

UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU
WYDZIAŁ BIOLOGII

ROZPRAWA DOKTORSKA

Współwystępowanie *Babesia* spp. (Apicomplexa: Piroplasmida)
i *Borrelia* spp. (Bacteria: Spirochaetes) w kleszczach pospolitych,
Ixodes ricinus, na terenach zurbanizowanych na przykładzie Poznania

Co-occurrence of *Babesia* spp. (Apicomplexa: Piroplasmida) and *Borrelia* spp.
(Bacteria: Spirochaetes) in common ticks, *Ixodes ricinus*, in urban areas on the
example of Poznań.

mgr Justyna Liberska

Poznań, luty 2024

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem:

prof. UAM dr hab. Mirosławy Dabert

Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej

Wydział Biologii

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

prof. UAM dr hab. Jerzego Michalika

Zakład Morfologii Zwierząt

Wydział Biologii

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Podziękowania

...dowiadujemy się, że jedyne co się liczy to Miłość. Wszystko inne - dyplomy, pieniądze, przedmioty - nie ma większego znaczenia. Okazuje się też, że to, co robiliśmy, nie jest ważne.

Ważne jest jak robiliśmy, a najistotniejsze jest to, że robiliśmy coś z miłością...

Elisabeth Kübler-Ross

Pani prof. UAM dr hab. Mirosławie Dabert, za danie mi szansy na realizację moich badań, przekazaną wiedzę, wszystkie nauki oraz lekcje.

Panu prof. UAM dr hab. Jerzemu Michalikowi, za wiarę we mnie i moją pracę, za pomoc, zaangażowanie, zrozumienie i wsparcie.

Pani prof. UAM dr hab. Agnieszce Ludwików, za pomoc, życzliwość i wsparcie.

Zespołowi Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej UAM w Poznaniu za przekazaną wiedzę i wzajemne wsparcie; Uli Sobczyńskiej i Julii Olechnowicz za wspierające rozmowy i pomoc; Małgosi Łosko, Ani Labrzyckiej-Dulănescu i Beacie Pater za pracę do późnych godzin, życzliwość i wspólne powroty do domów; Arturowi Trzebnemu za czas, kiedy podnosiliśmy się nawzajem na duchu i czerpaliśmy radość ze współpracy; Sylwii Jedut i panu Witoldowi Nowakowi za ich obecność, dobre słowo i życzliwość.

Śp. Panu prof. UAM dr hab. Czesławowi Błaszakowi za wyjazdy na Międzynarodowe Sympozja "Stawonogi pasożytnicze, alergogenne i jadowite - znaczenie medyczne i sanitarne" inspirowane rozmowy, dopingowanie i podnoszenie na duchu.

Panu Prof. dr hab. Andrzejowi Kaźmierskiemu za umożliwienie realizacji 'kleszczowej' pracy magisterskiej i pokazanie mi drzwi, którymi mogłam wejść, by dalej odkrywać niezwykle świat kleszczy.

Osobom zaangażowanym w zbiór kleszczy: Łukaszowi Brodzie, Gniewkowi Gruszczyńskiemu, Weronice Pawlik, Anecie Łyś, lekarzom weterynarii i pracownikom: (1) Centrum Zdrowia Małych Zwierząt M. Majka, R. Starczewski s.c., (2) Gabinetu Weterynaryjnego Katarzyny Gryglewskiej, (3) Gabinetu Weterynaryjnego lek. wet. Dariusza Filipińskiego, (4) Gabinetu Weterynaryjnego Marcina Koniecznego, (5) Gabinetu weterynaryjnego - Piotra Winieckiego, (6) Kliniki Weterynaryjnej Juszcak & Gorzelańczyk, (7) Praktyki Weterynaryjnej A. Golec M. Rybski, (8) Gabinetu Weterynaryjnego Pluto Vet lek. wet. Krzysztofa Kaniewskiego, (9) Gabinetu Weterynaryjnego Zwierzak A. Adamskiej, (10) Gabinetu Weterynaryjnego Amicus Grzegorza Macioch, (11) Usług Weterynaryjnych Jakuba Golec, (12) Przychodni Weterynaryjnej Na Polance Katarzyny Marciniak, (13) Specjalistycznego Gabinetu Weterynaryjnego lek. wet. Żanety Sokołowskiej, (14) Przychodni Weterynaryjnej lek. wet. Adama Łowczaka, (15) Przychodni Weterynaryjnej Kociak lek. wet. Sylwii Łata, (16) Kliniki Weterynaryjnej dr. Grzegorza Wąsiatyca, (17) Specjalistycznego Gabinetu Weterynaryjny Juszcak & Gorzelańczyk.

Przyjaciołom i Rodzinie; Ewie Gawińskiej, Ewelinie Łuczka, Dominice Seroka, Małgosi Wolskiej, Natalii Radacz, Marlenie Kopackiej, za bycie obok ilekroć tego potrzebowałam, za Wasze wsparcie i przestrzeń na emocje.

Kasi Kaszewskiej-Gilas za wsparcie, za wnoszenie się nawzajem, za wiarę we mnie, inspirujące rozmowy, muzykę i dotlenianie;), za przyjaźń i wspólną drogę.

Agacie Drwięga za wsparcie i dodawanie sobie nawzajem siły, głęboko wierzę, że to wszystko jest po Coś.

Małgosi Koliczkiej, za stanie obok, wsparcie, kleszczowe i brzuchorzęskowe fiksacje, miłość do kotów i zrozumienie.

Julii Durkiewicz, Małgosi Wolskiej, Mateuszowi Deker i Ani Olszewskiej za tworzenie bezpiecznych przestrzeni Domu Kultury Jogi, Yoga & Ayurweda i Yoga Academy gdzie zawsze mogłam znaleźć i znajduję ukojenie.

Magdzie Widłak- Langer za naszą współpracę, gdyby nie ogrom wykonanej z Tobą pracy, nie pisałabym teraz tych wyrazów wdzięczności, która obecnie mnie przepełnia, dziękuję, że nauczyłaś mnie jak wychodzić z mroku.

Maciejowi Nowiczowi, za nasze lekcje i atmosferę którą stworzyłeś, za pomoc i wsparcie.

Wszystkim Osobom, które przychodziły i przychodzą na moje zajęcia jogi, każde spotkanie z Wami dodaje sił w różnych obszarach życia; to niesamowita wymiana.

Kotykowski, za Twoją radosną niezależną naturę, za wyczuwanie moich emocji i kojące mruczenie, za każde 'stanie na straży', kiedy zwinięty w kłębek stacjonowałeś gdzieś w pobliżu, kiedy kolejne godziny dni noce, pracowałam.

Rodzicom &

Tacie Leszkowi Liberskiemu za rozbudzenie we mnie ciekawości, gdziekolwiek jesteś, czuję jak bardzo jesteś ze mnie dumny i ciągle podziwiasz mój upór, determinację i wytrwałość, bardzo za Tobą tęsknię,

Mamci Gabrysi Liberskiej za „zarażenie mnie” miłością do życia, dziękuję że uczymy się nawzajem i radujemy się z małych – wielkich – zwykłych rzeczy.

Dziękuję, że Jesteście, bez Was Wszystkich, To nigdy nie byłoby możliwe,
Dziękuję też Sobie za Siebie.
Z wdzięcznością Justyna 'Justice'

Spis treści

1. STRESZCZENIE	6
2. ABSTRACT	8
3. WYKAZ PUBLIKACJI SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ	10
4. WPROWADZENIE I GŁÓWNE CELE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	11
5. REZULTATY I WNIOSKI ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	17
5.1. Występowanie gatunków z rodzaju <i>Babesia</i>	17
5.2. Występowanie krętków <i>Borrelia miyamotoi</i> z grupy gorączek powrotnych (RFGB)	19
5.3. Występowanie krętków <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. z grupy boreliozy z Lyme (LB)	21
5.4. Współwystępowanie gatunków z rodzajów <i>Babesia</i> oraz <i>Borrelia</i> z grupy LB	22
5.5. Wnioski	22
6. LITERATURA	24
6. PUBLIKACJA A.1	33
7. PUBLIKACJA A.2	34
8. MANUSKRYPT M.1	35
9. OŚWIADCZENIA O WKŁADZIE W POWSTAWANIE ARTYKUŁÓW	75
10. MATERIAŁY DODATKOWE	90

1. Streszczenie

Ixodes ricinus, wektor patogenów odkleszczowych (ang. TBPs, *tick borne pathogens*) jest najważniejszym epidemiologicznie kleszczem w Europie. Nadal brakuje kompleksowej wiedzy na temat enzootycznych cykli krążenia TBPs z udziałem *I. ricinus* w ekosystemach miejskich, które ze względu na wysokie zagęszczenie ludzi, zwierząt towarzyszących i naturalnych żywicieli kleszczy, stanowią unikalne warunki do szerzenia się zoonoz transmisyjnych. Oprócz krętków z kompleksu *Borrelia burgdorferi* s.l. będących przyczyną boreliozy z Lyme (LB), kleszcze *I. ricinus* zaangażowane są w wektorowanie *B. miyamotoi*, krętka z grupy gorączek powrotnych (ang. RFG, *relapsing fever group*), czynnika tzw. boreliozy miyamotoi. Niektóre TBPs, m.in. *B. burgdorferi* s.l. i *Babesia microti*, mogą współwystępować u kleszczy i żywicieli rezerwuarnych, co oznacza, że istnieje prawdopodobieństwo ich jednoczesnego przeniesienia na ludzi lub zwierzęta domowe. W Europie trzy gatunki *Babesia*, *Ba. microti*, *Ba. divergens* i *Ba. venatorum*, mogą powodować ludzką babeszjozę, niebezpieczną dla pacjentów z obniżoną odpornością. Z kolei *Ba. canis* to jedyny w Polsce gatunek powodujący babeszjozę psów, którego wektorem jest kleszcz łąkowy, *Dermacentor reticulatus*. Celem rozprawy była analiza występowania bakterii *Borrelia* spp. i protistów *Babesia* spp. wraz z oceną częstości ich współwystępowania (koinfekcji) w populacjach miejskich kleszczy *I. ricinus*, na przykładzie miasta Poznania.

Materiał do badań stanowiły kleszcze: (i) poszukujące żywiciela (tj. z roślinności), zebrane z 5 terenów rekreacyjnych Poznania (n=1059) oraz (ii) pozyskane od psów i kotów w ramach 3 letniej współpracy z 17 gabinetami weterynaryjnymi w Poznaniu (n=1268 samic). Do detekcji TBPs zastosowano sekwencjonowanie markerowych fragmentów DNA.

Obecność DNA *B. burgdorferi* s.l. potwierdzono u 8,7% kleszczy poszukujących żywiciela, w tym u 11,8% samic, 9,6% samców oraz 6,3% nimf. Blisko 2-krotnie niższy odsetek zakażeń (4,7%) wykryto u samic zebranych ze zwierząt. W obu grupach kleszczy zidentyfikowano gatunki należące do krętków powodujących LB: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, a wśród kleszczy zebranych ze psów dodatkowo *B. spielmanii*. Występowanie DNA *B. miyamotoi*, wykazano u 2,1% kleszczy poszukujących żywicieli oraz łącznie u 1,8% kleszczy z psów i kotów. Obecność DNA *Babesia* spp. wykryto u 4,4% (45/1029) kleszczy zebranych z roślinności, w tym u 7,3% samic (21/289), 4,6% samców (13/280) oraz 2,4% nimf (11/460). DNA *Babesia* spp. stwierdzono także u 6% (76/1268) samic *I. ricinus* żerujących na zwierzętach towarzyszących. W obu grupach kleszczy zidentyfikowano dwa gatunki potencjalnie chorobotwórcze dla człowieka: *Ba. microti* i *Ba. venatorum*, ponadto

Ba. canis. Wśród zakażeń dominowały *Ba. canis* (61,2%) i *Ba. microti* (34,7%). Łącznie, współwystępowanie zakażeń *Borrelia* spp. i *Babesia* spp. odnotowano u 1% (24/2297) kleszczy. Wśród zakażonych kleszczy z roślinności, *Ba. canis* dominowała w koinfekcjach (72,7%; 8/11), występując z *B. afzelii* lub *B. garinii*. W kleszczach ze zwierząt, przeważała *Ba. microti* (92,3%; 12/13) głównie z *B. afzelii*.

Podsumowując, wyraźna dominacja *Ba. canis* uprawdopodobnia funkcjonowanie *I. ricinus* jako wektora w cyklach enzoptycznych na obszarach środkowo-zachodniej Polski, gdzie *D. reticulatus* jest nieobecny lub występuje rzadko. W takim przypadku miejskie tereny mogą stwarzać potencjalne ryzyko nabycia babeszjozy przez psy. Stwierdzenie dominacji dwóch patogennych gatunków krętków *B. afzelii* i *B. garinii* oraz wykrycie w obu grupach kleszczy sekwencji *Ba. microti* i *Ba. venatorum*, identycznych ze szczepami chorobotwórczymi dla człowieka, wskazują na ryzyko zachorowania osób korzystających z obszarów zieleni miejskiej na LB i/lub babeszjozę. Z kolei obecność *B. miyamotoi*, czyni możliwym nabycie boreliozy miyamotoi, która powinna być objęta diagnostyką różnicującą. Współwystępowanie potencjalnie chorobotwórczych gatunków z rodzajów *Borrelia* i *Babesia* wśród miejskich populacji kleszczy może modyfikować symptomy kliniczne, przebieg i nasilenie jednostek chorobowych powodowanych przez te patogeny. Koinfekcje te powinny być zatem brane pod uwagę przez lekarzy i diagnostów na etapie diagnozowania ludzi i psów z symptomami gorączki po kontakcie z kleszczem.

Słowa kluczowe: *Ixodes ricinus*, *Babesia*, *Borrelia* LB, borelioza z Lyme, *Borrelia* RF borelioza miyamotoi, babeszjoza, patogeny odkleszczowe, koinfekcje

2. Abstract

Ixodes ricinus, the vector of tick-borne pathogens (TBPs), is the most epidemiologically important tick in Europe. Comprehensive knowledge of enzootic circulation cycles of TBPs transmitted by *I. ricinus* in urban ecosystems is still lacking. Due to the dense population of humans, companion animals, and natural tick hosts, those environments provide unique conditions for tick-borne zoonotic infections to occur. In addition to spirochetes from the *Borrelia burgdorferi* s.l. complex, which are the cause of Lyme borreliosis (LB), *I. ricinus* ticks are involved in the transmission of *B. miyamotoi*—a spirochete from the relapsing fever group (RF), the causative agent of *B. miyamotoi* disease. Some TBPs may occur as coinfections in ticks and reservoir hosts, indicating the likelihood of their simultaneous transmission to humans or domestic animals. It has been demonstrated that coinfections with *B. burgdorferi* s.l. and *Babesia microti* protists in ticks and small rodents can locally intensify the expansion of *Ba. microti*. In Europe, three species—*Ba. microti*, *Ba. divergens*, and *Ba. venatorum*—can cause human babesiosis, posing a threat to immunocompromised patients. In the case of such dual infections, the course of the disease may be more severe, with persisting symptoms. Furthermore, *Ba. canis* is the sole species responsible for canine babesiosis in Poland; its competent vector is the meadow tick, *Dermacentor reticulatus*. This dissertation aimed to analyze the occurrence of *Borrelia* spp. bacteria and *Babesia* spp. protists, with an assessment of the frequency of their coexistence (coinfections) within urban populations of *I. ricinus* ticks, using the city of Poznań as an example.

The research material comprised host-seeking ticks (i.e., from vegetation) collected from five recreational areas in Poznań (n=1059) along with specimens obtained from companion animals (dogs and cats) in collaboration with 17 veterinary clinics in Poznań (n=1268 females). TBPs detection was performed by sequencing DNA marker fragments.

The presence of *B. burgdorferi* s.l. DNA was confirmed in 8.7% (90/1029) of host-seeking ticks, including 11.8% of females (34/289), 9.6% of males (27/280), and 6.3% of nymphs (29/460). A nearly two times lower infection rate (4.7%) was detected in females collected from animals. In both groups of ticks, species belonging to the spirochetes causing LB were identified: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, and among ticks collected from dogs, additionally, *B. spielmanii*. The presence of *B. miyamotoi* DNA, a species representing the *Borrelia* RF group, was detected in 2.1% of hosts-seeking ticks and 1.8% of ticks collected from dogs and cats.

The presence of *Babesia* spp. protists was detected in 4.4% of ticks collected from vegetation, including 7.3% of females, 4.6% of males, and 2.4% of nymphs. *Babesia* spp. DNA was also identified in 6% of female *I. ricinus* ticks feeding on companion animals. In both groups of ticks, two species potentially pathogenic to humans were identified: *Ba. microti* and *Ba. venatorum*, along with *Ba. canis*. Among the infections, *Ba. canis* (61.2%) and *Ba. microti* (34.7%) prevailed. In total, the co-occurrence of infections with *Borrelia* spp. and *Babesia* spp. was noted in 1% (24/2297) of ticks. Among the infected ticks collected from vegetation, *Ba. canis* predominated in coinfections (72.7%; 8/11), occurring alongside *B. afzelii* or *B. garinii*. In ticks from animals, *Ba. microti* prevailed (92.3%; 12/13), mainly with *B. afzelii*.

In summary, the clear dominance of *Ba. canis* suggests the functioning of *I. ricinus* as a vector in enzootic cycles in the central-western regions of Poland, where *Dermacentor reticulatus* is absent or rare. Under these circumstances, dogs in urban areas may face a potential risk of contracting babesiosis. Observing the dominance of two pathogenic spirochete species, *B. afzelii* and *B. garinii*, and detecting sequences that correspond to the strains causing babesiosis in humans (*Ba. microti* and *Ba. venatorum*) in both tick groups, points to the risk of acquiring LB and/or babesiosis by people using urban green areas. Moreover, the presence of *B. miyamotoi* infections makes it possible to contract *B. miyamotoi* disease, which should be considered in differential diagnosis. The coexistence of potentially pathogenic species from the *Borrelia* and *Babesia* genera within urban tick populations may modify clinical symptoms, the course, and severity of diseases caused by the pathogens. Therefore, in the examination of humans and dogs with presenting fever symptoms after tick exposure, physicians and diagnosticians should carefully consider the possibility of coinfections.

Keywords: *Ixodes ricinus*, *Babesia*, *Borrelia* LB, Lyme borreliosis, *Borrelia* RF, *B. miyamotoi* disease, babesiosis, tick-borne pathogens, coinfections.

3. Wykaz publikacji składających się na rozprawę doktorską

Podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej są przedstawione w porządku chronologicznym trzy prace obejmujące: dwa artykuły (A.1 i A.2) opublikowane w czasopismach z listy JCR o łącznym wskaźniku IF 7,634 oraz jeden manuskrypt (M. 1) przygotowany do wysłania do czasopisma.

A.1. Liberska J, Michalik J, Pers-Kamczyc E, Wierzbicka A, Lane RS, Rączka G, Opalińska P, Skorupski M, Dabert M. 2021. Prevalence of *Babesia canis* DNA in *Ixodes ricinus* ticks collected in forest and urban ecosystems in west-central Poland. Ticks and Tick-borne Diseases.12, 101786;

<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101786>

IF= 3,817, Q1, 91 perc., 100 pkt. MNiSW

A.2. Liberska J, Michalik J, Dabert M. 2023. Exposure of dogs and cats to *Borrelia miyamotoi* infected *Ixodes ricinus* ticks in urban areas of the city of Poznań, west-central Poland. Ticks and Tick-borne Diseases, 14(102188).

<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102188>

IF= 3,817, Q1, 91 perc., 100 pkt. MNiSW

M.1. Liberska J, Michalik J, Olechnowicz J, Dabert M. Co-occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* spp. DNA in *Ixodes ricinus* ticks collected from vegetation and pets in the city of Poznań, Poland. 2024.

<https://www.preprints.org/manuscript/202403.0023/v1>

Manuskrypt przygotowany do wysłania do czasopisma Pathogens, IF= 4,531, Q2, 74 perc., 100 pkt. MNiSW

4. Wprowadzenie i główne cele rozprawy doktorskiej

Około 75% nowo pojawiających się patogenów (ang. *new emerging pathogens*) ma pochodzenie odzwierzęce (zoonotyczne), a około 60% wszystkich czynników zakaźnych będących przyczyną chorób człowieka, jest związana ze zwierzętami. Aktualnie zoonozy stanowią największe globalne zagrożenie dla zdrowia publicznego (Bueno-Marí i wsp., 2015). Rolnictwo, hodowla zwierząt, globalny handel i turystyka, masowe migracje oraz urbanizacja tworzą niespotykane wcześniej możliwości dla transmisji patogenów odkleszczowych (ang. TBPs, *tick-borne pathogens*,) i ich wektorów na obszary, w których dotychczas nie występowały. Ryzyko nabycia chorób odkleszczowych (ang. *tick-borne disease*) jest możliwe także w aglomeracjach miejskich. Dlatego badania dotyczące rozpowszechnienia TBPs zakażających populacje kleszczy w miastach są konieczne dla identyfikacji czynników warunkujących istnienie endemicznych ognisk tych chorób. Na ich potrzebę wskazują szacunki the World Bank, według których około 56% światowej ludzkiej populacji żyje obecnie w miastach, a w wyniku urbanizacji do 2050 r wskaźnik ten może osiągnąć 70% (<https://www.worldbank.org/en/topic/urbandevelopment>).

Obszary w obrębie miast, to wysoce rozdrobnione ekosystemy różniące się sposobem użytkowania oraz zwykle zubożoną florą i fauną. Istotnym elementem krajobrazu miejskiego są tereny zielone tj. parki miejskie, bulwary, zieleńce, cmentarze, ogrody botaniczne i prywatne oraz lasy komunalne. Stwarzają one korzystne warunki dla lokalnych populacji kleszczy oraz zwierząt będących ich żywicielami (Rizzoli i wsp., 2014). Ważną rolę w układzie żywiciel-kleszcz-patogen stanowią licznie reprezentowane na obszarach miejskich psy i koty (Uspensky 2014). W rezultacie tereny, w których obecne są kleszcze w połączeniu z wysokim zagęszczeniem ludzi oraz psów i kotów, tworzą specyficzne warunki dla transmisji TBPs. Wiedza na temat enzoptycznych cykli determinujących krążenie tych patogenów w miastach pozostaje nadal niekompletna (Rizzoli i wsp., 2014; Noden i wsp., 2022).

Wśród ponad 980 gatunków kleszczy (Ixodida), około 10% uczestniczy w przenoszeniu czynników zakaźnych stanowiących zagrożenie dla człowieka i zwierząt domowych (Dantas-Torres i Otranto, 2022; Guglielmone i wsp., 2023). Po komarach, stanowią drugą najważniejszą grupę hematofagicznych stawonogów będących wektorami zoonoz transmisyjnych i w szczególności odpowiadają za szerzenie większości z nich w strefie klimatu umiarkowanego Ameryki Północnej, Europy i Azji. Kleszczom przypisuje się także kluczową rolę wektora chorób zwierząt gospodarskich (Bueno-Marí i wsp., 2015). Ponadto, w porównaniu do

komarów, spektrum przenoszonych TBPów jest bardziej różnorodne i obejmuje wirusy, bakterie, protisty, grzyby i nicienie (Rochlin i Toledo, 2020).

