EPIDEMIOLOŠKO ZNAČENJE LISICE (VULPES VULPES L.) U ŠIRENJU VEKTORSKI PRENOSIVIH ZOONOZA NA PODRUČJU SJEVERNE HRVATSKE

Trninić, Krešimir

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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:178:516906

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-01**

Repository / Repozitorij:

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

Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Krešimir Trninić

EPIDEMIOLOŠKO ZNAČENJE LISICE (*VULPES VULPES* L.) U ŠIRENJU VEKTORSKI PRENOSIVIH ZOONOZA NA PODRUČJU SJEVERNE HRVATSKE

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023

University of Zagreb
Veterinary Faculty

Krešimir Trninić

THE EPIDEMIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF FOX (*VULPES VULPES* L.) IN THE SPREAD OF VECTOR TRANSMISSIBLE ZOONOSES IN NORTHERN CROATIA

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2023

Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

KREŠIMIR TRNINIĆ

EPIDEMIOLOŠKO ZNAČENJE LISICE (*VULPES VULPES* L.) U ŠIRENJU VEKTORSKI PRENOSIVIH ZOONOZA NA PODRUČJU SJEVERNE HRVATSKE

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof.dr.sc. Marina Pavlak

Zagreb, 2023

University of Zagreb
VETERINARY FACULTY

Krešimir Trninić

THE EPIDEMIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF FOX (*VULPES VULPES* L.) IN THE SPREAD OF VECTOR TRANSMISSIBLE ZOONOSES IN NORTHERN CROATIA

DOCTORAL THESIS

Supervisor: prof.dr.sci. Marina Pavlak

Zagreb, 2023

Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

I Z J A V A

Ja, Krešimir Trninić, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima do onih navedenih u radu.

_____

(potpis studenta)

Zagreb, 2023

ZAHVALA

Zahvaljujem profesorici dr. sc. Marini Pavlak, svojoj mentorici, na nesebičnoj pomoći i podršci kao i savjetima koje sam dobio tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem ravnatelju Hrvatskoga veterinarskog instituta izv. prof. dr. sc. Borisu Habrunu i predstojniku Odjela za patološku morfologiju dr. sc. Željku Mihaljeviću na susretljivosti tijekom prikupljanja uzoraka za potrebe mojega rada, a posebno želim zahvaliti veterinarskom tehničaru g. Mariju Maršiću na pomoći pri uzorkovanju. Također, zahvaljujem predstojnici Odjela za virologiju, izv. prof. dr. sc. Loreni Jemeršić i dr. sc. Jeleni Prpić na pomoći pri obavljanju molekularne dijagnostike.

Iznimno zahvaljujem dr. sc. Snježani Ćurković, voditeljici Laboratorija za molekularnu dijagnostiku Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na velikodušnoj pomoći pri obavljanju određenih metoda molekularne dijagnostike. Ujedno ljubazno zahvaljujem i predstojnici Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju izv. prof. dr. sc. Martini Đuras što mi je omogućila izradu rada u Zavodu.

Zahvaljujem i izv. prof. dr. sc. Zrinki Štritof sa Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom na pomoći oko provođenja metoda u cilju istraživanja borelioze. Posebne zahvale dr. sc. Vesni Mojčec Perko na pomoći pri izvođenju PCR metoda.

SAŽETAK

EPIDEMIOLOŠKO ZNAČENJE LISICE (*VULPES VULPES* L.) U ŠIRENJU VEKTORSKI PRENOSIVIH ZOONOZA NA PODRUČJU SJEVERNE HRVATSKE

Divlje životinje vrlo često mogu biti rezervoari za vektorski prenosive zoonotske bolesti, koje su u svijetu u porastu, a još uvijek nedovoljno istražene. Cilj rada je utvrditi proširenosti i rizične čimbenike za vektorski prenosive uzročnike bakterijskih (Lajmska borelioza, anaplazmoza, erlihioza) i parazitskih (dirofilarioza) oboljenja u populaciji lisica, na području sjeverne i srednje Hrvatske. Pregledano je 179 uzoraka krvi lisica sa 127 područja uključujući 9 županija. Brzim dijagnostičkim SNAP® 4Dx® Plus testom koji se koristi za detekciju *Dirofilaria immitis* cirkulirajućeg antigena, te *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum* i *Ehrlichia canis / Ehrlichia ewingii* protutijela, pozitivno je bilo 16,76 % (CI 95 % 11,29 – 22,23 %) lisica. S obzirom na pojedinog uzročnika, ustanovljeno je 6,70 %, (CI 95 % 3,20 – 10,19 %) pozitivnih uzoraka na cirkulirajući antigen *D. immitis* i 10,05 % (CI 95 % 5,8 – 14,25 %) na protutijela za *A. phagocytophilum / A. platys*. Protutijela za *B. burgdorferi* i *E. canis / E. ewingii* nisu ustanovljena. Analizom prostorne distribucije pozitivnih lisica ustanovljene su značajne razlike prema geografskim područjima (županija). Najveći postotak pozitivnih lisica bio je u Karlovačkoj županiji (38,45 %, CI 95 % 19,75 – 57,15%), a najmanji u Varaždinskoj (7,70%, CI 95 % -6,79 – 22,19 %) ($P < 0,05$). Razlike po spolu i dobi nisu ustanovljene. Standardnom PCR metodom za osam SNAP® 4Dx® Plus testom pozitivnih i osam negativnih uzoraka lisica na cirkulirajući antigen *D. immitis,* nije utvrđena prisutnost *D. immitis.* PCR metodom nije utvrđena niti *D. repens* i *A. reconditum* kao ni prisutnost moguće koinfekcije. Od ukupno devet uzoraka lisica koje su bile SNAP® 4Dx® Plus testom pozitivne na protutijela *A. phagocytophilum / A. platys*, u četiri uzorka postupkom ugniježđenog i semiugniježđenog PCR-a potrvrđen je 16S rRNA i GroEL genom *A. phagocytophilum*. Analizom odsječaka koja je provedena metodom susjednog sparivanja uz primjenu modela Kimura-2-parametra, ustanovljena je sličnost izolata 16S rRNA-29 s ljudskim izolatom iz Poljske, izolata 16S rRNA-70 s izolatom divlje svinje iz Slovenije, te izolata 16S rRNA-105 s izolatom psa iz Slovenije, dok je izolat 16S rRNA-93bio identičan s izolatom psa iz Mađarske. Ovo istraživanje je prvo istraživanje vektorski prenosivih zoonoza u populaciji crvene lisice u Hrvatskoj koje je pokazalo da populacija crvene lisice nije slobodna od anaplazmoze i dirofilarioze te da treba uzeti u obzir njenu ulogu u održavanju i širenju ovih bolesti na nekim područjima u Hrvatskoj, koju je potrebno dalje istražiti.

KLJUČNE RIJEČI: Crvena lisica (*Vulpes vulpes* L.), zoonoze, SNAP® 4Dx® Plus Test, standardni PCR, ugniježđeni i semiugniježđeni PCR, *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingi*

EXTENDED ABSTRACT

THE EPIDEMIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF FOX (*VULPES VULPES* L.) IN THE SPREAD OF VECTOR TRANSMISSIBLE ZOONOSES IN NORTHERN CROATIA

INTRODUCTION

Zoonoses are infectious diseases common to humans and certain animal species that are naturally transmitted from animals to humans and vice versa. Today, more than 200 zoonoses are known to require different epidemiological approaches in disease detection and control. A large number of zoonoses are transmitted indirectly through intermediaries - vectors, most often ticks or mosquitoes. For a large number of vector-borne zoonoses, there is no systematic data on the prevalence in wildlife that are often reservoirs of these zoonoses, so such species pose a higher risk due to the possibility of more frequent contact with domestic animals and humans.

From an epidemiological point of view, it is important to know which and to what extent the causative agents of zoonoses are carried by wild animals, that can be transmitted by vectors to domestic animals or humans. One of the wild species of canids that represents a reservoir of vector-borne diseases is the Red Fox (*Vulpes vulpes* L.), which is present in large numbers in rural and suburban areas.

The Red Fox (*Vulpes vulpes* L.) is one of the adaptable species of animals whose numbers are increasing in human proximity, and increasing the risk of transmitting the disease to domestic animals and humans. It is known from the available literature that foxes can be reservoirs of various zoonoses that pose a public health problem because they can be transmitted not only to domestic animals, including pets, (especially dogs) but also to humans, which have not yet been studied in Croatia. This group of diseases includes anaplasmosis, Lyme borreliosis, ehrlichiosis and heartworm disease.

MATERIAL AND METHODS

This research was conducted on 179 shot carcasses of red fox (*Vulpes vulpes* L.) from the area of 9 counties, including 127 habitats (hunting grounds), foxes were of both sexes and aged from several months to seven years. Blood and an ear were sampled from each fox. From the collected blood samples, testing was performed by SNAP® 4Dx® Plus Test, polymerase

chain reaction (PCR) for amplification of the target part of DNA *Dirofilaria immitis*, nested and seminested polymerase chain reaction (nested PCR) for amplification of regions within the 16S rRNA and GroEL section of the *Anaplasma phagocytophilum* genome. From the collected ear samples, nested PCR method was performed for amplification the target part of *Borrelia burgdorferi* DNA.

Molecular studies were performed in order to compare with the results of the SNAP test. Genomic DNA isolation was performed using the commercial kit ReliaPrep ™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, USA). To determine the nucleotide sequences of the target gene 5.8S-ITS2-28S rDNA, two primers were used: DIDR-F1 and DIDR-R1 for the PCR reaction of *D. immitis* amplification (Sigma Aldrich, USA).

For the PCR amplification reaction of *D. immitis* from samples that were positive on the SNAP® 4Dx® Plus Test, a commercial GoTaq® Green Master Mix kit (Promega, USA) was used, which contains all the necessary optimized reagents.

Specific primers (Sigma Aldrich, USA) were used to amplification of regions within the 16S rRNA and GroEL section of the *A. phagocytophilum* genome. For both methods, the nested PCR in which the region within the 16S rRNA section of the genome *A. phagocytophilum* and the seminested PCR in which the region within the GroEL section of the genome *A. phagocytophilum* was amplified, two sets of primers were used.

In the nested PCR reaction for amplification of regions within the 16S rRNA and GroEL section of the *A. phagocytophilum* genome a commercial ALLinTM Red Taq Mastermix, 2x kit (highQu) was used. Two pairs of primers were used to amplify of regions within the 16S rRNA section of *the A. phagocytophilum* genome; ge3a/g10r and ge9f/g2. Two pairs of primers were used to amplify regions within the GroEL section of the *A. phagocytophilum* genome; EphplgroEL(569) F/EphplgroEL(1193)R and EphplgroE(569)F/EphplgroEL(1142)R. The obtained PCR reaction products were checked by electrophoresis in 1,5% agarose gel. After electrophoresis for 1 hours at room temperature at 90 V and 9 mA, the obtained results were visualized using a UV transilluminator (Vilber Lourmat, Torcy, France). The purified PCR products were sent for sequencing to Macrogen Inc. (Amsterdam, The Netherlands). To determine the nucleotide sequence, the resulting chromatograms were analyzed using Sequencher 5.4.6 (http://www.genecodes.com, Genes Codes Corporation). The following programs and software packages were used in the computer analysis of the obtained sequences: ClustalX, version 1.83 (THOMPSON et al., 1997), for multiple sequence alignment in order to find changes/mutations in the studied nucleotide sequences, and to prepare data for phylogenetic analysis; BioEdit, version 7.0.5.3 (HALL, 1999), for editing aligned sequences;

MEGA, version 5.0. (TAMURA et al., 2011), for phylogenetic and molecular evolutionary analyzes using different methods and procedures and BLAST (ALTSCHUL et al., 1990), to search databases (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

The commercial NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Germany) was used for PCR to amplify the target part of DNA *B. burgdorferi.* Evidence of the presence of *B. burgdorferi* by nested PCR is carried out in two parts using two different pairs of primers in two separate reactions. In an external PCR reaction, a specific DNA fragment encoding the OspA protein of *B. burgdorferi* is amplified. The obtained PCR product serves as a mold for the internal PCR reaction in which a small part of the PCR products of the external PCR reaction is multiplied, thus increasing the sensitivity and specificity of the PCR method itself. Twenty randomly selected ear samples were screened using the nested PCR method.

Statistical analysis included descriptive statistics, frequency distribution, significance tests, and nonparametric tests: the Mann-Whitney test when two groups were tested and the Kruskal-Wallis analysis for multiple analysis. For binary and categorical variables, statistically significant differences in seroprevalence between groups were estimated using hi-square statistics for more than the two groups included and Fisher's exact test for two-way comparisons only. All seroprevalence of the sample was estimated for the whole population by calculating the standard error (SE) and the 95% confidence interval (CI 95%). To assess the strength of the association between infection and risk factors, including geographical location (counties), breed, age and sex, the prevalence ratio (PR) was calculated as well as the Odds ratio (OR) and the corresponding 95% confidence intervals. Logistic regression analysis was performed to provide valid estimates of interconnection strength between groups. Significance among the groups was taken at the 5% level ($p < 0.05$) for the two-way test. All statistical and epidemiological analyzes were performed using the software STATISTICA 12 and WinEpiscope ver. 2.

RESULTS

The rapid diagnostic SNAP® 4Dx® Plus test used to detect *Dirofilaria immitis* antigen, *Borrelia burgdorferi* antibody, *Anaplasma phagocytophilum* antibody and *Ehrlichia canis / Ehrlichia ewingii*, was positive in 30 or 16.76% (CI 95% 11.29) fox. The highest percentage of positive foxes obtained by the SNAP test was found in Karlovac County (38.45%, CI 95% 19.75 - 57.15%), and the lowest in Varaždin County (7.70%, CI 95% -6.79 - 22, 19%) ($P < 0.05$). Gender was found in 175 individuals, of which 108 or 59.78% were males and 67 or

37.43% were females, and in four individuals the sex was unknown. Of the 108 male animals searched, a total of 12.96% (N = 14, CI 95% 6.63 - 19.29%) were positive, and 22.39% of female foxes were found (N = 15, CI 95% 12), 41 - 32.38%) positive. Regarding age, a positive SNAP test was in 24 or 18.05% of foxes. The highest share of infected foxes was found in foxes of younger age groups up to one year (20.00%, CI 95% -0.24 - 40.24%) and at the age of 1-2 years (21.43%, CI 95% 10), 69 - 32.18%), while a slightly lower percentage of foxes were found in the age group of 2-3 (16.13%, CI 95% 3.18 - 29.08%) and 3-4 years (12, 50%, CI 95% -3.71 - 28.71%).

Depending on the individual causative agent, 12 or 6.70% (CI 95% 3.20 - 10.19%) positive samples for *Dirofilaria immitis* antigen were found in 18 or 10.05% (CI 95% 5.8 - 14) of the individual test was positive for antibodies to *Anaplasma phagocytophilum / A. platys,* indicating a 1.63-fold higher exposure of foxes to anaplasma compared to heartworm, but this difference was not statistically significant (P = 0.2526, $\chi 2$ = 1,309). For other vector-borne diseases tested by this test, namely *Borrelia burgdorferi and Ehrlichia canis/Ehrlichia ewingii* antibodies were not detected. In Zagreb County, a statistically significantly lower number of positive foxes for *D. immitis a*ntigen was found (1.89%, CI 95% -1.78 - 5.56%) compared to other counties (P <0.05). However, in most counties this percentage was equal and ranged from 10.53% (CI 95% -3.27 - 24.33%) (Međimurje County) to 15.39% (CI 95% 1.52 - 29, 06%) (Karlovac County) (P> 0.05). *D. immitis* was not found in Varaždin and Bjelovar-Bilogora counties. Antibodies to *A. phagocytophilum* have not been established in Krapina-Zagorje County and the City of Zagreb. In other counties, the proportion of antibodies was found to be from 4.55% (CI 95% -4.16 - 13.76%) (Požega-Slavonia) to 23.08% (CI 05% 6.88 -39.28%) Karlovac County. According to the age structure of the studied fox population in relation to the positive test result according to the causative agent, the prevalence was not statistically significant (P> 0.05). A positive result for antigen on *D. immitis* was found only in foxes of younger age groups at the age of 1-2 years (14.29%, CI 95%, 6.34 -25.50%) and 2-3 years 3.23%, CI 95%, 2.99 -9.45%) (P> 0.05). Positive result for antibodies to *A. phagocytophilum* / *A. Platys* are also in the highest percentage found in younger foxes up to four years of age.

In order to test age as a risk factor, the animals were divided into three age groups: (1) young juveniles up to 1 year or until puberty, (2) then as young adults from 1 to 3 years and (3) at population of older adult foxes aged 3 to 7 years. The results of a regression analysis showing the possible correlation of the obtained prevalence of *A. phagocytophilum / A. platys* and *D. immitis* with potential risk factors. The results show that there are differences in the exposure

of foxes to risk factors such as geographical areas, but sex and age has not established a statistically significant association.

A standard PCR method to display the target gene 5.8S-ITS2-28S rDNA filaria was performed on eight fox samples that were positive and eight fox samples that were negative for *D. immitis* antigen using the SNAP® 4Dx® Plus Test. Analysis of PCR products amplified from the target DNA of foxes that were positive for *D. immitis* antigenic SNAP® 4Dx® Plus test indicates that none of the eight samples were positive, which means that in none of the eight samples was the amplification of the investigated fragment for *D .immitis.* Also, the presence of *D. repens* and *A. reconditum* was not determined by standard PCR method. as well as the presence of possible coinfection. Molecular analysis confirmed that samples that were negative using the SNAP® 4Dx® Plus test were also negative using the standard PCR method.

The PCR method for the display of the 16S rRNA and GroEL section of the *A. phagocytophilum* genome was performed on nine fox samples that were positiv for *A. phagocytophilum* antibodies using the SNAP® 4Dx® Plus test. Analysis of PCR products amplified from DNA foxes that were been SNAP® 4Dx® Plus test positives for *A. phagocytophilum* antibodies, four of the nine samples showed a positive result, which means that in four of the nine samples was the amplification of the studied fragment for *A. phagocytophilum*.

One of the significant vector-borne diseases in domestic and wild animals is *Borrelia burgdorferi*. The rapid SNAP® 4Dx® Plus diagnostic test found no antibodies to this bacterium. In order to verify the negative results of the rapid diagnostic test, and to further assess the possible infection of wild foxes with this bacterium, a sample of all foxes was collected to prove the presence of *Borrelia burgdorferi* using the nested PCR method. The presence of *Borrelia burgdorferi* was not detected in any of the twenty randomly selected ear samples.

DISCUSSION

Conducting an epidemiological study of the prevalence of vector-borne diseases in foxes that can be detected by rapid screening SNAP® 4Dx® Plus Test used for detection of *Dirofilaria immitis* antigen, *Borrelia burgdorferi* antibody, *Anaplasma phagocytophilum / Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis /Ehrlichia ewingii* In Croatia, a total of 16.76% of positive foxes were found, of which 10.05% of foxes tested positive for antibodies to *Anaplasma phagocytophilum / Anaplasma platys*, and 6.70% of foxes were positive for

Dirofilaria immitis antigen. This means that of the total positive foxes (N = 30), the ratio of anaplasma-positive to heartworm-positive was 6:4, in 1.63 times higher exposure of foxes to anaplasma compared to heartworm, but this difference was not statistically significant (P = 0.2526, $\chi 2$ = 1.309). Although this paper does not prove a direct connection between the fox as a reservoir of anaplasmosis and heartworm for dogs, it cannot be ruled out, especially that in areas of northwestern Croatia, mutual contact is possible, foxes with dogs and other domestic animals, because habitats (hunting grounds) positive foxes, are areas near the settlement or are even within the populated area itself.

However, comparing the differences in the number of positive foxes by pathogen in individual counties, the found number of positive foxes for antibodies to *Anaplasma spp.* Species between counties was not significant (P > 0.05), while only statistically significantly lower prevalence of *D. immitis* was found in Zagreb County (1.89%) compared to other counties (P <0.05). The differences obtained can be explained by the different density of foxes in a habitat.

With regard to gender, although 1.73 times more total positive female foxes were found compared to male foxes, this difference was not statistically significant. Epidemiological analysis also revealed a slightly higher general exposure to the causative agents of vector-borne diseases in female animals. The prevalence of *D. immitis* was equal in male and female animals, but a slightly higher exposure of female animals compared to males was also found, but this difference was also not statistically significant (P = 0.1746). Approximately the same exposure was found for anaplasma, although 2.3 times more were positive for *A. phagocytophilum / A. platys* antibodies in female animals than in males (P = 0.0673).

Comparing the general prevalence as well as the prevalence by pathogens according to age structure, it is evident that the largest number of positive foxes was up to four years of age. The general prevalence ranged from 12.50% in individuals 3-4 years to 21.43% in foxes aged 1-2 years. It should also be noted that the largest number of foxes examined was at the age of 1-2 years (N = 31). Testing of the differences in proportions did not reveal a significant difference (P> 0.05). *D. immitis* was 4,23 times more established at the age of 1-2 years compared to foxes at the age of 2-3 years (3,23%) but this difference was not statistically significant (P = 0.1068). Unlike *D. immitis*, antibodies to *A. phagocytophilum / A. platys* are established in all age groups up to four years and between the ages of five and six. The lowest number of serologically positive foxes was found at the age of one to two years 4.14%, and the highest in juvenile foxes up to one year 20.00%.

Comparing the results obtained by rapid screening SNAP®4Dx® Plus test with the results of applied molecular methods, standard PCR and nested PCR method it is clear that SNAP®4Dx® Plus is highly specific because all negative results obtained by screening were confirmed as negative by molecular methods, which indicates a specificity of 100%. The positive results of antibodies to *A. phagocytophilum and A. platys* indicate an infection of the fox that resulted in the development of antibodies, although by the nested PCR method it was found in the circulation in only four positive animals out of a total of nine. This can be explained by the fact that the SNAP®4Dx® Plus test detects antibodies and is therefore useful at a later stage of infection when PCR, due to low bacteremia or after the causative agent is no longer detectable in the blood and may give negative results, which is confirmed by other authors. According to their research, SNAP®4Dx® Plus test shows high sensitivity for detection of *D. immitis* antigen by 94.1%. Compared to the autopsy findings in dogs, also confirmed the high sensitivity of the test for *D. immits* from 94.26% to 99.18%, while the specificity was lower and ranged from 83.45% to 98.75 %.

Negative PCR results of positive foxes by screening test for *D. immitis* can be explained by insufficient sample to detect the required DNA fragments in the blood and thus a small number of microfilariae. Some authors also confirm that by applying the standard PCR method, false-negative PCR test results can be obtained because they confirmed the presence of the causative agent of DNA by applying more sensitive nested PCR in the same samples.

This research represents a contribution to the research of vectors of communicable diseases of wild animals in Croatia and the results confirm the circulation of vector-borne diseases in the fox population in the researched areas. Detecting the prevalence of the disease, as well as understanding the risk factors, allow surveillance planning and are an essential prerequisite for the implementation of control programs. Therefore, these results can contribute to a better understanding of the researched diseases in Croatia and can help in the implementation of further epidemiological research and surveillance, as well as the control program, depending on the prevalence rate and risk factors.

KEY WORDS: Red Fox (*Vulpes vulpes* L.), zoonoses, SNAP® 4Dx® Plus Test, standard PCR, nested PCR, seminested PCR, *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Ehrlichia canis / Ehrlichia ewingii*,

POPIS TABLICA, GRAFIKONA I SLIKA

Ovaj rad sadrži 18 tablica, 4 grafikona i 15 slika

Tablice

Tablica 2.1. Seroprevalencija istraživanih zoonoza u divljih životinja u pojedinim zemljama

Tablica 4.1. Broj uključenih staništa (lovišta) i broj pregledanih uzoraka lisica po županijama

Tablica 4.2. Sastav PCR reakcijske smjese volumena 50 µl

Tablica 4.3. Reakcijski ciklusi PCR reakcije za umnažanje regija unutar 16S rRNA odsječka genoma *A. phagocytophilum*

Tablica 4.4. Reakcijski ciklusi PCR reakcije za umnažanje regija unutar groEL odsječka genoma *A. phagocytophilum*

Tablica 4.5. Početnice korištene u vanjskoj i unutarnjoj ugniježđenoj PCR reakciji

Tablica 4.6. Prikaz kemikalija koje čine PCR smjesu za vanjski dio ugniježđene PCR reakcije

Tablica 4.7. Prikaz kemikalija koje čine PCR smjesu za unutarnji dio ugniježđene PCR reakcije

Tablica 5.1. Broj pretraženih staništa (lovišta) i lisica u pojedinoj županiji

Tablica 5.2. Broj pregledanih i pozitivnih lisica po županijama

Tablica 5.3 Broj pregledanih i pozitivnih lisica po spolu. (N = 175)

Tablica 5.4. Broj pregledanih i pozitivnih lisica po dobi (N = 133)

Tablica 5.5. Broj pregledanih i pozitivnih lisica i procjena prevalencije vrstama *Anaplasma phagocytophilum / A. platys* i *D. immitis* u populaciji lisica u pojedinim županijama

Tablica 5.6. Broj pregledanih i pozitivnih lisica i procjena prevalencije vrstama *Anaplasma phagocytophilum / A. platys* i *D. immitis* po spolu (N = 175)

Tablica 5.7. Broj pregledanih i pozitivnih lisica i procjena prevalencije vrstama *Anaplasma phagocytophilum / A. platys* i *D. immitis* po dobi (N = 133)

Tablica 5.8. Rezultati regresijske analize procjene pozitivnog nalaza u ovisnosti o području, spolu i dobnoj strukturi

Tablica 5.9. Rezultati regresijske analize procjene izloženosti (OR) lisica dirofilariji u ovisnosti o području, spolu i dobnoj strukturi

Tablica 5.10. Rezultati regresijske analize procjene izloženosti (OR) lisica anaplazmi u ovisnosti o području, spolu i dobnoj strukturi

Grafikon

Grafikon 2.1. Slučajevi humane borelioze od 2007. do 2019.

