

# Utvrđivanje prisutnosti bakterije Anaplasma Phagocytophilum u populaciji mišolikih glodavaca

---

Papak, Ines

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:545203>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -](#)  
[Repository of PHD, master's thesis](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**VETERINARSKI FAKULTET**

**Ines Papak**

**UTVRĐIVANJE PRISUTNOSTI BAKTERIJE *ANAPLASMA  
PHAGOCYTOPHILUM* U POPULACIJI MIŠOLIKIH  
GLODAVACA**

*Diplomski rad*

**Zagreb, 2019.**

**Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom  
Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu**

**Predstojnik:** prof. dr. sc. Zoran Milas

**Mentorica:** doc. dr. sc. Suzana Hađina, dr. med. vet.

**Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:**

1. Izv. prof. dr. dc. Zrinka Štritof
2. Doc. dr. sc. Josipa Habuš
3. Doc. dr. sc. Suzana Hađina
4. Izv. prof. dr. sc. Vilim Starešina - zamjena

*Željela bih se ovom prilikom zahvaliti svima koji su potpomogli izradi ovog diplomskog rada, prvenstveno svojoj mentorici doc.dr.sc. Suzani Hađini na uloženom vremenu, savjetima, razumijevanju, strpljenju te stručnom vodstvu.*

*Zahvaljujem dr. sc. Vesni Mojčec Perko, dipl.ing.mol.biol. na potpori, motivaciji, savjetima i velikoj pomoći prilikom praktičnog dijela izrade rada, te izuzetnoj profesionalnoj pristupačnosti i ljubaznosti .*

*Ovim putem također zahvaljujem doc. dr. sc. Lauri Goodman, Population Medicine and Diagnostic Sciences, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta Cornell, SAD na ustupljenoj DNK bakterije *A. phagocytophilum*.*

*Posebno hvala mojoj obitelji na potpori, motivaciji, savjetima i neograničenom razumijevanju kroz godine studiranja.*

*Hvala Rafału na neizmjernej potpori i motivaciji u teškim trenucima.*

*Osim toga, zahvaljujem se svima koji su me podržavali i motivirali tijekom studiranja posebno mojim prijateljima koji su bili sa mnom od prvog do zadnjeg dana i učinili godine studiranja nezaboravnim iskustvom.*

## SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD.....   | 1  |
| 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA .....  | 2  |
| 2.1. Povijest.....   | 2  |
| 2.2. Zemljopisna proširenost.....  | 2  |
| 2.3. Etiologija.....   | 2  |
| 2.4. Epizootiologija.....  | 4  |
| 2.5. Patogeneza.....   | 6  |
| 2.6. Klinička slika.....   | 7  |
| 2.6.1. Domaće životinje.....   | 7  |
| 2.6.2. Ljudi.....  | 8  |
| 2.7. Patoanatomski i patohistološki nalaz.....   | 8  |
| 2.8. Dijagnostika.....   | 9  |
| 2.9. Diferencijalna dijagnostika.....  | 10 |
| 2.10. Liječenje.....   | 10 |
| 2.11. Profilaksa.....  | 11 |
| 3. MATERIJALI I METODE.....  | 12 |
| 3.1. Obrada uzoraka.....   | 12 |
| 3.2. Utvrđivanje prisutnosti bakterije <i>A. phagocytophilum</i> korištenjem metode ugniježdene PCR reakcije.....            | 14 |
| 3.2.1. Vanjska lančana reakcije polimerazom.....   | 14 |
| 3.2.2. Unutarnja lančana reakcije polimerazom.....   | 16 |
| 3.3. Agarozna elektroforeza.....   | 17 |
| 3.4. Sekvenciranje nasumično odabranih uzoraka.....  | 18 |
| 4. REZULTATI.....  | 19 |
| 4.1. Istraživana populacija mišolikih glodavaca.....   | 19 |
| 4.2. Utvrđivanje prisutnosti bakterije <i>A. phagocytophilum</i> korištenjem parova početnica EC9/EC12a i SSAP2f/SSAP2r..... | 20 |
| 4.3. Rezultati sekvenciranja nasumično odabranih uzoraka.....  | 24 |
| 5. RASPRAVA.....   | 25 |
| 6. ZAKLJUČCI.....  | 28 |
| 7. LITERATURA.....   | 29 |

|                     |    |
|---------------------|----|
| 8. SAŽETAK .....    | 37 |
| 9. SUMMARY .....    | 38 |
| 10. ŽIVOTOPIŠ ..... | 39 |

## **Popis kratica**

**DNK**- deoksiribonukleinska kiselina

**RNK**- ribonukleinska kiselina

**HGA**- humana granulocitna anaplazmoza

**TAE** -Tris Acetatni EDTA (etilen-diamin-tetraoctena kiselina) puffer

**16S rRNK**- 16S ribosomska RNK

**PCR** (eng. *polymerase chain reaction*) - lančana reakcija polimerazom

**ELISA** (eng. *enzyme linked immunosorbent assay*) - imunoenzimni test

**HME**- humana monocitotropna erlihioza

## **Popis slika**

**Slika 1.** Proširenost krpelja iz roda *Ixodes* na sjevernoj polutci.

**Slika 2.** Razvojni stadiji krpelja *Ixodes ricinus*.

**Slika 3.** Mjesta izlova mišolikih glodavaca.

**Slika 4.** Vizualizacija pozitivnih PCR uzoraka u 1% agaroznom gelu pomoću UV svjetla.



## **Popis tablica**

**Tablica 1.** Broj uzorkovanih životinja, te datum uzorkovanja prema lokalitetu.

**Tablica 2.** Prikaz broja i vrste izlovljenih jedinki mišolikih glodavaca.

**Tablica 3.** Oligonukleotidni sastav početnica korištenih za vanjsku PCR reakciju.

**Tablica 4.** Prikaz sastavnica PCR smjese za provođenje vanjske PCR reakcije.

**Tablica 5.** Prikaz uvjeta provođenja vanjske PCR reakcije po temperaturama i vremenskom trajanju pojedinih koraka reakcije.

**Tablica 6.** Oligonukleotidni sastav početnica korištenih za unutarnju PCR reakciju.

**Tablica 7.** Prikaz sastavnica PCR smjese za provođenje unutarnje PCR reakcije.

**Tablica 8.** . Prikaz uvjeta provođenja unutarnje PCR reakcije po temperaturama i vremenskom trajanju pojedinih koraka reakcije.

**Tablica 9.** Uzorci kod kojih je utvrđena prisutnost gena za 16S rRNK bakterija iz roda *Anaplasma* i *Ehrlichia* i SSAP2f/SSAP2r za determinaciju vrste *A. phagocytophilum* iz slezene mišolikih glodavaca.

## **Popis grafikona**

**Grafikon 1.** Zastupljenost pretraženih mišolikih glodavaca s obzirom na spol.

**Grafikon 2.** Zastupljenost vrsta mišolikih glodavaca unutar sveukupnog broja pretraživanih uzoraka.

**Grafikon 3.** Postotak pozitivnih životinja u odnosu na ulovljene životinje po pojedinim lokalitetima.

**Grafikon 4.** Zastupljenost pojedinih vrsta mišolikih glodavaca u ukupnom broju pozitivnih uzoraka.

**Grafikon 5.** Prikaz pozitivnih životinja od ukupnog broja izlovljenih životinja iste vrste.

## 1. UVOD

Anaplazmoza je zarazna bolest koju uzrokuju bakterije iz roda *Anaplasma*. Od bolesti obolijeva veliki broj domaćih i divljih životinja uključujući i ljude (STUEN, 2007.). *A. phagocytophilum* uzrokuje anaplazmozu konja, krpeljnu groznicu preživača, granulocitnu anaplazmozu pasa i mačaka te humanu granulocitnu anaplazmozu, ali unatoč tome pojedini epidemiološki faktori za ovu bakteriju i dalje su nepoznati (CHASTAGNER i sur., 2016.). Smatra se da u Europi, bakterija *A. phagocytophilum* predstavlja jednu od najvažnijih krpeljno prenosivih bakterija koje uzrokuju ekonomske gubitke u proizvodnji domaćih životinja (STUEN, 2007.). Istraživanje prisutnosti ove bakterije u populacijama sisavaca jedini je način za otkrivanje puteva njenog širenja (CHASTANGER i sur., 2016.).

Većina istraživanja u Europi usmjerena su na utvrđivanje prisutnosti bakterije u krpelja *I. ricinus* koji se smatra glavnim vektorom ove bolesti. Srna i divlji glodavci prirodni su rezervoari *A. phagocytophilum*, a glodavci su i domaćini svih razvojnih stadija krpelja čime njihova uloga u životnom ciklusu ove bakterije postaje od izrazitog značaja (STUEN, 2007.). Međutim uloga divljih glodavaca u epizootiologiji *A. phagocytophilum* još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Njena prevalencija u populaciji mišolikih glodavaca ovisi o lokaciji te samoj vrsti i različita je diljem Europe (STUEN, 2013.). Dosadašnja istraživanja ukazala su da prevalencija bakterije *A. phagocytophilum* u mišolikih glodavaca može iznositi i do 19% ovisno o vrsti glodavca i zemljopisnom području gdje se nalaze (STUEN, 2013.). Zbog velike populacije glodavaca, te biološke raznolikosti šuma, Hrvatska se smatra žarištem krpeljno prenosivih zaraznih bolesti.

Ovo istraživanje je usmjereno upravo na populaciju mišolikih glodavaca s ciljem utvrđivanja prisutnosti bakterije *A. phagocytophilum* na prostoru Republike Hrvatske.

## **2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA**

### **2.1. Povijest**

Prvi slučajevi krpeljne groznice u ovaca, koza i teladi u Europi opisivani su od 1780. godine. Bolest se pojavljivala kod farmskih životinja, uglavnom malih preživača, te pasa sa sporadičnim fatalnim ishodom, a sam uzročnik ostao je nepoznat dugi niz godina. Po prvi puta krpeljna groznica preživača opisana je kao samostalna bolest 1932. godine u Škotskoj, a sam uzročnik, prototip bakterije *A. phagocytophilum* opisan je 1940. godine (JENKINS i sur., 2001.). Nakon toga uslijedili su opisi slučajeva bolesti uzrokovanih istim uzročnikom u Velikoj Britaniji, Irskoj, Skandinavskim zemljama i ostalim dijelovima Europe. Slična bolest je također opisana u konja 1969. godine u Sjedinjenim američkim državama (SAD). Do 1994. godine smatralo se da je navedeni uzročnik vezan uz pojavu bolesti isključivo u domaćih životinja i slobodnoživućih rezervoara kada je utvrđeno da se bolest javlja i kod ljudi koja je opisana pod nazivom humana granulocitna anaplazmoza (HGA) u SAD-u (WOLDEHIWET, 2010). Dvije godine kasnije, 1996. godine HGA je dijagnosticirana u Sloveniji (PETROVEC i sur., 1997.), te nešto kasnije u Poljskoj i ostalim dijelovima Europe (TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA i sur., 2001.).

### **2.2. Zemljopisna proširenost**

Bakteriju *A. phagocytophilum* nalazimo na azijskom, sjevernoameričkom te europskom kontinentu. Proširenost bakterije, te pojava bolesti kod domaćih životinja i ljudi, povezana je s rasprostranjenošću krpelja koji je prenose, te boravkom na područjima na kojima se nalaze zaraženi krpelji.

### **2.3. Etiologija**

Bakterija *A. phagocytophilum* spada u razred *Alphaproteobacteria*, red *Rickettsiales* i porodicu *Anaplasmataceae* (DUMLER i sur., 2001.). Prema trenutnoj klasifikaciji porodica *Anaplasmataceae* obuhvaća sedam različitih rodova: *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*,

Aegyptianella, Wolbachia, Neoehrlichia, te Xenohaliotis. Najveća promjena dogodila se prije osamnaest godina kada su DUMLER i suradnici (2001.) detaljnom filogenijskom analizom 16S ribosomske RNK (16S rRNK) i groESL gena bakterije *A. phagocytophilum* utvrdili genetičku raznolikost roda *Anaplasma* koja je ukazala na potrebnu reorganizaciju u redu Rickettsiales. Tada je uvedena porodica *Anaplasmataceae* koja je obuhvaćala sve bakterije iz dotadašnje porodice *Ehrlichiae* i roda *Anaplasma* koji je sadržavao samo tri vrste, vrstu *A. marginale*, *A. centrale* i *A. ovis* (BATTILANI i sur., 2017.). Zbog kompleksnosti postojeće taksonomije, prilikom reorganizacija unutar porodice *Anaplasmataceae*, osim detaljnih podataka o samom genomu uzročnika, u obzir se uzimaju podatci o biološkim i antigenskim karakteristikama pojedine vrste odnosno roda. Primjerice, za razliku od roda *Neorickettsia* i *Wolbachia* za koje je poznat njihov vertikalni prijenos u krpelja, rodovi *Ehrlichia* i *Anaplasma* se ne prenose s odraslih krpelja na ličinke (DUMLER i sur., 2001.). Svi rodovi osim rodova *Wolbachia* i *Xenohaliotis* inficiraju kralježnjake. *A. phagocytophilum* je jedna od sedam vrsta unutar roda *Anaplasma* koje imaju različite afinitete prema stanicama domaćina (RAR i GOLOVLJOVA, 2011.). Tako vrste *A. odocoilei* i *A. platys* inficiraju trombocite, *A. bovis* monocite, dok *A. centrale*, *A. marginale* i *A. ovis* primarno inficiraju eritrocite (DEEPAK i sur., 2017). Za bakteriju *A. phagocytophilum* je poznato da inficira granulocite, te u manjoj mjeri endotelne stanice (RAR i GOLOVLJOVA, 2011.).

