
TEZĂ DE DOCTORAT

**Cercetări privind
interacțiunea căpușă
(Ixodidae) – *Borrelia* – gazdă
receptivă; diversitatea genetică
a unor specii din genul
*Borrelia***

(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

Doctorand **Zsuzsa Kalmár**

Conducător de doctorat **Prof. Univ. Dr. Vasile Cozma**

Membru titular al Academiei de Științe Agricole și Silvice București



REZUMAT

În ultimul deceniu bolile vectoriale transmise de căpușe au devenit din ce în ce mai importante. Încălzirea globală, urbanizarea habitatului natural al căpușelor, creșterea populațiilor unor specii de gazde vertebrate în zonele de habitat ale artropodelor afectează biologia vectorilor și transmiterea agenților patogeni, astfel că, incidența anuală a bolilor vectoriale este în creștere (GRAY, 2009). Incidența bolilor vectoriale se extinde în acele zone geografice unde vectorii agenților patogeni sunt distribuiți, fiind mai frecventă în perioada de activitate a căpușelor vectori.

Spirochetele din genul *Borrelia* sunt printre cei mai larg răspândiți agenți patogeni bacterieni transmiși de căpușe. Speciile genului *Borrelia* prezintă patogenitate diferită în gazdele vertebrate și sunt menținute în cadrul unui sistem ciclic ce implică prezența anumitor specii de căpușe vectori (PARTE, 2014). Speciile de *Borrelia*, din punct de vedere filogenetic, sunt împărțite în trei grupe de spirochete: agenții cauzatori ai boreliozei Lyme (grupa BL), agenții cauzatori ai febrei recurente (grupa FR), respectiv specii de *Borrelia* care sunt asociate cu reptile (grupa REP) și a căror patogenitate la om nu este cunoscută în momentul de față.

Borelioza Lyme este considerată cea mai răspândită boală vectorială transmisă de căpușe atât în Europa cât și în America de Nord și Asia, fiind cauzată de spirochete din complexul *Borrelia burgdorferi* sensu lato (MASUZAWA, 2004). Datorită afecțiunii multisistemice la om, această boală este numită și ‘boala cu 1000 de fețe’, afectând pielea, articulațiile, sistemul nervos și cordul (CIUTĂ, 2012). Omul este considerat gazdă terminală, deoarece nu poate transmite mai departe agenții etiologici, închizând ciclul infecției. În momentul de față se cunosc 20 agenți etiologici ai BL care au o distribuție geografică diferită. Agentul etiologic al acestei zoonoze vectoriale circulă atât în căpușele vectori, cât și în gazdele vertebrate sălbatice și domestice, afectând atât unele specii de animale cât, și omul.

În Europa cea mai frecventă și des raportată specie, cauzatoare a febrei recurente, este *B. miyamotoi*, fiind semnalată atât la diferite specii de căpușe, cât și la rozătoare, micromamifere, păsări, respectiv la om (WAGEMAKERS, 2015). Din punct de vedere filogenetic, această specie face parte din grupa FR, dar este o specie care produce simptome similare atât cu speciile din grupa BL, cât și din grupa FR. Studiile efectuate arată faptul că această specie se poate regăsi atât la stadiile larvare ale căpușelor, cât și

la nimfe și adulți, demonstrând transmiterea transovariană a speciei (SCOLES, 2001).

Grupa REP cuprinde specii care s-au izolat de la reptile sau de la căpușele care parazitează aceste vertebrate, incluzând specia *Borrelia turcica*. Ecologia și patogenitatea bacteriei *B. turcica* este incomplet elucidată. Datele filogenetice arată faptul că această bacterie formează un cluster cu speciile din grupa BL și FR.

Gazdele rezervor în cele mai multe cazuri sunt specii comune de animale din fauna spontană, care mențin și transmit patogenii către un vector, sau un lanț succesiv de vectori care la rândul său transmite boala la gazda finală (ANDERSON, 1991). Gazdele rezervor sunt specii care satisfac câteva condiții specifice, cum ar fi de exemplu capacitatea de a menține viu patogenul pe perioade de timp îndelungate, capacitatea de a transmite patogenul la un vector și capacitatea de a fi gazdă comună a acestui vector (GERN, 1998).

Rolul micromamiferelor este considerat ca fiind de o deosebită importanță epidemiologică, de asemenea sunt considerate markeri pentru evaluarea distribuției unor specii de căpușe, iar prin densitatea ridicată în majoritatea habitatelor forestiere, ele devin un grup important de gazde rezervor (HANINCOVÁ, 2003).