Grafikon 5.1. Broj pregledanih i pozitivnih lisica prema nađenom uzročniku po županijama.

Grafikon 5.2. Broj pregledanih i pozitivnih lisica prema uzročnicima po spolu

Grafikon 5.3. Broj pregledanih i pozitivnih lisica prema nađenim uzročnicima po dobnoj strukturi

Slike

Slika 2.1. Crvena lisica *(Vulpes vulpes* L.*)*

Slika 4.1. Pregled istraživanih lokacija prema broju pretraženih lisica

Slika 4.2. Shema pozitivnog (lijevo) i negativnog (desno) rezultata SNAP® 4Dx® Plus testa. Pozitivan test indicira prisutnost *D. immitis* cirkulirajućeg antigena, te protutijela za *A. phagocytophilum / A. platys, B. burgdorferi* i *E. canis / E. ewingii*

Slika 4.3. Shema lančane reakcije polimerazom, PCR

Slika 4.4. Prostorija za izdvajanje DNA, Laboratorij za molekularnu dijagnostiku, Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Slika 4.5. Kabinet za pripremu PCR reakcije, Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Slika 4.6. Uređaj GenAmp System 9700 (Applied Biosystems, SAD). Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Slika 4.7. Sustav za elektroforezu PCR produkata na agaroznom gelu (SCI PLAS, UK), Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Slika 4.8. UV transiluminator s plavim svijetlom (Safe imager, Invitrogen) i kamera (Uvitec, UK), Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Slika 5.1. Pozitivni rezultat SNAP® 4Dx® Plus testa na *D. immitis* (plava točka gore)

Slika 5.2. Pozitivni rezultat SNAP® 4Dx® Plus testa na *A. phagocytophilum / A. platys* (plava točka u sredini).

Slika 5.3. Pregled pozitivnih i negativnih lisica za *D. immitis* prema lokaciji uzorkovanja

Slika 5.4. Pregled pozitivnih i negativnih lisica za *A. phagocytophilum / A. platys* prema lokaciji uzorkovanja

Slika 5.5. Prikaz filogenetskog stabla za umnožene odsječke 16S rRNA izrađenog metodom susjednog sparivanja (engl. *neighbor-joining*) uz primjenu modela Kimura-2-parametra.

Slika 5.6. Prikaz filogenetskog stabla za umnožene odsječke groEL izrađenog metodom susjednog sparivanja (engl. *neighbor-joining*) uz primjenu modela Kimura-2-parametra.

POPIS KORIŠTENIH KRATICA I ZNAKOVA

KRATICA	**ZNAČENJE**
ANkAP-2074s	početnice za *A. phagocytophilum*
ANkAP-2815s	početnice za *A. phagocytophilum*
BBA	pufer za vezivanje
BSK	Barbour-Stoenner-Kelly (hranjive podloge za izolaciju Borelia)
C6	peptidni test za identifikaciju protutijela *B. burgdorferi*
CF	memorijska kartica
CI	confidence interval, engl. (granica pouzdanosti)
CLD	pufer za staničnu razgradnju
CVBD	vektorski prenosive bolesti pasa
CWD	Column Wash Solution
DIDR-F1	prednja početnice za umnažanje *D. immitis*
DIDR-R1	stražnja početnice za umnažanje *D. immitis*
DNA	Deoxyribonucleic acid, engl. (deoksiribonukleinska kiselina)
EDTA	antikoagulans, etilendiamintetraoctena kiselina
EGA	granulocitna anaplazmoza konja
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, engl.
FVBD	vektorski prenosive bolesti mačaka, metazoonoze
gDNA	Genomic Deoxyribonucleic acid, engl
GroEL	Chaperone protein encoding gene, engl.
HGE	humana granulocitna erlihioza
HZJZ	Hrvatski zavod za javno zdravstvo
LB	Lyme-Borreliosis Group, engl.
MAYO	klinika, američki neprofitni medicinski centar
N	oznaka za ukupan broj
NK	negativna kontrola

OR	odds ratio, engl. (omjer vjerojatnosti)
Osp	Outer membrane surface proteins, engl.
OspA	Outer membrane surface protein A, engl.
OspC	Outer membrane surface protein C, engl.
P	vrijednost vjerojatnosti u statističkom testiranju hipoteza, engl, probability
pb	parova baza (base pairs, engl.)
PCR	Polymerase chain reaction, engl. (lančana reakcija polimerazom)
PR	prevalence ratio, engl. (omjer prevalencije)
rDNA	ribosomska deoksiribonukleinska kiselina
RNA	Ribonucleic acid, engl.
RT PCR	real-time PCR, engl.
SAD	Sjedinjene Američke Države
SE	standard error, engl. (standardna pogreška)
s.l.	sensu lato
SNAP 4DxPlus test	brzi dijagnostički test
spp.	oznaka za više vrsta nekog roda
s.s.	sensu stricto
SVA	Švedski veterinarski institut
TBRF	tickborne relapsing fever group, engl.
UK	United Kingdom
WOAH	World Organisation for Animal Health, prije OIE Međunarodni ured za epizootije
$\chi 2$	oznaka za hi-kvadrat test

SADRŽAJ:

1. UVOD 1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA 3
2.1. Vektorski prenosive zoonoze i njihovo značenje 3
2.1.1. *Anaplasma phagocytophilum i Anaplasma platys* 4
2.1.2. *Dirofilaria immitis* 6
2.1.3. *Borrelia burgdorferi* 8
2.1.4. *Ehrlichia canis* 9
2.2. Epidemiološko značenje lisice (*Vulpes vulpes* L.) u prijenosu zoonoza 10
2.2.1. Značenje lisice kao rezervoara i prenositeljice anaplazmoze i erlihioze 13
2.2.2. Značenje lisice kao rezervoara i prenositeljice borelioze 15
2.2.3. Značenje lisice kao rezervoara dirofilarioze 17
2.3. Epidemiološki podatci proširenosti istraživanih vektorski prenosivih zoonoza u ostalih divljih životinja 19
2.4. Epidemiološki podatci proširenosti istraživanih vektorski prenosivih zoonoza u domaćih životinja 23
2.5. Epidemiološki podatci proširenosti istraživanih vektorski prenosivih zoonoza u ljudi 25
2.6. Pregled istraživanih vektorski prenosivih zoonoza u Hrvatskoj 27
3. OBRAZLOŽENJE TEME 31
4. MATERIJALI I METODE 32
4.1. Istraživana populacija 32
4.2. SNAP® 4Dx® Plus Test 34
4.3. Lančana reakcija polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) 35
4.3.1. Izdvajanje DNA 35
4.3.2. Lančana reakcija polimerazom za umnažanje ciljnog dijela DNA *Dirofilaria immitis* 37
4.3.3. Elektroforeza PCR produkata na agaroznom gelu 39
4.4. Umnožavanje regija unutar 16S rRNA odsječka genoma *Anaplasma phagocytophilum* ugniježđenom lančanom reakcijom polimeraze 40
4.5. Umnožavanje regija unutar GroEL odsječka genoma *Anaplasma phagocytophilum* semi-ugniježđenom lančanom reakcijom polimeraze 42
4.5.1. Elektroforeza umnoženih odsječaka u agaroznom gelu 43

4.5.2. Ekstrakcija DNA (PCR-produkata) iz agaroznog gela i njezino pročišćavanje 43
4.5.3. Razdvajanje umnoženih DNA odsječaka 44
4.5.4. Otapanje izrezanog komadića gela 44
4.5.5. Vezanje umnoženog odsječka DNA za silikatnu membranu 45
4.5.6. Ispiranje silikatne membrane kolone 45
4.5.7. Izdvajanje čiste DNA (elucija) 45
4.5.8. Određivanje primarne strukture DNA (sekvenciranje) 45
4.6. Metoda lančane reakcije polimerazom za umnažanje ciljnog dijela DNA *Borrelia burgdorferi* 46
4.6.1. Izdvajanje DNA 46
4.6.2. Dokaz prisutnosti bakterije *Borrelia burgdorferi* metodom ugniježđene lančane reakcije polimerazom 46
4.7. Primijenjene epidemiološke i statističke metode 48
4.8. Računalne analize nukleotidnih sljedova 49
5. REZULTATI 50
5.1. Rezultati testiranja lisica SNAP® 4Dx® Plus Testom 50
5.2. Rezultati molekularnih istraživanja 66
5.2.1. PCR 66
5.2.1.1. Analiza PCR produkata *Dirofilaria immitis* 66
5.2.1.2. Rezultati računalnih analiza umnoženih odsječaka 16S rRNA i GroEL genoma *Anaplasma phagocytophilum* 67
5.2.1.3. Analiza PCR produkata *Borrelia burgdorferi* 70
6. RASPRAVA 71
7. ZAKLJUČCI 79
8. POPIS LITERATURE 81
9. PRILOZI 100
10. ŽIVOTOPIS AUTORA TE POPIS OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA 108

1. UVOD

Zoonoze su zarazne bolesti zajedničke ljudima i pojedinim životinjskim vrstama koje se prenose izravno ili neizravno sa životinja na ljude. Danas je poznato više od 200 zoonoza s različitim kliničkim znakovima koje zahtijevaju različit epidemiološki pristup u otkrivanju, praćenju, kontroli i suzbijanju.

Osim izravnog kontakta sa životinjom ili hranom životinjskog podrijetla, za prijenos određenog uzročnika zoonoza dovoljan je suživot u istom staništu jer se prenose i neizravno putem posrednika – vektora, najčešće krpelja ili komaraca. Vektorski prenosive bolesti zadnjih godina dobivaju sve veće značenje i predmet su istraživanja sve većeg broja znanstvenika. Promjenom ekoloških čimbenika, kao što su klimatski uvjeti, dolazi do promjene dinamike, gustoće i geografske distribucije pojedinih vrsta vektora, što rezultira češćom pojavom vektorski prenosivih zoonoza u životinja i ljudi.

Za razliku od velikog broja nevektorski prenosivih zoonoza, čiji je nadzor u većoj mjeri reguliran propisima i koje se redovito prate i prijavljuju Svjetskoj organizaciji za zdravlje životinja (eng. World Organization for Animal Health, WOAH, osnovana kao Office International des Epizooties, OIE) te Europskoj komisiji, za velik broj vektorski prenosivih bolesti nema sustavnog nadzora, ali ni dovoljno podataka o njihovoj proširenosti. To se osobito odnosi na vektorski prenosive zoonoze u divljih životinja, stoga je i uloga divljih životinja u održavanju i širenju vektorski prenosivih zoonoza nedovoljno poznata.

Divlji karnivori, a osobito crvena lisica *(Vulpes vulpes* L.*)*, česti su nositelji mnogim vektorima koji se na njima hrane. Kako vektori nisu specifični za vrstu, odnosno riječ je o istim kompetitivnim vektorima koji napadaju lisice, domaće životinje (stoku, kućne ljubimce) i ljude, može se pretpostaviti da učestalost infekcije uzročnicima vektorski prenosivih bolesti u populaciji lisica može utjecati na pojavu i širenje istih u populaciji drugih prijemčivih divljih i domaćih životinja te ljudi na određenom području. Zbog svoje široke rasprostranjenosti i načina života prilagođenog suživotu s ljudima, pa čak i u urbanim područjima, crvena lisica ima važnu ulogu u epidemiologiji vektorski prenosivih zoonoza.

Iako u Hrvatskoj postoji veći broj radova koji se bave istraživanjima vektorski prenosivih zoonoza, oni su uglavnom usmjereni na istraživanja domaćih životinja, osobito pasa. Istodobno, populacija divljih životinja, uključujući divlje kanide, još je nedovoljno istražena.

U svijetu je zabilježen sve veći porast prevalencije vektorski prenosivih zoonoza o kojima se govori kao emergentnim bolestima koje imaju javnozdravstveni učinak. Stoga procjena zdravstvenog stanja crvene lisice, odnosno spoznaja o mogućoj infekciji lisice i procjena njezine uloge u epidemiologiji vektorski prenosivih zoonoza te otkrivanje potencijalnih rizičnih područja, predstavlja doprinos u području javnog zdravstva.

Ovim se radom ponajprije želi utvrditi pojavnost i rasprostranjenost dosad neistraženih vektorski prenosivih zoonoza u lisica u Hrvatskoj i procijeniti ulogu crvene lisice u održavanju bolesti koje imaju zoonotski potencijal kao što su dirofilarioza, borelioza, erlihioza i anaplazmoza.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Vektorski prenosive zoonoze i njihovo značenje

Zoonoze su bolesti koje se prenose izravno ili neizravno sa životinja na ljude. Danas je poznato više od 200 zoonoza koje zahtijevaju različit epidemiološki pristup u otkrivanju i kontroli bolesti. Primjena epidemioloških postupaka u otkrivanju i kontroli zoonoza važan je čimbenik u području javnog zdravstva. Zoonoze možemo definirati kao bolesti i/ili infekcije koje se prirodnim načinima šire sa životinja na ljude ili s ljudi na životinje. Uzročnike zoonoza nalazimo među virusima, bakterijama, gljivicama i drugim biološkim tvarima te parazitima. Uzročnici zoonoza uglavnom se prenose hranom, ali veliki broj uzročnika zoonoza se može prenijeti kontaktom s divljim životinjama ili kućnim ljubimcima (TORGERSON i MACPHERSON, 2011.). Međutim, za prijenos nekih zoonoza potrebni su vektori pa su to vektorski prenosive zoonoze.

Za velik broj zoonoza rezervoar su divlje životinje, kod kojih često nisu vidljivi simptomi. Neke od zoonotskih bolesti koje mogu prenositi divlje životinje sustavno se nadziru, pa je učestalost infekcija nekim zoonotskim uzročnicima u divljih životinja u Hrvatskoj poznata. Međutim, za velik broj zoonoza nema sustavnih podataka o prevalenciji u divljih životinja. One vrste divljih životinja koje su češće u kontaktu s domaćim životinjama i/ili čovjekom, predstavljaju, naravno, veći rizik.

Važnost zoonoza u javnom zdravstvu očituje se u propisima koji reguliraju to područje. Najvažniji su među njima Zakon o veterinarstvu (Narodne novine broj 82/13, 148/13) i Pravilnik o načinu praćenja zoonoza i uzročnika zoonoza (Narodne novine broj 42/13). Osim toga, Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovu financiranju, svake se godine, ovisno o epidemiološkoj procjeni, donosi početkom godine za tekuću godinu. Također, putem Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, prate se i objavljuju podatci o kretanju važnijih zaraznih bolesti u ljudi, a rezultati objavljuju na kumulativnoj godišnjoj razini u Hrvatskom zdravstveno-statističkom ljetopisu (dostupno na https://www.hzjz.hr/hrvatski-zdravstveno-statisticki-ljetopis/hrvatski-zdravstveno-statisticki-ljetopis-za-2020-tablicni-podaci/). Kad je riječ o zoonozama koje se prenose vektorima, a koje se obrađuju u ovom radu (dirofilarioza, borelioza ili lajmska bolest, erlihioza i anaplazmoza),

samo za lajmsku boreliozu postoje sustavni podatci o pojavi te bolesti u ljudi, i to za razdoblje od 2007. godine pa do danas. Broj prijavljenih slučajeva u ljudi kretao se u rasponu od 266 slučajeva u 2007. godini do 473 slučaja u 2019. godini, uz znatno veći broj oboljelih (820) u 2018. godini.

Crvena je lisica (*Vulpes vulpes* L.) rasprostranjena u cijeloj Hrvatskoj te je kao lovna divljač pod stalnim praćenjem lovoovlaštenika u gotovo 1000 (984) lovišta u Hrvatskoj. Člankom 3., točkama 9. i 10. Naredbe o mjerama zaštite zdravlja životinja od zaraznih bolesti i njihovu financiranju u 2021. godini (Narodne novine broj 2/2021) od 8. siječnja 2021. godine, propisano je da su lovoovlaštenici dužni dostaviti veterinarskoj organizaciji određeni broj odstrijeljenih lisica ili čagljeva na laboratorijsko istraživanje, a u svrhu kontrole imunosti oralnog cijepljenja lisica. Broj uzoraka koje dostavlja svaki lovoovlaštenik za svako lovište propisan je posebnom Uputom o propisanom broju uzoraka. Tijekom 2018. godine, u skladu s preporukama Svjetske zdravstvene organizacije, u Hrvatskoj su provedena 3 programa vezana za važnije zoonoze koje se prenose vektorima: program utvrđivanja prevalencije *Francisella tularensis* u Republici Hrvatskoj, program praćenja proširenosti krpeljnog encefalitisa u Republici Hrvatskoj u 2018. godini, program utvrđivanja proširenosti lajmske borelioze u Republici Hrvatskoj u 2018. godini, a koja je i jedna od četiriju vektorski prenosivih zoonoza koje istražujemo u ovom radu.

2.1.1. *Anaplasma phagocytophilum* i *Anaplasma platys*

Anaplasma phagocytophilum i Anaplasma platys bakterije su koje, uz još pet vrsta (*A. bovis, A. centrale, A. marginale, A. ovis i A. odocoieili),* čine rod *Anaplasma* koji pripada porodici *Anaplasmataceae,* redu *Rickettsiales* te razredu *α*-proteobakterija (DUMLER i sur. 2001.; TATE i sur. 2013.; LI i sur. 2015.; MADISON-ANTENUCCI i sur. 2020.). Anaplazme su malene pleomorfne, gram-negativne bakterije, koje se, ovisno o vrsti, nalaze u krvnim stanicama. Za anaplazmu je karakteristična velika sposobnost prihvaćanja na različite domaće i divlje životinje, uključujući i čovjeka. Vrsta *A. phagocytophilum* prvi je put u ljudi otkrivena 1994. godine. Smatralo se da je nova vrsta erlihije u neutrofilima zbog čega je i dobila ime *Ehrlichia phagocytophilum*, uzročnik humane granulocitne erlihioze (HGE). Bakterije su nalikovale na vrstu *Ehrlichia equi*, vrstu koja je patogena za konja i za koju se znalo da ima tropizam za neutrofile. Godine 2001. *E. phagocytophilum* službeno je preimenovana u *Anaplasma phagocytophilum*. Bolest je nazvana humana granulocitna anaplazmoza. To je, uz

babeziozu, najčešća bolest koju prenose krpelji, a prouzročuje velike ekonomske gubitke te je golem javnozdravstveni problem (MADISON-ANTENUCCI i sur. 2020.).

A. phagocytophilum je uzročnik koji se prenosi krpeljima, a u kopitara, pasa i ljudi parazitira u granulocitima i izaziva bolest humanu granulocitnu anaplazmozu. Uobičajeni put prenošenja *A. phagocytophilum* je putem ugriza krpelja, a glavni je vektor u Europi krpelj vrste *Ixodes ricinus*. Epidemiološke studije u Europi ukazuju na povećan profesionalni rizik od infekcije za radnike u šumarstvu, lovce, veterinare i poljoprivrednike koji su često izloženi krpeljima u endemskim područjima. Filogenetskom je analizom utvrđeno da unutar vrste *A. phagocytophilum* postoji genetska raznolikost, i to na genima *groEL*, *ankA* i *msp4*. Osim toga, utvrđeno je da je ta raznolikost u Europi veća nego u SAD-u, a sojevi odgovorni za infekciju ljudi srodni su na oba kontinenta. Dokazano je da sojevi izdvojeni iz domaćih životinja poput konja, pasa i mačaka, te divljih životinja poput jelena (*Cervus elaphus*), divljih svinja (*Sus scrofa*) i crvene lisice (*Vulpes vulpes* L.) kao i sojevi nađeni u ježeva (*Erinaceus* spp.) imaju zoonotsko obilježje. Međutim, iako je sve veći broj radova koji opisuju genetsku varijabilnost vrste *A. phagocytophilum*, još je nedovoljno podataka za razumijevanje geografske distribucije i prijemčivosti domaćina na pojedine sojeve, te je nedovoljno istražena povezanost patogenosti i infektivnosti među sojevima kad je riječ o različitim vrstama domaćina (MATEI i sur. 2019.).

Humana granulocitna anaplazmoza dokazana je u 39 zemalja svijeta, ali i u Hrvatskoj. Primarni su rezervoari glodavci, a prenosi ih krpelj *I. ricinus* kojemu je stanište šuma i ruralna sredina (MATEI i sur. 2019.).

Anaplasma platys u pasa prouzročuje cikličku trombocitopeniju, a prenosi je krpelj *Rhipicephalus sanguineus*. Bolest karakterizira petehijalno krvarenje sluznice usta i zubnog mesa. Uglavnom se pojavljuje u subkliničkom obliku, samo katkad popraćena blago povišenom temperaturom i hematohezijom pa vrijeme inkubacije nije poznato. U infekcija prouzročenih virulentnijim sojevima mogu se pojaviti različiti nespecifični simptomi kao što su upala srednje očne ovojnice, blijeda sluznica, petehijalna krvarenja kože i sluznice usne šupljine, visoka temperatura, letargija, smanjen apetit i gubitak tjelesne mase (MADISON-ANTENUCCI i sur. 2020.).

Bolesti prouzročene vrstama *A. phagocytophilum i A. platys* mogu katkad proći u blagom obliku, no mogu se pojaviti i akutni simptomi poput visoke tjelesne temperature, anoreksije, proljeva i povraćanja. Nakon ugriza krpelja mikroorganizmi u obliku fagosoma ulaze u stanice

nositelja, razmnožavaju se dvojnom diobom te stvaraju morule. Raspadanjem mrtve stanice nositelja uzročnik se oslobađa u periferni krvotok i invadira druge krvne stanice (granulocite ili trombocite, ovisno o vrsti). Smatra se da je potrebno između 36 i 48 sati nakon prihvaćanja krpelja da bakterija uđe u organizam nositelja. Nakon raspada krvnih stanica kao što su neutrofili, bakterije putem periferne krvi odlaze u tkiva, primjerice u jetru, koštanu srž i slezenu. Inkubacija traje od 7 do 14 dana nakon ugriza krpelja. Akutna faza može proći asimptomatski ili se mogu pojaviti blagi simptomi koji mogu trajati jedan ili više dana, primjerice temperatura, letargija, anoreksija, bolovi u mišićima, poliartritis i otežano kretanje. Katkad se pojavljuju i povraćanje i proljev, kašalj, ubrzano disanje te ataksija, grčevi i mentalna tupost. Subakutna ili kronična faza nije opisana. Dijagnostika anaplazmoze temelji se na anamnezi, epidemiološkim podatcima i kliničkoj slici, a provodi se s pomoću hematocitometrijskih, hematološko-biokemijskih analiza mikroskopske pretrage obojenog krvnog razmaza (morula u citoplazmi neutrofilnog granulocita) te serološkim i molekularnim metodama. Diferencijalno dijagnostički treba isključiti erlihiozu, boreliozu i babeziozu. Sumnju na anaplazmozu uputno je postaviti u životinja koje pokazuju simptome općeg akutnog stanja kao što je visoka temperatura, i to ako se nalaze u endemičnom području lajmske bolesti koje je često endemično područje i za anaplazmozu zbog prisustva istog vektora. Rano otkrivanje bolesti omogućava bolju prognozu kad je riječ o njezinu razvoju (MATEI i sur. 2019.).

2.1.2. *Dirofilaria immitis*

Vrsta *Dirofilaria immitis* oblić je koji parazitira u većeg broja životinja, mesoždera kanida i felida, kao i kod čovjeka (MORCHON i sur. 2022.). *D. immitis* je oblić sa zoonotskim potencijalom uzročnik pseće kardiovaskularne (srčane) dirofilarioze (pseći srčani crv), dok *Dirofilaria repens* parazitira ispod kože tj. u potkožnom i vezivnom tkivu gdje stvara čvoriće, a može se naći i u području oka, ispod očne spojnice. U razvoju dirofilarija sudjeluju komarci iz porodice *Culicidae.* Komarac unese mikrofilarije (L1) tijekom hranjenja na nositelju, koje potom migriraju u Malpighijeve tubule gdje se presvlače u drugi (L2) i treći (L3) larvalni stadij kojeg inokulira ženka komarca tijekom hranjenja. Razvoj u komarcu traje 10-14 dana ovisno o temperaturi i vlazi zraka. Ubodom komarca, odnosno tijekom njegovog hranjenja, invazijska larva bude inokulirana u potkožno tkivo konačnog nositelja gdje se razvija i presvlači u larvu četvrtog (L4) i petog (L5) stupnja i migrira do pulmonalnih arterija, srca i pluća gdje postaje adult, odnosno gdje spolno sazrije i oplođene ženke *D. immitis* započinju polagati mikrofilarije (L1). Prepatentno razdoblje u pasa obično je šest do devet mjeseci. Adulti žive pet do sedam

godina. Odrasla ženka *D. immitis* može narasti do 31 cm, a *D. repens* do 17 cm. Mužjaci su upola manji. Mikrofilarije u krvi dugačke su oko 300 mikrometara, (WIKERHAUSER i BRGLEZ, 1996.), a u krvi se nalaze i do tri godine. *D. immitis* je potvrđena i u crvenih lisica u Slovačkoj (HURNIKOVA i sur. 2015.), Srbiji i Makedoniji (ĆIROVIĆ i sur. 2014.) te u Italiji (MAGI i sur. 2008.). Spomenuti autori upućuju na to da crvena lisica u prirodi služi kao rezervoar za domaće životinje i ljude. Usto, ukazuju i na potrebu daljnjih istraživanja tih uzročnika, i to osobito u područjima gdje je lisica češće u kontaktu s čovjekom i psima.

