Utvrđivanje proširenosti bakterije Francisella tularensis u populaciji mišolikih glodavaca

Vugrinec, Mateja

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:221403

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

zir.nsk.hr

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Mateja Vugrinec

Utvrđivanje proširenosti bakterije *Francisella tularensis* u populaciji mišolikih glodavaca

Diplomski rad

Zagreb, 2018

Diplomski rad je izrađen na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Predstojnik Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu:

prof.dr.sc. Zoran Milas

Mentor: doc.dr.sc. Josipa Habuš

Povjerenstvo za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Ljubo Barbić
2. Doc. dr. sc. Suzana Hađina
3. Doc.dr.sc Josipa Habuš
4. Doc. dr. sc. Vladimir Stevanović - zamjena

Zahvaljujem mentorici doc.dr.sc. Josipi Habuš na savjetima, izdvojenom vremenu, stručnom vodstvu i velikoj pomoći prilikom izrade ovog rada te na korektnom, profesionalnom i ljubaznom odnosu.

Zahvaljujem *dr. sc. Vesna Mojčec Perko, dipl.ing.mol.biol. na velikoj pomoći oko izvođenja praktičnog dijela rada te na stručnim savjetima, profesionalnom i ljubaznom odnosu.*

Zahvaljujem Viki Ivčević na velikoj pomoći oko izvođenja praktičnog dijela rada i ljubaznom odnosu.

Zahvaljujem se prijateljima i kolegama s fakulteta s kojima sam stekla nezaboravno iskustvo i lijepe međusobne odnose.

I na kraju veliko hvala mojoj obitelji koja mi je bila podrška i oslonac kroz čitavo vrijeme studija.

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA ... 2
2.1. Etiologija ... 2
2.2. Epidemiologija/ epizootiologija ... 2
2.2.1. Virulencija i infektivna doza ... 2
2.2.2. Izvor zaraze ... 3
2.2.3. Način širenja ... 3
2.2.4. Ulazna vrata ... 4
2.2.5. Prijemljivost ... 4
2.2.6. Pojavnost tularemije u ljudi ... 4
2.3. Patogeneza ... 6
2.4. Klinička slika ... 7
2.4.1. Životinje ... 7
2.4.2. Ljudi ... 9
2.5. Dijagnostički postupci ... 11
2.5.1. Dokaz uzročnika ... 12
2.5.2. Dokaz protutijela ... 14
2.6. Liječenje ... 14
3. MATERIJALI I METODE ... 15
3.1. Uzorci ... 15
3.2. Izdvajanje DNK iz jetre ... 18
3.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu ... 19
4. REZULTATI ... 21
5. RASPRAVA ... 25
6. ZAKLJUČCI ... 28
7. LITERATURA ... 29
8. SAŽETAK ... 34
9. SUMMARY ... 35
10. ŽIVOTOPIS ... 36

POPIS SLIKA

Slika 1. Životni ciklus vrste F.tularensis unutar makrofaga (prema Chong, A. i Celli, J., 2010.) 7

Slika 2. Županije iz kojih potječu uzorci: 1. Međimurska županija, 2. Koprivničko-križevačka županija, 3. Zagrebačka županija, 4. Sisačko-moslavačka županija, 5. Brodsko-posavska županija i 6. Vukovarsko- srijemska županija 17

Slika 3. Omjer miševa, voluharica i rovki u ukupnom broju pretraženih uzoraka 22

Slika 4. Ukupan broj uzoraka (449) prikazan u postocima po vrsti 23

Slika 5. Amplifikacijske krivulje pozitivnih uzoraka, te pozitivnih i negativnih kontrola 23

POPIS KRATICA

CDC - Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Centers for Disease Control and Prevention)*

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

ELISA – imunoenzimski apsorpcijski test (engl. *Enzyme linked immunosorbent assay*)

IIF – indirektna imunoflorescencija

MAT – mikroskopska aglutinacija

MR - manozni-receptori

PCR - lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase chain reaction*)

SZO - Svjetska zdrastvena organizacija

POPIS TABLICA

Tablica 1. Prikaz datuma i mjesta izlova, broj postavljenih klopki, broj ulovljenih glodavaca i malih sisavaca, podijela uzoraka po podrijetlu (vrsta) 15
Tablica 2. Prikaz svih ulovljenih vrsta (hrvatski i latinski nazivi) mišolikih glodavaca i malih sisavaca 17
Tablica 3. Prikaz komponenti koje čine reakcijsku smjesu za jedan uzorak (10 µL), za detekciju genoma *F. tularensis* metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu 19
Tablica 4. Prikaz uvjeta lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu koji se odvijaju u uređaju Rotor- Gene Q..... 20
Tablica 5. Prikaz relativne brojnosti glodavaca po mjestu i vremenu ulova i omjer miševa, voluharica i rovki 21
Tablica 6. Ct vrijednosti za pozitivne uzorke, te za pozitivne i negativne kontrole 24

1. UVOD

Tularemija je zoonoza sjeverne hemisfere uzrokovana bakterijom *Francisella tularensis*. *F.tularensis* se dijeli na tri podvrste: *F.tularensis* subsp. *tularensis, F.tularensis* subsp. *holartica* i *F.tularensis* subsp. *mediasiatica. F.tularensis* jedna je od najinfektivnijih bakterija, svega 10-15 intradermalno apliciranih ili inhaliranih bakterija može dovesti do bolesti. Na bakteriju je primljivo mnogo vrsta sisavaca, beskralježnjaka, ptica i vodozemaca. Rezervoari bolesti su najčešće zečevi i glodavci, dok su vektori bolesti najčešće krpelji. Bolest se može prenijeti na domaće životinje ili čovjeka direktnim kontaktom, inhalacijom infektivnog aerosola, kontaminiranom hranom i vodom, te ubodom člankonožaca. Kliničko očitovanje bolesti kod domaćih životinja je nespecifično (povišena tjelesna temperatura, limfadenopatija i ulceracije), dok se kod ljudi bolest očituje u više oblika ovisno o ulaznim vratima same bakterije. Iako se bolest smatra endemskom, u posljednje vrijeme je u Europi zabilježena povećana pojavnost uz povremenu pojavu epidemija. Razlog njihovih izbijanja nije u potpunosti razjašnjen, no pretpostavlja se da bi mogao biti vezan uz klimatske prilike (globalno zatopljenje) koje pogoduju održavanju populacije divljih glodavaca (jednih od rezervoara tularemija). Naime i zadnja sustavna istraživanja tularemije u Hrvatskoj (70 i 80-ih godina prošloga stoljeća) potvrđuju korelacija između brojnosti mišolikih glodavaca s izbijanjem epidemija u ljudi.

U ovom diplomskom radu pretraženo je 449 uzoraka jetre mišolikih glodavaca i malih sisavaca iz endemskih područja tularemije u Republici Hrvatskoj. Svi uzorci su pretraživani molekularnom metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu u svrhu dokaza prisustva specifičnih odsječaka DNK *F.tularensis.*

Cilj istraživanja je bio utvrditi učestalost infekcije u mišolikih glodavaca i malih sisavaca u područjima u kojima se tularemija javlja endemski.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Etiologija

Francisella tularensis je sitna (0,2 x 0,3-0,7 μm), kokobacilarna, aerobna, nepokretna, asporogena, gram negativna, fakultativno unutarstanična bakterija. Najbolje raste na krvnom agaru obogaćenom cistinom ili cisteinom pri 37°C, a kako bi kolonije narasle do pune veličine inkubirati ih treba dva do četiri dana. *F. tularensis* se temeljem biokemijskih razlika, razlika u virulenciji, epidemioloških i razlika u genomu dijeli na tri podvrste. Tip A - *F.tularensis subsp. tularensis* nalazimo u Sjevernoj Americi i najvirulentnija je podvrsta koja uzrokuje najveću smrtnost, tip B - *F.tularensis subsp.holarctica* proširen je širom sjeverne polutke pa ga nalazimo u Europi, Aziji i Sjeverni Americi, a uzrokuje blaže oblike bolesti. Podvrstu *F.tularensis subsp. mediasiatica* nalazimo u središnjoj Aziji i dijelovima bivšeg SSSR-a, a smatra se nešto slabije patogenom od tipa B (HERAK-PERKOVIĆ i sur., 2012.; NAGLIĆ i sur., 2005.).

F. tularensis dobro preživljava u vlažnoj zemlji, u vodi, blatu i leševima životinja (u zemlji 30 dana, u smrznutom mesu kunića 4 mjeseca, u vodi 3 mjeseca, u koži na dlakama više od mjesec dana, u strvinama 4 mjeseca, a u krpeljima 530 dana). Može preživjeti zagrijavanje na temperaturama od 42-65^{o}C (HERAK-PERKOVIĆ i sur,. 2012.; NAGLIĆ i sur., 2005.; SEMIĆ i sur., 2009.).

2.2. Epidemiologija/ epizootiologija

2.2.1. Virulencija i infektivna doza

F.tularensis je jako virulentna bakterija, 10-15 intradermalno apliciranih ili inhaliranih bakterija dovodi do bolesti. Zbog svoje virulentnosti potencijalno je biološko oružje. Tularemija spada u kategoriju A bioloških agensa zajedno sa virusom velikih boginja, antraksom, kugom, botulizmom i hemoragičnim groznicama (Ebola groznica, Marburška groznica,Lasinska groznica i Argentinska hemoragijska groznica) (BOKAN, S., 2003.). Za bioteroristički napad mogao bi biti upotrebljen soj *F.tularensis* u obliku aerosola koji je otporan na antimikrobnu terapiju, a putevi infekcije bili bi pluća, koža i ingestija. Godine 1969. Svjetska zdrastvena organizacija (SZO) napravila je model predviđanja biološkog napada tom bakterijom. Izračunato je da bi se bacanjem 50 kg bakterije *F.tularensis* u obliku

aerosola na grad s populacijom od 5 milijuna stanovnika rezultiralo onesposobljenjem 250.000 ljudi i oko 19.000 smrtnih slučajeva. Očekivalo bi se da bolest perzistira još nekoliko tjedana, a bolest bi se vraćala još nekoliko tjedana ili čak i mjesecima. Ovaj model je bio korišten od strane CDC-a za procjenu troškova bioterorističkog napada s bakterijom *F.tularensis* i zaključeno je da bi velika infektivnost patogena dovela do veoma visokih troškova. Visoka cijena i visok morbiditet opravdavaju stavljanje *F.tularensis* na listu agensa s najvišim prioritetom (SJÖSTEDT, A., 2007.; SEMIĆ i sur., 2009.).

2.2.2. Izvor zaraze

Rezervoari su najčešće zečevi i glodavci, a vektori bolesti su krpelji iz rodova *Ixodes* i *Dermacentor* (MORNER, T., 1992.). Ovisno o geografskom području i podvrsti *F. tularensis* rezervoari se mogu razlikovati. Tako su domaćini bakterije *F.tularensis subsp. holartica* u Euroaziji prvenstveno zečevi i glodavci. U središnjoj Europi izvorom bolesti smatra se smeđi zec (lat. *Lepus europaeus*) dok se u hladnijim krajevima (alpska Europa, Švedska, Norveška, Finska i Rusija) izvorom smatra planinski zec (lat. *Lepus tidimus*). Izvor zaraze su i vodena voluharica (lat. *Arvicola terrestris*) i poljska voluharica (lat. *Microtus arvalis*), no *F. tularensis* mogu u ekosustavu održavati i drugi mišoliki glodavci i/ili mali sisavci. U Sjevernoj Americi najvažnijim domaćinima tularemije smatraju se zečevi i kunići (porodica *Leporidae*, rodovi *Lepus*-zečevi i *Sylvilagu*s-kunići). No rezervoari *F. tularensis* subsp. *tularensis* mogu biti i glodavci (*Microtus spp*.), američki dabar (lat. *Castor cauadensis*) i bizamski štakor (lat. *Ondatra zibethicus*). Najvažnijim vektorima u Euroaziji i Sjevernoj Americi se smatraju krpelji. Na području Europe to su uglavnom krpelji iz rodova *Ixodes* i *Dermacentor* (SEMIĆ i sur. 2009). Ipak, u Finskoj i Švedskoj sve značajniji vektori su komarci iz rodova Aedes, Culexa i Anopheles (MORNER, T., 1994). Vektori se zaraze sišući krv bolesne životinje za vrijeme bakterijemije. Zbog otpornosti same bakterije u prirodi izvor zaraze mogu biti i kontaminirani vodotoci. Nedavna istraživanja pokazuju da je slobodnoživuća ameba (lat. *Acanthamoeba castellanii*) nosioc *F.tularensis* i da se bakterija u njoj razmnožava i na taj način može biti izvor infekcije za čovjeka i životinje (ABD i sur., 2003.).

