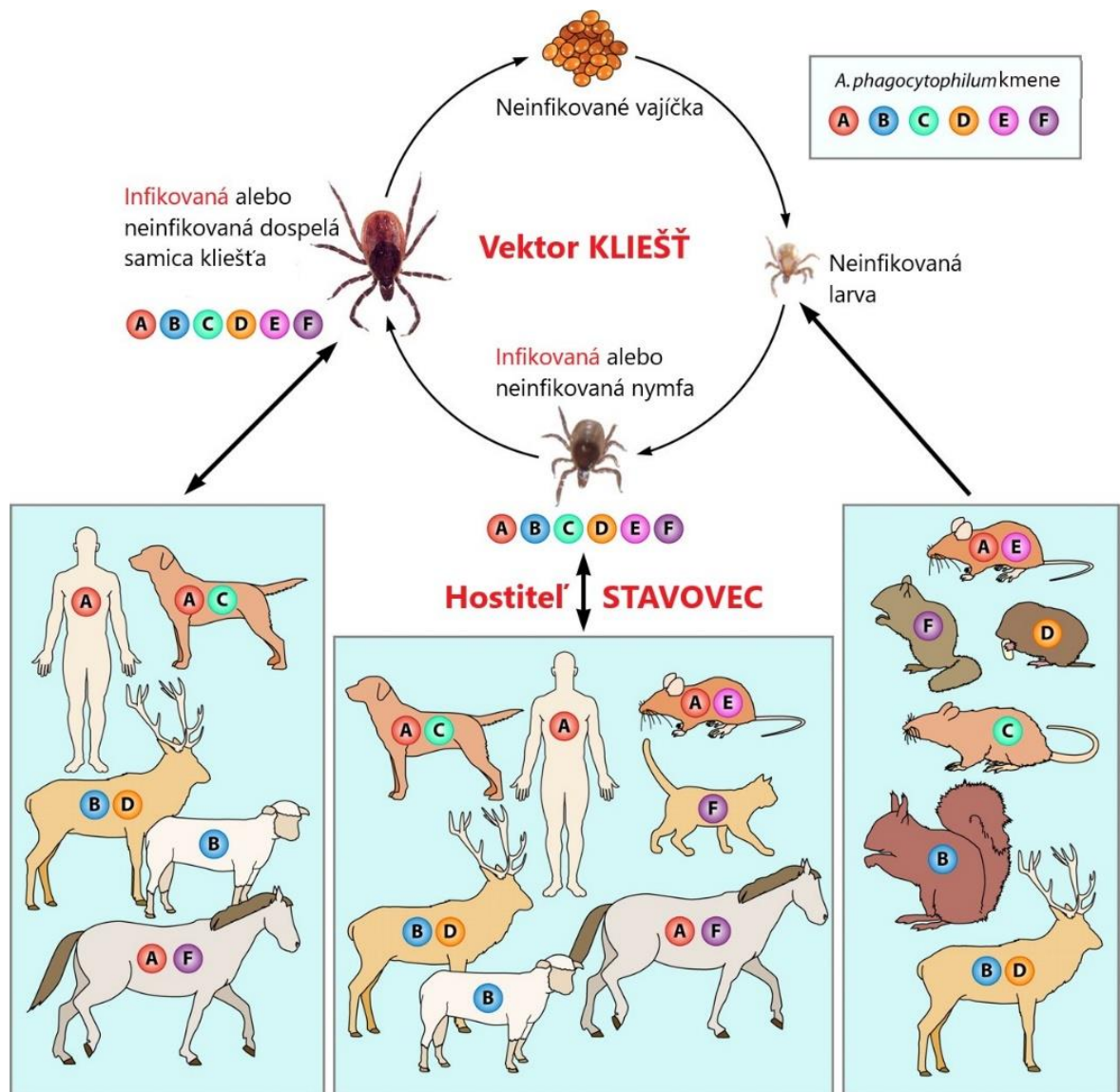
Prvé prípady ľudskej anaplazmózy boli hlásené v roku 1994 v Spojených štátoch. O niekoľko rokov neskôr bol prvý prípad ľudskej anaplazmózy opísaný v Európe u pacienta zo Slovinska (Dantas-Torres & Otranto 2017).

V Európe sa prenáša prostredníctvom kliešťov *Ixodes ricinus* (Stefanidesova *et al.* 2011, Stuen *et al.* 2013). Na Slovensku bol doteraz potvrdený len jeden klinický prípad granulocytárnej anaplazmózy (Nováková *et al.*, 2010)

Životný cyklus *A. phagocytophilum* zahŕňa kliešte ako vektory a divožijúce alebo domáce zvieratá ako hostiteľov (Obr. 12).

Na Slovensku bola zaznamenaná vysoká prevalencia infekcie *A. phagocytophilum* u niekoľkých druhov divožijúcich prežúvavcov (Smetanová *et al.* 2006, Stefanidesová *et al.* 2018, Víchová *et al.* 2014,), vrátane jeleňovitých v Malých Karpatoch (Kazimírová *et al.* 2018). Niektoré varianty spojené so srcami (*C. capreolus*) ako rezervoármí, sú pravdepodobne pre ľudí, domáce prežúvavce, kone a psy nepatogénne, zatiaľ čo pri variantách, ktoré

boli nájdené u jeleňov (*C. elaphus*) sa predpokladá, že sú patogénne pre ľudí, prežúvavce aj kone (Hamšíková *et al.* 2019). U diviakov býva prítomnosť *A. phagocytophilum* detegovaná zriedkavejšie, avšak taktiež predstavujú prirodzený rezervoár (Stefanidesova *et al.* 2011, Reiterová *et al.* 2016, Kazimírová *et al.* 2018).



Obr. 12: Životný cyklus *A. phagocytophilum*. Zdroj: Rikihisa (2011) (Upravené.)

2 CHARAKTERISTIKA ÚZEMIA

Juhozápadné Slovensko zahŕňa Podunajskú nížinu, Malé Karpaty a Záhorskú nížinu. Zahŕňa Nitriansky, Bratislavský, Trnavský a Trenčiansky kraj.

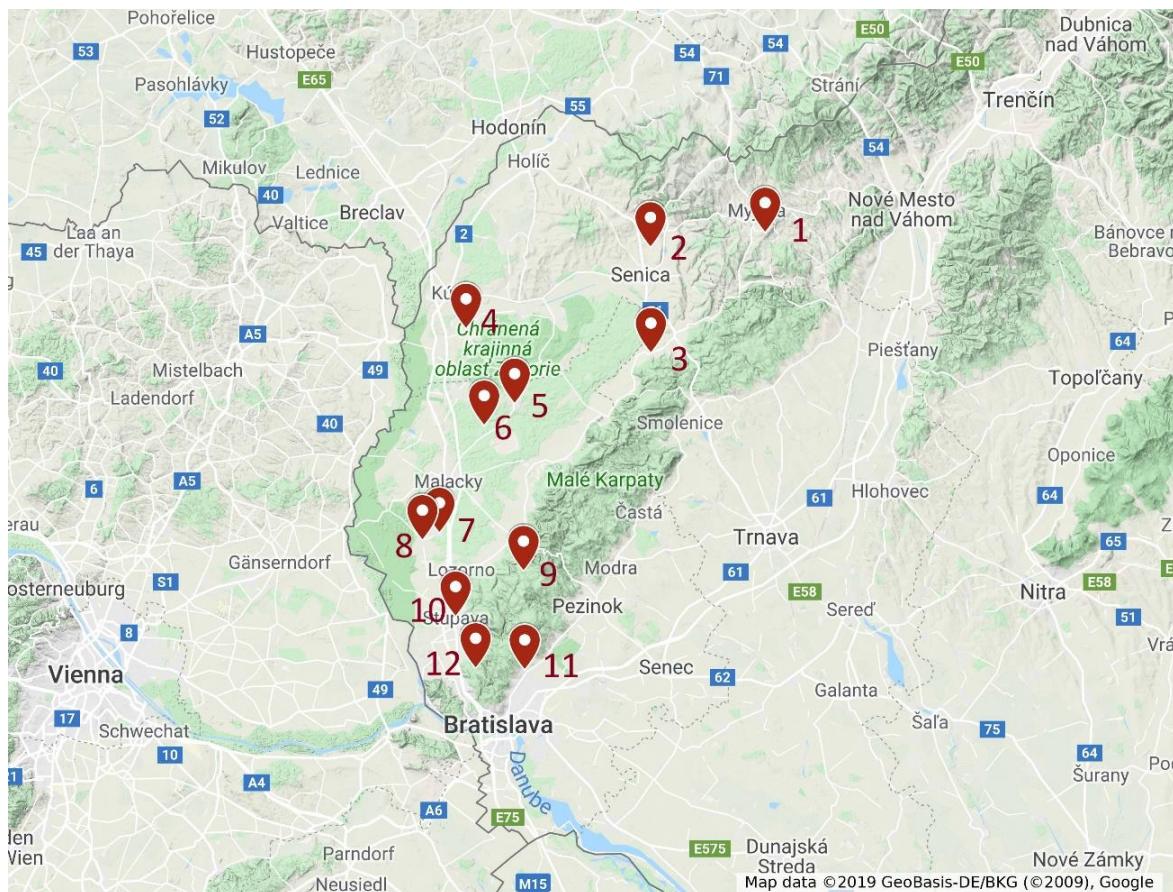
Podunajská nížina je charakterizovaná úrodnou černoziemou, hnedozemou ale aj sprašmi. Zahŕňa aj oblasť Žitného ostrova, ktorú považujeme za najúrodnejšie územie v našej republike [1]. Pozdĺž riek sa vyskytujú mokrade, ktoré presahujú národný význam a ochrana má celoeurópsky význam. Významnou súčasťou Podunajskej nížiny sú aj lužné lesy. Pre lužné lesy sú typickými stromami jaseň, topoľ, dub, brest, jelša. Z kríkov sa vyskytujú najmä zemolez, baza, čremcha. Nachádza sa tu chránené vtáčie územie Sysľovské polia, na ktorom sa vyskytuje náš najväčší vták drop fúzatý *Otis tarda* Linnaeus, 1758 (Chavko *et al.* 2009). Podunajská nížina hraničí na západnej strane s Malými Karpatami.

Malé Karpaty sú súčasťou Alpsko-himalájskej sústavy a sú najzápadnejším pohorím karpatského oblúka. Prevažujú tu dubové a dubovo-hrabové lesy, vo vyšších polohách bučiny a miestami jaseňovo-javorové lesy. Z ihličnatých stromov sa vyskytujú jedľa, tis a borovica. Malé Karpaty tvoria na západnej strane prirodzenú hranicu zo Záhorskou nížinou [2].

Záhorská nížina vyplňa väčšinu územia medzi Malými Karpatami a riekou Morava. Delí sa na Borskú nížinu a Chvojnickú pahorkatinu. Borská nížina je na Slovensku plošne najväčšie územie viatych pieskov s prevahou borovicových lesov. Borovica (*Pinus sylvestris*) je tu domovským druhom vyskytujúcim sa už od obdobia Dryasu (Šomšák *et al.* 2004). Chvojnická pahorkatina je zastúpená dubovými lesmi zasahujúcimi z Bielych Karpát a borovicovými lesmi na juhu a západe. K najdôležitejším riekam patria Myjava, Rudava, Chvojnica. Záhorská nížina patrí k územiám s bohatým a pestrým zastúpením fauny a flóry. Nachádza sa tu Chránená krajinná oblasť Záhorie s rozlohou 275km². Ďalej môžeme pozorovať mnohé maloplošné chránené národné prírodné rezervácie, ako napríklad Prírodná rezervácia Bezedné v katastri obce Plavecký Štvrtok, Červený rybník v katastri obce Lakšárska Nová Ves, Horný les, Dolný les a mnohé ďalšie [3].

2.1 Sledované lokality

Sledované lokality (Obr. 13) zahŕňajú viaceré územia patriace do Malých Karpát a Záhorskej nížiny. Zo žiadnej lokality patriacej do územia Podunajskej nížiny sa nám nepodarilo získať vzorky.



Obr. 13: Sledované lokality, z ktorých pochádzajú vzorky tkanív lovej zveri a kliešťov: 1) Polianka, 2) Rovensko, 3) Cerová, 4) Vojenské lesy, 5) Borský Sv. Jur, 6) Studienka, 7) Plavecký Štvrtok, 8) Láb, 9) Turecký vrch, 10) Stupava, 11) Rača, 12) Kačín. Zdroj: Google maps. Upravené.

V spolupráci s poľovníkmi zastrešenými Vojenskými lesmi a majetkami SR, š.p. sa nám podarilo získať cenné vzorky kliešťov a tkanív z oblasti výcvikového priestoru Turecký vrch nachádzajúceho sa v obci Jabloňové v Malých Karpatoch a z ďalších častí vojenského obvodu nachádzajúcich sa na Záhorskej nížine. Táto oblasť je oblasťou viatych pieskov.

Iné vzorky pochádzali z obce Plavecký Štvrtok a jedna zo zrazeného jedinca pri obci Láb. Obec Plavecký Štvrtok je charakterizovaná borovicovými lesmi. V katastri obce sa

nachádza Prírodná rezervácia Bezedné, ktorá je tvorená jelšovým lesom a močiarom, uprostred ktorého sa nachádza eolické jazero. Má charakter slatiniska [4].

V blízkosti Studienky a Borského Svätého Jura sa nachádza taktiež národná prírodná rezervácia Červený Rybník, ktorá je súčasťou CHKO Záhorie. Je tvorená pôvodným jelšovým porastom a nachádzajú sa tu významné slatinné rašeliniská a domov tu nachádzajú mnohé vzácne druhy vodných rastlín [5].

Obec Polianka sa rozkladá na oblasti Myjavskej pahorkatiny, na rozhraní povodí Morava a Váh. Myjavskú pahorkatinu obklopujú na juhovýchode Malé Karpaty, na východe Považské podolie a na severe Biele Karpaty. Na západe sa nachádza Chvojnická pahorkatina a na juhozápade Borská nížina, ktoré spoločne tvoria Záhorskú nížinu.

Obec Rovensko, z ktorej taktiež pochádzajú vzorky sa nachádza v okrese Senica. Územie obce je chudobné na vodu, pretože sa tu nachádzajú nepriepustné sedimenty. V súčasnej dobe je flóra obce chudobná, pretože pôda bola dlhé roky využívaná na poľnohospodárske účely. Nachádzajú sa tu len riedke dubové a agátové lesy [6].

Na západnom úpätí Malých Karpát sa nachádza obec Cerová, ktorá je ďalšou nami sledovanou lokalitou. Obec susedí s lesom s názvom „Bor“. Ide o borovicový a zmiešaný les. Cez kataster obce preteká riečka Rudava, ktorá sa vlieva do Moravy a potok Cerová [7].

Posledné dve sledované lokality sa nachádzajú v Bratislave. Územie Bratislavy pretína Dunaj a Malé Karpaty. Na brehoch Dunaja a Moravy môžeme nájsť pozostatky lužných lesov, na úpätiach Malých Karpát zase duby, hraby a buky. Severozápad Bratislavy je tvorený Záhorskou nížinou. Naše sledované lokality sa nachádzajú v Malých Karpatoch medzi Račou a Kačínom.

3 MATERIÁL A METÓDY

Prvou a azda najdôležitejšou súčasťou výskumu bolo nadviazanie spolupráce s poľovníkmi na území juhozápadného Slovenska.

Od poľovníkov sme sa snažili získať ratice a stiahnutú kožu z uhynutých, ulovených alebo autom zrazených zvierat a slezinu, prípadne krvnú zrazeninu. Slezina a krvné zrazeniny boli skladované v 70 % etanole v chladničke. Získané ratice a kožu bolo potrebné následne podrobne prehliadnuť a pinzetou zozbierať kliešte, prípadne aj iné ektoparazity, ak boli prítomné. Všetky nájdené ektoparazity, vrátane kliešťov, sme dávali do značených 2 ml skúmaviek Eppendorf naplnených 70 % etanolom.