Datorită mediatizării din ultimii ani privind riscul de infectare cu *Borrelia* spp. transmise prin mușcăături de căpușe, datele epidemiologice în România cresc anual. Până în prezent, în România datele epidemiologice la om sunt limitate (BRICIU, 2011; 2014), dar există studii serologice la câini, cai (KISS, 2011; MIRCEAN, 2012), și studii moleculare la arici (DUMITRACHE, 2012), mustelide (GHERMAN, 2012) și la căpușele colectate de pe vegetație (COIPAN, 2010; 2011; KALMÁR, 2013).

În acest context, lucrarea de față a avut ca și obiective generale următoarele:

- Stabilirea prevalenței și diversității unor specii din genul *Borrelia* la căpușele *Ixodes ricinus* nehrănite din România și analiza distribuției spațiale a speciilor implicate în infecție;

- Furnizarea datelor epidemiologice privind prezența bacteriilor *Borrelia* în țesuturile unor specii de animale și în corpul căpușelor parazite pe aceste animale;

- Evaluarea posibilității de transmitere și stabilirea prevalenței moleculare a bacteriei *Borrelia turcica* la căpușele *Hyalomma aegyptium* parazite pe specia de țestoase *Testudo graeca* din România;

•Caracterizarea structurii moleculare și determinarea conformației structurii ADN-ului prin spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR) a spirochetei *Borrelia turcica*.

Lucrarea cuprinde 163 pagini și este structurată pe două părți: prima parte, stadiul actual al cunoașterii, cuprinde 5 capitole, iar partea a doua, contribuția personală, 10 capitole.

Prima parte este structurată pe cinci capitole și prezintă în mod sintetic informații din literatura de specialitate referitoare la rolul vectorial al căpușelor Ixodidae, principalele boli vectoriale cauzate de acestea, borelioza Lyme și febra recurentă, biologia agentului patogen *Borrelia* spp. și gazdele rezervor competente, precum și câteva date privind principalele metode de detectare și identificare a agentului patogen *Borrelia* spp.

Capitolul 1 prezintă date referitoare la ciclul biologic al căpușelor Ixodidae și rolul/competența vectorială al acestora. Capitolul 2 detaliază manifestările clinice a celor două boli vectoriale cauzate de agenții etiologici, borelioza Lyme, respectiv febra recurentă, boli transmise de căpușe. Capitolul 3 descrie caracteristicile generale ale agentului patogen *Borrelia* spp., detaliând morfologia și structura acestei bacterii. Capitolul 4 prezintă gazdele rezervor pentru *Borrelia* spp., totodată abordează interacțiunile între căpușă – *Borrelia* – gazdă vertebrată. Ultimul capitol, capitolul 5, al primei părți este dedicat metodelor de detectare și identificare a agențului patogen *Borrelia* spp. Se prezintă principalele metode moleculare și spectroscopice de detectare și de identificare a borreliilor atât în organismul căpușelor, cât și în țesutul gazdelor vertebrate.

Partea a doua a tezei este structurată pe 10 capitole, incluzând ipoteza de lucru/obiective (capitolul 6) și metodologia generală (capitolul 7), urmat de cercetările proprii (capitolele 8 - 13), concluziile generale și recomandările (capitolul 14), respectiv originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei (capitolul 15). Lucrarea se încheie cu lista bibliografică (397 de titluri).

Capitolul 8 a avut ca obiectiv identificarea diferitelor genospecii din complexul *B. burgdorferi* s.l., de asemenea, analiza spațială a speciilor implicate în infecția căpușelor *I. ricinus* nehrănite din România.

În România, informațiile referitoare la infecția cu *Borrelia* spp. la căpușele nehrănite și la om, sunt încă limitate. Primul studiu, la nivel național privind infecția căpușelor *I. ricinus* nehrănite, s-a efectuat de echipa noastră în cadrul unui proiect de cercetare IDEI-PCCE CNCIS 84, 7/2010 (DUMITRACHE, 2012; KALMÁR, 2013). În vederea identificării genospeciilor de *B. burgdorferi* s.l. implicate în infecție, s-au aplicat două