Dirofilarioza, iako se javlja u ljudi zapravo slučajno, značajna je vektorski prenosiva zoonoza koju uzrokuju i *D. immitis* i *D. repens,* no *D. repens* ima značajniji zoonotski potencijal i javnozdravstveni interes. Invadirani ljudi s *D. immitis* često ne pokazuju kliničke znakove i stoga ostaje neprepoznata (RIEBENBAUER i sur. 2021.). U Japanu su, među 24 slučaja humane plućne dirofilarioze, čak u 83 % pacijenata nađeni samo povećani limfni čvorovi (MIYOSHI i sur. 2006.).

Promjene kod invadiranih životinja prouzrokuju odrasli nametnici *D. immitis,* a izazivaju kliničke simptome ponajprije zbog smetnji u cirkulaciji. Može doći do endokarditisa na srčanim zaliscima, a uginuli nametnici mogu izazvati plućnu emboliju. Paraziti mogu izazvati dugotrajan kašalj, iskašljavanje krvi i tresavicu. Bolest se manifestira kliničkim simptomima kardiovaskularne disfunkcije te nalazom odgovarajućih mikrofilarija u krvi. Dirofilariozu se dijagnosticira dokazom cirkulirajućeg antigena u krvi/plazmi/serumu koji potječe od odraslih ženki, a mikrofilarije iz krvi nakon hemolize testom po Knottu, katkad filtracijskim testom ili PCR-om (WIKERHAUSER i BRGLEZ, 1996.; PEKACZ i sur., 2022.).

2.1.3. *Borrelia burgdorferi*

Borrelia burgdorferi jest gram-negativna zavojita bakterija (spiroheta), uzročnik lajmske borelioze ili lajmske bolesti. Rod *Borrelia* spp. sadržava 42 vrste borelija koje su razvrstane u tri skupine: 21 vrsta koja prouzročuje groznicu koja je posljedica ugriza krpelja (engl. *tickborne relapsing fever group*, TBRF), 20 vrsta koje prouzročuju lajmsku bolest ili boreliozu (engl. *Lyme-Borreliosis Group,* LB) i jedna vrsta (*B. turcica*) koja prouzročuje bolest u gmazova. *Lyme-Borreliosis* (LB) skupina dijeli se nadalje u dvije skupine: *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (s. s.) koja je ponajprije uzročnik bolesti u ljudi te *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s. l.). koja lajmsku bolest prouzročuje i u ljudi i u životinja. Rezervoari vrste *Borrelia burgdorferi* u Europi ponajprije su europski jež (*Erinaceus europaeus*), voluharice i miševi (*Clethrionomys glareolus, Apodemus sylvaticus, Apodemus flavicollis*), ali mogu biti i domaće (goveda, konji, psi) i divlje životinje, npr. crvena lisica (*Vulpes vulpes* L.) te sobovi (*Rangifer tarandus*). Širenje vrste *B. burgdorferi* vezano je za ciklus vektora iz roda *Ixodes* spp. (WOAH, 2021.).

Lajmska je bolest prvi put opisana u ljudi u mjestu Old Lyme (Connecticut, SAD) 1975. godine kad je epidemiološkim istraživanjima utvrđena visoka incidencija reumatoidnog artritisa u djece koja su ujedno imala eriteme na mjestu uboda krpelja, a uzročnik je izdvojen i potvrđen 1981. godine. Za dijagnostiku vrste *B. burgdorferi* rabe se postupci lančane reakcije polimerazom (*polymerase chain reaction*, PCR), primjenjuje se, također, imunofluorescencija u tamnom polju, kao i izdvajanje bakterije na hranjivim podlogama (Barbour-Stoenner-Kelly, BSK), a primjenjuje se i metoda bojenja po Giemsi te postupak impregniranja solima srebra. Od seroloških postupaka za dokaz protutijela primjenjuje se postupak indirektne imunofluorescencije, ali i ELISA postupak te uporaba monoklonskih protutijela za serotipizaciju i prepoznavanje OspA i OspC proteina ovojnice kao i C6 peptidni test za identifikaciju protutijela *B. burgdorferi* u pasa (WOAH, 2021.). Vektor je krpelj *Ixodes ricinus*, najzastupljeniji u Europi. Mogu je prenositi i krpelji roda *Argas i Ornithodoros*. Krpelji se mogu inficirati već u larvalnom stadiju. Uzročnik cirkulira u prirodi između krpelja *Ixodes ricinus* i velikog broja rezervoara, tj. životinja kao što su glodavci, ptice i kućni ljubimci, a infekcija nastaje nakon ugriza krpelja koji je inficiran bakterijom *B. burgdorferi.* Smatra se endemskom bolesti u sjeveroistočnim i nekim drugim područjima SAD-a. U Hrvatskoj se prirodna žarišta nalaze uglavnom u kontinentalnom dijelu zemlje, osobito u područjima između Save i Drave. Bolest, dakako, ovisi o raširenosti krpelja *Ixodes* spp. Područja s visokom vlagom i gustom vegetacijom pružaju dobre uvjete za razvoj krpelja. Sezonska incidencija kliničke slike vezana

za pojavu krpelja obično je u ožujku i travnju te u rujnu. Nositelji i rezervoari bakterije najčešće su sitni glodavci, ježevi, gušteri i ptice. Infekcije u sitnih glodavaca ne prouzročuju kliničku sliku ni patološke promjene. Ptice selice mogu pridonijeti širenju infekcije. Bakterija se zadržava u crijevu krpelja odakle dospijeva u slinsku žlijezdu i u prijemčiva nositelja. Širi se po nositelju i naseljava zglobove, mozak, živce, oči i srce te dovodi do multisistemske upale. Bolest je uglavnom subklinička, a klinički je izražena u inficiranih kanida kao vrućica, letargija, artritis te bubrežni, srčani i živčani poremećaji. Bolest se može utvrditi i putem anamnestičkih podataka o izloženosti i ubodu krpelja te nespecifičnih kliničkih znakova. Potvrđuje se izdvajanjem uzročnika i uzgojem iz pojedinih tkiva ili tekućina, krvi, cerebrospinalne tekućine, sinovijalne tekućine, urina ili kolostruma. Katkad se uzročnik vidi mikroskopom na tamnom vidnom polju. Serološki se dokazuje neizravnom imunofluorescencijom, imunoenzimskim testom i Western blot postupkom. Točnije se bolest može utvrditi u klinički i subklinički zaraženih kanida, dokazom C6 ELISA tehnologijom. SNAP 4DxPlus test otkriva protutijela koja se proizvode samo kao infekcija bakterijom *B. burgdorferi*. (MADISON-ANTENUCCI i sur. 2020.).

U velikom dijelu Europe u životinja je endemično prisutna, a u ljudi se često manifestira kao neuroborelioza (KAISER 1998.; HENNINGSSON i sur. 2010.), a izvor infekcije jesu sentinel životinje (DUNCAN i sur. 2004.). BATINAC i sur. 2007. godine svojim istraživanjima utvrđuju povezanost infekcije bakterijom *B. burgdorferi* s etiologijom multiple skleroze.

2.1.4. *Ehrlichia canis*

Ehrlichia canis je kao i druge vrste erlihije (*Ehrlichia equi, Ehrlichia chaffeensis, Ehrlichia ewingii, Ehrlichia muris* subsp. *Eauclairensis*) gram-negativni obligatno intracelularni mikroorganizam iz roda *Rickettsia* (svrstan u zaseban rod 1932. godine), reda *Rickettsiales*, porodice *Anaplasmataceae*. Vrsta *E. canis* primarno je patogena za pse i kanide pa se ne smatra patogenom za čovjeka i ne predstavlja za njega rizik. Jedina realna opasnost za čovjeka jest boravak u području gdje ima krpelja koji prenose nekog uzročnika humane erlihioze. Bolest prouzročena vrstom *E. canis* – monocitna erlihioza ili tropska pseća pancitopenija – bolest je za koju je osobito karakterističan nalaz jake leukopenije i trombocitopenije. Dokazana je u mnogim državama svijeta pa tako i u Hrvatskoj. Prenosi se krpeljima vrste *Rhipicephalus sanguineus* u kojima se uzročnik razmnožava. Krpelj se zarazi hraneći se krvlju psa koji je u akutnoj fazi bolesti. Nakon hranjenja ženka krpelja izleže više od 5000 jajašaca. Uzročnik se prenosi transstadijski, transovarijalno, pa su krpelji inficirani u

svakom od njih – u stadiju larve, nimfe i odrasle jedinke. Pretpostavka je da je u prosjeku potrebno da krpelj uzima krv u trajanju od 24 do 48 sati kako bi prenio uzročnika na nositelja. Krpelj se može zaraziti samo u akutnoj fazi bolesti koja ne traje dulje od dva tjedna. Proširenost bolesti podudara se s rasprostranjenosti krpelja vrste *Rhipicephalus sanguineus* kao rezervoara. Patogeneza se temelji na imunopatološkim reakcijama i djelovanju endotoksina. Infekcija se očituje jakom invazijom parenhimatoznih organa s perivaskularnim nakupljanjem plazma-stanica u plućima, moždanim ovojnicama, slezeni i bubrezima. Limfociti razaraju vlastite monocite; riječ je o tipičnom nalazu jake leukopenije i trombocitopenije. Dokazano je da serum inficiranih pasa sadržava topljivi faktor koji koči migraciju trombocita. U inficiranih životinja bolest se pojavljuje u akutnom, subakutnom i kroničnom obliku. Akutna faza traje od 8 do 20 dana nakon ugriza, a simptomi su temperatura viša od 40 °C, letargija, anoreksija, konjunktivitis, povećanje limfnih čvorova i splenomegalija. Većina pasa preživi akutni napad, a nakon 2 – 4 tjedna bolest prelazi u subklinički oblik. Može trajati mjesecima i godinama uz promjene samo u krvnoj slici. U pasa sa zdravim imunološkim sustavom uzročnik se eliminira iz organizma, a u onih drugih prelazi u kroničan oblik čiji su simptomi letargija, gubitak tjelesne mase, upala šarenice, artropatije, nefropatije, neurološke smetnje, opsežna krvarenja sluznica, seroza i kože, edemi i iscrpljenost. Dijagnoza se postavlja nalazom tamnoljubičasto obojenih kokoidnih bakterija (morula) u citoplazmi monocita i limfocita, i to u krvnim razmazima obojenim postupkom po Giemsi. Imunološka dijagnoza provodi se dokazom protutijela u krvnom serumu oboljelih životinja s pomoću indirektne imunofluorescencije, a metodom lančane reakcije polimerazom identificira se DNA specifična za *E. canis* u biološkom uzorku, najčešće krvi. Za borbu protiv bolesti najbolje je kanide tretirati protiv krpelja prije sezone njihove aktivnosti, proizvodima koji se dobro podnose, dugo traju i sadržavaju učinkovite repelente protiv krpelja tijekom cijelog razdoblja njihove aktivnosti (MADISON-ANTENUCCI i sur. 2020.).

2.2. Epidemiološko značenje lisice (*Vulpes vulpes* L.) u prijenosu zoonoza

Crvena lisica *(Vulpes vulpes* L.*)* svrstana je u razred sisavaca (*Mammalia*), podrazred pravih sisavaca (*Theria, Eutheria*), kohortu grabežljivaca (*Ferungulata*), nadred zvijeri (*Ferae*), red mesoždera (*Carnivor*a), porodicu pasa (*Canidae*) te rod lisica (ANDRAŠIĆ, 1984.). Osim lisice u red mesoždera ili karnivora svrstavaju se i vuk i čagalj. Lisica je u Europi najrašireniji divlji predstavnik porodice pasa i najviše geografski raširen pripadnik reda

mesoždera. Lisica je u prosjeku dužine oko 80 cm, visine do 50 cm te ima do 40 cm dugačak kitnjast rep. Teška je od 6 do 10 kg. Pari se jedanput na godinu, najčešće u siječnju ili veljači. Nosi između 50 i 52 dana, a okoti od tri do osam (12) štenaca. Ima šest sisa, mladi su slijepi otprilike 12 – 14 dana. Hrani se u najvećoj mjeri sitnim glodavcima, manje sitnom divljači, lanadi, peradi. Često se hrani i pronađenim strvinama, jajima, a u određeno doba godine i voćem, biljem i biljnim plodovima. Provodi izvjesnu sanitarnu preventivnu mjeru u staništima jer se često hrani ranjenom, zakržljalom ili uginulom divljači. Živi pojedinačno, osim u vrijeme parenja i dok vodi mlade, kad u podzemnim nastambama (jamama) brigu o mladima vodi ženka, a mužjak donosi hranu. Jedini prirodni neprijatelj lisice je vuk.

Životinja je sumraka, a aktivna je cijelu noć. U Hrvatskoj su lisice Zakonom o lovstvu (NN 99/2018, 32/2019, 32/2020) određene kao divljač. Za nju nema lovostaja osim za ženku koja je visoko bređa i koja vodi mlade. Radi zaštite divljih životinja i biološke raznolikosti, ni lisica se ne smije izlučivati iz lovišta ispod broja kojim je određen biološki minimum – jedna lisica na tisuću hektara lovne površine.

Slika 2.1. Crvena lisica *(Vulpes vulpes* L.*)*
(Izvor: http://www.zec-porec.hr/uploads/pics/crvena_lisica.jpg

Osim što je najbrojnija, lisica je i najčešći prijenosnik raznih bolesti. Širenje ljudskih naselja i povećane rekreativne aktivnosti, kao i povećanje brojnosti lisica, potencijalno povećavaju mogućnost kontakata s domaćim životinjama i čovjekom, a time i rizik od širenja određenih uzročnika bolesti. Poznato je da je lisica u Europi, pa tako i u Hrvatskoj, najveći rezervoar i prijenosnik virusa bjesnoće, a ima važnost i za Aujeszkijevu bolest, parazitoze –

invazije trakavicama, trihineloze, toksokaroze, ankilostomoze, krenozomoze (juvenilne lisice) te šugu. Međutim, povremena istraživanja ukazuju na lisicu kao na potencijalni izvor i rezervoar i nekih drugih uzročnika zoonoza kao što je leptospiroza koja predstavlja velik javnozdravstveni problem (LEVETT, 2011.). MILAS i sur. (2006.) pregledom 59 uzoraka seruma crvene lisice s područja sjeverozapadne Hrvatske tijekom 2000. godine na protutijela za 12 serovara bakterije *Leptospira* spp. utvrdili su 34 (57,6 %) serološki pozitivne lisice te su istaknuli potrebu za daljnjim istraživanjima leptospiroze u lisica. Osim toga, istaknuli su i važnost utvrđivanja njezine uloge u očuvanju prirodnih žarišta. SLAVICA i sur. (2011.) utvrdili su postojanje 33,8 % (N = 358) serološki pozitivnih lisica na području kontinentalne Hrvatske uključujući 37 lovnih područja. Ta istraživanja ukazuju na prisutnost leptospira u populaciji lisica u Hrvatskoj i na potrebu sustavnog istraživanja te bolesti u populaciji lisica. Usto, potrebno je napraviti i procjenu u kojoj je mjeri upravo ta bolest rizičan čimbenik u ruralnim i suburbanim područjima.

Važna zoonoza koja je posljednjih godina potvrđena u crvene lisica jest i tuberkuloza. MILLAN i sur. (2008.) uočili su u odraslih lisica povećane limfne čvorove i tuberkulozne granulome u plućima te potvrdili prisutnost mikobakterija kompleksa *Mycobacterium tuberculosis* kao i *Mycobacterium bovis*. To je prvo izvješće o generaliziranoj tuberkulozi u obitelji divljih kanida, a što upućuje na veliko značenje lisice i u mogućem prijenosu te zoonoze.

Uloga lisice razmatrana je u širenju emergentnih i re-emergentnih zaraznih bolesti (EBANI i sur., 2022.), ali i vektorski prenosivih bolesti iako do danas nije u potpunosti razjašnjena značajnost lisice kao rezervoara vektorski prenosivih bolesti. Iako su molekularne i imunološke metode pridonijele poboljšanju otkrivanja tih bolesti u domaćih, tako i divljih životinja, uključujući i lisice, one ostaju i dalje nedovoljno istražene, što otežava procjenu opsega problema, tim više što su prevalencija i incidencija tih bolesti u korelaciji s promjenom populacije vektora, a koja opet ovisi i o klimatskim promjenama (MADISON-ANTENUCCI i sur. 2020.). No, zbog njene velike rasprostranjenosti, prilagodbe i prijemljivost na veliki broj uzročnika bolesti, koristi se kao sentinel vrsta, koja može upozoriti na promjene u ekosustavu, bilo da se radi o klimatskim promjenama, onečišćenju okoliša ili pojavi nekih uzročnika bolesti, posebno ako se radi o emergentnim i re-emergentnim bolestima. Stoga upravo kontrola lisica u nekom ekosustavu, može doprinijeti kontroli bolesti odnosno sprječavanju širenja i iskorijenjivanju bolesti u nekom ekosustavu. Stoga se njezina uloga kao potencijalnog rezervoara vektorski prenosivih bolesti razmatra i sa stajališta javnog zdravstva i u kontekstu strategije *Jedno zdravlje* (MADISON-ANTENUCCI i sur. 2020.; GARCES i PIRES, 2021.).

2.2.1. Značenje lisice kao rezervoara i prenositeljice anaplazmoze i erlihioze

Crvena je lisica (*Vulpes vulpes* L.) prepoznata kao potencijalni rezervoar navedenih zoonoza na domaće životinje, osobito pse, ali i ljude. Bakterije *Anaplasma platys* i *Ehrlichia canis* te protozoa *Leishmania infantum* prvi su put dokazane u populaciji crvene lisice u Portugalu. Umjerena prevalencija vrste *A. platys* potvrđuje nam činjenicu da crvena lisica ima određenu ulogu u epidemiologiji infekcija kao rezervoar bakterija za domaće pse (CARDOSO i sur. 2015.). DUMITRACHE i sur. (2015.) ukazuju na važnost crvene lisice kao rezervoara vrsta *Anaplasma phagocytophilum* i *Borellia burgdorferi* te ističu njezinu važnost u području javnog zdravstva. Prvi je put provedeno utvrđivanje prisutnosti vrste *Anaplasma phagocytophilum* u crvene lisice i rakunskog psa u pokrajini Brandenburg u Njemačkoj. PCR testiranjem *A. phagocytophilum* potvrđena je u 10 od 122 (8,2 %) crvene lisice i u 3 od 13 (23 %) rakunskog psa (HÄRTWIG i sur. 2014.).

HODŽIĆ i sur. (2015.) utvrdili su, također, da crvena lisica predstavlja potencijalnu opasnost za neke zoonotske uzročnike kao što su *Babesia* spp., *Hepatozoon canis, Anaplasma* spp., *Bartonella* spp., *Ehrlichia canis, Rickettsia* spp., i to za domaće pse i čovjeka u Bosni i Hercegovini.

HORNOK i sur. (2013.) proveli su istraživanje utvrđivanja prisutnosti bakterija *Ehrlichia canis* i *Rickettsia massiliae* u krpeljima porodice *Ixodes* na divljim kanidima južne Mađarske gdje je utvrđeno da crvena lisica igra glavnu ulogu u prijenosu pseće erlihioze.

TOLNAI i sur. (2015.) istraživali su rasprostranjenost vrste *A. phagocytophilum* u populaciji lisica u Mađarskoj te utvrdili prevalenciju od 12,5 %, a SRETER i sur. (2004.) prvi su put uočili vrstu *A. phagocytophilum* za koju su utvrdili da je najvažniji patogen koji prenose krpelji u Mađarskoj i istočnoj Europi s domaćih i divljih životinja na ljude.

MAIA i sur. (2015.) istraživali su bakterije i protozoe kao uzročnike vektorski prenosivih bolesti u krvi domaćih pasa i pasa lutalica u Portugalu te utvrdili, među ostalim, prisutnost *Anaplasma* spp. i *Ehrlichia* spp. u 1,9 % lisica. ALMEIDA i sur. (2013.) utvrdili su prisutnost *Ehrlichia* spp. u 10,3 % lisica u Brazilu. Također, u Italiji je u 16,6 % lisica utvrđena prisutnost *E. canis* (EBANI i sur. 2011.). KALINOVA i sur. (2009.) opisali su erlihiozu i anaplazmozu kao zoonoze u ljudi koje su utvrđene serološkim testiranjem, dokazivanjem

protutijela, imunofluorescencijom (IFA), PCR metodom te mikroskopskom pretragom bojenim po Giemsi.

LOFTIS i sur. (2006.) u Egiptu su utvrdili prisutnost vrsta *Anaplasma* spp. i *Ehrlichia* spp. u krpelja roda *Ixodes* skinutih s domaćih i divljih životinja, a FISHMAN i sur. (2004.) utvrdili su protutijela za *E. canis* IFA metodom u 36,0 % te ELISA metodom u 24,0 % pretraženih lisica. GROEN i sur. (2002.) dokazali su pretragom krvnog seruma febrilnih pacijenata PCR metodom erlihiozu u ljudi koji su bili u kontaktu s divljim životinjama u razdoblju od 1992. do 1999. godine u Nizozemskoj. ALEXANDER i sur. (1994.) dokazali su serološkim metodama *E. canis* u 2,0 % šakala. Serološkim je metodama dokazana erlihioza u Švicarskoj u 2,80 % lisica (PUSTERIA i sur. 1999.).

JAHVARI i sur. (2014.) također su u Nizozemskoj proveli istraživanje cirkulacije *A. phagocytophilum* u europskom ekosustavu na 6000 krpelja iz roda *Ixodes*, skinutih s divljih i domaćih životinja, pri čemu su PCR metodom utvrdili DNA uzročnika na svim uzorcima.

VICHOVA i sur. (2014.) istraživali su krpelje zaražene vrstom *A. phagocytophilum* i njihove rezervoare u Slovačkoj, a utvrđena je prisutnost u 8,16 % ovaca te 10,75 % glodavaca. U Italiji je provedeno istraživanje prisustva vrsta *Anaplasma* spp. i *Ehrlichia canis* na 110 buha skinutih sa 13 lisica gdje je utvrđena prevalencija vrste *Anaplasma* spp. od 25,0 % te *Ehrlichia canis* od 31,0 % (TORINA i sur. 2013.).

KARBOWIAK i sur. (2009.) u Poljskoj su na 111 lisica utvrdili 2,7 % zaraženih bakterijom *A. phagocytophilum*. GABRIEL i sur. (2009.) u sjeverozapadnoj su Kaliforniji proveli istraživanje infekcije sive lisice bakterijom *A. phagocytophilum* te utvrdili na uzorku od 70 lisica da njih 36 (51,0 %) ima protutijela za *A. phagocytophilum*, a PCR metodom utvrđeno je da je šest lisica ili njih 9,0 % pozitivno. Također, HULINSKA i sur. (2004.) od 419 pregledanih životinja utvrdili su *A. phagocytophilum* PCR metodom u 37 životinja, u 15,0 % domaćih životinja te 6,0 % divljih. CABELLO i sur. (2013.) i DUSCHER i sur. (2014.) pretragom krvi PCR metodom nisu dokazali prisutnost *Anaplasma* spp. i *Ehrlichia* spp u pretraženih lisica. MASCAREL i sur. (2015.) u Kanadi iste uzročnike našli su u samo dvije od 28 pregledanih lisica.

Rezultati molekularnih analiza koje su provedene u Rumunjskoj (DUMITRACHE i sur. 2015.) na ukupno 353 uzorka tkiva lisica pokazala su da ih je samo devet bilo pozitivno na uzročnike iz porodice *Anaplasmataceae*. Primjenom specifičnih početnica za umnožavanje vrsta *A. phagocytophilum* i *A. platys,* devet uzoraka (2,5 %) bilo je pozitivno na *A. phagocytophilum*. Svi uzorci bili su negativni na *A. platys.* Iako su u zemljama na području Europe istraživanja pojavnosti i prevalencije za obje vrste uzročnika u lisica vrlo rijetka, postoje podatci u nekim zemljama o njihovoj prevalenciji. U studijama koje su provedene u Austriji (DUSCHER i sur. 2014.) te Bosni i Hercegovini (HODŽIĆ i sur. 2015.) primjenom molekularnih metoda nije utvrđena nijedna pozitivna lisica. U istraživanju koje je provela HÄRTWIG sa svojim suradnicima (2014.) po prvi je put utvrđena prisutnost uzročnika *A. phagocytophilum* u plućnom tkivu lisica i rakunskih pasa. Osim u tkivu pluća moguće je uzročnika utvrditi i u drugim tkivima i organima ovisno o procesima autolize koji u većoj ili manjoj mjeri imaju utjecaj na degradaciju DNA uzročnika. Isti autor upotrebljava real-time PCR kako bi utvrdio prisutnost vrste *A. phagocytophilum* u 10 od ukupno 122 proučavane lisice.