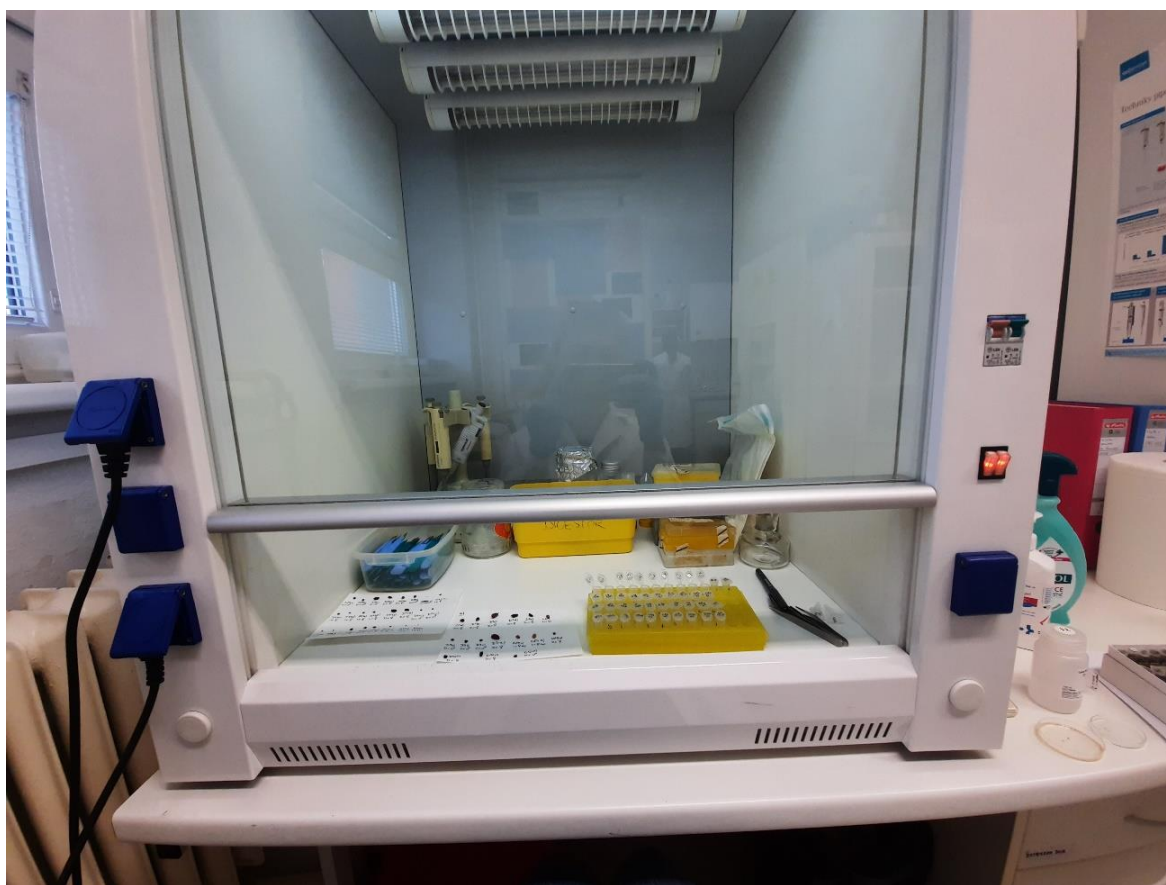
3.1 Determinácia kliešťov

Ďalším krokom bola determinácia kliešťov, zaradenie do druhu, vývinového štádia a pri dospelých jedincoch aj rozdelenie na základe príslušnosti k pohlaviu.. Pri určovaní kliešťov nám bol nápomocný Obrázkový kľúč dospelých kliešťov (Acari: Ixodida) fauny Slovenska (Slovák 2010) a Obrázkový kľúč lariev a nýmfov kliešťov (Acari: Ixodida) fauny Slovenska (Slovák, 2014). Tieto obrázkové kľúče sú aplikovateľné hlavne na nenacicané jedince, preto sme používali tiež knihy *Ticks of Europe and North Africa* (Estrada-Peña *et al.* 2017) a *Klieszczce Polski (Acari: Ixodida)* (Siuda 1993). Správne určenie do druhu je veľmi dôležité, nakoľko následne možno očakávať, aké patogény môže kliešť prenášať (Slovák 2010). Pri určovaní kliešťov bola použitá optická stereolupa Motic DM-39, Petriho miska, pinzeta, 1,5 ml alebo 2 ml skúmavky Eppendorf naplnené 70% etanolom pre roztriedenie podľa stanovených kritérií (druh, vývinové štádium, pohlavie). Skúmavky sme dôsledne označili, aby nedošlo k zámene vzoriek. Po zaradení všetkých kliešťov do druhu, vývinového štádia a pohlavia bolo potrebné všetky jedince spočítať a vytvoriť prehľadnú tabuľku, ktorá obsahovala aj údaje o hostiteľovi a lokalite.

3.2 Izolácia DNA

Na extrakciu DNA zo slezín sme použili komerčný kit Macherey Nagel Nucleospin® Tissue. Prvá časť prípravy vzoriek sa robila v digestore (Obr. 14), ktorý sa pred prácou

nechal vždy vyžiariť UV svetlom pre vytvorenie sterilného prostredia, aby neprišlo prípadnej kontaminácii vzoriek. Po celý čas sme pracovali v sterilných jednorázových nitrilových rukaviciach. Kúsok sleziny sme odrezali skalpelovou čepielkou a nechali odpariť etanol po dobu 10 minút.. Potom sme slezinu vložili do 1,5 ml Eppendorf skúmavky Safe Lock a rozdrtili na menšie kúsky skalpelom. Po pridaní 180 μ l lyzačného pufru T1 a 25 μ l proteinázy K sme vzorky zvortexovali (BIOSAN, Lotyšsko) a nechali inkubovať pri 56 °C v termobloku s trepačkou (Biosan TS-100) do nasledujúceho dňa (t.j. približne 24 hodín).



Obr. 14: Prvá časť izolácie DNA zo slezín a kliešťov sa robila v digestore.

Na druhý deň (Obr. 15) sme vzorky vybrali z termobloku, zvortexovali a po pridaní pufru B3 opäť zvortexovali a inkubovali v termobloku po dobu 10 minút pri 70 °C. Po inkubácii sme ich opäť zvortexovali a pridali sme 210 μ l 96 % etanolu. Potom sme vzorky zvortexovali a cca 600 - 700 μ l vzorky prepipetovali do kolóniek s membránou vložených do zberných skúmaviek (1,5 ml) a centrifugovali 1 minútu pri 11000 g na stolnej centrifúge Mikro 120 (Hettich). Filtát sme odstránili a kolónky sme vložili späť do zberných

skúmaviek. Po pridaní 500 µl pufru BW sme vzorky opäť scentrifugovali 1 minútu pri 11000 g. Filtrát sme následne opäť odstránili a pridali sme 600 µl pufru B5 a scentrifugovali 1 minútu pri 11000 xg. Filtrát sme odstránili a vložili späť do centrifúgy na 1 minútu pri rovnakých otáčkach, aby sa membrána v kolónke vysušila. Kolónky sme premiestnili do nových zberných skúmaviek a do kolóniek sme napipetovali 50 µl elučného pufru BE nahriateho na 70 °C. Nasledovala inkubácia 1 minútu a vzorky sme centrifugovali na 11000 g po dobu 1 minúty. Potom sme pridali opäť 50 µl elučného pufru BE zohriateho na 70 °C a postup sme opakovali. Filtrát obsahujúci čistú DNA sme rozdelili na dve alikvótne časti a zmrazili pri -20 °C.



Obr. 15: Druhá časť izolácie DNA po 24 hodinovej inkubácii v termobloku s trepačkou.

Izoláciu DNA z kliešťov (Obr. 16) sme po identifikácii robili KITOM Marchery Nagel Nucleospin® Tissue a postup sa od izolácie DNA zo slezín nelíši. DNA z dospelých jedincov a nýmfov sme izolovali jednotlivo, larvy sme izolovali v skupinách (pooloch) – z jedného zvieraťa najviac v piatich pooloch po piatich larvách.

primermi. Metóda využíva schopnosť DNA polymerázy syntetizovať komplementárne vlákno DNA podľa jednovláknového templátu. Riadili sme sa protokolom na PCR pre *Babesia* spp. (Casati *et al.* 2006) a použili sme komerčný HotStarTaq PCR kit (Qiagen, Hilden, Nemecko).

Na amplifikáciu 450 bp fragmentu 18S rRNA génu sme použili primery BJ1 a BN2, špecifické pre rod *Babesia* (Tab. 1).

Tab. 1: Primery použité v PCR reakcii (Casati *et al.* 2006). (BP-počet amplifikovaných báзовých párov)

Patogén	Gén	Primery	Sekvencie (5'-3')	BP
<i>Babesia</i> spp.	18 S rRNA	BJ1(forward) BN2(reverse)	GTCTTGTAATTGGAATGATGG TAGTTTATGGTTAGGACTACG	450

PCR reakcia jednej vzorky prebiehala v objeme 25 µl (Tab. 2). V každej reakcii bola zahrnutá aj pozitívna a negatívna kontrola. Pracovali sme vždy s 37 vzorkami DNA. Pre zachovanie sterilných podmienok sme PCR mix pripravovali v PCR boxe (BioAir INSTRUMENTS, aura PCR) v cleanroome po vyžiarení UV svetlom a templáty sme pridávali v osobitnej miestnosti.

Tab. 2: Zloženie PCR mixu.

Nuclease Free Water	14,875 µl
PCR pufor	2,5 µl
MgCl ₂ (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 (negat. kontrola)	5 µl
Objem spolu	25 µl

Amplifikáciu sme robili v termocykléri značky BioRad (BioRad t 100 thermal cycler, USA). Reakcia spočívala z počiatočnej denaturácie po dobu 5 minút pri 95 °C. Nasledovalo

35 cyklov denaturácie (1 minúta pri 94°C), anelácie (1 minúta pri 55°C) a elongácie (2 minúty pri 72°C). Finálna elongácia trvala 5 minút pri teplote 72°C (Tab. 3).

Tab. 3: Nastavenie podmienok v termocykléri.

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

3.3.1 Elektroforéza

Po amplifikácii pomocou PCR nasledovalo overenie jej úspešnosti pomocou horizontálnej elektroforézy. Ide o často využívanú metódu separácie makromolekúl za pomoci elektrického prúdu. Namnožená časť 18S rRNA obsahuje záporné nabité fosfátové skupiny, keďže ide o nukleovú kyselinu, takže sa jej fragmenty pohybujú od zápornej elektródy ku kladnej.

Elektroforéza prebiehala na 1,5 % agarózovom géli, ktorý sme pripravili za použitia 75 ml roztoku 1x TAE na gél (TAE buffer (50x) molecular biology grade, SERVA), do ktorého sme pridali 1,125 g agarózy (Agarose SERVA for DNA electrophoresis). Zmes sme dôkladne premiešali a dali rozpustiť do mikrovlnnej rúry na maximálne 2 minúty. Do horúceho roztoku sme následne napipetovali 3,5 µl farbičky Invitrogen SYBR Safe DNA Gel Stain a vzniknutú zmes sme preliali do elektroforéznej vaničky (BioZym), ponorili doňho hrebene na vytvorenie 40 jamiek a nechali stuhnúť, čo trvalo približne 30 minút. Po úplnom vytuhnutí gélu sme vytiahli hrebene a gél zaliali tlmivým roztokom TAE tak, aby bol celý gél v roztoku ponorený. Do vzniknutých jamiek sme napipetovali po 5 µl PCR produktu. Do prvej jamky sme napipetovali DNA ladder (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific), do druhej negatívnu kontrolu, do tretej pozitívny PCR produkt a do ostatných (37 jamiek) PCR produkty skúmaných vzoriek. Do vzoriek sme neprimiešavali žiadne farbivo, nakoľko nami používaný PCR mix mal v zložení pufoer coral load PCR, ktorý už farbivo obsahuje.

Elektroforéza bežala po dobu 45 minút pri 120V. Použili sme zdroj vysokého napätia značky BioRad. Následne po skončení reakcie sme vzorky v géli nechali vizualizovať pod

UV svetlom v transilluminátore Benchtop 3UV™ Transilluminator LMS-12 (Veľká Británia) a každý gél sme si odfotili.

3.3.2 Purifikácia PCR produktu

Purifikáciu sme robili podľa manuálu Marchery Nagel Nucleospin® Gel and PCR Clean-up. Pri veľmi malých objemoch vzorky <30 µl sme upravili objem reakčnej zmesi na 50 – 100 vodou. Objem vzorky sme zmiešali s pufrom NTI v objeme 1:2. Celý objem vzorky sme napipetovali do 2 ml zbernej skúmavky. Následne sme vzorku centrifugovali po dobu 30 sekúnd pri 11 000 g. Filtrát sme odstránili a kolónku vložili späť do zbernej nádoby. Do kolónky sme napipetovali 700 µl pufru NT3 a opäť centrifugovali pri 11 000 g. Filtrát sme odstránili a tento krok opakovali ešte raz, aby sme minimalizovali prenos chaotropnej soli a zlepšili hodnoty výsledného produktu. Následne sme opäť centrifugovali po dobu 1 minúty pri 11 000 g, aby sa úplne odstránil pufr NT3. Kolónku sme premiestnili do čistej zbernej nádoby s objemom 1,5 ml a pridali 15-30 µl tlmivého roztoku NE. Vzorky sme nechali inkubovať pri izbovej teplote po dobu 1 minúty a následne centrifugovali pri 11 000 g po dobu 1 minúty.

3.3.3 Sekvenovanie

Purifikovanú DNA z PCR produktov, ktoré boli pozitívne na prítomnosť DNA *Babesia* spp. sme zaslali na sekvenovanie do externého komerčného laboratória. Prvýkrát sme PCR produkty zasielali do Mycrosynth, Austria a všetky ďalšie boli zasielané do MacroGen Europe, Amsterdam, Holandsko, kde boli sekvenované. Sekvenovanie prebehlo Sangerovou metódou z oboch strán fragmentov.

3.3.4 Analýza sekvencií

Získané sekvencie fragmentu hypervariabilnej oblasti génu 18S rRNA pre *Babesia* spp. sme editovali v programe Unipro UNIGENE. Homologické sekvencie sme zarovnali použitím programu Unipro UNIGENE. Následne sme ich porovnali so sekvenciami uloženými v génovej banke (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pomocou Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Pre vytvorenie dendrogramu sme z databázy GenBank stiahli sekvencie reprezentatívnych druhov Piroplasmida a vybrané sekvencie sme spolu s našimi sekvenciami zarovnali (multiple alignment) pomocou metódy ClustalW. Pozície v jednotlivých sekvenciách obsahujúce medzery a tiež chýbajúce údaje sme vylúčili. Dendrogramy sme vytvorili pomocou metódy maximálnej vierohodnosti (maximum likelihood) (počet bootstrap replikácií 1000) v programe MEGAX na základe modelu Tamura-Nei (Tamura & Nei 1993).

3.4 Real time PCR na detekciu *Anaplasma phagocytophilum*

Na detekciu prítomnosti *A. phagocytophilum* v biologickom materiáli sme amplifikovali 77-bp dlhý úsek génu *msp2* (z angl. major surface protein) (Tab. 4, 5) pomocou real time PCR (Courtney *et al.* 2004; Svitáľková *et al.* 2015).

Tab. 4: Primery použité na amplifikáciu úseku génu *msp2 A. phagocytophilum*

ApMSP2f	(5'-ATGGAAGGTAGTGTGTTGTTATGGTATT-3')
ApMSP2r	(5'-TTGGTCTTGAAGCGCTCGTA-3')

Tab. 5: Komplementárna próba TaqMan:

ApMSP2p TaqMan probe (5'-TGGTGCCAGGGTTGAGCTTGAGATTG-3'
značená 5'-FAM – TAMRA-3'

Real time PCR je metóda, ktorá umožňuje presnú kvantifikáciu špecifických nukleových kyselín v komplexnej zmesi aj v prípade, že východisková koncentrácia izolovanej DNA je vo veľmi nízkej hodnote. Sleduje sa amplifikácia cieľovej sekvencie v reálnom čase za použitia fluorescenčnej technológie.

Pri príprave PCR mixu sme používali komerčný SuperHot Master Mix (BIORON, Germany). Reakčnú zmes sme pripravovali v Cleanroome v PCR boxe (BIOAIR INSTRUMENTS, Taliansko) za zachovania sterilných podmienok.