*A. phagocytophilum* je pleomorfna, gram negativna bakterija veličine od 0.5 do 1.5  $\mu\text{m}$  s dvostrukom staničnom membranom (POPOV, 1998.). Vanjska membrana je često naborana i nema kapsulu što joj olakšava opstanak u stanicama domaćina (RIKIHISA, 1997.). Obligatni je unutarstanični parazit, te se kod kralježnjaka umnaža u citoplazmatskim vakuolama neutrofila, makrofaga, monocita i eritrocita (RAR i GOLOVLJOVA, 2011.). S obzirom da je njena stjenka tanka te ne sadrži peptidoglikane i lipopolisaharide ova bakterija može boraviti i umnažati se unutar vakuola citoplazme stanica retikuloendotelnog sustava, a da pri tome ne ošteti vlastite stanične strukture (LIN, 2003.). Unutarcitoplazmatske inkluzije ove bakterije mikroskopski su vidljive kao organizirana elementarna tjelešca koja se zbog svog izgleda nalik dudu nazivaju morulama (lat. *morus*) (PRUNEAU i sur., 2014.). Bakterija se uspješno uzgaja na staničnim kulturama krpelja i humanim leukemijskim linijama stanica (HL-60), što omogućuje široki raspon studija, od analize različitih varijanti sojeva, do ispitivanja osjetljivosti ove bakterije na antibiotike (WOLDEHIWET, 2010.). U *in vitro* uvjetima bakterija je najosjetljivija na antibiotike doksiciklin

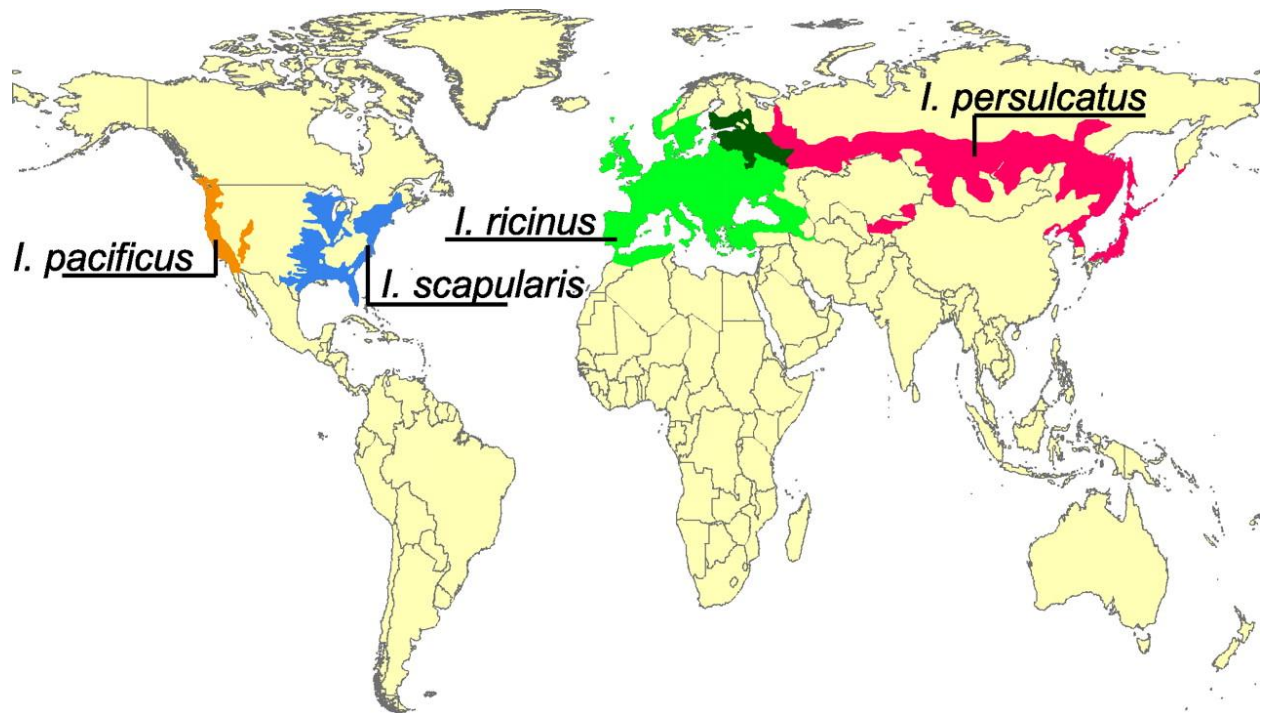
i rifampin, dok su se tetraciklini pokazali kao najučinkovitiji za liječenje prirodnih infekcija (STUEN, 2003.).

## 2.4. Epizootiologija

Izvori i rezervoari infekcije za skupinu bolesti koje uzrokuje bakterija *A. phagocytophilum* su krpelji (REPPERT i sur., 2013.). Različita istraživanja utvrdila su izrazitu genetičku raznolikost ove bakterijske vrste, različit tropizam te varijacije u patogenosti sojeva koji mogu dovesti do razvoja različitih kliničkih oblika bolesti, od blagih do vrlo teških (BARAKOVA, 2014.). Primjerice, soj „*Ap-Variant 1*“ dovodi do pojave bolesti u koza i jelena, ali ne i miševa, dok kalifornijski soj uzrokuje infekcije u konja, ali ne u preživača (RIKIHISA, 2011.). U prirodi, bakterija se održava u životnom ciklusu između krpelja koji sišu krv i divljih kralježnjaka koji su primarni rezervoari (KAWAHARA i sur., 2006.). Infekcija kralježnjaka je od velike važnosti u životnom ciklusu ove bakterije, jer je vertikalni prijenos u krpelja rijedak, i utvrđen jedino kod vrste *Dermacentor albipictus* (ATIF, 2015). Prosječna infektivna doza, nakon koje su nađene morule u neutrofilima miševa iznosila je između  $10^4$  i  $10^5$  stanica *A. phagocytophilum* (HODZIC i sur. 1998.). Prirodno inficirani krpelji prenose bakteriju hranjenjem na divljim sisavcima. Prema dosadašnjim istraživanjima utvrđena je prisutnost ove bakterije u populaciji žutogrlog miša (*Apodemus flavicollis*), običnog šumskog miša (*Apodemus sylvaticus*), te šumske voluharice (*Myodes glareolus*) s prosječnom prevalencijom od 22,8% unutar navedenih vrsta (CHASTAGNER, 2016.). Osim toga., utvrđeno je da su vjeverice vrste *Tamias ochrogenys* rezervoari za bakteriju *A. phagocytophilum*. Smatra se da u prilog širenju ove bolesti ide način života ovih životinja. Naime, ova vrsta vjeverica puno vremena provodi na zemlji, čime olakšavaju pristup krpeljima, a za vrijeme zimskih mjeseci životinje ne hiberniraju, već su aktivne tijekom cijele godine (FOLEY i NIETO, 2011.).

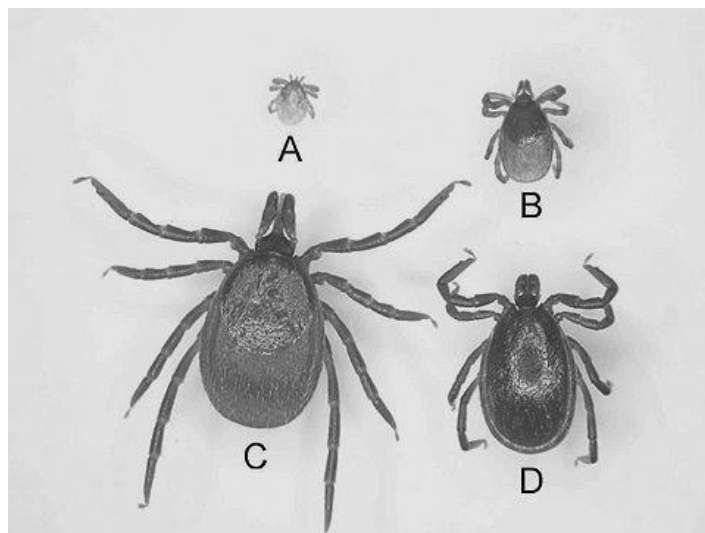
Bolest se širi ugrizom krpelja, a u eksperimentalnim uvjetima utvrđeno je da bi se bakterija prenijela u organizam domaćina, on mora biti pričvršćen na životinji u prosjeku između 24 i 48 sati (HODZIC i sur. 1998., DES VIGNES i sur., 2001.). Kretanjem prijemljivih životinjskih vrsta iz područja u kojima se bolest ne pojavljuje, u endemska područja, glavni je uzrok pojave bolesti (ATIF, 2015.). Rekreativne i druge aktivnosti u prirodi koje povećavaju rizik od ugriza krpelja, kao i transfuzija krvi, neki su od najvažnijih rizičnih čimbenika širenja bolesti u ljudi (ATIF, 2015.).

*A. phagocytophilum* dokazana je u različitim vrsta krpelja iz roda *Ixodes*, *Rhipicephalus* te *Dermacentor* (STUEN i sur., 2013.). Na zapadnoj obali SAD-a glavnim vektorom ove bakterije smatra se *I. pacificus*, na istočnoj obali *I. scapularis*, dok se u Aziji glavnim vektorom smatra *I. persulcatus*. U Europi ova se bakterija povezuje s endemskim područjima krpelja *I. ricinus* (STUEN i sur., 2013.) (Slika 1).



**Slika 1.** Proširenost krpelja iz roda *Ixodes* na sjevernoj polutki  
( Izvor: STEPHEN i sur., 2006.).

Republika Hrvatska prema zemljopisnom položaju spada u zemlje središnje Europe, te je glavni vektor bakterije *A. phagocytophilum* upravo navedena vrsta krpelja *I. ricinus* (KIEWRA i sur., 2014.) (Slika 2). Osim krpelja mehaničkim prijenosnicima bakterije smatraju se i ptice, komarci i muhe (STUEN i sur., 2013.).



**Slika 2.** Razvojni stadiji krpelja *Ixodes ricinus*: A. larva, B. nimfa, C. odrasla ženka, D. odrasli mužjak (Izvor: SUIDA i NOWAK, 2006.).

Bakterija se prenosi krvlju zaražene životinje, najčešće ulazi kroz kožu ugrizom vektora, ali najnovijim istraživanjima opisan je također i transplacentarni prijenos s perzistentno inficiranih odraslih jedinki na mladunčad (STUEN, 2018.).

Poznato je da od anaplazmoze obolijevaju domaći preživaci, psi, mačke, ljudi (FOGGIE, 1951.) te konji (GRIBBLE, 1969.). Sve dobne skupine su prijemljive za infekciju, a ustanovljeno je da su starije životinje prijemljivije za razvoj bolesti (ATIF, 2015.).

## **2.5. Patogeneza**

Nakon ulaska u probavni sustav krpelja koji se hrani krvlju inficirane životinje, bakterija krvotokom putuje do njegove slinske žlijezde i stanica srednjeg crijeva (SEVERO, 2012.). Za prijenos bakterije *A. phagocytophilum* na životinju, krpelj mora biti pričvršćen u prosjeku od 24 do 48 sati (SYKES i FOLEY, 2013.). Tijekom hranjenja krpelja, bakterija dospijeva u krvotok životinje domaćina i primarno inficira njegove cirkulirajuće leukocite, ali i endotelne stanice. Ulazak same bakterije u unutrašnjost stanice domaćina posredovan je membranskim proteinskim receptorima stanice i ovisan je o aktivnosti enzima transglutaminaze. Unutarstanične vakuole u kojima se nalazi bakterija tvore morule koje nisu u potpunosti odvojene od stanice domaćina u



kojoj se nalaze, već postoji komunikacija koja im omogućava opskrbu potrebnim hranjivim tvarima, ali i onemogućava njihovo prepoznavanje od strane imunskog sustava domaćina (SEVERO, 2012.). Istraživanja su pokazala da su mijeloidne krvne stanice znatno češće inficirane u odnosu na nezrele stanice koštane srži, što ukazuje da nezrele stanice koštane srži imaju drugačije receptore na površini svojih staničnih membrana i time su otpornije na vezanje anaplazmi, te posljedično na samu infekciju ovom bakterijom. Oko šestog dana nakon infekcije dolazi do supresije imunskog odgovora uz klinički nalaz limfocitopenije, neutropenije i trombocitopenije u prosječnom trajanju od dva do tri tjedna (CVETNIĆ, 2013.). Zanimljivo je da kod ljudi *A. phagocytophilum* ima sposobnost odgađanja apoptoze stanica domaćina aktivacijom niza protu-apoptoznih mehanizama što je ključno za preživljavanje u stanici kratkog životnog vijeka (STUEN i sur., 2013.).