2.2.2. Značenje lisice kao rezervoara i prenositeljice borelioze

Pozitivnu korelaciju seroprevalencije borelioze u pasa i pojave borelioze u čovjeka utvrdili su i JOHNSON i sur. (2004.). ISOGAI i sur. (1994.) izdvojili su spirohete *B. burgdorferi* i *B. afzelii* iz uzoraka rana na koži, iz mozga, srca, bubrega i jetre crvene lisice na području grada Sapporo u Japanu. FEDOROVA i sur. (2014.) izdvojili su 167 krpelja skinutih sa životinja iz okolice San Francisca s uzročnikom *B. burgdorferi* od ukupno 218 pregledanih krpelja. Koinfekciju sive vjeverice i drugih glodavaca bakterijama *B. burgdorferi* i *A. phagocytophilum* istraživali su NIETO i sur. (2010.) te dobili pozitivne PCR i serološke nalaze u 16 jedinki na *B. burgdorferi* te u 11 jedinki na *A. phagocytophilum.* BORETTI i sur. (2009.) proveli su PCR metodom molekularno istraživanje infekcije pasa, ljudi i lisica bakterijom *Rickettsia helvetica* te krpelja iz roda *Ixodes*. Proučavali su 884 psa, 58 lisica, 214 ljudi i 2073 krpelja te je utvrđeno 17 krpelja pozitivnih na *R. helvetica,* dok u krvi ispitanika nije utvrđena prisutnost rikecije. Navodi se da je opisano PCR testiranje važan alat u dijagnostici i za proučavanje te bolesti. U Španjolskoj su ESTRADA-PEÑA i sur. (1995.) utvrdili prevalenciju vrste *B. burgdorferi* u razdoblju od dvije godine u dvjema ekološki različitim pokrajinama na krpeljima. Također, utvrdili su prevalenciju vrste *B. burgdorferi* u endemičnom području na 51,0 % nimfa i 14,0 % adulta, a u slobodnim područjima na 28,0 % nimfa te 30,0 % adulta.

HEIDRICH i sur. (1999.) pretražuju kožu crvene lisice na prisutnost vrste *B. burgdorferi* s pomoću PCR metode gdje utvrđuju 7,0 % inficiranih te uzgajaju bakterije na *tryptose agaru* gdje utvrđuju nepokretne spirohete u 26,0 % uzoraka.

MASUZAWA i sur. (1996.) uspoređuju OspA serotip za *B. burgdorferi sensu lato* klasificiranim sa 16 monokloniranih protutijela s krpelja, ljudi i divljih životinja, te zaključuju da nisu mogli utvrditi prisutnost *B. burgdorferi* u Japanu, da je izolirana *B. afzelii* usko povezana s onom koja je utvrđena u Europi te da je *B. garinii* izolirana u Japanu vrlo raznolika i naizgled različita od one izolirane u Europi. DOBY i sur. (1991.) utvrđuju prisutnost spiroheta *B. burgdorferi* u divljih mesoždera pretražujući serološkom izolacijom serum u 372 lisice, četiri rakunska psa i dva risa. Znatna seropozitivnost bila je izražena u starih lisica obaju spolova, i to u 42,86 % slučajeva, a u mladih lisica u 12,77 % slučajeva. DOBY i sur. (1992.) istražuju utjecaj upotrebe cirkulirajućeg antigena dobivenog od raznih linija vrste *B. burgdorferi* u dijagnozi lajmske borelioze u životinja pasivnom hemaglutinacijom krvi i seruma na uzorku od 723 životinje te utvrđuju 189 seropozitivnih ili njih 26,14 %. Dvije godine poslije DOBY i sur. (1994.) utvrdili su inficiranost krpelja skinutih sa 74 jelena, 54 divlje svinje, tri lisice te 1400 ektoparazita primjenjujući indirektnu imunofluorescenciju (IMF) te je utvrđeno 3,7 % pozitivnih uzoraka u vrste *I. ricinus*, u roda *Dermacentor* bilo ih je 2,3 %, u roda *Haemaphysalis* bio je jedan pozitivan, a u vrste *I. hexagonus* dva pozitivna uzorka. WODECKA i sur. (2022.) ukazali su na povezanost crvene lisice u održavanju *Borrelia burgdorferi sensu lato* infekcije u središnjoj Poljskoj. Ukupno je 1583 krpelja uklonjeno s ušiju 120 zaraženih životinja. Od ukupno 943 krpelja u 32,4% potvrđen je DNA borelije i identificirano je 10 vrsta iz kompleksa *B. burgdorfer*i *sensu lato*. *Borrelia garinii* i *B. afzelii* činile su 70% svih infekcija. Ostalih osam vrsta uključivalo je *B. americana, B. bissettiae, B. burgdorferi sensu stricto, B. californiensis, B. carolinensis, B. lanei, B. spielmanii* i *B. valaisiana*. Analiza tkiva 243 lisice pokazala je da je 23,5% lisica zaraženo bakterijom *B. burgdorferi sensu lato*. *Borrelia garinii* otkrivena je u 91% zaraženih životinja, uključujući 31% miješanih infekcija s *B. afzelii*, drugom najraširenijom vrstom, a slijedi je *B. spielmanii*. Prevladavanje *B. garinii* u PCR-pozitivnih životinja i zaraženih ličinki krpelja (38,1%) sugerira da su ove spirohete i *B. afzelii* prvenstveno povezane s lisicama.

MANNELLI i sur. (1993.) utvrdili su visoki stupanj infestiranosti manjih sisavaca (rakuni, oposumi, lisice) krpeljom *Ixodes* spp., odnosno raznim razvojnim stadijima krpelja *Ixodes* spp. SCHOFFEL i sur. (1991.) u Njemačkoj, točnije u okolici Berlina, istraživali su

invadiranost crvenih lisice i ustanovili da od sto pretraženih lisica (47 ženskih i 53 muških jedinki) niti jedna jedinka nije bila slobodna od parazita. Od ektoparazita dokazane su tri vrste krpelja iz roda *Ixodes*, sedam vrsta buha i po jedna vrsta uši i grinje. Također je kod 15 % pregledanih lisica ELISA testom utvrđena protutijela za bakteriju *B. burgdorferi*. MENCKE (2013.) je istraživao ektoparazite, buhe, muhe i krpelje kao prenositelje vektorski prenosivih bolesti pasa (CVBD) i mačaka (FVBD). Fokus je bio na trima tako prenosivim uzročnicima, rikecijama, borelijama i psećoj lišmaniozi u Europi, te na pitanju o tome kako veterinarska medicina može odgovoriti na izazove CVBD-a i uspostaviti kontrolu te bolesti. Zaključak je da se prevencija CVBD-a temelji na kontroli ektoparazita pravodobnim nadzorom te liječenjem, ne samo radi zaštite zdravlja životinja nego i radi zaštite zdravlja ljudi.

2.2.3. Značenje lisice kao rezervoara dirofilarioze

HERNANDEZ-CAMACHO i sur. (2015.) utvrdili su mikrofilarije u uzorku krvi sive lisice na području Meksika, no daljnjom pretragom nisu pronašli adultne oblike *D. immitis* te su zaključili da je jedinka bila u početnoj fazi infekcije. PENEZIĆ i sur. (2014.) istraživali su prevalenciju adulta *D. immitis* u divljih mesoždera te utvrdili prevalenciju u vuka (1,43 %), lisice (1,55 %), šakala (7,32 %) i divlje mačke (7,69 %). *D. immitis* kao najčešći parazit u pasa, lisica i šakala u Mađarskoj potvrđen je istraživanjem. MESHGI i sur. (2009.) proučavali su 37 lisica i 79 šakala u Iranu na helminte i ektoparazite te su, među ostalim, utvrdili i prisutnost vrste *D. immitis*. MORGAN i sur. (2008.) navode kako su proveli istraživanje prisustva nematoda u lisica u Velikoj Britaniji, ali nisu pronašli *D. immitis*. SEGOVIA i sur. (2004.) istraživali su helminte crvenih lisica na Pirinejskom poluotoku i utvrdili da je *D. immitis* u tom slučaju satelitska vrsta.

CROOKS i sur. (2001.) i ROEMER i sur. (2000.) proveli su istraživanje na otočnim lisicama i utvrdili prostorne i vremenske varijacije cirkulirajućeg antigena i seroprevalenciju pseće dirofilarioze u otočnih lisica, i to tako da je 78,0 % lisica pozitivno na cirkulirajući antigen *D. immitis* te da je cirkulirajući antigen utvrđen u četiri od šest populacija lisica na osam otoka. GORTAZAR i sur. (1998.) provode istraživanje utvrđivanja povezanosti staništa i različitosti kad je riječ o invaziji helmintima u crvene lisice. Također, utvrđuju da je *D. immitis* vrlo prevalentna u području ocjeditih tala uz veće rijeke u istraživanom području. MILLER i sur. (1998.) nisu mogli utvrditi u istraživanom uzorku prisustvo mikrofilarija *D. immitis*. MARKS i sur. (1998.) utvrdili su invaziju *D. immitis* u crvenih lisica u urbanom dijelu grada Melbournea.

Krv uzeta na uzorku od 125 lisica filtrirana je te provjerena antigenskim ELISA testom. Utvrđeno je 6,4 % pozitivnih, a u šest lisica je filtracijskim testom utvrđeno prisustvo mikrofilarija. U Francuskoj je istraživana važnost invazije pasa vrstom *D. repens*; utvrđena je invadiranost od 20 % u populaciji vojnih pasa. Nije jasno dokazana patološka manifestacija odraslim dirofilarijama. Prevalencija se temeljila na utvrđivanju mikrofilarija u krvotoku i histokemijskom bojenju za identifikaciju (CHAUVE, 1997.). GORTAZAR i sur. (1994.) utvrđuju čimbenike koji utječu na prevalenciju vrste *D. immitis* u crvenih lisica. Od 433 pregledanih lisica tijekom razudbe u njih 46 ili 11,0 % utvrđen je adultni parazit. Veća prevalencija utvrđena je u lisica koje nastanjuju priobalni dio Španjolske. Razlika po spolu, težini i gojnom stanju nije bila utvrđena. U Sjedinjenim Američkim Državama istražuju prisutnost vrste *D. immitis* u 293 kojota i 155 lisica te utvrđuju da 19 kojota ili njih 7,0 % ima 1-100 *D. immitis*, a pet crvenih lisica ili njih 6,0 % ima 1-7 *D. immitis* (WIXSOM i sur. 1991.).

Rezultati molekularnih analiza koje su provedene u Vojvodini (POTKONJAK i sur. 2020.) na uzorcima krvi 59 pasa lutalica, 94 lisice i 32 čaglja, utvrđeno je 27,1 % pozitivnih pasa, 8,5 % pozitivnih lisica i 6,3 % pozitivnih čagljeva. U svih pozitivnih pasa (27,1 %) r*eal-time* PCR-om utvđena je *D. immitis* dok je od ukupno osam pozitivnih lisica (8,5 %) *D. immiti* utvrđena u pet, a *D. repens* u tri lisice. U oba pozitivna čaglja (6,3 %) potvrđena je *D. immitis.* Ovi rezultati ukazuju na moguću interakciju infekcije *D. immitis* između populacije pasa i populacije divljih kanida, dok je utvrđeno da *D. repens* cirkulira uglavnom u populacijama divljih kanida. ĆIROVIĆ i sur. (2014.) prvi put iznose podatke o prisutnosti *D. repens* u jednoj od 36 lisica na području sjeverozapadnog dijela Republike Srbije, a iste te godine PENEZIĆ i sur. (2014.) izvještavaju o prevalenciji vrste *D. immitis* od 1,6 % u lisica i 7,3 % u čagljeva. Od ostalih zemalja na području Europe prevalencija vrste *D. immitis* u lisica utvrđena je u samo njih nekoliko. U Mađarskoj je ona iznosila 3,7 % u lisica i 7,4 % u čagljeva (TOLNAI i sur. 2014.). Molekularnim istraživanjem koje je provedeno u Rumunjskoj, *D. immitis* je utvrđena u 0,3 % lisica i 7,6 % čagljeva, a *D. repens* je utvrđena u 0,7 % lisica i 3 % čagljeva (IONICĂ i sur. 2017.). Neka od provedenih istraživanja (MORCHON i sur. 2012.) ukazuju na to da divlji kanidi imaju važnu ulogu kao rezervoari uzročnika i na taj su način važan čimbenik u održavanju i širenju bolesti. Postoje i oprečna mišljenja kad je riječ o pojedinim istraživanjima, a govore o tome da upravo zbog prisutnosti malog broja odraslih oblića kao i malog broja mikrofilarija u krvi lisica, one nisu dobri domaćini za *D. immitis* (MARCONCINI i sur. 1996.). Pojedini autori (SIMÓN i sur. 2012.) smatraju da je potrebno pažljivo procijeniti međusobno

djelovanje divljih životinja, kućnih ljubimaca i ljudi na urbanim i ruralnim područjima kako bi se što bolje mogla utvrditi dinamika prijenosa bolesti.

Dirofilaria repens iako je u pravilu parazit mesoždera, može se naći i u ljudi. AUER (2004.) i AUER i SUSANI (2008.) ustanovili su u Austriji od 1981. do 2006. godine 13 slučajeva supkutane dirofilarioze u ljudi. Istražujući dirofilariozu u ljudi, CHAZAN i sur. (2001.) utvrdili su potkožnom tkivu lopatice *D. repens* u jednog čovjeka u Saudijskoj Arabiji, za kojeg nisu ustanovili uzrok, jer osoba nije bila u endemskim područjima, a na području Arapskog poluotoka nije bio zabilježen niti jedan slučaj ove dirofilarije.

2.3. Epidemiološki podatci o proširenosti istraživanih vektorski prenosivih zoonoza u ostalih divljih životinja

DUSCHER i sur. (2015.) istražuju divlje životinje kao rezervoar zoonoza. Među ostalim, zaključuju da jelen može biti rezervoar za *A. phagocytophilum,* ali s nejasnim potencijalom za infekciju ljudi. Opisana je tek mogućnost infekcije čovjeka jelenjim filaridom *Onchocerca jakutensis,* a iznimka bi mogla biti divlja svinja koja ima interakciju s lisicom putem koje se može uplesti u lanac ljudske prehrane, najčešće zoonozom vezanom za vrste *Trichinella britovi* i *Alaria alata*. HODZIC i sur. (2020.) istražuju divlje mesoždere kao važne domaćine krpelja *I. ricinus* kao i moguće rezervoare. Istraživanje je provedeno na sivom vuku za kojeg se malo zna u kojoj mjeri sudjeluje kao rezervoar bolesti koje se prenose putem krpelja. Istraživanje je provedeno molekularnim metodama (PCR) na 276 uzoraka slezene sivih vukova prikupljenih u 11 saveznih država Njemačke. U 127 uzoraka ili 46,0 % utvrđena je prisutnost vrste *Hepatozoon canis,* a dva uzorka ili 0,7 % bila su pozitivna na *A. Phagocytophilum.* Na temelju te studije prvi je put istaknut potencijal populacije sivog vuka kao rezervoara bolesti. Ulogu različitih vrsta divljih mesoždera u ekoepidemiologiji *A. phagocytophilum* i održavanju infekcije u sinantropskim okruženjima u svojem radu potvrđuju i MATEI i sur. (2021) koji su izdvojili *A. phagocytophilum* iz šest vrsta divljih mesoždera iz 17 područja Rumunjske.

AGUILAR-TIPACAMU i sur. (2020.) istražuju prisutnost zoonotskih uzročnika *Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi, Ehrlichia canis* i *Rickettsia rickettsii,* u divljih glodavaca u području srednjeg Meksika i stočarske proizvodnje gdje je moguć dodir domaćih životinja s divljim glodavcima. Ukupno je ulovljeno i pretraženo 92 divlja glodavca od koji su uzorkovani krv (serum) i organi (slezena, bubreg, srce i jetra). Imunofluorescentnim

testom (IFAT) analizirani su serumi na prisustvo protutijela za *A. phagocytophilum, B. burgdorferi, E.canis* i *R. rickettsii.* U svim uzorcima seruma ustanovljena su protutijela za *A. phagocytophilum* i *E. canis,* koji su potom analizirani PCR postupkom u kojem je *A. phagocytophilum* dokazana u 34 uzoraka, a *E. canis* u 59 uzoraka. RT-PCR postupkom uzorkovanih organa nije nađen genetski materijal odnosno virusna RNA za dokaz virusa iz familija *Bunyaviridae, Togaviridae* i *Flaviviridae*. To je prvo takvo istraživanje provedeno u Meksiku i koje ukazuje na važnost glodavaca u održavanju ovih infekcija na području stočarske proizvodnje u Meksiku.

SZEKERES i sur. (2019.) istraživali su male i srednje sisavce pregažene u prometu kako bi dobili uvid u uzročnike krpeljima prenosivih zaraza u gradskim staništima. Testirane su lešine ubijenih sisavaca na cestama u urbanim područjima kao korisni izvori uzoraka tkiva i parazita, a sve u svrhu istraživanja doprinosa te vrste u epidemiologiji vektorskih bolesti. Prikupljena su tkiva od 23 ježa i 12 ostalih sisavaca. Među prikupljenim uzorcima utvrđeno je 17 uzoraka (74 %) zaraženih vrstom *A. phagocytophilum,* u šest uzoraka (26 %) utvrđena je prisutnost vrste *B. burgdorferi,* u 12 uzoraka (52 %) vrste *R. helvetica,* a u 15 uzoraka (65 %) utvrđena je prisutnost vrste *Rickettsia* spp. Istraživanje je pokazalo da su urbane vrste sisavaca koje su pregažene na cesti izložene višestrukim patogenima koje prenose krpelji, ali buduće studije moraju razjasniti imaju li oni, zapravo, ulogu u njihovu održavanju i širenju.

SALKELD i sur. (2008.) pokušali su dokazati da je zapadna siva vjeverica rezervoar lajmske borelioze, odnosno spirohete *B. burgdorferi.* Proučene su 222 vjeverice PCR metodom te je utvrđena prevalencija od 30,0 % za *B. burgdorferi*, odnosno utvrđeno je 86,0 % inficiranih krpelja. U Kanadi su MORSHED i sur. (2005.) proučavali kako ptice pjevice prenose krpelje po Kanadi i izveli prvu izolaciju vrste *B. burgdorferi* iz krpelja *Ixodes auritulus*. Pritom su otkrili rasprostranjenost na postojećim i novoutvrđenim krpeljima uzročnike u svim državama Kanade.

Pregledom dostupne literature nađeni podatci seroprevalencije istraživanih zoonoza u divljih životinja u svijetu prikazani su u tablici 2.1.

Tablica 2.1. Seroprevalencija istraživanih zoonoza u divljih životinja u pojedinim zemljama

Zemlje	Broj pregledanih životinja	Dirofilaria	Borelia	Erlihia	Anaplasma	Izvor
Mađarska	lisice				12,5 %	TOLNAI i sur. (2015)
Mađarska	534 jedinke	4,49 %				TOLNAI i sur. (2014)
Italija	150 lisica			16,6 %		EBANI i sur. (2011)
Italija	13/lisica, 110/buha			31,0 %	25,0 %	TORINA i sur. (2013)
Italija	132 lisice	17,4 %				MAGI i sur. (2008)
Švicarska	1550 divljih životinja			2,80 %		PUSTERIA i sur. (1999)
Velika Britanija	546 lisica	7,3 %				MORGAN i sur. (2008)
Francuska	74/jelena, 54/divlje svinje, 3/lisice, 1400/ektoparazita		*I. ricinus* 3,7 % *Dermacentor* 2,3 %,			DOBY i sur. (1994)
Francuska	723 životinje		26,14 %			DOBY i sur. (1992)
Francuska	372/lisice, 4/rakunska psa, 2/risa				42,86 %	DOBY sur. (1991)
Njemačka	100/lisica, 47 muške, 53 ženke		15,0 %			SCHOFFEL i sur. (1991)
Portugal	78 lisica			2,9 %	14,5 %	CARDOSO i sur. (2015)
Poljska	111 lisica				2,7 %	KARBOWIAK i sur. (2009)
Rumunjska	353 lisice		1,42 %		2,55 %	DUMITRACHE i sur. (2015)

Češka	419 životinja				8,83 %	HULINSKA i sur. (2004)
Slovačka	183 lisice	57,4 %				HURNIKOVA i sur. (2015)
Srbija, Makedonija	71/vuk, 48/lisica, 26/šakala	2,4 %				CIROVIC i sur. (2014)
Kanada	28 lisica			3,57 %	3,57 %	MASCARELLI i sur. (2015)
SAD –Kalifornija	52/vjeverice, 222/vjeverice		30,77 % 30 %		21,15 %	NIETO i sur. (2010); SALKELD i sur. (2008)
SAD	70 sivih lisica				51,0 %	GABRIEL i sur. (2009)
Brazil	58 lisica			10,3 %		ALMEIDA i sur. (2013)
Kenija	76 šakala			2,0 %		ALEXANDER i sur. (1994)

2.4. Epidemiološki podatci o proširenosti istraživanih vektorski prenosivih zoonoza u domaćih životinja

ACOSTA-JAMETT i sur. (2020.) istražuju prevalenciju i faktore rizika za protutijela *A. phagocytophilum* u Čileu. Utvrdili su da krpelji koji prenose zarazne bolesti domaćih pasa na ljude, postaju sve veći problem u svjetskoj veterinarskoj i humanoj medicini. U istraživanje je uključeno 1105 osoba i 905 pasa. Ukupna seroprevalencija u ljudi bila je 9,4 % (5,6 % središnji Čile, 13,7 % krajnji sjever), a u pasa 44,0 % (61,1 % središnji Čile, 37,2 % sjeverni dio). Zoonotski patogeni *A. phagocytophilum* i *B. venatorum* najčešće su otkriveni u krpelja pronađenih na psima u privatnom vlasništvu koji bi se mogli rabiti kao markeri prisutnosti i distribucije patogena (ZANET i sur. 2020.).

LANGENWALDER i sur. (2020.) istražuju pojavu koinfekcije, reinfekcije i superinfekcije sojevima *Anaplasma phagocytophilum* u stadu goveda na temelju tipa ankA gena i tipizacije multilokusa te utvrđuju da je interakcija kralježnjaka kao domaćina i patogenog krpelja vjerojatno mnogo složenija nego što se ranije smatralo uzimajući u obzir čestu pojavu koinfekcije, ponovne infekcije i superinfekcije. Ta se složena situacija ne može jednostavno simulirati u eksperimentalnoj infekciji te je važno provesti terenske studije.

JIANG i sur. (2020.) provode studiju čiji je cilj procijeniti učestalost zaraze vrstama *Anaplasma* spp. među domaćim životinjama i divljim glodavcima u sjevernoj pokrajini Xinjiang Uygur u Kini. Za potrebe studije upotrijebljen je DNA uzet iz krvi ovaca *A. ovis* te je s pomoću PCR metode utvrđena prisutnost DNA u 21 uzorku od 137 ovaca ili u njih 15,3 %, u 18 uzoraka od 79 ovaca iz drugog područja ili u njih 22,8 % te u 13 uzoraka od 71 ovce iz trećeg područja ili u njih 18,3 %. U sljedećem koraku studije korišten je uzorak slezene te je utvrđeno u 37 uzoraka od 356 ovaca ili u njih 10,4 % te u 21 uzorku od 134 ovce ili u njih 15,7 % iz drugog područja. To je istraživanje otkrilo visoku stopu zaraze vrstama *A. phagocytophilum* i *A. ovis*, što potiče na poduzimanje učinkovitih mjera za sprečavanje i kontrolu infekcije životinja u istraživanoj pokrajini Kine vrstama *Anaplasma* spp.