Reakčnú zmes (Tab. 6) sme zvortexovali na vortexe (BIOSAN, Lotyšsko) a rozpipetovali po 20 µl do stripov PCR, mikroskúmaviek spojených po 8 kusov so samostatným viečkom s objemom 0,2 ml (BIORAD, USA). Najvyšší možný počet vzoriek testovaných pri jednej detekcii bol 96, teda 94 nami testovaných templátových DNA a pozitívna a negatívna kontrola. Do každej mikroskúmavky sme následne napipetovali 5 µl z nami

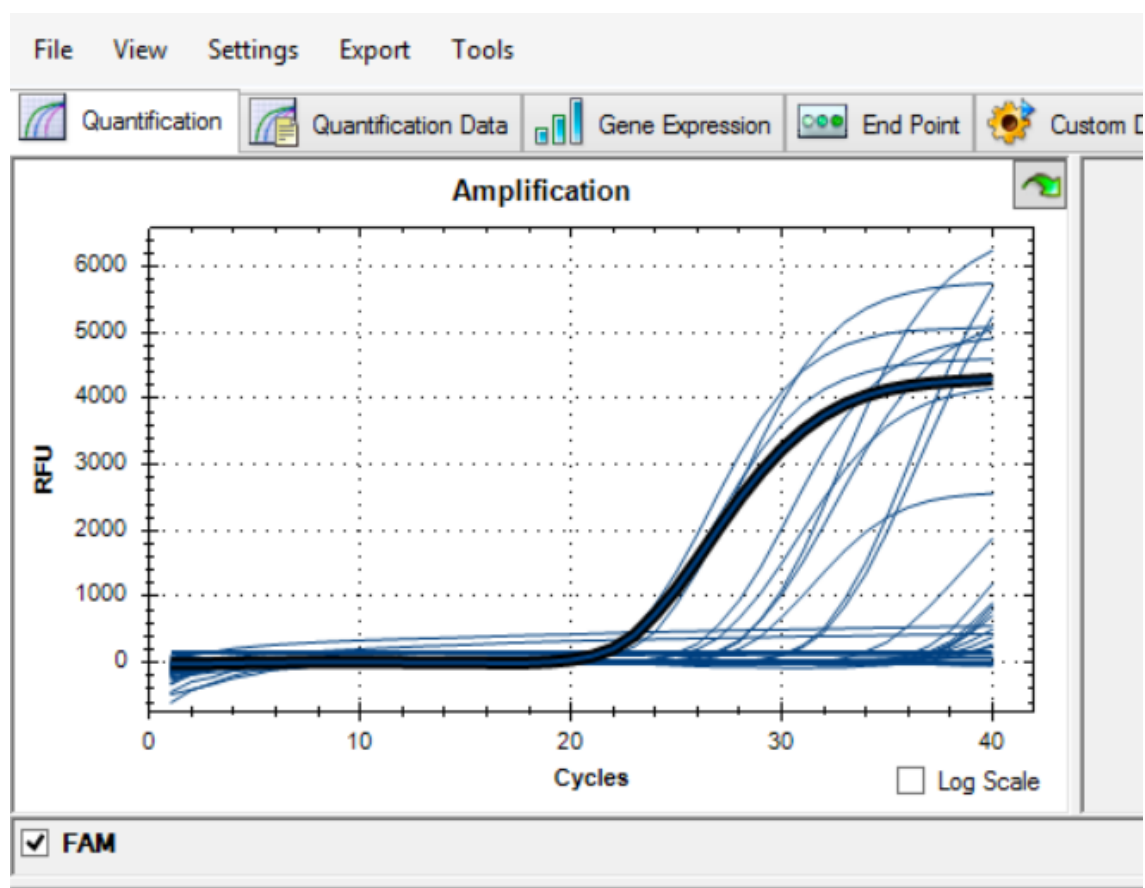
vyizolovanej vzorky DNA. Pozitívna a negatívna kontrola bola použitá pri každej reakcii. Ako pozitívnu kontrolu sme použili DNA vzorky pozitívnej na *A. phagocytophilum*. Do negatívnej kontroly sme namiesto vzorky DNA pridali 5 µl Nuclease Free Water, ktorú sme používali aj pri príprave PCR mixu.

Tab. 6: Zloženie reakčnej zmesi na jednu vzorku.

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

Podmienky PCR reakcie boli nasledovné: úvodná denaturácia pri 94°C po dobu 2 minúty a následne 39 cyklov denaturácie pri 94°C po dobu 15 sekúnd a anelácie pri 60°C po dobu 1 minúty. Každá reakcia sa uskutočnila pri reakčnom objeme 25 µl v stripoch. Použili sme termocyklér (CFX96 Real-Time PCR System, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Výsledky sme vyhodnotili pomocou programu CFX Manager (Bio-Rad, CA, USA) (Obr. 17). Za pozitívne vzorky sme považovali tie, ktorých krivky rástli exponenciálne a prah detekcie (C_q-hodnota, threshold cycle) bol nižší ako 37,5. Všetky výsledky sme si následne uložili do súboru.



Obr. 17: Grafický výstup z chromatografu pre Real Time PCR, tmavo vyznačená krivka je pozitívna kontrola (v tomto prípade s hodnotou $C_q = 21,36$).

4 VÝSLEDKY

4.1. Tkanivové vzorky

Od októbra 2018 do konca decembra 2019 sa nám od poľovníkov podarilo získať vzorky z celkovo 127 jedincov. Získané vzorky pochádzali zo štyroch jeleňov *Cervus elaphus*, 17 srncov *Capreolus capreolus*, 19 danielov *Dama dama* Linnaeus, 1758, troch muflónov *Ovis musimon* Pallas, 1811, 84 diviakov *Sus scrofa* Linnaeus, 1758, dvoch líšok a jednej kuny. Jednalo sa o ulovené, zrazené prípadne uhynuté zvieratá. Žiadne zo zvierat nebolo usmrtené na účel výskumu. Od poľovníkov sme získavali prednostne vzorky slezín, prípadne krvnú zrazeninu.

Zo všetkých získaných vzoriek slezín bola izolovaná DNA a z izolátov sa následne robila PCR na detekciu *Babesia* spp. a *Theileria* spp., po ktorej nasledovala elektroforéza, aby sme videli, či boli vzorky pozitívne alebo negatívne. Pozitívne vzorky sme následne poslali do externého komerčného laboratória a pomocou BLAST sme detegovali identitu konkrétneho druhu Piroplasmida. Použitím PCR sme DNA z vybraných vzoriek slezín vyšetrili na prítomnosť *A. phagocytophilum*. Výsledky detekcie patogénov sú zhrnuté v priloženej tabuľke (Tab.7).

Tab. 7: Vyšetrené vzorky slezín voľne žijúcich zvierat s uvedením lokality. Hrubým písmom sú vyznačené koinfekcie *Babesia* spp./*Theileria* spp. a *A. phagocytophilum*.

Druh zvierat'a	Lokalita, okres	Infekcia <i>Babesia</i> spp./ <i>Theileria</i> spp.	Infekcia <i>A. phagocytophilum</i>
<i>C. elaphus</i>	Borský Sv. Jur, SE	<i>T. capreoli</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>C. elaphus</i>	Borský Sv. Jur, SE	<i>T. capreoli</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>C. elaphus</i>	Závod, MA	<i>T. capreoli</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>C. elaphus</i>	Jablonka, MY	<i>T. capreoli</i> , slabo pozit.	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>C. capreolus</i>	Láb, MA	<i>T. capreoli</i> , slabo pozit.	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>C. capreolus</i>	Senica, SE	neg.	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>C. capreolus</i>	Rača, BA	neg.	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>C. capreolus</i>	Slanec, BA	<i>T. capreoli</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>C. capreolus</i>	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>C. capreolus</i>	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>	NEVYŠETRENÉ
<i>C. capreolus</i>	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>	neg.
<i>C. capreolus</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>C. capreolus</i>	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>C. capreolus</i>	Rača, BA	<i>T. capreoli</i> , slabo pozit.	<i>A. phagocytophilum</i>

<i>C. capreolus</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>C. capreolus</i>	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>C. capreolus</i>	Jablonka, MY	<i>T. capreoli</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>C. capreolus</i>	Polianka, MY	neg.	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>C. capreolus</i>	Jablonka, MY	<i>T. capreoli</i>, slabo pozit.	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>C. capreolus</i>	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>	neg.
<i>C. capreolus</i>	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>	neg.
<i>D. dama</i>	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>	neg.
<i>D. dama</i>	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>D. dama</i>	Rača, BA	neg.	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>D. dama</i>	Rača, BA	neg.	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>D. dama</i>	Rača, BA	neg.	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>D. dama</i>	Devínka Kobyla, BA	<i>T. capreoli</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>D. dama</i>	Kačín, BA	<i>T. capreoli</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>D. dama</i>	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>D. dama</i>	Polianka, MY	neg.	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>D. dama</i>	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>D. dama</i>	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>D. dama</i>	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>D. dama</i>	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>	NEVYŠETRENÉ
<i>D. dama</i>	Rača, BA	neg.	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>D. dama</i>	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>D. dama</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>D. dama</i>	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>D. dama</i>	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>O. musimon</i>	Kačín, BA	neg.	neg.
<i>O. musimon</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>O. musimon</i>	Rača, BA	neg.	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>S. scrofa</i>	Borský Sv. Jur, SE	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Plav. Štvrtok, MA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Plav. Štvrtok, MA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Plav. Štvrtok, MA	neg.	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>S. scrofa</i>	Plav. Štvrtok, MA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Plav. Štvrtok, MA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.

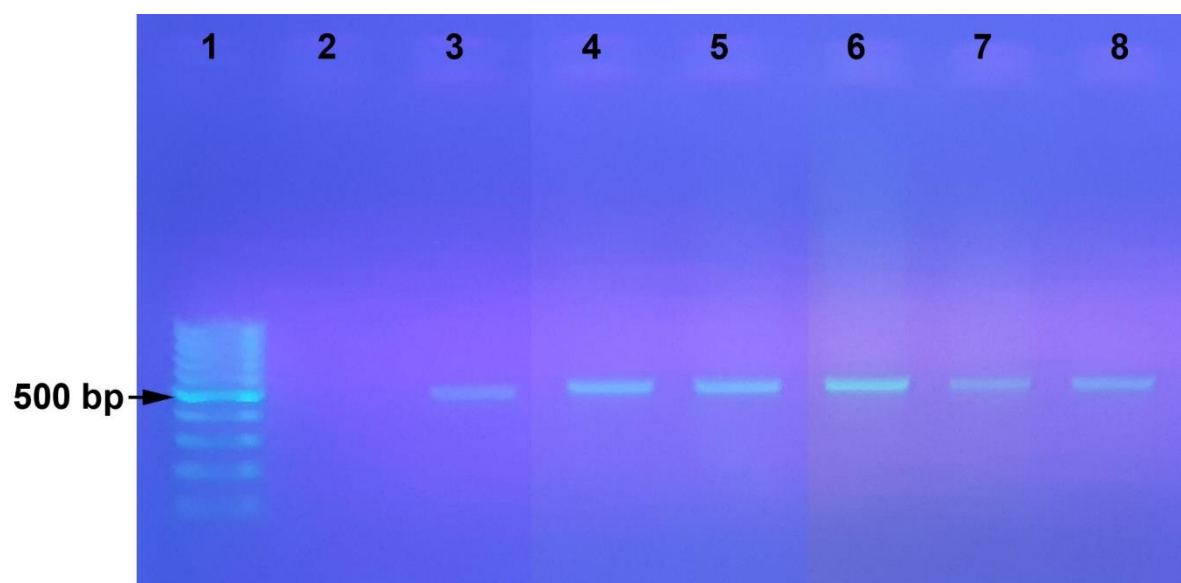
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	<i>A. phagocytophilum</i> , slabo poz.
<i>S. scrofa</i>	Kačín, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Maria foráž les	neg.	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>S. scrofa</i>	Kačín, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Kačín, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Devínska Kobyla, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Mestské lesy, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Kačín, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Bučany, TT	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Bučany, TT	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.

<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	<i>A. phagocytophilum</i> , slabo poz.
<i>S. scrofa</i>	Cerová, SE	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Hlboké, SE	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Hlboké, SE	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Lesopark, BA	neg.	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>S. scrofa</i>	Jablonka, MY	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Jablonka, MY	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	<i>A. phagocytophilum</i> , slabo poz.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Plav. Štvrtok, MA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	<i>A. phagocytophilum</i>
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Plav. Štvrtok, MA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	neg.
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	NEVYŠETRENÉ
<i>S. scrofa</i>	Rača, BA	neg.	<i>A. phagocytophilum</i> , slabo poz.
<i>V. vulpes</i>	Rovensko, SE	neg.	neg.
<i>V. vulpes</i>	Rovensko, SE	<i>B. vulpes</i> , slabo pozit.	neg.
<i>M. foinea</i>	Rovensko, SE	neg.	neg.

4.1.1 Piroplasmida

4.1.1.1 Prevalencia

Testovanie na prítomnosť Piroplasmida odhalila prítomnosť *Babesia vulpes* u jednej líšky a *Theileria capreoli* pri vzorkách z 28 jedincov rôznych druhov jeleňovitých (Obr. 18). Spolu bolo pozitívnych 29 vzoriek slezín z celkovo 127 vyšetrených, čo predstavuje mieru prevalence piroplazmiem 22,8 % (Tab. 7)



Obr. 18: Vizualizácia PCR amplifikovaného fragmentu génu 18S rRNA *Babesia* spp./*Theileria* spp. vo výške 450 bp na agarózovom géli. Dráhy (zľava do prava): 1 - DNA ladder 100 bp, 2 - negatívna kontrola, 3 - pozitívna kontrola, 4-6 - *T. capreoli* v slezine srnca, daniela a jeleňa. 7 - *T. capreoli* v samičke *I. ricinus* zo srnca, 8 - *Babesia* sp. v samičke *H. concinna* zo srnca.

Prítomnosť *T. capreoli* bola zaznamenaná vo všetkých štyroch vzorkách slezín jeleňov, čo predstavuje prevalenciu 100 %.

Pri testovaní vzoriek zo srncov sa nám prítomnosť tohto patogénu potvrdila v 12 z celkového počtu 17 vyšetrených vzoriek, čo predstavuje mieru prevalence 70,5 %.

Vzorky z danielov pochádzali z celkovo 18 jedincov, pričom prítomnosť *T. capreoli* sa potvrdila u 12 jedincov, čo predstavuje podobnú mieru prevalence ako pri srncoch a to 66,6 %.

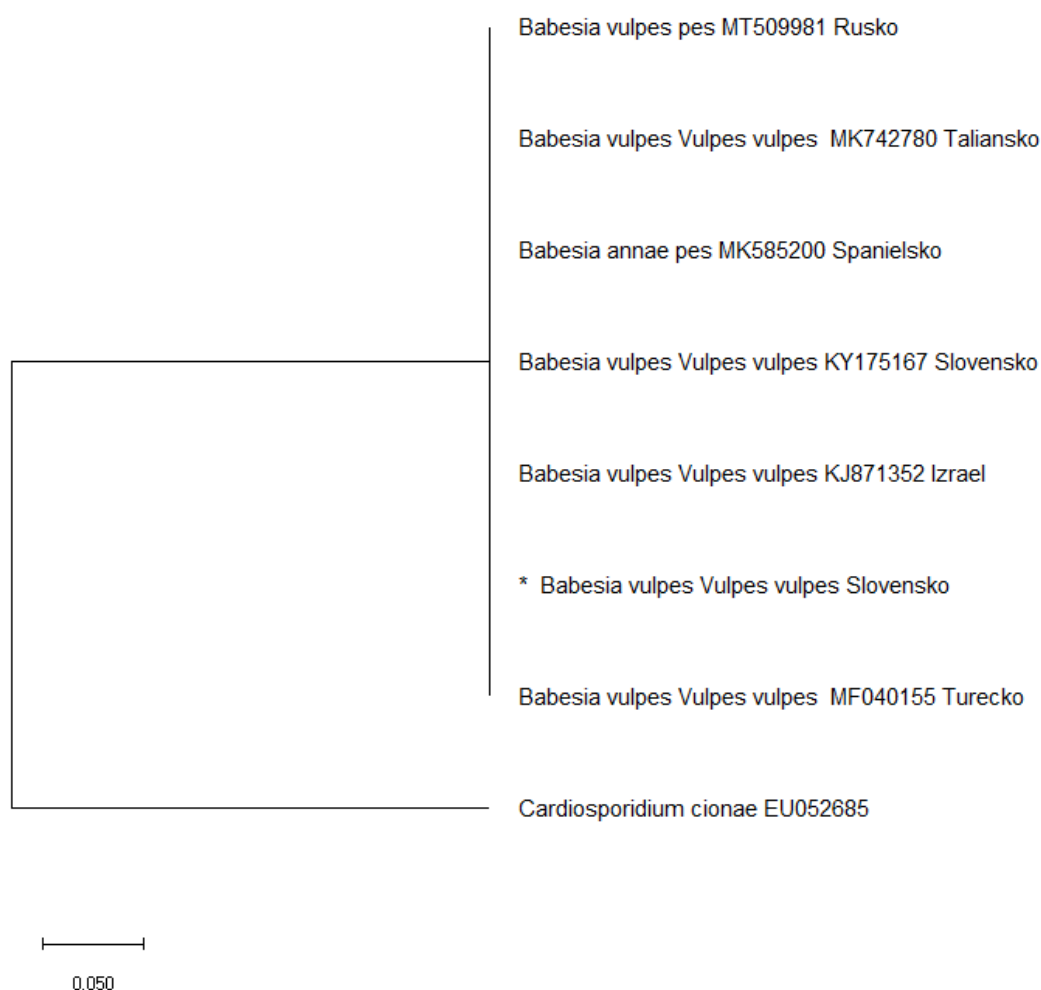
Všetky z celkovo 82 vyšetrených vzoriek slezín diviakov boli negatívne.