## **2.6. Klinička slika**

### **2.6.1. Domaće životinje**

*A. phagocytophilum* uzrokuje anaplazmozu konja, krpeljnu groznicu preživača, granulocitnu anaplazmozu pasa i mačaka (DE LA FUENTE i sur., 2005., JIN i sur., 2012.). Ovisno o inficiranoj vrsti životinje dovodi do razvoja različitih kliničkih slika bolesti koje ponekad mogu završiti letalno (JIN i sur., 2012.). Letalni ishodi bolesti do sada su opisani u ovaca, konja i pasa (JENKINS i sur. 2001., STUEN, 2003.). Inkubacijski period iznosi od 7 do 14 dana, dok su kod ovaca zabilježeni slučajevi kliničke manifestacije već tri dana nakon infekcije (MACLEOD i GORDON, 1933., CVETNIĆ, 2013.).

Krpeljna groznica preživača bolest je uzrokovana bakterijom *A. phagocytophilum* od koje oboljevaju svi domaći preživači. Simptomi bolesti kod goveda su uglavnom nespecifični, dok je kod ovaca opisan porast tjelesne temperature, smanjen apetit i anoreksija (OGDEN i sur., 1998.). Klinički simptomi uvelike ovise o razvoju sekundarnih bakterijskih infekcija, tako da se često opisuju slučajevi pada mliječnosti, pobačaja i neplodnost (DANIEL i sur., 2015.). Osim toga kod tovnih goveda i janjadi zabilježen je smanjeni dnevni prirast nakon infekcije (TAYLOR i KENNY, 1980., GRØVA i sur., 2011.).

Anaplazmoza konja bolest je s različitim kliničkim simptomima poput povišene tjelesne temperature, anoreksije, depresije, apatije, edema na distalnim dijelovima tijela, nevoljkosti, smanjene aktivnosti, te petehijalnih krvarenja po velikim krvnim žilama i bubrezima (FRANZEN i sur., 2005.).

Klinički simptomi graulocitne anaplazmoze pasa su visoka temperatura, depresija i anoreksija (EGENVALL i sur., 1997.). Kod mačaka su najdominantnije kliničke manifestacije anoreksija, letargija, konjuktivitis, mialgija i nekoordiniranost (COHN, 2003.).

### **2.6.2. Ljudi**

Simptomi humane granuocitne anaplazmoze su uglavnom nespecifični i očituju se povišenom tjelesnom temperaturom, smanjenim apetitom, bolovima u mišićima, te bolovima u zglobovima (JIN i sur., 2012.). Također, trombocitopenija, leukopenija, anemija te povišena razina alanin aminotransferaze u serumu neki su od simptoma bolesti (BAKER i DUMLER, 2008.). U većini slučajeva pacijenti se oporave spontano bez antibiotske terapije unutar 2 do 3 tjedna. Zabilježeni su također slučajevi s letalnim ishodima (JIN i sur., 2012.). Prema izvještajima iz SAD-a od oboljelih ljudi je hospitalizirano njih 36% od kojih je 7% trebalo intenzivnu njegu, dok je letalni ishod utvrđen u 1% pacijenata (DUMLER, 2012.).

### **2.7. Patoanatomski i patohistološki nalaz**

Uzimajući u obzir da klinički slučajevi kronične anaplazmoze kod pasa do sada nisu opisani, a simptomi su vezani isključivo za fazu bakterijemije patoanatomske i patohistološke promjene uzrokovane *A. phagocytophilum* kod pasa i mačaka nisu zabilježene (GREIG i ARMSTRONG, 2006., GREEN, 2012.).

Kod goveda uginulih od krpeljne groznice preživača pronađena su krvarenja po sluznicama probavnog sustava, povećana slezena tamnocrvene boje, te kongestija bubrega, dok su kod konja tijekom razudbe pronađeni uz petehijalna krvarenja po sluznicama, vaskulitis krvnih žila mišićja te edem stražnjih ekstremiteta (CVETNIĆ, 2008.).

Patološke promjene kod ljudi uključuju perivaskularne limfohistiocitne upalne infiltrate u parenhimskim organima, hepatitis s rijetkim apoptozama, normocelularnu koštanu srž, blagi

limfoidni gubitak, mononuklearnu hiperplaziju fagocita u slezeni i limfnim čvorovima, te rijetko nekrozu slezene (WALKER, 1996.).

## 2.8. Dijagnostika

Klinički oblik bolesti može se dijagnosticirati pronalaskom citoplazmatskih uklopina u monocitima, granulocitima i neutrofilima u krvnom razmasku obojenom po May Grünwald Giemsi (FOGGIE, 1951., ATIF, 2015.). Znatno rjeđe koristi se elektronski mikroskop kojim je moguće identificirati uzročnika u citoplazmatskim vakuolama unutar stanice domaćina (RIKIHISA, 1991.). Nadalje, imunohistokemijskim metodama u uzorcima tkiva također možemo potvrditi dijagnozu. Metode se temelje na lokalizaciji specifičnih antigena u tkivu, pomoću ciljno usmjerenih protutijela, koristeći osnovni princip u imunologiji da određeno protutijelo veže i prepoznaje samo ciljni antigen koji je u ovom slučaju bakterija *A. phagocytophilum* (LEPIDI i sur., 2000.).

Postoje različite molekularne metode koje se koriste za utvrđivanje prisutnosti bakterije *A. phagocytophilum* u krvi ili uzorcima tkiva, a kao jednostavna i pouzdana izdvaja se ugniježđena PCR reakcija (CHEN i sur., 1994.). PCR tehnike temelje se najčešće na utvrđivanju prisutnosti dijelova gena, npr. za 16S rRNK, *groEL*, *ankA*, *groESL*, *msp2*, *msp4* ili *p44* gena (COURTNEY i sur., 2004.). Geni ribosomske RNK su izrazito očuvani u bakterijskih vrsta, te se smatraju korisnim alatom u molekularnoj dijagnostici, jednako kao i u filogenetskim istraživanjima. Umnažanjem dijelova gena za 16S rRNK dokazuje se prisutnost bakterijske DNK kod životinja vektora ili rezervoara u medicinskoj i veterinarskoj dijagnostici. Metode se razlikuju prema početnicama koje se koriste, odnosno dijelovima gena koje one umnažaju (CHEN i sur., 1994.). Veličina cijelog genoma bakterije *A. phagocytophilum* procijenjena je na 1 471 282 bp, a sastav baza pohranjen je u bazi podataka NCBI GenBank 2006. godine. Utvrđeni broj gena je 1 411, od kojih 1 264 kodira proteine, 42 kodira RNK, a 27 su pseudogeni. Sekvenciranje cijelog genoma bakterije *A. phagocytophilum* uvelike olakšava istraživanje raznolikosti ovog mikroorganizma (RYMASZEWSKA, 2011.).

SNAP<sup>®</sup>4Dx<sup>®</sup> ELISA test komercijalno je dostupan za brzu kliničku dijagnostiku protutijela u serumu pasa. ali se uspješno koristi i za serume konja i ovaca (GRANQUIST i sur., 2010.). Međutim, tijekom korištenja ovih testova ustanovljeni su problemi s njihovom osjetljivošću i

unakrižnim reakcijama koje se javljaju s drugim vrstama iz roda *Anaplasma*. Zbog navedenoga ukoliko se koriste serološke metode dijagnostike svakako se preporučuje njihova kombinacija s nekom molekularnom metodom. (ATIF, 2015.).

Bakterija *A. phagocytophilum* se uspješno uzgaja na staničnim kulturama krpelja te na staničnim kulturama humane leukemijske linije (HL-60), ali zbog kompleksnosti postupka ta metoda se ne primjenjuje u rutinskoj kliničkoj dijagnostici već se koristi isključivo u istraživačke svrhe (WOLDEHIWET, 2010.).

## **2.9. Diferencijalna dijagnostika**

Znakovi i simptomi bolesti obično počinju pet do 14 dana nakon ugriza zaraženog krpelja. Budući da ugrizi krpelja nisu bolni, te se nakon hranjenja krpelj otpusti, prilikom uzimanja anamnestičkih podataka mnogi ljudi se neće sjećati ugriza, a na životinjama ga nećemo pronaći. Sumnju na anaplazmozu se postavlja ako se radi o nespecifičnoj febrilnoj bolesti nepoznatog podrijetla, osobito tijekom proljetnih i ljetnih mjeseci kada su krpelji najaktivniji. Na anaplazmozu pasa, mačaka, preživača ili konja bi trebali posumnjati ako je životinju ugrizao krpelj, ili ako je boravila na prostorima gdje postoji veliki rizik od ugriza krpelja, a ima izražene nespecifične kliničke simptome anoreksije, depresije te apatije, bez značajnih promjena biokemijskih parametara krvi uz moguće blage promjene u krvnoj slici (LESTER, 2005.). Diferencijalno dijagnostički se moraju isključiti ostale krpeljno prenosive bolesti kao što su borelijoza, babezijoza, tularemija te erlihioza (CVETNIĆ, 2013.), a kod ljudi dodatno humana monocitotropna erlihioza i Rocky Mountain groznica (KIM, 2018.).

## **2.10. Liječenje**

Tetraciklini su lijek izbora u liječenju i eliminaciji anaplazmi kod ljudi i životinja (ATIF, 2015.). Terapija je najučinkovitija kada se započne na početku razvoja bolesti. U ljudi koji se liječe doksiciklinima kroz 7 do 10 dana, infekcija se u potpunosti povlači bez recidiva (BAKKEN i DUMLER, 2006.). Moguća alternativa za pacijente s alergijom na doksiciklin je rifampicin koji se može primjenjivati i tijekom graviditeta. Ostali antibiotici, kao što su kinoloni, cefalosporini, penicilini i makrolidi pokazali su se nedjelotvornim (DUMLER, 2015.).

## 2.11. Profilaksa

Profilaksa se temelji uglavnom na sprječavanju ugriza krpelja. Ljudi i životinje, posebno su ugroženi na prostorima za koje se zna da su endemska područja zaraženih krpelja. U Europi su trenutno registrirani razni ektoparazitici koji djeluju protiv krpelja i mogu se aplicirati psima. Svaki proizvod je specifičan prema načinu upotrebe i prilagođen životinjama, pa tako razlikujemo tablete, ogrlice ili pripravke koji se lokalno apliciraju na kožu životinja. Neki spojevi, poput piretroida, su registrirani kao repelenti (PEREIRA, 2009.). Za preživače je opisana metoda zaštite od krpelja u vidu kupki u kojima su otopljeni insekticidi kojima se ispire koža goveda neposredno prije puštanja na ispašu u proljetnim mjesecima (CVETNIĆ, 2013.).

Biološka kontrola vektora alternativna je metoda kontrole pojave bolesti te se temelji na suzbijanju krpelja uz pomoć njihovih prirodnih neprijatelja. Studije su dosad pronašle svega nekoliko bioloških vektora poput bakterija, entomopatogenih gljivica i nematoda kao prirodnih neprijatelja krpelja. Održiva biološka ravnoteža najteži je izazov ove metode (SAMISH i sur., 2004.).

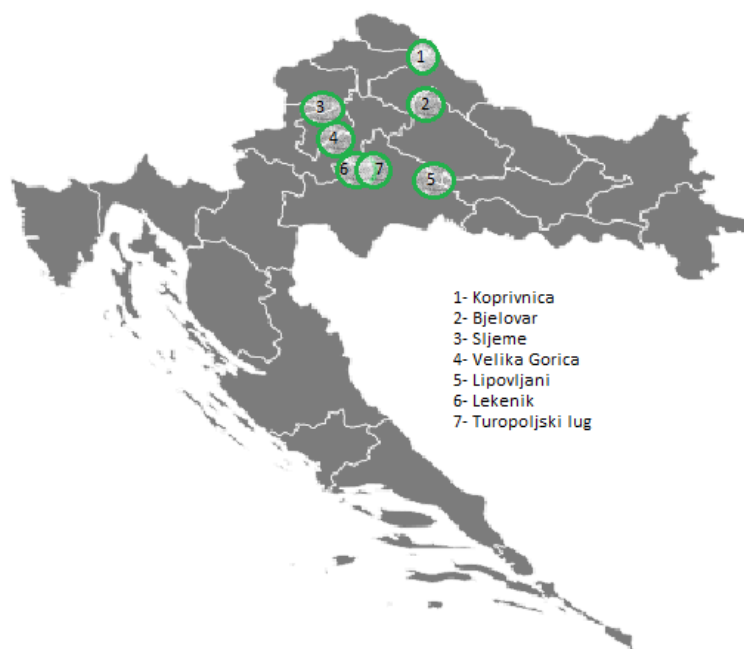
Vakcina za bakteriju *A. phagocytophilum* još uvijek nije dostupna zbog nemogućnosti pronalaska zajedničkog antigena svim varijantama *A. phagocytophilum* (HERRON i sur. 2000., GE i RIKIHISA, 2006.).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Obrada uzoraka

U ovom istraživanju pretraženo je 186 arhiviranih genomskih DNK izdvojenih iz slezena mišolikih glodavaca izlovljenih na različitim lokacijama u Republici Hrvatskoj, a pohranjenih na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mišoliki glodavci izlovljeni su u vremenskom periodu od 12. srpnja 2017. godine do 29. svibnja 2018. godine na sedam različitih lokacija kontinentalnog dijela Republike Hrvatske koje su uključivale četiri županije: Bjelovarsko-bilogorsku, Koprivničko-križevačku, Zagrebačku, te Sisačko-moslavačku (Slika 3).