Kleszcz pospolity, *Ixodes ricinus*, to najważniejszy i najbardziej rozpowszechniony wektor TBPów w Europie (Rizzoli i wsp., 2014). Jest gatunkiem poza-gniazdowo-norowym, niespecyficznym żywicielsko pasożytującym na blisko 300 gatunkach lądowych kręgowców (ssaków, ptaków i gadów) (Gern i Humair, 2002). Kleszcze ulegają zakażeniu patogenami podczas pobierania krwi od gatunków rezerwuarowych pełniących rolę naturalnego źródła infekcji. Człowieka atakują nimfy i samice, stąd w epidemiologii chorób odkleszczowych tylko te dwa stadia są zagrożeniem dla ludzi i zwierząt domowych (Kahl i Gray, 2023).

Spośród chorobotwórczych gatunków bakterii wektorowanych przez *I. ricinus*, najważniejszą grupę stanowią krętki z kompleksu *Borrelia burgdorferi* s.l. będące przyczyną boreliozy z Lyme (LB). Jest to najczęstsza zoonoza odkleszczowa na półkuli północnej. Aktualnie kompleks ten nazwany także grupą LB (*Lyme borreliosis group*), obejmuje co najmniej 24 gatunki, z których 14 wykryto u *I. ricinus*, a sześć (*B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *B. spielmanii*, *B. bavariensis* i *B. bissettae*) uważa się za patogenne dla człowieka (Steinbrink i wsp., 2022; Wodecka i Kolomiiets, 2023). W Europie corocznie zgłaszanych jest ponad 230 000 przypadków LB i większość spowodowana jest przez *B. afzelii* i *B. garinii*. (Mendoza-Roldan i wsp. 2019). W Polsce w 2019 roku odnotowano ponad 20 000 zachorowań (Czarkowski i wsp., 2021). Na boreliozę chorują także psy. Rozwija się ona najczęściej w postaci artretycznej, ze stanem zapalnym kończyn, zwłaszcza stawów nadgarstkowych lub stępowych, z powiększeniem węzłów chłonnych i może prowadzić do kulawizny (Jankauskaitė i wsp. 2023). U starszych psów pojawiają się dysfunkcje neurologiczne (Skotarczak, 2002). Zapadalność na boreliozę ludzi i psów zależy od odsetka zakażonych kleszczy, dlatego dane te stanowią podstawowy wskaźnik do oszacowania ryzyka nabycia tej choroby. Także badania serologiczne psów są pomocne dla oceny sytuacji epidemiologicznej (Hovius i wsp., 2000).

Borrelia miyamotoi to przedstawiciel krętków z grupy gorączek powrotnych (ang. RFGB, *Relapsing fever group Borrelia*), powodujących, nawracające zwykle po tygodniu remisji, epizody gorączkowe trwające do 3 dni. Podczas tych ataków występuje wysoka gorączka do 39°C, bóle głowy, mięśni i stawów. Wektorami krętków RFGB są głównie kleszcze miękkie (Argasidae) (Schwan i Piesman, 2002), stąd te gatunki notowane są w regionach tropikalnych i subtropikalnych. *Borrelia miyamotoi* to jedyny przedstawiciel

RFGB, który podobnie jak gatunki z grupy LB, jest związany z kleszczami twardymi (Ixodidae) z rodzaju *Ixodes*; w Europie z *I. ricinus*. Obecnie znane są trzy genotypy występujące w Ameryce Północnej, Europie oraz Azji, które powodują chorobę (boreliozę) miyamotoi (ang. BMD, *B. miyamotoi disease*) (Siński i wsp., 2016). Dotychczas zdiagnozowano ją u ponad 560 pacjentów, w tym ponad 60 przypadków pochodzi z Europy (Cleveland i wsp., 2023). W Polsce opisano jeden przypadek u pacjenta z objawami neuroboreliozy ocznej (Fiecek i wsp., 2019). U ponad 10% chorujących obserwuje się od dwóch do trzech epizodów gorączki dochodzącej nawet do 40°C i nieswoiste objawy grypopodobne (Siński i wsp., 2016; Cleveland i wsp., 2023). W przypadku psów i kotów, częstość zakażeń i patogeniczność tego krętka pozostają nieznane.

Protisty z rodzaju *Babesia* to pasożyty erytrocytów kręgowców, które należą do rzędu Piroplasmida i typu Apicomplexa. Rodzaje *Babesia* i *Theileria* nazwano „piroplazmami” ze względu na gruszkowatą morfologię pasożyta (ang. *pear shaped*) namnażającego się w erytrocytach (Uilenberg, 2006). Dotychczas opisano ponad 100 gatunków *Babesia*, a wśród nich chorobotwórcze dla ludzi i psów, które wywołują babeszjozę z objawami gorączki i anemii podobnymi do malarii (Beugnet i Moreau, 2015). *Ixodes ricinus* uczestniczy w transmisji *Ba. divergens*, *Ba. microti*, *Ba. venatorum*, *Ba. capreoli*, z których trzy pierwsze gatunki powodują babeszjozę u ludzi (Gray i wsp., 2010; Bajer i Dwużnik-Szarek, 2021). W Europie udokumentowano ponad 60 przypadków tej choroby, z których większość wywołana była przez *Ba. divergens*. Pięć przypadków przypisano *Ba. venatorum*, a kolejne jedenaście *Ba. microti* (Hildebrandt i wsp., 2021). Zakażenie zwykle przebiega bezobjawowo, jednak może wystąpić zmęczenie, gorączka, bóle głowy, mięśni, stawów, nudności, kaszel (Krause i wsp., 1991). U pacjentów z obniżoną odpornością i chorobami współistniejącymi może rozwinąć się ciężka postać z niebezpiecznymi powikłaniami obejmującymi zespół ostrej niewydolności oddechowej, ARDS (ang. *acute respiratory distress syndrome*) (Krause, 2019).

Babesia canis to czynnik etiologiczny babeszjozy psów notowanej na obszarach Europy w strefie klimatu umiarkowanego, której wektorem jest kleszcz łąkowy, *Dermacentor reticulatus* (Beugnet i Moreau, 2015). Objawami są gorączka, apatia, anoreksja, błądliwość błon śluzowych, hemoglobinuria, żółtaczka, anemia hemolityczna (Solano-Gallego i wsp., 2016). Chorobę tę mogą powodować dwa typy szczepów *Ba. canis*: typ A wywołujący łagodniejszą postać i typ B o większej patogeniczności (Adaszek and Winiarczyk, 2008).

Ixodes ricinus to gatunek trójżywieliowy i dlatego w rozwoju osobniczym jest eksponowany trzykrotnie (jako larwa, nimfa i samica) na zakażenie się jednym lub kilkoma

patogenami od gatunku rezerwuarowego, który może być równocześnie źródłem kilku patogenów. W konsekwencji mieszane infekcje kleszczy uprawdopodobniają wspólną transmisję patogenów do organizmu człowieka lub zwierząt domowych. Badania pokazują, że infekcje dwoma lub więcej patogenami u kleszczy i ich żywicieli występują częściej niż sądzono (Moutailler i wsp., 2016). Modyfikują one objawy kliniczne, przebieg i nasilenie choroby odkleszczowej u ludzi w porównaniu z chorobą spowodowaną pojedynczą infekcją (Jahfari i wsp., 2016, Dunaj i wsp., 2018; Cutler i wsp., 2020). Istnieją doniesienia, że bakterie *B. burgdorferi* s.l. i *Ba. microti* często występują w koinfekcjach przenoszonych przez kleszcze z kompleksu *I. ricinus* (Scott i Scott, 2018). Ich współwystępowanie może oddziaływać synergistycznie i wspierać ekspansję *Ba. microti* w lokalnych cyklach enzootycznych, zwiększając poziom zakażeń wśród kleszczy i ich żywicieli (Dunn i wsp., 2014; Diuk-Wasser i wsp., 2016). Pacjenci zakażeni przez oba patogeny cierpią na bardziej zróżnicowane i dłużej utrzymujące się objawy (Krause i wsp., 1996; Martínez-Balzano i wsp., 2015). Występowanie takich koinfekcji potwierdzono także u pacjentów w Polsce (Jabłońska i wsp., 2016; Pańczuk i wsp., 2016). Dlatego badania uwzględniające współwystępowanie gatunków z rodzajów *Borrelia* i *Babesia* w populacjach kleszczy są istotne dla rozpoznania sytuacji epidemiologicznej i mogą być pomocne dla lekarzy i diagnostów na etapie rozpoznawania i leczenia pacjentów z symptomami gorączki po kontakcie z kleszczem.

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej była analiza poziomu zakażeń spowodowanych bakteriami z rodzaju *Borrelia* i protistami z rodzaju *Babesia* w populacjach kleszczy *Ixodes ricinus* występujących w warunkach ekosystemów miejskich na przykładzie miasta Poznania.

W szczególności wyznaczono następujące cele:

1. określenie częstości występowania gatunków z rodzaju *Babesia*,
2. określenie częstości występowania krętków *Borrelia miyamotoi* z grupy gorączek powrotnych (RFGB),
3. określenie częstości występowania krętków *Borrelia burgdorferi* s.l. z grupy boreliozy z Lyme (LB),
4. określenie częstości współwystępowania gatunków z rodzajów *Babesia* oraz *Borrelia* z grupy LB.

Materiał do badań stanowiły dwie grupy kleszczy: **(i)** kleszcze z roślinności będące w fazie niepasżytniczej (n=1059) oraz **(ii)** w fazie pasożytniczej żerujące na psach i kotach (n=1268). Pierwszą grupę zebrałam z roślinności metodą flagowania na pięciu stanowiskach wykorzystywanych przez mieszkańców Poznania dla celów rekreacji wypoczynku (tabela 1). Zbiór przeprowadzałam od maja do września 2017 r. i w kwietniu 2018 r. Drugą grupę kleszczy zbierałam w trakcie trzyletniej współpracy (od kwietnia do października 2015 r., od marca do listopada 2016 r. oraz od marca do września 2017 r.) z lekarzami z 17 lecznic weterynaryjnych w Poznaniu. Łącznie ze zwierząt towarzyszących zebrałam 1268 samic kleszczy *I. ricinus* w różnym stanie opicia krwią, w tym 711 od 609 psów, 153 od 117 kotów oraz 404 od 389 czworonogów, które potraktowano łącznie bez podziału na psy i koty (Tabela 2). Kleszcze przechowywałam w 96% etanolu. Ich identyfikację gatunkową przeprowadzałam za pomocą metod morfologicznych, przy użyciu klucza do oznaczania gatunków kleszczy (Siuda, 1993). W przypadku stadiów młodocianych przynależność gatunkową potwierdzałam metodami molekularnymi, opartymi na amplifikacji i sekwencjonowaniu fragmentu genu podjednostki I oksydazy cytochromu *c* (COI).

Detekcję DNA krętków *Borrelia* przeprowadziłam poprzez amplifikację i sekwencjonowanie hiperzmiennego regionu V4 genu 16S rRNA (V4 16S). Szczegóły dotyczące starterów, konstrukcji biblioteki, sekwencjonowania następnej generacji (NGS) i analizy danych sekwencji zostały opisane w artykule A.2. Dodatkowo izolaty, w których zidentyfikowałam DNA *Borrelia* sp. na podstawie V4 16S oraz izolaty kleszczy ze zwierząt towarzyszących poddałam amplifikacji i sekwencjonowaniu wykorzystując fragment genu *flaB* przy użyciu dwóch par zestawów starterów 132f/905r i 220f/823r (Wodecka i wsp., 2010). Protokoły reakcji PCR i sekwencjonowania Sangera zawarłam w artykule A.2.

DNA *Babesia* spp. wykrywałam poprzez amplifikację i sekwencjonowanie fragmentu genu 18S rRNA przy użyciu nested PCR i sekwencjonowania Sangera lub poprzez sekwencjonowanie NGS tego samego docelowego DNA. Do zagnieżdżonej reakcji PCR użyłam zestawu starterów RIB-19/RIB-20; do pierwszego etapu amplifikacji (Zahler i wsp., 2000) oraz zestawu starterów P3/BabR3; do drugiego etapu amplifikacji (Li i wsp., 2013; Liberska i wsp., 2021). Sekwencje starterów i protokoły zagnieżdżonej reakcji PCR i sekwencjonowania Sangera opisałam w artykule A.1. Drugie podejście do wykrywania *Babesia* spp. DNA przeprowadziłam przy użyciu zestawu starterów P3/BabR3 połączonych z podwójnie indeksowanymi adapterami Ion Torrent w celu wygenerowania amplikonów

do sekwencjonowania NGS. Szczegóły dotyczące konstrukcji biblioteki, sekwencjonowania Ion Torrent i analizy danych sekwencji opisałam w artykule A.2.

Dokładność chromatogramów sekwencji Sangera sprawdzałam w programie GeneiousR11.1.5 (Biomatters Ltd.), kontigi składałam w programie do edycji sekwencji GeneDoc 2.7 (Nicholas i Nicholas, 1997). Warianty sekwencji amplikonu (ASV) i operacyjne jednostki taksonomiczne (OTU) uzyskane z danych NGS porównałam z dostępnymi w GenBank przy użyciu BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) i algorytmu megablast. Do określenia gatunków z rodzajów *Borrelia* i *Babesia* zastosowałam próg identyfikacji 99%, ponieważ określono je na podstawie sekwencji rDNA. Dla określenia gatunku kleszcza próg obniżyłam do 97% z racji na wewnątrzgatunkową zmienność markera COI.

Tabela 1. Wykaz 5 stanowisk będących miejscem wypoczynku i rekreacji na terenie miasta Poznania, z których metodą flagowania zebrano kleszcze *Ixodes ricinus* w okresie od maja do września 2017 r. i w kwietniu 2018 r.

Miejsce	Stadia				Łącznie
	Larwy	Nimfy	Samice	Samce	
1. Kampus UAM Morasko	0	17	15	9	41
2. Jezioro Rusalka*	1	313	170	153	637
3. Sołacki Park	13	17	15	14	59
4. Cytadela Park	0	4	24	41	69
5. Jezioro Maltańskie*	16	109	65	63	253
Łącznie	30	460	289	280	1059

*zadrzewione i zalesione tereny w sąsiedztwie obu sztucznych zbiorników wodnych.

Tabela 2. *Samice *Ixodes ricinus* zebrane ze zwierząt towarzyszących w 17 lecznicach weterynaryjnych w Poznaniu między IV - X 2015 r., III - XI 2016 r. oraz III - IX 2017 r.

Zwierzęta	Psy (n= 609)	Koty (n=117)	Nieokreślone (n=389)	Suma (n=1115)
Kleszcze	711	153	404	1268

* w publikacji A.2, opisano wyniki dotyczące 837 kleszczy zebranych z psów lub kotów; do manuskryptu M.1, dodatkowo włączono kleszcze pozbawione dokładnej informacji czy pochodziły od psów lub kotów

5. Rezultaty i wnioski rozprawy doktorskiej

5.1. Występowanie gatunków z rodzaju *Babesia*

W artykule A.1 badałam na obecność *Babesia canis*, kleszcze zebrane w dwóch odmiennych ekosystemach: (i) leśnym i (ii) miejskim. Pierwszą grupę kleszczy zebrano z 6 osób ubranych w kombinezony pszczelarskie, uczestniczących w eksperymencie mającym określić zachowania ludzi nasilające ekspozycję na kleszcze podczas pobytu w lasach. Eksperyment przeprowadzono na dwóch stanowiskach w drzewostanach mieszanych na terenie Wielkopolski (szczegóły: Wierzbicka i wsp., 2016). Grupę „miejskich kleszczy” zebrałam z pięciu terenów rekreacyjnych miasta Poznania (Tabela 1). Wśród „leśnych kleszczy” zakażenie *Ba. canis* wyniosło 10,2%. Odsetek zakażeń był podobny na obu stanowiskach (zakres od 9,9% do 12,5%). Najwyższy poziom infekcji sięgający 13% stwierdziłam u larw. W miejskich populacjach *I. ricinus*, frekwencja zakażeń okazała się czterokrotnie niższa i wyniosła 2,5%. Zakażenia były dwukrotnie częstsze u kleszczy dorosłych niż u nimf (3,3% vs. 1,5%). U trzech kleszczy wykryłam koinfekcję z *Ba. venatorum*, a u nimfy z *Ba. divergens* lub *Ba. capreoli* (oba gatunki mają tę samą sekwencję nukleotydów we fragmencie markerowym 18S rRNA). Analiza sekwencji 81 amplikonów ujawniła 20 wariantów genetycznych, które różniły się w jednej lub dwóch pozycjach nukleotydowych we fragmentach o długości 272 pz. Dominujący wariant stwierdzony u 74% (60/81) kleszczy wykazał 100% identyczności z izolatami *Ba. canis* zidentyfikowanymi u psów z Polski (np. KT844903). Analiza filogenetyczna wszystkie uzyskane sekwencje przyporządkowała do typu A (*Ba. canis* type A) grupującego szczepy powodujące łagodniejszą postać babeszjozy w porównaniu ze szczepami typu B (Adaszek i Winiarczyk, 2008). Ten szczep wykryto na północy Polski, jednak poziomy zakażeń *Ba. canis* były wielokrotnie niższe i wynosiły 0,2% u dorosłych (Cieniuch i wsp., 2009) oraz 0,4% u nimf i 1,0% u dorosłych *I. ricinus* (Stańczak i wsp., 2015).

Do tej pory wszystkie przypadki babeszjozy psów w Europie przypisuje się kleszczowi łąkowemu, *Dermacentor reticulatus*, którego uważa się za kompetentny wektor *Ba. canis* (Solano-Gallego i wsp., 2016). Dlatego w Polsce obszary uznane za endemiczne dla tej choroby są jednocześnie obszarami występowania tego kleszcza, który rozprzestrzenia zwykle bardziej wirulentne szczepy *Ba. canis* typ B (Adaszek i Winiarczyk, 2008; Łyp i wsp., 2016). Według Mierzejewskiej i wsp. (2015) częstość występowania tego patogenu *D. reticulatus* w regionach endemicznych północno-wschodniej i środkowej Polski waha się pomiędzy 2,3%

i 8%. Najwyższy odsetek zakażeń (21,3%) stwierdzono w południowo-wschodniej Polsce (Dzięgiel i wsp., 2014). Ostatnie badania potwierdziły istnienie rozproszonych stanowisk *D. reticulatus* na obszarze województwa wielkopolskiego, jednak jak dotąd u żadnego z kleszczy nie potwierdzono *Ba. canis* (Mierzejewska i wsp., 2015b; Opalińska i wsp., 2016). Udział *I. ricinus* w przenoszeniu *B. canis* wydaje się być zatem prawdopodobny, co sugeruje wykrycie sekwencji *Ba. canis* typ B u samicy *I. ricinus* żerującej na psie na Słowacji (Rehackova i wsp., 2016). *Ixodes ricinus* mógłby potencjalnie pełnić rolę alternatywnego wektora przynajmniej dla mniej wirulentnych szczepów typu A, zwłaszcza, że jest najczęściej stwierdzanym kleszczem na psach na zachodzie Polski (Król i wsp., 2016). Na możliwość takiej roli wskazują badania (Foldvari i Farkas, 2005), w których stwierdzono, że chociaż babeszjoza była częściej diagnozowana u psów infestowanych przez *D. reticulatus*, to zdiagnozowano ją także u zwierząt infestowanych wyłącznie przez *I. ricinus* (61% vs. 26%).

Podsumowując, praca dokumentuje najwyższy w Europie poziom zakażeń *Ba. canis* wśród *I. ricinus* (10,2%). Potwierdzenie *Ba. canis* u 13% larw z ekosystemów leśnych, wskazuje na kluczowe znaczenie transmisji transowarialnej (wertykalnej) tego gatunku. Ten transfer jest charakterystyczny dla przedstawicieli z grupy *Babesia* sensu stricto (klad X), do której należą także *Ba. divergens*, *Ba. venatorum* (Azagi i wsp., 2021). Wykrycie u „miejskich kleszczy” co najmniej dwukrotnie wyższego odsetka zakażeń u dorosłych osobników w porównaniu z nimfami (3,3% vs. 1,5%) wskazuje na transstadialny transfer tego pasożyta. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki sugerują możliwość funkcjonowania *I. ricinus* jako alternatywnego wektora *Ba. canis* na obszarach, gdzie *D. reticulatus* jest nieobecny lub rzadki. W konsekwencji psy mające regularny kontakt z *I. ricinus* mogą być ekspozowane na *Ba. canis*, co powinno być brane pod uwagę przez weterynarzy, zwłaszcza, że kleszcz pospolity nie jest łączony z psią babeszjozą. Ostateczne określenie statusu *I. ricinus* jako wektora *Ba. canis* wymaga badań eksperymentalnych.

W pracy M.1. przedstawiłam rezultaty dotyczące pozostałych wykrytych gatunków z rodzaju *Babesia*. Łącznie DNA *Babesia* spp. wykryłam u 4,4% kleszczy z roślinności (7,3% samic, 4,6% samców i 2,4% nimf). Zakażone kleszcze występowały na 4 z 5 stanowisk (zakres: 0,8% - 9,8%). Podobne poziomy zakażeń opisano w Trójmieście (4,5%) (Stańczak i wsp., 2015) oraz w parkach miejskich Warszawy (6,5%) (Sytykiewicz i wsp., 2012). W przypadku samic *I. ricinus* zebranych ze zwierząt u 6,0% okazów zidentyfikowałam DNA *Babesia* spp., przy czym kleszcze z psów były częściej zakażone niż z kotów (6,8% vs. 3,9%). Podobny odsetek zakażeń (4,7%) opisano u kleszczy z psów na Litwie (Namina i wsp., 2019). Najwyższe

frekwencje zakażonych kleszczy z psów (66,8%) i kotów (15,4%) pochodzą z południowej Polski (Asman i wsp., 2015). W obu grupach kleszczy stwierdziłam dwa gatunki chorobotwórcze dla człowieka: *Ba. microti* i *Ba. venatorum*, ponadto *Ba. canis*. *Babesia canis* i *Ba. microti* dominowały zarówno w kleszczach z roślinności (2,6% i 1,4%) jak i ze zwierząt (2,8% i 2,2%), natomiast *Ba. venatorum* była najrzadszym gatunkiem. Doniesienia o *Ba. canis* u *I. ricinus* pochodzą z północy Polski (zakres: 0,2% - 5,8%) (Stańczak i wsp., 2015; Kubiak i wsp., 2022) oraz z Wielkopolski, gdzie wykazałam najwyższy jak dotąd odsetek (10,2%) u „leśnych kleszczy” (od 9,9% do 12,5%) opisany w artykule A.1. Prewalencja *Ba. canis* w kleszczach z psów (3,2%) okazała się podobna do opisanej na Litwie (3,8%) (Namina i wsp., 2019). Wszystkie uzyskane sekwencje *Ba. canis* należały do typu A reprezentującego szczepy o mniejszej chorobotwórczości (Adaszek i Winiarczyk, 2008). Z kolei w przypadku *Ba. microti* uważanej za najbardziej rozpowszechniony gatunek w populacjach *I. ricinus* (Onyiche i wsp., 2021), sekwencje (n=42) były w 100% identyczne z genotypem "Jena/Germany" uważanym za patogenny dla ludzi. Ponadto sekwencje *Ba. venatorum* (n=17) wykazały 100% identyczność ze szczepami u pacjentów we Włoszech, Austrii (Herwaldt i wsp., 2003) i Polsce (Rozej-Bielicka i wsp., 2017).