Z celkového počtu troch kusov vyšetrených vzoriek divožijúcich mäsožravcov (2 líšky a 1 kuna) sa v jednej líške potvrdila prítomnosť *B. vulpes*, na základe čoho môžeme konštatovať 50 % prevalenciu tohto druhu mikroorganizmu v líškach.

4.1.1.2 Molekulárna analýza

Na základe získaných sekvencií fragmentu génu 18S rRNA v pozitívnej vzorke zo sleziny líšky a vybraných sekvencií *B. vulpes*, ktoré sú uložené v GenBank, sme zostrojili fylogenetický strom, v ktorom všetky sekvencie tvoria jeden klastor (Obr. 19). Pomocou BLAST analýzy sme potvrdili 100%-nú zhodu nami identifikovanej sekvencie so sekvenciami izolátov z líšok zo Slovenska (KY175167 = prístupové číslo v GeBank), z Talianska (MK742780), Španielska (MK585200), Izraela (KJ871352) a Turecka (MF040155) a zo psa z Ruska (MT509981).

Na základe sekvencií fragmentu génu 18S rRNA vo vybraných pozitívnych vzorkách zo slezín jeleňovitých a vybraných sekvencií *Theileria* sp., ktoré sú uložené v GenBank, sme zostrojili fylogenetický strom, v ktorom sú sekvencie zoradené v jednom klastri, pričom sekvencie z *C. capreolus* tvoria osobitný subklastor (Obr. 20). Pomocou BLAST analýzy sme potvrdili 100%-nú mieru zhody našich sekvencií z danielov a jeleňov so sekvenciami *T. capreoli* resp. *Theileria* spp. v izolátoch z danielov a jeleňov zo Slovenska (KX470612, KX470611), z jeleňov z Nemecka (KU510436) a Poľska (DQ520836), a 100%-nú zhodu našich sekvencií zo srncov so sekvenciami *T. capreoli* resp. *Theileria* spp. v izolátoch zo srncov zo Slovenska (KX470610) a Španielska (DQ866842).



Obr. 19: Fylogenetický strom sekvencie 18S rRNA *Babesia vulpes* zostrojený pomocou metódy maximálnej vierohodnosti (maximum likelihood) a modelu Tamura-Nei. Zobrazený je fylogenetický strom s najvyššou pravdepodobnosťou vierohodnosti. V konečnom súbore bolo celkovo 375 pozícií. 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 = 0,3086)). Strom sme nakreslili do mierky s dĺžkami vetiev meranými v počte substitúcií na mieste. Analýza zahŕňala 8 nukleotidových sekvencií. Všetky polohy obsahujúce medzery a chýbajúce údaje boli eliminované (možnosť kompletnej delécie). Mierka znázorňuje 5 substitúcií na 100 nukleotidových pozícií. Izolát získaný v našej práci je označený hviezdíčkou. 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.



Obr. 20: Fylogenetický strom sekvencií 18S rRNA *Theileria* spp. zostrojený pomocou metódy maximálnej vierohodnosti (maximum likelihood) a modelu Tamura-Nei. Zobrazovaný je fylogenetický strom s najvyššou pravdepodobnosťou vierohodnosti. V konečnom súbore bolo celkovo 374 pozícií. Percento stromov, v ktorých sa zoskupili združené taxóny je zobrazené vedľa vetvy. Počiatočný strom/stromy pre heuristicke vyhľadávacie boli získané automaticky použitím algoritmov Neighbor-Join a BionNJ pre maticu párových vzdialeností odhadovaných pomocou princípu modelu Tamura-Nei a výber topológie s vyššou hodnotou pravdepodobnosti vierohodnosti. Diskrétna distribúcia Gamma bola použitá na modelovanie vývojových rozdielov medzi miestami (5 kategórii (+G, parameter = 0,4082)). Strom sme nakreslili do mierky s dĺžkami vetiev meranými v počte substitúcií na mieste. Analýza zahŕňala 21 nukleotidových sekvencií. Všetky polohy obsahujúce medzery a chýbajúce údaje boli eliminované (možnosť kompletnej delécie). Mierka znázorňuje 5 substitúcií na 100 nukleotidových pozícií. Izoláty získané v našej práci sú označené hviezdikami. 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.

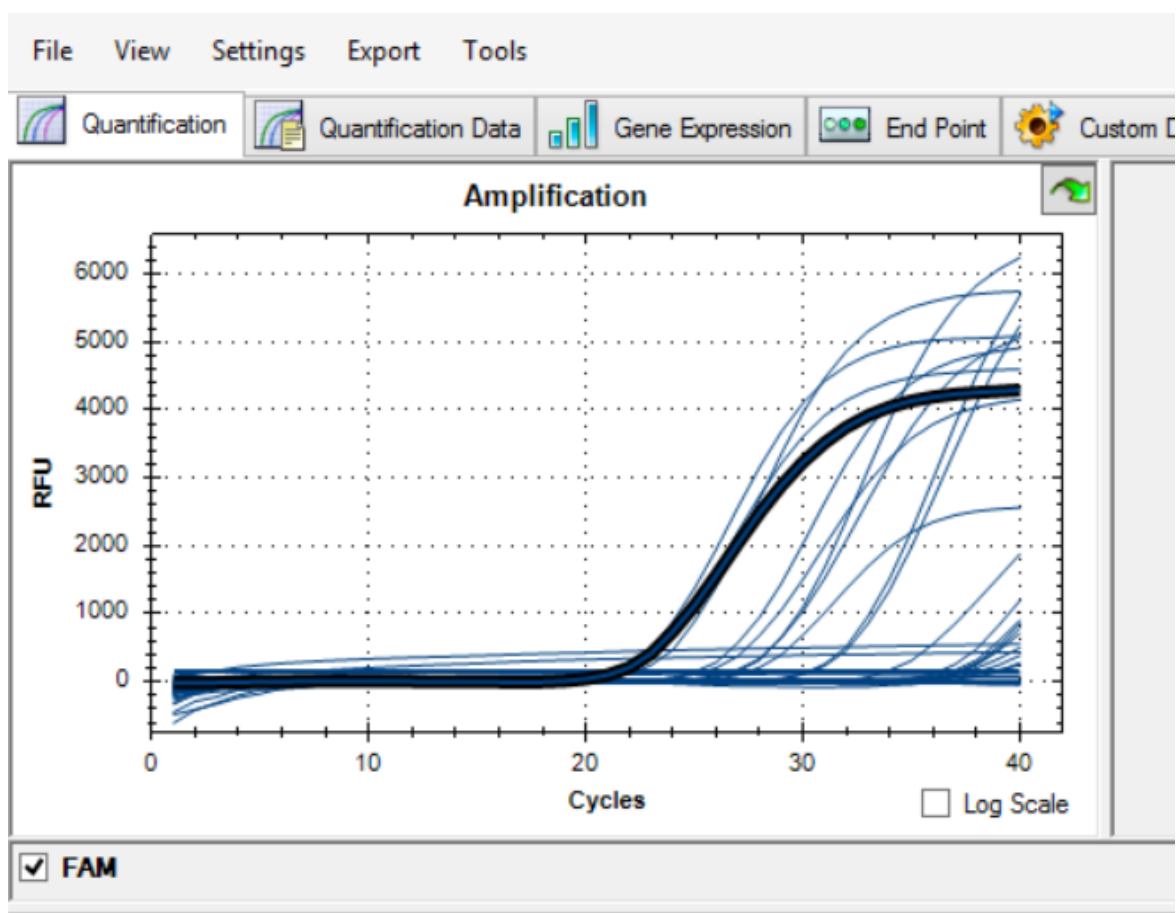
4.1.2 *Anaplasma phagocytophilum*

Pri vyšetreniach na prítomnosť *A. phagocytophilum* sme pristúpili k výberu vzoriek, a to z kapacitných dôvodov a taktiež z dôvodu, že epidemiologická situácia z územia Malých Karpát, z ktorých pochádzali viaceré vzorky získané z Bratislavského kraja, je zo štúdií z posledných rokov už čiastočne známa (Kazimírová et al., 2018). Z celkového počtu 94 vyšetrených vzoriek bolo 42 pozitívnych (Tab. 7), čo predstavuje spolu 44,6 % mieru premorenia u lovných zvierat na juhozápadnom Slovensku. Pozitívne vzorky sme vyhodnocovali v Real Time PCR na základe hodnoty Cq, pričom za pozitívnu sme považovali každú vzorku s hodnotou nižšou ako 37,5 (Obr. 21). Vo viacerých vyšetrených vzorkách boli zistené koinfekcie *T. capreoli* a *A. phagocytophilum* (Tab. 7).

Koinfekcie boli celkovo zaznamenané v miere 23,4 %.

Vo všetkých štyroch vzorkách pochádzajúcich z jeleňov bola zistená okrem predtým zistenej prítomnosti *T. capreoli* prítomnosť *A. phagocytophilum*, čo predstavuje 100 % prevalenciu prítomnosti oboch týchto mikroorganizmov.

Zo vzoriek slezín srncov bolo vybraných 16 kusov, ktoré boli otestované na prítomnosť *A. phagocytophilum*, pričom pozitívny výsledok bol zaznamenaný pri 11 vzorkách, čo predstavuje 68,7 % prevalenciu. Koinfekcia bola zistená v 8 vzorkách, čo znamená, že 50 % srncov predstavuje rezervoár pre viac ako jeden patogén súčasne.



Obr. 21: Vzorka sleziny *C. capreolus* testovaná na prítomnosť *A. phagocytophilum* s hodnotou Cq 22,9.

Na testovanie bolo vybraných 17 vzoriek slezín z danielov, pričom *A. phagocytophilum* bola prítomná v 16 vzorkách, čo naznačuje 94,1 % mieru premorenia, pričom až v 10 prípadoch sa jednalo o koinfekciu. Koinfekcia *T. capreoli* a *A. phagocytophilum* predstavuje 58,8 %.

Z troch testovaných slezín muflónov bola pozitívna len jedna vzorka, čo predstavuje 33,3 %, pričom koinfekcie neboli zaznamenané.

Z vybraných 51 vzoriek z diviakov bola prítomnosť *A. phagocytophilum* zaznamenaná v 10 vzorkách, čo predstavuje prevalenciu 19,6 %, pričom treba povedať, že 4 z 10 pozitívnych vzoriek boli slabo pozitívne. U žiadnej vzorky nebola zaznamenaná koinfekcia s iným vyšetreným druhom mikroorganizmu.

Všetky tri vzorky získané z divožijúcich mäsožravcov boli negatívne na prítomnosť *A. phagocytophilum*.

4.2 Kliešte

4.2.1 Druhové spektrum kliešťov

Od októbra 2018 do decembra 2019 sa nám z materiálu poskytnutého od poľovníkov (ratice, koža) podarilo z lokalít na juhozápadnom Slovensku získať celkovo 1424 kliešťov rôznych ontogenetických štádií, ktoré sme zaradili do troch druhov: *Ixodes ricinus*, *Haemaphysalis concinna* a *Dermacentor reticulatus* (Tab. 8).

Tab. 8: Celkový počet zozbieraných kliešťov zaradených do druhu a vývinového štádia.

Druh	Larva	Nymfa	Samička	Samček	Spolu
<i>I. ricinus</i>	30	214	239	101	584
<i>H. concinna</i>	91	343	63	283	780
<i>D. reticulatus</i>	-	-	23	37	60
Spolu	121	557	325	421	1424

Kliešte pochádzali z 15 srncov (Tab. 9), 10 jeleňov (Tab. 10), 14 danielov (Tab. 11), 3 muflónov (Tab. 12) a 9 diviakov (Tab. 13) a medzidruhovo boli zastúpené rôzne.

Tab. 9: Celkový počet kliešťov zozbieraných zo srncov na juhozápadnom Slovensku.

Druh	Larva	Nymfa	Samička	Samček	Spolu
<i>I. ricinus</i>	13	67	25	10	115
<i>H. concinna</i>	76	252	62	283	673
Spolu	89	319	87	293	788

Tab. 10: Celkový počet kliešťov zozbieraných z jeleňov na juhozápadnom Slovensku.

Druh	Larva	Nymfa	Samička	Samček	Spolu
<i>I. ricinus</i>	-	7	47	8	62
<i>D. reticulatus</i>	-	-	-	6	6
Spolu	-	7	47	14	68

Tab. 11: Celkový počet kliešťov zozbieraných z **danielov** na juhozápadnom Slovensku.

Druh	Larva	Nymfa	Samička	Samček	Spolu
<i>I. ricinus</i>	17	132	154	80	383
<i>H. concinna</i>	15	91	1	-	107
<i>D. reticulatus</i>	-	-	4	5	9
Spolu	32	223	159	85	499

Tab. 12: Celkový počet kliešťov zozbieraných z **muflónov** na juhozápadnom Slovensku.

Druh	Larva	Nymfa	Samička	Samček	Spolu
<i>I. ricinus</i>	-	8	3	7	18
Spolu	-	8	3	7	18

Tab. 13: Celkový počet kliešťov zozbieraných z **diviakov** na juhozápadnom Slovensku.

Druh	Samička	Samček	Spolu
<i>I. ricinus</i>	6	-	6
<i>D. reticulatus</i>	19	26	45
Spolu	25	26	51

4.2.2 Vyšetrenie na Piroplasmida

4.2.2.1 Prevalencia

Z kapacitných dôvodov nebolo možné testovať všetky kliešte, preto sme na testovanie na prítomnosť Piroplasmida urobili náhodný výber kliešťov najviac po 5 kusov z každého druhu a ontogenetického štádia z jedného zvierat'a. Larvy boli izolované v pooloch po 5 kusov v počte najviac 5 poolov z jedného druhu a z jedného zvierat'a. Celkovo sme na prítomnosť Piroplasmida vyšetřili 221 vzoriek kliešťov, z ktorých bolo 58 vzoriek pozitívnych, čo znamená 26,2 % mieru premorenia piroplazmami u kliešťov cicajúcich na lovnej zveri. U druhu *I. ricinus* sme z celkového počtu 131 vyšetřených pozitivitu potvrdili v 37 vzorkách, čo znamená 28,2 % mieru prevalencie. Pri druhu *H. concinna* sme potvrdili len dve pozitívne vzorky z 32, čo predstavuje 6,25 % prevalenciu. Pri testovaní kliešťov druhu *D. reticulatus* bolo 19 z 58 vzoriek pozitívnych, čo predstavuje mieru premorenia až 32,75 %.

Pri testovaní kliešťov zozbieraných z jeleňov sa nám podarilo v jednom prípade zachytiť prítomnosť *Babesia* sp., avšak z dôvodu nekvalitnej sekvencie sa nám nepodarilo mikroorganizmus zaradiť do druhu. Celkovo bolo z jeleňov vyšetřených 16 vzoriek kliešťov,

jeden jedinec *H. concinna* a 15 vzoriek *I. ricinus*. Prevalencia výskytu *Babesia* spp. v kliešťoch z jeleňov bola 6,25 %. Pozitívny kliešť bola samička *I. ricinus* a pochádzal z bližšie nešpecifikovanej oblasti Poľovného revíru Záhorie z 31.10. 2018.

Pri kliešťoch zo srncov sa pri testovaní podarilo odhaliť 9 pozitívnych vzoriek, pričom sa nám podarilo niektoré zaradiť do druhu *T. capreoli*. Celkový počet vyšetrených vzoriek kliešťov bol 37, z čoho 22 patrilo do druhu *I. ricinus* so 7 pozitívnymi vzorkami a prevalenciou 31,8 % a 15 patrilo do druhu *H. concinna* s dvoma pozitívnymi vzorkami, pričom miera zamorenia bola 13,3 %. Pozitívne vzorky pochádzali z Malých Karpát (Rača, BA) (Tab. 14). Celková miera zamorenia kliešťov zo srncov bola 24,3 %.

Tab. 14: Pozitívne vzorky kliešťov pochádzajúce zo srncov testované na prítomnosť *Babesia* spp.