SCARAMOZZINO i sur. (2005.) prvi put izvještavaju o prisutnosti vrste *D. repens* u pasa u regiji Lazio, u 2,85 % uzoraka krvi domaćih pasa i pasa iz uzgajivačnica. RIDYARD (2005.) je istraživao srčane i plućne parazite u pasa i mačaka te je utvrdio da *D. immitis* nije još endemična vrsta parazita u UK-u jer ovisi o urbanizaciji lisice kao prenositeljice. Kako

anaplazmoza u pasa može često ostati neprepoznata, ona predstavlja velik javnozdravstveni problem. Osim toga, u endemskim područjima protutijela se ne moraju pojaviti u svih inficiranih pasa te se serološkom pretragom ne moraju uvijek naći svi inficirani psi (GRANICK i sur. 2009.). U Europi je seroprevalencija pasa inficiranih bakterijom *A. phagocytophilum* različita i kreće se od 2,7 % u Francuskoj (PANTCHEV i sur. 2009.), 4,68 % u Italiji (EBANI i sur. 2014.), 5,2 % u Finskoj (VERA i sur. 2014.), 5,5 % u Rumunjskoj (MIRCEAN i sur. 2012.), 7,9 % u Mađarskoj (FARKAS i sur. 2014.) te 15,5 % u Srbiji (POTKONJAK i sur. 2015.) pa čak do 46 % u Bugarskoj (PANTCHEV i sur. 2015.) i 56,5 % u Austriji (KIRTZ i sur. 2007.). U Njemačkoj je inficiranost bakterijom *A. phagocytophilum* utvrđena u populaciji zdravih pasa u rasponu od 19,4 % (BARTH i sur. 2012.) pa sve do 42 % (KOHN i sur. 2011.).

STILLMAN i sur. (2014.) proveli su studiju validacije komercijalno dostupnog kliničkog ELISA testa za otkrivanje protutijela za bakterije *Anaplasma phagocytophilum, Anaplasma platys, Borrelia burgdorferi, Ehrlichia canis i Ehrlichia ewingii* i antigena *Dirofilaria immitis* u pasa. Osjetljivost i specifičnost kliničkog ELISA testiranja bila je > 89 % za otkrivanje protutijela za *A. phagocytophilum* (93,2 %, odnosno 99,2 %), *A. platys* (89,2 %, odnosno 99,2 %), *B. burgdorferi* (96,7 %, odnosno 98,8 %), *E. canis* (97,8 %, odnosno 92,3 %) i *E. ewingii* (96,5 %, odnosno 93,9 %). Osjetljivost testa za otkrivanje *D. immitis* bila je 98,9 %, uz specifičnost od 99,3 %. Klinički ELISA test utvrdio je izloženost > 1 vektorskog patogena u 354 od 1195 uzoraka. Potvrđena je unakrsna reaktivnost cirkulirajućeg antigena *E. canis* s protutijelima anti *E. chaffeensis*. Rezultati terenskih evaluacija potvrdili su da se ELISA test u klinici može pouzdano rabiti u tipičnim kliničkim uvjetima za identifikaciju pasa izloženih patogenima koji su od interesa.

TOLNAI i sur. (2014.) te GUARDONE i sur. (2013.) među 712 pasa koje su proučavali, u njih 30 utvrdili su postojanje vrste *D. repens*, a u njih 40 prisutnost vrste *D. immitis*. U Albaniji na periferiji grada Tirane, XHAXHIU i sur. (2011.) istraživali su koji je najčešći uzročnik crijevne parazitoze u pasa te su patoanatomski utvrdili i prisutnost dvaju odraslih parazita *D. immitis* u desnom ventrikulu jednog psa. Istraživanje prevalencije vrste *D. immitis* s obzirom na stanište, klasičnim molekularnim metodama proveli su u Kaliforniji MILLER i sur. (2011.) na 519 uzoraka krvi pasa dobivši prevalenciju od 3,47 %. U Grčkoj su LEFKADITIS i sur. (2010.) utvrdili na uzorku od 341 psa ili 17,9 % seropozitivnih pasa na specifičan cirkulirajući antigen, a Brazilu su FURTADO i sur. (2009.) na 188 pasa utvrdili prevalenciju u njih 32,45 %, a infekciju u 53,84 %.

SEO i sur. (2019.) istraživali su mogućnost evoluiranja *Anaplasma phagocytophilum* u geografskim i biotskim nišama kralježnjaka i krpelja. U tu svrhu istraživali su 23 vojna konja na temelju kliničke slike, anamneze, fizikalnog pregleda, hematologije, kemije krvi i fekalnog pregleda. Provedena je diferencijalna dijagnoza s pomoću molekularnih analiza za uzročnike različitih febrilnih bolesti. Otkrili su da je jedan konj zaražen bakterijom *Anaplasma bovis* te potvrdili to istraživanje kao prvo kliničko izvješće o infekciji vrstom *A. bovis* u konja.

JANZEN i sur. (2019.) proveli su retrospektivno istraživanje i analizu 1030 rezultata dijagnostičkih testova granulocitne anaplazmoze u konja (EGA), dobivenih od Nacionalnog veterinarskog instituta (SVA, Švedska). Rezultati su pokazali znatno povećanje udjela pozitivnih slučajeva EGA-a od 2002. do 2015. i velike razlike u sezonskoj raspodjeli slučajeva EGA-a u godini. Povezanost s konfiguracijom krajolika pokazuje pozitivan odnos *A. phagocytophilum* i crnogorične šume, vodenih tijela i heterogenosti krajolika. Razvijena metoda povezivanja biljnog pokrova s rizikom od bolesti može se primijeniti na druge vektorske bolesti i na druga područja istraživanja.

2.5. Epidemiološki podatci o proširenosti istraživanih vektorski prenosivih zoonoza u ljudi

DYKSTRA i sur. (2020.) u državi Washington istraživali su bolesti prenosive krpeljima na ljude u razdoblju od 2011. do 2016. godine. Istraživanje je provedeno na uzorku od 202 oboljele osobe u saveznoj državi Washington. Utvrđeno je 1,9 % oboljelih od *A. phagocytophilum* i 34,0 % od lajmske borelioze. Istodobno je prikupljeno 977 uzoraka krpelja na temelju kojih je utvrđena prevalencija vrste *B. burgdorferi sensu stricto* od 4,0 %, *B. burgdorferi sensu lato* od 3,8 %, *B. miyamotoi* od 4,4 % krpelja, te je, također utvrđeno da su neke bolesti prenosive krpeljima endemične u državi Washington.

SOCOLOVSCHI i sur. (2009.) utvrdili su da se posljednjih godina prevalencija bakterijskih bolesti koje se prenose krpeljima znatno povećala u europskim zemljama. Pojava i ponovna pojava tih bolesti pripisuju se promjenama u okolišu i ljudskom ponašanju. Nekoliko je bolesti prouzročenih bakterijama, primarno izoliranim od krpelja, zatim smatranim patogenima. Potrebno je uzeti u obzir bakterije pronađene u člankonožaca koji se mogu hraniti

na ljudima, kao potencijalne ljudske patogene. Također, dali su pregled kliničkih i epidemioloških podataka o bakterijskim bolestima koje se prenose krpeljima u europskim zemljama, usredotočeni na epidemiološke i kliničke aspekte rikecioza koje se prenose krpeljima. Usto, dali su i pregled ostalih bolesti koje se prenose krpeljima, s naglaskom na njihovu pojavnost i ponovnu pojavnost.

MADISON-ANTENUCCI i sur. (2020.) utvrdili su da je klinička slika infekcije u ljudi bakterijama *A. phagocytophilum* i *E. chaffeensis* vrlo slična. Naime, bolest je utvrđena tjedan-dva nakon izlaganja u 75 % ljudi koji su prijavili ugriz krpelja. Zabilježeno je samo deset slučajeva prijenosa vrste *A. phagocytophilum* transfuzijom, uključujući i jedan smrtni slučaj. Zabilježen je i jedan slučaj prijenosa transplantacijom organa. Utvrđeno je da je stopa smrtnosti relativno niska i za *A. phagocytophilum* iznosi 0,3 %, a za *E. chaffeensis* nešto je viša od 3 %. Klinički simptomi i laboratorijski rezultati za *E. evingii* vrlo su slični rezultatima dobivenim za *E. chaffeensis*. Tijekom prvih tjedan-dva od zaraze, PCR u stvarnom vremenu najspecifičnija je, najosjetljivija i najrasprostranjenija metoda za otkrivanje i identifikaciju vrsta *E. chaffeensis, A. phagocytophilum* i *E. ewingii*. Nakon prvih tjedan-dva infekcija brzo opada, a vjerojatnost otkrivanja smanjuje se, ograničavajući vrijednost PCR-a (4). Osjetljivost PCR-a za otkrivanje vrste *E. chaffeensis* iznosi od 60 do 80 %, a osjetljivost za otkrivanje vrste *A. phagocytophilum* od 67 do 90 %, ovisno o broju dana od zaraze (9, 10, 17). MATEI i sur. (2019.) tvrde da pozitivan rezultat PCR-a može biti koristan, ali negativan rezultat ne isključuje dijagnozu, a liječenje se ne smije uskratiti zbog negativnog rezultata PCR-a.

KODAMA i sur. (2005.) istražuju klinička obilježja B-staničnog limfoma, klasifikaciju i prognozu u ljudi. U molekularnoj se analizi upotrebljava, među ostalim, i DNA ljudskog herpes virusa i vrste *B. burgdorferi* na temelju kojih klasificiraju bolesne osobe u nekoliko grupa, prema kliničko-patološkim obilježjima i prognozama ishoda bolesti.

MADISON-ANTENUCCI i sur. (2020.) opisuju lajmsku boreliozu čiji je uzročnik bakterija *B. burgdorferi* kao najučestalije zabilježenu bolest koja se prenosi krpeljom u Sjedinjenim Državama. Prema podatcima, u Sjedinjenim je Državama u 2010. godini zabilježen 22 561 slučaj bolesti, a u 2015. godini ta se stopa bolesti povećala na 28 453 slučaja. Lajmska borelioza se najčešće javlja kao osip (eritem) na mjestu uboda krpelja koji se u oko 70 do 80 % ljudi javlja u prosjeku od sedam dana (raspon tri do 30 dana) nakon uboda krpelja, obično prije pojave vrućice. Prijenos bolesti odnosno uzročnika nakon prihvaćanja, s krpelja na čovjeka

obično se događa u razdoblju od 36 sati do 72 sata. Rani diseminirani stadij bolesti javlja se obično do tjedan dana od prvih znakova bolesti koji uključuju vrućicu, glavobolju, bolove u mišićima (simptomi općeg infekcijskog sindroma) te u rjeđim slučajevima može dovesti do neuroloških problema (periferalne neuropatije, meningitis). Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (Word Health Organisation, WHO) u Europi najučestalija bolest koja se prenosi krpeljima je upravo lajmska bolest. Od 1990. do 2010. godine najveća prosječna stopa incidencije zabilježena je u Bjelorusiji, Belgiji, Hrvatskoj, Norveškoj, Rusiji, Srbiji (< 5/100.000), Bugarskoj, Finskoj, Mađarskoj, Poljskoj i Slovačkoj (< 16/100.000) te češkoj, Estoniji i Litvi (< 36/100.000) i Sloveniji (< 130/100.000) (ANONIMUS, 2020.).

NICHOLSON i sur. (1991.) istražuju vrstu *D. immitis* kao uzročnika pojavljivanja plućnih nodula u ljudi. Autor daje izvještaj o utvrđenoj prisutnosti parazita u ljudi u MAYO klinici koji, kako je utvrđeno, izaziva stvaranje tipičnih nodula u plućima. Za dijagnozu je provedena torakotomija u pacijenata. U SAD-u je najviše uzročnika utvrđeno u pasa, mačaka, lisica, vukova i kojota u populaciji u južnim, istočnim i jugoistočnim dijelovima zemlje.

2.6. Pregled istraživanih vektorski prenosivih zoonoza u Hrvatskoj

Prema dostupnim podatcima, u Hrvatskoj su se istraživanja seroprevalencije vektorski prenosivih bolesti provodila uglavnom u domaćih životinja, i to ponajprije u pasa. JURKOVIĆ i sur. (2019.) proveli su istraživanje SNAP®4Dx®Plus testom u pasa te su utvrdili najveću ukupnu seroprevalenciju od 6,1 %. Seroprevalencija prema uzročnicima bila je sljedeća: *Anaplasma* spp od 4,5 %, *D. immitis* 0,6 %, *E. canis* u 0,6 % i *B. burgdorferi* 0,4 %. MRAOVIĆ i sur. (2019.) istim su postupkom utvrdili da je na području Istre *D. immitis* prisutna u 11,94 % pasa, a *Anaplasma* spp. u njih 3,73 %. Usto, utvrdili su neke rizične čimbenike povezane s držanjem pasa. MRLJAK i sur. (2017.) proučavali su 435 pasa s 13 različitih lokacija u Hrvatskoj te utvrdili seroprevalenciju *A. phagocytophilum* u njih 6,21 %, a *D. immitis* u njih 0,46 %. HUBER i sur. (2017.) PCR su postupkom utvrdili prisutnost vrste *A. phagocytophilum* u populaciji zdravih pasa iz različitih područja Hrvatske, i to u njih 0,3 %.

ŽIVIČNJAK i sur. (2006.) upućuju na dirofilariozu kao važnu zoonozu koja predstavlja problem u veterinarskoj medicini i javnom zdravstvu. Mikrofilarije *D. repens* u pasa u Hrvatskoj zastupljene su u njih čak 15,5 %, a u jednom slučaju dokazana je i *D. immitis*.

Mikrofilarije roda *Dirofilaria* nađene su i u klinički zdravih pasa. JURIĆ i sur. (2007.) na području Istre otkrili su prisutnost *D. immitis* u 5,5 % i *D. repens* u 10,4 % pasa tartufara. O nalazu mikrofilarija u supkutanom tkivu pasa izvješćuju i DŽAJA i sur. (2008.).

Prema istraživanjima koja su proveli TURK i sur. (2000.; 2008.), vrsta *B. burgdorferi* bila je zastupljena u 5 % uzoraka seruma pasa i 8,8 % pretraženih puhova na području Gorskog kotara. Također, ukazali su na važnost puhova kao rezervoara borelije. *B. burgdorferi* je procijenjena u 6 (5%) uzoraka psećih seruma u titru u rasponu od 1:100 do 1:2000.

DUMIĆ i sur. (2020.) na temelju pregleda 118 krpelja prikupljenih s 18 divljih svinja utvrdili su da je od svih nađenih krpelja, *Dermacentor reticulatus* utvrđen u najviše divljih svinja (91 %), a *Ixodes ricinus* (7 %) i *Ixodes hexagonus* (2 %) nađeni su u puno manjem postotku. Najveći broj prikupljenih krpelja bio je u adultnom stadiju (njih 97 %), a samo ih je 3 % bilo u stadiju nimfe. Prosječna stopa invadiranosti bila je sedam krpelja po jedinki. BECK i sur. (2010.) istraživali su uzročnike u krpeljima *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus* te su utvrdili prisutnost *B. burgdorferi* u njih 85,7 %, a *Anaplasma phagocytophilum* u 21,4 % pretraženih krpelja. RIIPKEMA i sur. (1996.) su na području sjeverne Hrvatske utvrdili *B. burgdorferi sensu lato* u 45 % krpelja vrste *I. ricinus.*

JURKOVIĆ (2021.) istražuje značaj, vektorski potencijal i raznolikost krpelja na području RH. Smatra se da su krpelji nakon komaraca najvažniji biološki vektori uzročnika bolesti u svijetu. Istraživanje je provedeno na 509 arhivskih prethodno morfološki determiniranih krpelja. Lančana reakcija polimerazom (PCR) korištena je kako bi se umnožio ciljni odsječak 16S rRNA gena. Sekvencioniranjem je dokazano šest vrsta krpelja iz roda *Ixodes,* dvije vrste roda *Dermacentor,* jedna vrsta unutar roda *Rhipicephalus* i jedna skupina sa četiri različita genotipa, jedna vrsta roda *Hyalomma* i tri vrste unutar roda *Haemaphysalis.* U 18% krpelja su dokazane proteobakterije iz porodice *Anaplasmataceae*: *Anaplasma capra, A. phagocytophilum, Ehrlichia canis, Ehrlichia* spp., „*Candidatus Neoehrlichia lotoris*“ i endosimbionti *Wolbachia* spp. i *Midichloria mitochondrii*. Na području kontinentalne Hrvatske u genotipovima *I. ricinus* su dokazane *Borrelia afzelii* i *B. valaisiana* u 1,9% i 0,8% krpelja.

Prema PUPIĆ-BAKRAČ i sur. (2020.), psi predstavljaju glavni rezervoar dirofilarija iako veliku ulogu u pojavi bolesti u ljudi imaju i vektori. Isti su autori opisali kliničke slučajeve invadiranosti ljudi parazitom *D. repens* te naveli kao predilekcijska mjesta tog uzročnika

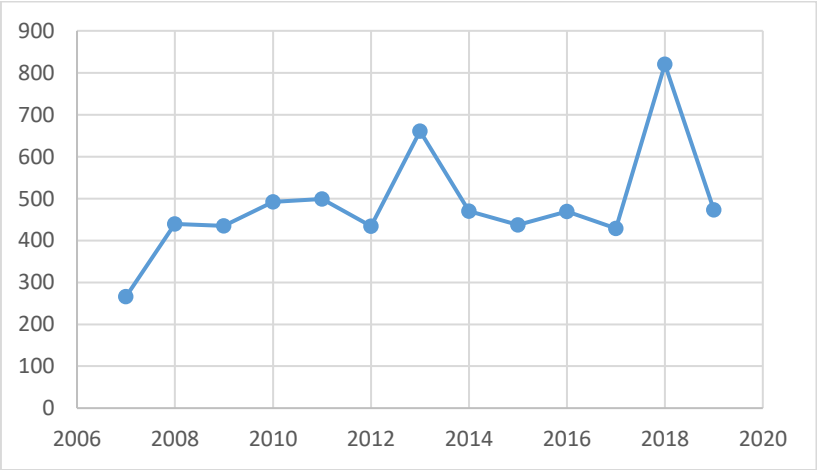
supkutana i okularna područja, a *D. immitis* ističu kao uzročnika pulmonalne dirofilarioze. Prve slučajeve humane dirofilarioze uzrokovane s *D. repens* opisali su PUIZINA-IVIĆ i sur (2003.). SVIBEN i sur (2013.) opisao je slučaj subkonjuktivalne *D. repens* u starije žene. Prema PUPIĆ-BAKRAČ i sur. (2020.) *D. immitis* do danas nije detektiran kao uzročnik humane dirofilarioze u Hrvatskoj. Pregledom pojavnosti humane dirofilarioze od 1996. godine, kad je prvi put utvrđena, pa do 2020. godine, u 16 radova opisano je 30 slučajeva humane dirofilarioze od kojih je u devet slučajeva bila poznata povezanost s domaćim životinjama, ponajprije sa psima i mačkama. Slučajevi dirofilarioze u ljudi potvrđeni su u Dalmaciji (10), centralnoj Hrvatskoj (8), Slavoniji (8) i Istri (4) (SVIBEN i sur. 2003.).

TOPOLOVEC i sur. (2003.) utvrdili su u ljudi pozitivan titar protutijela na bakteriju *Borrelia burgdorferi* u 15 seruma te su, također, pronašli da uzročnici humane monocitne i granulocitne erlihioze cirkuliraju u istočnim dijelovima Hrvatske. Poznato je da se klinički oblici lajmske bolesti u Gorskom kotaru pojavljuju samo sporadično, za razliku od sjeverozapadne Hrvatske i susjednih područja Slovenije koja su dobro poznata endemska područja lajmske borelioze. POLJAK i sur. (2000.) proveli su istraživanje seroprevalencije *Borrelia burgdorferi sensu lato* u rizičnoj populaciji šumarskih radnika u planinskom području Gorskog kotara i usporedili je s općom prevalencijom u stanovnika tog i primorskog područja. Analizirani su i serumi uzeti od deset lovačkih pasa iz Gorskog kotara. Protutijela IgG na *B. burgdorferi sensu lato* pronađena su u 11 ispitanika (4,7 %) iz skupine šumarskih radnika, u tri (3 %) opće populacije i u pet (2,7 %) ispitanika iz primorskog područja. Četiri od deset pasa (40 %) imalo je IgG protutijela za *B. burgdorferi* te su pokazali da šumsko-planinsko područje Gorskog kotara ima obilježja područja niske rasprostranjenosti, za razliku od endemskih susjednih područja. GOLUBIĆ i sur. (1998.) također su utvrdili prisustvo *B. burgdorferi sensu lato* u sjeverozapadnoj Hrvatskoj. Distribucija lajmske borelioze po spolu i dobi u sjeverozapadnoj Hrvatskoj pokazala je nešto veću prevalenciju u žena i u radno aktivnih ljudi starosti od 20 do 50 godina. Najčešće su pogođene osobe koje povremeno borave u prirodi, dok su one s povećanim rizikom od ugriza krpelja znatno rjeđe obolijevale. Najčešća klinička manifestacija lajmske borelioze u tih osoba bio je *eritema migrans* 46 %, a bile su izražene i neurološke manifestacije s naglaskom na periferni neuritis koji je zabilježen u 32 % slučajeva na tom području. Nadalje, *B. burgdorferi* bila je potvrđena u devet od 42 seruma srndaća i u tri od devet seruma zeca. Pretraženi serumi divljih svinja (n = 10), goveda (n = 103) i pasa (n = 13) bili su negativni na protutijela za *B. burgdorferi*. Testiranjem krpelja (n = 123) prikupljenih s pet različitih lokacija na području sjeverozapadne Hrvatske *B. burgdorferi sensu lato*

potvrđena je u 56 od 124 krpelja (45 %). Prema istraživanjima ŽIVANOVIC i sur. (1991.), seroprevalencija borelioze u općoj populaciji stanovništva u sjeveroistočnoj Hrvatskoj bila je 11,3 %, dok je među pripadnicima rizične skupine koja je uključivala šumske radnike, bila gotovo dvostruko veća (25,5 %), za razliku od vojske, koja je također smatrana jednom od rizičnih skupina, gdje je nađeno samo 6 % pozitivnih vojnika.

Prema istraživanjima MULIĆ i sur. (2011.), od bolesti koje se prenose krpeljima lajmska borelioza endemična je u cijeloj kontinentalnoj Hrvatskoj i u Hrvatskom primorju. Bolest pokazuje izrazit sezonski karakter, što je uvjetovano biološkim ciklusom krpelja koji su najaktivniji u proljeće i ljeto. Od 1999. do kraja 2008. godine prijavljeno je ukupno 2890 oboljelih od lajmske borelioze, a u prosjeku se na godinu prijavi manje od 300 oboljelih od lajmske borelioze s različitim kliničkim slikama, no dominira kožni oblik bolesti. U županijama sjeverne Hrvatske (Zagrebačka, Varaždinska, Međimurska, Krapinsko-zagorska, Koprivničko-križevačka) i Gradu Zagrebu zabilježeno je 75,75 % slučajeva među svim prijavljenim. U promatranom razdoblju nije prijavljen nijedan slučaj erlihioze.

Prema podatcima Hrvatskog zavoda za zdravstvo (Hrvatski zdravstveno-statisitčki ljetopis, 2019.), lajmska borelioza u ljudi od 2007. do 2019. godine kretala se u rasponu od 266 do 473 slučaja. Trend pojave slučajeva humane borelioze prikazan je na slici 2.1.



Grafikon 2.1. Slučajevi humane borelioze od 2007. do 2019. (izvor: HZJZ)

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Lisice mogu biti nositelji mnogih uzročnika zoonoza. Za neke zoonoze one predstavljaju glavni rezervoar, a time i važan čimbenik u održavanju i širenju uzročnika na takvu području i staništu. Osobito je važna uloga lisica kao rezervoara uzročnika zoonoza koje se prenose vektorima. S obzirom na to da vektori nisu specifični za vrstu, odnosno da je riječ o istim kompetitivnim vektorima koji se hrane na lisicama (divlje životinje), domaćim životinjama (psi, mačke) i ljudima, može se pretpostaviti da učestalost infekcije uzročnicima vektorski prenosivih zoonoza u populaciji lisica može utjecati na pojavu i širenje istih u populaciji drugih prijemčivih divljih i domaćih životinja te ljudi na određenom području. Stoga je i pretpostavka ovog istraživanja da lisice mogu biti važan rezervoar zoonoza koje se prenose vektorima, osobito borelioze i dirofilarioze na području sjeverne i zapadne Hrvatske gdje su ove bolesti i potvrđene u ljudi.

Glavni je cilj ovog istraživanja procijeniti ulogu lisica u održavanju i širenju uzročnika vektorski prenosivih zoonoza: lajmske borelioze, dirofilarioze, anaplazmoze i erlihioze. Kako bi se taj cilj realizirao, u ovom je istraživanju bilo potrebno napraviti sljedeće korake:

1. procijeniti trenutačnu proširenost (prevalenciju) odabranih vektorski prenosivih uzročnika bakterijskih (lajmska borelioza, anaplazmoza, erlihioza) i parazitskih bolesti (dirofilarioza) u populaciji lisica na području sjeverne i zapadne Hrvatske.
2. procijeniti prostornu i vremensku distribuciju te povezanost pozitivnih nalaza prema spolu i dobnoj kategoriji te geografskim subpodručjima.
3. procijeniti u kojoj je mjeri populacija lisica rizičan čimbenik na području sjeverne i zapadne Hrvatske.
4. evaluacija brzog dijagnostičkog SNAP® 4Dx® Plus testa kao *screening* testa u otkrivanju istraživanih zoonoza u lisica.