5.2. Występowanie krętków *Borrelia miyamotoi* z grupy gorączek powrotnych (RFGB)

W artykule A.2. opublikowałam rezultaty dotyczące częstości zakażeń *Borrelia miyamotoi*, bakterii z grupy gorączek powrotnych (RFGB) wśród miejskich populacji kleszczy *I. ricinus*. Poza kleszczami z roślinności (Tab. 1) stanowiących bezpośrednie zagrożenie dla ludzi, badałam także kleszcze z psów i kotów celem oceny częstości ich ekspozycji na kontakt z zakażonymi kleszczami. Łącznie przebadalam 837 okazów *I. ricinus* (831 samic i 6 larw) pochodzących od 680 zwierząt (567 psów i 113 kotów). Dodatkowo pozyskałam 33 okazy *Ixodes hexagonus*, w tym 31 (1 larwa, 13 nimf i 17 samic) zebrane z 3 kotów oraz 1 larwę i 1 nimfę z 2 psów, ponadto 1 okaz samicy *Dermacentor reticulatus* z psa. Należy zauważyć, że w odróżnieniu od ludzi, nie istnieją żadne publikacje o zakażeniach/chorobie wśród tej grupy zwierząt. Jedyne doniesienie o wykryciu *B. miyamotoi* u dwóch kotów bez symptomów chorobowych pochodzi z USA (Shannon i wsp., 2017). Może to oznaczać, że zwierzęta towarzyszące są odporne i nie dochodzi u nich do rozwoju spirochetami (pojawienia się krętków we krwi) typowej dla *B. miyamotoi*. W Europie, brak danych o występowaniu zakażeń

B. miyamotoi u psów i kotów może wynikać z nieuwzględnienia tego gatunku na etapie diagnozowania chorób odkleszczowych przez weterynarzy.

DNA *B. miyamotoi* wykryłam u 2,1% kleszczy zebranych z roślinności. Zakażone kleszcze występowały na wszystkich pięciu stanowiskach (zakres: 1,4% - 2,4%). Obecność patogenu wykazałam także we wszystkich stadiach rozwojowych, przy czym zakażenia były ponad dwukrotnie częstsze u nimf niż u postaci dorosłych (2,8% vs. 1,2%), a najczęstsze u larw (6,7%). Spośród 22 zakażonych kleszczy 27,3% wykazało koinfekcję z *B. burgdorferi* s.l., czyli łącznie, współwystępowanie obu patogenów dotyczyło 0,6% wszystkich kleszczy. W Słowacji 24% kleszczy *I. ricinus* zakażonych *B. miyamotoi* było w koinfekcji z *B. burgdorferi* s.l. (Hamsikova i wsp., 2017). W przypadku kleszczy *I. ricinus* ze zwierząt zakażenie *B. miyamotoi* wyniosło 1,8% i występowało wyłącznie u samic. Zakażone kleszcze infestowały 2,2% zwierząt (13 psów i 2 koty). Patogen wykryłam także u 9,1% kleszczy *I. hexagonus* (1 samica i 2 nimfy), natomiast nie potwierdziłam go u samicy *D. reticulatus*.

Analiza sekwencji (253 pz) regionu V4 genu 16S rRNA (V4 16S), wykrytych w zakażonych kleszczach z roślinności wykazała obecność dwóch typów. Typ 1 dominował (95%; 21/22) i był w 100% identyczny z wariantem *B. miyamotoi* wykrytym w jajach *I. ricinus* na terenie Czech (GenBank CP046389). Typ 2 wystąpił tylko u jednej larwy. Z kolei sekwencje genu *flaB* wykryte w kleszczach ze zwierząt wykazały 100% identyczność z izolatami opisanymi u *I. ricinus* żerujących na sarnie w Polsce (np., GenBank FJ874925).

Spośród uzyskanych wyników na szczególną uwagę zasługuje wykrycie zakażonych kleszczy na wszystkich 5 stanowiskach, co potwierdza istnienie aktywnych enzootycznych cykli *B. miyamotoi* w miejskich populacjach *I. ricinus* w Poznaniu. Łączny odsetek zakażeń (2,1%) jest zbliżony do wartości odnotowanych w miejskich ekosystemach w Holandii (2,5%), Niemczech (2,1%) czy Litwie (1,1%) (Wagemakers i wsp., 2017; Blazejak i wsp., 2018; Capligina i wsp., 2020). Na uwagę zasługuje wykrycie infekcji u 6,7% larw, co potwierdza transowarialny transfer tego patogenu. Dlatego, chociaż larwy *I. ricinus* stwierdza się zaledwie u 1,2-4,2% zaatakowanych ludzi (Duplaix i wsp., 2021), mogą one stanowić potencjalne zagrożenie infekcją *B. miyamotoi* dla człowieka. Brak różnic w poziomie zakażeń wykrytych w obu grupach kleszczy (2,1% i 1,8%), sugeruje, że systematyczny monitoring miejskich psów i kotów pod kątem obecności *B. miyamotoi* w żerujących kleszczach, może być również wykorzystany dla oceny ryzyka nabycia tych krętków przez człowieka. Z kolei, obecność zakażonych samic *I. ricinus* u 2,2% (15/680) zwierząt badanych w okresie 3 lat

sugeruje, że ryzyko ekspozycji na tę bakterię jest stosunkowo niskie, co jednak nie powinno być argumentem dla nieuwzględniania przez weterynarzy możliwości wystąpienia infekcji *B. miyamotoi*. W tym kontekście przyszłe badania powinny być rozszerzone także na dzikie gatunki zwierząt drapieżnych, których rola pozostaje nieznana.

5.3. Występowanie krętków *Borrelia burgdorferi* s.l. z grupy boreliozy z Lyme (LB)

W pracy M1. analizowałam występowanie krętków z kompleksu *B. burgdorferi* s.l. oraz protistów z rodzaju *Babesia* w populacjach kleszczy *I. ricinus* wraz z ich identyfikacją gatunkową oraz oszacowaniem frekwencji współwystępowania w postaci koinfekcji. Wyniki dotyczące występowania pojedynczych infekcji *Babesia* spp. opisałam w podrozdziale 5.1. Poza kleszczami z roślinności – grupa I (Tab. 1) badałam osobniki z psów i kotów – grupa II, do których dodatkowo włączyłam 404 kleszcze bez danych o ich żywicielach (Tab. 2).

Ogółem DNA *B. burgdorferi* s.l. wykryłam u 8,7% kleszczy z roślinności (11,8% samic, 9,6% samców oraz 6,3% nimf), które występowały na 4 z 5 stanowisk (zakres: 3% - 40,3%). W Europie, średni poziom zakażeń *B. burgdorferi* s.l. u *I. ricinus* z terenów zieleni miejskiej wynosi 17,3% (zakres: 3,1% - 38,1%) (Hansford i wsp., 2022). W Polsce zbliżone wartości notowano w parkach Warszawy (10,9%) i Trójmiasta (12,4%) (Kowalec i wsp., 2017; Stańczak i wsp., 2004), a najwyższą wartość (27,4%) w Białymstoku (Grochowska i wsp., 2021). U kleszczy ze zwierząt stwierdziłam blisko dwukrotnie niższy procent infekcji (4,7% vs. 8,7%). Był on zbliżony do wartości opisanych w Holandii (4,8%) i Austrii (5,2%) (Leschnik i wsp., 2012; Kooyman i wsp., 2022). W Polsce wielokrotnie wyższe odsetki zakażeń u *I. ricinus* z psów notowano we Wrocławiu (21,7%) oraz Olsztynie (34,4%) (Król i wsp., 2015; Michalski i wsp., 2020). W obu grupach wykryłam gatunki należące do krętków powodujących LB: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana*, a u kleszczy z grupy II dodatkowo *B. spielmanii*. Dwa pierwsze gatunki przeważały w grupie I (3,7% i 3,7%), jak i II (3,7% i 0,6%), co potwierdza ich dominującą pozycję wśród gatunków z kompleksu *B. burgdorferi* s.l. występujących w populacjach *I. ricinus* (Strnad i wsp., 2017) oraz u psów z objawami boreliozy w Europie (Skotarczak, 2018).

5.4. Współwystępowanie gatunków z rodzajów *Babesia* oraz *Borrelia* z grupy LB

Łącznie, spośród 120 kleszczy, u których stwierdziłam DNA *Babesia* spp. prawie 20% było równocześnie zakażone *B. burgdorferi* s.l. Poziomy koinfekcji były podobne w obu grupach kleszczy (1,1% - grupa I oraz 1,0% - grupa II). W Polsce współzakażenia tymi patogenami u kleszczy wahają się w przedziale 0,3% - 2,8% (Stańczak i wsp., 2004; Grochowska i wsp., 2022). *Babesia canis* dominowała w koinfekcjach (72,7%; 8/11), występując z *B. afzelii* lub *B. garinii*, natomiast w kleszczach ze zwierząt, przeważała *Ba. microti* (92,3%; 12/13) głównie z *B. afzelii*.

Za istotne osiągnięcie pracy M.1 uważam wykazanie, że w koinfekcjach występowały patogenne dla ludzi sekwencje protistów *Ba. microti* i *Ba. venatorum* wespół z krętkami *B. afzelii* i *B. garinii* powodującymi LB. Informacje o takich podwójnych infekcjach obecnych w kleszczach mają istotne znaczenie dla epidemiologii obu jednostek chorobowych, ponieważ mogą one modyfikować ich symptomy kliniczne, przebieg oraz czasokres leczenia. Na podkreślenie zasługuje stwierdzenie zakażeń *Ba. canis* w kleszczach z psów (3,2%) i z roślinności (2,6%), co należy uznać za kolejną sugestię o potencjalnej roli *I. ricinus* jako alternatywnego wektora dla tego gatunku i związane z nim ryzyko nabycia babeszjozy przez psy na terenach miast, gdzie *D. reticulatus* jest rzadki lub nieobecny.

Wnioski

1. Populacje kleszczy *Ixodes ricinus* występujące na terenach rekreacyjnych Poznania uczestniczą jako wektory w transmisji *Borrelia miyamotoi* z grupy gorączek powrotnych, 5 gatunków krętków z grupy LB oraz co najmniej 2 gatunków protistów z rodzaju *Babesia*. Wykrycie tych zakażeń na większości badanych stanowisk oraz dodatkowo u kleszczy ze zwierząt towarzyszących, dowodzi istnienia aktywnych enzootycznych cykli trzymujących krążenie tych patogenów w warunkach miejskich.
2. Wyraźna dominacja *Babesia canis* (61%) w obu grupach kleszczy, u których wykryto DNA *Babesia* spp, uprawdopodobnia funkcjonowanie *I. ricinus* jako alternatywnego wektora na obszarze środkowo-zachodniej Polski, gdzie biologiczny wektor, *Dermacentor reticulatus* jest nieobecny lub występuje w rozproszeniu. Wykrycie wyłącznie sekwencji mniej wirulentnych szczepów typu A, sugeruje możliwość ich

powiązań z *I. ricinus*, który infestuje psy w zachodniej Polsce. W rezultacie psy mające regularny kontakt z tym kleszczem mogą być ekspozowane na warianty *Ba. canis* powodujące łagodniejszą postać babeszjozy, co powinno być wzięte pod rozwagę przez weterynarzy, zwłaszcza że kleszcz pospolity nie jest łączony z tą chorobą.

3. Pomimo stosunkowo niskich poziomów zakażeń *Ba. microti* i *Ba. venatorum* u przebadanych kleszczy (1,8% i 0,7%), wykrycie sekwencji identycznych z wariantami występującymi u pacjentów z objawami babeszjozy wskazuje, że na terenach rekreacyjnych w obrębie miast istnieje potencjalnie ryzyko nabycia tej choroby.
4. Brak różnic w poziomie zakażeń *B. miyamotoi* w obu grupach kleszczy (2,1% i 1,8%), sugeruje, że monitoring miejskich psów i kotów pod kątem obecności tego krętka w żerujących kleszczach, mógłby być wykorzystany dla oszacowania ryzyka nabycia boreliozy miyamotoi. Obecność *B. miyamotoi* u żerujących *I. ricinus* (2,2%) w ciągu 3 lat badań, pokazuje, że ryzyko ekspozycji jest niskie. Brak opisanych przypadków tej choroby u psów i kotów, nie wyklucza możliwości wystąpienia infekcji *B. miyamotoi*, dlatego zwierzęta te powinny być objęte poszerzoną diagnostyką przez weterynarzy zwłaszcza w przypadku zwierząt z symptomami gorączki po kontakcie z *I. ricinus*.
5. Wykrycie koinfekcji *Borrelia* spp. i *Babesia* spp. tylko u 1% (24/2297) kleszczy pokazuje, że są one stosunkowo rzadkie w miejskich populacjach *I. ricinus*. Dominacja dwóch patogennych gatunków krętków: *B. afzelii* i *B. garinii* w koinfekcjach z potencjalnie chorobotwórczymi szczepami *Ba. microti* i *Ba. venatorum* wskazuje na możliwość równoczesnego zakażenia i rozwoju obu chorób odkleszczowych. Dlatego lekarze i diagnosty w rejonach, gdzie wykrywano takie mieszane infekcje u *I. ricinus*, powinni brać pod uwagę ich modyfikujący wpływ na objawy kliniczne, przebieg i leczenie takich podwójnych zakażeń u pacjentów.

6. Literatura

- Adaszek, Ł., Winiarczyk, S., 2008. Molecular characterization of *Babesia canis canis* isolates from naturally infected dogs in Poland. *Vet. Parasitol.* 152, 235–241.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.024>
- Asman M., Solarz K., Cuber P., Gąsior T., Szilman P., Szilman E., Tondaś E., Matzullok A., Kusion N., Florek K., 2015. Detection of protozoans *Babesia microti* and *Toxoplasma gondii* and their co-existence in ticks (Acari: Ixodida) collected in Tarnogórski district (Upper Silesia, Poland). *Ann Agric Environ.* 22, 80–83.
<https://doi.org/10.5604/12321966.1141373>
- Azagi, T., Jaarsma, R.I., Docters van Leeuwen, A., Fonville, M., Maas, M., Franssen, F.F., Kik, M., Rijks, J.M., Montizaan, M.G., Groenevelt, M., Hoyer, M., 2021. Circulation of *Babesia* species and their exposure to humans through *Ixodes ricinus*. *Pathogens*, 10, 386. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040386>
- Bajer, A., Dwużnik-Szarek, D., 2021. The specificity of *Babesia*-tick vector interactions: Recent advances and pitfalls in molecular and field studies. *Parasites & Vectors*, 14, 1-16. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05019-3>
- Beugnet, F., Moreau, Y., 2015. *Babesiosis*. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 34, 627-639. <https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2385>
- Blazejak, K., Raulf, M.K., Janecek, E., Jordan, D., Fingerle, V., Strube, C., 2018. Shifts in *Borrelia burgdorferi* (s.l) genospecies infections in *Ixodes ricinus* over a 10-year surveillance period in the city of Hanover (Germany) and *Borrelia miyamotoi*-specific Reverse Line Blot detection. *Parasites & vectors*, 11, 1-10.
<https://doi.org/10.1186/s13071-018-2882-9>
- Bueno-Marí, R., Almeida, A.P.G., Navarro, J.C., 2015. Emerging zoonoses: eco-epidemiology, involved mechanisms, and public health implications. *Frontiers in public health*, 3, 157. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2015.00157>
- Capligina, V., Seleznova, M., Akopjana, S., Freimane, L., Lazovska, M., Krumins, R., Kivrane, A., Namina, A., Aleinikova, D., Kimsis, J., Kazarina, A., 2020. Large-scale countrywide screening for tick-borne pathogens in field-collected ticks in Latvia during 2017–2019. *Parasites & Vectors*, 13, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04219-7>
- Cieniuch, S., Stańczak, J., Ruczaj, A., 2009. The first detection of *Babesia* EU1 and *Babesia canis canis* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) collected in urban and rural areas in northern Poland. *Pol J Microbiol*, 58, 231-236.

- Cleveland, D.W., Anderson, C.C., Brissette, C.A. 2023. *Borrelia miyamotoi*: A Comprehensive Review. Pathogens, 12, 267. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020267>
- Cutler, S.J., Vayssier-Taussat, M., Estrada-Peña, A., Potkonjak, A., Mihalca, A.D., Zeller, H., 2021. Tick-borne diseases and co-infection: Current considerations. Ticks and tick-borne diseases, 12, 101607. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101607>
- Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2022. Vector-borne zoonoses. W Zoonoses: Infections Affecting Humans and Animals (pp. 1-15). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85877-3_27-1
- Diuk-Wasser, M.A., Vannier, E., Krause, P.J. 2016. Coinfection by *Ixodes* tick-borne pathogens: ecological, epidemiological, and clinical consequences. Trends Parasitol. 32, 30-42. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.09.008>
- Dunaj, J., Moniuszko-Malinowska, A., Swiecicka, I., Andersson, M., Czupryna, P., Rutkowski, K., Zambrowski, G., Zajkowska, J., Grygorczuk, S., Kondrusik, M., Świerzbńska, R., 2018. Tick-borne infections and co-infections in patients with non-specific symptoms in Poland. Advances in Medical Sciences, 63, 167-172. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.09.004>
- Dunn, J. M., Krause, P. J., Davis, S., Vannier, E. G., Fitzpatrick, M. C., Rollend, L., Belperron, A. A., States, S. L., Stacey, A., Bockenstedt, L. K., Fish, D., 2014. *Borrelia burgdorferi* promotes the establishment of *Babesia microti* in the northeastern United States. PLoS One, 9, 115494. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115494>
- Duplax, L., Wagner, V., Gasmi, S., Lindsay, L.R., Dibernardo, A., Thivierge, K., Fernandez-Prada, C., Arsenault, J., 2021. Exposure to tick-borne pathogens in cats and dogs infested with *Ixodes scapularis* in Quebec: an 8-year surveillance study. Frontiers in Veterinary Science, 8, 696815. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.696815>
- Dzięgiel, B., Kubrak, T., Adaszek, Ł., Dębiak, P., Wyłupek, D., Bogucka-Kocka, A., Lechowski, J., Winiarczyk, S., 2014. Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Anaplasma phagocytophilum* in hard ticks collected from meadows of Lubelskie Voivodship (eastern Poland). Journal of Veterinary Research, 58, 29-33. <https://doi.org/10.2478/bvip-2014-0005>
- Fiecek B., Lewandowska G., Roguska U., Rozej-Bielicka W., Tylewska-Wierzbanowska S., Chmielewski T., 2019. *Borrelia miyamotoi* DNA in a patient suspected of Lyme borreliosis. Research Square, <https://doi.org/10.21203/rs.2.15315/v2>

- Földvári, G., Farkas, R., 2005. Ixodid tick species attaching to dogs in Hungary. *Veterinary Parasitology*, 129, 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.032>
- Gern, L., Humair, P.F., 2002. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. W: Gray, J.S., Kahl, O., Lane, R.S., Stanek, G. (Eds.), *Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 141–174. <https://doi.org/10.1079/9780851996325.0000>
- Gray, J., Zintl, A., Hildebrandt, A., Hunfeld, K.P., Weiss, L., 2010. Zoonotic babesiosis: Overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 1, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2009.11.003>
- Grochowska, A., Dunaj, J., Pancewicz, S., Czupryna, P., Majewski, P., Wondim, M., Tryniszewska, E., Moniuszko-Malinowska, A., 2021. Detection of *Borrelia burgdorferi* sl, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* spp. in *Dermacentor reticulatus* ticks found within the city of Białystok, Poland—first data. *Experimental and Applied Acarology*, 85, 63-73. <https://doi.org/10.1007/s10493-021-00655-x>.
- Grochowska A, Dunaj-Małyszko J, Pancewicz S, Czupryna, P., Milewski, R., Majewski, P., Moniuszko-Malinowska, A., 2022. Prevalence of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks collected from recreational areas in northeastern Poland with analysis of environmental factors. *Pathogens*, 11, 468. <https://doi.org/10.3390/pathogens11040468>.
- Guglielmone, A.A., Nava, S., Robbins, R.G., 2023. Geographic distribution of the hard ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae) of the world by countries and territories. *Zootaxa*, 5251, 1-274. <https://doi.org/10.11646/ZOOTAXA.5251.1.1>.
- Hamšíková, Z., Coipan, C., Mahríková, L., Minichová, L., Sprong, H., Kazimírová, M., 2017. *Borrelia miyamotoi* and co-infection with *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks and rodents from Slovakia. *Microbial ecology*, 73, 1000-1008. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0918-2>.
- Hansford, K.M., Wheeler, B.W., Tschirren, B., Medlock, J.M, 2022. Questing *Ixodes ricinus* ticks and *Borrelia* spp. in urban green space across Europe: A review. *Zoonoses Public Health*, 69, 153–166. <https://doi.org/10.1111/zph.12913>.
- Herwaldt, B.L.; Cacció, S.; Gherlinzoni, F.; Aspöck, H.; Slemenda, S.B.; Piccaluga, P.; Martinelli, G.; Edelhofer, R.; Hollenstein, U.; Poletti, G.; Pampiglione, S., Löschenberger, K., Tura, S., Pieniazek, N.J., 2003. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 942–948. <https://doi.org/10.3201/eid0908.020748>.