metode de identificare, printre care: RFLP și secvențializarea ADN-ului. Astfel, din 172 de căpușe *I. ricinus* infectate cu *B. burgdorferi* s.l., 141 (82%, 95% CI: 75.4 - 87.4) de căpușe au avut infecții monospecifice. Cea mai frecventă specie detectată a fost *B. afzelii* (126/12.221; 1.03% sau 73.25% din căpușe infectate), urmată de *B. garinii* (65/12.221; 0.53% sau 37.79% din căpușe infectate), și *B. burgdorferi* s.s. (12/12.221; 0.10% sau 6.98% din căpușe infectate). Co-infecții s-au detectat la 31 de căpușe (18%) în 14 localități, aceste fiind următoarele: *B. afzelii* + *B. garinii*, *B. garinii* + *B. burgdorferi* s.s. și o căpușă co-infectată cu *B. afzelii* + *B. burgdorferi* s.s. Din cele 65 *I. ricinus* infectate cu *B. afzelii*, la 30 de infecții (46.2%, 95% CI: 33.7 - 59.0) s-au depistat co-infecții. Cea mai larg răspândită genospecie din România este *B. afzelii*, această specie fiind detectată în 46 localități, urmată de *B. garinii* în 23 localități și *B. burgdorferi* s.s. în 12 localități.

Valorile prevalenței infecției cu diferite specii de *Borrelia* identificate în alte țări europene sunt comparabile cu datele noastre obținute în acest studiu. Genospeciile dominante în România sunt *B. afzelii* și *B. garinii*, *B. afzelii* este o genospecie simpatrică cu *B. garinii*, care este frecventă în regiunile de deal, și cu *B. burgdorferi* s.s. a cărei distribuție este limitată. Totuși, studiile efectuate în Europa relevă faptul că *B. afzelii* este specia cea mai răspândită atât în alte țări din sud-estul Europei, cât și în România (COPIAN, 2011). În studiul de față, s-a evaluat, pentru prima dată, diversitatea genetică a diferitelor genospecii de *B. burgdorferi* s.l. la căpușele *I. ricinus*, colectate de pe vegetație, pe plan național, respectiv s-a analizat distribuția spațială a acestora.

Capitolul 9 a avut ca obiectiv determinarea prevalenței infecției cu *B. miyamotoi* la căpușele *I. ricinus* nehrănite din Transilvania și distribuția spațială a acestei specii. *Borrelia miyamotoi* este o spirochetă care din punct de vedere filogenetic face parte din grupa FR, dar din punctul de vedere al simptomelor și manifestărilor clinice pe care aceasta le poate provoca, este o specie care produce simptome similare cu BL și FR (KRAUSE, 2015). *Borrelia miyamotoi* este răspândită în Europa, America, Rusia și Japonia (FONVILLE, 2014). Deși existența acestei specii se cunoaște din anul 1999, totuși, aceasta a primit puțină atenție până la primele raportări de cazuri umane. Cu toate acestea, nu există informații referitoare la infecția cu *B. miyamotoi* la căpușele *I. ricinus* nehrănite din România.

Pentru a obține o indicație privind prezența agentului patogen *B. miyamotoi* în căpușele nehrănite *I. ricinus*, s-au selectat aleatoriu căpușe din 14 județe din regiunea Transilvania. Astfel, s-au analizat 468 de căpușe nehrănite *I. ricinus* pentru infecția cu *B. miyamotoi*. Detectarea agentului

patogen s-a efectuat prin PCR cantitativ, țintind gena *flab* (FONVILLE, 2014). Din 468 de căpușe nehrănite *I. ricinus* (26.92% masculi, 63.25% femele, 9.83% nimfe) incluse în acest studiu, 7 căpușe au fost infectate cu *B. miyamotoi*, astfel prevalența totală a infecției a fost 1.5%. Infecții s-au detectat în 5 localități, iar prevalența locală în localitățile unde s-au înregistrat căpușe infectate, a variat între 1.61% - 8.33%.

Valorile prevalenței infecției cu *B. miyamotoi* identificate în alte țări europene sunt similare cu rezultatele obținute în studiul de față. Cunoașterea distribuției geografice a speciei *B. miyamotoi* este limitată, dar se presupune că această specie are o distribuție similară cu cele cauzatoare ale BL (KRAUSE, 2015). Rezultatele obținute în acest studiu sugerează o distribuție mozaicată a *B. miyamotoi* la căpușele nehrănite *I. ricinus* în zona investigată, fiind, prima semnalare în România.

Capitolul 10 a avut ca obiectiv furnizarea datelor epidemiologice privind prezența *Borrelia* spp. în țesuturile micromamiferelor din România și în corpul căpușelor parazite pe aceste animale. Micromamiferele constituie gazde rezervor competente pentru căpușe, care mențin și transmit agenții patogeni către vectori ce sunt transmiși mai departe la gazda finală (BOWMANN, 2008). Dintre micromamifere, în principal, diferitele specii de rozătoare sunt rezervoare competente pentru căpușe (MIHALCA, 2012a; 2013). Aceste gazde sunt considerate markeri pentru evaluarea distribuției unor specii de căpușe (MIHALCA, 2012b). Datorită faptului că micromamiferele sunt gazde pentru diferite specii de căpușe (MIHALCA, 2012b), iar nivelul de parazitare al acestora este ridicat, aceste animale joacă un rol important în epidemiologia bolilor vectoriale transmise prin căpușe.