2.2.3. Način širenja

Bolest se može širiti putem vektora, ingestijom kontaminirane hrane (nedovoljno obrađeno meso inficirane životinje) ili vode (glodavci svojim izlučevinama zagađuju vodu), kontaktom

s inficiranom životinjom ili vektorom, inhalacijom aerosola u kojem se nalazi uzročnik, te dodirom preko sluznica oka. Način širenja bolesti utjecati će i na pojavnost ove bolesti. Oboljenja se najčešće javljaju sezonski što ima korelaciju sa sezonskom aktivnošću glodavaca i artropoda, te njihovom gustoćom te sa sezonom lova na zečeve. U istraživanjima u pojedinim zemljama uočavaju se tako bimodalne distribucije bolesti. Bolest se zbog vektora pojavljuje od svibnja do listopada, dok se zbog zečeva javlja od studenog do veljače (OHARA i sur., 1998.; TARNVIK i sur., 1996.). U SAD-u je također zapažena bimodalna distribucija bolesti, u ljeti do pojave bolesti dolazi zbog uboda krpelja,a zimi zbog lova.

2.2.4. Ulazna vrata

Ulazna vrata uzročnika su probavni i dišni sustav,sluznica konjuktiva te kroz ozlijeđenu ili neozlijeđenu (vektori) kožu.

2.2.5. Prijemljivost

Na infekciju *F.tularensis* su primljive mnoge vrste sisavaca (190 vrsta), beskralježnjaka (88 vrsta), ptica (23 vrste) i vodozemaca (3 vrste) (MORNER, T., i sur. 2001.). Iako su specifična protutijela protiv ove bolesti zabilježena u svih domaćih životinja ipak najčešće oboljevaju mačke i ovce, iako je i u njih incidencija bolesti uglavnom niska. Obzirom na način prijenosa (kontakt s inficiranim zečevima) bolest može biti nešto češća i u lovačkih pasa. U ljudi ova bolest je vezana uz određena zanimanja, pa tako u endemskim područjim od tularemije najčešće obolijevaju lovci, šumari, mesari i veterinari.

2.2.6. Pojavnost tularemije u ljudi

Tularemija je tipična bolest prirodnih žarišta koja se vrlo često javlja endemski uz povremenu pojavu manjih, zatvorenih epidemija. Ipak, tijekom različitih socio-ekonomskih previranja, osobito ratova, razmjer zabilježenih epidemija može biti i znatno veći. Sukladno tome zabilježene su značajne geografske i vremenske varijacije u pojavnosti tularemije.

- Svijet

  U Japanu je od 1924.godine do 1996.godine bilo evidentirano 1374 slučaja tularemije, najveći broj oboljelih bio je pedesetih godina i doveden je u svezu s povećanom konzumacijom zečeva (OHARA i sur., 1998.). U Rusiji je tularemija prvi put

evidentirana 1926.godine. Tijekom drugog svjetskog rata javila se hidrična epidemija pa se broj oboljelih godišnje kretao od 10000 do 100000 (TÄRVNIK, A., 2003.).

U SAD-u je godine 1939. zabilježen najveći broj oboljelih od tularemije, zabilježen je 2291 slučaj, dok je u narednih deset godina broj oboljelih pao na 1100 oboljelih godišnje (EVANS i FRIEDLANDER, 1997.). Broj oboljelih se kroz godine sve više smanjuje, te je 1967. bilo manje od 200 oboljelih godišnje. Od 1990. do 2000. godine zabilježeno je prosječno 124 oboljelih na godinu (ANONIMUS, 2002.).

- Europa

  Na Kosovu je tijekom ratnih previranja 1999.-2000. godine bilo zabilježeno 327 oboljelih od tularemije, izvor zaraze su bile hrana i voda kontaminirane izlučevinama glodavaca (REINTJES i sur., 2002.).

  U Bugarskoj je od 1961.godine do 1969.godine došlo do produženog izbijanja tularemije uz Srebrarsko jezero. U razdoblju od 1997. do 2004. Zabilježena su 285 slučaja tularemije, žarište se na nalazilo na području zapadne granice sa Srbijom, gdje je u to vrijeme također izbila epidemija (DJORDJEVIC i sur., 2005.; KOMITOVA i sur., 2010).

  U Turskoj je u razdoblju između 1988.-1998. godine oboljelo 205 osoba, uzrok oboljenja je konzumiranje vode sa izvora (HELVACI i sur., 2000.).

  U Španjolskoj je 1997.godine do 1998.godine je došlo do izbijanja tularemije kada se broj oboljelih popeo iznad 500, smatra se da je uzrok lov na zečeve (EIROS BOUZA i RODRIGUEZ TORRES, 1998.).

  U Švedskoj se bolest javlja endemično i javlja se samo na sjeveru te se povezuje sa ubodima komaraca. Zadnja epidemija izbila je 2000.godine kada je oboljelo 270 osoba (ELIASSON i sur., 2002.).

  U Njemačkoj se svake godine pojavi nekoliko slučajeva.

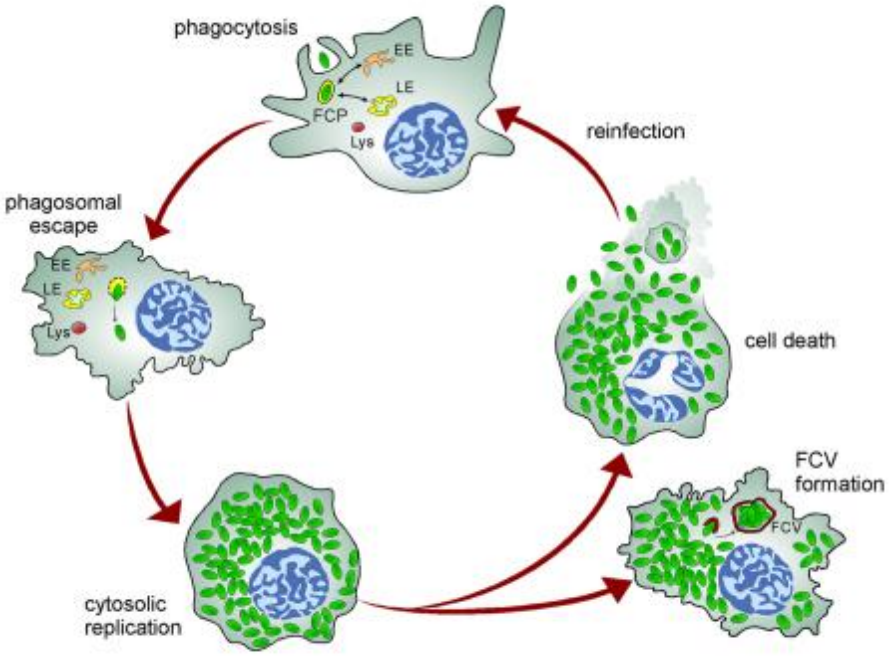
- Hrvatska

  Prvi slučajevi tularemije u Hrvatskoj datiraju iz 1953.godine. Početkom te godine su zabilježeni prvi slučajevi oboljenja kod ljudi u epidemijskom obliku kao posljedica epizootije među zečevima. Broj oboljelih te godine je bio 24 slučaja. Krajevi koji su bili zahvaćeni su Dugo selo, Novska i Nova Gradiška. Sljedeće godine krajem ožujka pojavilo se novo žarište bolesti u okolici Zagreba (Budenec i Cerje) kada je broj oboljelih bio 12, a izvor zaraze su bili zečevi. Te iste godine prilikom utvrđivanja

proširenosti zaraze među životinjama došlo je do laboratorijske infekcije veterinarskog osoblja. Zabilježena su i dva slučaja u zimskim mjesecima 1954./1955. (BEZJAK i KATUNARIĆ, 1956.). U općini Petrinja bolest je prvi put zabilježena 1965.godine, a do 1998.godine registrirana je 10 puta. U jesen godine 1998. pa do početka ožujka 1999.godine dolazi do epidemije u kojoj je oboljelo 18 osoba (BRKIĆ i sur., 2005.). Prema podacima iz Hrvatskog zdravstvenog-statističkog ljetopisa broj oboljelih od 2004. do 2016. bio je uglavnom do pet osoba godišnje s izuzetkom 2005. kad je zabilježeno deset i 2015. kad smo zabilježili 13 oboljelih.

2.3. Patogeneza

Na mjestu ulaska dolazi do razmnažanja bakterija, koje se prvo šire u područne limfne čvorove. Ukoliko ne dođe do uništavanja patogena lokalnom upalom uzročnik se pomoću zaraženih makrofaga širi po cijelom tijelu putem limfe ili krvi (CONLAN i sur., 2003.). Na mjestu inokulacije dolazi do upalne reakcije i nekroze tkiva (GEYER i sur., 1997.). Mogu nastati i granulomi ili kazeozni granulomi koji podsjećaju na tuberkulozne promjene (ĐORĐEVIĆ-SPASIĆ, M., 2014.). *F.tularensis* je fakultativni intracelularni patogen, umnaža se u makrofagima, najčešće, neutrofilima, dendritičnim stanicama, epitelnim stanicama pluća i hepatocitima (SANTIC i sur., 2010.). Bakterija se veže na površinske receptore stanice domaćina i pomoću manoza receptora (MR) i receptora komplementa 3 uđe u stanicu. Na alveolarnim makrofagima MR se nalaze u većoj količini, to je razlog zašto je infektivna doza pri aerosolnom prijenosu bakterije niska. Zbog aktivacije MR dolazi do prestanka lučenja TNF- α i drugih upalnih citokina, što je siguran način ulaska za patogena. Kada bakterija uđe u stanicu ulazi u rani endosom i sprječava njegovo sazrijevanje i fuziju s lizosomom. Bakterija se razmnožava u endosomu, a nakon sat vremena od infekcije izlazi iz fagosoma i nalazi se u citoplazmi gdje se također razmnožava. S vremenom dolazi do pucanja makrofaga i do reinfekcije novih makrofaga (Slika 1.) (CHECROUN i sur., 2006.; SANTIC i sur., 2008.; CLEMENS i sur., 2005.).



Slika 1. Životni ciklus vrste F.tularensis unutar makrofaga (prema Chong, A. i Celli, J., 2010.)

2.4. Klinička slika

2.4.1. Životinje

Kliničke manifestacije bolesti su različite s obzirom na vrstu. Općenito govoreći simptomi koji se najčešće javljaju su nespecifični, a obuhvaćaju akutna febrilna stanja uz limfadenopatiju.