**Slika 3.** Mjesta izlova mišolikih glodavaca.

Navedena područja smatraju se endemskim za krpelje *I. ricinus*, te posljedično tome bolesti koje on prenosi, a neke od njih su lajmska boreliozna i krpeljni meningoencefalitis. Zbog zajedničkog vektora, velika je vjerojatnost prisutnosti bakterije *A. phagocytophilum* na tom području, a time i opasnosti od pojave anaplazmoze (ĐAKOVIĆ RODE, 2015.). Endemska područja imaju tipičan

geografski položaj koji osigurava optimalne klimatske uvjete za razvoj, aktivnost i preživljavanje populacije krpelja vrste *I. ricinus*, a time i uzročnika bolesti koje on prenosi (KRAJINOVIĆ i KRAJINOVIĆ, 2018.). Detaljan prikaz uzorkovanja prikazan je u Tablici 1.

**Tablica 1.** Broj uzorkovanih životinja, te datum uzorkovanja prema lokalitetu.

| Županija                        | Lokalitet       | Datum izlova | Broj jedinki (n) |
|---------------------------------|-----------------|--------------|------------------|
| Zagrebačka županija             | Sljeme          | 12.07.2017.  | 45               |
|                                 |                 | 07.05.2018.  | 5                |
|                                 |                 | 15.05.2018.  | 7                |
|                                 | Velika Gorica   | 27.10.2017.  | 7                |
|                                 |                 | 08.02.2018.  | 13               |
|                                 | Turopoljski lug | 27.10.2017.  | 11               |
| Bjelovarsko-bilogorska županija | Bjelovar        | 29.05.2018.  | 5                |
| Koprivničko-križevačka županija | Koprivnica      | 12.10.2017.  | 37               |
|                                 |                 | 11.04.2018.  | 7                |
| Sisačko-moslavačka županija     | Lipovljani      | 26.10.2017.  | 22               |
|                                 | Lekenik         | 19.10.2017.  | 27               |

Od sveukupno 186 izlovljenih mišolikih glodavaca, utvrđena je najveća zastupljenost žutogrlog miša (*A. flavicollis*) njih 66/186, zatim običnog šumskog miša (*A. sylvaticus*) 42/186, poljskog miša (*A. agrarius*) 38/186, šumske voluharice (*M. glareolus*) 32/186, livadne voluharice (*M. agrestis*) 3/186, poljske voluharice (*M. arvalis*) 3/186 te 2/186 šumske rovke (*S. araneus*) (Tablica 2).

**Tablica 2.** Prikaz broja i vrsta izlovljenih jedinki mišolikih glodavaca.

| Vrsta životinje | Hrvatski naziv     | Latinski naziv              | Broj ulovljenih životinja (n) |
|-----------------|--------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Miš             | Žutogrli miš       | <i>Apodemus flavicollis</i> | 66                            |
|                 | Obični šumski miš  | <i>Apodemus sylvaticus</i>  | 42                            |
|                 | Poljski miš        | <i>Apodemus agrarius</i>    | 38                            |
| Voluharica      | Šumska voluharica  | <i>Myodes glareolus</i>     | 32                            |
|                 | Livadna voluharica | <i>Microtus agrestis</i>    | 3                             |
|                 | Poljska voluharica | <i>Microtus arvalis</i>     | 3                             |
| Rovka           | Šumska rovka       | <i>Sorex araneus</i>        | 2                             |

### 3.2. Utvrđivanje prisutnosti bakterije *A. phagocytophilum* korištenjem metode ugniježdene PCR reakcije

Za PCR reakciju korišteni su arhivirani uzorci DNK koja je bila izdvojena iz slezene glodavaca i pohranjena na temperaturi od  $-80^{\circ}\text{C}$ . Za sve uzorke provedene su dvije zasebne PCR reakcije u tzv. ugniježdenoj PCR reakciji. U prvoj, vanjskoj PCR reakciji umnožio se dio gena koji kodira za 16S rRNK bakterije iz roda *Ehrlichia* i *Anaplasma*, veličine 1 462 bp. Nakon toga, dobiveni PCR proizvod koristio se kao kalup za drugu, unutarnju PCR reakciju, za koju su odabrane početnice komplementarne slijedu baza unutar prve PCR reakcije, a umnažao se dio gena za 16S rRNK specifičan za bakteriju *A. phagocytophilum* (KAWAHARA i sur., 2006., YANG i sur., 2016.).

#### 3.2.1. Vanjska lančana reakcije polimerazom

Za potrebe ovog istraživanja za vanjsku PCR reakciju su odabrani specifični odsječci DNK koji kodiraju za 16S rRNK bakterija iz roda *Ehrlichia* i *Anaplasma*. Sljedovi baza početnica EC9/EC12a (KAWAHARA i sur., 2006., YANG i sur., 2016.) navedeni su u Tablici 3.



**Tablica 3.** Oligonukleotidni sastav početnica korištenih za vanjsku PCR reakciju.

| Specifičnost   | Naziv početnice | Slijed baza početnice        | Veličina PCR proizvoda |
|--|-----------------|------------------------------|------------------------|
| 16S rRNK bakterije iz roda <i>Ehrlichia</i> i <i>Anaplasma</i> | EC9             | 5'-TACCTTGTTACGACTT-3'       | 1 462 bp               |
|  | EC12a           | 5'-TGATCCTGGCTCAGAACGAACG-3' |                        |

Za izvođenje svih PCR reakcija korišten je komercijalni komplet TaKaRa Taq Hot Start Version (Takara Bio Inc., Japan). PCR smjesa za ovu reakciju sastojala se od sastavnica navedenim u Tablici 4.

**Tablica 4.** Prikaz sastavnica PCR smjese za provođenje vanjske PCR reakcije.

|                                    | Za 1 uzorak (µl) |
|------------------------------------|------------------|
| 10x PCR pufer ( Mg <sup>2+</sup> ) | 1,25             |
| dNTP smjesa                        | 1                |
| Početnica AEF (10 µl)              | 0,32             |
| Početnica AER (10 µl)              | 0,32             |
| H <sub>2</sub> O                   | 8,24             |
| Enzim TaKaRa Taq HS                | 0,125            |
| DNK/uzorak                         | 1,25             |

Ukupan volumen PCR mješavine za vanjsku lančanu reakciju polimerazom iznosio je 12,5 µl, a PCR reakcija se odvijala prema navedenom programu izmjene temperatura i vremenskog trajanja svakog pojedinog koraka (Tablica 5).

**Tablica 5.** Prikaz uvjeta provođenja vanjske PCR reakcije po temperaturama i vremenskom trajanju pojedinih koraka reakcije.

| Temperatura (°C) | Vrijeme (min) | Broj ponavljanja |
|------------------|---------------|------------------|
| 95               | 2             | -                |
| 95               | 0,5           | 35 x             |
| 53               | 0,5           |                  |
| 72               | 1,5           |                  |
| 72               | 10            | -                |
| 4                | ∞             | -                |

### 3.2.2. Unutarnja lančana reakcije polimerazom

Nakon vanjske lančane reakcije polimerazom PCR pozitivni uzorci ponovno su umnoženi u tzv. unutarnjoj lančanoj reakciji polimerazom. Početnice korištene u ovoj reakciji SSAP2f/ SSAP2r specifične su za bakterijsku vrstu *A. phagocytophilum* (KAWAHARA i sur., 2006., YANG i sur., 2016.), a njihov sastav baza naveden je u Tablici 6.

**Tablica 6.** Oligonukleotidni sastav početnica korištenih za unutarnju PCR reakciju.

| Specifičnost                          | Naziv početnice | Slijed baza početnice        | Veličina PCR proizvoda |
|---------------------------------------|-----------------|------------------------------|------------------------|
| 16S rRNK<br><i>A. phagocytophilum</i> | SSAP2f          | 5'-GCTGAATGTGGGGATAATTTAT-3' | 641 bp                 |
|                                       | SSAP2r          | 5'-ATGGCTGCTTCCTTTCGGTTA-3'  |                        |

Ukupan volumen uzorka u unutarnjoj lančanoj reakciji polimerazom iznosio je također 12,5 µl, a njegov sastav nalazi se u Tablici 7.

**Tablica 7.** Prikaz sastavnica PCR smjese za provođenje unutarnje PCR reakcije.

|                                    | Za 1 uzorak (µl) |
|------------------------------------|------------------|
| 10x PCR pufer ( Mg <sup>2+</sup> ) | 1,25             |
| dNTP smjesa                        | 1                |
| Početnica AF (10 µl)               | 0,32             |
| Početnica AR (10 µl)               | 0,32             |
| H2O                                | 8,49             |
| Enzim TaKaRa Taq HS                | 0,125            |
| PCR proizvod vanjske PCR reakcije  | 1                |

PCR reakcija se odvijala prema navedenom programu izmjene temperatura i vremenskog trajanja svakog pojedinog koraka u Tablici 8.

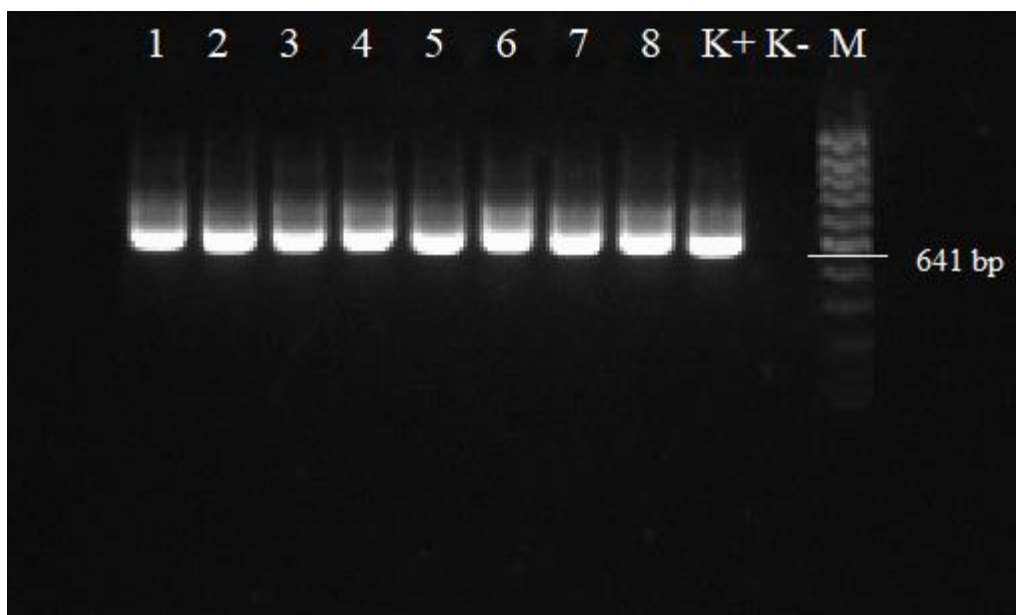
**Tablica 8.** Prikaz uvjeta provođenja unutarnje PCR reakcije po temperaturama i vremenskom trajanju pojedinih koraka reakcije.

| Temperatura (°C) | Vrijeme (min) | Broj ponavljanja |
|------------------|---------------|------------------|
| 95               | 2             | -                |
| 95               | 0,5           | 35 x             |
| 56               | 0,5           |                  |
| 72               | 1             |                  |
| 72               | 7             | -                |
| 4                | ∞             | -                |

U svakoj PCR reakciji, vanjskoj i unutarnjoj, korištene su pozitivna i negativna kontrola reakcije. Za uzorak pozitivne kontrole korištena je DNK izdvojena iz krpelja *I. scapularis* ustupljena u istraživačke svrhe ljubaznošću doc. dr. sc. Laure Goodman, Population Medicine and Diagnostic Sciences, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta Cornell, SAD, a za negativnu kontrolu PCR reakcije korištena je DNaza/RNaza pročišćena voda.