Hostiteľ	Kliešť	Vývinové štádium	Dátum	Lokalita	Infekcia
<i>C. capreolus</i>	<i>I. ricinus</i>	Samička	5.8.2019	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>
<i>C. capreolus</i>	<i>I. ricinus</i>	Nymfa	5.8.2019	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>
<i>C. capreolus</i>	<i>I. ricinus</i>	Samček	11.8.2019	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>
<i>C. capreolus</i>	<i>I. ricinus</i>	Samička	1.11.2019	Rača, BA	<i>Babesia</i> spp.
<i>C. capreolus</i>	<i>H. concinna</i>	Samička	1.11.2019	Rača, BA	<i>Babesia</i> spp.
<i>C. capreolus</i>	<i>H. concinna</i>	Samička	1.11.2019	Rača, BA	<i>Babesia</i> spp.
<i>C. capreolus</i>	<i>I. ricinus</i>	Nymfa	1.11.2019	Rača, BA	<i>Babesia</i> spp.
<i>C. capreolus</i>	<i>I. ricinus</i>	Nymfa	1.11.2019	Rača, BA	<i>Babesia</i> spp.
<i>C. capreolus</i>	<i>I. ricinus</i>	Nymfa	1.11.2019	Rača, BA	<i>Babesia</i> spp.

Pri testovaní na prítomnosť *Babesia* spp. z kliešťov parazitujúcich daniele sa nám podarilo zistiť pozitivitu (Obr. 18) pri 27 kliešťoch, pričom všetky okrem jedného jedinca *D. reticulatus* patrili do druhu *I. ricinus* (Tab. 15). Vyšetrených bolo celkovo 92 kliešťov, 71 *I. ricinus*, 17 *H. concinna* a 4 *D. reticulatus*. Celková miera zamorenia piroplazmami u kliešťov cicajúcich na danieloch bola 29,3 %. Prevalencia infekcie u *I. ricinus* bola 36,6 % a u druhu *D. reticulatus* 25 %. Kliešte boli zozbierané zo zvierat zo Stupavy, Poľovného revíru Záhorie a z Malých Karpát (Rača, BA). Podarilo sa nám identifikovať druh *T. capreoli* v samičkách, nymfách aj larvách *I. ricinus*. V jednej nymfe *I. ricinus* pochádzajúcej z Malých Karpát sme zaznamenali prítomnosť *B. venatorum*, ktorá predstavuje potenciálne nebezpečenstvo aj pre ľudí.

Tab. 15: Pozitívne vzorky kliešťov pochádzajúce z danielov testované na prítomnosť *Babesia* spp.

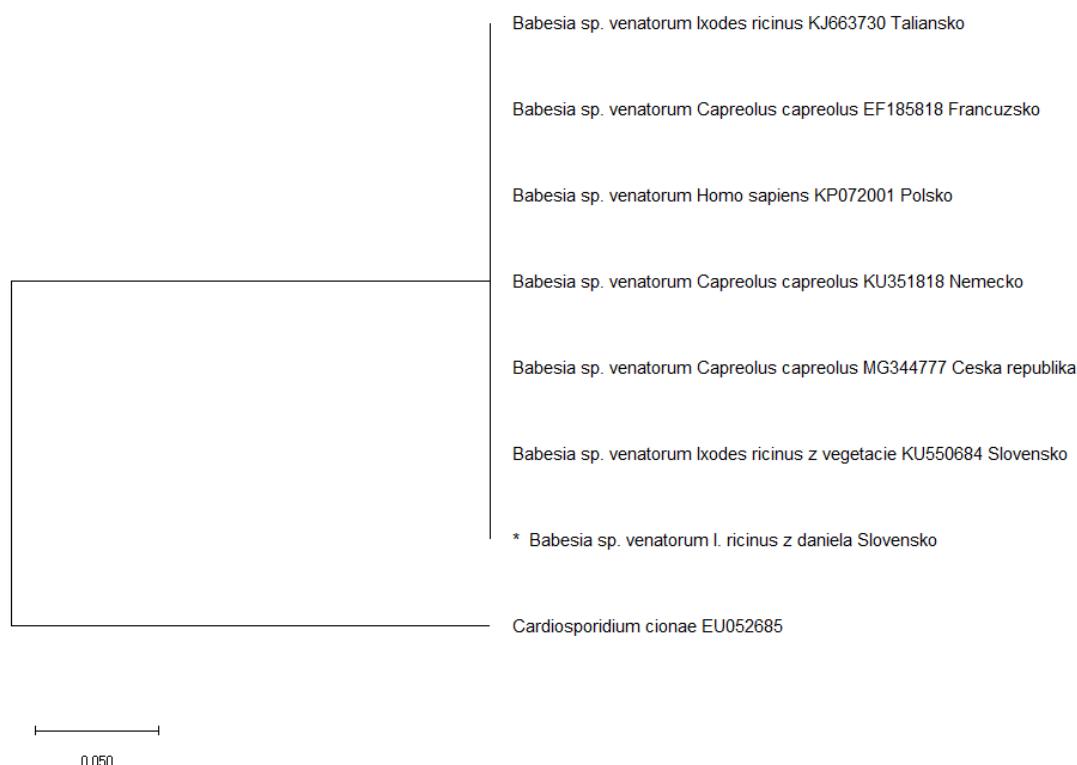
Hostiteľ	Kliešť	Vývinové štádium	Dátum	Lokalita	Infekcia
<i>D. dama</i>	<i>I. ricinus</i>	Samička	12.10.2018	Stupava, MA	<i>T. capreoli</i>
<i>D. dama</i>	<i>I. ricinus</i>	Samička	12.10.2018	Stupava, MA	<i>T. capreoli</i>
<i>D. dama</i>	<i>I. ricinus</i>	Nymfa	12.10.2018	Stupava, MA	<i>T. capreoli</i>
<i>D. dama</i>	<i>I. ricinus</i>	Samička	12.10.2018	Stupava, MA	<i>T. capreoli</i>
<i>D. dama</i>	<i>D. reticulatus</i>	Samička	30.10.2018	PR Záhorie, MA	<i>Babesia</i> spp.
<i>D. dama</i>	<i>I. ricinus</i>	Samička	8.8. 2019	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>
<i>D. dama</i>	<i>I. ricinus</i>	Nymfa	8.8. 2019	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>
<i>D. dama</i>	<i>I. ricinus</i>	Nymfa	8.8. 2019	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>
<i>D. dama</i>	<i>I. ricinus</i>	Nymfa	8.8.2019	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>
<i>D. dama</i>	<i>I. ricinus</i>	Nymfa	8.8.2019	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>
<i>D. dama</i>	<i>I. ricinus</i>	Nymfa	8.8.2019	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>
<i>D. dama</i>	<i>I. ricinus</i>	Nymfa	8.8.2019	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>
<i>D. dama</i>	<i>I. ricinus</i>	Samička	8.8.2019	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>
<i>D. dama</i>	<i>I. ricinus</i>	Samička	8.9.2019	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>
<i>D. dama</i>	<i>I. ricinus</i>	Nymfa	8.9.2019	Rača, BA	<i>B. venatorum</i>
<i>D. dama</i>	<i>I. ricinus</i>	Nymfa	24.10.2019	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>
<i>D. dama</i>	<i>I. ricinus</i>	Nymfa	24.10.2019	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>
<i>D. dama</i>	<i>I. ricinus</i>	Nymfa	24.10.2019	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>
<i>D. dama</i>	<i>I. ricinus</i>	Larvy POOL	24.10.2019	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>
<i>D. dama</i>	<i>I. ricinus</i>	Larvy POOL	24.10.2019	Rača, BA	<i>T. capreoli</i>

Všetkých 18 kliešťov pochádzajúcich z muflónov bolo na prítomnosť *Babesia* spp. negatívnych. Z nich 9 kliešťov pochádzalo z troch zvierat z Poľovného revíru Záhorie z októbra 2018. Z Malých Karpát pochádzalo taktiež 9 kliešťov z jedného zvierat'a a boli zozbierané v novembri 2019.

Z kliešťov získaných z diviakov bolo pozitívne testovaných na prítomnosť *Babesia* spp. 21 vzoriek z celkového počtu 58 testovaných, čo predstavuje prevalenciu 36,2 %. Vyšetrených bolo 5 vzoriek druhu *I. ricinus*, pričom 3 boli pozitívne, čo naznačuje 60 % prevalenciu. Z počtu 53 testovaných vzoriek *D. reticulatus* bolo pozitívnych 18, čo znamená, že miera infekcie bola u tohto druhu 33,9 %.Všetky pozitívne vzorky pochádzali z lesov v okolí obce Plavecký Štvrtok v okrese Malacky. Pozitívne vzorky sa nám nepodarilo priradiť ku konkrétnemu druhu, ale podarilo sa ich zaradiť do rodu *Babesia*.

4.2.2.2 Molekulárna analýza

Na základe sekvencie fragmentu génu 18S rRNA v pozitívnej vzorke z nymfy *I. ricinus* a vybraných sekvencií *B. sp. venatorum*, ktoré sú uložené v GenBank, sme zostrojili fylogenetický strom, v ktorom všetky sekvencie tvoria jeden klaster (Obr. 22).



Obr. 22: Fylogenetický strom sekvencií 18S rRNA *Babesia sp. venatorum*, zostrojený pomocou metódy maximálnej vierohodnosti (maximum likelihood) a modelu Tamura-Nei. Zobrazený je fylogenetický strom s najvyššou pravdepodobnosťou vierohodnosti. V konečnom súbore bolo celkovo 446 pozícií. Percento stromov, v ktorých sa zoskupili združené taxóny je zobrazené vedľa vetvy. 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 = 0,2634)). Strom sme nakreslili do mierky s dĺžkami vetiev meranými v počte substitúcií na mieste. Analýza zahŕňala 8 nukleotidových sekvencií. Všetky polohy obsahujúce medzery a chýbajúce údaje boli eliminované (možnosť kompletnej delécie). Mierka znázorňuje 5 substitúcií na 100 nukleotidových pozícií. Izolát získaný v našej práci je označený hviezdíčkom. 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.

Pomocou BLAST analýzy sme potvrdili 100%-nú zhodu nami identifikovanej sekvencie so sekvenciami izolátov z *I. ricinus* zo Slovenska (KU550684) a z Talianska

(KJ663730), izolátov zo srncov z Francúzska (EF185818), Nemecka (KU351818), Českej republiky (MG344777) a z krvi nakazeného človeka z Poľska (KP0720001).

Vo fylogenetickom strome sekvencie *Theileria* spp. identifikované v kliešťoch tvoria *I. ricinus* z danielov jeden klaster spolu so sekvenciami zo slezín jeleňov a danielov (Obr. 20).

4.2.3 *Anaplasma phagocytophilum*

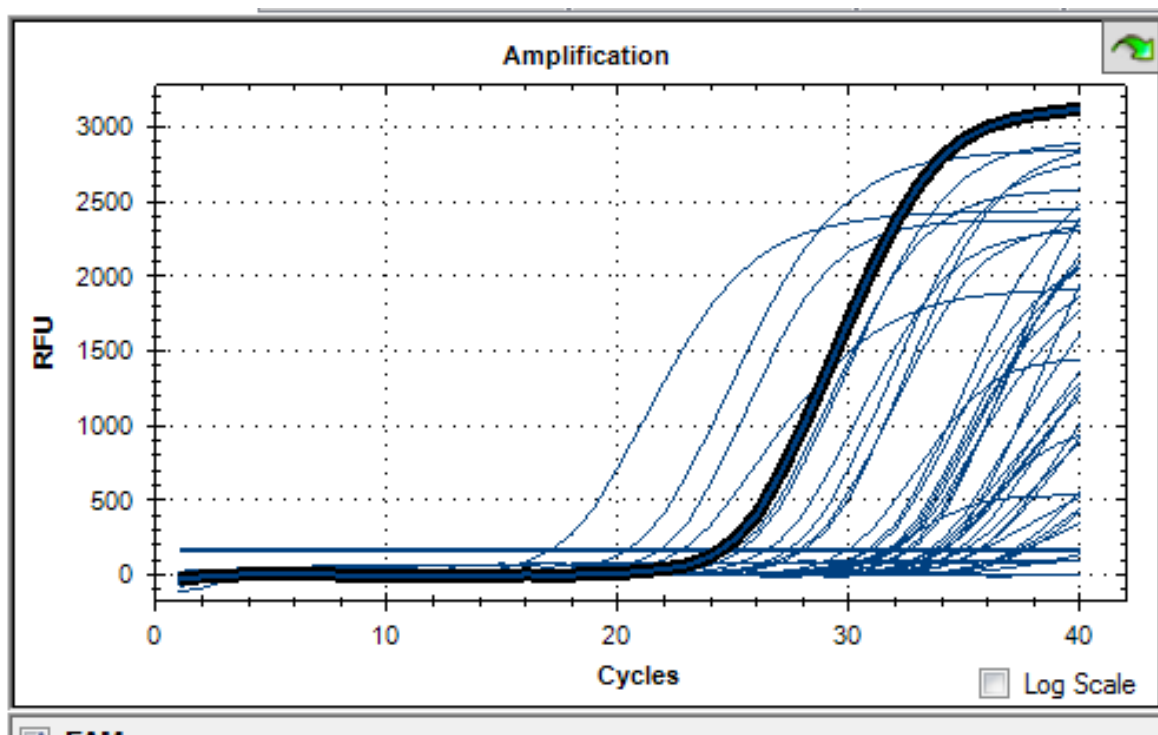
Pri testovaní na *A. phagocytophilum* sme z časových a kapacitných dôvodov nevyšetrovali všetky vzorky kliešťov, ale urobili sme náhodný výber rôznych ontogenetických štádií druhu *I. ricinus*, prednostne mimo lokality Malé Karpaty, pretože tu sa robila v predchádzajúcich rokoch taktiež štúdia (Kazimírová *et al.*, 2018), takže prevalenciu patogénu môžeme predpokladať.

Celkovo sme na vyšetrenie *A. phagocytophilum* otestovali 180 vzoriek kliešťov (Obr. 23) z voľne žijúcich zvierat vyskytujúcich sa na juhozápadnom Slovensku, z toho 131 vzoriek bolo pozitívnych, pričom sme za pozitívnu považovali každú vzorku s hodnotou Cq nižšou ako 37,5, podobne ako počas vyšetrenia slezín zo zvierat. Zistili sme mieru zamorenia kliešťov patogénom *A. phagocytophilum* 72,77 %.

Na vyšetrenie boli testované aj dve vzorky obsahujúce larvy *I. ricinus* v pooloch (Tab. 16) po 5, z čoho jedna vzorka bola pozitívna. Daniel, z ktorého pochádzali pozitívne larvy, bol taktiež pozitívny na prítomnosť *A. phagocytophilum*, pričom sa uňho vyskytovala tiež koinfekcia *T. capreoli*. Taktiež väčšina kliešťov z tohto jedinca bolo pozitívnych na oba študované patogény.

Tab. 16: Vyšetrenie lariev *I. ricinus* z daniela v pooloch na prítomnosť *A. phagocytophilum*.

Kliešť	Hostiteľ	Lokalita	Dátum	Infekcia
Larvy POOL	D. dama	PR Záhorie	22.10.2018	Negatívna
Larvy POOL	D. dama	Rača, BA	24.10.2019	Pozitívna



Obr. 23: Pozitívna vzorka kliešťa *I. ricinus* z jeleňa testovaná na prítomnosť *A. phagocytophilum* s hodnotou Cq 24,42.

Nymfy sme vyšetrovali v počte 59 vzoriek, z ktorých bolo pozitívnych 34, na základe čoho môžeme predpokladať u lovnéj zveri prevalenciu mikroorganizmu na úrovni 57,6 %. Z územia Malých Karpát pochádzalo 43 vzoriek a ostatných 16 pochádzalo zo Záhoria. Pri vzorkách z územia Malých Karpát bolo pozitívnych 23 vzoriek z vyšetrených 43, čo predstavuje 53,5 % mieru zamorenia u ným. Pri vzorkách zo Záhoria bolo pozitívnych 11 vzoriek, čo predstavuje 68,8 % zamorenosť populácie ným. patogénom *A. phagocytophilum*.

Dospelých samičiek *I. ricinus* sme na prítomnosť *A. phagocytophilum* vyšetrili 119, z čoho 100 bolo pozitívnych, čo predstavuje prevalenciu 84 %. Z územia Malých Karpát sme vyšetrili 54 vzoriek, z čoho bolo 48 pozitívnych, to znamená 88,9 % zamorenosť populácie dospelých samičiek *I. ricinus*. Zo Záhoria sme vyšetrili 65 vzoriek, z ktorých 52 bolo pozitívnych, čo znamená, že prevalencia nákazy je 80 %. Tieto porovnania demonštrujú, že zamorenosť populácií *I. ricinus* v sledovaných oblastiach na juhozápadného Slovenska je veľmi podobná.