Mačke su osjetljivije na tularemiju od pasa, a klinička slika prirodno stečene tularemije domaćih životinja najbolje je opisana upravo u mačaka (BEHR, M., 2000.). Tularemija kod mačaka može se kretati od subkliničke infekcije do blage bolesti s limfadenopatijom i povišenom tjelesnom temperaturom pa do teškog oboljenja i smrti (WOODS i sur., 1998.). Pored groznice razvijaju se znakovi koji mogu uključivati anoreksiju, dehidraciju, slabost, limfadenopatiju, dolazi do oralnih i jezičnih ulceracija, upale pluća, hepatomegalije, splenomegalije i ikterusa. Broj leukocita može biti normalan, visok ili nizak, u usporedbi s referentnim vrijednostima. Drugi laboratorijski nalaz mogu uključivati leukocitozu uz skretanje u lijevo, trombocitopeniju, toksične promjene na neutrofilima, povišene serumske vrijednosti jetrenih enzima i hiperbilirubinemiju (WOODS i sur., 1998.).

Prirodne infekcije pasa rijetko se opisuju. U jednom primjeru, 13-mjesečni pas koji je pojeo zeca za tjedan dana imao je akutnu anoreksiju, groznicu i limfadenopatiju uključujući i nekrotizirajući tonzilitis i bronhopneumoniju. Dijagnoza tularemije potvrđena je četverostrukim porastom protutijela u parnim serumima. Ostali laboratorijski nalazi osim visoke koncentracije fibrinogena u plazmi bili su unutar referentnih raspona (GUSTAFSON i DEBOWES, 1996.). Pri eksperimentalno inficiranih pasa s *F.tularensis* opisana je slična klinička slika. Psi koji su bili hranjeni inficiranom hranom razvili su petodnevnu bolest s povišenom temperaturom i mukopurulentnim iscjetkom iz nosa i očiju. Kod intradermalne inokulacije pojavila se groznica, pustule na mjestu inokulacije i regionalna limfadenopatija (JOHNSON, HN., 1944.). Štenci su osjetljiviji od starih pasa. Unatoč malom broju kliničkih izvješća o tularemiji u pasa, u literaturi postoji obilje dokaza o serokonverziji sugerirajući da prirodna infekcija kod pasa nije tako rijetka ali je vjerojatno povezana sa subkliničkim ili vrlo blagim oblicima bolesti (CALHOUN, EL., 1954.; CALHOUN i sur., 1956.).

U Sjedinjenim Američkim Državama opisano je nekoliko epidemija tularemije kod ovaca. Epidemije su uglavnom izbijale u proljeće u stadima gdje su ovce uslijed ozbiljnih zimskih neprilika, smanjene i neuravnotežene prehrane bile vrlo mršave i opterećene vrlo velikim brojem krpelja. Ovce su imale visoku tjelesnu temperaturu, nisku tjelesnu težinu, regionalnu limfadenopatiju i proljev (GEIGER, JC., 1931.). Općenito, oboljele ovce slabo reagiraju na vanjske podražaje, često stoje spuštene glave, imaju parezu zadnjeg kraja zbog čega šepaju, moguće su lokalne nekroze na mjestu uboda i anemija. Letalitet u ovaca iznosi 10-25%.

Kod konja je zabilježena epidemija tularemije u kobila i 5 ždrijebadi, od kojih su 2 uginula od bolesti. Jedno od dva ždrjebadi koja su uginula nije pokazivalo znakove bolesti. Kod konja koji su očitovali kliničku sliku zapažen je opći infekcijski sindrom, otežano disanje, ukočenost i edem nogu, a u ždrebadi apatija, dispneja i nekordinirano kretanje. Kod preživjelih konja dokazana je serokonverzija, a *F.tularensis* je izdvojena iz tkiva uginulih životinja (CLAUS i sur., 1959.).

Postoji dosta znanstvenih radova o serokonverziji u goveda no klinički oblici se izuzetno rijetko javljaju (CALHOUN, EL., 1954.; CALHOUN i sur., 1956.). Postoje zapisi o najmanje jednoj epidemiji u kojoj je tularemija dijagnosticirana u dva bolesna teleta (JELLISON, WL., 1971.).

Kod odraslih svinja infekcija je latentna dok se u prasadi može javiti opći infekcijski sindrom, profuzno znojenje i dispneja, a bolest traje sedam do deset dana.

Kod zečeva i glodavaca očituje se letargija i tromost. Životinje gube strah, promijenjen im je senzori, a mogu se javiti i ekscitacije. Životinje se lako hvataju rukama, imaju povišenu temperaturu i otežano dišu (HABRUN, B., 2010.).

Kliničko očitovanje bolesti opisano je i u nekoliko vrsta primata (*Saimiri sciureus, Sanguinus nigricollis, Cercopithecus talapoin*) uključujući i nizinske gorile (lat. *Gorilla gorilla gorilla*). Te životinje su razvile različite nespecifične znakove, uključujući depresiju, letargiju, anoreksiju, povraćanje,proljev, generaliziranu limfadenopatiju, blijede sluznice i kožne petehije. Nekoliko životinja je naglo umrlo (NAYAR i sur., 1979.; WAGGIE i sur., 1997.; BAUMEISTER i RAMSAY, 1984.; EMMONS i sur., 1970.).

2.4.2. Ljudi

Ljudi se najčešće inficiraju s *F.tularensis* tip A i B. Inkubacija bolesti traje obično od 3-10 dana, ali može varirati od 1-21 dan. Bolest počinje naglo, dolazi do povišenja tjelesne temperature, javlja se slabost, glavobolja i drhtavica. Kliničko očitovanje bolesti uveliko će ovisiti o putu ulaska uzročnika u organizam, a možemo ih podlijeliti na unutarnje i vanjske. Vanjski oblici su glandularni, ulceroglandularni, okuloglandularni i tonziloglandularni, a unutarnji oblici bolesti su respiratorni, enteralni i tifoidni (MIHALJEVIĆ i sur., 1994. ; SEMIĆ i sur., 2009.).

- **Ulceroglandularni oblik** najčešći je oblik bolesti, a javlja se nakon kontakta sa zaraženom životinjom ili nakon ugriza. Kod ovog oblika bolesti ulazna vrata su najčešće na ruci (SEMIĆ i sur., 2009.). Ovaj oblik bolesti je najčešći oblik bolesti u skandinavskim zemljama, SAD-u, Japanu, Španjolskoj i obuhvaća 90% svih slučajeva (TARNVIK i BERGLUND, 2003.). Dolazi do lokalnih kožnih promjena i stvaranja bezbolnih papula koje kroz nekoliko dana ulceriraju ili postaju pustule. Promjene zarastu ostavljajući manje ili više vidljive ožiljke. Kroz nekoliko dana dolazi do povećanja regionalnih limfnih čvorova (najčešće područje lakta ili pazuha). Povećani limfni čvorovi su bezbolni, okruženi crvenilom i otokom okolnog tkiva i kože i često fistuliraju (ĐORĐEVIĆ-SPASIĆ, M., 2014.; SEMIĆ i sur., 2009.).

- **Glandularni oblik** bolesti patogenetski je identičan ulcerogladularnom obliku i prenosi se na isti način. Razlika je u tome što nema primarne lezije. Očituje se povećanjem regionalnih limfnih čvorova, može biti povećan samo jedan, a može ih biti i više. Gnojni limfni čvorovi mogu postati fluktuirajući što je indikacija za njihovu drenažu. Dijagnoza se može predvidjeti ako nema povišene tjelesne temperature (ĐORĐEVIĆ-SPASIĆ, M., 2014.; SEMIĆ i sur., 2009.). Ovaj oblik se najčešće javlja kod djece i drugi je najčešći oblik tularemije (28% od svih oblika tularemije), a kod odraslih je treći najčešći oblik (16% od svih oblika tularemije) (ĐORĐEVIĆ-SPASIC, M., 2014.).

- **Okuloglandularni oblik** bolesti je također sličan ulceroglandularnom obliku. Bolest se očituje konjuktivitisom, bolnošću, fotofobijom i povećanim suzenjem. Moguć je nalaz periorbitalnih ulcera ili papula. Bolest se očituje limfadenopatijom, najčešće su zahvaćeni preaurikalni, cervikalni i submandibularni limfni čvorovi (ĐORĐEVIĆ-SPASIĆ, M., 2014.; SEMIĆ i sur., 2009.).

- **Tonziloglandularni oblik** nastaje unošenjem kontaminirane vode, hrane ili udisanjem kapljica. Kod ovog oblika bolesti dolazi do jednostrane ili obostrane ulceromembranozne angine ili nektorične angine što predstavlja primarnu leziju. Značajno su povećani vratni limfni čvorovi, dok su promjene na tonzilama manje. Dolazi do stomatitisa i faringitisa. Inspekcijom se uočava crvenilo i gnojne promjene u usnoj šupljini i sluznici ždrijela. Ovaj oblik tularemije bez drugih manifestacija može dugo ostati prikriven (BLANCO i sur., 2001.).

- **Respiratorni oblik** bolesti nastaje inhalacijom bakterije u obliku aerosola. Infekcije ovim oblikom nisu česte, ali kad se pojave zahvaćaju veliki broj oboljelih. Simptomi bolesti uključuju suhi kašalj, otežano disanje i bol u grudima, a česti su i oblici sa generaliziranom slabošću bez respiratornih simptoma. Pneumonija kod tularemije može biti primarna i sekundarna. Primarna pneumonija nastala je kao rezultat inhalacije uzročnika, dok je sekundarna pneumonija rezultat hematogenog širenja uzročnika tijekom bolesti. O težini bolesti ovog oblika ovisi koja podvrsta bakterije je bolest izazvala.

Tularemija tip A- PRIMARNA PNEUMONIJA: početak bolesti promptni s drhtavicom, otežanim disanjem i bolnošću u grudima, kašljem i profuznim znojenjem. Kašalj može ali i ne mora biti produktivan, prisutna i opća slabost. SEKUNDARNA PNEUMONIJA: javlja se kod ulceroglandularnog ili glandularnog oblika tularemije tipa A, a simptomi pneumonije se javljaju 1-2 dana do nekoliko mjeseci nakon početka bolesti. Promjene na plućima variraju i mogu se na rtg snimci zamjeniti s tipičnom bakterijskom pneumonijom, tuberkulozom, karcinomom pluća ili limfomom.

Tularemija tip B-SEKUNDARNA PNEUMONIJA: javlja se vrlo rijetko, a javlja se kod ulceroglandularnog ili tonziloglandularnog oblika bolesti (SYRJALA i sur., 1985.; TÄRVNIK i BERGLUND, 2003.; SEMIĆ i sur., 2009.).

- **Tifoidni (septički, gripozni) oblik** dolazi do povećanja tjelesne temperature koja može trajati i do tri tjedna,a praćena je glavoboljom, simptomima endotoksemije i poremećajima svijesti. Izostaju kožne lezije i limfadenopatija. Česti su šokovi, a stopa mortaliteta je 30-60%. Po klinički slici nalikuje na sepsu ili trbušni tifus (JACOBS, R., 1997.).

- **Enteralni** (gastrointestinalni) oblik nastaje unošenjem kontaminirane hrane ili vode. Javljaju se ulceracije na tankom i debelom crijevu, te dolazi do povećanja mezenterijalnih limfnih čvorova, bolova u trbuhu, proljeva i povraćanja. Limfni čvorovi mogu se ponekad napipati kroz trbušnu stijenku, a ako dođe do njihovog razmekšanja može doći do peritonitisa (SEMIĆ i sur., 2009.).

- **Sekundarne kožne manifestacije** se također javljaju kod tularemije i često ih se pogrešno dijagnosticira ili se predvide. Opisuju se kao makulopapularni, vezikulopapularni, urtikarijalni osip, multiformni eritem i Sweet-ov sindrom (ĐORĐEVIĆ-SPASIĆ, M., 2014.).