### 3.3. Agarozna elektroforeza

Za pripremu gela, zagrijavanjem se otopilo 0,5 g agaroznog praha u 50 ml TAE (Tris Acetatni EDTA) pufera čime je dobiven 1% agarozni gel. U još tekuću agarozu dodalo se 3 µL boje za DNK (Diamond, Nucleic Acid Dye, Promega, USA). Gel se izlio u kalup i u njega se umetnuo češalj u svrhu formiranja jažica, nakon čega se gel hladio oko 45 minuta. Izvlačenjem češlja, u gelu su ostale utisnute jažice u koje su pipetirani uzorci odnosno PCR proizvodi. Nakon toga gel se stavio u kadicu za elektroforezu napunjenu TAE puferom. U svaku jažicu pipetiralo se po 5 µl uzorka prethodno pomiješanih s 1 µl bromfenol-plave boje (DNA Loading Buffer, 6x, Lonza, USA) Uloga te boje je spuštanje PCR uzorka na dno jažice i njegova vidljivost u gelu. Osim uzoraka u jednu od jažica dodana je pozitivna, a u drugu negativna kontrola PCR reakcije. Uvjeti pri kojima je provedena elektroforeza bili su 120 V/ 80 mA u trajanju od 45 minuta. Za vizualizaciju PCR proizvoda u agaroznom gelu koristila se UV kamera Gel Doc™ XR+Gel Documentation System (BIORAD, Hrvatska) (Slika 4).



**Slika 4.** Vizualizacija pozitivnih PCR uzoraka u 1% agaroznom gelu pomoću UV svjetla (unutarnja PCR reakcija, početnice SSAP2f/SSAP2r). Pozitivni uzorci: 1. M-2206, 2. M-2207, 3. M-2209, 4. M-2210, 5. M-2213, 6. M-2221, 7. M-2222, 8. M-2223.

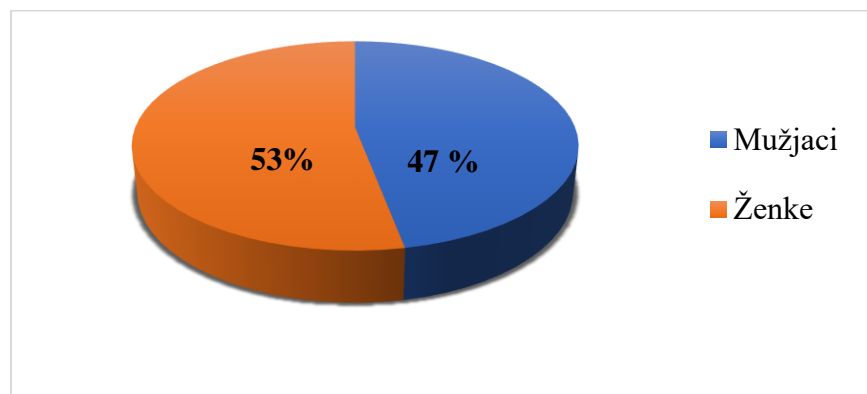
### 3.4. Sekvenciranje nasumično odabranih uzoraka

Iz literature je poznata kompleksnost genoma bakterija iz roda *Anaplasma* i različita osjetljivost i specifičnost početnica, te problematika koja se javlja kod njihovog korištenja prilikom pokušaja determinacije vrste (MASSUNG i SLATER, 2003., YANG i sur., 2016). U svrhu provjere utvrđivanja vrste *A. phagocytophilum* parovima početnica početnice SSAP2f/SSAP2r korištenim u ovom istraživanju, nasumično je odabrano pet pozitivnih uzoraka te zajedno s pozitivnom kontrolom poslano na sekvenciranje u tvrtku MacroGen (Nizozemska).

## 4. REZULTATI

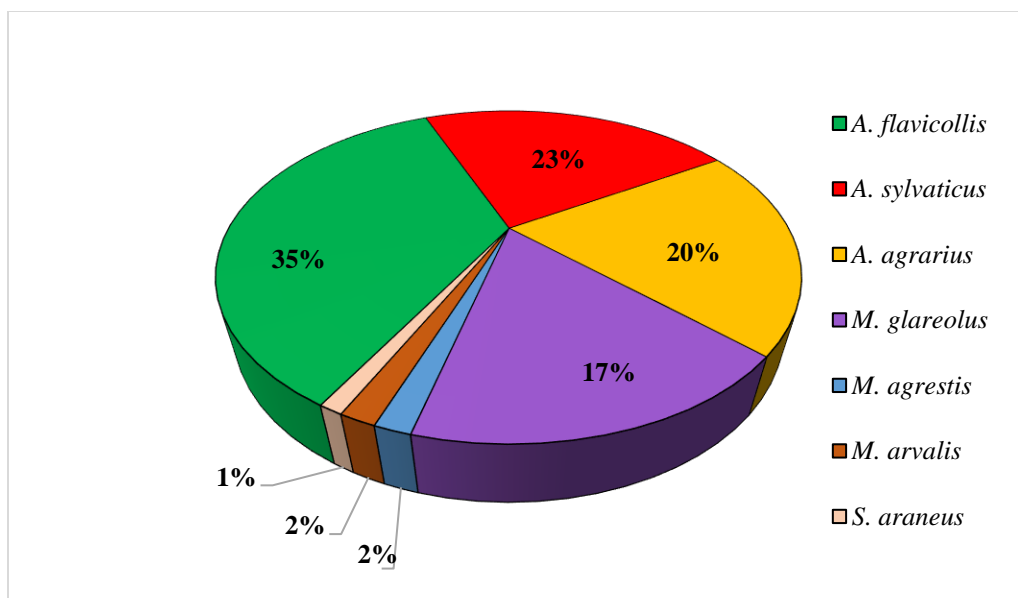
### 4.1. Istraživana populacija mišolikih glodavaca

U ovom istraživanju pretraženo je sveukupno 186 genomskih DNK izdvojenih iz slezene mišolikih glodavaca prikupljenih tijekom godine dana, koji su potjecali sa sedam različitih lokacija četiriju županija kontinentalnog dijela Republike Hrvatske. Od sveukupnog broja pretraženih životinja njih 53% (98/186) je potjecalo od ženki, a 47% (88/186) od mužjaka (Grafikon 1).



**Grafikon 1.** Zastupljenost pretraženih mišolikih glodavaca s obzirom na spol.

Detaljnija analiza ispitivanih vrsta mišolikih glodavaca ukazala je na najveću zastupljenost žutogrlog miša (*A. flavicollis*) (35% odnosno 66/186), zatim običnog šumskog miša (*A. sylvaticus*) (23% odnosno 42/186), poljskog miša (*A. agrarius*) (20% odnosno 38/186), šumske (*M. glareolus*) (17% odnosno 32/186), livadne (*M. agrestis*) i poljske voluharice (*M. arvalis*) (2% odnosno 3/186) te šumske rovke (*S. araneus*) (1% odnosno 2/186) (Grafikon 2).



**Grafikon 2.** Zastupljenost vrsta mišolikih glodavaca unutar sveukupnog broja pretraživanih uzoraka.

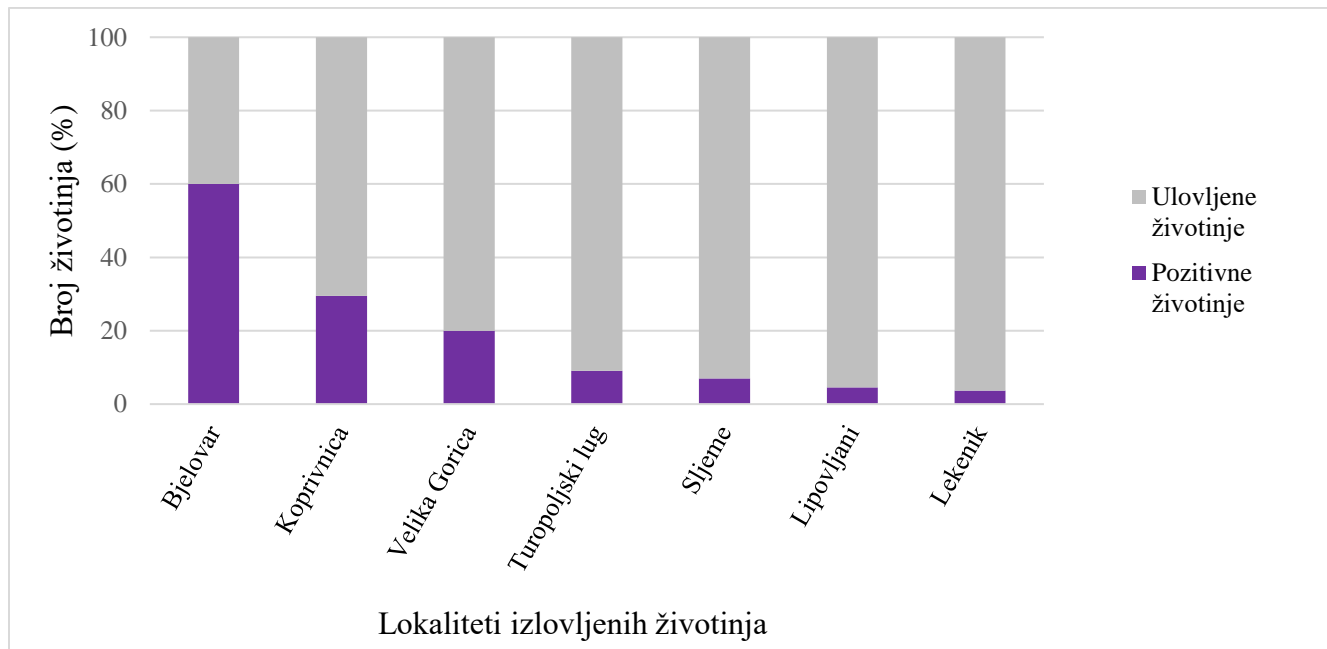
#### 4.2. Utvrđivanje prisutnosti bakterije *A. phagocytophilum* korištenjem parova početnica EC9/EC12a i SSAP2f/SSAP2r

Korištenjem parova početnica EC9/EC12a i SSAP2f/SSAP2r dokazano je prisustvo gena za 16S rRNK bakterijske vrste *A. phagocytophilum* u 15% uzoraka (27/186). Tako je u Koprivnici utvrđeno 48% (13/27) pozitivnih glodavaca, Velikoj Gorici i Sljemenu 15% (4/27), Bjelovaru 11% (3/27), Lekeniku, Lipovljanima i Turopoljskom lugu 4% (1/27) (Tablica 9).

**Tablica 9.** Uzorci kod kojih je utvrđena prisutnost gena za 16S rRNK bakterija iz roda *Anaplasma* i *Ehrlichia* i SSAP2f/SSAP2r za determinaciju vrste *A. phagocytophilum* iz slezene mišolikih glodavaca.

| Redni broj | Oznaka uzorka | Vrsta mišolikog glodavca | Mjesto          | Spol |
|------------|---------------|--------------------------|-----------------|------|
| 1.         | M-2149        | <i>A. agrarius</i>       | Lipovljani      | M    |
| 2.         | M-2201        | <i>A. flavicollis</i>    | Velika Gorica   | M    |
| 3.         | M-2181        | <i>A. flavicollis</i>    | Velika Gorica   | Ž    |
| 4.         | M-2182        | <i>A. flavicollis</i>    | Velika Gorica   | M    |
| 5.         | M-2175        | <i>A. flavicollis</i>    | Turopoljski lug | Ž    |
| 6.         | M-2045        | <i>A. sylvaticus</i>     | Sljeme          | M    |
| 7.         | M-2087        | <i>A. agrarius</i>       | Koprivnica      | Ž    |
| 8.         | M-2094        | <i>A. agrarius</i>       | Koprivnica      | M    |
| 9.         | M-2103        | <i>A. agrarius</i>       | Koprivnica      | Ž    |
| 10.        | M-2106        | <i>A. agrarius</i>       | Koprivnica      | Ž    |
| 11.        | M-2108        | <i>A. agrarius</i>       | Koprivnica      | M    |
| 12.        | M-2109        | <i>A. agrarius</i>       | Koprivnica      | M    |
| 13.        | M-2111        | <i>A. agrarius</i>       | Koprivnica      | M    |
| 14.        | M-2112        | <i>A. agrarius</i>       | Koprivnica      | Ž    |
| 15.        | M-2113        | <i>M. arvalis</i>        | Koprivnica      | Ž    |
| 16.        | M-2116        | <i>A. agrarius</i>       | Koprivnica      | Ž    |
| 17.        | M-2117        | <i>A. agrarius</i>       | Koprivnica      | Ž    |
| 18.        | M-2139        | <i>A. flavicollis</i>    | Lekenik         | Ž    |
| 19.        | M-2190        | <i>A. flavicollis</i>    | Velika Gorica   | Ž    |
| 20.        | M-2206        | <i>A. flavicollis</i>    | Koprivnica      | Ž    |
| 21.        | M-2207        | <i>A. agrarius</i>       | Koprivnica      | M    |
| 22.        | M-2209        | <i>A. sylvaticus</i>     | Sljeme          | M    |
| 23.        | M-2210        | <i>M. glareolus</i>      | Sljeme          | Ž    |
| 24.        | M-2213        | <i>A. flavicollis</i>    | Sljeme          | Ž    |
| 25.        | M-2221        | <i>A. flavicollis</i>    | Bjelovar        | Ž    |
| 26.        | M-2222        | <i>A. sylvaticus</i>     | Bjelovar        | Ž    |
| 27.        | M-2223        | <i>M. agrestis</i>       | Bjelovar        | Ž    |