Okrem zamorenosti jednotlivých štádií nami stanovenými patogénmi sme venovali osobitú pozornosť koinfekciám piroplazmiem a *A. phagocytophilum*. Pozorovali sme, že u všetkých kliešťov *I. ricinus*, ktoré sme s pozitívnym výsledkom vyšetrili na prítomnosť

piroplaziem sa vyskytovala aj súbežná infekcia patogénom *A. phagocytophilum*, t.j. prevalencia koinfekcie bola 100 %.

6. DISKUSIA

Kliešte a divožijúce zvieratá sú ako rezervoároví hostitelia rôznych patogénnych mikroorganizmov predmetom mnohých štúdií. Je to dôležité pre mapovanie tzv. hotspots, teda ohnisk nákaz. Úlohe divožijúcich párnokopytníkov a mäsožravcov v cirkulácii kliešťami prenášaných patogénov sa v minulosti na Slovensku nevenovala veľká pozornosť, no v posledných rokoch počet štúdií zaoberajúcich sa touto problematikou narastá.

Aké je ale druhové bohatstvo kliešťov na juhozápadnom Slovensku? Aká je premorenosť patogénmi *Babesia* spp., *Theileria* spp. a *Anaplasma phagocytophilum* u kliešťov a divožijúcich zvierat na tomto území? Získať odpovede na tieto otázky bolo cieľom mojej diplomovej práce. V spolupráci s poľovníkmi sa nám od októbra 2018 do decembra 2019 podarilo z územia juhozápadného Slovenska získať vzorky slezín zo 127 jedincov divožijúcich zvierat a zozbierať celkovo 1424 kliešťov patriacich do rodov *Ixodes*, *Haemaphysalis* a *Dermacentor*. Napriek tomu, že najvyšší počet kliešťov (= 780) patril druhu *H. concinna*, môžeme, konštatovať, že najrozšírenejším druhom bol *I. ricinus*, ako uviedol pre toto územie Korbel (1956) vo svojej štúdii už v minulom storočí. Získaný počet jedincov *H. concinna* totiž značne ovplyvnil jeden jedinec srnca ulovený v máji 2019 v Malých Karpatoch, z ktorého kože bolo zozbieraných celkovo až 541 jedincov druhu *H. concinna* v rôznych ontogenetických štádiách, čo predstavuje vyše 69 % z celkového počtu zozbieraných kliešťov tohto druhu. Najmenej zastúpeným bol druh *D. reticulatus*, čo bolo podmienené pravdepodobne tým, že najväčší podiel kliešťov pochádzal zo zvierat ulovených v Malých Karpatoch, kde sa tento druh kliešťa vyskytuje zriedkavo (Kazimírová *et al.* 2016, Hamšíková *et al.* 2016, Kazimírová *et al.* 2018)

6.1 Tkanivové vzorky

Na prítomnosť Piroplasmida sme otestovali 127 vzoriek slezín, pričom sa v 27 vzorkách jeleňovitých potvrdila prítomnosť *Theileria capreoli* a v jednej vzorke z líšky *Babesia vulpes*, na základe čoho môžeme konštatovať prevalenciu Piroplasmida na juhozápadnom Slovensku 26,2 %. Prevalencie *Babesia* spp./ *Theileria* spp. u jednotlivých druhov divožijúcich zvierat boli rôzne, u jeleňov *Cervus elaphus* 100 % (4/4), u srncov *Capreolus capreolus* 70,5 % (12/17), u danielov *Dama dama* 66,6 % (12/18), u muflónov *Ovis musimon* 0 % (0/4), u diviakov *Sus scrofa* 0 % (0/82), u lišok *Vulpes vulpes* 50 % (1/2) a u kuny *Martes*

foina 0 % (0/1).). Na prítomnosť *A. phagocytophilum* sme vyšetrili celkovo 94 vzoriek slezín lovných zvier, pričom bolo 42 pozitívnych, čo predstavuje 44,6 % prevalenciu infekcie. Prevalencie pri jednotlivých druhoch zvierat boli rôzne. U jeleňov bola prítomnosť *A. phagocytophilum* potvrdená vo všetkých 4 vzorkách, čo predstavuje 100 %, pričom u všetkých vzoriek sa vyskytovala koinfekcia s *T. capreoli*. Pri vzorkách zo slezín srncov bol výskyt patogénu *A. phagocytophilum* potvrdený v 11 vzorkách zo 16 vyšetrených, čo predstavuje 68,7 %, pričom koinfekcia bola zaznamenaná v 8 vzorkách, čo predstavuje 50 % mieru koinfekcie. U danielov sme zaznamenali *A. phagocytophilum* v miere 94,1 % (16/17) a koinfekcia bola zachytená v 10 vzorkách, čo znamená 58,8 %. U muflónov bola *A. phagocytophilum* zistená v jednej vzorke, pričom sme vyšetrili 3 vzorky. Koinfekcia nebola zaznamenaná. V 10 vzorkách slezín diviakov z 51 testovaných bola zaznamenaná prítomnosť *A. phagocytophilum*, pričom koinfekcie neboli zaznamenané. Sleziny divožijúcich mäsožravcov boli na prítomnosť *A. phagocytophilum* negatívne. Nakoľko však bol počet ulovených mäsožravcov nízky, nemôžeme úplne vylúčiť existenciu infekcie tejto skupiny zvierat baktériou ani na sledovanom území Slovenska, nakoľko infekcia mäsožravcov vrátane líšok baktériou *A. phagocytophilum* bola potvrdená v Poľsku a v ďalších krajinách strednej Európy (Szewczyk *et al.* 2019).

Podobný výskum, pri ktorom boli testované tkanivové vzorky divožijúcich párnokopytníkov a mäsožravcov v Talianskych Alpách prebiehal v rokoch 2008-2012 (Zanet *et al.* 2014), pričom bolo testovaných na prítomnosť *Babesia* spp. celkovo 1036 vzoriek, z ktorých bolo pozitívnych 103 (prevalencia 9,94 %), čo predstavuje podstatne nižšie číslo v porovnaní s našimi výsledkami na juhozápadnom Slovensku. Prevalencie u jednotlivých druhov sa taktiež rôznili, a to u jeleňov 44,23 % (23/52), u srncov 12,55 %, u danielov 0 % (0/17), u diviakov 4,67 %, u kamzíkov 22,22 % (8/36), u líšok 0,98 % (2/205), vlkov *Canis lupus* 0 % (0/7). Celková prevalencia bola nižšia ako pri nami prezentovanom výskume, naproti tomu v Talianskych Alpách bol determinovaný širší okruh *Babesia* spp./*Theileria* spp., a to *B. vulpes*, *B. bigemina*, *B. capreoli*, *B. venatorum* a iné, ktoré sa nepodarilo určiť do druhu. To naznačuje vyššiu prevalenciu druhov potenciálne nebezpečných pre ľudí. Rozdielne čísla v prevalenciách u jednotlivých druhov, ako aj celkovej prevalencie mikroorganizmov môžu súvisieť s rozdielmi v klimatických a geografických pomeroch študovaných organizmov, rôznym spektrom hostiteľov a vektorov a taktiež rozličnou početnosťou študovaných vzoriek. Pri inom výskume v Taliansku (Ebani *et al.* 2017) boli testované vzorky slezín diviakov okrem iného aj na prítomnosť *A. phagocytophilum*, pričom pozitívne bolo len 1 % vyšetrených vzoriek. V porovnaní s našim výskumom, kde bolo na vyšetrenie *A.*

phagocytophilum pozitívnych až 10 z 51 testovaných vzoriek, čo predstavuje prevalenciu 19,6 % možno povedať, že v cirkulácii *A. phagocytophilum* v prírodných ohniskách má na Slovensku diviak pravdepodobne väčšiu úlohu, ako diviaky v Taliansku, kde nie je významným rezervoárom, čo demonštruje spomínaná štúdia.

Vysoké prevalence infekcie uvedenými patogénmi v párnokopytníkoch môžeme sledovať v niektorých iných krajinách Európy. Napríklad vo Švédsku boli v roku 2013 získané a testované na prítomnosť *Babesia* spp. vzorky krvi zo 77 srncov z celkového počtu 89 vzoriek krvi. Výsledky ukázali, že pozitívnych bolo 40 jedincov zo 77, čo predstavuje prevalenciu až 52%. Potvrdila sa prítomnosť *B. capreoli*, ktorá je dominantným druhom *Babesia* spp. vo Švédsku s prevalenciou 44 % (34/77) a *B. venatorum* s prevalenciou 7,8 % (6/77) (Andersson *et al.* 2016). Kaufmann *et al.* (2016) vo svojom výskume, ktorý prebehol v Nemecku uvádzajú prevalenciu *Babesia* spp. 31 %, pričom najvyššia bola zaznamenaná u srncov (62,7%). Prevalencia infekcie *A. phagocytophilum* bola 83,2 % (Kaufmann *et al.* 2016). Iný výskum v Nemecku (Wiegman *et al.* 2015) sa zaoberal testovaním krvných vzoriek sobov (*Rangifer tarandus*) na prítomnosť *Babesia* spp., pričom bola zistená prevalencia patogénov na úrovni 23,6 %.

Výsledky výskumu v Slovinsku (Žele *et al.* 2012) zistili v divožijúcich zvieratách prítomnosť *A. phagocytophilum* s prevalenciou 72,3 %, pričom medzi 376 študovanými vzorkami boli vzorky zo srncov, jeleňov, kamzíkov a diviakov.

Počas výskumu ktorý prebiehal v Tirolsku (Silaghi *et al.* 2011b) bolo otestovaných 78 vzoriek voľne žijúcich párnokopytníkov, pričom pozitívnych na prítomnosť *Babesia* spp. bolo 14 vzoriek, čo predstavuje prevalenciu 17,9 %. Testovaných bolo 19 vzoriek srncov, z ktorých bolo pozitívnych 6, čo predstavuje prevalenciu nákazy u tohto druhu hostiteľa 31,6 %. Všetkých 6 pozitívnych vzoriek bolo identifikovaných ako *B. capreoli*. Jeleňov bolo testovaných 12, pričom pozitívne boli 3 vzorky, čo predstavuje 25 % prevalenciu, pričom sa jednalo o druh *B. odocoilei*-like. Medzi ostatné testované druhy zvierat patrili kamzíky s prevalenciou 17,4 % (4/23), pričom okrem *B. capreoli* bol u jedného jedinca identifikovaný druh *B. venatorum* a kozorožce *Capra ibex*, z ktorých bol pozitívny jeden jedinec z testovaných 18 (5,6 %) na druh *B. divergens*. Na testovanie prítomnosti *A. phagocytophilum* bolo pozitívnych 7 vzoriek z 25 testovaných, čo predstavuje 28 % prevalenciu, pričom miera koinfekcie s *Babesia* spp. bola 85,7 %. V predchádzajúcej štúdii Silaghi *et al.* (2011a) uvádzajú mieru prevalence *A. phagocytophilum* 38,5 %. Čo je ale zaujímavé, obe tieto štúdie naznačujú, že náchylnejšie na nákazu a koinfekcie sú zvieratá staršie ako 3 roky (Silaghi *et al.*

2011a, Silaghi *et al.* 2011b). Novšie výskumy z tejto oblasti (Messner *et al.* 2019) ale ukazujú oveľa nižšie prevalence týchto patogénov u voľne žijúcich párnokopytníkov.

V Poľsku bolo v priebehu rokov 2010 a 2011 (Welc-Falęciak *et al.* 2013) získaných a testovaných na prítomnosť rôznych patogénov 67 tkanivových vzoriek srncov. Pri detekcii *Babesia* spp. sa zistila prevalencia 26,9 % a odhalila prítomnosť *B. capreoli*, *B. venatorum* a *B. divergens*. Prítomnosť patogénu *A. phagocytophilum* bola zaznamenaná s prevalenciou 37,3 % u 25 jedincov. V staršom výskume zaznamenali Skotarczak *et al.* (2008) vo vzorkách slezín divožijúcich párnokopytníkov prítomnosť *Theileria* spp. s prevalenciou 24,6 % u srncov a s prevalenciou 84% u jeleňov. Prítomnosť *Babesia* spp. bola zaznamenaná u srncov s prevalenciou 30,4 % a u jeleňov s prevalenciou 2 %. Prítomnosť *A. phagocytophilum* bola detegovaná u srncov s prevalenciou 53,6 %, u jeleňov s prevalenciou 68 % a u diviakov s prevalenciou 6 %. Koinfekcie *A. phagocytophilum* boli zaznamenané s *Babesia* spp. len u srncov s prevalenciou 16,6 %. Koinfekcie *A. phagocytophilum* a *Theileria* spp. boli zaznamenané u srncov (12,3 %) a u jeleňov (28 %). Porovnanie týchto dvoch štúdií naznačuje rozličný výskyt patogénov v závislosti od rokov a klimatických podmienok.

V Maďarsku Hornok *et al.* (2017) testovali na prítomnosť Piroplasmida krvné vzorky a vzorky slezín z jeleňov, srncov, danielov, muflónov, diviakov, ale aj byvolov *Bubalus bubalis* (Linnaeus, 1758) pochádzajúcich z Prírodnej rezervácie Mórahalom. Všetky zo 60 získaných krvných vzoriek byvolov boli negatívne. Najvyššia prevalencia 43,1 % bola zaznamenaná v krvných vzorkách srncov. U jeleňov bola zaznamenaná prevalencia 41,7 % v slezinách aj v krvných vzorkách. Autori štúdie potvrdili prítomnosť dvoch genotypov *T. capreoli*, genotyp “capreoli-CE1” v srncoch a genotyp “elaphi-CE1” v jeleňoch a danieloch. Odlišné genotypy parazita v srncoch na jednej strane a v jeleňoch a danieloch na druhej strane boli identifikované v novšej štúdii u zvierat z Malých Karpatoch (Kazimírová *et al.* 2018), ako aj v našej práci.

Vzorky slezín zo 109 voľne žijúcich zvierat z územia Banskej Štiavnice, Žarnovice a Žiari nad Hronom na Slovensku testovali na prítomnosť *A. phagocytophilum* Štefanidesová *et al.* (2007). Vzorky pochádzali z 30 srncov, 49 jeleňov, 28 diviakov a dvoch muflónov. U žiadnej vzorky sleziny diviaka sa pozitivita nepotvrdila. Prevalencia u srncov bola zaznamenaná 50 % a u jeleňov 53,1 %. Infekcia *A. phagocytophilum* bola zaznamenaná u jedného muflóna.

Na území západného Slovenska Štefanidesová *et al.* (2011) vyšetrili na prítomnosť *A. phagocytophilum* vzorky slezín 42 divožijúcich zvierat, 35 srncov, 4 jeleňov a 3 diviakov.

Pozitivita sa potvrdila u 22 srncov s prevalenciou 62,86 % a u dvoch jeleňov a dvoch diviakov.

Na prítomnosť *A. phagocytophilum* testovali Vichová *et al.* (2013) okrem iného aj voľne žijúce mäsožravce a párnokopytníky z územia východného Slovenska. U žiadnej z 248 testovaných vzoriek slezín líšok nebola potvrdená pozitivita na *A. phagocytophilum*. Prevalencia infekcie *A. phagocytophilum* u diviakov bola 16,7 % a u jeleňov 17,5 %. Dve vzorky slezín danielov z troch testovaných boli pozitívne. Osem vzoriek slezín srncov a dve vzorky kamzíkov boli pozitívne, čo predstavuje prevalenciu 61,5 % u srncov a 3,5 % u kamzíkov.

Nedávno publikované boli výsledky výskumu zameraného na výskyt kliešťami prenášaných patogénov v lovnej zveri a kliešťoch, ktorý prebiehal v rokoch 2011-2014 v Malých Karpatoch (Kazimírová *et al.* 2018). Počas tejto doby bolo vyšetrených 92 tkanivových vzoriek voľne žijúcich párnokopytníkov: srnec *C. capreolus* (n = 14), jeleň *C. elaphus* (n = 8), daniel *D. dama* (n = 22), muflón *O. musimon* (n = 9) a diviak *S. scrofa* (n = 39). Druh *Theileria* sp. bol zistený v tkanivových vzorkách jeleňov s prevalenciou 100 % (8/8), srncov s prevalenciou 92,9 % (13/14) a vo vzorkách z danielov s prevalenciou 90,9 % (20/22). Infekcia *A. phagocytophilum* bola zistená u jeleňov zo 100 % prevalenciou, u srncov s 92,9 % prevalenciou (13/14), u danielov s 95,4 % prevalenciou (21/22), u muflónov s prevalenciou 88,9 % (8/9) a u diviakov s prevalenciou 28,2 % (11/39). Tieto výsledky sú do značnej miery dobre porovnateľné s tými nami získanými. Môžeme konštatovať vysokú prevalenciu nami študovaných patogénov u lovnej zveri na juhozápadnom Slovensku. Podľa Alberdi *et al.* (2000) patria srnce medzi významných hostiteľov anaplaziem, čo môžeme demonštrovať aj pri srncoch a ďalších druhov jeleňovitých na juhozápadnom Slovensku.