- Hildebrandt, A., Zintl, A., Montero, E., Hunfeld, K.P., Gray, J., 2021. Human babesiosis in Europe. *Pathogens*, 10, 1165. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091165>.
- Hovius, J.W., Hovius, K.E., Oei, A., Houwers, D.J. and van Dam, A.P., 2000. Antibodies against specific proteins of and immobilizing activity against three strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato can be found in symptomatic but not in infected asymptomatic dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2611-2621. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.7.2611-2621.2000>.
- Jabłońska, J., Żarnowska-Prymek, H., Stańczak, J., Kozłowska, J., Wiercińska-Drapało, A., 2016. Symptomatic co-infection with *Babesia microti* and *Borrelia burgdorferi* in patient after international exposure; a challenging case in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23. <https://doi.org/10.5604/12321966.1203914>.
- Jahfari, S., Sprong, H., 2016. Emerging tick-borne pathogens: ticking on Pandora's box. In *Ecology and prevention of Lyme borreliosis* (pp. 119-122). Wageningen Academic Publishers. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-838-4_9.
- Jankauskaitė, K., Zamokas, G., Karvelienė, B., 2023. Most common vector-borne diseases in dogs in Europe: a review. *Biologija*, 69. <https://doi.org/10.6001/biologija.2023.69.4.3>.
- Kahl, O., Gray, J.S., 2023. The biology of *Ixodes ricinus* with emphasis on its ecology. *Ticks Tick Borne Dis*, 14, 102114. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102114>.
- Kooyman, F.N.J., Zweerus, H., Nijse, E.R., Jongejan, F., Wagenaar, J.A., Broens, E.M., 2022. Monitoring of ticks and their pathogens from companion animals obtained by the “tekenscanner” application in The Netherlands. *Parasitol Res*, 121, 1887–1893. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07518-3>.
- Kowalec, M., Szewczyk, T., Welc-Falęciak, R., Siński, E., Karbowski, G., Bajer, A., 2017. Ticks and the city—are there any differences between city parks and natural forests in terms of tick abundance and prevalence of spirochaetes? *Parasites & Vectors*, 10, 573. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2391-2>.
- Krause, P.J., 2019. Human babesiosis. *International journal for parasitology*, 2, 165-174. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.11.007>.
- Krause, P.J.3., Telford 3rd, S.R., Ryan, R., Hurta, A.B., Kwasnik, I., Luger, S., Niederman, J., Gerber, M., Spielman, A., 1991. Geographical and temporal distribution of babesial infection in Connecticut. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 1-4. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.1.1-4.1991>.
- Krause, P.J., Telford, S.R. 3rd, Spielman, A., Sikand, V., Ryan, R., Christianson, D., Burke, G., Brassard, P., Pollack, R., Peck, J., Persing, D. H. 1996. Concurrent Lyme disease

- and babesiosis. Evidence for increased severity and duration of illness. JAMA. 275:1657-60. PMID: 8637139. <https://doi.org/10.1001/jama.1996.03530450047031>.
- Król, N., Kiewra, D., Szymanowski, M., Lonc, E., 2015. The role of domestic dogs and cats in the zoonotic cycles of ticks and pathogens. Preliminary studies in the Wrocław Agglomeration (SW Poland). Vet. Parasitol, 214, 208-212. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.09.028>
- Król, N., Obiegala, A., Pfeffer, M., Lonc, E., Kiewra, D., 2016. Detection of selected pathogens in ticks collected from cats and dogs in the Wrocław Agglomeration, South-West Poland. Parasites & vectors, 9, 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1632-0>.
- Kubiak, K.; Dziekońska-Rynko, J.; Szymańska, H.; Kubiak, D.; Dmitryjuk, M.; Dzika, E., 2019. Questing *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Borrelia miyamotoi* in an urban area of north-eastern Poland. Exp. Appl. Acarol. 78, 113–126. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00379-z>
- Leschnik M.W., Khanakah G., Duscher G., Wille-Piazzai W., Hörweg C., Joachim A., Stanek G., 2012. Species, developmental stage and infection with microbial pathogens of engorged ticks removed from dogs and questing ticks. Med. Vet. Entomol, 26, 440–446. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01036.x>.
- Li, Y., Teng, L., Shang, L., Ma, R., Cai, J., Zhao, Q., Li, J., Li, N., Liu, Q., 2013. Detection of *Theileria* and *Babesia* sp. in ixodid ticks from Qinghai Province, Northwestern China. Journal of Animal and Veterinary Advances, 12, 775-778. <https://doi.org/10.36478/javaa.2013.775.778>.
- Liberska, J., Michalik, J., Pers-Kamczyc, E., Wierzbicka, A., Lane, R.S., Rączka, G., Opalińska, P., Skorupski, M., Dabert, M., 2021. Prevalence of *Babesia canis* DNA in *Ixodes ricinus* ticks collected in forest and urban ecosystems in west-central Poland. Ticks Tick Borne Dis, 12, 101786. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101786>.
- Łyp, P., Bartnicki, M., Staniec, M., Winiarczyk, S., Adaszek, Ł., 2016. Occurrence of different strains of *Babesia canis* in dogs in eastern Poland. Journal of Veterinary Research, 60, 423-427. <https://doi.org/10.1515/jvetres-2016-0063>.
- Martínez-Balzano, C., Hess, M., Malhotra, A., Lenox, R., 2015. Severe babesiosis and *Borrelia burgdorferi* co-infection. QJM: Int. J. Med, 108, 141-143. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcs100>.
- Mendoza-Roldan, J.A., Colella, V., Lia, R.P., Nguyen, V.L., Barros-Battesti, D.M., Iatta, R., Dantas-Torres, F. and Otranto, D., 2019. *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) in

- ectoparasites and reptiles in southern Italy. *Parasites & vectors*, 12, 1-9.
<https://doi.org/10.1186/s13071-019-3286-1>.
- Michalski, M. M., Kubiak, K., Szczotko, M., Chajęcka, M., Dmitryjuk, M., 2020. Molecular Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in ticks collected from dogs in urban areas of north-eastern Poland. *Pathogens*, 9, 455.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9060455>.
- Mierzejewska, E.J., Pawelczyk, A., Radkowski, M., Welc-Falęciak, R., Bajer, A., 2015b. Pathogens vectored by the tick, *Dermacentor reticulatus*, in endemic regions and zones of expansion in Poland. *Parasites & Vectors*, 8, pp.1-16.
<https://doi.org/10.1186/s13071-015-1099-4>.
- Mierzejewska, E.J., Welc-Falęciak, R., Karbowski, G., Kowalec, M., Behnke, J.M., Bajer, A., 2015a. Dominance of *Dermacentor reticulatus* over *Ixodes ricinus* (Ixodidae) on livestock, companion animals and wild ruminants in eastern and central Poland. *Exp Appl Acarol*, 66, 83-101.
<https://doi.org/10.1007/s10493-015-9889-0>.
- Moutailler, S., Valiente Moro, C., Vaumourin, E., Michelet, L., Tran, F.H., Devillers, E., Cosson, J.F., Gasqui, P., Van, V.T., Mavingui, P., Vourc'h, G., 2016. Co-infection of ticks: the rule rather than the exception. *PLoS neglected tropical diseases*, 10, p.e0004539. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004539>.
- Namina A., Capligina V., Seleznova M., Krumins R., Aleinikova D., Kivrane A., Akopjana S., Lazovska M., Berzina I., Ranka R. 2019. Tick-borne pathogens in ticks collected from dogs, Latvia, 2011–2016. *BMC Vet. Res*, 15, 398.
<https://doi.org/10.1186/s12917-019-2149-5>.
- Nicholas, K.B., Nicholas Jr, H.B., 1997. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Pittsburgh Supercomputing Center's National Resource for Biomedical Supercomputing, ver. 2.7. 000.
- Noden, B. H., Roselli, M. A., Loss, S. R. 2022. Effect of urbanization on presence, abundance, and coinfection of bacteria and protozoa in ticks in the US great plains. *J. Med. Entomol.* 59.3: 957-968. <https://doi.org/10.1093/jme/tjab2284>.
- Onyiche, T.E., Răileanu, C., Fischer, S., Silaghi, C., 2021. Global distribution of *Babesia* species in questing ticks: a systematic review and meta-analysis based on published literature. *Pathogens*. 10, 230. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020230>.
- Opalińska, P., Wierzbicka, A., Asman, M., 2016. The PCR and nested PCR detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in

- Dermacentor reticulatus* F. collected in a new location in Poland (Trzciel, Western Poland). *Acta Parasitologica*, 61, 849-854. <https://doi.org/10.1515/ap-2016-0117>
- Pańczuk, A., Tokarska-Rodak, M., Koziół-Montewka, M., Plewik, D., 2016. The incidence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* coinfections among foresters and farmers in eastern Poland. *J Vector Borne Dis.*, 53, 348-354.
- Řeháčková, K., Haláková, M., Víchová, B. and Kočišová, A., 2016. Epizootiological Study of the Occurrence of Canine Babesiosis in Southwestern Slovakia. *Folia Veterinaria*, 60, 39-42. <https://doi.org/10.1515/fv-2016-0027>
- Rizzoli, A., Silaghi, C., Obiegala, A., Rudolf, I., Hubálek, Z., Földvári, G., Plantard, O., Vayssier-Taussat, M., Bonnet, S., Špitalská, E., Kazimírová, M., 2014. *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. *Front. Public Health*, 2, 1–26. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00251>.
- Rochlin, I., Toledo, A., 2020. Emerging tick-borne pathogens of public health importance: a mini-review. *J Med Microbiol*, 69, 781. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001206>.
- Rozej-Bielicka, W., Masny, A., Gołąb, E., 2017. High-resolution melting PCR assay, applicable for diagnostics and screening studies, allowing detection and differentiation of several *Babesia* spp. infecting humans and animals. *Parasitol Res.* 116, 2671–2681. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5576-x>.
- Schwan, T.G., Piesman, J., 2002. Vector interactions and molecular adaptations of Lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. *Emerging infectious diseases*, 8, 115. <https://doi.org/10.3201/eid0802.010198>
- Scott, J.D., Scott, C.M., 2018. Lyme disease propelled by *Borrelia burgdorferi*-infected blacklegged ticks, wild birds and public awareness—Not climate change. *J. Vet. Sci. Med*, 6. <https://doi.org/10.13188/2325-4645.1000035>
- Shannon, A.B., Rucinsky, R., Gaff, H.D., Brinkerhoff, R.J., 2017. *Borrelia miyamotoi*, other vector-borne agents in cat blood and ticks in eastern Maryland. *Ecohealth*, 14, 816-820. <https://doi.org/10.1007/s10393-017-1268-3>
- Siński, E., Welc-Falęciak, R. Zajkowska, J., 2016. *Borrelia miyamotoi*: A human tick-borne relapsing fever spirochete in Europe and its potential impact on public health. *Advances in medical sciences*, 61, 255-260. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2016.03.001>.
- Siuda, K., 1993. Kleszcze (Acari: Ixodida) Polski. II. Systematyka i rozmieszczenie. *Monografie Parazytologiczne vol, 12*. Polish Parasitological Society, Warsaw.

- Skotarczak, B., 2002. Canine borreliosis-epidemiology and diagnostics. *Ann Agric Environ Med.* 9, 25-28.
- Skotarczak, B., 2018. The role of companion animals in the environmental circulation of tick-borne bacterial pathogens. *Ann Agric Environ Med*, 25, 473-480.
<https://doi.org/10.26444/aaem/93381>.
- Solano-Gallego, L., Sainz, Á., Roura, X., Estrada-Peña, A., Miró, G., 2016. A review of canine babesiosis: the European perspective. *Parasites & vectors*, 9, 1-18.
<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1596-0>.
- Stańczak J., Cieniuch S., Lass A., Biernat B., Racewicz M. 2015. Detection and quantification of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks from urban and rural environment, northern Poland, by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Exp. Appl. Acarol.* 66, 63–81. <https://doi.org/10.1007/s10493-015-9887-2>.
- Stańczak, J., Gabre, R.M., Kruminis-Łozowska, W., Racewicz, M., Kubica-Biernat, B., 2004. *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. *Ann. Agric. Environ. Med.* 11, 109–114.
- Steinbrink, A., Brugger, K., Margos, G., Kraiczy, P., Klimpel, S., 2022. The evolving story of *Borrelia burgdorferi* sensu lato transmission in Europe. *Parasitology Research*, 121, 781-803. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07445-3>.
- Strnad, M., Honig, V., Ruzek, D., Grubhoffer, L., Rego, R.O.M., 2017. Europe-wide meta-analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato prevalence in questing *Ixodes ricinus* ticks. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e00609-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00609-17>.
- Sytykiewicz H, Karbowski G, Hapunik J, Szpechciński A, Supergan-Marwicz M, Goławska S, Sprawka, I., Czerniewicz, P., 2012. Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* co-infections in *Ixodes ricinus* ticks in central-eastern region of Poland. *Ann Agric Environ Med.* 19, 45–49.
- Uilenberg, G., 2006. *Babesia*—a historical overview. *Vet Parasitol.* 138, 3-10.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.035>.
- Uspensky, I., 2014. Tick pests and vectors (Acari: Ixodoidea) in European towns: Introduction, persistence and management. 5, 41– 47.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.07.011>
- Wagemakers, A., Staarink, P.J., Sprong, H., Hovius, J.W., 2015. *Borrelia miyamotoi*: a widespread tick-borne relapsing fever spirochete. *Trends in Parasitology*, 31, 260-269.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.12.012>.

- Wierzbicka, A., Rączka, G., Skorupski, M., Michalik, J., Lane, R.S., 2016. Human behaviors elevating the risk of exposure to *Ixodes ricinus* larvae and nymphs in two types of lowland coniferous forests in west-central Poland. *Ticks Tick Borne Dis*, 7, 1180-1185. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.07.018>.
- Wodecka, B., Leońska, A., Skotarczak, B., 2010. A comparative analysis of molecular markers for the detection and identification of *Borrelia* spirochaetes in *Ixodes ricinus*. *Journal of medical microbiology*, 59, 309-314. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.013508-0>.
- Wodecka, B., Kolomiets, V., 2023. Genetic Diversity of Borreliaceae Species Detected in Natural Populations of *Ixodes ricinus* Ticks in Northern Poland. *Life*, 13, 972. <https://doi.org/10.3390/life13040972>.
- Zahler, M., Rinder, H., Zwegarth, E., Fukata, T., Maede, Y., Schein, E. Gothe, R., 2000. „*Babesia gibsoni*” of dogs from North America and Asia belong to different species. *Parasitology*, 120, 365-369. <https://doi.org/10.1017/S0031182099005557>.

6. Publikacja A.1

<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101786>

7. Publikacja A.2

<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102188>

8. Manuskrypt M.1

Co-occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* spp. DNA in *Ixodes ricinus* ticks collected from vegetation and pets in the city of Poznan, Poland

Justyna Liberska ^{a*}, Jerzy Michalik ^b, Julia Olechnowicz ^a, Mirosława Dabert ^a

^a *Molecular Biology Techniques Laboratory, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University
Poznań, Poland*

^b *Department of Animal Morphology, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz University,
Poznań, Poland*

*Corresponding author: *E-mail address: justyna.liberska@amu.edu.pl* (J.A. Liberska).

Molecular Biology Techniques Laboratory, Faculty of Biology, Adam Mickiewicz
University Poznan, ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, 61-614 Poznań, Poland

Abstract

Green spaces localized in cities create favourable environmental conditions for *Ixodes ricinus*, the most widespread and important vector of tick-borne pathogens in Central Europe. In this study, we described the prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Babesia* species found in mono- and double infections among *I. ricinus* ticks occurring in urban areas of the city of Poznań, west-central Poland. Two tick groups were examined: (i) a group of 1,029 host-seeking ticks (460 nymphs, 289 females, and 280 males and (ii) a group of 1,268 engorged female ticks removed from 1,115 tick-infested animals, dogs and cats. The overall prevalence of *B. burgdorferi* s.l. found in host-seeking ticks was almost two-fold higher in comparison to ticks derived from pets (8.7 vs. 4.7%, respectively, χ^2 test, $P = 0.001$). *Borrelia afzelii* and *B. garinii* were the most prevalent species both in ticks from vegetation (3.7% and 3.7%, respectively) and from pets (3.7% and 0.6%, respectively). *Babesia* infections were slightly more common in feeding ticks compared to those from vegetation (6.0 vs. 4.7%, respectively), however, the difference was not significant. Three *Babesia* species including *Ba. microti*, *Ba. venatorum* and *Ba. canis* were identified. *Babesia canis* and *Ba. microti* were the most prevalent in host-seeking (2.6% and 1.4%, respectively) and feeding ticks (2.8% and 2.2%, respectively), whereas *Ba. venatorum* was the rarest piroplasm. All *Ba. microti* obtained sequences (n=42) were identical to *Ba. microti* genotype "Jena/Germany" that is considered as pathogenic to humans. Furthermore, the sequences of *Ba. venatorum* (n=17) were identical with those isolated from patients in Italy, Austria and Poland. Altogether, out of 121 *Babesia*-positive ticks, 19.8% were simultaneously infected with *B. burgdorferi* s.l. spirochetes. We found similar prevalences of co-infections in host-seeking (1.1%) as well as in feeding ticks (1.0%). In the first group, *Ba. canis* prevailed in coinfections (73%), mostly with *B. afzelii* and *B. garinii*. In the second group, *Babesia microti* dominated with *B. afzelii* (92.7%). This is the first finding documenting the co-occurrence of both pathogens in ticks from companion

animals. The detection of *Ba. microti* and *Ba. venatorum* sequences identical to strains pathogenic to humans as well as predominance of LB spirochetes, *B. afzelii* and *B. garinii* in *I. ricinus* from vegetation and animals indicates that there is a potential risk of acquiring human babesiosis and/or Lyme borreliosis in urban areas of the city of Poznań. Although, the overall risk of encountering a *Ba. microti* and *B. burgdorferi* s.l. co-infected tick was low (1.0%), the potential for more severe clinical symptoms and complications deserves notice. A relatively high infection rates of *Ba. canis* in dog-derived ticks (3.2%) and in host-seeking ticks (2.6%), suggests that *I. ricinus* could potentially be involved in the circulation of this piroplasm in areas, where the competent vector, *Dermacentor reticulatus* is absent or rare.

Keywords: *Ixodes ricinus*, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Babesia microti*, *Babesia venatorum*, *Babesia canis*, *Borrelia miyamotoi*, coinfections, babesiosis, urban green areas

1. Introduction

Green spaces inside European towns such as parks, leisure-time areas for hiking and biking, botanic gardens, private properties with gardens, cemeteries, and urban forests, create favourable environmental (e.g., temperature and humidity) conditions for *Ixodes ricinus*, the most widespread and important vector of tick-borne pathogens (TBPs) in Central Europe. One of the key factors influencing the survival and maintenance of local tick populations is their access to appropriate and abundant tick bloodmeal hosts [1]. Within urban green areas, immature stages of this primarily a forest-dwelling tick species, feed mostly on small rodents, ground-feeding passerines, and hedgehogs which are additionally important hosts of adult female ticks. The latter feed also on urban pet populations represented by dogs and cats, including stray animals. The observed ongoing increase in the number of pets in towns, suggests that this group of mammals appears to be increasingly important for the persistence and size of tick populations in these ecologically altered habitats. Some of vertebrate species acting as maintenance hosts for *I. ricinus*, may concurrently serve as reservoir hosts of TBPs. Their high or low abundance and species composition in urban habitats, influence the level of infection of local tick populations and is critical for public health importance [1]. Therefore, investigations regarding the prevalence of TBPs infecting ticks, are necessary to establish or predict the emergence of active endemic foci of tick-borne diseases. It is particularly crucial because, there is still a lack of comprehensive knowledge on the eco-epidemiology of these infections in urban ecosystems and our understanding of how urbanization affects pathogen-host-vector relationships [2].

Ticks can carry two or more pathogenic microorganisms with a subsequent high likelihood of co-transmission to humans or animals [3,4]. *Ixodes ricinus* ticks infected with various bacteria, i.e., spirochetes of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) complex, the agent of Lyme borreliosis (LB) or *Anaplasma phagocytophilum*, the agent of human

anaplasmosis, are regularly found in urban and suburban areas across Europe [5-7]. Furthermore, *B. burgdorferi* s.l. spirochetes and intraerythrocytic parasites of the protozoan genus *Babesia* (Apicomplexa: Piroplasmida), including *Ba. microti*, *Ba. divergens*, *Ba. venatorum*, and *Ba. duncani* (present only in North America), can co-occur and be co-transmitted by ticks of the *Ixodes ricinus* species complex [8]. These protozoan pathogens are responsible for human babesiosis causing a febrile hemolytic anemia, that is generally asymptomatic or self-limiting in healthy humans, however, is a serious health concern in splenectomised, immunocompromised patients [9]. In North America, the major agent of human babesiosis is *Ba. microti*, a parasite associated with small mammals serving as primary reservoir hosts. There are eco-epidemiological evidence indicating that coinfections *B. burgdorferi* s.l. and *Ba. microti* among ticks and *Peromyscus leucopus* mice may contribute to the emergence and expansion of *Ba. microti* in the enzootic cycle. Ecological models demonstrated the strongest effects when the prevalence of *B. burgdorferi* in mice was high [10]. Recent research clearly demonstrated that infection of *I. scapularis* ticks with *B. burgdorferi* s.l. spirochetes increases the likelihood of infection with *Ba. microti* as well as *A. phagocytophilum* compared with borreliae-free ticks [11]. Furthermore, according to Zemsch et al. [12] host-seeking *I. scapularis* ticks that are infected with *Ba. microti*, are more likely to be coinfecting with *B. burgdorferi* than expected if the pathogens were transmitted independently. This implies that such positive pathogen-vector-host interactions of both tick-borne agents may favour their emergence and maintenance in local tick populations [13]. Coinfections may also change clinical symptoms, course, severity of tick-associated disease in humans and animals compared to those induced by a single infection [14-16]. Patients co-infected with *B. burgdorferi* s.l. and *Ba. microti* suffer from significantly more diverse, intense, and persisting disease symptoms compared to those infected with each pathogen separately [17,18]. It has been shown that *Ba. microti* weakens adaptive immunity and

increases the severity of LD [19]. Furthermore, human coinfection with *Ba. microti* and *B. burgdorferi* s.l. seems to be serious clinical problem because of the difficulties in diagnosis and treatment, since the antibiotics used to treat borreliae are ineffective against *Ba. microti* [20]. In Europe, most cases of human babesiosis are attributed to *Ba. divergens*, usually a cattle parasite or less frequently to *Ba. venatorum* for which the roe deer is the main reservoir host. Interestingly, European genotypes of *Ba. microti* infecting humans are not as infectious or pathogenic than those in the USA [21].

The aim of our study was to ascertain the co-occurrence of *B. burgdorferi* s.l. spirochetes and *Babesia* piroplasms in *I. ricinus* ticks collected from vegetation as well as from dogs and cats in urban areas of the city of Poznań, west-central Poland.

2. Materials and methods

2.1. Tick collection and identification, and DNA extraction

Host-seeking ticks were collected by sweeping up the vegetation up to 1 m with a 1 m² flannel flag along the paths in five forested green areas used for recreational activities and as walking areas for dogs in the city of Poznań. Ticks were collected from May to September 2017 and in April 2018. The five study sites included: Morasko Adam Mickiewicz University Campus, Sołacki and Citadel city parks, two urban forests localized around Rusalka and Malta lakes, for details see [22].

Ticks feeding on dogs and cats, were collected during a three-year survey (April to October 2015, March to November 2016, and March to September 2017) in 17 veterinary clinics in Poznań (for details see [22]). In this study, we tested ticks derived from animals which did not travel outside the city, based on information from questionnaires.

All ticks were preserved in 96% ethanol until DNA extraction. Adult ticks were identified to the species level using morphological characters [23]. *Ixodes* nymphs were identified using DNA-barcoding based on cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) amplification and next generation sequencing (NGS) of the amplicons [22,24]. Ticks were tested individually. DNA extraction from host-seeking ticks was performed with the ammonium hydroxide method, whereas DNA from pet-derived ticks were isolated using a silica-column method. Details concerning DNA extractions are described by Liberska et al. [22].

2.2. Screening for *Borrelia burgdorferi* s.l. DNA

Host-seeking ticks were initially screened for *B. burgdorferi* s.l. DNA by amplification and sequencing of the V4 hypervariable region of the 16S rRNA gene (V4 16S). Details concerning PCR primers, library construction, NGS sequencing, and sequence data analysis were described previously [25]. Host-seeking and feeding ticks positive for *B. burgdorferi* s.l. V4 16S were retested by amplification and sequencing the *flaB* gene fragment using two primer sets 132f/905r and 220f/823r [26]. Protocols for PCR reactions and Sanger sequencing followed [25].

2.3. Screening for *Babesia* spp. DNA

Babesia spp. DNA was detected by amplification and sequencing of the 18S rRNA gene fragment using nested PCR and Sanger sequencing or by next generation sequencing (NGS) of the same target DNA. For the nested PCR, we used the RIB-19/RIB-20 primer set for the first-round reaction [27], and the P3/BabR3 primer set for the second-round reaction [22, 28]. Primer sequences and protocols for nested PCR and Sanger sequencing are described by Liberska et al. [22].

The second approach for the detection of *Babesia* DNA was conducted with the use of the P3/BabR3 primer set fused with dual-indexed Ion Torrent adapters to generate *Babesia*-specific amplicons for NGS sequencing. Details concerning library construction, Ion Torrent sequencing, and sequence data analysis were described previously [25].

2.4. Statistical analysis

Data analysis was performed using STATISTICA software version 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Rates of infection were analysed using Chi-squared test χ^2 and Fisher exact test. A $p < 0.05$ was considered statistically significant.