În acest sens, 401 de micromamifere (11 specii) au fost colectați din 7 județe din România: 9 specii de rozătoare - șoareci (*Apodemus agrarius*, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *A. uralensis*, *M. minutus*, *M. agrestis*, *M. arvalis*, *M. subterraneus*, *M. glareolus*) și două specii de insectivore – chițcani (*Crocidura leucodon*, *C. suaveolens*). De la 393 animale (98%) s-a recoltat atât cordul, cât și ficatul, de la două animale (0.50%) doar cordul, iar de la 6 (1.50%) doar ficatul. În ceea ce privește infecția cu *Borrelia* spp. la *I. ricinus* colectate (n=301) de pe micromamifere, nu s-au găsit căpușe infectate cu aceste spirochete.

Prevalența totală a infecției cu *Borrelia* spp. la micromamifere a fost de 4.99%. Cea mai ridicată prevalență din totalul micromamiferelor examinate, s-a înregistrat la *C. suaveolens* (7/49; 1.45%), urmat de *A. agrarius* (3/87; 0.75%) și *M. arvalis* (3/53; 0.75%), *A. flavicollis* (2/49; 0.50%) și *M. glareolus* (2/32; 0.50%), *M. agrestis* (1/2; 0.5%), *M. minutus*

(1/11; 0.50%), *C. leucodon* (1/21; 0.25%). Țesuturile infectate au fost atât cordul (13/395; 3.29%), cât și ficatul (11/399; 2.76%). Cea mai frecventă specie detectată din totalul probelor pozitive a fost *B. afzelii* (14/20; 70%), urmată de *B. garinii*, *B. burgdorferi* s.s. și *B. miyamotoi* cu o prevalență de 10% (2/20) în cazul fiecărei specii. Corelarea genospeciilor cu speciile de gazdă, arată faptul că *B. afzelii* a fost detectată la 8 specii de micromamifere (*A. agrarius*, *A. flavicollis*, *C. leucodon*, *C. suaveolens*, *M. minutus*, *M. agrestis*, *M. arvalis*, *M. glareolus*), la câte un exemplar din fiecare specie de micromamifer enumerat, fiind mai frecventă la *C. suaveolens*. *Borrelia garinii*, *B. burgdorferi* s.s. și *B. miyamotoi* au fost detectate la câte două specii de animale, prezentând următoarele asocieri: *B. garinii* - *A. agrarius*, *B. garinii* - *M. arvalis* respectiv *B. burgdorferi* s.s. - *A. agrarius* și *B. burgdorferi* s.s. - *M. arvalis*, *Borrelia miyamotoi* - *A. flavicollis* și *M. glareolus*, în ambele cazuri țesutul infectat fiind ficatul.

Studiul de față este primul care evaluează prevalența infecției cu *Borrelia* spp. în țesuturile recoltate de la rozătoare și insectivore din România, în corelație cu căpușele parazite pe aceste animale. De asemenea, este primul studiu în care s-a semnalat prezența agentului patogen *Borrelia* spp. la speciile insectivore *C. leucodon*, respectiv *C. suaveolens*. Rolul de rezervor la cele două specii de insectivore nu s-a mai evaluat până în prezent.

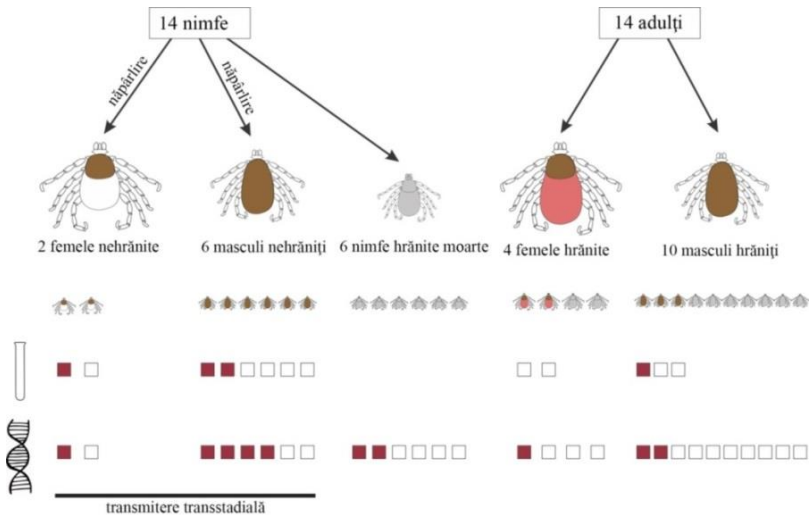


Fig. 1. Stagiile căpușelor *H. aegyptium*, infecția lor cu *B. turcica* relevată după năpârlire și cultivare, respectiv după analiza PCR (KALMÁR, 2015a).