2.5. Dijagnostički postupci

Tularemija je opasna zoonoza, pa pretragu na tularemiju smiju obavljati samo za to posebno osposobljene osobe u odgovarajuće pripremljenim laboratorijima. Uzorci koji se uzorkuju za pretragu kod uginulih ili žrtvovanih životinja su jetra, slezena i limfni čvorovi, dok se kod živih životinja uzima sadržaj papula ili aspirirano tkivo limfnih čvorova te krvni serum za serološke pretrage (NAGLIĆ i sur., 2005.).

2.5.1. Dokaz uzročnika

2.5.1.1. Bakteriološka pretraga

Izdvajanje uzročnika moguće je na posebnim hranjivim podlogama koje sadrže defibriniranu kunićju krv i cistein. Ukoliko je materijal iz primarnog afekta ili aspirata limfnog čvora koristi se Francisov agar koji je pouzdan za izdvajanje i iz bolesnih i uginulih sisavaca ali i čovjeka. Podloge koje se koriste za izdvajanje *F.tularensis* nisu selektivne, pa treba paziti da se nacijepi što manje onečišćen materijal. Inkubacija *F.tularensis* na agaru je 48-72 sata pri temperaturi od 37 °C da bi se uočile kolonije. Prilikom rada s bakterijom *F.tularensis* potrebno se obavezno pridržavati biosigurnosnih mjera zbog velike infektivnosti bakterije. Rad u biosigurnosnome kabinetu, korištenje dvostrukih rukavica, jednokratnih kuta, korištenje posebne maske za lice,a korišten pribor obavezno se treba autoklavirati (HABRUN, B., 2010.). Radi čestih laboratorijskih infekcija osoblja, izdvajanje i rad sa sojevima *F. tularansis* obavlja se u samo laboratorijima biološke razine sigurnosti 3.

2.5.1.2. Molekularna dijagnostika

Lančana reakcija polimerazom (PCR) jedna je od pouzdanijih metoda za dokazivanje uzročnika, pa i nakon početka antimikrobne terapije kod pretrage aspirata limfnog čvora. Uzročnik se pomoću PCR metode može dokazati i u krpelju (HABRUN, B., 2010.). Prednost molekularne dijagnostike jest što se ona uz povećane mjere opreza može provoditi u standardnim dijagnostičkim laboratorijima biološke razine sigurnosti 2.

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. Real time PCR) je laboratorijska tehnika u molekularnoj biologiji koja omogućava umnažanje određenog fragmenta DNK u *in vitro* uvjetima. Posebnost ove vrste PCR metode je u načinu detekcije pozitivnog uzorka gdje na računalnom ekranu u stvarnom vremenu pratimo stvaranje PCR proizvoda u pojedinom uzorku. Metoda omogućuje i kvantifikaciju umnažanog dijela DNK u ispitujućem uzorku. Novonastali PCR proizvodi obilježavaju se flourescentnim bojama. Količina flourescencije razmjerna je količini nastalog PCR proizvoda.

Real time PCR metoda temelji se na standardnoj metodi PCR-a. Potrebno je izolirati DNK iz materijala, odabrati početnice za reakciju i optimizirati PCR reakciju. Svaka PCR reakcija sastoji se od tri osnovna koraka:

1. Denaturacija dvolančane DNK- najčešće se odvija na temperaturi od 94 ^{o}C, u trajanju od 3 do 5 minuta. U tom koraku dolazi do razdvajanja dvaju lanaca DNK koji sada služe kao kalupi za amplifikaciju ciljnog dijela DNK.

2. Hibridizacija početnica na komplementarne dijelove DNK- temperatura u tom procesu je od 55^{o}C do 60^{o}C, ovisno o početnicama. Oligonukleotidne početnice vežu se na komplementarne sljedove na DNK lancima.

3. Sinteza komplementarnog lanca- reakcija se odvija na temperaturi od 72 ^{o}C, koja je optimalna za djelovanje termostabilnog enzima Taq-polimeraze. Polimeraza ugrađuje komplementarne nukleotide, odnosno kopira lanac DNK . Sinteza se odvija na oba lanca, pa se u jednom ciklusu amplifikacije broj DNK molekula udvostruči.

Ova tri koraka čine jedan ciklus PCR reakcije koji se ponavlja najčešće 35- 40 puta. Odabrani fragment DNK umnoži se tako u 35 ponavljanja u 2^{36} kopija.

Lančana reakcija polimerazom u starnom vremenu je brža, osjetljivija i specifičnija tehnika u odnosu na konvencionalnu PCR metodu koja za detekciju uspješnosti umnažanja DNK segmenta koristi gel elektroforezu u agaroznom gelu. Tehnološko unapređenje Real time PCR metode je uvođenje simultanog sustava za umnažanje i detekciju PCR proizvoda. U reakcijsku smjesu se osim standardnih komponenata za PCR dodaje i fluorescentna boja (npr. Syber Green I). Prilikom PCR reakcije boja se veže za novosintetizirane molekule DNK, što rezultira povećanjem fluorescencije. Razina fluorescencije se očitava nakon svakog ciklusa, a odgovarajući računalni program prati vrijednosti na ekranu računala. Uporabom početnica obilježenih fluorescentnim spojevima, amplifikacija DNK prati se preko ugradnje početnica u PCR proizvod, a zapravo se generira porast intenziteta fluorescencije. Drugi pristup je uporaba standardnih početnica i specijalnih proba/ sondi (sonde *Taqman*) koje su komplementarne dijelu ciljne regije DNK. Sonde su obilježene su različitim kombinacijama spojeva koji emitiraju svjetlosnu energiju i spojeva koji blokiraju takvo djelovanje.

U tipičnoj reakciji, PCR produkt nastaje eksponencijalno. Krivulja odnosa intenziteta fluorescencije prema broju ciklusa pokazuje sigmoidalni oblik. U kasnim ciklusima supstrati reakcije se iscrpe, PCR produkt se više ne udvostručuje i krivulja prelazi u ravan oblik- tzv. plato. Točka na krivulji kada se intenzitet fluorescencije naglo povećava naziva se granični ciklus (eng. *the threshold cycle* - Ct value). PCR produkti mogu se apsolutno kvantificirati pomoću standarda ili usporedbom s kontrolnim genom. Apsolutna kvantifikacija temelji se na

standardnoj krivulji. Apsolutna koncetracija svakog standarda mora biti poznata. Učinkovitost PCR reakcije mora biti u istom rangu za standard i za testirani uzorak.

2.5.2. Dokaz protutijela

Pouzdana metoda kod dijagnoze tularemije kod ljudi je određivanje specifičnih protutijela klasičnom aglutinacijom. Već u drugom tjednu bolesti je pozitivna, kod titra 1:160, a titar može biti i viši od 1:2560. U pasa i mačaka prema nekim autorima pozitivnim se uzima i titar 1:40 do 1:60 (NAGLIĆ i sur., 2005.). Kod serološke dijagnostike se još koriste mikroaglutinacijski test (MAT) koji je visoko osjetljiv i specifičan, a relativno je jednostavan, jeftin i brz. Zasniva se na reakciji aglutinacije. MAT je kod oko 86% pacijenata pozitivan u drugom tjednu infekcije, zato se koristi za ranu i specifičnu dijagnozu tularemije. Lažno negativni rezultati mogu se očekivati u ranoj fazi infekcije. U prva tri tjedna bolesti MAT je negativan u 30% slučajeva.

Imunoenzimni test (ELISA) često se koristi, a njena prednost je što može prepoznati pojedine klase specifičnih antitijela.

Test indirektne imunoflorescencije (IIF) je visoko specifičan test i koristi za detekciju i lokalizaciju specifičnih antitijela i antigena u serumu oboljelih, ali i u drugim kliničkim uzorcima (ĐORĐEVIĆ-SPASIĆ, M., 2014.).

2.6. Liječenje

U liječenju tularemije kod ljudi najčešće se rabi streptomicin ili gentamicin, a uzročnik je prema postignutim rezultatima osjetljiv i na aminoglikozidne antibiotike, tetracikline, cefalosporine III. generacije i na fluorkinolone. Bakterija je rezistentna na penicilinske antibiotike, cefalosporine I. generacije, makrolide i sulfonamide. Kod liječenja životinja koriste se tetraciklini, gentamicin, streptomicin i eritromicin, ali se liječenje u pravilu ne preporuča (HABRUN, B., 2010.; NAGLIĆ i sur., 2005.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci

Za potrebe izrade diplomskog rada korišteni su uzorci jetre mišolikih glodavaca arhiviranih na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Retrogradno su za svaki uzorak prikupljeni i analizirani i podatci o mjestu i datumu ulova, o vrsti i spolu ulovljenih mišolikih glodavaca odnoso malih sisavaca (insektivora). Podatci o broju i podrijetlu pretraženih uzoraka navedeni su u Tablici 1., a Tablica 2. zbirno navodi sve vrste glodavaca i malih sisavaca obuhvaćenih ovim istraživanjem.

Tablica 1. Prikaz datuma i mjesta izlova, broj postavljenih klopki, broj ulovljenih glodavaca i malih sisavaca, podijela uzoraka po podrijetlu (vrsta)

Datum izlova	**Mjesto izlova**	**Br. PK**	**Br. UG**	**Br. UZ**	**Podrijetlo uzoraka**
14.10.2014.	Lipovljani	100	91	69	*A.sylvaticus* (n=1); *A.agrarius* (n=62); *A.flavicollis* (n=1); *M.glareolus* (n=2); ND (n=3)
21.06.2016.	Stara Gradiška	200	6	2	*S. araneus* (n=2)
05.07.2016.	Županja	338	25	21	*A.sylvaticus* (n=6); *A.agrarius* (n=1); *A.flavicollis* (n=4); *M.agrestis* (n=9); *M.arvalis* (n=1)
06.07.2016.	Županja	332	21	17	*A.sylvaticus* (n=8); *A.agrarius* (n=1); *A.flavicollis* (n=5); *M.agrestis* (n=2); *M.arvalis* (n=1)
08.07.2016.	Velika Gorica	200	63	27	*A.sylvaticus* (n=4); *A.agrarius* (n=8); *A.flavicollis* (n=14); *M.glareolus* (n=1);
12.09.2016.	Velika Gorica	200	33	27	*A.sylvaticus* (n=3); *A.agrarius* (n=6); *A.flavicollis* (n=15); *M.glareolus* (n=2);

					M.agrestis (n=1)
15.09.2016.	Velika Gorica	200	39	34	*A.sylvaticus* (n=7); *A.agrarius* (n=9); *A.flavicollis* (n=8); *M.glareolus* (n=3); *M.agrestis* (N=4); *M.arvalis* (n=3)
27.09.2016.	Lonja, Sunja,Sisak	100	26	24	*A.sylvaticus* (n=1); *A.agrarius* (n=14); *A.flavicollis* (n=1); *M.agrestis* (n=3); *M.arvalis* (n=4); *S.araneus* (n=1)
07.10.2016.	Čakovec	200	29	23	*A.sylvaticus* (n=3); *A.agrarius* (n=11); *A.flavicollis* (n=1); *M.glareolus* (n=3); *M.arvalis* (n=3); *S.araneus* (n=1); ND (n=1)
18., 19. i 20.10.2016.	Županja	877	109	104	*A.sylvaticus* (n=16); *A.agrarius* (n=47); *A.flavicollis* (n=11); *M.glareolus* (n=5); *M.agrestis* (n=7); *M.arvalis* (n=2); *S.araneus* (n=12); ND (n=4)
28.10.2016.	Koprivnica	200	78	74	*A.sylvaticus* (n=12); *A.agrarius* (n=25); *A.flavicollis* (n=27); *M.glareolus* (n=2); *M.arvalis* (n=7); ND (n=1)
09.12.2016.	Lipovljani	63	27	27	*A.sylvaticus* (n=3); *A.agrarius* (n=12); *M.glareolus* (n=4); *M.agrestis* (n=4); *M.arvalis* (n=1); *S.araneus* (n=3)