2.5. Sequence analysis

Sanger sequence chromatograms were checked for accuracy in GeneiousR11.1.5 (Biomatters Ltd.) and contigs were assembled manually in GeneDoc sequence editing tool version 2.7 [29]. Amplicon sequence variants (ASVs) and operational taxonomic units (OTUs) obtained from NGS data were compared to those available in the GenBank using BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) and the megablast algorithm. We used 100% identity threshold to determine *Borrelia* and *Babesia* species because they were determined from rDNA sequences. The identity threshold for tick species determination was lowered to 97% due to intra-species variability of the COI marker.

2.6. Phylogenetic analysis

For phylogenetic analysis, we used 49 V4 16S sequences (Table S1) including ASVs found in this study (n=18), V4 16S sequences identical to the ASVs found in this study and sourced from reference *B. burgdorferi* s.l. genomes deposited in GenBank (n=18), and representants of *Borrelia* RF group (n=13) used to root the tree. Sequences were aligned manually in GeneDoc and a phylogenetic tree was built using FastTree 2.1.11 as implemented

in Geneious Prime 2023.2.1 (Biomatters Ltd.). The tree was edited in Mega7 [30] and Corel Draw v. X5.

3. Results

3.1. Collection and identification of ticks

A total of 2297 *I. ricinus* ticks including 1029 host-seeking individuals (460 nymphs, 289 females, and 280 males) and 1268 feeding female ticks removed from 1115 tick-infested companion animals, were collected during this study (Tables 1, 2). In the case of pet-derived ticks sampled in veterinary clinics, 711 were removed from 609 dogs, 153 from 117 cats, and 404 from 389 undefined animals, i.e., without giving information about host species (Table 2).

3.2. Detection of *Borrelia burgdorferi* s.l. DNA

Based on V4 16S and *flaB* gene fragments, DNA of *B. burgdorferi* s.l. was detected in 90 (8.7%) of the 1,059 host-seeking *I. ricinus* ticks. The bacterium was found in nymphs, males, and females with prevalences of 6.3%, 9.6% and 11.8%, respectively (Table 1). Four out of the five collection sites yielded ticks that tested positive for *Borrelia* spirochetes (range between 3.0% and 40.6%). Sequencing of the amplified *flaB* gene fragments revealed four *Borrelia* species: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. lusitaniae*, and *B. valaisiana* (Table 1). The first two prevailed and reached the same prevalence of 3.7%, followed by *B. lusitaniae* (0.9%), *B. valaisiana* (0.3%) and *Borrelia* undetermined species (0.2%).

Among the 1,268 feeding *I. ricinus* females, DNA *B. burgdorferi* s.l. was detected in 4.7% (n=59) individuals, and this prevalence was almost two-fold lower in comparison to host-seeking ticks (8.7%, χ^2 test, $P = 0.001$). Infected ticks were found in all animal groups: dogs (4.8%), cats (3.3%) and undefined pets (5.0%). Five spirochete species were identified with a clear predominance of *B. afzelii* (3.7%; n=47) followed by *B. garinii* (0.6%; n=7), *B.*

spielmani (0.2%; n=3), *B. lusitaniae* (0.1%; n=1) and *B. valaisiana* (0.1%). Except of *B. valaisiana*, the remaining four species were detected in dog-derived ticks. The five infected ticks collected from cats, harboured only *B. afzelii*, whereas 20 individuals from the group of undefined pets were infected with *B. afzelii* (n=16), *B. garinii* (n=3) and *B. valaisiana*.

3.3. Genetic diversity of *B. burgdorferi* s.l. V4 16S amplicon sequence variants

In total, 18 different *B. burgdorferi* s.l. V4 16S ASVs were found in questing ticks (Supplementary table with GenBank acc. nos.). For most ASVs, identical sequences in species reference genomes published in GenBank could be assigned (Figure V4 Tree). Phylogenetic analysis enabled the assignment of one of the previously unknown variants, ASV05, to *B. afzelii* with a relatively high support (85%). Another new variant, ASV17, was reconstructed as a sister to the V4 16S sequence from the *B. maritima* reference genome, although with moderate support (76%). The remaining four new variants (ASV10-12 and ASV14) were reconstructed by the phylogenetic analysis as a separate, well supported clade (90%). These ASVs tended to co-occur with other *B. burgdorferi* s.l. V4 16S ASVs either in a relatively large number of ticks (ASV10 and ASV 14 in nine positive samples each) or in a predominant number of reads (ASV11). Amplicon sequence variant 12 was found in only one sample and in co-occurrence with ASV14; however, both sequences differed at two variable nucleotide positions, indicating that ASV12 cannot be considered an NGS artifact of the ASV14 amplicon.

Analysis of the *flaB* gene sequence was unable to unambiguously assign most of the V4 16S ASVs to the species. Samples positive for *B. burgdorferi* s.l. V4 16S DNA that clustered basally at our phylogenetic tree (ASV01-03 and ASV18), failed in PCR amplification of the *flaB* gene fragment. Moreover, most of the ASVs occurred in co-infections, making it impossible to assign a specific *flaB* gene sequence to a specific V4 16S ASV. However, in

these cases, the *flaB* gene results did not exclude the presence of the species identified in by the V4 16S analysis in the analyzed samples. This also applied to the clade grouping of the previously unknown V4 16S variants (ASV10-12, ASV14). In this case, the *flaB* gene sequences indicated the presence of *B. garinii* and *B. lusitaniae*. In this regard, due to the presence of *B. burgdorferi* s.l. V4 16S sequence variants that could not be unambiguously assigned to the species, further analyses were based on sequencing data from *flaB* amplicons.

3.3. Presence of *Babesia* spp. DNA in *Ixodes ricinus*

The overall prevalence of *Babesia* spp. in host-seeking *I. ricinus* ticks was 4.4% (45/1,029), and the infection was noticed in all developmental stages (Table 1), with the highest prevalence found in females and the lowest in nymphs (7.3% vs. 2.4%; respectively; χ^2 test: $P = 0.001$). *Babesia* infected ticks occurred in four out of five locations (range between 0.8% and 9.8%). Among three identified *Babesia* species, *Ba. canis* (2.6%) followed by *Ba. microti* (1.4%) were the most prevalent, and *Ba. venatorum* (0.4%) was the rarest species. These three species were noted in adult females and males, whereas *Ba. venatorum* was absent in nymphs.

In total, 6.0 % (76/1,268) feeding female *I. ricinus* ticks were positive for the presence of *Babesia* DNA (Table 2). The highest infection rate was noted in ticks collected from dogs (6.8%) and undefined animals (5.7%), and the lowest, in cat-derived ticks (3.9%), but the difference was statistically insignificant. Three *Babesia* species were identified: two of them, *Ba. canis* and *Ba. microti*, reached similar infection rates (2.8% and 2.2%, respectively), whereas *Ba. venatorum*, was the rarest species (1.0%). Ticks infected with these three species were confirmed in all animal groups. The infection levels of *Ba. canis* and *Ba. microti* in ticks derived both from dogs and undefined pets were similar (3.2%, 2.5% and 2.7%, 2.0%, respectively), with the lowest level for *Ba. venatorum* (1.0% and 0.7%, respectively). The

latter prevailed (2.0%) in cat-derived ticks, followed by *Ba. microti* (1.3%) and *Ba. canis* (0.7%) that was found only in one female tick.

All obtained *Ba. canis* sequences demonstrated 100% similarity to *Ba. canis* isolates detected in the blood of infected dogs from Poland (e.g., GenBank: EU622793, KT844903), as well as in questing *I. ricinus* ticks (GenBank: MF797820). *Babesia microti* sequences were identical to the zoonotic *Ba. microti* "Jena/Germany" genotype (GenBank acc. no. EF413181), whereas *Ba. venatorum* sequences showed 100% homology to isolates found in patients in Italy and Austria (AY046575), and also in an asymptomatic patient in Poland (KP072001).

3.4. Co-occurrence of *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Babesia* spp. DNA in *Ixodes ricinus*

Overall, of the 2,297 *I. ricinus* ticks, 10.7% (n=246) tested positive for a single pathogen, and 1.0% (n=24) yielded dual infections. Of the 149 positive for *B. burgdorferi* s.l. DNA ticks, mono-infections were identified in 83.8% (n=125) and co-occurrence with *Babesia* spp. DNA in 16.1% ticks. Of the 121 ticks infected with *Babesia* species, 80.2% (n=97) were single infections, and 19.8% were co-infected with *B. burgdorferi* s.l. Among host-seeking ticks, co-occurrence of *Borrelia* and *Babesia* was identified in 1.1% (11/1,029) of adult ticks. None of the 460 nymphs was concurrently infected with both pathogens (Tab. 1). *Babesia canis* was the most prevalent species in co-infected ticks (72.7%; 8/11), and was confirmed in four (0.4%) co-infections with *B. afzelii* and in four (0.4%) with *B. garinii*. In the remaining three female ticks, *B. lusitaniae* co-occurred with *Ba. venatorum* (n=2; 0.2%) and *Ba. microti* (n=1; 0.1%).

Among feeding female ticks, 1.0% (13/1,268) were co-infected with both pathogens. *Babesia microti* was the most prevalent species in all co-infections (92.3%; 12/13). Most co-infections of this species was recorded with *B. afzelii* (10/13). Furthermore, *Ba. microti* co-

occurred with *B. spielmanii* and *B. garinii* in two other ticks. *Babesia canis* co-occurred with *B. garinii* only in one female tick.

3.5. Co-occurrence of *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes ricinus*

Of the 90 positive for *B. burgdorferi* s.l. host-seeking ticks, six (6.7%) were co-infected with *B. miyamotoi* spirochetes identified in our previous study [25]. *Borrelia afzelii* was the most common and occurred in three coinfections (2 nymphs and one male), followed by *B. garinii* (2 nymphs) and *B. lusitaniae* (one female). None of 59 *B. burgdorferi* s.l. positive feeding ticks, yielded concurrently *B. miyamotoi*.

4. Discussion

In this study, we described prevalence of *B. burgdorferi* s.l. and *Babesia* spp. found in mono- and double infections among *I. ricinus* ticks occurring in urban areas of the city of Poznań. We focused on two tick groups: (i) a group of host-seeking collected from vegetation, and (ii) a group of feeding ticks removed from pet animals, dogs and cats.

According to a review by Hansford et al. [31], the mean *Borrelia* prevalence in questing ticks in urban green areas across Europe was 17.3% (range: 3.1% to 38.1%). In our study, 8.7% of ticks (range: 0.0% to 40.6%) yielded borreliae. Comparable or higher mean infection rates were found in urban *I. ricinus* populations of several European cities from neighboring countries. For example, in Slovakia, the prevalence of *B. burgdorferi* s.l. ranged from 6.8% to 15.3% in parks of Bratislava, [32,33], and in agglomerations of Košice and Bardejov reached 10.2% [34]. In the Czech Republic, 12.1% of ticks collected in parks in Brno and 13.2% in Ostrava city, yielded spirochetes [35,36]. Furthermore, in the city parks of Vilnius, Latvia, and in recreational areas of Hanover, Germany, 25% of ticks yielded *B. burgdorferi* s.l. [37,38]. Comprehensive studies on host-seeking ticks infected with *B. burgdorferi* s.l. in strictly urban

agglomerations in Poland, are relatively rare. In city forests and parks of Warsaw, the mean prevalence of *Borrelia* spirochaetes was 10.9% [6], and in the Tri-City agglomeration area of Gdańsk, Gdynia, and Sopot, reached 12.4% [39]. To date, the highest levels of *Borrelia* infections have been described in green areas of the city Białystok (25.7%) and Olsztyn (27.4%) [40,41]. In our study, the highest prevalence of 40.3% (28/69) was recorded in ticks of the Citadel Park, the largest municipal park strictly in the center of the city. Although, the number of tested ticks was limited, this high infection level, may result from the lack of roe deer, that is considered to eliminate *B. burgdorferi* s.l. in feeding ticks [42].

The overall prevalence of *B. burgdorferi* s.l. found in ticks from pet animals (4.7%), was almost two-fold lower than in host-seeking ticks (8.7%). Comparable prevalences were described in the Netherlands [43,44] and Austria (4.8% and 5.2%, respectively) [45]. Higher infection rates in *I. ricinus* mainly from dogs, were recorded in Lativa (10.7%), Germany (11.6%), Finland (11.8%), Norway (14%), and Denmark (15%) [46-50]. So far, the highest prevalences in *I. ricinus* from dogs have been found in two city agglomerations: Wrocław (21.7%), in the southwest [51] and Olsztyn (34.4%), in the northeast of Poland [52].

Borrelia afzelii and *B. garinii* proved to be the most prevalent species among infected ticks both from vegetation and pets. Our results are in agreement with the frequency of main *Borrelia* species infecting host-seeking *I. ricinus* ticks in central Europe [53] and with a report by Skotarczak [54], documenting that *B. afzelii* and *B. garinii* are the most common species in dogs. Dogs can develop infection of *B. burgdorferi* s.l. and exhibit the presence of antibodies, but unlike humans, they rarely get sick [55]. The distribution of *Borrelia* species in our study, may be explained by species composition of wild hosts. The predominant *B. afzelii*, together with *B. spielmanii*, are maintained in enzootic cycles associated with small rodents and medium-sized mammals, including hedgehogs [56-58]. We found *B. spielmanii* only in three feeding females, what confirms the rarity and highly focal distribution of this spirochete. The

mentioned groups of mammals were observed in our study locations, with predominance of small rodents. In the present research, *B. afzelii* prevailed in feeding ticks (3.7%). This spirochete was also the most prevalent (3.6%) followed by *B. garinii* (1.7%), *B. valaisiana* (1.4%) and *B. spielmanii* (1.4%) in ticks from dogs in Latvia [49]. A reverse pattern, with predominance of *B. garinii* over *B. afzelii* (28.1% vs. 3.2%), was observed in ticks from dogs in north-eastern Poland [52]. Avian associated *B. garinii* and *B. valaisiana* [59] were present in both infected tick groups, with almost a fourfold higher prevalence of *B. garinii* in ticks from vegetation in comparison to feeding ticks (42.2% vs. 11.2%). The lizard-associated *B. lusitaniae* [60] prevailed in host-seeking ticks compared to pet-derived ticks (10% vs. 1.7%). The finding of this spirochete only at the Rusalka lake, suggests its highly focal distribution.

In this study, the method of amplification and sequencing of the V4 region in 16S rRNA was not specific enough to clearly identify the obtained *B. burgdorferi* s.l. sequences to species as displayed on the phylogenetic tree. The 16S rRNA region had different sequences of V4 for some species identified by *flaB* gene, therefore the complex analysis, including other marker genes is necessary to correctly assign 16S rDNA sequences to the species.

We detected *Babesia* DNA in 4.4% of host-seeking ticks, which were recorded in four out of five locations (range: 0.8% to 9.8%). The meta-analysis by Onyiche et al. [61] estimated the overall prevalence of babesiae in questing *I. ricinus* in Europe at 2.1%. Our results agree with infection rates found in the city Białystok (3.7%) [41] and within the Tri-City agglomeration (4.5%) [62]. Lower prevalences (range: 0.4% to 0.5%) were reported in ticks tested in Bavarian public parks [63] or in urban Bielański Forest (0.8%), in Warsaw [64].

Babesia DNA was identified in 6.0% of feeding ticks, with a higher prevalence in ticks from dogs (6.8%) compared to those from cats (3.9%). Stensvold et al. [48] documented a prevalence of 8.0% in dog-derived ticks in Denmark. Lower prevalences of *Babesia* spp. in pet-derived ticks (usually from dogs) were 0.8% in the Netherlands [44], 1.0% in Finland

[50], 1.4% (62/4316) in the United Kingdom [65], 2.5% in Germany [47], and 4.7% in Latvia [49]. The highest infection rates in ticks feeding upon dogs (66.8%) and cats (15.4%) were reported in southern Poland [66].

In Europe, *I. ricinus* is involved in the transmission cycles of *Ba. divergens*, *Ba. venatorum*, *Ba. microti*, and *Ba. capreoli*, of which the first three are considered as human pathogens [8]. In our study, three species including *Ba. microti*, *Ba. venatorum* and *Ba. canis* were identified in both groups of ticks. The finding of the first two species, might be explain the availability of ticks to suitable reservoir hosts of both parasites. In Europe, *Ba. microti* infects small rodents [67]. The reservoir host for *Ba. venatorum*, is the roe deer, and this species was observed in at least four out of five study sites. However, we did not find *Ba. divergens*, the main etiological agent of human babesiosis in European patients [21]. Since cattle are regarded as the reservoir hosts for *Ba. divergens*, their absence in urban areas of Poznań, may explain that we failed to find the pathogen. In our study, *Ba. canis* and *Ba. microti* were the most prevalent species in feeding (2.6% and 1.4%, respectively) and host-seeking ticks (2.8% and 2.2%, respectively), whereas *Ba. venatorum* was the rarest piroplasm. Although, the role of *I. ricinus* in the transmission of *Ba. canis* remains still unclear, this parasite has already been found in questing ticks in northern Poland (range: 0.2% to 5.8%) [40,62,68], in Slovakia and the Czech Republic (range; 0.2% to 1.4%) [69,70]. In our previous study, we found that 10.2% of ticks in forest ecosystems in west-central Poland were positive for *Ba. canis* DNA, the highest prevalence ever reported for this tick [22]. European *Ba. canis* strains belong to the type A or type B, which induce different clinical symptoms of canine babesiosis [71]. In this previous and the current study, all *Ba. canis* obtained sequences represented the milder type A. In Europe, *Ba. canis* infections in *I. ricinus* from dogs were previously documented only in Latvia and Russia, with prevalences of 1.0% and 3.8%, respectively [49,72], and a prevalence of 3.2% in our study is comparable with those data. In

Europe, most *Babesia* infections in *I. ricinus* collected from companion animals are caused by *Ba. microti* and *Ba. venatorum*. The overall prevalence of 2.2% of *Ba. microti* in feeding ticks in our study was lower compared to a 5.7% infection rate in dog-derived ticks in Warsaw which yielded *Ba. microti* Gray strain pathogenic to humans (GenBank: AY693840) [73]. In Europe, the highest prevalences of *Ba. microti* in this group of ticks, were reported in southeastern (42.6%) and southern (24.3%) Poland [66, 74]. In the case of *Ba. venatorum*, the highest prevalence of 1.6% was recorded in dog-derived ticks in Latvia [49]. According to Onyiche et al. [61], *Ba. microti* is considered to be the most common *Babesia* species in questing *I. ricinus* in the eastern Europe. In our study, *Ba. microti* (1.4%) was the second most prevalent species following *Ba. canis*. Much higher infection rates of *Ba. microti* in ticks from urban areas were 2.6% in northern [39], 6.5% in central [75], and 26.4% in southern Poland [76]. *Babesia venatorum* that infected only 0.4% of host-seeking ticks in our study as well as in Bavarian public parks [63], reached also low infection rates of 0.8% in central [64] and 0.9% in northern Poland [68].

In Europe, more than 60 cases of human babesiosis have been caused mainly by *Ba. divergens*, with five cases attributed to *Ba. venatorum* and eleven autochthonous cases to *Ba. microti*, most of which were identified in Poland [21,77]. Two European genotypes of *Ba. microti* can infect humans, but are less infectious or pathogenic to humans as those in the United States. The first *Ba. microti* genotype (strain) "Jena/Germany" (EF413181) is closely related to the USA genotypes (Clade 1) including e.g., the Gray strain isolated from a patient in Massachusetts (AY693840), responsible for most cases of human babesiosis worldwide. The second *Ba. microti* genotype, the 'Munich' type (AB071177) is widely distributed in Europe and belongs to Clade 3 [78]. This genotype was originally thought to be non-zoonotic, however, it has recently been identified in six patients with mild and asymptomatic infections in Poland [79] and in one from Spain [80]. However, its pathological potential remains still

uncertain [77]. It should be noted, that *Ba microti* sequences identified in our study, were identical to *Ba. microti* genotype "Jena/Germany" that is considered as pathogenic to humans [77]. In Poland, Welc-Falęciak et al. [81] found the same genotype in two asymptomatic patients. Furthermore, among 1.3% of *Babesia* infected *I. ricinus* removed from humans in Poland, most showed a high similarity (> 99%) to the *Ba. microti* strain Jena followed by *Ba. venatorum* [82]. Of note, that the sequences of *Ba. venatorum* found in the two mentioned study as well as in our, were identical with those isolated from splenectomised patients in Italy and Austria [83], and with an asymptomatic patient from Poland [84].

Altogether, out of 121 *Babesia*-positive ticks, 19.8% were simultaneously *Borrelia*-positive. We found almost identical prevalences of co-infections with *B. burgdorferi* s.l. and *Babesia* spp. in host-seeking (1.1%) as well as in feeding ticks (1.0%). To the best of our knowledge, this is the first report documenting the co-occurrence of both pathogens in ticks from companion animals in Europe. In Poland, coinfection rates of both pathogens in host-seeking ticks were described in the north (range; 0.3% to 0.6%) [39,85], in the east (1.6%) [86], and in the northeast (2.8%) [41]. In the present study, *Ba. canis* prevailed in coinfections mostly with *B. afzelii* and *B. garinii* in host-seeking ticks, whereas *Ba. microti* dominated predominantly with *B. afzelii*, in ticks from the pets. The prevalence of 0.9% (n=9) *Ba. canis* and *B. burgdorferi* s.l. coinfections in host-seeking ticks in our study, is consistent with a previous Polish study, in which 1.0% of 104 ticks showed a coinfection of *Ba. canis* with *B. afzelii* [87]. Recently, a fatal case of a dog co-infected with *Ba. canis* and *B. burgdorferi* s.l. was diagnosed in Romania [88]. Hildebrand et al. [89], found 1.6% of coinfections *Ba. microti* followed by *Ba. divergens*, mostly with *B. afzelii* and *B. garinii* in questing ticks in Middle Germany, whereas *Ba. microti* and *B. afzelii* prevailed in co-infected ticks from humans [82].

Taking into account the mentioned studies, in host-seeking *I. ricinus*, *Ba. microti* seems to be the most prevalent species in co-infections with *B. afzelii* and *B. garinii*. Co-occurrence of these pathogens is of significant importance from a medical point of view. In humans, they may affect the clinical course of disease, especially in non-immunocompetent patients, and might be difficult to differentiate since both infections induce often nonspecific symptoms including fever, fatigue, and flu-like illness [90,91]. Jabłońska et al. [92] described a symptomatic case of babesiosis and LB in a Polish immunocompetent patient after travelling to Canada and the USA. Furthermore, in a study of 24 tick-exposed individuals from southeastern Poland, a piroplasm 98.9% homologous with *Ba. divergens* and *Ba. venatorum* was detected in one person concurrently seropositive for *B. burgdorferi* s.l. [93]. In another Polish report, Pańczuk et al. [94] also found a single *B. burgdorferi* s.l. and *Ba. microti* coinfection among foresters with significant levels of IgG anti-*B. burgdorferi* antibodies.

Using our previous results regarding the presence of *B. miyamotoi* spirochetes [25] in the same group of host-seeking ticks, we found that 0.6% of 1,029 individuals yielded concurrently DNA of *B. burgdorferi* s.l., with predominance of *B. afzelii* and *B. garinii*. Co-occurrence of both pathogens was also documented in 0.4% and 1.4% of adult *I. ricinus* collected from vegetation in France [95] and eastern Poland [86], respectively.