Capitolul 11 a avut ca obiectiv evaluarea posibilității de transmitere a bacteriei *B. turcica* în diferite stadii de dezvoltare al căpușelor *H. aegyptium* parazite pe specia de țestoasă dobrogeană *Testudo graeca* din România. Importanța și rolul epidemiologic al țestoaselor (reptilelor) a crescut, datorită comerțului internațional al animalelor de companie provenite din sălbăticie (BURRIDGE, 2011). O multitudine de agenți patogeni emergenți și/sau zoonotici, au fost izolați de la reptile sau de la căpușele care parazitează aceste vertebrate (PAȘTIU, 2012). Țestoasele, aduse din sălbăticie, parazitare cu diferite specii de căpușe, facilitează introducerea patogenilor „non-native” și reprezintă un risc semnificativ pentru sănătatea publică (BURRIDGE, 2000; 2011; 2003).

Studiul s-a desfășurat în perioada anului 2013, luna iulie. În total s-au colectat 28 de căpușe după hrănire și detașare completă de pe 6 țestoase (*T. graeca*). Nimfele au fost ținute în condiții de laborator până până la năpârlirea acestora în adulți. În vederea cultivării spirochetelor, conținutul intestinal și glandele salivare au fost obținuți de la adulți nehrăniți (nimfe năpârlite) și hrăniți. Prezența spirochetelor s-a detectat prin DFM/MCF iar prin PCR folosind primeri, proiectați în acest studiu, pentru detectarea *B. turcica* țintind genele *gyrB* și *glpQ* (Figura 1).

Acesta este primul studiu care evaluează posibilitatea transmiterii transstadiale a infecției cu *B. turcica* la căpușele *H. aegyptium* recoltate de pe *T. graeca* din România. Prevalența crescută a *H. aegyptium* pe *T. graeca* (PAȘTIU, 2012), respectiv rezultatele obținute în acest studiu, indică faptul că *B. turcica* este menținută în natură în cadrul unui sistem ciclic. Astfel, presupunem, că gazda vertebrată naturală a bacteriei poate fi reprezentată de micromamifere (ex. rozătoare, arici) care sunt preferate de stagiile premature (larve, nimfe) ale căpușelor. De asemenea, negativitatea probelor de sânge poate indica și o bacteriemie scăzută. Având în vedere că probele de sânge recoltate de la țestoase nu au prezentat semne de infecție cu *B. turcica*, indică faptul că, contaminarea nimfelor a decurs: în timpul hrănirii nimfelor pe o altă gazdă; prin transmitere transovariană; sau prin mecanismul de co-hrănire a nimfelor pe o altă gazdă. Rezultatele obținute confirm, pentru prima dată, transmiterea transstadială a patogenului *B. turcica* la căpușele *H. aegyptium*. Această transmitere subliniază importanța supravegherii țestoaselor în ceea ce privește bolile vectoriale.

Capitolul 12 a avut ca obiectiv determinarea, utilizând tehnica PCR, prevalența infecției cu *B. turcica* la căpușe *H. aegyptium* hrănite pe broasca țestoasă dobrogeană, *T. graeca*, din România. Astfel, s-au folosit probele de ADN extrase în prealabil de la *H. aegyptium* recoltate de pe țestoasele de

uscat, *T. graeca* capturate în județele Tulcea și Constanța (PAȘTIU, 2012). Din totalul celor 448 de căpușe, prevalența totală a infecției cu *B. turcica* obținut a fost 17.41 %.

Studii epidemiologice privind infecția cu *B. turcica* la *H. aegyptium* sunt parcimonioase. *Borrelia turcica* a fost studiată și caracterizată pentru prima dată de GÜNER și colab. în anul 2003. Aceste spirochete au fost izolate din *H. aegyptium* hrănite pe *T. graeca* provenite din Turcia. Rezultatele obținute în studiul de față privind prevalența infecției cu *B. turcica* sunt comparabile cu rata prevalenței obținute de GÜNER și colab. (2003). Riscul infecției depinde de mai mulți factori. Unul dintre acești factori ar fi schimbarea climatică care influențează ecologia și biologia vectorului, a patogenului și a gazdei. În studiile epidemiologice, densitatea populației luate în studiu influențează prevalența totală a infecției cu un anumit patogen.