Vzorky slezín a krvi z celkovo 300 líšok testovali na území severného a východného Slovenska Koneval *et al.* (2017), pričom na *Babesia* spp. bolo pozitívnych 29 vzoriek (9,7 %). Z 29 pozitívnych vzoriek bola detegovaná *B. vulpes* v 12 vzorkách, čo predstavuje prevalenciu *B. vulpes* 41,4 % (12/29).

Patogén *A. phagocytophilum* je široko rozšírený aj u iných druhov divožijúcich zvierat ako sú párnokopytníky. Szerekes *et al.* (2008) vo svojej štúdii uvádzajú napríklad až 74 % prevaleciu nákazy *A. phagocytophilum* v tkanivových vzorkách z ježov *Erinaceus concolor* Martin, 1838.

6.2 Kliešte

Na prítomnosť *Babesia* spp./ *Theileria* spp. sme v našej štúdii otestovali celkovo 221 kliešťov, pričom 58 bolo pozitívnych, čo predstavuje prevalenciu prítomnosti týchto patogénov 26,2 %. U druhu *I. ricinus* bolo pozitívnych 37 (28,2 %), pričom sme detegovali v prevažnej miere *T. capreoli*. Z vyšetrených kliešťov druhu *H. concinna* boli 2 pozitívne z 32, čo predstavuje 6,25 %. Pri testovaní kliešťov druhu *D. reticulatus* bolo 19 z 58 testovaných kliešťov pozitívnych, čo predstavuje mieru premorenia piroplazmami až 32,75 %. Len u jedného jedinca *I. ricinus* sa nám podarilo odhaliť prítomnosť druhu *B. venatorum*, ktorý predstavuje potenciálne riziko pre ľudí.

Na prítomnosť *A. phagocytophilum* sme otestovali 180 kliešťov *I. ricinus*, z ktorých 131 bolo pozitívnych, čo predstavuje prevalenciu 72,77 %, pričom koinfekcia s *Theileria* spp. sa vyskytovala vo všetkých kliešťoch pozitívne testovaných na *A. phagocytophilum*. Môžeme teda usúdiť, že pri druhu *I. ricinus* je prevalencia koinfekcie až 100 %.

V Taliansku bol patogén *A. phagocytophilum* zistený v kliešťoch z lovnéj zveri prevalenciou 29,87 %, pričom vyšetrené boli kliešte *I. ricinus*, *H. punctata* a *D. marginatus* (Ebani *et al.* 2015).

Ben & Lozynskyi (2019) sledovali v rokoch 2009-2014 prevalenciu *A. phagocytophilum* v kliešťoch *I. ricinus* a *D. reticulatus* z vegetácie na rôznych lokalitách v Ukrajine. Celkovo 5130 kliešťov v 366 pooloch bolo vyšetrených na prítomnosť *A. phagocytophilum*, pričom prevalencia patogénu bola 21,9 %. Bolo pozorované, že výskyt patogénu bol zaznamenávaný častejšie pri kliešťoch druhu *I. ricinus* ako u druhu *D. reticulatus*. Taktiež bol pozorovaný rozdiel v prevalencii infekcie medzi rôznymi habitatmi, pričom najviac boli infikované kliešte v lesných zónach, čo predstavuje aj prirodzený habitat pre rezervoárové divožijúce párnokopytníky. Taktiež bola zaznamenaná bimodálna krivka výskytu *A. phagocytophilum* v kliešťoch s dvomi vrcholmi: jarným a jesenným, pričom jesenný dosahoval vyššie hodnoty (Ben & Lozynskyi 2019).

V Poľsku prebehol výskum, ktorý bol zameraný na sledovanie diverzity *Babesia* spp. v kliešťoch druhu *I. ricinus* (Welc- Fałęciak *et al.* 2012), pričom vzorky pochádzali z vegetácie z troch období a to 2005-2006, 2007 a 2010-2011 a z dvoch študovaných území Urwitał a Bielański Forest. Prevalencie *Babesia* spp. sa medzi dvomi územiami líšili, na území Urwitał sa zaznamenala prevalencia 2 %, na území Bielański Forest len 0,8 %. Boli identifikované *B. microti* a *B. venatorum*.

Prvý výskyt *B. venatorum* a *B. capreoli* v druhu *I. ricinus* na území Českej republiky dokumentovali Venclikova *et al.* (2015). Kliešte, v ktorých boli tieto patogény identifikované boli zozbierané v roku 2010.

Celkovo 1075 kliešťov druhu *I. ricinus* zozbieraných z vegetácie z územia východného Slovenska testovali na prítomnosť *A. phagocytophilum* Vichová *et al.* (2013), pričom prevalencie v jednotlivých lokalitách varírovali od 1,4 % do 5,5 %.

Výskyt *Babesia* spp. v kliešťoch druhu *I. ricinus* a *H. concinna* z vegetácie študovali na juhozápadnom Slovensku Hamšíková *et al.* (2016). Vyšetřili celkovo 5057 kliešťov *I. ricinus*, pričom prevalencia *Babesia* spp. bola 1,5 % a 91 kliešťov druhu *H. concinna* s prevalenciou *Babesia* spp. 6,6 %. Boli identifikované druhy *B. microti*, *B. venatorum*, *B. odocoilei*, *B. canis*, *B. capreoli*. Koinfekcie s *A. phagocytophilum* boli zistené u kliešťov *I. ricinus* len v dvoch prípadoch, a to u jedného samčeka pozitívneho na *B. venatorum* a u jednej nymfy pozitívnej na *B. canis* z Bratislavy.

V rámci výskumu diverzity mikroorganizmov prenášaných kliešťami vo voľne žijúcich párnokopytníkoch (Kazimírová *et al.* 2018) a v kliešťoch ktoré ich parazitujú, bolo získaných 2660 kliešťov druhu *I. ricinus*, 284 jedincov *H. concinna* a 2 jedince patriace *D. reticulatus*. Výber kliešťov bol analyzovaný na prítomnosť mikroorganizmov. Celkovo 82,8% testovaných kliešťov bolo infikovaných aspoň jedným mikroorganizmom. V kliešťoch druhu *I. ricinus* boli identifikované okrem *A. phagocytophilum*, *Theileria* spp., *B. venatorum* aj *Rickettsia* spp., *C. burnetii*, *B. burgdorferi*. Zaznamenali sa aj kliešte druhu *H. concinna*, ktoré boli infikované *A. phagocytophilum*, *Theileria* spp., *Babesia* spp.. Koinfekcie boli zaznamenané v 38,4 % kliešťov druhu *I. ricinus*, pričom sa jednalo o koinfekcie dvoch až 4 mikroorganizmov. Najčastejšia koinfekcia bola s *A. phagocytophilum*, pričom koinfekcia *A. phagocytophilum* a *Theileria* spp. bola zaznamenaná u lariev v pooloch s prevalenciou 16,2 %, u ným s prevalenciou 15,2 % a u dospelých jedincov s prevalenciou 38,7 %. Na základe výsledkov tohto výskumu môžeme predpokladať vysoké prevalencie koinfekcií s viac než 2 patogénmi. Je zaujímavé, že napriek tomu že sa v kliešťoch z vegetácie a parazitujúcich lovnú zver na území juhozápadného Slovenska potvrdila prítomnosť viacerých druhov piroplazmiem ktoré sú viazané na jeleňovité (*B. venatorum*, *B. capreoli*, *B. odocoilei*), v samotných zvieratách sa infekcia danými druhmi babézií nepotvrdila. Predpokladáme, že prevalencia infekcie jeleňovitých babézií v skúmanej oblasti je buď veľmi nízka, alebo infikované kliešte sa do tejto oblasti dostali prostredníctvom vtákov či iných zvierat s veľkým areálom pohybu. Naopak, napriek veľmi vysokému zamoreniu jeleňovitých a kliešťov cicajúcich na infikovaných zvieratách parazitom *T. capreoli* (Kazimírová *et*

al. 2018, naša práca), v kliešťoch z vegetácie sa infekcia týmto parazitom potvrdila iba v *H. concinna*, nie v *I. ricinus* (Hamšíková *et al.* 2016). Z uvedeného vyplýva, že *I. ricinus* pravdepodobne nie je vektorom *T. capreoli* a parazitom sa infikuje len prostredníctvom krvi infikovaných zvierat. V kliešťoch *I. ricinus* z vegetácie a v jeleňovitých bola v predchádzajúcich výskumoch potvrdená prítomnosť viacerých kmeňov *A. phagocytophilum*, z ktorých v srncoch a v kliešťoch z lokalít s výskytom srncov prevažoval kmeň ktorý nie je patogénny ani pre človeka, ani pre domáce zvieratá, kým na lokalitách s absenciou srncov, a v iných druhoch jeleňovitých, muflónoch a v diviakoch sa potvrdila prítomnosť kmeňov baktérie potenciálne patogénnych pre domáce zvieratá aj človeka (Kazimírová *et al.* 2018, Hamšíková *et al.* 2019). V budúcnosti bude potrebné podrobnejšie analyzovať kmene *A. phagocytophilum* v divožijúcich zvieratách a objasniť úlohu týchto zvierat v cirkulácii rôznych kmeňov baktérie na Slovensku. Takisto bude potrebné zistiť príčinu vysokej prevalencie *T. capreoli* u jeleňovitých v sledovanej oblasti a jej vplyv na zdravotný stav populácií týchto zvierat. A v neposlednom rade bude potrebné sledovať infekcie voľne žijúcich zvierat aj ďalšími druhmi mikroorganizmov ktoré kliešte prenášajú.

ZÁVER

Na základe molekulárno biologických metód sa nám podarilo získať nové poznatky druhovom spektre kliešťov parazitujúcich lovnú zver ako aj výskyte mikroorganizmov v kliešťoch a u lovnéj zveri na juhozápadnom Slovensku. Výskumu lovnéj zveri sa na území Slovenska venovala doteraz len malá pozornosť, preto je daná téma v tejto dobe, kedy sa vplyvom klimatických zmien kliešte rozširujú do nových oblastí, vysoko aktuálna.

V časovom rozmedzí od októbra 2018 do decembra 2019 sa nám podarilo získať v spolupráci s poľovníkmi z juhozápadného Slovenska tkanivové vzorky (sleziny) z celkovo 127 jedincov voľne žijúcich zvierat, ktoré sme testovali na prítomnosť piroplazmiem a *A. phagocytophilum*, pričom sa nám podarilo detegovať vysoké prevalencie *Theileria capreoli* u jeleňovitých a *Babesia vulpes* u jednej líšky. Pri detekcii *A. phagocytophilum* boli zistené vysoké prevalencie u jeleňovitých. Zistili sme, že lovná zver je významným rezervoárom kliešťami prenášaných mikroorganizmov, pričom najväčšiu úlohu zohrávajú práve jeleňovité. Diviaky zohrávajú v tomto prípade menšiu úlohu ako rezervoár, no treba pripomenúť, že výskyt *A. phagocytophilum* bol u nich tiež zaznamenaný, i keď v nižšej miere ako u jeleňovitých. Koinfekcie boli celkovo zaznamenané v miere 23,4 % v slezinách u voľne žijúcich zvierat.

Z ulovených zvierat sa nám podarilo zozbierať celkovo 1424 kliešťov, ktoré patrili do troch druhov, a to *Ixodes ricinus*, *Haemaphysalis concinna* a *Dermacentor reticulatus*. Najpočetnejší bol druh *H. concinna*, čo ale bolo ovplyvnené vysokou mierou parazitovania týmto druhom kliešťa na jednom zvierati, preto môžeme konštatovať, že najrozšírenejším druhom bol *I. ricinus*, ktorý patrí k epidemiologicky najdôležitejšiemu druhu v Európe a na Slovensku. Celkovo u kliešťov cicajúcich na lovnéj zveri zaznamenali 26,2 % mieru premorenia piroplazmami, pričom sme identifikovali v prevažnej miere *T. capreoli* a u jednej vzorky nymfy kliešťa *I. ricinus* z daniela pochádzajúceho z Malých Karpát bola pozitívita na druh *Babesia venatorum*, ktorý predstavuje potenciálne nebezpečenstvo pre ľudí. Miera premorenia *A. phagocytophilum* bola 72,77 %. Koinfekcie boli zaznamenané vo všetkých vzorkách pozitívnych na *A. phagocytophilum*, čo predstavuje až 100 % prevaleciu.

Na záver môžeme konštatovať, že ciele diplomovej práce boli naplnené. Predložená diplomová práca poskytuje prehľad výskytu *Babesia* spp. / *Theileria* spp. a *A. phagocytophilum* u lovnéj zveri a v kliešťoch na juhozápadnom Slovensku. V jednom prípade bol u kliešťa *I. ricinus* zaznamenaný aj v nedávnej minulosti popísaný druh *B. venatorum*, ktorý predstavuje veľké riziko pre imunosuprimovaných ľudí, prípadne ľudí po splenektómii.

Nedá sa teda spochybníť medicínska a veterinárna významnosť kliešťov. Lovná zver predstavuje významný rezervoár pre kliešťami prenášané mikroorganizmy, preto by sa mala táto téma stať predmetom ďalších výskumov a záujmov vedeckej komunity na Slovensku. V neposlednom rade je potrebné šíriť osvetu ohľadom ochrany proti kliešťom aj medzi širokou laickou verejnosťou.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Alarcon-Chaidez F.J. 2014. Salivary glands, pp. 163-205. In: Sonenshine D.E., Roe R.M. (eds), *Biology of Ticks*. Vol.1. Oxford University Press, Oxford-New York, 540 pp. ISBN: 978-0199744053.
- Alberdi M.P., Walker A. R., Urquhart A. 2000. Field evidence that roe deer (*Capreolus capreolus*) are a natural host for *Ehrlichia phagocytophila*. *Epidemiol. and Infect.* 124 (2): 315-323.
- Anderson J.F., Magnarelli L.A.. 2008. Biology of ticks. *Infect.s Dis. Clin. North Amer.* 22: 195-215.
- Andersson M. O., Bergvall U. A., Chirico J., Christensson M., Lindgren P., Nordström J., Kjellander P. 2016. Molecular detection of *Babesia capreoli* and *Babesia venatorum* in wild Swedish roe deer, *Capreolus capreolus*. *Parasit. Vectors* 9:221. doi: 10.1186/s13071-016-1503-8.
- Andersson M. O., Tolf C., Tamba P., Stefanache M., Radbea G., Rubel F., Waldenström J., Dobler G., Chițimia-Dobler L. 2017. *Babesia*, *Theileria*, and *Hepatozoon* species in ticks infesting animal hosts in Romania. *Parasitol. Res.* 116(8): 2291-2297. doi: 10.1007/s00436-017-5537-4.
- Baneth G., Florin-Christensen M., Cardoso L., Schnittger L. 2015. Reclassification of *Theileria annae* as *Babesia vulpes* sp. nov. *Parasit. Vectors.* 8: 207. doi: 10.1186/s13071-015-0830-5.
- Barker S.C., Murrel A. 2008. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names, pp. 1-39. In: Bowman A.S., Nuttal P.A. (eds.). *Ticks: Biology, Disease and Control*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ben I., Lozynskyi I. 2019. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* and coinfection with *Borrelia burgdorferi* and tick-borne encephalitis virus in Western Ukraine. *Vector-Borne Zoonot. Dis.* doi: 10.1089/vbz.2019.2450.