In conclusion, the finding of a predominance of two pathogenic species of spirochetes, *B. afzelii* and *B. garinii*, and the detection in both groups of ticks of the sequences *Ba. microti* and *Ba. venatorum*, which are identical to human pathogenic strains, indicate that people using urban green spaces are at risk of contracting LB and/or babesiosis. The occurrence of double infections, even though with a low prevalence of 1.0%, is both clinically and epidemiologically significant and indicates that they pose a challenge for differential diagnosis in patients with acute febrile disease after contact with a tick. Furthermore, the finding of *Ba. canis* in both groups of *I. ricinus* suggests that this species could potentially be

involved in the circulation of this piroplasm in areas of western central Poland, where the competent vector, *Dermacentor reticulatus* is absent or rare. If this is the case, urban areas may pose a potential risk of dogs acquiring babesiosis.

Acknowledgements

We would like to thank Urszula Sobczyńska, Łukasz Broda, Weronika Pawlik, and Aneta Łyś of Adam Mickiewicz University in Poznań for their assistance in the collection of ticks from urban ecosystems. We would like to thank all the veterinary clinics involved in the study: Centrum Zdrowia Małych Zwierząt M. Majka, R. Starczewski s.c., Gabinet Weterynaryjny Katarzyna Gryglewska, Gabinet Weterynaryjny lek. wet. Dariusz Filipiński, Gabinet Weterynaryjny Marcin Konieczny, Gabinet weterynaryjny - Piotr Winiecki, Klinika Weterynaryjna Juszczak & Gorzelańczyk, Praktyka Weterynaryjna A. Golec M. Rybski, Gabinet Weterynaryjny PLUTO VET lek wet Krzysztof Kaniewski, Zwierzak Gabinet Weterynaryjny A. Adamska, AMICUS Gabinet Weterynaryjny, Usługi Weterynaryjne Jakub Golec, Przychodnia Weterynaryjna Na Polance Katarzyna Marciniak, Specjalistyczny Gabinet Weterynaryjny lek. wet. Żaneta Sokołowska, Przychodnia Weterynaryjna lek. wet. Adam Łowczak, Przychodnia Weterynaryjna Kociak lek. wet. Sylwia Łata, Klinika Weterynaryjna dr. Grzegorza Wąsiatycza.

This work was partially supported by the COST Action CA21170 “Prevention, anticipation and mitigation of tick-borne disease risk applying the DAMA protocol (PRAGMATICK)”.

References

1. Rizzoli, A.; Silaghi, C.; Obiegala, A.; Rudolf, I.; Hubálek, Z.; Földvári, G.; Plantard, O.; Vayssier-Taussat, M.; Bonnet, S.; Špitalská, E.; et al. 2014. *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*, 1–26.
<https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00251>
2. Noden, B.H.; Roselli, M.A.; Los, S.R. Effect of urbanization on presence, abundance, and coinfection of bacteria and protozoa in ticks in the US Great Plains. *J. Med. Entomol.* **2022**, *59*, 957–968. <https://doi.org/10.1093/jme/tjab228>
3. Ginsberg, H.S. Potential effects of mixed infections in ticks on transmission dynamics of pathogens: Comparative analysis of published records. *Exp. Appl. Acarol.* **2008**. *46*, 29–41. <https://doi.org/10.1007/s10493-008-9175-5>
4. Moutailler S.; Valiente Moro, C.; Vaumourin, E.; Michelet, L.; Tran, FH.; Devillers, E.; et al. Co-infection of ticks: The rule rather than the exception. *PLoS Negl Trop Dis.* **2016**, *10*, e0004539. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004539>
5. Welc-Fałęciak, R.; Kowalec, M.; Karbowski, G.; Bajer, A.; Behnke, J.M.; Siński, E. Rickettsiaceae and Anaplasmataceae infections in *Ixodes ricinus* ticks from urban and natural forested areas of Poland. *Parasites Vectors* **2014**, *7*, 121.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-121>
6. Kowalec, M.; Szewczyk, T.; Welc-Fałęciak, R.; Siński, E.; Karbowski, G.; Bajer, A. Ticks and the city—are there any differences between city parks and natural forests in terms of tick abundance and prevalence of spirochaetes? *Parasites Vectors* **2017**, *10*, 573. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2391-2>
7. Richtrová, E.; Míchalová, P.; Lukavská, A.; Navrátil, J.; Kybicová, K. 2022. *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in *Ixodes ricinus* ticks in urban green areas in Prague. *Ticks Tick Borne Dis.* **2022**, *13*, 102053 <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102053>
8. Bajer, A.; Dwuznik-Szarek, D. The Specificity of *Babesia*-tick vector interactions: Recent advances and pitfalls in molecular and field studies. *Parasites Vectors* **2021**, *14*, 507. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05019-3>

9. Krause, P.J., Spielman, A., Telford, S.R. 3rd, Sikand, V.K., McKay, K., Christianson, D., Pollack, R.J., Brassard, P., Magera, J., Ryan, R.; et al. Persistent parasitemia after acute babesiosis. *N Engl J Med.* **1998**, 339, 160-165.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199807163390304>
10. Dunn, J.M.; Krause, P.J.; Davis, S.; Vannier, E.G.; Fitzpatrick, M.C.; Rollend, L.; Belperron, A.A.; States, S.L.; Stacey, A.; Bockenstedt, L.K. et al. *Borrelia burgdorferi* promotes the establishment of *Babesia microti* in the northeastern United States. *PLoS One* **2014**, 9, e115494. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115494>
11. Little, E.A.H.; Molaei, G. Passive tick surveillance: exploring spatiotemporal associations of *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae), *Babesia microti* (Piroplasmida: Babesiidae), and *Anaplasma phagocytophilum* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) infection in *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2020**, 20, 177-186. <https://doi.org/10.1089/vbz.2019.2509>
12. Zembsch, T.E.; Lee, X.; Bron, G.M.; Bartholomay, L.C.; Paskewitz, S.M. Coinfection of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) nymphs with *Babesia* spp. (Piroplasmida: Babesiidae) and *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales: Spirochaetaceae) in Wisconsin. *J Med Entomol.* **2021**, 58, 1891-1899. <https://doi.org/10.1093/jme/tjab056>
13. Hersh, M.H.; Ostfeld, R.S.; McHenry, D.J.; Tibbetts, M.; Brunner, J.L.; Killilea, M.E.; LoGiudice, K.; Schmidt, K.A.; Keesing, F. Co-infection of blacklegged ticks with *Babesia microti* and *Borrelia burgdorferi* is higher than expected and acquired from small mammal hosts. *PLoS ONE* 2014, 9, e99348. doi: 10.1371/journal.pone.0099348.
14. Diuk-Wasser, M.A.; Vannier, E.; Krause, P.J. Coinfection by *Ixodes* tick-borne pathogens: ecological, epidemiological, and clinical consequences. *Trends Parasitol.* **2015**, 32, 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.09.008>
15. Jahfari, S.; Hofhuis, A.; Fonville, M.; van der Giessen, J.; van Pelt, W.; Sprong, H.

Molecular detection of tick-borne pathogens in humans with tick bites and erythema migrans, in the Netherlands. *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0005042.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005042>

16. Cutler, S.J.; Vayssier-Taussat, M.; Estrada-Peña, A.; Potkonjak, A.; Mihalca, A.D.;

Zeller, H. Tick-borne diseases and co-infection: Current considerations. *Ticks Tick Borne Dis.* **2021**, *12*, 101607, <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101607>

17. Krause, P.J.; Telford, S.R., III; Spielman, A.; Sikand, V.; Ryan, R.; Christianson, D.;

Burke, G.; Brassard, P.; Pollack., et al. Concurrent Lyme disease and babesiosis: Evidence for increased severity and duration of illness. *JAMA* **1996**, *275*, 1657–1660.

<https://doi.org/10.1001/jama.1996.03530450047031>

18. Martínez-Balzano, C.; Hess, M.; Malhotra, A.; Lenox, R. Severe babesiosis and

Borrelia burgdorferi co-infection. *QJM Int. J. Med.* **2015**, *108*, 141-143.

<https://doi.org/10.1093/qjmed/hcs100>

19. Djokic, V.; Akoolo, L.; Primus, S.; Schlachter, S.; Kelly, K.; Bhanot, P.; Parveen, N.

Protozoan parasite *Babesia microti* subverts adaptive immunity and enhances Lyme disease severity. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1596.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01596>

20. Parveen, N.; Bhanot, P. *Babesia microti*—*Borrelia burgdorferi* coinfection. *Pathogens*

2019, *8*, 117. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030117>

21. Hildebrandt, A., Zintl, A., Montero, E., Hunfeld, K.P., Gray, J. 2021. Human

babesiosis in Europe. *Pathogens* **2021**, *10*, 1165.

<https://doi.org/10.3390/pathogens10091165>

22. Liberska, J.; Michalik, J.; Pers-Kamczyc, E.; Wierzbicka, A.; Lane, R. S.; Rączka, G.;

Opalińska, P.; Skorupski, M.; Dabert, M. Prevalence of *Babesia canis* DNA in *Ixodes ricinus* ticks collected in forest and urban ecosystems in west-central Poland. *Ticks*

- Tick Borne Dis.* **2021**, *12*, 101786. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101786>
23. Siuda, K. Kleszcze (Acari: Ixodida) Polski. II. Systematyka i rozmieszczenie. Monografie Parazytologiczne vol, 12. Polish Parasitological Society, Warsaw, Poland 1993.
24. Trzebny, A.; Słodkiewicz-Kowalska, A.; Becnel, J.J.; Sanscrainte, N.; Dabert, M. A new method of metabarcoding Microsporidia and their hosts reveals high levels of microsporidian infections in mosquitoes (Culicidae). *Mol. Ecol. Resour.* **2020**, *20*, 1486–1504. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13205>.
25. Liberska, J.A.; Michalik, J.F.; Dabert, M. Exposure of dogs and cats to *Borrelia miyamotoi* infected *Ixodes ricinus* ticks in urban areas of the city of Poznań, west-central Poland. *Ticks Tick Borne Dis.* **2023**, *14*, 102188. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102188>
26. Wodecka, B.; Leońska, A.; Skotarczak, B. A comparative analysis of molecular markers for the detection and identification of *Borrelia* spirochetes in *Ixodes ricinus*. *J. Med. Microbiol.* **2010**, *59*, 309–314. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.013508-0>.
27. Zahler, M.; Rinder, H.; Schein, E.; Gothe, R. Detection of a new pathogenic *Babesia microti*-like species in dogs. *Vet Parasitol.* **2000**, *89*, 241–248. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(00\)00202-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00202-8)
28. Li, Y.; Teng, L.; Shang, L.; Ma, R.; Cai, J.; Zhao, Q.; Li, J.; Liu, Q. Detection of *Theileria* and *Babesia* sp. in *Ixodid* ticks from Qinghai Province, Northwestern China. *J Anim Vet Adv.* **2013**, *12*, 775–778. <https://doi.org/10.36478/javaa.2013.775.778>
29. Nicholas, K.B.; Nicholas, H.B. Jr. GeneDoc: A tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Pittsburgh Supercomputing Center’s National Resource for Biomedical Supercomputing. 1997. Available from <<http://www.nrbsc.org/downloads/>> (accessed 2 March 2007, ver. 2.7.000).

30. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* **2016**, *33*, 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
31. Hansford, K.M.; Wheeler, B.W.; Tschirren, B.; Medlock, J.M. Questing *Ixodes ricinus* ticks and *Borrelia* spp. in urban green space across Europe: A review. *Zoonoses Public Health*, **2022**, *69*, 153–166. <https://doi.org/10.1111/zph.12913>
32. Chvostáč, M.; Špitalská, E.; Václav, R.; Vaculová, T.; Minichová, L.; Derdáková, M. Seasonal patterns in the prevalence and diversity of tick-borne *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. in an urban temperate forest in south western Slovakia. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2018**, *15*, 994. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050994>
33. Vaculová, T.; Derdáková, M.; Špitalská, E.; Václav, R.; Chvostáč, M.; Rusňáková Tarageľová, V. Simultaneous occurrence of *Borrelia miyamotoi*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in urban foci in Bratislava, Slovakia. *Acta Parasitol.* **2019**, *64*, 19-30. <https://doi.org/10.2478/s11686-018-00004-w>
34. Pangráčová, L.; Derdáková, M.; Pekárik, L.; Hviščová, I.; Víchová, B.; Stanko, M.; Hlavatá, H.; Peťko, B. *Ixodes ricinus* abundance and its infection with the tick-borne pathogens in urban and suburban areas of Eastern Slovakia. *Parasites Vectors* **2013**, *16*, 238. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-238>
35. Pejchalová, K.; Žakovská A.; Mejzlíková, M.; Halouzka, J.; Dendis, M. Isolation, cultivation and identification of *Borrelia burgdorferi* genospecies from *Ixodes ricinus* ticks from the city of Brno, Czech Republic. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2007**, *14*, 75–79.
36. Venclíková, K.; Mendel, J.; Betášová, L.; Blažejová, H.; Jedličková, P.; Straková, P.;

- Hubálek, Z.; Rudolf, I. Neglected tick-borne pathogens in the Czech Republic, 2011-2014. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016, 7, 107-112. <https://10.1016/j.ttbdis.2015.09.004>
37. Žygutienė, M.; Alekseev, A.; Dubinina, H.; Kazlauskienė, R. Evidence for a risk of tick borne infection in the city parks of Vilnius, Lithuania. *Ekologija* 2008, 54, 40–43. <https://doi.org/10.2478/V10055-008-0008-y>
38. Glass, A.; Springer, A.; Raulf, M.K.; Fingerle, V.; Strube, C. 15-year *Borrelia* prevalence and species distribution monitoring in *Ixodes ricinus/inopinatus* populations in the city of Hanover, Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 2023, 14, 102074. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102074>
39. Stańczak, J.; Gabre, R.M.; Kruminis-Łozowska, W.; Racewicz, M.; Kubica-Biernat, B. *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2004, 11, 109–114.
40. Kubiak, K.; Dziekońska-Rynko, J.; Szymańska, H.; Kubiak, D.; Dmitryjuk, M.; Dzika, E. Questing *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Borrelia miyamotoi* in an urban area of north-eastern Poland. *Exp. Appl. Acarol.* 2019, 78, 113–126. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00379-z>
41. Grochowska, A.; Dunaj-Małyszko, J.; Pancewicz, S.; Czupryna, P.; Milewski, R.; Majewski, P.; Moniuszko-Malinowska, A. Prevalence of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks collected from recreational areas in northeastern Poland with analysis of environmental factors. *Pathogens.* 2022, 11, 468. <https://doi.org/10.3390/pathogens11040468>
42. Mannelli, A.; Bertolotti, L.; Gern, L.; Gray, J. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe: transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular

processes and effects of climate change. *FEMS Microbiol Rev.* **2015**, *36*, 837-861.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00312.x>

43. Nijhof, A.M.; Bodaan, C.; Postigo, M.; Nieuwenhuijs, H.; Opsteegh, M.; Franssen, L.; Jebbink, F.; Jongejan, F. Ticks and associated pathogens collected from domestic animals in The Netherlands. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2007**, *7*, 585–596.

<https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0130>

44. Kooyman, F.N.J.; Zweerus, H.; Nijse, E.R.; Jongejan, F.; Wagenaar, J.A.; Broens, E.M. Monitoring of ticks and their pathogens from companion animals obtained by the “tekenscanner” application in The Netherlands. *Parasitol Res.* **2022**, *121*, 1887–1893.

<https://doi.org/10.1007/s00436-022-07518-3>

45. Leschnik, M.W.; Khanakah, G.; Duscher, G.; Wille-Piazzai, W.; Hörweg, C.; Joachim, A.; Stanek G. Species, developmental stage and infection with microbial pathogens of engorged ticks removed from dogs and questing ticks. *Med. Vet. Entomol.* **2012**, *26*, 440–446. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01036.x>

46. Jenkins, A.; Hvidsten, D.; Matussek, A.; Lindgren, P-E.; Stuen, S.; Kristiansen, B-E. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Norway: evaluation of a PCR test targeting the chromosomal *flaB* gene. *Exp Appl Acarol.* **2012**, *58*, 431-439.

<https://doi.org/10.1007/s10493-012-9585-2>.

47. Schreiber, C.; Krücken, J.; Beck, S.; Maaz, D.; Pachnicke, S.; Krieger, K.; Gross, M.; Kohn, B.; von Samson-Himmelstjerna, G. Pathogens in ticks collected from dogs in Berlin/Brandenburg, Germany. *Parasites Vectors* **2014**, *14*, 535.

48. Stensvold, C.R.; Al Marai, D.; Andersen, L.O.; Krogfelt, K.A.; Jensen, J.S.; Larsen, K.S.; Nielsen, H.V. *Babesia* spp. and other pathogens in ticks recovered from domestic dogs in Denmark. *Parasites Vectors* **2015**, *8*, 262.

<https://doi.org/10.1186/s13071-015-0843-0>

49. Namina, A.; Capligina, V.; Seleznova, M.; Krumins, R.; Aleinikova, D.; Kivrane, A.; Akopjana, S.; Lazovska, M.; Berzina, I.; Ranka, R. Tick-borne pathogens in ticks collected from dogs, Latvia, 2011–2016. *BMC Vet. Res.* **2019**, *15*, 398. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2149-5>
50. Zakham, F.; Korhonen, E.M.; Puonti, P.T.; Castrén, R.S.; Uusitalo, R.; Smura, T.; Kant, R.; Vapalahti, O.; Sironen, T.; Kinnunen, P.M. Molecular detection of pathogens from ticks collected from dogs and cats at veterinary clinics in Finland. *Parasites Vectors* **2023**, *16*, 327. <https://doi.org/10.1186/s13071-023-05864-4>
51. Król, N.; Obiegala, A.; Pfeiffer, M.; Lonc, E.; Kiewra, D. Detection of selected pathogens in ticks collected from cats and dogs in the Wrocław agglomeration, South-West Poland. *Parasites Vectors* **2016**, *9*, 351. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1632-0>
52. Michalski, M.M.; Kubiak, K.; Szczotko, M.; Chajęcka, M.; Dmitryjuk, M. Molecular detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in ticks collected from dogs in urban areas of north-eastern Poland. *Pathogens* **2020**, *9*, 455. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060455>
53. Strnad, M.; Honig, V.; Ruzek, D.; Grubhoffer, L.; Rego, R.O.M. Europe-wide meta-analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato prevalence in questing *Ixodes ricinus* ticks. *Appl. Environ. Microbiol.* **2017**, *83*, e00609-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00609-17>
54. Skotarczak, B. The role of companion animals in the environmental circulation of tick-borne bacterial pathogens. *Ann Agric Environ Med.* **2018**, *25*, 473-480. <https://doi.org/10.26444/aaem/93381>
55. Vogt, N.A. Lyme borreliosis in animals. In: Merck Veterinary Manual. www.merckvetmanual.com/generalized-conditions/lyme-borreliosis/lyme-borreliosis-

56. Hanincová, K.; Schäfer, SM.; Etti, S.; Sewell, H.S.; Taragelová, V., Ziak, D.; Labuda, M.; Kurtenbach, K. Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. *Parasitology* **2003**, *126*, 11–20. <https://doi.org/10.1017/S0031182002002548>
57. Richter, D.; Schlee, D.B.; Matuschka, F.R. Reservoir competence of various rodents for the Lyme disease spirochete *Borrelia spielmanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 3565–3570. <https://doi.org/10.1128/AEM.00022-11>
58. Skuballa, J.; Petney, T.; Pfaffle, M.; Oehme, R.; Hartelt, K.; Fingerle, V.; Kimmig, P.; Taraschewski, H. Occurrence of different *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies including *B. afzelii*, *B. bavariensis*, and *B. spielmanii* in hedgehogs (*Erinaceus* spp.) in Europe. *Ticks Tick Borne Dis.* **2012**, *3*, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2011.09.008>.
59. Michalik, J.; Wodecka, B.; Skoracki, M.; Sikora, B.; Stańczak, J. Prevalence of avian-associated *Borrelia burgdorferi* s.l. genospecies in *Ixodes ricinus* ticks collected from blackbirds (*Turdus merula*) and song thrushes (*T. philomelos*). *Int. J. Med. Microbiol.* **2008**, *298* (Suppl. 1), 129–138.
60. Richter, D.; Matuschka, FR. Perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia lusitaniae* by lizards. *Appl Environ Microbiol.* **2006**, *72*, 4627–4632.
61. Onyiche, T.E.; Răileanu, C.; Fischer, S.; Silaghi, C. Global distribution of *Babesia* species in questing ticks: a systematic review and meta-analysis based on published literature. *Pathogens* **2021**, *10*, 230. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020230>
62. Stańczak, J.; Cieniuch, S.; Lass, A.; Biernat, B.; Racewicz, M. Detection and quantification of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks from urban and rural environment, northern Poland, by real-time polymerase chain reaction. *Exp. Appl. Acarol.* **2015**, *66*, 63–81. <https://doi.org/10.1007/s10493-015->

63. Schorn, S.; Pfister, K.; Reulen, H.; Mahling, M.; Silaghi, C. Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Parasites Vectors* **2011**, *4*, 135.
64. Welc-Fałęciak, R.; Bajer, A.; Paziewska-Harris A.; Baumann-Popczyk, A.; Siński, E. Diversity of *Babesia* in *Ixodes ricinus* ticks in Poland. *Adv Med Sci.* **2012**, *57*, 364–369. <https://doi.org/10.2478/v10039-012-0023-9>
65. Abdullah, S.; Helps, C.; Tasker, S.; Newbury, H., Wall, R. Prevalence and distribution of *Borrelia* and *Babesia* species in ticks feeding on dogs in the UK. *Med. Vet. Entomol.* **2018**, *32*, 14–22. <https://doi.org/10.1111/mve.12257>
66. Asman, M.; Solarz, K.; Cuber, P.; Gasior, T.; Szilman, P.; Szilman, E.; Tondas, E.; Matzullok, A.; Kusion, N.; Florek, K. Detection of protozoans *Babesia microti* and *Toxoplasma gondii* and their co-existence in ticks (Acari: Ixodida) collected in Tarnogórski district (Upper Silesia, Poland). *Ann Agric Environ.* **2015**, *22*, 80–83. <https://doi.org/10.5604/12321966.1141373>
67. Karbowski, G. Zoonotic reservoir of *Babesia microti* in Poland. *Pol J Microbiol.* **2004**, *53* (Suppl), 61–65.
68. Cieniuch, S.; Stańczak, J.; Ruczaj, A. The first detection of *Babesia* EU1 and *Babesia canis canis* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) collected in urban and rural areas in northern Poland. *Pol J Microbiol.* **2009**, *58*, 231–236.
69. Hamšíková, Z.; Kazimírová, M.; Haruštiaková, Z.; Kazimírová, M.; Haruštiaková, D.; Mahríková, M.; Slovák, M.; Berthová, L.; Kocianová, E.; Schnittger, L. *Babesia* spp. in ticks and wildlife in different habitat types of Slovakia. *Parasites Vectors* **2016**, *9*, 292. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1560-z>.
70. Rybářová, M.; Honsová, M.; Papoušek, I.; Šíroky, P. Variability of species of *Babesia*