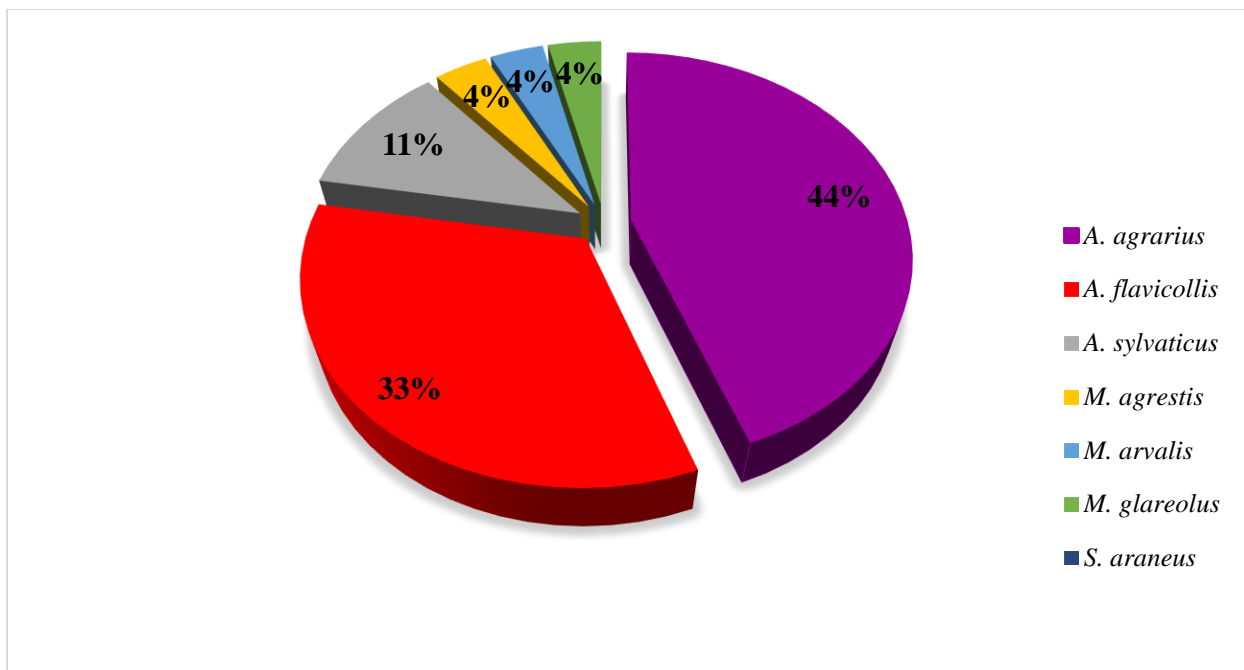
Usporedbom broja izlovljenih i broja pozitivnih životinja utvrđeno je 60% (3/5) pozitivnih uzoraka u Bjelovaru, 29,5% (13/44) Koprivnici, 20% (4/20) Velikoj Gorici, 9% (1/11) Turopoljskom lugu, 7% (4/57) Sljemenu, 4,5% (1/22) Lipovljanima, te 3,7% (1/27) u Lekeniku (Grafikon 3).



**Grafikon 3.** Postotak pozitivnih životinja u odnosu na ulovljene životinje po pojedinim lokalitetima.

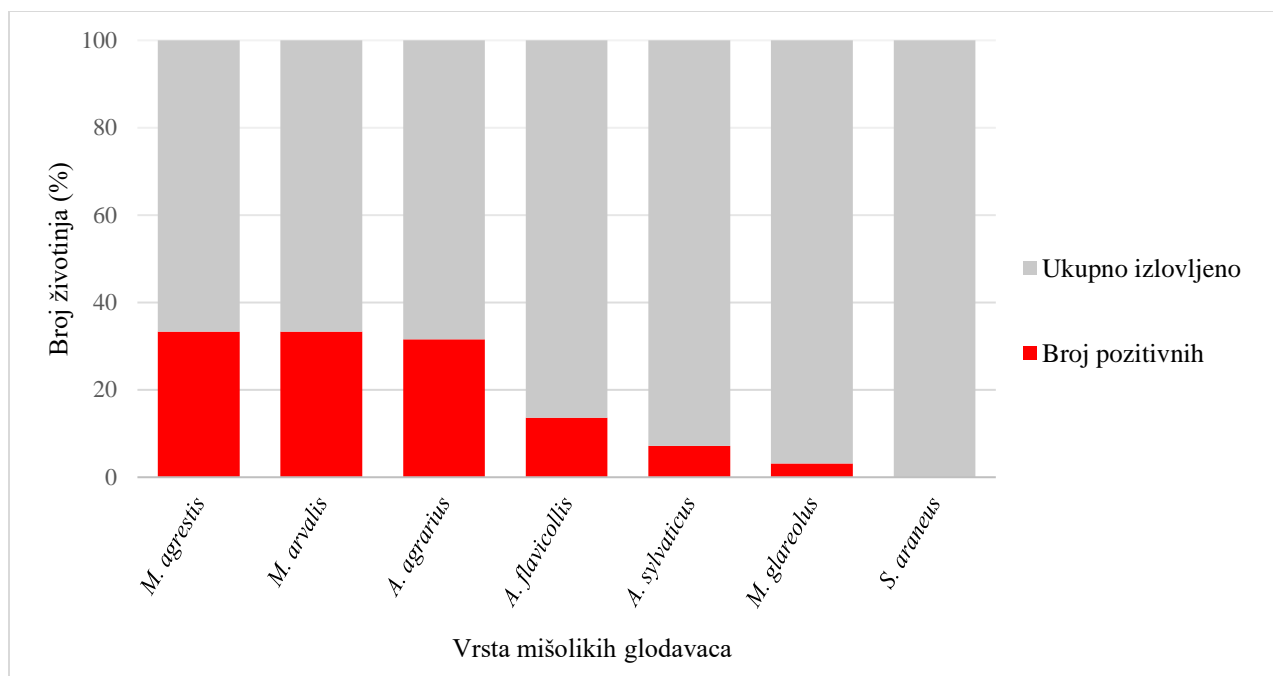
U ovom istraživanju ustanovljen je najveći broj pozitivnih uzoraka kod poljskog miša (*A. agrarius*) i to u 44% (12/27) slučajeva, zatim žutogrlog miša (*A. flavicollis*) s 33% (9/27), običnog šumskog miša (*A. sylvaticus*) s 11% (3/27), livadne (*M. agrestis*), poljske (*M. arvalis*) i šumske voluharice (*M. glareolus*) s 4% (1/27). Kod šumske rovke (*S. araneus*) nije utvrđen niti jedan pozitivan uzorak (0/2) (Grafikon 4).





**Grafikon 4.** Zastupljenost pojedinih vrsta mišolikih glodavaca u ukupnom broju pozitivnih uzoraka

Gledajući pojedinačno udio pozitivnih životinja u odnosu na izlovljene prema vrsti mišolikih glodavaca pozitivni uzorci utvrđeni su kod livadne (*M. agrestis*) i poljske voluharice (*M. arvalis*) s 33% (1/3), poljskog miša (*A. agrarius*) 31% (12/38), žutogrlog miša (*A. flavicollis*) 14% (9/66), običnog šumskog miša (*A. sylvaticus*) 7% (3/42) i šumske voluharice (*M. glareolus*) 3% (1/32). Kod šumske rovke (*S. araneus*) nije utvrđen niti jedan pozitivan uzorak (0/2) (Grafikon 5).



**Grafikon 5.** Prikaz pozitivnih životinja od ukupnog broja izlovljenih životinja iste vrste

#### 4.3. Rezultati sekvenciranja nasumično odabranih uzoraka

Sekvence nasumično odabranih pet pozitivnih uzoraka analizirane su BLAST programom kojim je utvrđena 100% podudarnost s bakterijskom vrstom iz porodice *Anaplasmataceae*, *Candidatus Neohrlichia mikurensis* (pristupni broj GU7249639.1). Pozitivna kontrola potvrđena je kao *A. phagocytophilum* ukazujući na 100% podudarnost sa sekvencom bakterije *A. phagocytophilum* (pristupni broj GQ450278.1) preuzete iz NCBI GenBank baze podataka.

## 5. RASPRAVA

*A. phagocytophilum* je bakterija koja uzrokuje humanu granulocitnu anaplazmozu, a od nje obolijevaju domaći i divlji sisavci (CHEN, 1994.). Poznato je da su divlji glodavci rezervoari navedene bakterije i domaćini za sve razvojne stadije krpelja, te se smatraju izuzetno važnim za njezino preživljavanje i održavanje u prirodi (FOLEY i sur., 2002., OBIEGALA i sur., 2014.). Zadnjih godina porastao je broj istraživanja u svrhu utvrđivanja prisutnosti bakterije *A. phagocytophilum* u njihovih rezervoara i domaćina zbog povećane pojavnosti bolesti koju uzrokuje kako u ljudi, tako i u životinja (PASCUCCI i sur., 2015.).

Od kada se bolest pojavila u ljudi, veliki broj molekularnih metoda za utvrđivanje prisutnosti bakterije postao je dostupan u laboratorijskoj dijagnostici. Međutim, različita istraživanja ukazala su da postoji statistički značajna razlika između njihove osjetljivosti i specifičnosti (MASSUNG i SLATER, 2003., DUMLER, 2004., YANG i sur., 2016.). Osim toga, najnovija istraživanja opisala su postojanje različitih genetskih varijacija unutar vrste *A. phagocytophilum*, gdje su uzorci izdvojeni iz različitih domaćina i s različitih zemljopisnih lokacija ukazali na genetičku raznolikost navedene bakterijske vrste (DUGAT, 2015.). Opisana genetička raznolikost često je prisutna upravo unutar dijela gena koji se pretražuje PCR metodama zbog čega one nisu uvijek rezultirale umnažanjem ciljnog dijela za korištenu početnicu (MORISSETTE, 2009., STRASEK, 2009. i STRASEK, 2015.). Osim toga smatra se kako pojedini ekotipovi bakterije u prirodi imaju značajno promijenjene ciljne dijelove gena, te je njihova determinacija time otežana (MORISSETTE, 2009., STRASEK, 2009., STRASEK, 2015.). Uzimajući u obzir navedeno, pitanje je da li su stvarno negativni rezultati negativni odnosno stvarno pozitivni rezultati pozitivni bez detaljne analize osjetljivosti i specifičnosti početnica koje se koriste u molekularnim metodama.

Primjerice, prilikom ispitivanja specifičnosti 13 različitih parova početnica za ciljne dijelove gena 16S rRNK, *groE*, *ank*, *msp2*, 100 kDa, 130 kDa, Hsp-70 koji se koriste u utvrđivanju prisutnosti *A. phagocytophilum* u DNK materijalu, ustanovljeno je da parovi početnica ehr 521 i ehr 747 za 16S rRNK gen imaju visoku osjetljivost, ali nisku specifičnost ukoliko se u uzorcima nalazi DNK materijal srodnih vrsta rikecija. Naime, navedene početnice su umnažale 16S rRNK gen *E. chaffeensis*, *R. rickettsii* i *B. henselae* te je naglašeno da se ne bi trebale koristiti u analizama DNK materijala koji potječe iz krpelja *I. scapularis* (MASSUNG i SLATER, 2003.). Nadalje, u drugom istraživanju, također provedenom u SAD-u s istim parom početnica u kombinaciji sa Southern

analizom i sekvenciranjem ustanovljeno je 4,4% pozitivnih uzoraka, od kojih je 14% sekvenci bilo homologno endosimbiontu krpelja *I. scapularis*, a ne sekvencama bakterije *A. phagocytophilum* (SHUKLA i sur., 2003.).

Nedavno istraživanje u Kini ispitivalo je osjetljivost i specifičnost pet različitih parova početnica za metodu ugniježdene lančane reakcije polimerazom (YANG i sur., 2016.). Pozitivni PCR rezultati dobiveni su u 20,7% slučajeva kada su korišteni parovi početnica EC9/EC12a i SSAP2f/SSAP2r, 11,6% s početnicama EE1/EE2 i EE3/EE4, i 5,2 % s početnicama ge3a/ge10r i ge9f/ge2.

Ustanovljena visoka osjetljivost i specifičnost parova početnica EC9/EC12a i SSAP2f/SSAP2r bila je razlog njihova odabira za ovo istraživanje kojima je utvrđeno 15% pozitivnih uzoraka. U svrhu kontrole i provjere rezultata pet nasumično odabranih pozitivnih uzoraka poslano je na sekvenciranje i rezultati su pokazali da je riječ o bakterijskoj vrsti *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* je bakterija koja pripada redu Rickettsiae i porodici Anaplasmataceae otkrivena 1990. godine, a 2004. godine opisana kao zasebna vrsta. Nekoliko godina kasnije, ustanovljeno je da je patogena za ljude, a danas je poznato da najčešće uzrokuje teške oblike bolesti u imunokompromitiranih pacijenata (JHA i sur., 2018).