Br. PK- broj postavjenih klopki;

Br.UG – broj ulovljenih glodavaca;

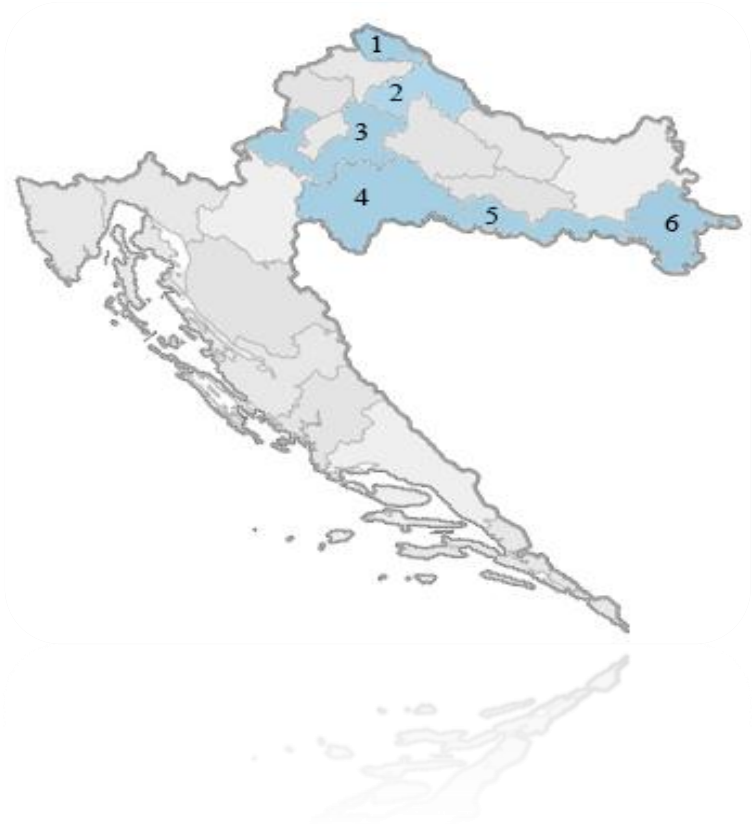
Br.UZ- broj arhiviranih i obrađenih uzoraka.

ND – nedeterminirano. Nemoguće odrediti temeljem morfoloških karakteristika.

Tablica 2. Prikaz svih ulovljenih vrsta (hrvatski i latinski nazivi) mišolikih glodavaca i malih sisavaca

Vrsta mišolikog glodavca i malog sisavca	Latinski naziv
Obični šumski miš	*Apodemus sylvaticus*
Žutogrli miš	*Apodemus flavicollis*
Poljski miš	*Apodemus agrarius*
Šumska voluharica	*Myodes glareolus*
Livadna voluharica	*Microtus agrestis*
Poljska voluharica	*Microtus arvalis*
Šumska rovka	*Sorex araneus*

Za potrebe istraživanja odabrana je skupina uzoraka mišolikih glodavaca izlovljenih 2014. i 2016. godine u geografskim područjima koja se smatraju endemskima te su povezana sa povećanom incidencijom bolesti u ljudi. To su područja Moslavine, Posavine, Banije, Turopolja, Podravine i Međimurja (Slika 2.). Sveukupno je bilo pretraženo 449 uzoraka jetre koji su prije početka ispitivanja bili pohranjeni na -80^{o}C.



Slika 2. Županije iz kojih potječu uzorci: 1. Međimurska županija, 2. Koprivničko-križevačka županija, 3. Zagrebačka županija, 4. Sisačko-moslavačka županija, 5. Brodsko-posavska županija i 6. Vukovarsko- srijemska županija

Utvrđivanje gustoće populacije glodavaca provedeno je metodom linearnog transekta, pri čemu omjer broja ulovljenih jedinki i postavljenih klopki (na odabranim transektima određene lokacije) daje podatak o relativnoj brojnosti životinja.
Relativna brojnost glodavaca računala se za svaki izlov po sljedećoj formuli:

$$\text{RB}= \frac{broj\ ulovljenih\ glodavaca}{broj\ postavljenih\ klopki} \times 100\%$$

Istraživački dio proveden je u Laboratoriju za leptospire (LEPTOlab), Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. Izdvajanje DNK iz jetre

Uzorci (jetre mišolikih glodavaca) bili su izvađeni iz zamrzivača (-80^{o}C) i ostavljeni na sobnoj temperaturi da se odmrznu. Za izdvajanje DNK uporabljen je komercijalni kit QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen. DNK je izdvojena iz materijala prema uputama proizvođača. Organi su usitnjeni sterilnim instrumentima (pinceta, skalpel, igle) nakon čega je za potrebe izdvajanja DNK odvagano 25mg usitnjenog tkiva. Cijeli proces pripreme obavljao se u mikrobiološkoj zaštitnoj komori. Usitnjeni uzorak stavljen je u Eppendorf epruvetu zapremnine 1,5 ml, te mu je dodano 180 µl pufera ATL koji pomaže lizu stanica. Zatim je dodano 20 µl enzima proteinaze K za lizu i sve promiješano na stolnoj laboratorijskoj tresilici. Uzorak je zatim podvrgnut inkubaciji na 56^{o}C preko noći u termomiješalici. Nakon inkubacije dodano je 200 µl pufera AL i vorteksirano 15 sekundi, te inkubirano 10 min na 70^{o}C na termomikseru. Epruveta s uzorkom je zatim centrifugirana na 1000 rpm 1 min u mikrocentrifugi kako bi se spustile kapljice tekućine iz poklopca epruvete. U epruvetu je potom dodano 200 µl 96%-tnog etanola, epruveta je vorteksirana i nakon toga centrifugirana na 1000 rpm 1 min. Iz epruvete je sadržaj prebačen u 2 ml epruvetu sa silikagelnom membranom na kojoj će biti zaustavljena DNK. Sadržaj epruvete centrifugan je na 8000 rpm 1 minutu. Epruveta s membranom je premještena u novu sakupljačku epruvetu, a sakupljačica bačena. Zatim je ispipetirano 500 µl pufera AW1 u epruvetu s membranom i centrifugirano 1 minutu na 8000 rpm. Epruveta s membranom je premještena u novu sakupljačicu, a stara se baca. U epruvetu s membranom se zatim dodalo 500 µl pufera AW2, te centrifugalo 3 minute na 14 000 rpm. Epruveta s membranom premještena je u sterilnu Eppendorf epruvetu od 1,5

ml, te je dodano 200 µl pufera AE za otpuštanje DNK sa silikagelne membrane. Sadržaj epruvete inkubiran je 1 minutu na sobnoj temperaturi i centrifugiran na 800 rpm kroz 1 minutu. Nakon toga bačena je epruveta s membranom, a u Eppendorf epruveti nalazi se izdvojena DNK iz uzorka jetre.

3.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Postupak lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu napravljen je pomoću komercijalnog kita *Max qPCR Kit for Francisella tularensis,* proizvođača *PCR Max* za *in vitro* detekciju i kvantifikaciju gena sukcinat dehidrogenaze (sdhA) bakterije *F. tularensis*. Kit je dizajniran za najširi profil detekcije uz visoku specifičnost za *F. tularensis* uključujući tri podvrste *F. tularensis holartica, mediasiatica i tularensis*. Pod optimalnim PCR uvjetima kit ima vrlo visoku učinkovitost > 95% i može otkriti manje od 100 kopija ciljnog DNK segmenta. Kit sadrži specifične početnice, Taq polimerazu i nukleotide koji će stvarati komplementarne segmente ciljne regije DNK *F. tularensis.* Reakcija se odvija na principu *Taqman* tehnologije u kojoj se koriste neobilježene početnice te specifične obilježene sonde. Detekcija se temelji na stvaranju fluorescentnog signala nakon razdvajanja fluorofora od prigušivača kod cijepanja sonde u PCR reakciji.

Priprema se reakcijska smjesa za točno određeni broj uzoraka. Volumeni pojedinih sastojaka za jedan uzorak prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Prikaz komponenti koje čine reakcijsku smjesu za jedan uzorak (10 µL), za detekciju genoma *F. tularensis* metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu

2x qPCR Master Mix	5 µl
Početnice/ proba mješavina za *F.tularensis*	0,5 µl
Voda	2 µl
Uzorak DNK	2,5 µl

Za kontrolu uspješnosti PCR reakcije potrebno je koristiti pozitivnu i negativnu kontrolu. Za pozitivnu kontrolu uzima se DNK uzročnika, te nam ona ukazuje da li su početnice i probe za otkrivanje ciljnog gena *F. tularensis* ispravno funkcionirale. Ako se kod pozitivne kontrole dobije negativan rezultat, test je nevažeći i potrebno ga je ponoviti. Kod negativne kontrole umjesto DNK koristi se RNA –ase/DNA-ase slobodna voda. Ona ukazuje da prilikom postavljanja reagensi nisu zagađeni.

U plastične kapilare stavlja se PCR reakcijska smjesa u koju je dodana izdvojena DNK za pojedini uzorak. Za svaki uzorak se rade po dvije reakcije. Kapilare su zatim stavljene u PCR uređaj, Rotor- Gene Q, Quiagen. U uređaju se odvijaju promjene temperature i reakcije koje su prikazane u tablici 4.

Tablica 4. Prikaz uvjeta lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu koji se odvijaju u uređaju Rotor- Gene Q

Programski korak	**Vrijeme izvođenja**	**Temperatura izvođenja**	
Aktivacija enzima	2 minute	95 °C	
Denaturacija	10 sekundi	95 °C	50 ciklusa
Prikupljanje podataka	60 sekundi	60°C	

Za analizu rezultata korišten je informatički program vezan za sam uređaj, Software Version Rotor- Gene 2.1.0.9.

Kao pozitivan na bakteriju *F. tularensis* opisujemo onaj uzorak koji je u oba ponavljanja (u duplikatu) imao Ct vrijednost ispod 38.

2x < 35 – pozitivan uzorak

1x< 35, 1x nema Ct – sumnjivo pozitivan (ponoviti pretragu)
1x> 35, 1x nema Ct – sumnjivo negativno (ponoviti pretragu)
2x nema Ct – negativan uzorak

4. REZULTATI

Tijekom ovog istraživanja pretraženo je ukupno 449 uzoraka jetre malih glodavaca i insektivora izlovljenih na endemskim područjima tularemije Republike Hrvatske.

Analizom podataka utvrđeno je da gustoća populacije glodavaca niti distribucija vrsta nije bila jednaka na svim područjima izlova (Tablica 5.). Fluktuacije u brojnosti zamijećene su i na istim lokacijama ovisno o datumu izlova (Tablica 5.).

Od ukupnog broja ulovljenih i pretraženih životinja najveći udio činili su miševi 79,04 %, dok su voluharice (16, 63 %) i rovke (4,33%) bile zastupljene u manjem broju (Slika 4.).