Capitolul 13 a avut ca obiectiv caracterizarea structurii moleculare a bacteriei *B. turcica* prin spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR), care permite identificarea compoziției moleculare a unei celule de la un microorganism, permițând identificarea proteinelor, lipidelor și a carbohidraților prezente în compoziția acesteia, respectiv oferă informații despre conformația ADN-ului și ARN-ului (OUST, 2004). Datorită diferențelor structural a microorganismelor, această tehnică permite identificarea a diferitelor specii de bacterii pe baza spectrelor emise (D'SOUZA, 2009).

Analiza experimentală FT-IR s-a efectuat din cultură de *B. turcica* și din ADN-ul acestuia. Cultura și ADN-ul, răzuit de pe suprafața lamelor, s-a omogenizat cu bromură de potasiu (KBr). Domeniile spectrale în cazul culturii au fost cuprinse între $\sim 400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, respectiv $\sim 700 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ în cazul ADN-ului izolat de la *B. turcica*. Spectrele FT-IR înregistrate în cazul culturii *B. turcica* prezintă un număr de 21 benzi de absorbție. Benzile înregistrate în această regiune spectrală sunt caracteristice grupărilor funcționale din structura proteinelor, acizilor nucleici, fosfolipidelor, respectiv carbohidraților. În ceea ce privește spectrele FT-IR înregistrate în cazul ADN-ului izolat de la *B. turcica* s-au înregistrat 27 de peak-uri, care sunt caracteristice structurii ADN-ului. Diferențele spectrale înregistrate la genospeciile patogene la om, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* s.s., comparativ cu specia, *B. turcica*, investigată în studiul de față, se pot datora diferențelor structurale din compoziția peretelui celular al borreliilor. Conformația proteinelor din structura bacteriei *B. turcica*, determinată prin FT-IR, este de α -helix, iar conformația ADN-ului este de formă B.

Toate aceste studii s-au realizat în cadrul proiectului IDEI-PCCE CNCSIS 84, 7/2010 "Studii fundamentale și aplicate de ecoepidemiologie, biologie și genetica moleculară ale vectorilor bolii Lyme", EurNegVec COST TD1303, în colaborare cu Institutul Național de Sănătate Publică și Mediu, Ministerul Sănătății, Bunăstării și Sportului (RIVM) din Olanda, în cadrul proiectului European, EurNegVec COST Action TD1303 și al proiectului co-finanțat POSDRU 159/1.5/S/136893.

BIBLIOGRAFIE

1. ANDERSON J, 1991, Epizootiology of Lyme borreliosis, *Scand J Infect Dis, Suppl* 77, 23–34.

2. BRICIU, V.T., TITILINCU, A., ȚĂȚULESCU, D.F., CÂRSTINA, D., LEFKADITIS, M., MIHALCA, A.D., 2011, First survey on hard ticks (Ixodidae) collected from humans in Romania: possible risks for tick-borne diseases, *Exp Appl Acarol*, 54, 199–204.

3. BRICIU, V.T., MEYER, F., SEBAH, D., ȚĂȚULESCU, D.F., COROIU, G., LUPȘE, M., CARSTINA, D., MIHALCA, A.D., HIZO-TEUFEL, C., KLIER, C., HUBER, I., FINGERLE, V., 2014, Real-time PCR-based identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in ticks collected from humans in Romania, *Ticks Tick Borne Dis*, 5, 575–581.

4. BURRIDGE, M.J., SIMMONS, L.A., ALLAN, S.A., 2000, Introduction of potential heart water vectors and other exotic ticks into Florida on imported reptiles, *J Parasitol*, 86, 700–704.

5. BURRIDGE, M.J., SIMMONS, L.A., 2003, Exotic ticks introduced into the United States on imported reptiles from 1962 to 2001 and their potential roles in international dissemination of diseases, *Vet Parasitol*, 113, 289–320.

6. BURRIDGE M.J., 2011, Invasive species, Non-native and invasive ticks. Threats to human and animal health in the United States, *University Press of Florida, Florid*, pp. 4–14.

7. CIUTĂ, C., NECHIFOR, V., TOMAC, I., MIRON, A., NOVAC, B., NOVAC, C., 2012, Lyme disease—unusual medical encounter for an urologist, *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 116, 1101–1105.

8. COIPAN, E.C., VLADIMIRESCU, A.F., 2010, First report of lyme disease spirochetes in ticks from Romania (Sibiu County), *Exp Appl Acarol*, 52, 193–197.