- 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 Tick-Borne Dis. 7 (2): 319-326. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.11.008.
- Bullová E., Lukáš M., Stanko M. & Peřko 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.
- Burbaitė L, Csányi S. 2009. Roe deer population and harvest changes in Europe. Estonian J Ecol. 58:169–80.
- Burbaitė L, Csányi S. 2010. Red deer population and harvest changes in Europe. Acta Zool Lit. 20: 179–88.
- Casati S, Sager H., Gern L., Piffaretti J.C. 2006. Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. Ann. Agric. Environ. Med. 13: 65-70
- 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*. J. Clin. Microbiol. 42: 3164–3168.
- Černý V. 1958. Theileriafunde beim europäischen Hirsch im Gebiet von Topolčianky (Slovakie). Biologia 13: 509–511.
- Daniel M., Danielová V., Kříž B., Jirsa A., Nožička, J. 2003. Shift of the tick *Ixodes ricinus* and tick-borne encephalitis to higher altitudes in central Europe. Eur. J. of Clin. Microbiol. 22: 327-328.
- Dantas-Torres F., Chomel B.B., Otranto D. 2012 Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. Trends Parasitol. 28: 437-46.
- Dantas-Torres F., Otranto D. 2017. Anaplasmosis. Pp. 215-221. In: Marcondes C.B. (ed.). Arthropod Borne Diseases,. © Springer International Publishing Switzerland. doi 10.1007/978-3-319-13884-8_15

- Donoso-Mantke O., Karan L. S., Růžek D. 2011. Tick-borne encephalitis virus: A General overview, pp.133-156. In: Růžek D. (ed.) *Flavivirus encephalitis*, In-TechOpen, Croatia.
- Ebani V. V., Bertelloni F., Cecconi G., Sgorbini M., Cerri D. 2017. Zoonotic tick-borne bacteria among wild boars (*Sus scrofa*) in Central Italy. *As. Pac. J. Trop. Dis.* 7 (3): 141-143. doi: 10.12980/apjtd.7.2017D6-412.
- Ebani V. V., Bertelloni F., Turchi B., Filogari D., Cerri D. 2015. Molecular survey of tick-borne pathogens in Ixodid ticks collected from hunted wild animals in Tuscany, Italy. *As. Pac. J. Trop. Med.* 8 (9): 714-717. doi: 10.1016/j.apjtm.2015.07.033
- Estrada-Peña A., Mihalca A. D., Petney T. (eds). 2017. *Ticks of Europe and North Africa*. Springer. ISBN 978-3-319-63760-0. doi: 10.1007/978-3-319-63760-0.
- Farkas R., Estrada-Peña A., Jaenson T.G.T., Pascucci I., Madder M. 2013. Basic Biology and Geographical Distribution of Tick Species Involved in the Transmission of Animal Pathogens, Including Zoonoses, pp. 6-22. In: Salman M. & Tarrés-Call J. (eds). *Tick and Tick-Borne Diseases: Geographical Distribution and Control Strategies in The Euro-Asia Region*. CAB International. ISBN: 978-1-84593-853-6.
- Fuehrer H.-P., Biro N., Harl J., Worliczek H.L., Beiglböck Ch., Farkas R., Joachim A., Duscher G.G. 2013. Molecular detection of *Theileria* sp. ZS TO4 in red deer (*Cervus elaphus*) and questing *Haemaphysalis concinna* tick in Eastern Austria. *Vet. Parasitol.* 197: 653-657. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.07.005.
- Gallupi R., Aureli S., Bonoli C., Caffara M. Tampieri M. P. 2010. Detection and molecular characterization of *Theileria* sp. in fallow deer (*Dama dama*) and ticks from an Italian natural preserve. *Res. Vet. Sci.* 91: 110-115.
- Grešíková M. 1999. *Kliešťová encefalitída – trvalý verejno-zdravotnícky problém*, VEDA Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, Bratislava, 102 pp. ISBN: 80-224-0627-9
- Hamšíková Z., Kazimírová M., Haruštiaková D., Mahríková L., Slovák M., Berthová L., Kocianová E., Schnittger L. 2016. *Babesia* spp. in tick and wildlife in different habitat types of Slovakia. *Parasit. Vectors.* 9:292. doi: 10.1186/s13071-016-1560-z.

- Hamšíková Z., Silaghi C., Takumi K., Rudolf I., Gunár K., Sprong H., Kazimírová M. 2019. Presence of Roe Deer Affects the Occurrence of *Anaplasma phagocytophilum* Ecotypes in Questing *Ixodes ricinus* in Different Habitat Types of Central Europe. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 16, 4725. doi: 10.3390/ijerph16234725.
- Hornok S., Sugár L., Horváth G., Kovács T., Micsutka A., Gönczi E., Flaisz B., Takács N., Farkas R., Meli M. L., Hofmann-Lehmann R. Evidence for host specificity of *Theileria capreoli* genotypes in cervids. *Parasit. Vectors* 10: 473. doi: 10.1186/s13071-017-2403-2.
- Hunfeldt K.-P., Hildebrandt A., Gray J.S. 2008. Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *Int. J. Parasitol.* 38: 1219-1237. doi: 10.1016/j.ijpara.2008.03.001.
- Chavko J., Maderič B., Litzbarski B., Litzbarski H., Vršková K., Michalka R., Blaškovič T., Rybanič R. 2009. Program starostlivosti chráneného vtáčieho územia Sysľovské polia 2010 – 2019. Ochrana dravcov na Slovensku-RPS, Slovenská ornitologická spoločnosť/ BirdLife Slovensko, Štátna ochrana prírody Slovenskej republiky Banská Bystrica.
- Jahfari S., Coipan C., Fonville M., van Leeuwen A.D., Hengeveld P, Heylen D, et al. 2014. Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. *Parasit Vectors*. 7:365.
- Kauffmann M., Rehbein S., Hamel D., Lutz W., Heddergott M., Pfister K. & Silaghi C. 2017. *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* spp., in roe deer (*Capreolus capreolus*), fallow deer (*Dama dama*) and mouflon (*Ovis musimon*) in Germany. *Mol. Cell. Probes*. 31: 46-54. doi: 10.1016/j.mcp.2016.08.008.
- Kazimírová M., Hamšíková Z., Špitálská E., Minichová L., Mahríková L., Caban L., Sprong H., Fonville M., Schnittger L., Kocianová E. 2018. Diverse tick-borne microorganisms identified in free-living ungulates in Slovakia. *Parasit.Vectors* 11:495. doi: 10.1186/s13071-018-3068-1.
- Kazimírová, M., Hamšíková, Z., Kocianová, E., Marini, G., Mojšová, M., Mahríková, L., Berthová L., Slovák M., Rosá, R. (2016). Relative density of host-seeking ticks in different habitat types of south-western Slovakia. *Experimental and Applied Acarology*, 69 (2), 205-224.

- Kiara H., Steinaa L., Nene V., Svitek N. 2018. Theileria in ruminants, pp. 187-213. In: Florin-Christensen M., Schnittger L. (eds). Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets. doi: 10.1007/978-3-319-70132-5_8
- Koneval M., Miterpáková M., Hurníková Z., Blaňarová L., Víchová B. 2017. Neglected intravascular pathogens, *Babesia vulpes* and haemotropic *Mycoplasma* spp. in European red fox (*Vulpes vulpes*) population. Vet. Parasitol. 243: 176-182. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.11.008.
- Korbel L. 1956. Poznámky o výskytu ixodových kliešťov v Podunajsku a v Malých Karpatoch. Acta Facul. Rer. Natur. Univ. Comen., Zool. 1: 67-78.
- Lempereur L., Wirtgen M., Nahayo A., Caron Y., Shiels B., Saegerman C., Losson B., Linden A. 2012. Wild cervids are host for tick vectors of *Babesia* species with zoonotic capability in Belgium. Vector-Borne Zoonot. Dis. 12(4): 275-280.
- Mackenstedt U, Jenkins D, Romig T. The role of wildlife in the transmission of parasitic zoonoses in peri-urban and urban areas. Int J Parasitol Parasit Wildl. 2015;4:71–79.
- Macko J., Machava J., Bublinec E., Hrkľová G. 2016. Soil reaction and tick abundance *Ixodes ricinus*. Folia Oecol. 43 (2). ISSN 1336-5266.
- Massei G, Kindberg J, Licoppe A, Gačić D, Šprem N, Kamler J, et al. 2015. Wild boar populations up, numbers of hunters down? A review of trends and implications for Europe. Pest Manag Sci. 71: 492–500.
- Messner M., Kayikci F. N., Shahi-Barog B., Harl J., Messner Ch., Fuehrer H. 2019. Screening of wild ruminants from the Kaunertal and other alpine regions of Tyrol (Austria) for vector-borne pathogens. Parasitol. Res. doi: 10.1007/s00436-019-06412-9.
- Michel A.O., Mathis A., Ryser-Degiorgis M.-P. 2014. *Babesia* spp. in European wild ruminant species: parasite diversity and risk factors for infection. Vet. Res.. 45:65. doi: 10.1186/1297-9716-45-65.
- 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., 1972. The ecology and public health importance of *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks in Central Europe. *Folia Parasitol.* 19: 93–102.
- Nováková M, Vichová B, Majláthová V, Lesňáková A, Pochybová M, Peťko B. 2010. First case of human granulocytic anaplasmosis from Slovakia. *Ann Agric Environ Med.* 17: 173–175.
- Reiterová K, Špilovská S, Blaňarová L, Derdáková M, Čobádiová A, Hisira V. 2016. Wild boar (*Sus scrofa*) - reservoir host of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Anaplasma phagocytophilum* in Slovakia. *Acta Parasitol.* 61: 255-260.
- Rikihisa Y., 2011. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 24 (3): 469–489. doi:10.1128/CMR.00064-10
- Rizzoli A., Silaghi C., Oniegala A., Rudolf I., Hubálek Z, Földvári G., et al. 2014. *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and per-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. *Front. Publ. Health.* 2: 251. doi: 10.3389/fpubh.2014.00251
- Rubel F., Brugger K., Pfeffer M., Chitimia-Dobler L., Didyk Y. M., Leverenz S., Dautel H., Kahl O. 2015. Geographical distribution of *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* in Europe. *Ticks Tick-Borne Dis.* 7: 224-233. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.10.015
- Rubel, F., Brugger, K., Monazahian, M. et al. 2014. The first German map of georeferenced ixodid tick locations. *Parasit.Vectors*, 7: 477. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0477-7>.
- Sawczuk M., Maciejewska A., Skotarczak B. 2008. Identification and molecular characterization of *Theileria* sp. infecting red deer (*Cervus elaphus*) in northwestern Poland. *Eur J Wildl Res* 54: 225-230. doi: 10.1007/s10344-007-0133-z.
- Schnittger L, Rodriguez AE, Florin-Christensen M, Morrison D. 2012. Babesia: A world emerging. *Infect. Genet. Evol.* 12: 1788–1809.
- Silaghi C., Hamel D., Pfister K., Rehbein S. 2011b. Babesia species and co- infection with *Anaplasma phagocytophilum* in free-ranging ungulates from Tyrol (Austria). *Wien. Tierärztl. Mschr. – Vet. Med. Austria*, 98. 268-274.

- Silaghi, C., Hamel, D., Thiel, C., Pfister, K., Passos, L.M., Rehbein, S. 2011a. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in wild caprine and cervid ungulates from the Alps in Tyrol, Austria. *Vector Borne Zoonot. Dis.* 11: 355-362.
- Siuda, K. 1993. Kleszcze polski (Acari: Ixodida). Systematyka i Rozmieszczenie czest II. Polskie Towarzystwo Parazytologiczne, Warszawa, 376 pp. ISBN 83-601349-0-X.
- Skotarczak B., Adamska M., Sawczuk M., Maciejewska A., Wodecka B., Rymaszewska A. 2008. Coexistence of tick-borne pathogens in game animals and ticks in western Poland. *Veterinarni Medicina*, 53 (12): 668-675.
- Skrabalo Z, Deanovic Z. 1957. Piroplasmosis in man: report of a case. *Doc. Med. Geogr. Trop.* 9: 11–16
- Slovák M. 2010. Obrázkový kľúč dospelých kliešťov (Acari: Ixodida) fauny Slovenska. *Entomofauna carpathica*. 22: 8–13.
- Slovák M. 2014. Obrázkový kľúč lariev a nýmfov kliešťov (Acari: Ixodida) fauny Slovenska. *Entomofauna carpathica*. 26: 12–18.
- Smetanová K, Schwarzová K, Kocianová E. 2006. Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp., and *Borrelia burgdorferi* s. l. in ticks, and wild-living animals in western and middle Slovakia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078: 312-315.
- Sonenshine D.E., Roe M. 2014. Overview- ticks, people, and animals. In: Sonenshine D.E., Roe M. (eds), *Biology of Ticks*, Vol. 1, Oxford University Press, Oxford-New York, 540 pp. ISBN: 978-0199744053
- Stuen S, Granquist EG, Silaghi C. 2013. *Anaplasma phagocytophilum* - a widespread multihost pathogen with highly adaptive strategies. *Front Cell Infect Microbiol.* 3:31.
- Svitáľková, Z., Haruštiaková, D., Mahriková, 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. *Parasit.Vectors* 8: 276.
- Szerekes S., van Leeuwen A. D., Tóth E., Majoros G., Sprong H., Földvári G. 2018. Road-killed mammals provide insight into tick-borne bacterial pathogen communities within urban habitats. *Transbound. Emerg. Dis.* doi: 10.1111/tbed.13019.

- Szewczyk, T., Werszko, J., Myczka, A. W., Laskowski, Z., & Karbowski, G. (2019). Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in wild carnivores in north-eastern Poland. *Parasit. Vectors*, 12 (1): 465. doi: 10.1186/s13071-019-3734-y
- Šomšák L., Šimonovič V., Kollár J. 2004. Phytocoenoses of pine forests in the central part of the Záhorská nížina Lowland. *Biologia, Bratislava*. 59 (1): 101-113.
- Štefanidesová K., Špitálska E., Krkoš I., Smetanová E., Kocianová E. 2011. *Anaplasma phagocytophilum* and other tick-borne bacteria in wild animals in western Slovakia. *Biologia* 66 (6): 1087-1090. doi: 10.2478/s11756-011-0131-1.
- Štefanidesová, K., Kocianová, E., Boldiš, V., Košťanová, Z., Kaňka, P., Némethová, D., Špitálská, E. 2008. Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* infection in free-ranging ungulates in central Slovakia. *Europ. J. Wildl. Res.* 54 (3): 519-524.
- Tamura K., Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10 (3): 512-26. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023.
- Venclíková K, Mendel J, Betasová L, Hubálek Z, Rudolf I. 2015. First evidence of *Babesia venatorum* and *Babesia capreoli* in questing *Ixodes ricinus* ticks in the Czech Republic. *Ann. Agric. Environ. Med.* 22 (2): 212–214. doi: 10.5604/12321966.1152067
- Víchová B., Majláthová V., Nováková M., Stanko M., Hviščová I., Pangráčová L., et al. 2014. *Anaplasma* infections in ticks and reservoir host in Slovakia. *Infect. Genet. Evol.* 22: 265-272.
- Volf P., Horák P. (eds) 2007. *Paraziti a jejich biologie*. TRITON, Praha, 318 pp. ISBN 978-80-7387-008-9.
- Welc- Fałęciak R., Werszko J., Cydzik K., Bajer A., Michalik J., Behnke J. M. 2013. Co-infection and Generic Diversity of Tick-Borne Pathogens in Roe Deer from Poland. *Vector-Borne Zoonot. Dis.*, 13: 277-288. doi: 10.1089/vbz.2012.1136
- Wiegmann L., Silaghi C., Obiegala A., Karnath C., Langer S., Ternes K., Kämmerling J., Osman Ch., Pfeffer M. 2015. Occurrence of *Babesia* species in captive reindeer

(*Rangifer tarandus*) in Germany. Vet. Paras. 211: 16-22. doi: 10.1016/j.vet-par.2015.04.026.

Yabsley M.J., Shock B.C. 2013. Natural history of zoonotic Babesia: Role of wildlife reservoirs. Int.l J. Parasitol. Parasit. and Wildl.. 2: 18-31. doi: 10.1016/j.ijppaw.2012.11.003.

Young K. M., Corrin T., Wilhelm B., Uhland C., Greig J., Mascarenhas M., Waddell L. 2019. Zoonotic *Babesia*: A scoping review of the global evidence. PLoS ONE. 14 (12): e0226781. doi: 10.1371/journal.pone.0226781.

Zanet S., Trisciuglio A., Bottero E., Fernández I. G., Gortazar Ch., Carpignano M. G., Ferroglio E. 2014. Piroplasmosis in wildlife: *Babesia* and *Theileria* affecting free-ranging ungulates and carnivores in the Italian Alps. Parasit. Vectors 7:70.

Žele D., Aberšek J., Gruntar I., Ocepek M., Vengušt G. 2012. Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in game animals from Slovenia. Acta Vet. Hung. 60 (4): 441-448. doi: 10.1556/AVet.2012.038.

Internetové zdroje

[1] <https://www.sprievodcaposlovensku.com/podunajska-nizina/> (citované dňa 15.2.2020)

[2] https://sk.wikipedia.org/wiki/Mal%C3%A9_Karpaty (citované dňa 15.2.2020)

[3] https://sk.wikipedia.org/wiki/Mal%C3%A9_Karpaty (citované dňa 15.2.2020)

[4] https://sk.wikipedia.org/wiki/Bez%C3%A9dn%C3%A9_Karpaty (citované dňa 15.2.2020)

[5] <http://chkozahorie.sopsr.sk/> (citované dňa 15.2.2020)

[6] <https://sk.wikipedia.org/wiki/Rovensko> (citované dňa 15.2.2020)

[7] <https://obeccerova.sk/o-cerovej/> (citované dňa 15.2.2020)