Tablica 5. Prikaz relativne brojnosti glodavaca po mjestu i vremenu ulova i omjer miševa, voluharica i rovki

Mjesto	Datum izlova	Relativna brojnost glodavaca (RB)	Omjer M:V:R
Međimurska županija		15%	15:6:1
Čakovec	07.10.2016.	15%	15:6:1
Koprivničko-križevačka županija		39%	64:9:0
Koprivnica	28.10.2016.	39%	64:9:0
Zagrebačka županija		23%	74:14:0
Velika Gorica	08.07.2016.	32%	26:1:0
Velika Gorica	12.09.2016.	17%	24:3:0
Velika Gorica	15.09.2016.	20%	24:10:0
Sisačko-moslavačka županija		2014.-91% ; 2016.-33%	95:18:4
Lipovljani	14.10.2014.	91%	64:2:0
Lonja, Sunja, Sisak	27.09.2016.	26%	16:7:1
Lipovljani	09.12.2016.	43%	15:9:3
Brodsko-posavska županija		1%	0:2:0
Stara gradiška	21.06.2016.	1%	0:2:0
Vukovarsko-srijemska županija		10%	99:27:12
Županja	05.07.2016.	7%	11:10:0
Županja	06.07.2016.	6%	14:3:0
Županja	18., 19. i 20.10.2016.	12%	74:14:12

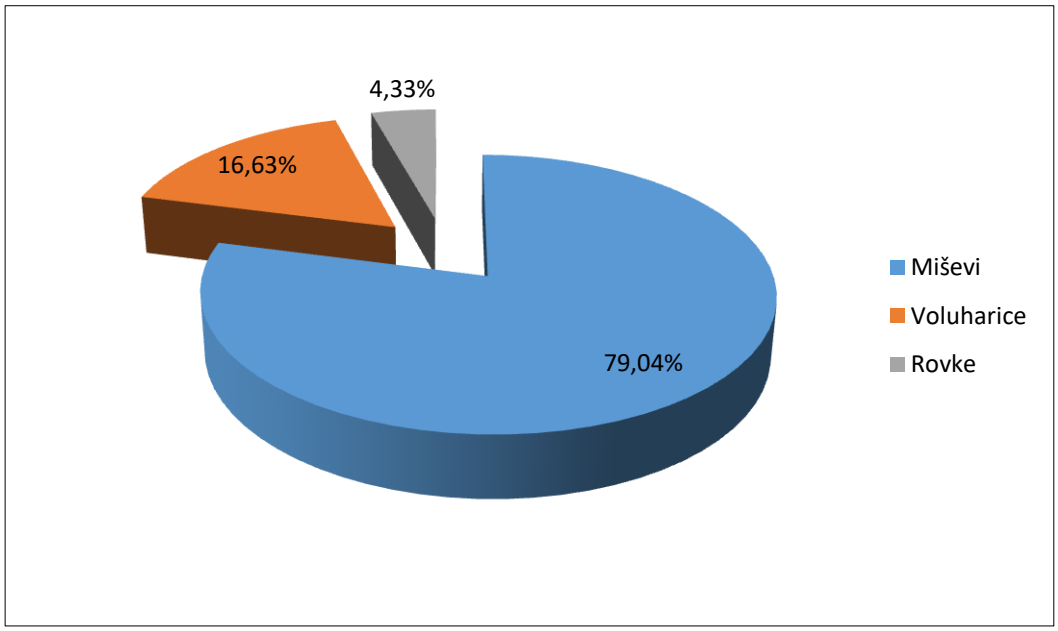
M - miševi

V - voluharice

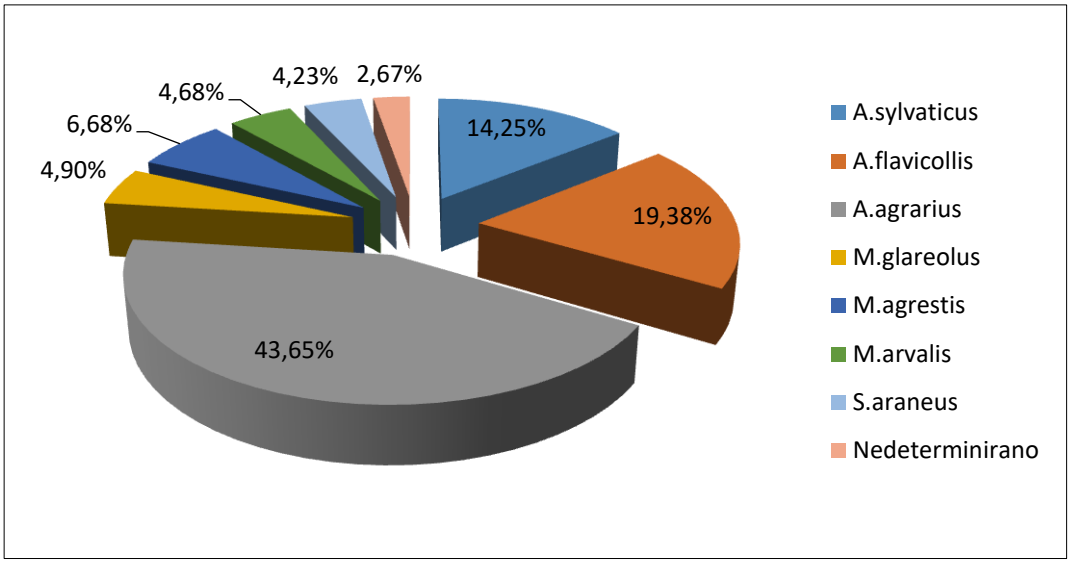
R – rovke

Zbirno, distribucija vrsta glodavaca i insektivora u cijelom uzorku bila je kako slijedi; poljski miš (*Apodemus agrarius*) – 196/449, 43,65%; žutogrli miš (*Apodemus flavicollis*) 87/449, 19,38%; obični šumski miš (*Apodemus sylvaticus*) 64/449, 14,25%; livadna voluharica (*Microtis agrestis*) 30/449, 6,68%, šumske voluharice (*Myodes glareolus*) 22/449, 4,90%; poljska voluharica (*Microtus arvalis*) 21/449, 4,68%, šumska rovka (*Sorex araneus*) 19/449, 4,23% . Za deset uzoraka temeljem morfoloških karakteristika nije se mogla odrediti vrsta glodavaca (Slika 3).

U svakom ulovu zasebno najveći udio bili su miševi, zatim voluharice i rovke. Njihovi omjeri prikazani su u Tablici 5.

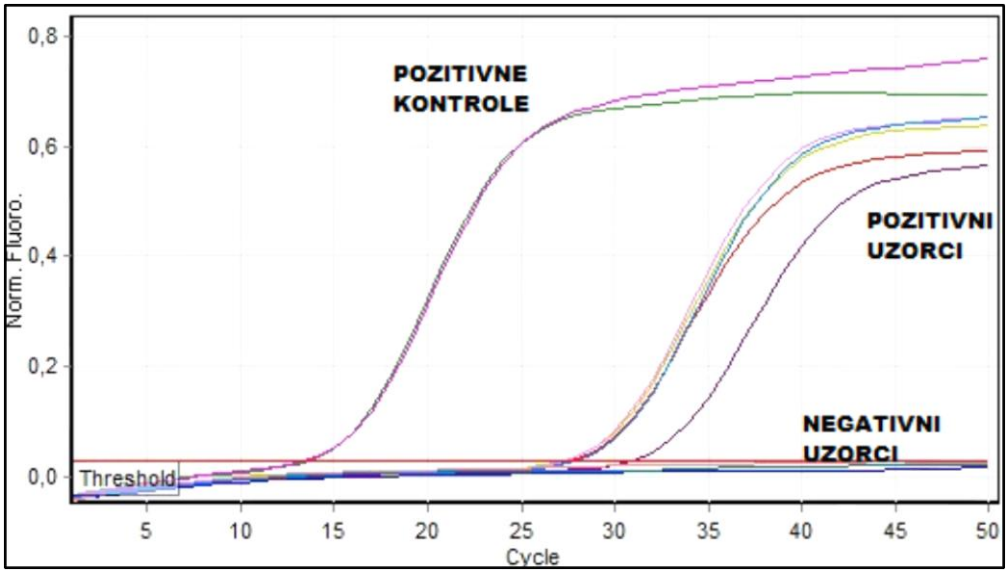


Slika 3. Omjer miševa, voluharica i rovki u ukupnom broju pretraženih uzoraka



Slika 4. Ukupan broj uzoraka (449) prikazan u postocima po vrsti

U tri uzorka utvrđena je prisutnost DNK *F. tularensis*. Sva tri pozitivna uzorka bila su s istog mjesta ulova (Lipovljani, 14.10.2014), tijekom kojeg je utvrđena relativna brojnost glodavaca od 91% pri čemu su miševi činili 96,97%, a voluharice 3,03% ulova (Slika 3.) (Tablica 7.). Dva pozitivna uzorka jetre bila su od poljskog miša (*Apodemus agrarius*) i jedan uzorak jetre od običnog šumskog miša (*Apodemus sylvaticus*).



Slika 5. Amplifikacijske krivulje pozitivnih uzoraka, te pozitivnih i negativnih kontrola

Tablica 6. Ct vrijednosti za pozitivne uzorke, te za pozitivne i negativne kontrole

	Boja	**Uzorci**	**Ct**
1.		M-1717	27,90
2.		M-1717	27,37
3.		M-1739	29,70
4.		M-1739	30,91
5.		M-1758	27,43
6.		M1758	28,04
7.		NEGK	-
8.		NEGK	-
9.		POZK	13,66
10.		POZK	13,55

M-1717 - *Apodemus sylvaticus* (obični šumski miš)- pozitivan

M-1739 - *Apodemus agrarius* (poljski miš)- pozitivan

M-1758 - *Apodemus agrarius* (poljski miš)- pozitivan

NEGK - negativna kontrola

POZK - pozitivna kontrola

Dobiveni rezultati daju prevalenciju tularemije među populacijom mišolikih glodavaca od 3,3% (3/91) na području ulova odnosno 0,67% (3/449) ukoliko promatramo ukupan broj pretraženih glodavaca.

5. RASPRAVA

U Europi je u posljednje vrijeme zabilježena povećana pojavnost tularemije uz povremenu pojavu, uglavnom manjih, zatvorenih epidemija (LUQUE-LARENA i sur., 2015 GYURANECZ i sur., 2012.; ROSSOW i sur., 2014.; ROSSOW i sur., 2015). Pretpostavlja se da bi razlog povećane pojavnosti tularemije mogao biti vezan uz klimatske promjene (globalno zatopljenje) koje pogoduju održavanju populacije divljih glodavaca (rezervoara tularemije), ali i samih vektora. Promjenjiva gustoća rezervoara i vektora *F.tularensis* igraju važnu ulogu u ekološkom ciklusu tularemije u različitim ekosustavima. Veza između izbijanja tularemije i fluktuacije gustoće populacije glodavaca opisana je diljem Europe (LUQUE-LARENA i sur., 2015.; GYURANECZ i sur., 2012.; ROSSOW i sur., 2014.; ROSSOW i sur., 2015.).

Zadnja sustavna istraživanja tularemije u Hrvatskoj datiraju iz 70 i 80-tih godina prošlog stoljeća. Upravo zbog oskudnih istraživanja tularemije u Hrvatskoj, kojih nakon tog razdoblja skoro nije niti bilo, u ovom diplomskom radu istraživana je učestalost infekcije u populaciji mišolikih glodavaca i malih sisavaca u endemskim poručjima tularemije. Na temelju dobivenih rezultata ovog istraživanja može se utvrditi da je prevalencija infekcije u populaciji glodavaca relativno niska (0,67 %) što je u skladu s rezultatima istraživanja ostalih Europskih država. U Mađarskoj je prevalencija bolesti u populaciji europskog smeđeg zeca iznosi 0,66-1,1 % (GYURANECZ i sur., 2010.), dok se među mišolikim glodavcima prevalencija kreće između 0-5 %, vrlo slično kao i u Švedskoj gdje prevalencija iznosi 0,42 % (GYURANECZ i sur. 2011.; BROAMAN i sur. 2011.).