4. MATERIJALI I METODE

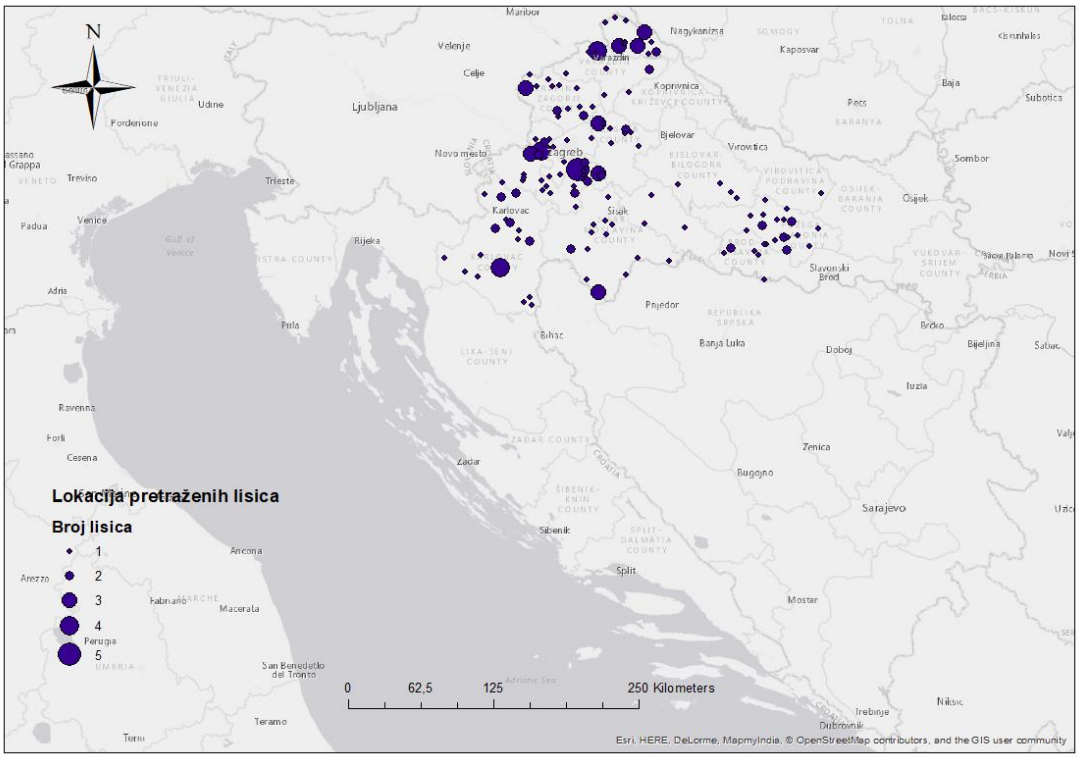
4.1. Istraživana populacija

Istraživanje je provedeno na populaciji crvenih lisica (*Vulpes vulpes* L.) na području sjeverne i središnje Hrvatske koje su dostavljene u Hrvatski veterinarski institut u Zagrebu radi kontrole imunosti oralnog cijepljenja na bjesnoću, a na temelju Naredbe o mjerama zaštite zdravlja životinja od zaraznih bolesti i njihovu financiranju u 2019. i 2020. godini. Prije uzorkovanja sve su lisice bile pregledane na bjesnoću te su samo one s negativnim nalazom na bjesnoću bile uzorkovane. Uzorkovano je ukupno 185 lisica tijekom 2019. i 2020. godine iz 11 županija, a samo je jedan manji broj lisica bio s područja istočne Hrvatske (Brodsko-posavska i Virovitičko-podravska). S obzirom na to da su te županije izvan okvira naslova ovog rada, nisu uzete u daljnje analize. Istraživanje je, dakle, provedeno na 179 odstrijeljenih trupova crvene lisice (*Vulpes vulpes* L.) s područja devet županija uključujući 127 staništa (lovišta). Lisice su bile obaju spolova i u dobi od nekoliko mjeseci pa do sedam godina. Broj pregledanih lisica i broj uključenih staništa po županijama prikazan je u tablici 4.1. i na slici 4.1.

Svakoj se lisici uzorkovala krv i uška. Na temelju prikupljenih uzoraka krvi provedeno je testiranje s pomoću SNAP® 4Dx® Plus testa, standardne PCR reakcije za umnožavanje ciljnog dijela DNA vrste *Dirofilaria immitis* te ugniježđene i semiugniježđene PCR reakcije za umnožavanje regija unutar 16S rRNA i GroEL odsječka genoma *Anaplasma phagocytophilum*. SNAP brzim dijagnostičkim testom detektira se cirkulirajući antigen *D. immitis,* a molekularnim metodama DNA mikrofilarija L1. Od prikupljenih uzoraka uške provedeno je testiranje ugniježđenom PCR reakcijom za umnožavanje ciljnog dijela DNA vrste *Borrelia burgdorferi.*

Tablica 4.1. Broj uključenih staništa (lovišta) i broj pregledanih uzoraka lisica po županijama

Županija	Broj staništa (lovišta)	Broj uzoraka	Broj muških	Broj ženskih
Zagrebačka	33	53	36	16
Krapinsko-zagorska	13	17	10	7
Sisačko-moslavačka	17	21	15	6
Karlovačka	18	26	13	13
Varaždinska	8	13	6	6
Bjelovarsko-bilogorska	4	4	1	3
Požeško-slavonska	18	22	12	9
Međimurska	12	19	12	6
Grad Zagreb	4	4	3	1
Ukupno	127	179	108	67



Slika 4.1. Pregled istraživanih lokacija prema broju pretraženih lisica

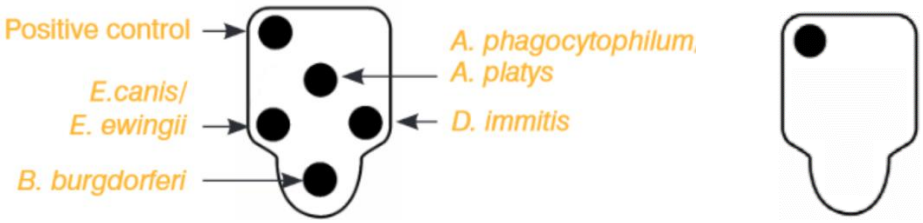
Uzorci krvi uzeti su tijekom razudbe iz grudne šupljine, uglavnom iz srca. Od jednog dijela krvi, neposredno nakon razudbe, napravljen je SNAP® 4Dx® Plus test, a ostali je dio uzorkovane krvi te tkiva uški smrznut i skladišten radi postupka provedbe molekularne dijagnostike primjenom standardne PCR i ugniježđene PCR metode.

4.2. SNAP® 4Dx® Plus test

Primjena *screening* postupaka poput SNAP®4Dx® Plus testa za otkrivanje *Dirofilaria immitis* cirkulirajućeg antigena, *Borrelia burgdorferi* protutijela, *Anaplasma phagocytophilum* / *Anaplasma platys* protutijela i *Ehrlichia canis* / *Ehrlichia ewingii* protutijela, jednostavnija je, brzo izvediva i financijski najprihvatljivija metoda kojom brzo možemo doći do rezultata, stoga je i prihvatljiva kao *screening* postupak u nadzoru tih bolesti u životinja.

U skladu s uputama proizvođača rabila se puna krv s antikoagulansom. Neposredno prije izvođenja testa sve njegove komponente koje se čuvaju u hladnjaku na + 4 ºC, trebaju bez zagrijavanja dostići sobnu temperaturu (15 – 25 °C). Nakon zadovoljavanja uvjeta kad je riječ o temperaturi svih komponenti testa, priprema se sadržaj koji je potrebno ukapati u testne pločice: ukapaju se tri kapi uzorka u epruvetu, a zatim četiri kapi konjugata držeći pritom bočicu konjugata vertikalno. Nakon što se epruveta začepi, izmiješa se njezin sadržaj tako da ju se okrene 3 – 5 puta. Pripremljeni sadržaj ulijeva se zatim u bazenčić testne pločice koja mora biti na horizontalnoj podlozi. Tijekom 30 – 60 sekundi uočava se promjena boje aktivacijskog kruga i tad se aktivator snažno potisne prema dolje. Rezultati se očitavaju za osam minuta nakon vremena aktivacije. Bez obzira na to što se pozitivna kontrola može pojaviti prije, rezultat se može očitati tek nakon osam minuta.

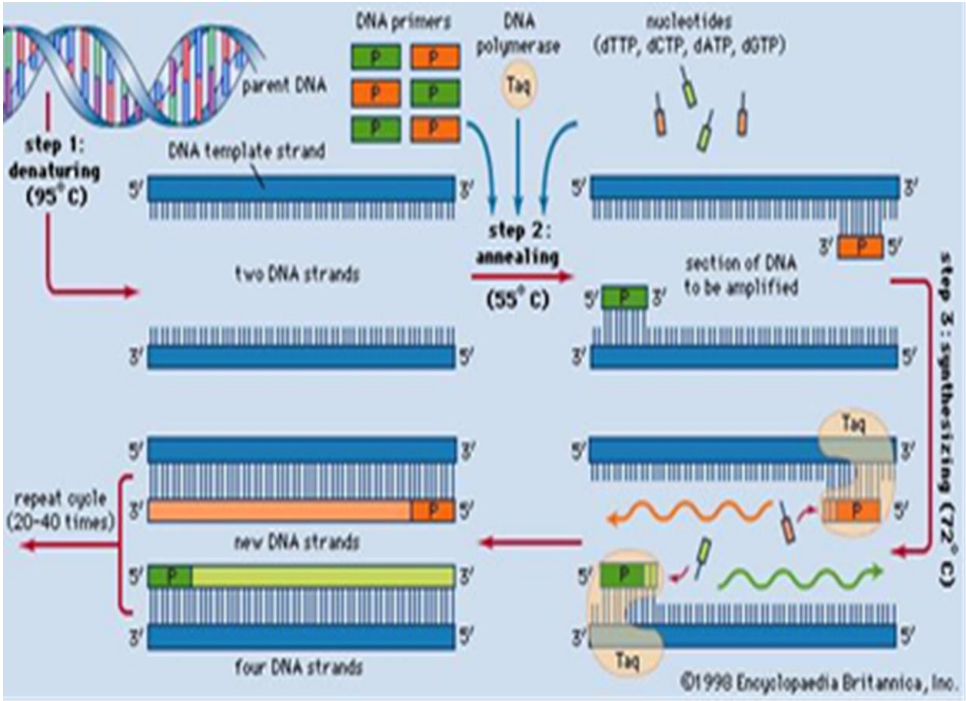
Rezultat je pozitivan ako se pojavila boja u točkama koje su označene za pojedini uzročnik. Negativan u slučaju kad se jedino na pozitivnoj kontrolnoj točki razvila obojenost (slika 4.2.).



Slika 4.2. Shema pozitivnog (lijevo) i negativnog (desno) rezultata SNAP® 4Dx® Plus testa. Pozitivan test indicira prisutnost *D. immitis* cirkulirajućeg antigena, te protutijela za *A. phagocytophilum / A. platys, B. burgdorferi* i *E. canis / E. ewingii.*

4.3. Lančana reakcija polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR)

Lančana reakcija polimerazom ili PCR metoda jest metoda kojom se eksponencijalno (u velikom broju kopija) umnožava ciljni dio DNA u uvjetima *in vitro*. Dio dvolančane DNA umnožava se s pomoću specifične DNA polimeraze, tzv. Taq polimeraze koja katalizira sintezu DNA, a dobiva se iz bakterije *Thermus aquaticus*. Shema PCR reakcije prikazana je na slici 4.3.



Slika 4.3. Shema lančane reakcije polimerazom, PCR (Izvor: www.britannica.com)

4.3.1. Izdvajanje DNA

Genomska DNA izdvojena je iz smrznute krvi uporabom komercijalnog kita ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, SAD). Uzorci smrznute krvi koji sadržavaju EDTA antikoagulans prethodno su odmrznuti na sobnoj temperaturi, a nakon toga miješani su 10 minuta u miješalici s rotacijom (*Rock'n Roller*, Labinco). Tijekom odmrzavanja bilo je vidljivo da u velikom broju uzoraka nije riječ o uzorcima pune krvi, i to zato što su pojedini uzorci bili srednje do jako zgrušani, a pojedini su uzorci bili izrazito rijetki, gotovo vodenasti. Iz uzoraka koji su bili zgrušani, postupak izdvajanja DNA bio je otežan te je pojedine korake bilo potrebno više puta ponavljati. Postupak izdvajanja DNA događa se u prostoriji u kojoj je smješten digestor i odgovarajuća oprema potrebna za rad (slika 4.4.).

Slika 4.4. Prostorija za izdvajanje DNA, Laboratorij za molekularnu dijagnostiku Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Nakon provedenog postupka miješanja u svaku tubicu od 1,5 ml otpipetira se 20 µl proteinaze K (PK) te doda 200 µl krvi i kratko promiješa. Nakon miješanja u istu tubicu dodaje se 200 µl pufera za staničnu razgradnju (CLD) te se kratko promiješa vrtložnom miješalicom (Vortex, Genius 3, Ika) u trajanju od 10 sek. Taj je postupak važan radi postizanja što bolje stanične razgradnje (lize). Uzorci su inkubirani 10 min. na 56 °C u termobloku (Thermo Shaker TS-100, Kisker). Nakon provedenog postupka inkubacije u uzorke krvi dodano je 250 µl pufera za vezanje (BBA) i snažno miješano 10 sekundi vrtložnom miješalicom. Taj je korak važan i radi postizanja stanične razgradnje te boljeg vezanja DNA na membranu. Ukupan volumen otopine svakog uzoraka premješten je u Relia Prep ™ Binding Columnu (kolonu) koja je prethodno stavljena u sabirnu tubicu. Uzorci se centrifugiraju u centrifugi (Mini Spin, Eppendorf) jednu minutu na 14 000 rpm (okretaja u minuti). Nakon centrifugiranja potrebno je provjeriti je li lizat potpuno prošao kroz kolonu. Ako je dio otopine zaostao u koloni, potrebno je centrifugirati još jednu minutu dok lizat potpuno ne prođe kroz membranu. Sabirna se tubica u kojoj se nalazi supernatant odbacuje, a kolona se prebacuje u novu sabirnu tubicu. Nakon toga u kolonu je odpipetirano 500 µl otopine za ispiranje Column Wash Solution (CWD) te centrifugirano tri minute na 14 000 rpm. Ako je lizat još prisutan na vrhu membrane, potrebno je centrifugirati još jednu minutu dok sav lizat ne prođe kroz membranu. Ispiranje kolone ponovljeno je još dva puta kako bi se uklonio preostali pufer. U završnoj fazi kolonu je potrebno premjestiti u čiste i označene tubice od 1,5 ml u koje je odpipetirano 100 µl Nuclease-Free Water (voda slobodna od nukleaza). Dobivenu otopinu (eluat) potrebno je centrifugirati jednu minutu na 14 000 rpm i nakon toga odbaciti kolumnu. U zadnjem koraku izdvajanja DNA tubice s otopljenom DNA pohranjene su na – 20°C.

4.3.2. Lančana reakcija polimerazom za umnožavanje ciljnog dijela DNA vrste *Dirofilaria immitis*

Za određivanje nukleotidnih sljedova ciljnoga gena 5.8S-ITS2-28S rDNA nematoda, (oblića) koji parazitiraju u lisica rabile su se početnice specifične za vrste parazita iz porodice *Onchocercidae* (*Spirurida*), a to su *Dirofilaria immitis* i *Dirofilaria repens* koje pripadaju rodu *Dirofilaria* te *Acanthocheilonema reconditum* koja pripada rodu *Acanthocheilonema*. Početnice su sintetizirane u Sigma Aldrich, SAD. Za PCR reakciju umnožavanja *D. immitis* rabile su se početnice DIDR-F1 i DIDR-R1 (RISHNIW i sur. 2006.).

Sljedovi su početnica sljedeći:

DIDR-F1 5′-AGT GCG AAT TGC AGA CGC ATT GAG-3'

DIDR-R1 5′-AGC GGG TAA TCA CGA CTG AGT TGA-3'

Početnice su prethodno otopljene u deioniziranoj vodi kako bi se dobila *stock* otopina u koncentraciji od 100 µM koja je pohranjena na temperaturi od – 20 ^{0}C. Nakon toga pristupilo se izradi „radne“ otopine. Za svaku početnicu pojedinačno napravljena je koncentracija od 10 µM koja se upotrebljavala u PCR reakciji. Za pripremu početnica i PCR reakcijskih smjesa koristimo se PCR kabinetom (slika 4.5.) koji je smješten u prostoriji u kojoj se nalazi i sva ostala odgovarajuća oprema za rad.

Slika 4.5. Kabinet za pripremu PCR reakcije,
Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Za PCR reakciju umnožavanja *D. immitis* iz uzoraka koji su bili pozitivni na SNAP® 4Dx® Plus testu, upotrebljavao se komercijalni kit GoTaq® Green Master Mix (Promega, SAD) koji sadržava sve potrebne optimizirane reagense: polimerazu, $MgCl_2$, dNTP-e i pufer.

PCR reakcija za umnožavanje ciljnog dijela DNA filarija sastoji se od smjese sljedećih reagencija: GoTaq® G2 Green Master Mixa u količini od 25,0 µl, 10 µM nizvodne početnice u količini 1.0 µl, 10µM uzvodne početnice u količini od 1.0 µl, 3 µl ciljne DNA i deionizirane vode u količini od 20 µl. Za PCR reakciju uzoraka rabile su se tubice od 200 µl, a ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 50 µl.

Izvođenje PCR reakcija omogućeno je uporabom uređaja GenAmp System 9700 (Applied Biosystems, SAD) (slika 4.6.).

Slika 4.6. Uređaj GenAmp System 9700 (Applied Biosystems, SAD).
Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

S obzirom na to da uspješnost PCR reakcije ovisi o određenim uvjetima u kojima se ona izvodi, za svaku su reakciju optimizirani uvjeti umnožavanja ciljne DNA.

Za PCR reakciju umnožavanje fragmenata DNA mikrofilarija *D. immitis* primjenom DIDR-F1 i DIDR-R1 početnica, PCR reakcija događala se u sljedećim uvjetima: početna aktivacija polimeraze na 95 ^{o}C u trajanju od dvije minute, a nakon toga uslijedila su 32 ciklusa razdvajanja lanaca na 95 ^{o}C u trajanju od 30 sekundi, sparivanja početnica na 60 ^{o}C u trajanju od 30 sekundi te produživanja početnica na 72 ^{o}C u trajanju od 30 sekundi. Konačno

produživanje umnoženih sljedova DNA događalo se na 72 ^{o}C u trajanju od sedam minuta. Temperatura se nakon postupka umnožavanja spušta na 4 ^{o}C, a PCR produkti pohranjuju na temperaturu hladnjaka do provođenja elektroforeze.

4.3.3. Elektroforeza PCR produkata na agaroznom gelu

Dobiveni produkti PCR reakcije provjeravaju se elektroforezom u 2-postotnom agaroznom gelu. Agarozni gel napravljen je tako da je u Erlenmeyerovu tikvicu u 100 ml pufera dodano 2,0 g agaroze (SeaKem ^{R} LE Agarose, Lonza) i 100 ml 1 x TAE pufer (Promega, SAD). To je zagrijano u mikrovalnoj pećnici do vrenja kako bi se agaroza otopila. Otopljenom agaroznom gelu, koji je prethodno ohlađen, dodano je 4 µl DNA boje (Diamond ^{TM} Nucleic Acid Day, Promega) i lagano promiješano kružnim okretanjem tikvice. Agaroza se dodatno ohladi na temperaturu izlijevanja (50 – 60 ^{o}C) na sobnoj temperaturi ili pod mlazom hladne vode. Za to vrijeme potrebno je pripremiti kalup. U kalup je potrebno staviti graničnike i češalj te lagano izlijevati agarozu. Ostaviti neko vrijeme na sobnoj temperaturi da se gel polimerizira (stvrdne). Nakon polimerizacije iz gela je uklonjen češalj, a gel je stavljen u kadicu za elektroforezu (SCIE-PLAS, UK) koja sadržava 1 x TAE pufer. PCR produkti nanose se u jažice na gelu u količini od 8 µl. Osim produkata u jednu od jažica nanosi se biljeg za utvrđivanje dvolančanih DNA molekula u veličini od 100 do 1500 pb (BenchTop 100 bp DNA Ladder, Promega) te u količini od 6 µl. (slika 4.7.).

Slika 4.7. Sustav za elektroforezu PCR produkata na agaroznom gelu (SCI PLAS, UK)
Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Elektroforeza se provodi u svrhu provjere umnožavanja istraživanog fragmenta te pojave mogućih dodatnih ili nespecifičnih fragmenata. Nakon elektroforeze u trajanju od tri sata na sobnoj temperaturi pri naponu od 80 V i 8 mA pristupa se vizualizaciji dobivenih rezultata s pomoću UV transiluminatora s plavim svjetlom (Safe imager, Invitrogen). Gel na koji su naneseni PCR produkti, fotografira se kamerom (Uvitec, UK), a slike se pohranjuju na CF memorijsku karticu (slika 4.8.).

Slika 4.8. UV transiluminator s plavim svjetlom (Safe imager, Invitrogen) i kamera (Uvitec, UK) Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

4.4. Umnožavanje regija u 16S rRNA odsječku genoma *Anaplasma phagocytophilum* ugniježđenom lančanom reakcijom polimeraze

Za ugniježđenu lančanu reakciju polimeraze rabila su se dva para početnica (LIZ i sur. 2002.).

Vanjski par početnica:

ge3a 5′-CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC-3'

ge10r 5′-TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC-3'

Unutarnji par početnica:

ge9f 5′-AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT-3'

ge2 5′-GGCAGTATTAAAAGCAGCTCCAGG-3'

Početnice su sintetizirane u Sigma Aldrich, SAD.

Izravni PCR obavljen je uporabom para početnica ge3a/ge10r (LIZ i sur. 2002.) s pomoću kojeg se umnoži odsječak veličine 932 bp upotrebom komercijalnog kompleta ALLinTM Red Taq Mastermix, 2 x kit (highQu). Reakcijskoj smjesi volumena 44 µL (tablica 4.2.) dodavalo se po 6 µL DNA.

Tablica 4.2. Sastav PCR reakcijske smjese volumena 50 µl

Sastojak	**Volumen**
ALLinTM Red Taq Mastermix, 2 x	25 µl
sterilna voda oslobođena od nukleaza	17 µl
homologna početnica (10 µM)	1,0 µl
komplementarna početnica (10 µM)	1,0 µl

Reakcijski ciklusi PCR reakcije provodili su se u uređaju Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, SAD) kako je navedeno u tablici 4.3.

Tablica 4.3. Reakcijski ciklusi PCR reakcije za umnožavanje regija unutar 16S rRNA odsječka genoma *A. phagocytophilum*

Naziv koraka	Početna denaturacija	40 ciklusa umnožavanja			Završno produživanje lanca
		denaturacija	sparivanje početnica i kalupa (*annealing*)	produživanje lanca	
vrijeme / temperatura	1' / 95 °C	15" / 95 °C	15" / 60 °C	1' / 72 °C	5' / 72 °C

Budući da umnoženi odsječci veličine 932 bp nisu vidljivi nakon elektroforetske analize u 1,5-postotnom agaroznom gelu, rabili su se kao kalup za ugniježđeni PCR uz par početnica ge9f/ge2 (LIZ i sur. 2002.). Na taj se način umnoži odsječak veličine 546 bp upotrebom komercijalnog kompleta ALLin Red Taq Mastermix, 2 x (highQu). Reakcijskoj smjesi volumena 44 µL (tablica 1.) dodavalo se po 6 µL produkta izravnog PCR-a, a reakcijski ciklusi provodili su se u istom uređaju prema obrascu navedenom u tablici 4.3.

4.5 Umnožavanje regija unutar GroEL odsječka genoma *Anaplasma phagocytophilum* semi-ugniježđenom lančanom reakcijom polimeraze

Za semiugniježđenu lančanu reakciju polimeraze rabila su se dva para početnica (ALBERTI i sur. 2005.).

Vanjski par početnica:

EphplgroEL(569)F 5'-ATGGTATGCAGTTTGATCGC-3'
EphplgroEL(1193)R 5'-TCTACTCTGTCTTTGCGTTC-3'
Unutarnji par početnica:
EphplgroEL(569)F 5'-ATGGTATGCAGTTTGATCGC-3'
EphgroEL(1142)R 5'-TTGAGTACAGCAACACCACCGGAA-3'

Izravni PCR obavljen je uporabom para početnica EphplgroEL(569)F/ EphplgroEL(1193)R (ALBERTI i sur. 2005.) s pomoću kojeg se umnoži odsječak veličine 750 bp upotrebom komercijalnog kompleta ALLinTM Red Taq Mastermix, 2 x kit (highQu). Reakcijskoj smjesi volumena 44 µL (tablica 4.2.) dodavalo se po 6 µL DNA.

Reakcijski ciklusi PCR reakcije provodili su se u uređaju Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, SAD), kako je navedeno u tablici 4.4.