Imajući u vidu rezultate dobivene nasumičnim sekvenciranjem u ovom istraživanju može se sa sigurnošću zaključiti da je 15% uzoraka genomske DNK bilo pozitivno na bakterije iz roda Anaplasma i Ehrlichia, od čega je 18% bilo *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. Međutim, bez dodatnog sekvenciranja preostalih pozitivnih uzoraka ne može se tvrditi da li su one zaista pripadale vrsti *A. phagocytophilum* ili nekoj drugoj vrsti iz roda Anaplasma odnosno Ehrlichia.

Dosadašnja istraživanja na području Europe utvrdila su prisutnost *A. phagocytophilum* u rasponu od 0,5 do 15% ispitivane populacije žutogrlog miša (*Apodemus flavicollis*), do 11% običnog šumskog miša (*A. sylvaticus*) i u rasponu od 5 do 19,2% u populaciji šumske voluharice (*Myodes glareolus*) (STUEN i sur., 2013.). Primjerice, u Francuskoj *A. phagocytophilum* je utvrđena u 11% populacije običnog šumskog miša (*A. sylvaticus*) (MARUMOTO i sur., 2007), a u Češkoj u 15% ispitivane populacije žutogrlog miša (*Apodemus flavicollis*) i 13,3% šumske voluharice (*Myodes glareolus*) (HULINSKA i sur., 2004.). Istraživanje u Njemačkoj utvrdilo je isti postotak prevalencije u šumske voluharice (*Myodes glareolus*), dok je prevalencija u žutogrlog miša (*Apodemus flavicollis*) bila značajno niža i iznosila svega 0,5% (HARTELT i sur., 2008.). Za

razliku od navedenog, neka druga istraživanja nisu utvrdila prisutnost bakterije *A. phagocytophilum* u krpeljima vrste *I. ricinus* sakupljenih s tijela (BURRI i sur., 2014.), niti u uzorcima pune krvi mišolikih glodavaca iz roda *Apodemus* i *Myodes* (PASCUCCI i sur., 2015.).

Rezultati ovog istraživanja su svakako ukazali na prisutnost bakterija iz roda *Ehrlichia* i *Anaplasma* na svih sedam uzorkovanih lokacija koje pripadaju endemskom području krpeljno prenosivih bolesti. Najviše pozitivnih glodavaca utvrđeno je na području Koprivnice i to u 48% slučajeva, a od vrste glodavaca poljski miš (*Apodemus agrarius*) bio je pozitivan u 44% slučajeva dok kod šumske rovke (*S. araneus*) nije utvrđen niti jedan pozitivan uzorak. Gledajući omjer izlovljenih i pozitivnih životinja po vrstama mišolikih glodavaca najviše pozitivnih utvrđeno je kod livadne (*M. agrestis*) i poljske voluharice (*M. arvalis*) i to u 33% slučajeva. S obzirom da rod *Anaplasma* i *Ehrlichia* obuhvaća veliki broj vrsta, u ovom trenutku teško je usporediti rezultate ovog preliminarnog istraživanja s rezultatima drugih istraživanja u Europi.

Ovo istraživanje još jednom je potvrdilo da je osnova svakog istraživanja prisutnosti bakterije *A. phagocytophilum* prvo vrednovanje metode koja se koristi za određenu životinjsku vrstu na određenom zemljopisnom području a u svrhu dobivanja pouzdanih rezultata (MASSUNG i SLATER, 2003., YANG i sur., 2016.).

Uzimajući u obzir podatke iz literature i rezultate ovog istraživanja prilikom provođenja istraživanja rasprostranjenosti bakterije *A. phagocytophilum* potrebno je uvijek pozitivne uzroke sekvencirati u svrhu provjere specifičnosti upotrijebljenih početnica. Nadalje, vrlo je važno koristiti barem dva para početnica koje umnažaju različite dijelove gena, te je pozitivne uzorke potrebno poslati na sekvenciranje u svrhu potvrde pozitivnih rezultata. Na taj način dobio bi se uvid u učinkovitost samih početnica s ciljem odabira upravo onih koji su u mogućnosti precizno utvrditi one biotipove bakterije *A. phagocytophilum* koji kruže u populaciji mišolikih glodavaca na prostoru kontinentalne Republike Hrvatske.

## 6. ZAKLJUČCI

Od pretraženih 186 arhiviranih uzoraka slezene mišolikih glodavaca izlovljenih na području kontinentalne Hrvatske, njih 15% bilo je PCR pozitivno na parove početnica EC9/EC12a za determinaciju 16S rRNK bakterija iz roda Ehrlichia i Anaplasma, i SSAP2f/SSAP2r za determinaciju 16S rRNK bakterije *A. phagocytophilum*.

U svrhu kontrole specifičnosti početnica nasumičnim odabirom pet pozitivnih uzoraka, sekvenciranjem je utvrđeno da je riječ o bakterijskoj vrsti *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* koja pripada redu Rickettsiae, te porodici Anaplasmataceae.

Dobivanjem preliminarnih rezultata sekvenciranja može se zaključiti da je 15% uzoraka bilo pozitivno na bakterije iz roda Ehrlichia i Anaplasma, od čega za njih 18% utvrđeno da je riječ o bakteriji *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*.

Ovo istraživanje potvrdilo je da je za utvrđivanje stvarne prisutnosti bakterije *A. phagocytophilum* u glodavaca potrebno koristiti više različitih parova početnica koje umnažaju ciljne gene ove bakterije, te da je obavezno sve pozitivne rezultate poslati na sekvenciranje. Na taj način utvrdila bi se osjetljivost i specifičnost početnica, te bi se mogle odabrati one koje bi se koristile za identifikaciju i utvrđivanje prisutnosti ove bakterije u glodavaca kao njezinog rezervoara na području Republike Hrvatske.

## 7. LITERATURA

ATIF, F. A. (2015): *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: *Rickettsiales* pathogens of veterinary and public health significance. *Parasitol. Res.* 114, 3941.

BAKKEN, J. S., J. S. DUMLER (2006): Clinical diagnosis and treatment of human granulocytic anaplasmosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1078, 236-247.

BAKKEN, J. S., J. S. DUMLER (2008): Human granulocytic anaplasmosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 22, 433-448.

BARAKOVA, I., M. DERDAKOVA, G. CARPI, F. ROSSO, M. COLLINI, V. TAGLIAPIETRA, C. RAMPONI, H. C. HAUFFE, A. RIZZOLI (2014): Genetic and ecologic variability among *Anaplasma phagocytophilum* strains, northern Italy. *Emerg Infect Dis.* 20, 5-1082.

BEUGNET F., J. L. MARIE (2009): Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet. Parasitol.* 163, 298-305.

BATTILANI, M., S. DE ARCANGELI, A. BALBONI, F. DONDI (2017): Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. *Infect. Genet. Evol.* 45, 195-211.

BEUGNET F., J. L. MARIE (2009): Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet. Parasitol.* 163, 298-305.

CHASTAGNER, A., M. MOINET, G. PEREZ, E. ROY, K.D. MCCOY, O. PLANTARD, A. AGOULON, S. BASTIAN, A. BUTET, Y. RANTIER, H. VERHEYDEN, N. C`EBE, A. LEBLOND, G. VOURE`H (2016): Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in small rodents in France. *Ticks Tick Borne Dis.* 7, 988-991.

CHEN, S. M., S. J. DUMLER, J. S. BAKKEN, D. H. WALKER (1994): Identification of a granulocytic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J. Clin. Microbiol.* 32, 589-595.

COHN, L. A. (2003): Ehrlichiosis and related infections. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 33, 863-884.

- COURTNEY, J. W., L. M. KOSTELNIK, N.S. ZEIDNER, R.F. MASSUNG (2004): Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. J. Clin. Microbiol. 42, 3164-3168.
- CVETNIĆ, Ž. (2008): Krpeljna vrućica. U: Bakterijske i gljivične bolesti životinja. Medicinska naklada, Zagreb, str. 397-399
- CVETNIĆ, Ž. (2013): Infekcije vrstama iz roda *Ehrlichia* i *Anaplasma*. U: Bakterijske i gljivične zoonoze. Medicinska naklada, Zagreb, Hrvatski veterinarski institut, str. 92-99.
- DANIEL, R., K. PUGH, N. TORRENS, A. CARSON, M. WESSELS (2015): Intercurrent tickborne fever infection and Bibersteinia trehalosi septicaemia in a five-week-old lamb. Vet. Rec. 177, 24.
- DE LA FUENTE, J., F. RUIZ-FONS, V. NARANJO, A. TORINA, O. RODRÍGUEZ, O. GORTÁZAR (2008): Evidence of Anaplasma infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from Southern Spain. Res. Vet. Sci. 84, 382-386.
- DE LA FUENTE, J., P. AYOUBI, E.F. BLOUIN, C. ALMAZÁN, V. NARANJO, K.M. KOCAN (2006): Anaplasmosis: focusing on host-vector-pathogen interactions for vaccine development. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1078, 416-423.
- DEEPAK, D., P. PREENA, S. YADAV, MONIKA, R. MUKHERJEE, S. K. DIXIT (2017): *Anaplasma bovis* (*Ehrlichia bovis*) infection in a Buffalo . Int. J. livestock Res. 7, 130-133.
- DES VIGNES F., M. L. LEVIN, D. FISH (1999): Comparative vector competence of *Dermacentor variabilis* and *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) for the agent of human granulocytic ehrlichiosis. J. Med. Entomol. 36, 182–185.
- DUGAT, T., A. C. LAGRÉE, R. MAILLARD, H. J. BOULOUIS, N. HADDAD (2015): Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. Front Cell Infect Microbiol. 5-61.
- DUMLER, J. S. (2012): The biological basis of severe outcomes in *Anaplasma phagocytophilum* infection. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 64, 13-20.



DUMLER, J. S., D. H. WALKER (2015): *Ehrlichia chaffeensis* (human monocytotropic ehrlichiosis), *Anaplasma phagocytophilum* (human granulocytotropic anaplasmosis), and other *Anaplasmatacea*; Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, Elsevier, St.. 2227-2230.

DUMLER, J. S., P. BROUQUI (2004): Molecular diagnosis of human granulocytic anaplasmosis. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4,59-69.

DUMLER, J.S., A. F. BARBET, C. P. J. BEKKER, G. A. DASCH, G. H. PALMER, S. C. RAY, Y. RIKIHISA, F. R. RURANGIRWA (2001): Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*. *Cowdria* 51, 2145-2165.

ĐAKOVIĆ RODE, O. (2015): Humana granulocitna anaplazmoza u Republici Hrvatskoj i nove spoznaje o anaplazmama i erlihijama. *Infektološki glasnik*, 35, 5-15

EGENVALL, A. E., A. A. HEDHAMMAR, A. BJÖERSDORFF (1997): Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *Vet. Rec.* 140, 222-226.

FOGGIE, A. (1951): Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep. *J. Pathol. Bacteriol.* 63, 1-15.

FOLEY, J. E., V. KRAMER, D. WEBER (2002): Experimental infection of dusky-footed wood rats (*Neotoma fuscipes*) with *Ehrlichia phagocytophila* sensu lato. *J. Wildl. Dis.* 38, 194-198.

FOLEY, J. E., N. C. NIETO (2011): The ecology of tick-transmitted infections in the redwood chipmunk (*Tamias ochrogenys*). *Ticks Tick Borne Dis.* 2, 88-93.

FRANZÉN, P., A. ASPAN, A. EGENVALL, A. GUNNARSSON, L. ABERG, J. PRINGLE (2005): Acute clinical, hematologic, serologic, and polymerase chain reaction findings in horses experimentally infected with a European strain of *Anaplasma phagocytophilum*. *J. Vet. Intern. Med.* 9, 232-239.

GRANQUIST, E. G., M. ALEKSANDERSEN, K. BERGSTROM, S. J. DUMLER S, W. O. TORSTEINBO, S. STUEN (2010): A morphological and molecular study of *Anaplasma phagocytophilum* transmission events at the time of *Ixodes ricinus* tick bite. *Acta Vet. Scand.* 52, 43.