9. COIPAN, E.C., VLADIMIRESCU, A.F., 2011, *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae): vectors for Lyme disease spirochetes in Romania, *Exp Appl Acarol*, 54, 293–300.

10. D'SOUZA, L., DEVI, P., KAMAT, T., NAIK, C.G., 2009, Diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopic (DRIFTS) investigation of *E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, *Ind J Maine Sci*, 38, 45–51.

11. DUMITRACHE, M.O., PAȘTIU, A.I., KALMÁR, Z., MIRCEAN, V., SÂNDOR, A.D., GHERMAN, C.M., PEȘTEAN, C., MIHALCA, A.D., COZMA, V., 2013, Northern white-breasted hedgehogs *Erinaceus roumanicus* as hosts for ticks infected with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in Romania, *Ticks Tick Borne Dis*, 4, 214–217.

12. DUMITRACHE, M.O., 2012, Cercetări privind ecobiologia și epidemiologia atacului cu căpușe Ixodidae – vectori ai bolii Lyme în România, Teză de doctorat, *University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, Romania*.

13. FONVILLE, M., FRIESEMA, I.H., HENGEVELD, P.D., DOCTERS, VAN LEEUWEN, A., JAHFARI, S., HARMS, M.G., VAN VLIET, A.J., HOFHUIS, A., VAN PELT, W., SPRONG, H., VAN DEN WIJNGAARD, C.C., 2014, Human exposure to tickborne

relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, the Netherlands, *Emerg Infect Dis*, 20, 1244–1245.

14.GERN, L., HUMAIR, P.F., 1998, Natural history of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Wien Klin Wochenschr*, 110, 856–858.

15.GHERMAN, C., SÁNDOR, A.D., KALMÁR, Z., MARINOV, M., MIHALCA, A.D., 2012, First report of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in two threatened carnivores: the Marbled polecat, *Vormela peregusna* and European mink, *Mustela lutreola* (Mammalia: Mustelidae), *BMC Veterinary Research*, 8, 137.

16.GRAY, J.S., DAUTEL, H., ESTRADA-PEÑA, A., KAHL, O., LINDGREN, E., 2009, Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe, *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2009, 593232.

17.GÜNER, E.S., HASHIMOTO, N., TAKADA, N., KANEDA, K., IMAI, Y., MASUZAWA, T., 2003, First isolation and characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains from *Ixodes ricinus* ticks in Turkey, *J Med Microbiol*, 52, 807–813.

18.HANINCOVÁ, K., SCHÄFER, S.M., ETTI, S., SEWELL, H.S., TARAGELOVA, V., ZIAK, D., LABUDA, M., KURTENBACH, K., 2003, Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe, *Parasitology*, 126, 11–20.

19.JOHNSON, R.C., SCHMID, G.P., HYDE, F.W., STEIGERWALT, A.G., BRENNER, D.J., 1984, *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease, *Int J Syst Bacteriol*, 34, 496–497.

20.KALMÁR, Z., MIHALCA, A.D., DUMITRACHE, M.O., GHERMAN, C.M., MAGDAȘ, C., MIRCEAN, V., OLTEAN, M., DOMȘA, C., MATEI, I.A., MĂRCUȚAN, D.I., SÁNDOR, A.D., D'AMICO, G., PAȘTIU, A., GYÖRKE, A., GAVREA, R., MAROSI, B., IONICĂ, A., BURKHARDT, E., TORIAY, H., COZMA, V., 2013, Geographical distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* genospecies in questing *Ixodes ricinus* from Romania: a countrywide study, *Ticks Tick Borne Dis*, 4, 403–408.

21.KALMÁR, Z., D'AMICO, G., MATEI, I.A., PAȘTIU, A.I., MĂRCUȚAN, D.I., IONICĂ, A.M., MAGDAȘ, C., MODRÝ, D., MIHALCA, A.D., 2014, *Borrelia turcica* in *Hyalomma aegyptium* ticks in Romania, *Parasit Vectors*, 7, Suppl 1, P6.

22.KALMÁR, Z., COZMA, V., SPRONG, H., JAHFARI, S., D'AMICO, G., MĂRCUȚAN, D.I., IONICĂ, A.M., MAGDAȘ, C., MODRÝ, D., MIHALCA, A.D., 2015a, Transstadial transmission of *Borrelia turcica* in *Hyalomma aegyptium* ticks, *PLoS One*, 10, e0115520.