Tablica 4.4. Reakcijski ciklusi PCR reakcije za umnožavanje regija unutar groEL odsječka genoma *A. phagocytophilum*

Naziv koraka	Početna denaturacija	35 ciklusa umnožavanja			Završno produživanje lanca
		sparivanje početnica i kalupa (*annealing*)	produživanje lanca	sparivanje početnica i kalupa (*annealing*)	
vrijeme / temperatura	1' / 95 °C	15" / 95 °C	15" / 55 °C	1' / 72 °C	10' / 72 °C

Budući da umnoženi odsječci veličine 750 bp nisu vidljivi nakon elektroforetske analize u 1,5-postotnom agaroznom gelu, rabili su se kao kalup za semiugniježđeni PCR uz par početnica EphplgroEL(569)F / EphgroEL(1142)R (ALBERTI i sur. 2005.). Na taj se način umnoži odsječak veličine 573 bp upotrebom komercijalnog kompleta ALLin Red Taq Mastermix, 2 x (highQu). Reakcijskoj smjesi volumena 44 µL (tablica 4.2.) dodavalo se po 6 µL produkta izravnog PCR-a, a reakcijski ciklusi provodili su se u istom uređaju prema obrascu navedenom u tablici 4.4.

4.5.1. Elektroforeza umnoženih odsječaka u agaroznom gelu

Elektroforeza se izvodila u 1,5-postotnom agaroznom gelu veličine 100 x 115 x 40 mm (širina x duljina x visina) priređenom u 1 x TAE puferu. Isti se pufer rabio i tijekom elektroforeze. Rastopljenom se gelu prije izlijevanja u nosač dodala odgovarajuća količina etidijeva bromida (0,4 µl etidijeva bromida u 40 ml gela). Elektroforeza se provodila tijekom 60 minuta pri sobnoj temperaturi uz primjenu inicijalnog napona od 70 V. Nakon što su uzorci krenuli iz jažica napon se povećao na 90 V. U jažice se stavljalo 9 µL PCR produkta koji sadržava obojeni pufer za elektroforezu (*Red electrophoresis tracking dye* sadržan u kompletu za PCR, ALLin Red Taq Mastermix). Obojeni pufer olakšava unošenje uzoraka u jažice i praćenje tijeka elektroforeze. Kao standard za određivanje veličine u parovima baza (bp) rabilo se 5 µl markera (Take5 100bp DNA Ladder, highQu). Rezultati su očitani s pomoću UV transiluminatora (Vilber Lourmat, Torcy, Francuska).

4.5.2. Ekstrakcija DNA (PCR produkata) iz agaroznog gela i njezino pročišćavanje

U slučajevima u kojih se kao rezultat ugniježđene PCR reakcije uz prethodnu reverznu transkripciju pojavilo nespecifično umnožavanje, odnosno gdje se nakon agarozne elektroforeze osim odsječaka očekivane veličine, uočavaju i oni nespecifični, proveden je postupak ekstrakcije i pročišćavanja ciljne DNA iz agaroznog gela. Postupak je proveden uporabom komercijalnog kompleta reagensa Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega, SAD) u skladu s uputama proizvođača.

Komplet Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System rabi se za pročišćavanje DNA odsječaka veličine od 100 bp do 10 kb iz standardnih ili *low-melting* agaroznih gelova slabije topivosti pripremljenih u TAE ili u TBE puferu. PCR produkti pročišćavaju se kako bi se uklonili

nepotrebni nukleotidi i početnice, ali kao što je navedeno, i nespecifični amplikoni. Nakon što se elektroforezom razdvoje umnoženi DNA odsječci, ciljna se linija izrezuje i komadić gela se otapa u otopini za vezanje za membranu koja sadržava guanidin-izotiocijanat. Otopljeni komadić gela nanosi se na silikatnu membranu kolone. Nakon vezanja za silikatnu membranu mogući se kontaminanti učinkovito ispiru uporabom pufera za ispiranje, a umnoženi odsječak od interesa odstrani se vodom.

Komplet Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System može se upotrebljavati za pročišćavanje linearnih DNA odsječaka, superzavijene plazmidne DNA, jednolančane linearne ili cirkularne DNA.

Prije prve uporabe kompleta potrebno je koncentriranoj otopini za ispiranje membrane dodati odgovarajuću količinu 96-postotnog pa do 100-postotnog etanola, prema uputama proizvođača.

4.5.3. Razdvajanje umnoženih DNA odsječaka

Obavlja se s pomoću elektroforeze u 2-postotnom agaroznom gelu veličine 100 x 115 x 40 mm (širina x duljina x visina) pripremljenom u 1 x TBE puferu. U jažice 2-postotnog agaroznog gela nanosi se po 50 µL PCR produkta svakog uzorka pomiješanog s 10 µL obojenog pufera za elektroforezu (10 x Blue Juice Gel Loading Buffer, Invitrogen, SAD). Rezultati su očitavani s pomoću UV transiluminatora (Vilber Lourmat, Torcy, Francuska), a sterilnim skalpelom izrezivali su se DNA odsječci odgovarajuće veličine.

4.5.4. Otapanje izrezanog komadića gela

Obavljeno je s pomoću otopine za vezanje za membranu. Najprije se izvažu prazne epruvete volumena 1,5 ml, a zatim epruvete u koje je dodan komadić gela. Masa izrezanog komadića gela jednaka je razlici mase epruvete koja sadržava komadić gela i mase prazne epruvete. Prema masi izrezanog komadića gela određuje se volumen otopine za vezanje za membranu koji je potreban za otapanje (za 10 mg komadića gela potrebno je 10 µl otopine za vezanje za membranu). Smjesa komadića gela i otopine za vezanje za membranu vorteksira se i inkubira tijekom deset minuta pri temperaturi od 50 °C do 65 °C.

4.5.5. Vezanje umnoženog odsječka DNA za silikatnu membranu

Obavlja se u posebnim kolonama koje se uklapaju u sabirne epruvete za centrifugiranje od 2,0 mL. Otopina komadića gela nanosila se na kolonu, inkubirala jednu minutu pri sobnoj temperaturi te centrifugirala jednu minutu pri najvećem broju okretaja. Kolona za vrijeme centrifugiranja propušta tekući sadržaj u sabirnu epruvetu, a DNA se veže za membranu. Sabirna epruveta i filtrat odbacuju se u posudu za otpad, a kolona stavlja u novu sabirnu epruvetu.

4.5.6. Ispiranje silikatne membrane kolone

Obavlja se tako da se 700 µl otopine za ispiranje membrane nanosi na kolumnu, centrifugira jednu minutu pri najvećem broju okretaja. Sabirna se epruveta i filtrat zatim odbacuju u posudu za otpad, a kolona se stavlja u novu sabirnu epruvetu. Na kolonu se nanosi 500 µl otopine za ispiranje membrane, centrifugira pet minuta pri najvećem broju okretaja. Zatim se odbacuje sabirna epruveta i filtrat, a kolona se stavlja u novu sabirnu epruvetu. Na kraju se silikatna membrana posuši i pročišćava od ostataka etanola centrifugiranjem jednu minutu pri najvećem broju okretaja.

4.5.7. Izdvajanje čiste DNA (elucija)

Postiglo se uklapanjem kolone u čistu 1,5 ml epruvetu uz dodatak 50 µl sterilne, deionizirane vode izravno na silikatnu membranu. Sadržaj se inkubira tijekom jedne minute na sobnoj temperaturi, zatim centrifugira jednu minutu pri najvećem broju okretaja. Kolona se odbacuje, a filtrat je umnoženi odsječak DNA koji se čuva na – 20 ºC. Izdvojena i pročišćena DNA ponovno se podvrgne elektroforezi kako bi se uvjerilo u učinkovitost postupka.

4.5.8. Određivanje primarne strukture DNA (sekvenciranje)

Pročišćeni PCR produkti poslani su na sekvenciranje u tvrtku Macrogen Inc. (Amsterdam, Nizozemska). Kako bi se utvrdio slijed nukleotida, dobiveni su kromatogrami analizirani s pomoću programa Sequencher 5.4.6 (http://www.genecodes.com, Genes Codes Corporation).

4.6. Metoda lančane reakcije polimerazom za umnožavanje ciljnog dijela DNA *Borrelia burgdorferi*

4.6.1. Izdvajanje DNA

Za izdvajanje DNA rabio se komercijalni komplet NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Njemačka). Nakon što su se uzorci odmrznuli na sobnoj temperaturi, usitnjeni su sterilnim instrumentima u mikrobiološkoj biozaštitnoj komori.

Postupak: 25 mg tkiva izreže se na komadiće koji se stave u epruvetu za mikrocentrifugu, dodaje se 180 µl pufera T1 i 25 µl otopine proteinaze K i inkubira na 56 °C dok se ne dobije potpuna liza (najmanje 1 – 3 h) uz povremeno miješanje. Dodaje se 200 µl pufera B3, zatim se deset minuta inkubira na 70 °C. U uzorak se dodaje 210 µl etanola (96 – 100 %), centrifugira se tijekom jedne minute na 11 000 rpm. Za pranje membrane dodaje se 500 µl pufera BW i centrifugira jednu minutu na 11 000 rpm, a zatim 600 µl pufera B5 i centrifugira ponovno jednu minutu na 11 000 rpm. Nakon toga membrana se suši ponovnim centrifugiranjem jednu minutu na 11 000 rpm, čime se uklanja zaostali etanol, a zatim se u 1,5 ml epruvetu za mikrocentrifugu dodaje 100 µl pufer BE. Inkubira se na sobnoj temperaturi jednu minutu te centrifugira jednu minutu na 11 000 rpm.

Nakon izdvajanja svi su uzorci DNA pohranjeni na – 20 °C do provođenja lančane reakcije polimerazom.

4.6.2. Dokaz prisutnosti bakterije *Borrelia burgdorferi* metodom ugniježđene lančane reakcije polimerazom

Ugniježđena PCR metoda provodi se u dva dijela pri čemu se upotrebljavaju dva različita para početnica u dvjema odvojenim reakcijama. U vanjskoj PCR reakciji umnožava se specifični odsječak DNA koji kodira OspA protein bakterije *B. burgdorferi* (GUY i STANEK, 1991.). Dobiveni PCR proizvod služi kao kalup za unutarnju PCR reakciju u kojoj se umnožava manji dio PCR produkata vanjske PCR reakcije čime se povećava osjetljivost i specifičnost same PCR metode. Dvadeset nasumično odabranih uzoraka uške pretraženo je s pomoću ugniježđene PCR metode. Početnice i njihovi sljedovi baza (GUY i STANEK, 1991.) navedeni su u tablici 4.5.

Tablica 4.5. Početnice korištene u vanjskoj i unutarnjoj ugniježđenoj PCR reakciji

Ciljni protein	Naziv početnice	Nukleotidni slijed baza početnice	Veličina PCR proizvoda
OspA (vanjski dio PCR reakcije)	N1	5'-GAGCTTAAAGGAACTTCTGATAA-3'	560 pb
	C1	5'-GTATTGTTGTACTGTAATTGT-3'	
OspA (unutarnji dio PCR reakcije)	N2	5'-ATGGATCTGGAGTACTTGAA-3'	351 pb
	C2	5'-CTTAAAGTAACAGTTCCTTCT-3'	

Sve kemikalije koje su se upotrebljavale u vanjskom dijelu ugniježđene PCR reakcije navedene su u tablici 4.6., a u tablici 4.7. navedene su kemikalije koje su se rabile u unutarnjem dijelu ugniježđene PCR reakcije.

Tablica 4.6. Prikaz kemikalija koje čine PCR smjesu za vanjski dio ugniježđene PCR reakcije

	za 1 uzorak (µl)
Emerald PCR mix	12
Vanjska početnica F: N1 (10 µm)	0,5
Vanjska početnica R: C1 (10 µm)	0,5
dH20	9,5

V= 22,5 µl PCR smjese + 2,5 µl DNA / uzorak

Tablica 4.7. Prikaz kemikalija koje čine PCR smjesu za unutarnji dio ugniježđene PCR reakcije

	za 1 uzorak (µl)
Emerald PCR mix	12
Unutarnja početnica F: N2 (10 µm)	0,5
Unutarnja početnica R: C2 (10 µm)	0,5
dH20	11

V= 24 µl PCR smjese +1 µl PCR produkt vanjske PCR reakcije / uzorak

4.7. Primijenjene epidemiološke i statističke metode

Statistička analiza uključivala je deskriptivnu statistiku, distribuciju frekvencija, testove značajnosti i neparametrijske testove: Mann-Whitneyev test kad su testirane dvije skupine i Kruskal-Wallisova analiza za višestruku analizu. Za binarne i kategorijske varijable statistički znatne razlike u seroprevalenciji među skupinama procijenjene su s pomoću hi-kvadrat statistike za više od dvije uključene skupine i Fisherova egzaktnog testa samo za dvosmjerne usporedbe. Sva seroprevalencija uzorka procijenjena je za cijelu populaciju izračunavajući standardnu pogrešku (*standard error,* SE) i granicu pouzdanosti od 95 % (*confidence interval,* CI 95 %).

Kako bi se procijenila snaga povezanosti između infekcije i čimbenika rizika, uključujući zemljopisni položaj (županije), pasminu, dob i spol, računao se omjer prevalencije (engl. *prevalence ratio,* PR) kao i omjer vjerojatnosti (engl. *odds ratio*, OR) i odgovarajući interval pouzdanosti od 95 %. Da bi se pružile valjane procjene snage povezivanja među skupinama, provedena je logistička regresijska analiza (HOSMER i LEMESHOW, 2000.). Važnost među skupinama uzeta je na razini od 5 % ($p < 0,05$) za dvosmjerni test. Sve statističke i epidemiološke analize provedene su s pomoću softvera STATISTICA 12 i WinEpiscope ver. 2.

4.8. Računalne analize nukleotidnih sljedova

Pri računalnim analizama dobivenih sekvenci rabili su se sljedeći programi i programski paketi:

- ClustalX, verzija 1.83 (THOMPSON i sur. 1997.) za višestruko sravnjivanje sekvenci u svrhu pronalaska mjesta promjena/mutacija u istraživanim nukleotidnim sljedovima te pripremu podataka za filogenetsku analizu.
- BioEdit, verzija 7.0.5.3 (HALL 1999.) za uređivanje sravnjenih sekvenci.
- MEGA, verzija 5.0. (TAMURA i sur. 2011.) za filogenetske i molekularnoevolucijske analize primjenom različitih metoda i postupaka.
- BLAST (ALTSCHUL i sur. 1990.) za pretraživanje baza podataka (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

5. REZULTATI

5.1. Rezultati testiranja lisica SNAP® 4Dx® Plus testom

Od 179 uzoraka lisica prikupljenih na istraživanom području sjeverne i središnje Hrvatske, brzim dijagnostičkim SNAP® 4Dx® Plus testom koji se rabi za detekciju cirkulirajućeg antigena *Dirofilaria immitis*, protutijela *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum* i *Ehrlichia canis / Ehrlichia ewingii*, potvrđeno je da je pozitivno 30 lisica (tablica 5.2.) ili njih 16,76 % (CI 95 %, 11,29 – 22,23 %). Broj pretraženih i pozitivnih lisica po područjima (lovištima) prikazan je u Prilogu 1. Ukupno 179 lisica bilo je sa 127 područja sjeverne i središnje Hrvatske uključujući devet županija središnje i sjeverne Hrvatske, a 22 lisice bile su iz Požeško-slavonske županije. Testiranjem je utvrđeno da razlika u broju pretraženih lisica po staništima (lovištima) i područjima, tj. županijama, nije bila velika, što ukazuje na ujednačenost uzoraka po područjima (tablica 5.1. i slika 5.1.) te njihovu randomiziranost i reprezentativnost u interpretaciji podataka.

Tablica 5.1. Broj pretraženih staništa (lovišta) i lisica u pojedinoj županiji

Županija	Broj staništa (lovišta)	Broj pregledanih lisica	Minimalno – maksimalno		Srednja vrijednost	SD
Zagrebačka	33	53	1	5	1,61	0,99
Krapinsko-zagorska	13	17	1	3	1,31	0,63
Sisačko-moslavačka	17	21	1	3	1,24	0,56
Karlovačka	18	26	1	4	1,44	0,78
Varaždinska	8	13	1	4	1,50	1,07
Bjelovarsko – bilogorska	4	4	1	1	1,00	0,00
Požeško- slavonska	18	22	1	2	1,22	0,43
Međimurska	12	19	1	3	1,58	0,90
Grad Zagreb	4	4	1	1	1,00	0,00
Ukupno	127	179	1	5	1,40	0,78

Zbirni rezultat broja pretraženih i pozitivnih lisica po županijama prikazan je u tablici 5.2., a po spolu i dobi u tablicama 5.3. i 5.4.

U tablici 5.2. vidljivo je da je najveći postotak pozitivnih lisica dobiven SNAP® 4Dx® Plus testom utvrđen u Karlovačkoj županiji (38,45 %, CI 95 %, 19,75 – 57,15 %), a najmanji u Varaždinskoj županiji (7,70 %, CI 95 %, 6,79 – 22,19 %) (P < 0,05). Testiranjem proporcija statistički bitne razlike utvrđene su još između Karlovačke županije te Zagrebačke, Požeško-slavonske i Međimurske županije (P < 0,05).

Tablica 5.2. Broj pregledanih i pozitivnih lisica po županijama

Županija	Broj staništa (lovišta)	Broj pregledanih lisica	Pozitivno		95 % CI	SE
	N	N	N	%	%	
Zagrebačka	33	53	7	13,21[2]	4,09 – 22,33	0,046
Krapinsko-zagorska	13	17	2	11,76	-3,55 – 27,07	0,078
Sisačko-moslavačka	17	21	4	19,05	2,25 – 35,85	0,028
Karlovačka	18	26	10	38,45[1,2]	19,75 – 57,15	0,095
Varaždinska	8	13	1	7,70[1]	-6,79 – 22,19	0,074
Bjelovarsko-bilogorska	4	4	1	25,00	-17,44 – 67,44	0,217
Požeško-slavonska	18	22	2	9,09[2]	2,92 – 21,10	0,061
Međimurska	12	19	2	10,53[2]	-3,73 – 24,33	0,070
Grad Zagreb	4	4	1	25,00	-17,44 – 67,44	0,217
Ukupno	127	179	30	16,76	11,29 – 22,23	0,028

[1,2] P < 0,05

Spol je utvrđen u 175 jedinki među kojima je bilo 108 muških ili 59,78 % i 67 ženskih ili 37,43 %, a četirima jedinkama spol nije određen. Od 108 pretraženih muških životinja ukupno je bilo 12,96 % (N = 14, CI 95 %, 6,63 – 19,29 %) pozitivnih, a od ženskih lisica pozitivnih je bilo 22,39 % (N = 15, CI 95 %, 12,41 – 32,38 %). Dobivene razlike nisu pokazale statistički važnu razliku između ukupno pozitivnih muških i ženskih životinja (P = 0,10, $\chi 2$ =2,66) (tablica 5.3.).

Tablica 5.3. Broj pregledanih i pozitivnih lisica po spolu (N = 175)

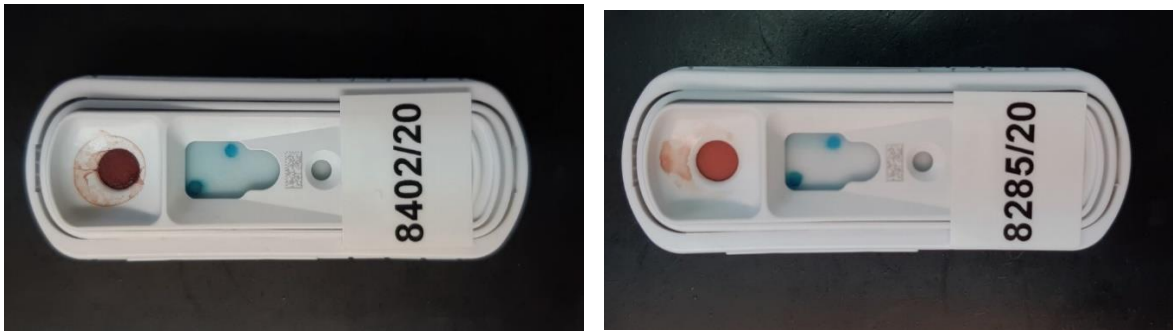
Spol	Broj pregledanih	Pozitivno		95 % CI	SE
		N	%	%	
muško	108	14	12,96	6,63 – 19,29	0,032
žensko	67	15	22,39	12,41 – 32,38	0,051
ukupno	175	29	16,57	11,06 – 22,08	0,028

Od ukupno 133 lisice kojima je određena dob, test SNAP® 4Dx® Plus bio je pozitivan u 24 lisice ili u njih 18,05 %. Najveći udio inficiranih lisica utvrđen je u mlađih dobnih skupina, i to u dobi do jedne godine (20,00 %, CI 95 %, 0,24 – 40,24 %) te u dobi od jedne do dvije godine (21,43 %, CI 95 %, 10,69 – 32,18 %), dok je manji postotak pozitivnih lisica utvrđen u lisica dobne skupine od tri (16,13 %, CI 95 %, 3,18 – 29,08 %) i četiri godine (12,50 %, CI 95 %, 3,71 – 28,71 %) godine. Međutim, statistički važne razlike u proporciji nađenih pozitivnih lisica prema dobnoj strukturi nisu nađene (P = 0,3228, $\chi 2$ = 0,978). U tablici 5.4. prikazan je broj pregledanih i pozitivnih lisica prema dobi.

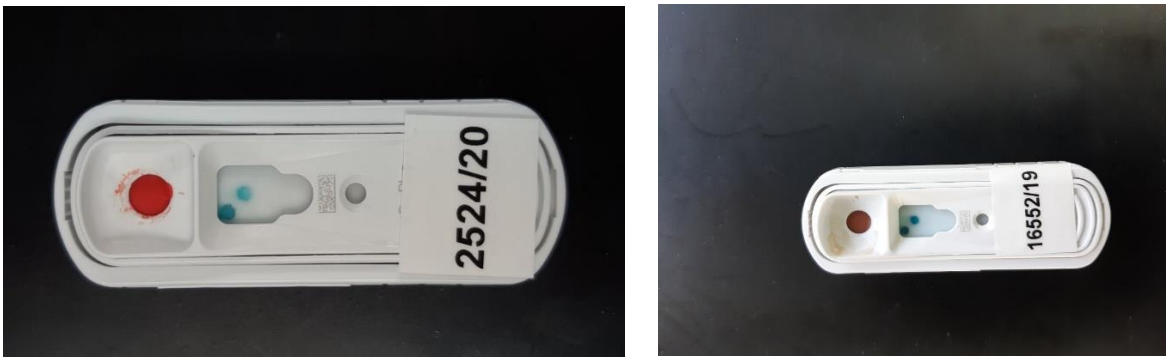
Tablica 5.4. Broj pregledanih i pozitivnih lisica po dobi (N = 133)

Dob (godine)	Broj pregledanih	Pozitivno		95 % CI	SE
		N	%	%	
0 – 1	15	3	20,00	-0,24 – 40,24	0,103
1 – 2	56	12	21,43	10,69 – 32,18	0,055
2 – 3	31	5	16,13	3,18 – 29,08	0,067
3 – 4	16	2	12,50	-3,71 – 28,71	0,083
4 – 5	6	0	0	0	0
5 – 6	6	2	33,33	-4,39 – 71,04	0,192
6 – 7	3	0	0	0	0
Ukupno	133	24	18,05	11,51 – 24,59	0,033

S obzirom na pojedinog uzročnika utvrđeno je 12 ili 6,70 % (CI 95 %, 3,20 – 10,19 %) pozitivnih uzoraka na cirkulirajući antigen *Dirofilaria immitis* (slika 5.1.) i u 18 ili 10,05 % (CI 95 %, 5,8 – 14,25 %) jedinki test je bio pozitivan na protutijela za *Anaplasma phagocytophilum / A. platys* (slika 5.2.). Drugim riječima, lisice su 1,63 puta više izložene anaplazmi nego dirofilariji, ali ta razlika nije statistički važna (P = 0,2526, $\chi 2$ = 1,309). Za ostale vektorski prenosive bolesti koje su tim testom ispitivane, a to su *Borrelia burgdorferi* i *Ehrlichia canis / Ehrlichia ewingii,* protutijela nisu utvrđena.