- Starcovici, 1893 in three sympatric ticks (*Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna*) at the edge of Pannonia in the Czech Republic and Slovakia. *Folia Parasitol.* **2017**, *64*, 028. <https://doi.org/10.14411/fp.2017.028>
71. Adaszek, Ł.; Winiarczyk, S. Molecular characterization of *Babesia canis canis* isolates from naturally infected dogs in Poland. *Vet. Parasitol.* **2008**, *52*, 235–241. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.024>
72. Livanova, N.N.; Fomenko, N.V.; Akimov, I.A.; Ivanov, M.J.; Tikunova, N.V.; Armstrong, R.; Konyaev, S.V. 2018. Dog survey in Russian veterinary hospitals: tick identification and molecular detection of tick-borne pathogens. *Parasites Vectors* **2018**, *11*, 591. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3161-5>
73. Zygnier, W.; Bąska, P.; Wiśniewski, M.; Wędrychowicz, H. The molecular evidence of *Babesia microti* in hard ticks removed from dogs in Warsaw. *Pol J Microbiol.* **2010**, *59*, 95–7.
74. Kocoń, A.; Asman, M.; Nowak-Chmura, M.; Witecka, J.; Rączka, G. Exposure of domestic dogs and cats to ticks (Acari: Ixodida) and selected tick-borne diseases in urban and recreational areas in southern Poland. *Sci Rep.* **2022**, *12*, 7851. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11973-4>
75. Sytykiewicz, H.; Karbowski, G.; Hapunik, J.; Szpechciński, A.; Supergan-Marwicz, M.; Goławska, S.; Sprawka, I.; Czerniewicz, P. Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* co-infections in *Ixodes ricinus* ticks in central-eastern region of Poland. *Ann Agric Environ Med.* **2012**, *19*, 45–49.
76. Asman, M.; Solarz, K.; Szilman, E.; Szilman, P.; Sikora, B.; Jakubas-Zawalska, J. The occurrence of three tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks collected from the area of the Kraków-Częstochowa Upland (Southern Poland). *Acarologia* **2018**, *58*, 967–975. <https://doi.org/10.24349/acarologia/20184301>

77. Hildebrandt, A.; Gray, J.; Montero, E. Characteristics of Human Babesiosis in Europe. *Pathogens* **2023**, *12*, 323. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020323>
78. Goethert, H.K. What *Babesia microti* is now. *Pathogens* **2021**, *10*, 1168. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091168>
79. Moniuszko-Malinowska, A.; Święcicka, I.; Dunaj, J.; Zajkowska, J.; Czupryna, P.; Zambrowski, G.; Chmielewska-Badora, J.; Żukiewicz-Sobczak, W.; Swierzbńska, R.; Rutkowski, K.; et al. Infection with *Babesia microti* in humans with non-specific symptoms in North East Poland. *Infect. Dis. Lond. Engl.* **2016**, *48*, 537–543. <http://dx.doi.org/10.3109/23744235.2016.1164339>
80. Arsuaga, M.; Gonzalez, L.M.; Lobo, C.A.; de la Calle, F.; Bautista, J.M.; Azcárate, I.G.; Puente, S.; Montero, E. First report of *Babesia microti*-caused babesiosis in Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2016**, *16*, 677–679. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1946>
81. Welc-Fałęciak, R.; Pawełczyk, A.; Radkowski, M.; Pancewicz, S.A.; Zajkowska, J.; Siński, E. First report of two asymptomatic cases of human infection with *Babesia microti* (Franca, 1910) in Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2015**, *22*, 51–54. <https://doi.org/10.5604/12321966.1141394>
82. Pawełczyk, A.; Bednarska, M.; Hamera, A.; Religa, E.; Poryszewska, M.; Mierzejewska, E.J.; Welc-Fałęciak, R. Long-term study of *Borrelia* and *Babesia* prevalence and co-infection in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks removed from humans in Poland, 2016–2019. *Parasites Vectors* **2021**, *14*, 348. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04849-5>
83. Herwaldt, B.L.; Cacció, S.; Gherlinzoni, F.; Aspöck, H.; Slemenda, S.B.; Piccaluga, P.; Martinelli, G.; Edelhofer, R.; Hollenstein, U.; Poletti, G.; Pampiglione, S., Löschenberger, K., Tura, S., Pieniazek, N.J. Molecular characterization of a non-

- Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, *9*, 942–948. <https://doi.org/10.3201/eid0908.020748>
84. Rozej-Bielicka, W.; Masny, A.; Gołąb, E. High-resolution melting PCR assay, applicable for diagnostics and screening studies, allowing detection and differentiation of several *Babesia* spp. infecting humans and animals. *Parasitol Res.* **2017**, *116*, 2671–2681. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5576-x>
85. Skotarczak, B.; Wodecka, B.; Cichocka, A. Coexistence DNA of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks from north-western Poland. *Ann Agric Environ Med.* **2002**, *9*, 25–8.
86. Sawczyn-Domańska, A.; Zwoliński, J.; Kloc, A.; Wójcik-Fatla, A. Prevalence of *Borrelia*, *Neoehrlichia mikurensis* and *Babesia* in ticks collected from vegetation in Eastern Poland. *Exp. App. Acarol.* **2023**, *90*, 409–428. <https://doi.org/10.1007/s10493-023-00818-y>
87. Kubiak, K.; Dmitryjuk, M.; Dziekońska-Rynko, J.; Siejwa, P.; Dzika, E. The risk of exposure to ticks and tick-borne pathogens in a spa town in northern Poland. *Pathogens* **2022**, *11*, 542. <https://doi.org/10.3390/pathogens11050542>.
88. Miron, L.D.; Ciuca, L.; Ilie, C.; Potoroaca, A.; Lazăr, C.; Martinescu, G.-V. Co-Infection with *Babesia canis* and *Borrelia burgdorferi* s.l. in a dog from Northeastern Romania: A case report. *JALSE.* **2022**, *54*, 439–449. <https://doi.org/10.46909/journalalse-2021-038>
89. Hildebrandt, A.; Pauliks, K.; Sachse, S.; Straube, E. Coexistence of *Borrelia* spp. and *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* Ticks in Middle Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2010**, *10*, 831–837. <http://doi.org/10.1089/vbz.2009.0202>
90. Meer-Scherrer, L.; Adelson, M.; Mordechai, E.; Lottaz, B.; Tilton Meer-Scherrer, R. *Babesia microti* Infection in Europe. *Curr Microbiol.* **2004**, *48*, 435–437.

<https://doi.org/10.1007/s00284-003-4238-7>

91. Dunaj, J.; Moniuszko-Malinowska, A.; Swiecicka, I.; Andersson, M.; Czupryna, P.; Rutkowski, K.; Zambrowski, G.; Zajkowska, J.; Grygorczuk, S.; Kondrusik, M.; et al. Tick-borne infections and co-infections in patients with non-specific symptoms in Poland. *Adv Med Sci.* **2018**, *63*, 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.09.004>
92. Jabłońska, J.; Żarnowska-Prymek, H.; Stańczak, J.; Kozłowska, J.; Wiercińska-Drapało, A. Symptomatic coinfection with *Babesia microti* and *Borrelia burgdorferi* in patient after international exposure; a challenging case in Poland. *Ann Agric Environ Med.* **2016**, *23*, 387–389. <https://doi.org/10.5604/12321966.1203914>.
93. Welc-Falęciak, R.; Hildebrandt, A.; Siński E. Coinfection with *Borrelia* species and other tick-borne pathogens in humans: two cases from Poland. *Ann Agric Environ Med.* **2010**, *17*, 309–313.
94. Pańczuk, A.; Tokarska-Rodak, M.; Koziół-Montewka, M.; Plewik, D. The incidence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* coinfections among foresters and farmers in eastern Poland. *J Vector Borne Dis.* **2016**, *53*, 348-354.
95. Cosson, J.F.; Michelet, L.; Chotte, J.; Le Naour E.; Cote, M.; Devillers, E.; Poulle, L.M.; Huet, D.; Galan, M.; Geller, J.; et al. Genetic characterization of the human relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in vectors and animal reservoirs of Lyme disease spirochetes in France. *Parasit. Vectors* **2014**, *7*, 233.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-233>

Table 1. The prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Babesia* spp. in single and double infections found in 1029 host-seeking *I. ricinus* ticks collected in urban areas of the city of Poznań.

	Females	Males	Nymphs	TOTAL
<i>Borrelia</i> spp.				
<i>B. afzelii</i>	10	17	11	38 (3.7)
<i>B. garinii</i>	19	8	11	38 (3.7)
<i>B. lusitaniae</i>	2	0	7	9 (0.9)
<i>B. valaisianae</i>	2	1	0	3 (0.3)
<i>Borrelia</i> spp.	1	1	0	2 (0.2)
Total	34/289 (11.8)	27/280 (9.6)	29/460 (6.3)	90/1029 (8.7)
<i>Babesia</i> spp.				
<i>Babesia microti</i>	10	9	8	27 (2.6)
<i>Babesia canis</i>	8	3	3	14 (1.4)
<i>Babesia venatorum</i>	3	1	0	4 (0.4)
Total	21/289 (7.3)	13/280 (4.6)	11/460 (2.4)	45/1029 (4.4)
<i>co-infections</i>				
<i>B. afzelii</i> + <i>Ba. canis</i>	1	3	0	4 (0.4)
<i>B. garinii</i> + <i>Ba. canis</i>	1	3	0	4 (0.4)
<i>B. lusitaniae</i> + <i>Ba. venatorum</i>	2	0	0	2 (0.2)
<i>B. lusitaniae</i> + <i>Ba. microti</i>	1	0	0	1 (0.1)
Total	5	6	0	11/1029 (1.1)

Table 2. The prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Babesia* spp. in single and double infections found in 1268 feeding *I. ricinus* female ticks removed from three groups of pet animals surveyed in veterinary clinics of the city of Poznań.

	Dogs (n= 609)	Cats (n=117)	Undefined hosts (n=389)	TOTAL
<i>Borrelia</i> spp.				
<i>B. afzelii</i>	26 (3,7)	5 (3,3)	16 (4,0)	47 (3,7)
<i>B. garinii</i>	4 (0,6)	0	3 (0,7)	7 (0,6)
<i>B. spielmanii</i>	3 (0,4)	0	0	3 (0,2)
<i>B. lusitaniae</i>	1 (0,1)	0	0	1 (0,1)
<i>B. valaisiana</i>	0	0	1	1 (0,1)
Total	34/711 (4,8)	5/153 (3,3)	20/404 (5,0)	59/1268 (4,7)
<i>Babesia</i> spp.				
<i>Babesia canis</i>	23 (3,2)	1 (0,7)	11 (2,7)	35 (2,8)
<i>Babesia microti</i>	18 (2,5)	2 (1,3)	8 (2,0)	28 (2,2)
<i>Babesia venatorum</i>	7 (1,0)	3 (2,0)	3 (0,7)	13 (1,0)
Total	48/711 (6,8)	6/153 (3,9)	22/404 (5,7)	76/1268 (6,0)
<i>co-infections</i>				
<i>B. afzelii</i> + <i>Ba. microti</i>	5	0	5	10 (0,8)
<i>B. spielmanii</i> + <i>Ba. microti</i>	1	0	0	1 (0,1)
<i>B. garinii</i> + <i>Ba. microti</i>	0	0	1	1 (0,1)
<i>B. garinii</i> + <i>Ba. canis</i>	0	1	0	1 (0,1)
Total	6	1	6	13/1268 (1,0)

Table S1. Sequences of the V4 16S rDNA region used in this study.

Species	GenBank acc. no.
ASV01	this study
ASV02	this study
ASV03	this study
ASV04	this study
ASV05	this study
ASV06	this study
ASV07	this study
ASV08	this study
ASV09	this study
ASV10	this study
ASV11	this study
ASV12	this study
ASV14	this study
ASV15	this study
ASV16	this study
ASV17	this study
ASV18	this study
ASV19	this study
<i>B. afzelii</i>	CP075440
<i>B. afzelii</i>	NZ_CP009212
<i>B. anserina</i>	CP013704
<i>B. bavariensis</i>	NC_6156
<i>B. bissettae</i>	CP002746
<i>B. carolinensis</i>	NZ_CP132445
<i>B. carolinensis</i>	NZ_CP132465
<i>B. chilensis</i>	CP009910
<i>B. coriaceae</i>	NZ_CP005745
<i>B. crocidurae</i>	NZ_CP004267
<i>B. duttonii</i>	NZ_AZIT01000001
<i>B. garinii</i>	CP075451
<i>B. garinii</i>	NZ_CP028861
<i>B. garinii</i> subsp. <i>bavariensis</i>	NR_178227
<i>B. hermsii</i>	NZ_CP011060
<i>B. lusitaniae</i>	NZ_CP124050
<i>B. maritima</i>	NZ_CP044535
<i>B. miyamotoi</i>	this study
<i>B. miyamotoi</i>	this study
<i>B. miyamotoi</i>	this study
<i>B. miyamotoi</i>	CP004217
<i>B. parkeri</i>	NZ_CP007022
<i>B. recurrentis</i>	NC_11244

<i>B. spielmanii</i>	NZ_CP124042
<i>B. turcica</i>	NZ_CP028884
<i>B. turicatae</i>	NC_8710
<i>B. valaisiana</i>	NZ_ABCY02000001
<i>B. valaisiana</i>	U78154
<i>B. valaisiana</i>	U78155
<i>B. yangtzensis</i>	CP124002
<i>Borrelia</i> sp.	AY570512

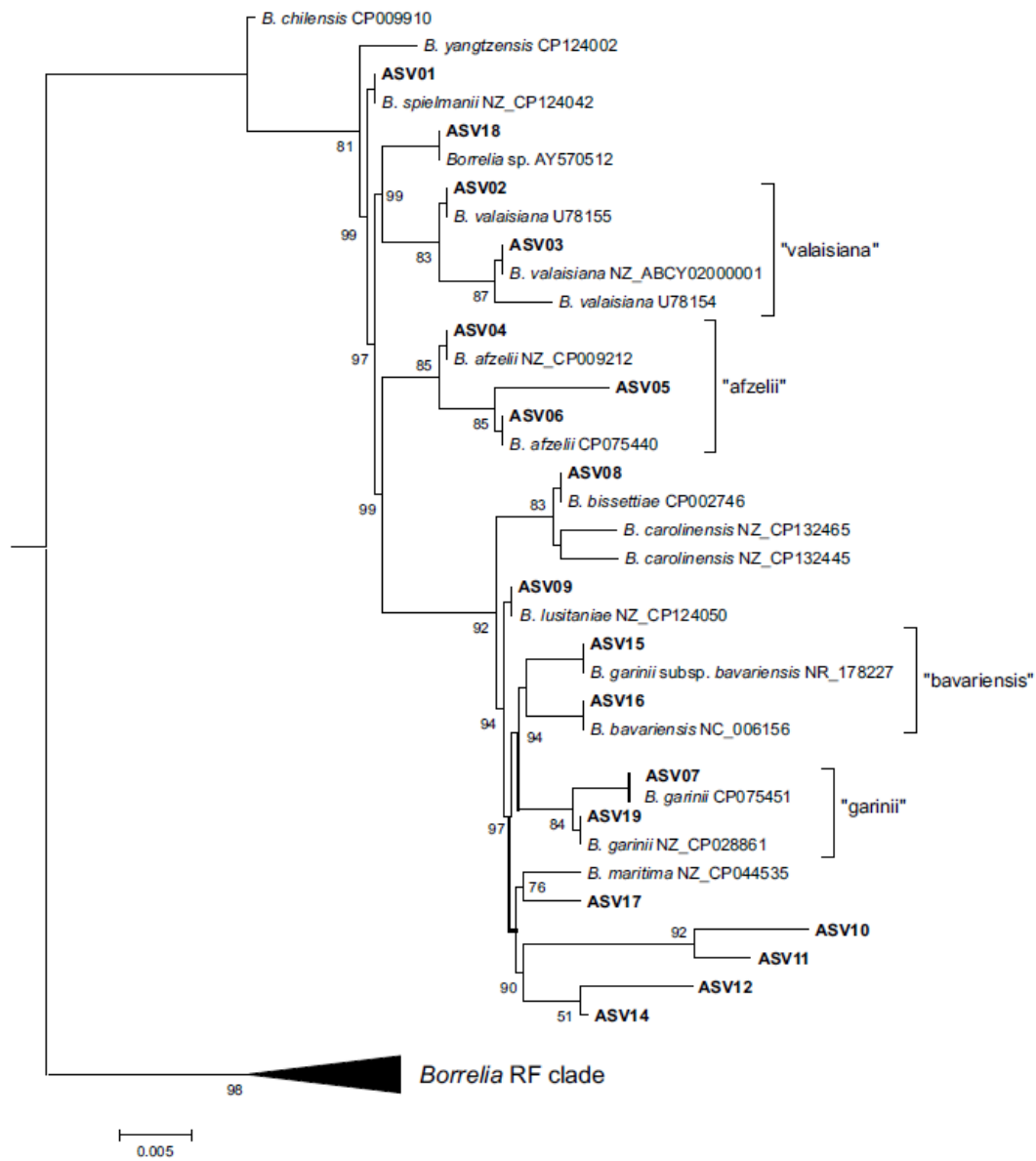


Figure 1. Phylogenetic analysis of amplicon sequence variants (ASV) of the V4 16S rRNA gene found in this study (ASV1-ASV19). The tree was constructed by FastTree method as described in Materials and Methods section.

9. Oświadczenia o wkładzie w powstawanie artykułów

OŚWIADCZENIE OKREŚLAJĄCE WKŁAD W POWSTANIE ARTYKULU

Poznań, dnia 19.02.2024

Mgr Justyna Liberska
Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

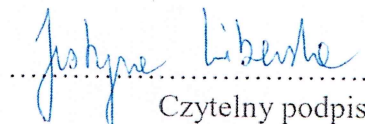
Niniejszym oświadczam, że mój wkład merytoryczny w pracę:

Liberska J, Michalik J, Pers-Kamezczyk E, Wierzbicka A, Lane RS, Rączka G, Opalińska P, Skorupski M, Dabert M. Prevalence of *Babesia canis* DNA in *Ixodes ricinus* ticks collected in forest and urban ecosystems in west-central Poland. Ticks Tick Borne Dis. 2021 Sep;12(5):101786. doi: 10.1016/j.ttbdis.2021.101786. Epub 2021 Jul 12. PMID: 34280697

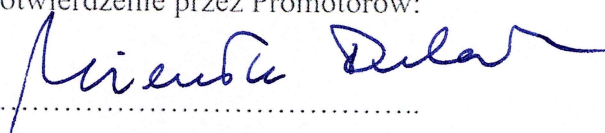
obejmował:

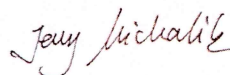
Sformułowanie hipotezy badawczej, pozyskiwanie materiału z terenów rekreacyjnych Poznania, założenie i prowadzenie bazy danych, przeprowadzenie identyfikacji gatunkowej kleszczy metodami morfologicznymi oraz molekularnymi oraz izolacji DNA z kleszczy pozyskanych z terenów rekreacyjnych Poznania, testowanie i dostosowanie warunków detekcji *Babesia* sp. za pomocą metod molekularnych, przeprowadzenie identyfikacji *Babesia* sp. z uzyskanych kleszczy, dokonanie interpretacji wyników, pozyskanie funduszy na badania i przygotowanie manuskryptu.

Mój całkowity wkład w pracę wynosił 60%.


Czytelny podpis

Potwierdzenie przez Promotorów:





OŚWIADCZENIE OKREŚLAJĄCE WKŁAD W POWSTANIE ARTYKUŁU

Poznań, dnia 19.02.2024

Prof. UAM dr hab. Jerzy Michalik
Zakład Morfologii Zwierząt
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

Niniejszym oświadczam, że mój wkład merytoryczny w pracę:

Liberska J, Michalik J, Pers-Kamczyc E, Wierzbička A, Lane RS, Rączka G, Opalińska P, Skorupski M, Dabert M. Prevalence of *Babesia canis* DNA in *Ixodes ricinus* ticks collected in forest and urban ecosystems in west-central Poland. Ticks Tick Borne Dis. 2021. 5, 101786. doi: 10.1016/j.ttbdis.2021.101786. Epub 2021 Jul 12. PMID: 34280697

obejmował:

Zaproponowanie koncepcji, wykonanie analiz statystycznych, branie udziału w przygotowaniu manuskryptu.

Mój całkowity wkład w pracę wynosił 5%.



.....

Czytelny podpis

OŚWIADCZENIE OKREŚLAJĄCE WKŁAD W POWSTANIE ARTYKUŁU

Poznań, dnia 20.02.2024

Prof. UAM dr hab. Mirosława Dabert
Laboratorium Technik Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

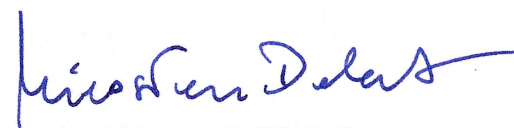
Niniejszym oświadczam, że mój wkład merytoryczny w pracę:

Liberska J, Michalik J, Pers-Kamczyc E, Wierzbicka A, Lane RS, Rączka G, Opalińska P, Skorupski M, Dabert M. Prevalence of *Babesia canis* DNA in *Ixodes ricinus* ticks collected in forest and urban ecosystems in west-central Poland. Ticks Tick Borne Dis. 2021 Sep;12(5):101786. doi: 10.1016/j.ttbdis.2021.101786. Epub 2021 Jul 12. PMID: 34280697

obejmował:

Opracowanie metodyki oraz walidację badań, zaproponowanie koncepcji oraz branie udziału w przygotowaniu manuskryptu (autor korespondencyjny).

Mój całkowity wkład w pracę wynosił 5%.



.....
Czytelny podpis

OŚWIADCZENIE OKREŚLAJĄCE WKŁAD W POWSTANIE ARTYKUŁU

Poznań, dnia 20.02.2021r.

Dr inż. Patrycja Opalińska

Katedra Łowiectwa i Ochrony Lasu
Wydział Leśny
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wojska Polskiego 71 D
60-625 Poznań

Niniejszym oświadczam, że mój wkład merytoryczny w pracę:

Liberska J, Michalik J, Pers-Kamczyc E, Wierzbicka A, Lane RS, Rączka G, Opalińska P, Skorupski M, Dabert M. Prevalence of *Babesia canis* DNA in *Ixodes ricinus* ticks collected in forest and urban ecosystems in west-central Poland. Ticks Tick Borne Dis. 2021 Sep;12(5):101786. doi: 10.1016/j.ttbdis.2021.101786. Epub 2021 Jul 12. PMID: 34280697

obejmował:

Pozyskiwanie materiału badawczego z terenów leśnych oraz branie udziału w przygotowaniu manuskryptu.

Mój całkowity wkład w pracę wynosił 5%.


.....
Czytelny podpis

OŚWIADCZENIE OKREŚLAJĄCE WKŁAD W POWSTANIE ARTYKUŁU

Poznań, dnia 19 lutego 2024 r.

Dr hab. inż. Emilia Pers-Kamczyc
Instytut Dendrologii Polskiej Akademii Nauk
ul. Parkowa 5
62-035 Kórnik

Niniejszym oświadczam, że mój wkład merytoryczny w pracę:

Liberska J, Michalik J, Pers-Kamczyc E, Wierzbicka A, Lane RS, Rączka G, Opalińska P, Skorupski M, Dabert M. Prevalence of *Babesia canis* DNA in *Ixodes ricinus* ticks collected in forest and urban ecosystems in west-central Poland. Ticks Tick Borne Dis. 2021 Sep;12(5):101786. doi: 10.1016/j.ttbdis.2021.101786. Epub 2021 Jul 12. PMID: 34280697

obejmował:

Przeprowadzenie izolacji DNA z kleszczy pozyskanych z terenów leśnych, pozyskanie funduszy na badania oraz branie udziału w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój całkowity wkład w pracę wynosił 5%.