Rezultati našeg istraživanja upućuju na činjenicu da u slučajevima povećane brojnosti i prevalencija infekcije raste (3,3% kod prosječne gustoće od 91%). Iz literaturnih podataka znamo da eksperimentalno inficirani glodavci ugibaju unutar nekoliko dana nakon akutnih infekcija, a do prijenosa može doći izravnim kontaktom, kanibalizmom ili preko kontaminiranog okoliša (RODRÍGUEZ-PASTOR i sur. 2017.). U širenju infekcije u prirodnim uvjetima sudjeluju i razni člankonošci, uglavnom buhe i krpelji (RODRÍGUEZ-PASTOR i sur. 2017.). Kod smanjene gustoće populacije oboljeli glodavci inficiraju manji broj životinja, a bakterija se teže održava u populaciji. Kod porasta gustoće populacije mišolikih glodavaca dolazi do češćih međusobnih kontakata, olakšan je prijenos bakterije s jedne životinje na drugu, a povećava se i mogućnost pronalaska pozitivne živuće životinje.

U nekoliko istraživanja opisana je izravna i pozitivna povezanost između prevalencije *F.tularensis* u voluharica i njihove relativne brojnosti te povezanost između povećane gustoće populacije glodavaca i povećane incidencije bolesti u ljudi. Eksponencijalni rast populacije voluharica pokazao se ključan za prijenos tularemije na poljoprivredna zemljišta, a povećana brojnost voluharica povezana je s pojavom slučajeva tularemije u ljudi u Španjolskoj (LUQUE-LARENA i sur,. 2015.; RODRÍGUEZ-PASTOR i sur., 2017.). Slične poveznice opisane su i tijekom zadnjih sustavnih istraživanja tularemije u Hrvatskoj. Borčić (1973.) tvrdi da svako prirodno žarište karakteriziraju prostorne i vremenske fluktuacije što je uvjetovano porastom brojnosti mišolikih glodavaca (svake 3-4 godine manja, svakih 9-11 godina veća), što zavisi od klimatskih i genetskih faktora, a poklapa se s epidemijama tularemije u žarištu. Ovim istraživanjem je u Hrvatskoj krajem 2014. u jednom od endemskih područja tularemije relativna brojnost glodavaca bila čak 91%, a sljedeće godine 2015. zabilježena je veća stopa oboljelih ljudi, čak 13 slučajeva dok je inače stopa bolesti do pet osoba godišnje u minulih 12 godina. Iznimka je bila još 2005. godine kada je broj oboljelih bio deset prema podacima iz Hrvatskog zdravstvenog statističkog ljetopisa.

Iz naših podataka može se vidjeti da je relativna brojnost glodavaca nešto viša za vrijeme jesenskih mjeseci, u vrijeme kad ima obilje hrane, a brojna istraživanja pokazuju pozitivan utjecaj uroda šumskog sjemena na porast brojnosti šumskih glodavaca (CRESPIN i sur., 2002.; JENSEN i sur., 2012.). Na gustoću populacije malih glodavaca utječe i vegetacija, tako je istraživanjem utvrđeno da se nakon godine povišenog uroda bukvice jasno raspoznaje porast populacije malih glodavaca,jer urod šumskog sjemena u jesen omogućava glodavcima produljenje sezone razmnožavanja (BJEDOV i sur.,2016.). Najveća utvrđena relativna brojnost glodavaca tijekom ovog istraživanja zabilježena je 14.10.2014. i iznosila je 91% (Lipovljani) dok se kod ostalih ulova u 2016. godini relativna brojnost kretala od 1-43%. Dostupne publikacije opisuju bogat urod bukvice tijekom 2013. godine (BJEDOV i sur. 2016.)

Za razliku od ostalih Europskih istraživanja u kojima se *F. tularensis* uglavnom povezuje s voluharicama u našem istraživanju *F.tularensis* je utvrđena samo u miševa - poljskom (*Apodemus agrarius*) i običnom šumskom mišu (*Apodemus sylvaticus*). Dobivene rezultate povezujemo s činjenicom da je u istraživanim područjima RH utvrđena veća brojnost miševa nego voluharica, dok je u Španjolskoj i Finskoj veća brojnost voluharica (RODRÍGUEZ-PASTOR i sur., 2017; ROSSOW i sur., 2015.).

Ovim istraživanjem dokazali smo prisustvo *F. tularensis* u populaciji mišolikih glodavaca izlovljenih u endemskim područima RH. Povezali smo povećanu pojavnost bakterije u populaciji glodavaca s povećanom brojnošću populacije. Dobiveni podatci upućuju i na moguću svezu između prevalencije *F.tularensis* u glodavaca i *F.tularensis* u ljudi. Daljnja istraživanja neophodna su kako bismo potpunije razumjeli epizootiološko/epidemiološki ciklus *F.tularensis* u Republici Hrvatskoj.

6. ZAKLJUČCI

Gustoća populcije glodavaca nije jednaka na svim područjima izlova. Fluktuacije u brojnosti zamijećene su i na istim lokacijama u različitim razdobljima izlova.

Prisustvo *F. tularensis* dokazano je u dva poljska (*Apodemus agrarius*) i jednog običnog šumskog miša (*Apodemus sylvaticus*).

Ukupna prevalencija *F. tularensis* u populaciji mišolikih glodavaca je niska i iznosi 0,67%.

Prevalencija tularemije među populacijom mišolikih glodavaca povezana je s gustoćom populacije mišolikih glodavaca. Kod gustoće populacije od 91% prevalencija tularemije bila je 3,3%.

Za razliku od većine Europskih studija tijekom ovog istraživanja F. tularensis nije dokazana u voluharica već samo u miševa. Dobivene rezultate povezujemo s većom brojnošću miševa (79,04 %, od čega je 43,65% poljski miš) nego voluharica (16,63%) i rovki (4,33%), na tom području.

Iz dobivenih rezultata može se naslutiti eventualna povezanost povećane gustoće i povećane prevalencije *F. tularensis* u populaciji glodvaca s povećanom incidencijom tularemije u ljudi.

7. LITERATURA

ABD, H., T. JOHANSSON, I. GOLOVLIOV, G. SANDSTRÖM, M. FORSMAN (2003.): Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. Appl Environ Microbiol; 69:600-6

ANONIMUS (2002.): Tularemia-United States 1990-2000. Centers for Disease Control and Prevention. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2002; 51(9):182-4) ATPase proton pump and phagosome acidification are essential for escape of *Francisella tularensis* into the macrophage cytosol. Infect Immun.*;* 76: 2671–7

BAUMEISTER, BM., ED. RAMSAY (1984.): Tularemia in a lowland gorilla, in Proceedings. 4th Annu Meet Assoc Zoo Vet Tech;11–18

BEHR, M. (2000.): Laboratory-acquired lymphadenopathy in a veterinary pathologist. Lab Anim (NY); 29:23-25

BEZJAK, B., D. KATUNARIĆ (1956.):Interni oblici tularemije, https://library.foi.hr/m8/S01101/1956/1956_05-06.pdf

BJEDOV, L., P. SVOBODA, A. TADIN, J. HABUŠ, Z. ŠTRITOF, N. LABAŠ, M. VUCELJA, A. MARKOTIĆ, N. TURK, J. MARGALETIĆ (2016.):Utjecaj uroda sjemena obične bukve (*Fagus sylvatica* L.) na populacije sitnih glodavaca i pojavnosti hantavirusa u šumama nacionalnog parka „Plitvička jezera“ i parka prirode „Medvednica“; Šumarski list, 9-10: 455-464

BLANCO, JR., C. GUTIERREZ, M. ZABALZA, J. SALCEDO, I. ERDOZAIN, JA. OTEO (2001.): Clinical microbiological case: sore throat and painful bilateral lymph nodes. Clin Mivrobiol Infect; 7 (11): 654

BOKAN, S. (2003.): Biological and toxin weapons-bioterrorism. Arh Hig Rada Toksikol; 54:29-43

BORČIĆ, B. (1973.): Epidemiološka obilježja tularemije u njenim prirodnim žarištima u Hrvatskoj. Zagreb: Medicinski fakultet

BRKIĆ, I., B. BORČIĆ, B. ALERAJ (2005.): Tularemija u Petrinji 1998.-1999., Hrvatski časopis za javno zdrastvo, Volumen 1:br 4, 7.listopad 2005

BROMAN, T., J. THELAUS, AC. ANDERSSON, P. BA¨CKMAN (2011.) :Molecular detection of persistent Francisella tularensis subspecies holarctica in natural waters. Int JMicrobiol

CALHOUN, EL. (1954.): Natural occurrence of tularemia in the lone star tick, Amblyomma americanum (Linn), and in dogs in Arkansas. Am J Trop Med Hyg; 3:360-366

CALHOUN, EL., CO. MOHR, HI. ALFORD (1956.): Dogs and other mammals as hosts of tularemia and of vector ticks in Arkansas. Am J Hyg; 63:127-135

CHECROUN, C., TD. WEHRLY, ER. FISCHER, SF. HAYES, J. CELLI (2006.): Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. Proc Natl Acad Sci.; 103: 14578–83

CLAUS, KD., JH. NEWHALL, D. MEE (1959.): Isolation of Pasteurella tularensis from foals. J Bacteriol; 78:294-295

CLEMENS, DL., BY. LEE, MA. HORWITZ (2005.): *Francisella tularensis* enters macrophages via a novel process involving pseudopod loops. Infect Immun; 73: 5892

CONLAN, JW., W. CHEN, H. SHEN, A. WEBB, R. KUOLEE (2003.): Experimental tularemia in mice challenged by aerosol or intradermally with virulent strains of *Francisella tularensis*: bacteriologic and histopathologic studies. Microb Pathog.; 34: 239–48

CRESPIN, L., R. VERHAGEN, NC. STENSETH, NG. YOCCOZ, AC. PREVOT-JULLIARD, JD. LEBRETON (2002): Survival in fluctuating bank vole populations: seasonal and yearly variations. Oikos; 98: 467-479

DJORDJEVIC, M., J. GARBINO, I. UCKAY, C. GARZONI, V. KOSTIC, B. LAKO, D. TASIC (2005.): An abrupt onset of tularemia in children in Kosovo. In: Abstract book of the 15th ECCMID; Copenhagen, Denmark. p 399

ĐORĐEVIĆ-SPASIĆ, M. (2014.) :Immunodiagnostic and molecular methods in evaluation of the therapy efficiency on patients suffering from tularemia

EIROS BOUZA, JM., A. RODRIGUEZ TORRES (1998.): Tularemia. Rev Clin Esp.:785-8

ELIASSON, H., J. LINDBACK, JP. NUORTI, M. ARNEBORN, J. GIESECKE, A. TRGNELL (2002.): The 2000 tularemia outbreak: a case-control study of risk factors in disease-endemic and emergent areas, Sweden. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8(9): 956-60.

EMMONS, RW., JD. WOODIE, MS. TAYLOR (1970.): Tularemia in a pet squirrel monkey (Saimiri sciureus). Lab Anim Care;20:1149–1153

EVANS, ME., AM. FRIEDLANDER (1997.): Tularemia. In: Sidell FR, Takafuji ET, Franz DR, editors.Textbook of Military Medicine: Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare.Part I: Warfare, Weapons, and the Casualty. Washington, DC: Borden Institute, United States Government Printing; p503 – 512.