23.KALMÁR, Z., SPRONG, H., MIHALCA, A.D., GHERMAN, C.M., COIPAN, E.C., FONVILLE, M., COZMA, V., 2015b, Circulation of *Borrelia miyamotoi* and *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in questing *Ixodes ricinus*, Romania, *Emerg Infect Dis*, In press.

24.KELLER, A., GRAEFEN, A., BALL, M., MATZAS, M., BOISGUERIN, V., MAIXNER, F., LEIDINGER, P., BACKES, C., KHAIRAT, R., FORSTER, M., STADE, B., FRANKE, A., MAYER, J., SPANGLER, J., MCLAUGHLIN, S., SHAH, M., LEE, C., HARKINS, T.T., SARTORI, A., MORENO-ESTRADA, A., HENN, B., SIKORA, M., SEMINO, O., CHIARONI, J., ROOTSI, S., MYRES, N.M., CABRERA, V.M., UNDERHILL, P.A., BUSTAMANTE, C.D., VIGL, E.E., SAMADELLI, M., CIPOLLINI, G., HAAS, J., KATUS, H., O'CONNOR, B.D., CARLSON, M.R., MEDER, B., BLIN, N., MEESE, E., PUSCH, C.M.,

ZINK, A., 2012, New insights into the Tyrolean Iceman's origin and phenotype as inferred by whole-genome sequencing, *Nat Commun*, 3, 698.

25.KISS, T., CADAR, D., KRUPACI, A.F., BORDEANU, A., BRUDASCA, G.F., MIHALCA, A.D., MIRCEAN, V., GLIGA, L., DUMITRACHE, M.O., SPINU, M., 2011, Serological reactivity to *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs and horses from distinct areas in Romania, *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11, 1259–1262.

26.KRAUSE, P.J., FISH, D., NARASIMHAN, S., BARBOUR, A.G., 2015, *Borrelia miyamotoi* infection in nature and in humans, *Clin Microbiol Infect*, 21, 631–639.

27.MASUZAWA, T., 2004, Terrestrial distribution of the Lyme borreliosis agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in East Asia, *Jpn J Infect Dis*, 57, 229–235.

28.MIHALCA, A.D., DUMITRACHE, M.O., SÁNDOR, A.D., MAGDAŞ, C., OLTEAN, M., GYÖRKE, A., MATEI, I.A., IONICĂ, A., D'AMICO, G., COZMA, V., GHERMAN, C.M., 2012a, Tick parasites of rodents in Romania: host preferences, community structure and geographical distribution, *Paras Vectors*, 5, 266.

29.MIHALCA, A.D., DUMITRACHE, M.O., MAGDAŞ, C., GHERMAN, C.M., DOMŞA, C., MIRCEAN, V., GHIRA, I.V., POCORA, V., IONESCU, D.T., BARABÁSI, S., COZMA, V., SÁNDOR AD, 2012b, Synopsis of the hard ticks (Acari: Ixodidae) of Romania with update on host associations and geographical distribution, *Exp Appl Acarol*, 58, 183–206.

30.MIHALCA, A.D., SÁNDOR, A.D., 2013, The role of rodents in the ecology of *Ixodes ricinus* and associated pathogens in Central and Eastern Europe, *Frontin Cel Infect Microbiol*, 3, 56.

31.OUST, A., MØRETRØ, T., NATERSTAD, K., SOCKALINGUM, G.D., ADT, I., MANFAIT, M., KOHLER, A., 2006, Fourier transform infrared and raman spectroscopy for characterization of *Listeria monocytogenes* strains, *Appl Environ Microbiol*, 72, 228–232.

32.PARTE, A.C., 2014, LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature, *Nucleic Acids Res*, 42, D613–D616.

33.PAŞTIU, A.I., MATEI, I.A., MIHALCA, A.D., D'AMICO, G., DUMITRACHE, M.O., KALMÁR, Z., SÁNDOR, A.D., LEFKADITIS, M., GHERMAN, C.M., COZMA, V., 2012, Zoonotic pathogens associated with *Hyalomma aegyptium* in endangered tortoises: evidence for host-switching behaviour in ticks?, *Parasit Vectors*, 5, 301.

34.SCOLES, G.A., PAPERIO, M., BEATI, L., FISH, D., 2001, A relapsing fever group spirochete transmitted by *Ixodes scapularis* ticks, *Vector Borne Zoonotic Dis*, 1, 21–34.

35.WAGEMAKERS, A., STAARINK, P.J., SPRONG, H., HOVIUS, J.W., 2015, *Borrelia miyamotoi*: a widespread tick-borne relapsing fever spirochete, *Trends Parasitol*, 31, 260–269.