Emilia PersKamczyc

.....
Czytelny podpis

OŚWIADCZENIE OKREŚLAJĄCE WKŁAD W POWSTANIE ARTYKUŁU

Poznań, dnia 19.02.24

Dr inż. Anna Wierzbicka

Katedra Łowiectwa i Ochrony Lasu
Wydział Leśny i Technologii Drewna
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wojska Polskiego 71 D
60-625 Poznań

Niniejszym oświadczam, że mój wkład merytoryczny w pracę:

Liberska J, Michalik J, Pers-Kamczyc E, Wierzbicka A, Lane RS, Rączka G, Opalińska P, Skorupski M, Dabert M. Prevalence of *Babesia canis* DNA in *Ixodes ricinus* ticks collected in forest and urban ecosystems in west-central Poland. Ticks Tick Borne Dis. 2021 Sep;12(5):101786. doi: 10.1016/j.ttbdis.2021.101786. Epub 2021 Jul 12. PMID: 34280697

obejmował:

Pozyskiwanie materiału badawczego z terenów leśnych oraz branie udziału w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój całkowity wkład w pracę wynosił 5%.


Czytelny podpis

OŚWIADCZENIE OKREŚLAJĄCE WKŁAD W POWSTANIE ARTYKUŁU

Poznań, dnia 5.01.24

Dr inż. Grzegorz Rączka
Katedra Urządzania Lasu
Wydział Leśny i Technologii Drewna
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wojska Polskiego 71 D
60-625 Poznań


Niniejszym oświadczam, że mój wkład merytoryczny w pracę:

Liberska J, Michalik J, Pers-Kamczyc E, Wierzbicka A, Lane RS, Rączka G, Opalińska P, Skorupski M, Dabert M. Prevalence of *Babesia canis* DNA in *Ixodes ricinus* ticks collected in forest and urban ecosystems in west-central Poland. Ticks Tick Borne Dis. 2021 Sep;12(5):101786. doi: 10.1016/j.ttbdis.2021.101786. Epub 2021 Jul 12. PMID: 34280697

obejmował:

Pozyskiwanie materiału badawczego z terenów leśnych oraz branie udziału w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój całkowity wkład w pracę wynosił 5%.



.....
Czytelny podpis

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA PUBLIKACJI

Poznań, dnia ..19.02.2024.

Mgr Justyna Liberska
Laboratorium Technik Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

Niniejszym oświadczam, że mój wkład merytoryczny w pracę:

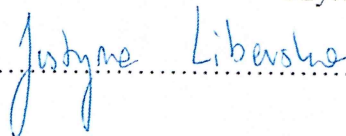
**Liberska, J.A., Michalik, J.F., Dabert, M. 2023. Exposure of dogs and cats to *Borrelia miyamotoi* infected *Ixodes ricinus* ticks in urban areas of the city of Poznań, west-central Poland. Ticks Tick Borne Dis. Jul;14(4):102188.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102188>.**

obejmował:

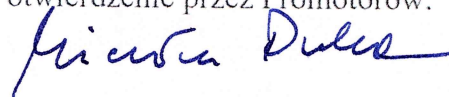
Sformułowanie hipotezy badawczej, pozyskiwanie materiału z terenów rekreacyjnych Poznania, założenie i prowadzenie bazy danych, przeprowadzenie identyfikacji gatunkowej kleszczy metodami morfologicznymi oraz molekularnymi oraz wykonanie izolacji DNA z kleszczy pozyskanych z terenów rekreacyjnych Poznania oraz ze zwierząt towarzyszących, testowanie i dostosowanie warunków detekcji *Borrelia* sp. za pomocą metod molekularnych, przeprowadzenie identyfikacji *Borrelia miyamotoi* w zebranych kleszczach, dokonanie interpretacji wyników oraz przygotowanie manuskryptu (autor korespondencyjny).

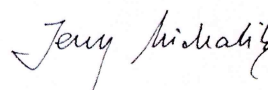
Mój całkowity wkład w pracę wynosił 70%.

Czytelny podpis:

.....


Potwierdzenie przez Promotorów:

.....


.....


OŚWIADCZENIE OKREŚLAJĄCE WKŁAD W POWSTANIE ARTYKUŁU

Poznań, dnia 19.02.2024

Prof. UAM dr hab. Jerzy Michalik
Zakład Morfologii Zwierząt
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

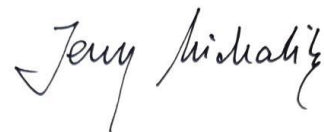
Niniejszym oświadczam, że mój wkład merytoryczny w pracę:

Liberska, J.A., Michalik, J.F., Dabert, M. 2023. Exposure of dogs and cats to *Borrelia miyamotoi* infected *Ixodes ricinus* ticks in urban areas of the city of Poznań, west-central Poland. Ticks Tick Borne Dis. 4, 102188.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102188>.

obejmował:

Zaproponowanie koncepcji, wykonanie analiz statystycznych, branie udziału w przygotowaniu manuskryptu.

Mój całkowity wkład w pracę wynosił 15%.



.....
Czytelny podpis

OŚWIADCZENIE OKREŚLAJĄCE WKŁAD W POWSTANIE ARTYKUŁU

Poznań, dnia 20.02.2024

Prof. UAM dr hab. Mirosława Dabert
Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

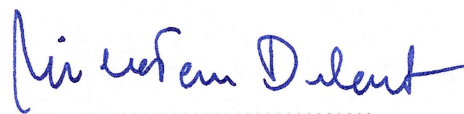
Niniejszym oświadczam, że mój wkład merytoryczny w pracę:

**Liberska, J.A., Michalik, J.F., Dabert, M. 2023. Exposure of dogs and cats to *Borrelia miyamotoi* infected *Ixodes ricinus* ticks in urban areas of the city of Poznań, west-central Poland. Ticks Tick Borne Dis. Jul;14(4):102188.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102188>.**

obejmował:

Opracowanie metodyki oraz walidację badań, pozyskanie funduszy na badania oraz branie udziału w przygotowaniu manuskryptu.

Mój całkowity wkład w pracę wynosił 15%.



.....
Czytelny podpis

OŚWIADCZENIE WSPÓLAUTORA PUBLIKACJI

Poznań, dnia 19.02.2024.....

Mgr Justyna Liberska
Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

Niniejszym oświadczam, że mój wkład merytoryczny w pracę:

Co-occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* spp. DNA in *Ixodes ricinus* ticks collected from vegetation and pets in the city of Poznan, Poland.

obejmował:

Sformułowanie hipotezy badawczej, pozyskiwanie materiału z terenów rekreacyjnych Poznania, założenie i prowadzenie bazy danych, przeprowadzenie identyfikacji gatunkowej kleszczy metodami morfologicznymi oraz molekularnymi oraz izolacji DNA z kleszczy pozyskanych z terenów rekreacyjnych Poznania oraz ze zwierząt towarzyszących, testowanie i dostosowanie warunków detekcji *Babesia* sp. oraz *Borrelia burgdorferi* s.l. za pomocą metod molekularnych, przeprowadzenie identyfikacji *Babesia* sp. oraz *Borrelia burgdorferi* s.l. w zebranych kleszczach, dokonanie interpretacji wyników i przygotowanie manuskryptu (autor korespondencyjny).

Mój całkowity wkład w pracę wyniósł 70%.

Czytelny podpis:

.....
Justyna Liberska
.....

Potwierdzenie przez Promotorów:

.....
Miroslaw Deler
.....

.....
Jenny Michalitz
.....

OŚWIADCZENIE OKREŚLAJĄCE WKŁAD W POWSTANIE ARTYKUŁU

Poznań, dnia 19.02.2024

Prof. UAM dr hab. Jerzy Michalik
Zakład Morfologii Zwierząt
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

Niniejszym oświadczam, że mój wkład merytoryczny w pracę:

Co-occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* spp. DNA in *Ixodes ricinus* ticks collected from vegetation and pets in the city of Poznan, Poland

obejmował:

Zaproponowanie koncepcji, wykonanie analiz statystycznych, branie udziału w przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Mój całkowity wkład w pracę wynosił 15%.



.....
Czytelny podpis

OŚWIADCZENIE OKREŚLAJĄCE WKŁAD W POWSTANIE ARTYKUŁU

Poznań, dnia 20.02.2024

Prof. UAM dr hab. Mirosława Dabert
Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

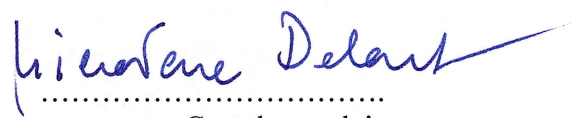
Niniejszym oświadczam, że mój wkład merytoryczny w pracę:

Co-occurrence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Babesia* spp. DNA in *Ixodes ricinus* ticks collected from vegetation and pets in the city of Poznan, Poland

obejmował:

Opracowanie metodyki oraz walidację badań, zaproponowanie koncepcji,
pozyskanie funduszy na badania oraz branie udziału w przygotowaniu manuskryptu.

Mój całkowity wkład w pracę wynosił 10%.


.....
Czytelny podpis

OŚWIADCZENIE OKREŚLAJĄCE WKŁAD W POWSTANIE ARTYKUŁU

Poznań, dnia 21.02.2024

Mgr Julia Olechnowicz
Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej
Wydział Biologii
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

Niniejszym oświadczam, że mój wkład merytoryczny w pracę:

Co-occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* spp. DNA in *Ixodes ricinus* ticks collected from vegetation and pets in the city of Poznan, Poland

obejmował:

Dokonanie re-analiz, przy użyciu metod molekularnych, potwierdzając obecność DNA *Babesia* sp. oraz *Borrelia* sp. w wytypowanym materiale.

Mój całkowity wkład w pracę wynosił 5%.


.....
Czytelny podpis

10. Materiały dodatkowe

Supplementary Table A.1. List of 18S rRNA gene sequences of *Babesia* spp. used in the phylogenetic analysis.

Species	Host species	Location	Isolate	GenBank	References
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp2C06	MF797821	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp2D01	MF797829	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp2D09	MF797816	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp2H01	MF797815	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp3A04	MF797819	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp3A12	MF797820	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp3D12	MF797826	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp3F06	MF797818	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp3H07	MF797817	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp4A08	MF797822	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp4H09	MF797823	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp5A06	MF797825	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp5E07	MF797824	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp5G04	MF797827	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp5H04	MF797830	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp6G05	MF797828	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp1A01	MW090682	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp1E09	MW090683	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp1E10	MW090684	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp1F09	MW090685	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp1H09	MW090686	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp2A06	MW090687	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp2B02	MW090688	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp2C09	MW090689	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp2C12	MW090690	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp2D06	MW090691	this study

<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp2D10	MW090692	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp2E06	MW090693	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp2E12	MW090694	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp2F10	MW090695	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp2H02	MW090696	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp2H06	MW090697	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp3A02	MW090698	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp3B07	MW090699	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp3C02	MW090700	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp3E07	MW090701	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp3F05	MW090702	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp3H10	MW090703	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp3H11	MW090704	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp4A02	MW090705	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp4A05	MW090706	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp4C01	MW090707	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp4C04	MW090708	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp4C07	MW090709	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp4D05	MW090710	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp4D08	MW090711	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp4E01	MW090712	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp4E02	MW090713	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp4F12	MW090714	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp5H03	MW090715	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp5H10	MW090716	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp6nr16	MW090717	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp6nr28	MW090718	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp6nr39	MW090719	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	EPKp6nr41	MW090720	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	JR158	MT981825	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	JR237	MT981803	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	JR240	MT981804	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	JR241	MT981805	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	JR249	MT981806	this study

<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	JR283_285	MT981807	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	JR317	MT981808	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	JR320	MT981809	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	JR332	MT981810	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	JR338	MT981811	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	JR464_466	MT981812	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	JR467_469	MT981813	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	JR470_472	MT981800	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	JR491	MT981814	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	JR492	MT981815	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	JR518	MT981816	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	JR539	MT981817	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	MAL130_133	MT981818	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	MAL71	MT981819	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	MOR26	MT981802	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	PC40	MT981820	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	PC43	MT981821	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	PC44	MT981822	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	PC51	MT981823	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	PC54	MT981824	this study
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	JR76	MT981826	this study
<i>B. canis</i>	<i>Canis familiaris</i>	Croatia, Poland	Bc1	AY072926	Caccio i wsp. 2002
<i>B. canis</i>	<i>C. familiaris</i>	Croatia, Germany	BCC2	FJ209025	Beck i wsp. 2009
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Czech Republic, Slovakia	5488	KX857483	Rybarova and Siroky 2016
<i>B. canis</i>	<i>C. familiaris</i>	France	Dog#135	KC902833	Rene-Martellet i wsp. 2015
<i>B. canis</i>	<i>Nyctalus noctula</i>	Hungary	E18_typeA	KP835549	Hornok i wsp. 2015
<i>B. canis</i>	<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	Hungary	E21_typeB	KP835550	Hornok i wsp. 2015
<i>B. canis</i>	<i>C. familiaris</i>	Lithuania, Poland	KA13-1	KM111283	Paulauskas i wsp. 2014
<i>B. canis</i>	<i>C. familiaris</i>	Netherlands	2	AY703073	Matjila i wsp. 2005

<i>B. canis</i>	<i>C. familiaris</i>	Netherlands	1	AY703071	Matjila i wsp. 2005
<i>B. canis</i>	<i>C. familiaris</i>	Poland, Germany	1	EU622792	Adaszek and Winiarczyk 2008
<i>B. canis</i>	<i>C. familiaris</i>	Poland	2	EU622793	Adaszek and Winiarczyk 2008
<i>B. canis</i>	<i>C. familiaris</i>	Poland	K035	KT844907	Rozej-Bielicka i wsp. 2015
<i>B. canis</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i>	Poland	331D	KT272401	Mierzejewska i wsp. 2015
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	20-04	GQ325620	Cieniuch i wsp. 2009
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Slovakia	N30B	KU362904	Hamsikova i wsp. 2016
<i>B. canis</i>	<i>I. ricinus</i>	Slovakia	M398B	KU362905	Hamsikova i wsp. 2016
<i>B. canis</i>	<i>Dermacentor reticulatus</i>	Russia	D2	AY649326	Rar i wsp. 2005
<i>B. canis</i>	<i>D. reticulatus</i>	United Kingdom	UK 2016	KY694436	Fernandez de Marco et al 2017
<i>B. bigemina</i>	n/a	Argentina	n/a	HQ688689	Thompson i wsp. 2010
<i>B. canis rossi</i>	<i>Haemaphysalis parva</i>	Turkey	Ba-704	MF040149	Orkun and Karaer 2017
<i>B. canis vogeli</i>	<i>C. familiaris</i>	India	n/a	MG252701	Roopesh i wsp. 2017
<i>B. caperoli/divergens</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	MAL71	MW012667	this study
<i>B. capreoli</i>	<i>Equus caballus</i>	Italy	B5/B6	KX839234	Bassano i wsp. 2016
<i>B. gibsoni</i>	<i>C. familiaris</i>	Romania	11	JX110650	Imre i wsp. 2013
<i>B. divergens</i>	<i>Homo sapiens</i>	China	clone x36-1	MK256977	Wang i wsp. 2018
<i>B. ovata</i>	<i>Bos grunniens</i>	China	Tiantang 5	KX870099	Liu i wsp. 2017
<i>B. sp. venatorum</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	JR170	MW012665	this study
<i>B. sp. venatorum</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	JR466	MW012666	this study
<i>B. sp. venatorum</i>	<i>I. ricinus</i>	Poland	PC43	MW012668	this study
<i>B. sp. venatorum</i>	<i>I. ricinus</i>	Czech Republic	6345	KX857480	Rybarova and Siroky 2016
<i>Anthemosoma garnhami</i>	<i>Acomys percivali</i>	Ethiopia	675CC	MH093637	Chavatte i wsp. 2018

n/a not available

Table S1. List of veterinary clinics sampled in this study.

Nr	ID	Veterinary Clinic Name	Adress
1	A	Centrum Zdrowia Małych Zwierząt M. Majka	os. W. Jagiełły 33
2	AA	Gabinet Weterynaryjny Katarzyna Gryglewska	ul. Piątkowska 105
3	C	Gabinet Weterynaryjny lek. wet. Dariusz Filipiński	os. Wichrowe Wzgórze paw.
4	E	Gabinet Weterynaryjny Marcin Konieczny	os. S. Batorego 82N/L6
5	F	Gabinet Weterynaryjny Piotr Winiecki	ul. Chwiałkowskiego 24
6	G	Klinika Weterynaryjna Juszcak & Gorzelańczyk	ul. Bułgarska 68A
7	H	Praktyka Weterynaryjna A. Golec M. Rybski	ul. Marcelińska 100/ 202
8	J	Specjalistyczny Gabinet Weterynaryjny Juszcak & Gorzelańczyk	ul. Armii Krajowej 85A
9	K_L	Gabinet Weterynaryjny PLUTO	os. Jagiellońskie 77
10	M	Gabinet Weterynaryjny ZWIERZAK lek. wet. A. Adamska	ul. Św. Antoniego 32
11	N	Gabinet Weterynaryjny AMICUS	os. Rzeczypospolitej 3
12	O	Usługi Weterynaryjne lek. wet. J. Golec	ul. Bnińska 40
13	P	Przychodnia Weterynaryjna NA POLANCE	ul. Katowicka 11 lokal U1-2
14	S	Specjalistyczny Gabinet Weterynaryjny lek. wet. Ż. Sokołowska	os. Lecha 92
15	T	Przychodnia Weterynaryjna	os. Orła Białego 85A
16	U	Przychodnia Weterynaryjna Kociak lek.wet. Sylwia Łata	Chwaliszewo 12
17	W	Klinika Weterynaryjna dr. Grzegorza Wąsiatyca	ul. Księcia Mieszka I 18

Table S2. List of V4 16S sequences of Borreliaceae used in the phylogenetic analysis.

<i>Borrelia</i> species	GenBank acc. no.
1 <i>B. afzelii</i>	NZ_CP009212
2 <i>B. anserina</i>	CP013704
3 <i>B. bavariensis</i>	NZ_CP059009
4 <i>B. bissettii</i>	NC_015921
5 <i>B. burgdorferi</i>	NZ_CP019767
6 <i>B. chilensis</i>	CP009910
7 <i>B. coriaceae</i>	NZ_CP005745
8 <i>B. crocidurae</i>	NZ_CP004267
9 <i>B. duttonii</i>	NZ_AZIT01000001
10 <i>B. garinii</i>	NZ_CP028861
11 <i>B. hermsii</i>	NZ_CP011060
12 <i>B. maritima</i>	NZ_CP044535
13 <i>B. mayonii</i>	NZ_CP015796
14 <i>B. miyamotoi</i>	CP004217
15 <i>B. parkeri</i>	NZ_CP007022
16 <i>B. recurrentis</i>	NC_011244
17 <i>B. turcica</i>	NZ_CP028884
18 <i>B. turicatae</i>	NC_008710
19 <i>B. valaisiana</i>	NZ_ABCY02000001
20 This study V4 16S type 1	
21 This study V4 16S type 2	
22 <i>Spirochaeta lutea</i>	NR_136451

Table S4. List of *flaB* gene fragment sequences of *Borrelia miyamotoi* detected in *Ixodes* spp. ticks collected from dogs or cats in 17 veterinary clinics in Poznań, and deposited in GenBank.

Tick species	Tick stage	Host	Location	Isolate	GenBank acc. no.
<i>Ixodes ricinus</i>	female	dog	ul. Księcia Mieszka I 18,	W067.1	ON000073
<i>Ixodes ricinus</i>	female	dog	ul. Księcia Mieszka I 18,	W023	ON000074
<i>Ixodes ricinus</i>	female	cat	ul. Bnińska 40,	O010	ON000075
<i>Ixodes ricinus</i>	female	dog	ul. Św. Antoniego 32,	M017	ON000076
<i>Ixodes ricinus</i>	female	dog	os. Jagiellońskie 77,	L050.3	ON000077
<i>Ixodes ricinus</i>	female	dog	os. Jagiellońskie 77,	L030	ON000078
<i>Ixodes ricinus</i>	female	dog	os. Jagiellońskie 77,	L026	ON000079
<i>Ixodes ricinus</i>	female	dog	ul. Armii Krajowej 85A,	JL637	ON000080
<i>Ixodes ricinus</i>	female	dog	os. Wichrowe Wzgórze paw. 104,	C056	ON000081
<i>Ixodes ricinus</i>	female	cat	os. Wichrowe Wzgórze paw. 104,	C040	ON000082
<i>Ixodes ricinus</i>	female	unknown	os. Wichrowe Wzgórze paw. 104,	C001	ON000083
<i>Ixodes ricinus</i>	female	dog	ul. Bnińska 40, Poznań	O030	ON000084
<i>Ixodes ricinus</i>	female	dog	ul. Armii Krajowej 85A, Poznań	JL593	ON000085
<i>Ixodes ricinus</i>	female	dog	os. Rzeczypospolitej 3, Poznań	N001	ON000086
<i>Ixodes ricinus</i>	female	dog	ul. Bułgarska 68A, Poznań	G024	ON000087
<i>Ixodes ricinus</i>	female	dog	os. Rzeczypospolitej 3, Poznań	N0300.2	ON000088
<i>Ixodes ricinus</i>	female	dog	os. Rzeczypospolitej 3, Poznań	N017.2	ON000089
<i>Ixodes ricinus</i>	female	dog	os. Rzeczypospolitej 3, Poznań	N014	ON000090
<i>Ixodes hexagonus</i>	female	cat	os. Lecha 92, Poznań	S006.8	ON000091
<i>Ixodes hexagonus</i>	nymph	cat	os. Lecha 92, Poznań	S006.9	ON000092
<i>Ixodes hexagonus</i>	nymph	dog	os. Lecha 92, Poznań	S007	ON000093

Table S5. List of V4 16S sequences of *Borrelia miyamotoi* detected in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks collected in urban areas of the city of Poznań, and deposited in GenBank.

Tick stage	Location	Isolate	GenBank acc. no.
nymph	urban forest around Malta Lake,	mal47	MZ918966
larva	urban forest around Malta Lake,	mal51	MZ918967
female	urban forest around Malta Lake,	mal153_155	MZ918968
larva	urban forest around Malta Lake,	mal241	MZ918969
male	urban forest around Malta Lake,	mal165_167_212	MZ918970
male	Sołacki Park,	ps23_24	MZ918971
male	Citadel Park,	pc46	MZ918972
female	urban forest around Rusałka Lake,	jr146_149	MZ918973
nymph	Morasko Adam Mickiewicz University Campus,	mor27	MZ918974
nymph	urban forest around Rusałka Lake,	jr286_288	MZ918975
nymph	urban forest around Rusałka Lake,	jr289_291	MZ918976
nymph	urban forest around Rusałka Lake,	jr374_376	MZ918977
nymph	urban forest around Rusałka Lake,	jr458_460	MZ918978
nymph	urban forest around Rusałka Lake,	jr479_481	MZ918979
nymph	urban forest around Rusałka Lake,	jr538_545_546	MZ918980
female	urban forest around Rusałka Lake,	jr234	MZ918981
male	urban forest around Rusałka Lake,	jr321	MZ918982
nymph	urban forest around Rusałka Lake,	jr571_573	MZ918983
nymph	urban forest around Rusałka Lake,	jr586_589	MZ918984
nymph	urban forest around Rusałka Lake,	jr590_592	MZ918985
nymph	urban forest around Rusałka Lake,	jr607_609	MZ918986
nymph	urban forest around Rusałka Lake,	jr613_615	MZ918987