GEIGER, JC (1931.): Tularemia in cattle and sheep. Calif West Med; 34:1-3

GEYER, SJ., A. BURKEY, FW. CHANDLER (1997.): Tularemia. In: Pathology of Infectious Diseases Connor DH. (Ed), Appleton & Lange, Stamford, Conn, 869

GISTAFSON, BW., LJ. DEBOWES (1996.): Tularemia in a dog. J Am Anim Hosp Assoc; 32:339-341

GYURANECZ, M., K. RIGO, A. DAN, G. FO¨LDVA´RI (2011.): Investigation of the ecology of *Francisella tularensis* during an interepizootic period. Vector Borne Zoonotic Dis; 11:1031–1035

GYURANECZ, M., L. FODOR, L. MAKRAI, L. MONSE (2010.): Epidemiology of tularemia, with special regard to the infection of European brown hare (*Lepus europaeus*). Magy A´ llatorv Lapja; 132:39–45

GYURANECZ, M., J. REICZIGEL, K. KRISZTALOVICS, L. MONSE, GK. SZABÓNÉ, A. SZILÁGYI (2012.): Factors influencing emergence of tularemia, Hungary, 1984–2010. Emerg Infect Dis.;18:1379–81

HABRUN, B. (2010.): Tularemija-Antropozoonoze: eidemiološka i klinička slika, dijagnostika, terapija i prevencija; Zagreb:Medicinska naklada; 23-25

HELVACI, S., S. GEDIKOGLU, H. AKALIN, HB. ORAL (2000.): Tularemia in Bursa, Turkey: 205 cases in ten years. Eur J Epidemiol; 16(3): 271-6

HERAK-PERKOVIĆ, V., Ž. GRABAREVIĆ, J. KOS (2012): Veterinarski priručnik; 2553-2554

JACOBS, R. (1997.): Tularemia. Adv Ped Infect Dis; 12:55-69

JELLISON, WL. (1971.): Tularemia in Montana. Mont Wildl; 5-24

JENSEN, PG., C. DEMERS, S. MCNULTY, W. JAKUBAS, MM. HUMPHRIES MM (2012): Responses of marten and fisher to fluctuations in prey populations and mast crops in northern hardwood forest. J.Wildl. Manag; 76:489-502

JOHNSON, HN. (1944.): Natural occurrence of tularemia in dogs used as a source of canine distemper virus. J Lab Clin Med; 29:906-915

KOMITOVA, R., R. NENOVA, P. PADESHKI, I. IVANOV, V. POPOV, P. PETROV (2010): Tularemia in Bulgaria 2003-2004.Infect Dev Ctries.; 24;4(11): 689-94

LUQUE-LARENA, JJ., F. MOUGEOT, DV. ROIG, X. LAMBIN, R. RODRÍGUEZ-PASTOR, E. RODRÍGUEZ-VALÍN (2015.): Tularemia outbreaks and common vole (*Microtus arvalis*) irruptive population dynamics in northwestern Spain, 1997–2014. Vector Borne Zoonotic Dis.;15:568–70

MIHALJEVIĆ, F., J. FALIŠEVAC, B. BEZJAK, B. MRAVUNAC (1994.): Specijalna klinička infektologija.8.izd.Zagreb:Medicinska naklada

MORNER, T. (1994.): Tularemia in hares in Sweden. Swedish University of Agricultural science, Uppsala

MORNER, T.(1992.): The ecology of tularemia. *Rev Sci Tech*.; 11 (4): 1123-30

MORNER, T., E. ADDISON, E.S. WILLIAMS, I.K. BARKER (2001): Tularemia: infecous diseas ofwild animals; 303-12

NAGLIĆ, T., D. HAJSIG, J. MADIĆ, LJ. PINTER (2005.): Veterinarska mikrobiologija; Specijalna bakteriologija i mikologija; 38-39

NAYAR, GPS., GJ. CRAWSHAW, JL. NEUFELD (1979.): Tularemia in a group of nonhuman primates. J Am Vet Med Assoc; 175:962–963

OHARA, Y., T. SATO, M. HOMMA (1998.): Arthropod-borne tularemia in Japan:clinical analysis of 1,374 cases observed between 1924 and 1996. J Med Entomol; 35(4):471

REINTJES, R., I. DEDUSHAJ, A. GJINI, TR. JORGENSEN, B. COTTER, A.LIEFTUCHT, F. D'ANCONA, DT. DENNIS, MA. KOSOY, G. MULLIQI-OSMANI, R. GRUNOW, A. KALAVESHI, L. GASHI, I. HUMOLLI (2002.): Tularemia outbreak investigation in Kosovo:case control and environmental studies. Emerg Infect dis; 8 (1): 69-73

RODRÍGUEZ-PASTOR, R., R. ESCUDERO, D. VIDAL, F. MOUGEOT, B. ARROYO, X. LAMBIN, AM. VILA-CORO ,I. RODRÍGUEZ-MORENO, P. ANDA, JJ. LUQUE-LARENA (2017.): Density-Dependent Prevalence of *Francisella tularensis* in Fluctuating Vole Populations, Northwestern Spain; Vol.23, No.8

ROSSOW, H., KM. FORBES, E. TARKKA, PM. KINNUNEN, H. HEMMILÄ, O. HUITU (2014.): Experimental infection of voles with *Francisella tularensis* indicates their amplification role in tularemia outbreaks. PLoS One; 9:e108864

ROSSOW, H., J. OLLGREN, J. HYTÖNEN, H. RISSANEN, O. HUITU, H. HENTTONEN (2015.): Incidence and seroprevalence of tularaemia in Finland, 1995 to 2013: regional epidemics with cyclic pattern. Euro Surveill; 20:21209

SANTIC, M., S. AL-KHODOR, Y. ABU KWAIK (2010.): Cell biology and molecular ecology of *Francisella tularensis*. Cell Microbiol; 12:129

SANTIC, M., R. ASARE, I. SKROBONJA, S. JONES, Y. ABU KWAIK (2008.): Acquisition of the vacuolar

SEMIĆ, V., M. BREZOVEC, I. LAZARIĆ, M. ŠANTIĆ (2009.): Ekologija, domaćini i vektori bakterije *Francisella tularensis*

SJÖSTEDT, A. (2007): Tularemia:history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical manifestations. Ann N Y Acad Sci; 1105:1-29

SYRJALA, H., P. KUJALA, V. MYLLYLA, A. SALMINEN (1985.): Airborne transmission of tularemia in farmers. Scand J Infect Dis.; 17(4): 371–5

TÄRVNIK, A., L. BERGLUND (2003.): Tularemia. Eur Respir J; 21(2):361-73

TÄRVNIK, A., G. GANDSTROM, A. SJOSTEDT (1996.): Epidemilogical analysis of tularemia in Sweden 1931-1993. FEMS immunology and medical microbiology; 13(3):201-4

WAGGIE, K., P. DAY-LOLLINI, P. MURPHY-HACKLEY, (1997.): Diagnostic exercise: illness, cutaneous hemorrhage, and death in two squirrel monkeys (Saimiri sciureus). Lab Anim Sci; 47:647–649

WOODS, JP., RJ. PANCIERA, RJ. MORTON (1998.): Feline tularemia. Compend Contin Educ Pract Vet; 20:442-457

8. SAŽETAK

Utvrđivanje proširenosti bakterije *Francisella tularensis* u populaciji mišolikih glodavaca

Tularemija je zoonoza koju uzrokuje gram negativna, kokobacilarna, nepokretna, aerobna bakterija *Francisella tularensis*. Glavni rezervoari bolesti su zečevi i glodavci, a najvažniji vektori su krpelji. Iako se bolest smatra endemskom, u posljednje vrijeme je u Europi zabilježena povećana pojavnost uz povremenu pojavu, najčešće manjih, zatvorenih epidemija. Uz ostale čimbenike, povećana incidencija bolesti veže se i uz klimatske promjene koje pogoduju širenju i povećanju brojnosti glodavaca (rezervoara) i krpelja (vektora). Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učestalost infekcije u mišolikih glodavaca i malih sisavaca unutar endemskih područja tularemije Republike Hrvatske. U tu svrhu ukupno 449 uzoraka jetre glodavaca pretraženo je pomoću lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu kako bi se dokazalo prisustvo specifičnih odsječaka *F. tularensis*. Retrogradno su prikupljeni i analizirani i podaci o relativnoj gustoći populacije glodavaca tijekom izlova i zastupljenosti pojedenih vrsta. Dobiveni rezultati ukazuju da gustoća populacije glodavaca niti distribucija vrsta nije bila jednaka na svim područjima izlova. Fluktuacije u brojnosti zamijećene su i na istim lokacijama ovisno o datumu izlova. Prisustvo *F. tularensis* dokazano je u uzorcima dva poljska i jednog običnog šumskog miša. Svi pozitivni miševi ulovljeni su 2014.godine u mjestu Lipovljani kada je relativna brojnost glodavaca bila je izuzetno visoka (91%) u usporedbi sa svim ostalim izlovima (1-43%). Dobiveni rezultati daju prevalenciju tularemije među populacijom mišolikih glodavaca od 3,3% (3/91) na području ulova odnosno 0,67% (3/449) ukoliko promatramo ukupan broj pretraženih glodavaca.

Ovim istraživanjem utvrdili smo prisutnost bakterije *F.tularensis* među populacijom mišolikih glodavaca i povezali povećanu pojavnost bakterije u populaciji glodavaca s povećanom brojnošću populacije. Dobiveni podatci upućuju i na moguću svezu između povećane pojavnosti *F.tularensis* u glodavaca i *F. tularensis* u ljudi. Daljnja istraživanja neophodna su kako bismo potpunije razumjeli epizootiološko/epidemiološki ciklus *F.tularensis* u endemskim žarištima Republike Hrvatske.

Ključne riječi: mišoliki glodavci, tularemija, PCR

9. SUMMARY

Prevalence of *Francisella tularensis* in small rodent population

Tularemia is a zoonosis caused by a Gram-negative, coccobacillary, non-motile, aerobic bacterium *Francisella tularensis*. The main reservoirs of the disease are hares and rodents, and the most important vectors are ticks. Even though considered endemic, lately there has been an increase in incidence throughout Europe with an occasional appearance of mostly minor, closed epidemics. Alongside other factors, the increased incidence is also linked to climatic changes that favor the spread and an increase in numbers of rodents (reservoirs) and ticks (vectors). Aim of this study was to determine the frequency of the infection in small rodents and mammals within the endemic areas of the Republic of Croatia. For this purpose, 449 liver samples were tested by real-time PCR method. Data on relative density and the distribution of certain species of rodents at different hunting sites were collected and analyzed. Obtained results indicate that neither the density of the rodent population nor the distribution of species were equal on all hunting sites. Fluctuations in numbers were also noted on the same sites, depending on the date of the hunt. The presence of *F. tularensis* was detected in two striped field mice and one wood mouse. All positive animals were caught in 2014. in Lipovljani when the relative numbers of rodents were extremely high (91%) compared to other hunts (1-43%). The gotten results indicate tularemia prevalence among the population of small rodents of 3.3% (3/91) in that area, or 0.67% (3/449) when observing the overall number of tested rodents.

With this research we have determined the presence of *F. tularensis* within the population of small rodents and connected the increased incidence of the bacteria in the population of rodents with the increased abundance of rodents. The results of the research also indicate a possible connection between the increased frequency of *F. tularensis* in rodents and increase incidence of the disease in humans. Further research is necessary in order to better comprehend the epidemiologic cycle of *F. tularensis* in endemic foci of the Republic of Croatia.

Key words: mice-like rodents, tularemia, PCR

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Čakovcu 1991. godine. Svoje obrazovanje započela sam u Osnovnoj školi Mursko Središće. Svoje srednjoškolsko obrazovanje započinjem 2006.godine kada upisujem Gimnaziju Čakovec, smjer prirodoslovno- matematički. Maturirala sam 2010. i te iste godine upisujem Veterinarski fakultet u Zagrebu, na kojem sam trenutno apsolvent. Na petoj godini studija kratko vrijeme sam volontirala na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom što je uključivalo i noćna dežurstva. Terensko stručnu praksu i stručno klinički rad obavljala sam u Sloveniji u veterinarskoj klinici Pesnica – MZ VET preko Erasmus + programa. Tamo sam provela dva mjeseca gdje sam stekla puno novog iskustva u radu u ambulanti te sam iskušala rad terenskog veterinara.