- GRIBBLE, D. H. (1969): Equine ehrlichiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 155, 462-469.
- GREIG, B., P. J. ARMSTRONG (2006): Canine granulocytotropic anaplasmosis (*Anaplasma phagocytophilum* infection). U: *Infectious Diseases of Dog and Cat*. Saunders Elsevier, 219-224.
- GREEN, C. E. (2012): *Infectious disease of the dog and cat*, 4th ed.. Saunders Elsevier, Philadelphia, St.Louis, USA, str. 254-256.
- GRØVA, L., I. OLESEN, H. STEINSHAMN, S. STUEN (2011): Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection and effect on lamb growth. *Acta Vet. Scand.* 30, 53.
- HERRON, M. J., C. M. NELSON, J. LARSON, K. R. SNAPP, G. S. KANSAS, J. L. GOODMAN (2000): Intracellular parasitism by the human granulocytic ehrlichiosis bacterium through the P-selectin ligand, PSGL-1. *Science* 288, 1653-1656.
- HODZIC E., D. L. BORJESSON, S. FENG, S. W. BARTHOLD (2001): Acquisition dynamics of *Borrelia burgdorferi* and the agent of human granulocytic ehrlichiosis at the host-vector interface. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 1, 149–158.
- JENKINS A., B. E. KRISTIANSEN, A. G. ALLUM, R. K. AAKRE, L. STRAND, E. J. KLEVELAND, I. VAN DE POL, L. SCHOULS (2001): *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Ehrlichia spp.* in *Ixodes* ticks from southern Norway. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3666-3671.
- JENKINS, A., B. E. KRISTIANSEN, A. G. ALLUM, R. K. AAKRE, L. STRAND, E. J. KLEVELAND (2001): *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Ehrlichia spp.* in *Ixodes* ticks from southern Norway. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3666-3671.
- JHA P., C. M. KIM, D. M. KIM, N. R. YOON, B. JHA, J. W. PARK i sur. (2018): First detection and identification of *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in South Korea. *PLoS ONE* 13(12).
- JIN, H., F. WEI, Q. LIU, J. QIAN (2012): Epidemiology and control of human granulocytic anaplasmosis: a systematic review. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12, 269-274.
- KAWAHARA, M., Y. RIKIHISA, Q. LIN (2006): Novel Genetic Variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a *Novel Ehrlichia sp.* in Wild Deer and Ticks on Two Major Islands in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1102-1109.

- KIEWRA, D., G. LEŚNY, A. CZUŁOWSKA (2014): The prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks in SW Poland. *Pol. J. Microbiol.* 68, 89-93.
- KIM, S.W., C. M. KIM, D. M. KIM, N. R. YUN (2018.): Manifestation of anaplasmosis as cerebral infarction: a case report. *BMC Infect. Dis.* 17-409.
- KRAJINOVIĆ V., L. CVETKO KRAJINOVIĆ (2018.): Krpeljima prenosive bolesti - globalna prijetnja zdravlju. *Medix* 6, 332-340.
- LEPIDI, H., J. E. BUNNELL, M. E. MARTIN, J. E. MADIGAN, S. STUEN, J. S. DUMLER (2000): Comparative pathology and immunohistology associated with clinical illness after *Ehrlichia phagocytophila*-group infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 29-37.
- LESTER, S. J., E. B. BREITSCHWERDT, C. D. COLLIS, B.C. HEGARTY (2005): *Anaplasma phagocytophilum* infection (granulocytic anaplasmosis) in a dog from Vancouver Island. *Can Vet J.* 825-827.
- LIN, M., Y. RIKIHISA (2003): *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infect. Immun.* 71, 5324-5331.
- MACLEOD, J., W. GORDON (1933): Studies in tick-borne fever of sheep. I. transmission by the tick, *Ixodes ricinus*, with a description of the disease produced. *Parasitol.* 25, 273-283.
- MASSUNG, R. F., K. G. SLATER (2003): Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. *J Clin Microbiol.* 41, 22-717.
- MORISSETTE, E., R. F. MASSUNG, J. E. FOLEY, A. R. ALLEMAN, P. FOLEY, A. F. BARBET (2009): Diversity of *Anaplasma phagocytophilum* strains, USA. *Emerg Infect. Dis.* 15, 31-928.
- OBIEGALA, A., M. PFEFFER, K. PFISTER, T. TIEDEMANN, C. THIEL, A. BALLING, C. KARNATH, D. WOLL, C. SILAGHI (2014): *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* and *Anaplasma phagocytophilum*: prevalences and investigations on a new transmission path in small mammals and Ixodid ticks. *Parasitol. Vectors* 7, 563.

OGDEN, N.H., Z. WOLDEHIWET, C.A. HART (1998): Granulocytic ehrlichiosis: an emerging or rediscovered tick-borne disease? *J. Med. Microbiol.* 47, 475-482.

PEREIRA, C. P., P. R. OLIVEIRA, K. C. FURQUIM, G. H. BECHARA, M. I. CAMARGO-MATHIAS (2009): Effects of fipronil (active ingredient of Frontline) on salivary gland cells of *Rhipicephalus sanguineus* females (Latreille, 1806) (Acari: *Ixodidae*). *Vet Parasitol.* 124–130.

PETROVEC M., S. LOTRIC-FURLAN, T. A. ZUPANC, F. STRLE, P. BROUQUI, V. ROUX, J. S. DUMLER (1997.): Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1556-1559.

POPOV, V. L. (2007): Ultrastructural evidence of the ehrlichial developmental cycle in naturally infected *Ixodes persulcatus* ticks in the course of coinfection with *Rickettsia*, *Borrelia* and a *flavivirus*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7, 699-716.

PRUNEAU, L., A. MOUMÈNE, D. F. MEYER, I. MARCELINO, T. LEFRANÇOIS, N. VACHIÉRY (2014): Understanding Anaplasmataceae pathogenesis using “Omics” approaches. *Front Cell Infect. Microbiol.* 4, 1-7

RAR, V., I. GOLOVLJOVA (2011): *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and “*Candidatus Neoehrlichia*” bacteria Pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1842-1861.

RIKIHISA, Y. (1991): The tribe *Ehrlichieae* and ehrlichial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 12-33.

RIKIHISA, Y. (1997): Ultrastructural and antigenic characterization of a granulocytic ehrlichiosis agent directly isolated and stably cultivated from a patient in New York State. *J. Infect. Dis.* 175, 210-213.

RYMASZEWSKA, A. (2011): PCR for detection of tick-borne *Anaplasma phagocytophilum* pathogens: a review; *Vet.Med.*, 56, 529–536.

SEVERO, M.S., K. D. STEPHENS, M. KOTSYFAKIS, H. F. J. PEDRA (2012): *Anaplasma phagocytophilum*: deceptively simple or simply deceptive? *Future Microbiol.* 7, 719-731.

SHUKLA S. K., M. F. VANDERMAUSE, E. A. BELONGIA, K. D. REED, S. M. PASKEWITZ, J. KAZMIERCZAK (2003): Importance of primer specificity for PCR detection of *Anaplasma phagocytophila* among *Ixodes scapularis* ticks from Wisconsin. J. Clin. Microbiol. 41, 4006.

SIUDA, K., M. NOWAK (2006): Zagrożenie atakami kleszczy na szlakach turystycznych w województwie małopolskim. Konspekt. 26, 42-48.

STEPHEN, J. S., D. NEITZEL, K. D. REED, A. E. BELONGIA (2006.): Coinfections acquired from *Ixodes* Ticks. Clin. Microbiol. 19, 708-727.

STRASEK SMRDEL, K., F. D. VON LOEWENICH, M. PETROVEC, T. AVSIC ZUPANC (2015): Diversity of ankA and msp4 genes of *Anaplasma phagocytophilum* in Slovenia. Ticks Tick Borne Dis. 6, 164-166.

STRASEK SMRDEL, K., N. TOZON, D. DUH, M. PETROVEC, T. AVSIC ZUPANC (2009): Diversity of groESL sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among dogs in Slovenia. Clin Microbiol Infect. 2, 79-80.

STUEN, S. (2003): *Anaplasma phagocytophilum* (Formerly *Ehrlichia phagocytophila*) Infection in Sheep and Wild Ruminants in Norway. A study on clinical manifestation, distribution and persistence. Dr Philos thesis, Norwegian School of Veterinary Science, Oslo.

STUEN, S. (2007): *Anaplasma phagocytophilum* - the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. Vet. Res. Commun. 31, 79-84.

STUEN, S., E. G. GRANQUIST, C. SILAGHI (2013): *Anaplasma phagocytophilum*—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. Front. Cell. Infect. Microbiol. 3, 31-71.

STUEN, S., W. OKSTAD, A. M. SAGEN (2018): Intrauterine Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* in Persistently Infected Lambs. Vet Sci.,5-25.

SYKES, J. E., J. E. FOLEY (2013): Canine and Feline Infectious Diseases. 1st ed., Elsevier, Philadelphia, USA. str. 290-299.

TAYLOR, S. M., J. KENNY (1980): The effects of tick-borne fever (*Ehrlichia phagocytophila*) on the growth rate of fattening cattle. Brit. Vet. J. 136, 364-370.

TELFORD, S. R. III, J. E. DAWSON, P. KATAVOLOS, C. K. WARNER, C. P. KOLBERT, D. H. PERSING (1996): Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 6209-6214.

TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA S., T. CHMIELEWSKI, M. KONDRUSIK, T. HERMANOWSKA-SZPAKOWICZ, W. SAWICKI, K. SULEK (2001): First cases of acute human granulocytic ehrlichiosis in Poland. Eur. J.of Clin. Microbiol., 20, 196-198.

WALKER, D. H., J. S. DUMLER (1996): Emergence of the ehrlichioses as human health problems. Emerg. Infect. Dis. 18-29.

WOLDEHIWET, Z. (2010): The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. Vet. Parasitol. 167, 108-122.

YANG, J., Z. LIU, Q. NIU, J. LIU, J. XIE, Q. CHEN, Z. CHEN, G. GUAN, G. LIU, J. LUO, H. YIN (2016): Evaluation of different nested PCRs for detection of *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants and ticks. BMC Vet. Res. 12-35.

## 8. SAŽETAK

### Utvrđivanje prisutnosti bakterije *Anaplasma phagocytophilum* u populaciji mišolikih glodavaca

Anaplazmoza je zarazna bolest koju uzrokuju bakterije iz roda *Anaplasma*. *A. phagocytophilum* uzročnik je anaplazmoze konja, krpeljne groznice preživača, granulocitne anaplazmoze pasa i mačaka te humane granulocitne anaplazmoze u ljudi. Srna i divlji glodavci prirodni su rezervoari *A. phagocytophilum*, a osim toga glodavci su i domaćini svih razvojnih stadija krpelja. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi prisutnost bakterije *A. phagocytophilum* u populaciji mišolikih glodavaca. Uzorci tkiva slezene pretraženi su ugniježđenom lančanom reakcijom polimeraze, te su pozitivni rezultati utvrđeni u 15% uzoraka. U svrhu provjere utvrđivanja vrste *A. phagocytophilum* parovima početnica EC9/EC12a i SSAP2f/SSAP2r korištenih u ovom istraživanju, nasumično je odabrano pet pozitivnih uzoraka te poslano na sekvenciranje. Sekvence su analizirane BLAST programom kojim je utvrđena 100% podudarnost s bakterijskom vrstom iz porodice *Anaplasmataceae*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. Rezultati ovog preliminarnog istraživanja pokazali su da se bez sekvenciranja svih pozitivnih uzoraka te korištenja više različitih parova početnica ne može utvrditi stvarna prisutnost bakterije *A. phagocytophilum*. Kod određenih životinjskih vrsta na određenom području javljaju se unakrižne reakcije s drugim bakterijskim vrstama iz porodice *Anaplasmataceae*.

## 9. SUMMARY

### **Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in wild rodent population**

Anaplasmosis is an infectious disease caused by bacteria from the genus *Anaplasma*. *A. phagocytophilum* is the cause of equine anaplasmosis, ruminant tick fever, canine and feline granulocytic anaplasmosis, and human granulocytic anaplasmosis. Deer and wild rodents are natural reservoirs of *A. phagocytophilum*, and in addition, rodents are also host tick development stages. The aim of this study was to determine the presence of *A. phagocytophilum* in a wild rodent population. Spleen tissue samples were examined by nested polymerase chain reaction and positive results were found in 15% of the samples. For the purpose of confirming the determination of *A. phagocytophilum* by EC9/EC12a and SSAP2f/SSAP2r primers used in this study, five positive samples were randomly selected and sent for sequencing. The sequences were analyzed by a BLAST program that determined 100% identity with *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, a bacterial species belonging to the family *Anaplasmataceae*. The results of this preliminary study showed that without sequencing all positive samples and using different primer sets the presence of *A. phagocytophilum* could not be determined. In certain animal species in certain geographic area there is a possibility of cross-reactions occurring with other bacterial species in the family *Anaplasmataceae*.



## **10. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam u Šibeniku 1994. godine. Započela sam svoje obrazovanje 2000.godine u Osnovnoj školi Jurja Šižgorića u Šibeniku. 2008. upisujem jezičnu Gimnaziju Antuna Vrančića. Maturirala sam 2012. i te iste godine upisala Veterinarski fakultet u Zagrebu. Na prvoj godini faksa postala sam član sportske odbojkaške ekipe koja je sudjelovala na sveučilišnoj ligi. U prvom semestru četvrte godine bila sam demonstrator na Zavodu za veterinarsku biologiju, na predmetu Molekularna biologija i genomika u veterini. Drugi semestar 5. godine sam studirala u Wrocławu u Poljskoj, kao dio ERASMUS studijske razmjene. Tijekom studija posjetila sam 15 zemalja u Europi, Aziji i Africi.