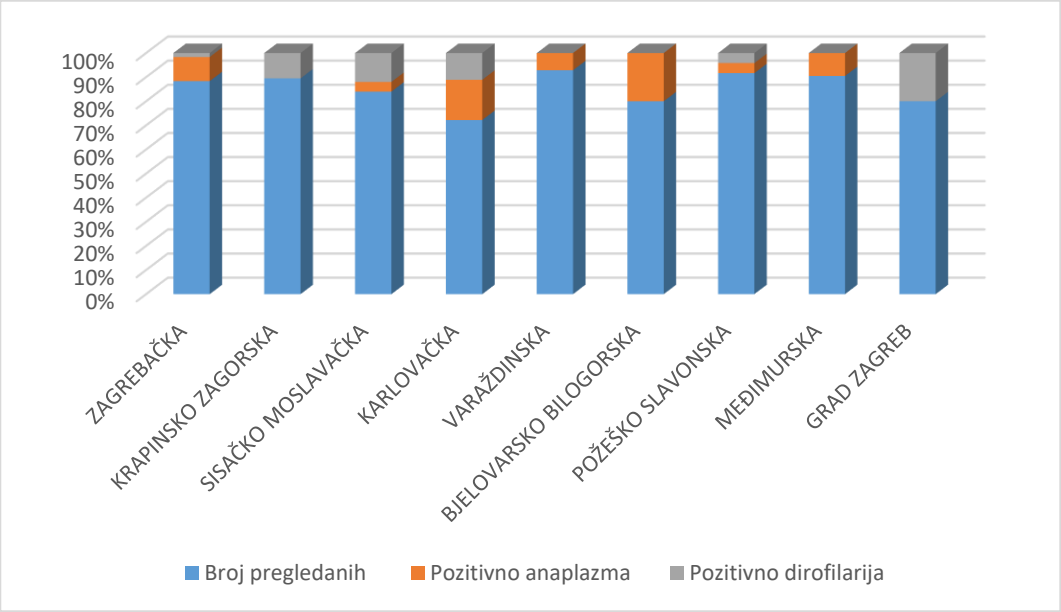


Slika 5.1. Pozitivan rezultat SNAP® 4Dx® Plus testa na *D. immitis*
(plava točka gore)



Slika 5.2. Pozitivan rezultat SNAP® 4Dx® Plus testa na *A. phagocytophilum / A. platys*
(plava točka u sredini)

Na grafikonu 5.1. i u tablici 5.5. prikazan je broj pregledanih i pozitivnih lisica prema nađenim uzročnicima po županijama.



Grafikon 5.1. Broj pregledanih i pozitivnih lisica prema nađenom uzročniku po županijama

U tablici 5.5. i grafikonu 5.1. vidljivo je da unutar županija postoji razlika u broju lisica kod kojih su nađena protutijela za anaplazmu. Iako je najveća seroprevalencija anaplazme ustanovljena u Bjelovarsko-bilogorskoj (25,00 %; CI 95 % -17,43 - 67,44 %) i Karlovačkoj (23,08 %; CI 95 % 6,88 – 39,28 %) županiji u odnosu na ostale županije ta razlika nije bila statistički značajna (P > 0,05).

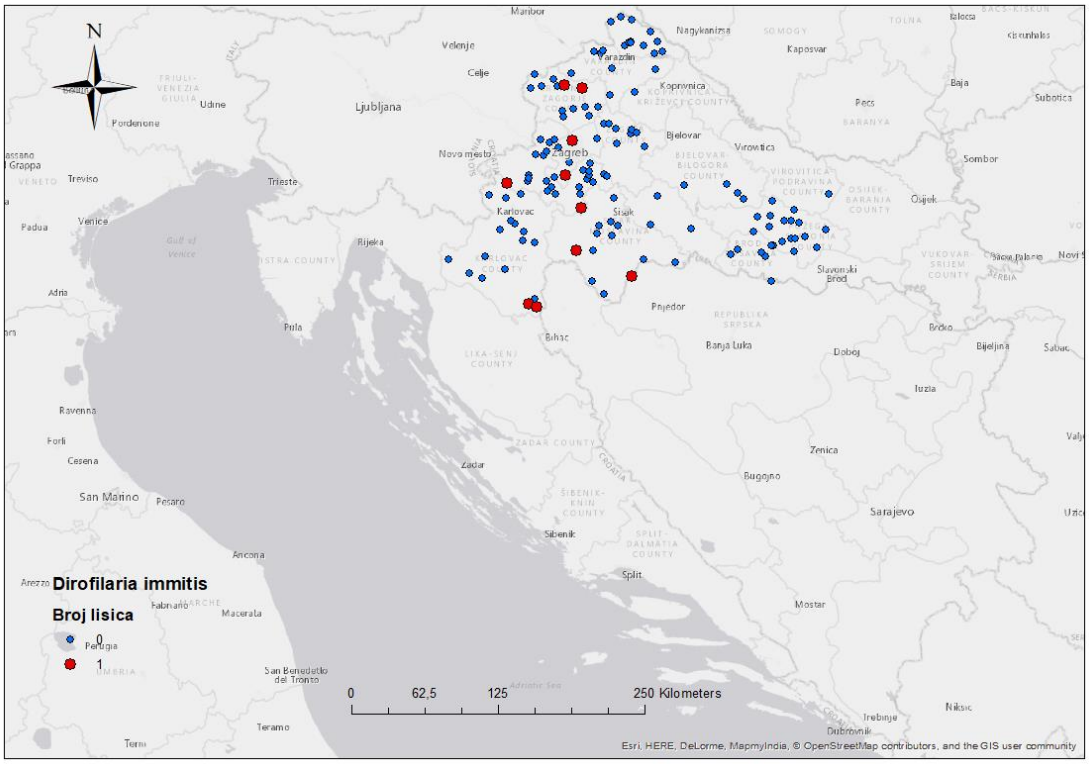
No, istovremeno testiranjem razlika pozitivnih lisica na cirkulirajući antigen *D. immitis* između županija, utvrđen je statistički znatno manji broj pozitivnih lisica u Zagrebačkoj županiji (1,89 %, CI 95 %, 1,76 – 5,56 %) u usporedbi s ostalim županijama (P < 0,05). Međutim, u najvećem broju županija taj je postotak bio podjednak i kretao se u rasponu od 11,76 % (CI 95 %, 3,55 – 27,07 %) (Krapinsko-zagorska županija) do 15,39 % (CI 95 %, 1,52 – 29,06 %) (Karlovačka županija) (P > 0,05). *D. immitis* nije nađena u Varaždinskoj, Međimurskoj i Bjelovarsko-bilogorskoj županiji.

Tablica 5.5. Broj pregledanih i pozitivnih lisica i procjena prevalencije vrstama *Anaplasma phagocytophilum / A. platys* i *D. immitis* u populaciji lisica u pojedinim županijama

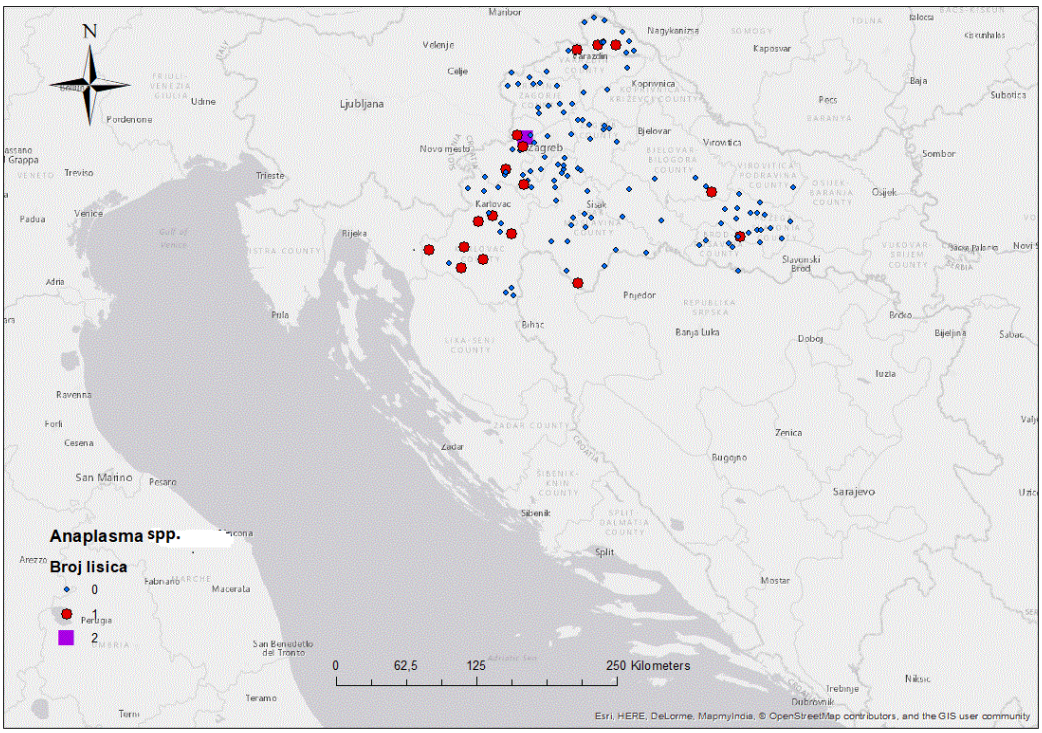
Županija	Broj pregledanih lisica	Pozitivne na dirofilariju		CI 95 %		Pozitivne na anaplazmu		CI 95 %		P	χ2
		N	%	-	+	N	%	-	+		
Zagrebačka	53	1	1,89*	-1,76	5,56	6	11,32	2,79	19,85	0,0506	3,820
Krapinsko-zagorska	17	2	11,76	-3,55	27,07	0	0	0	0	0,145	2,124
Sisačko-moslavačka	21	3	14,29	-0,68	29,28	1	4,76	-4,35	13,87	0,2928	1,107
Karlovačka	26	4	15,39	1,52	29,06	6	23,08	6,88	39,28	0,4818	0,495
Varaždinska	13	0	0	0	0	1	7,69	-6,79	22,17	0,3079	1,040
Bjelovarsko-bilogorska	4	0	0	0	0	1	25,00	-17,43	67,44	0,2850	1,143
Požeško-slavonska	22	1	4,55	-4,16	3,26	1	4,55	-4,16	13,76	1,00	0,00
Međimurska	19	0	0	0	0	2	10,53	-3,27	24,33	0,1462	2,112
Grad Zagreb	4	1	25,00	-17,45	67,44	0	0	0	0	0,2850	1,143
Ukupno	179	12	6,70	3,03	10,36	18	10,06	5,65	14,46	0,063	3,46

*statstički značajna razlika, $P < 0,05$

Pozitivne i negativne lisice prema lokaciji uzorkovanja prikazane su za *D. immitis* na slici 5.3., a za *Anaplasma phagocytophilum / A. platys* na slici 5.4.



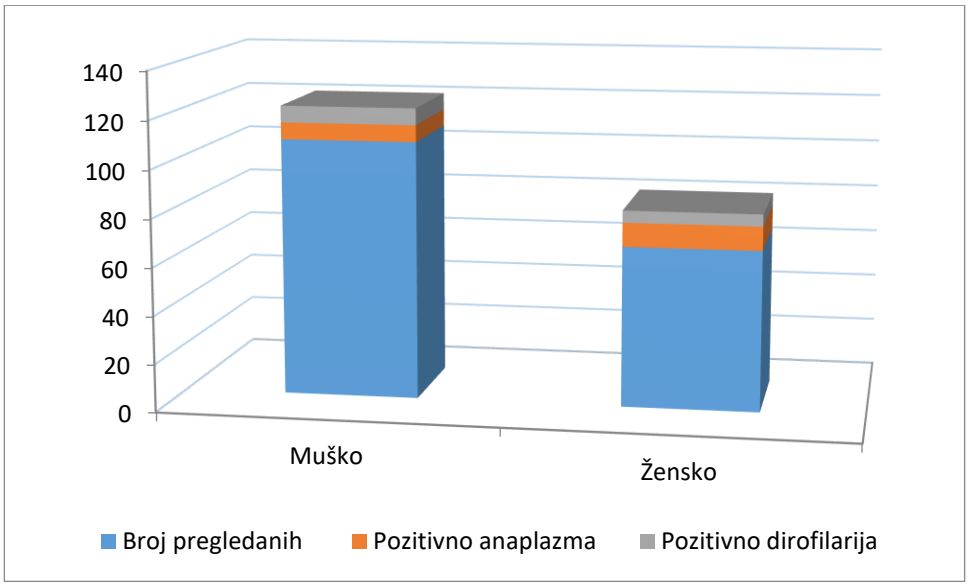
Slika 5.3. Pregled pozitivnih i negativnih lisica za *D. immitis* prema lokaciji uzorkovanja



Slika 5.4. Pregled pozitivnih i negativnih lisica za *A. phagocytophilum / A. platys* prema lokaciji uzorkovanja

SNAP® 4Dx® Plus testom protutijela za *A. phagocytophilum* nisu utvrđena u Krapinsko-zagorskoj županiji i Gradu Zagrebu. U ostalim su županijama utvrđena, i to u rasponu od 4,55 % (CI 95 %, 4,16 – 13,76 %) (Požeško-slavonska) do 23,08 % (CI 95 %, 6,88 – 39,28 %) (Karlovačka županija). Testiranjem proporcija nije utvrđena statistički bitna razlika. U testiranje proporcija nisu bile uključene Bjelovarsko-bilogorska županija i Grad Zagreb zbog malog broja pregledanih lisica (N = 4).

Na grafikonu 5.2. i u tablici 5.6. prikazan je broj pregledanih i pozitivnih lisica prema nađenim uzročnicima po spolu.



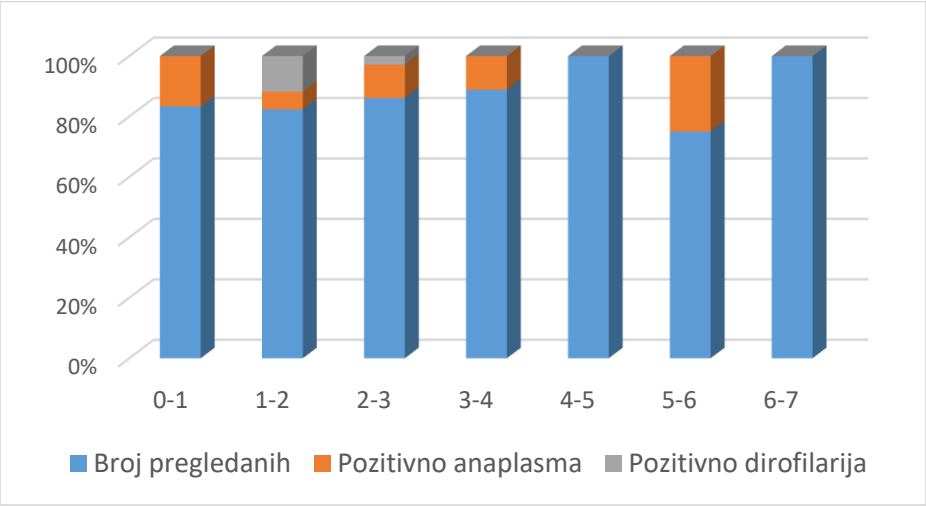
Grafikon 5.2. Broj pregledanih i pozitivnih lisica prema uzročnicima po spolu

U tablici 5.6. vidljivo je da prema spolnoj strukturi istraživane populacije lisica u odnosu na pozitivan rezultat testa prema uzročniku, dobivena razlika nije bila statistički bitna ($P > 0,05$). Broj pozitivnih muških i ženskih lisica koji su pokazali pozitivnu reakciju na cirkulirajući antigen *D. immitis* bila je podjednaka, a unatoč nešto većem postotku nađenih protutijela za *A. phagocytophilum / A. platys* u ženskih jedinki, ta razlika nije bila velika ($P > 0,05$).

Tablica 5.6. Broj pregledanih i pozitivnih lisica i procjena prevalencije vrstama *Anaplasma phagocytophilum / A. platys* i *D. immitis* po spolu (N = 175)

Spol	Broj pregledanih lisica	Pozitivni na dirofilariju		CI 95 %		Pozitivni na anaplazmu		CI 95 %		P	χ2
	N	N	%	-	+	N	%	-	+		
Muško	108	7	6,48	1,13	11,12	7	6,48	1,13	11,12	1,000	0,00
Žensko	67	5	7,46	1,19	13,79	10	14,93	6,39	23,46	0,190	1,88
Ukupno	175	12	6,86	3,13	10,39	17	9,71	5,32	14,10	0,337	0,921

Na grafikonu 5.3. i u tablici 5.7. prikazan je broj pregledanih i pozitivnih lisica prema nađenom uzročniku po dobi.



Grafikon 5.3. Broj pregledanih i pozitivnih lisica prema nađenim uzročnicima po dobnoj strukturi

Pozitivan rezultat za cirkulirajući antigen *D. immitis* utvrđen je u lisica u dobi od jedne ili dvije godine (14,29 %, CI 95 %, 6,34 – 25,50 %) te dvije ili tri godine (3,23 %, CI 95 %, 2,99 – 9,45 %), ali ta razlika nije bila značajna (P > 0,05). Pozitivan rezultat na protutijela za *A. phagocytophilum / A. platys* također je u najvećem postotku bio u mlađih lisica do četiri godine. Razlike u proporciji pozitivnih na protutijela anaplazme među dobnim skupinama također nisu bile statistički značajne (P > 0,05).

Tablica 5.7. Broj pregledanih i pozitivnih lisica i procjena prevalencije vrstama *Anaplasma phagocytophilum / A. platys* i *D. immitis* po dobi (N = 133)

Dob (godine)	Pregledano	Dirofilarija pozitivno		CI 95 %		Anaplazma pozitivo		CI 95 %		P	$\chi 2$
	N	N	%	-	+	N	%	-	+		
0 – 1	15	0	0	0	0	3	20,00	-0,24	40,24	0,068	3,33
1 – 2	56	8	14,29	6,34	25,50	4	7,14	0,40	13,88	0,221	1,49
2 – 3	31	1	3,23	-2,99	9,45	4	12,90	1,10	24,70	0,365	0,82
3 – 4	16	0	0	0	0	2	12,50	-3,70	28,71	0,144	2,13
4 – 5	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5 – 6	6	0	0	0	0	2	33,33	-4,39	71,05	0,121	2,40
6 – 7	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ukupno	133	9	6,77	2,50	11,04	15	11,28	5,90	16,66	0,199	1,68

U cilju procjene istraživanih područja, spola i dobi kao rizičnog čimbenika upotrebljavala se regresijska analiza. U cilju testiranja dobi kao rizičnog čimbenika, životinje su bile podijeljene u tri dobne skupine: (1) juvenilne jedinke do jedne godine, odnosno do vremena spolne zrelosti, (2) zatim kao mlađe adultne jedinke od jedne do tri godine i (3) na populaciju starijih adultnih lisica od tri do sedam godina.

U tablicama 5.8. – 5.10. prikazani su rezulatati regresijske analize koja pokazuje moguću povezanost prevalencije *A. phagocytophilum / A. platys* i *D. immitis* s potencijalnim rizičnim čimbenicima. Rezultati pokazuju da postoje razlike u izloženosti lisica rizičnim čimbenicima kao što su geografska područja, spol i dob, ali njihovim daljnjim testiranjem nije utvrđena statistički bitna povezanost.

Tablica 5.8. Rezultati regresijske analize procjene pozitivnog nalaza u ovisnosti o području, spolu i dobnoj strukturi

Rizični čimbenik	Varijabla	Broj pregledanih N	Pozitivno %	OR[1]	CI 95 % [2]	P-vrijednosti [3]
Područje – županija	Varaždinska	13	7,70	referirana vrijednost		
	Zagrebačka	53	13,21	1,83	0,20 – 16,31	P = 0,5899
	Krapinsko-zagorska	17	11,76	1,60	0,13 – 19,83	P = 0,7144
	Sisačko-moslavačka	21	19,05	2,82	0,28 – 28,52	P = 0,3790
	Karlovačka	26	38,45	7,50	0,84 – 66,86	P = 0,0710
	Požeško-slavonska	22	9,09	1,20	0,09 – 14,59	P = 0,8866
	Međimurska	19	10,53	1,41	0,11 – 17,40	P = 0,7879
Spol	ženske lisice	67	12,39	referirana vrijednost		
	muške lisice	108	22,39	1,94	0,87 – 4,32	P = 0,1068
Dob (godine)	0 – 1	15	20,00	2,33	0,41 – 13,26	P = 0,3391
	1 – 3	87	19,54	2,64	0,72 – 9,77	P = 0,1447
	3 – 7	31	12,90	referirana vrijednost	0,009 – 25,99	P = 0,7261

[1] OR = *odds ratio*, ili vjerojatnost izloženosti, [2] interval pouzdanosti za vjerojatnost izloženosti OR, [3] statistički bitno $P < 0.05$

Tablica 5.9. Rezultati regresijske analize procjene izloženosti (OR) lisica dirofilariji u ovisnosti o području, spolu i dobnoj strukturi

Rizični čimbenik	Varijabla	Broj pregledanih N	Pozitivno %	OR[1]	CI 95 % [2]	P-vrijednosti [3]
Područje – županija	Zagrebačka	53	1,89	referirana vrijednost		
	Krapinsko-zagorska	17	11,76	6,93	0,59 – 81,83	P = 0,1241
	Sisačko-moslavačka	21	14,29	8,21	0,80 – 83,83	P =0,0757
	Karlovačka	26	15,39	9,45	0,99 – 89,46	P = 0,0501
	Požeško-slavonska	22	4,55	2,48	0,15 – 41,45	P = 0,5282
	Međimurska	19	10,53	6,12	0,52 – 71,76	P = 0,1494
Spol	muške lisice	108	6,48	referirana vrijednost		
	ženske lisice	67	7,46	2,28	0,69 – 7,50	P = 0,1746
Dob (godine)	0 – 1	15	0	2,03	0,04 – 107,34	P = 0,7261
	1 – 3	87	10,34	7,62	0,43 – 134,97	P = 0,1659
	3 – 7	31	0	referirana vrijednost	0,009 – 25,99	P = 0,7261

[1] OR = *odds ratio*, ili vjerojatnost izloženosti, [2] interval pouzdanosti za vjerojatnost izloženosti OR, [3] statistički bitno $P < 0.05$

Tablica 5.10. Rezultati regresijske analize procjene izloženosti (OR) lisica anaplazmi u ovisnosti o području, spolu i dobnoj strukturi

Rizični čimbenik	Varijabla	Broj pregledanih N	Pozitivno %	OR[1]	CI 95 % [2]	P-vrijednosti [3]
Područje – županija	Požeško-slavonska	22	4,55	referirana vrijednosti		
	Zagrebačka	53	11,32	2,68	0,31 – 23,68	P = 0,3750
	Sisačko-moslavačka	21	4,76	1,05	0,06 – 17,94	P = 0,9731
	Karlovačka	26	25,08	6,30	0,70 – 57,08	P = 0,1016
	Varaždinska	13	7,69	1,75	0,10 – 30,59	P = 0,7015
	Međimurska	19	10,53	2,47	0,21 – 29,63	P = 0,4755
Spol	muške lisice	108	6,48	referirana vrijednosti		
	ženske lisice	67	14,93	2,53	0,91 – 7,01	P = 0,0740
Dob (godine)	0 – 1	15	20,00	2,18	0,52 – 9,14	P = 0,2888
	1 – 3	87	9,20	referirana vrijednosti		
	3 – 7	31	12,90	1,40	0,3947 – 4,99	P = 0,6006

[1] OR = odds ratio, ili vjerojatnost izloženosti, [2] interval pouzdanosti za vjerojatnost izloženosti OR, [3] statistički bitno $P < 0.05$

5.2. Rezultati molekularnih istraživanja

5.2.1. PCR

Osim ukupne epidemiološke analize i procjene populacije lisica sjeverne i središnje Hrvatske kao mogućih rezervoara vektorski prenosivih bolesti, uporabom brzog *screening* SNAP testa, daljnja istraživanja usmjerena su na molekularna istraživanja i usporedbu rezultata SNAP testa s rezultatima PCR-a za dokaz prisutnosti mikrofilarija *D. immitis*, odnosno njihov DNA, ugniježđenog i semiugniježđenog PCR-a za utvrđivanje vrste *Anaplasma phagocytophilum* te ugniježđenog PCR-a za utvrđivanje vrste *Borrelia burgdorferi.*

5.2.1.1. Analiza PCR produkata *Dirofilaria immitis*

Standardna PCR metoda za prikaz ciljnoga gena 5.8S-ITS2-28S rDNA filarija provedena je na osam uzoraka lisica koje su bile pozitivne i osam uzoraka lisica koje su bile negativne na cirkulirajući antigen *D. immitis* primjenom SNAP® 4Dx® Plus testa. Od pozitivnih uzoraka umnoženi su uzorci 25, 26, 27, 30, 34, 108, 152 i 155. Od negativnih uzoraka umnoženi su uzorci 140, 142, 143, 144, 145, 147, 148 i 149. Očekivani fragmenti koji se umnožavaju u PCR reakciji različitih su dužina za pojedinu vrstu. Za *D. immitis* istraživani fragment iznosi 542 para baza (pb), za *D. repens* 484 pb, a za *A. reconditum* dužina istraživanog fragmenta iznosi 578 pb. Nakon umnožavanja PCR produkti analizirani su elektroforezom na 2-postotnom agaroznom gelu, fotografirani kamerom, pohranjeni na CF karticu te dokumentirani.

Analiza PCR produkata umnoženih iz ciljnih DNA lisica koje su bile pozitivne na cirkulirajući antigen *D. immitis* antigenskim SNAP® 4Dx® Plus testom, upućuje na to da nijedan od osam uzoraka nije bio pozitivan. To znači da ni u jednom od osam uzoraka nije došlo do umnožavanja istraživanog fragmenta za *D. immitis*. Isto tako, standardnom PCR metodom nije utvrđena prisutnost *D. repens* i *A. reconditum* kao ni prisutnost moguće koinfekcije.

Provedenom molekularnom analizom potvrđeno je da su uzorci koji su negativni primjenom SNAP® 4Dx® Plus testa, negativni i primjenom standardne PCR metode.

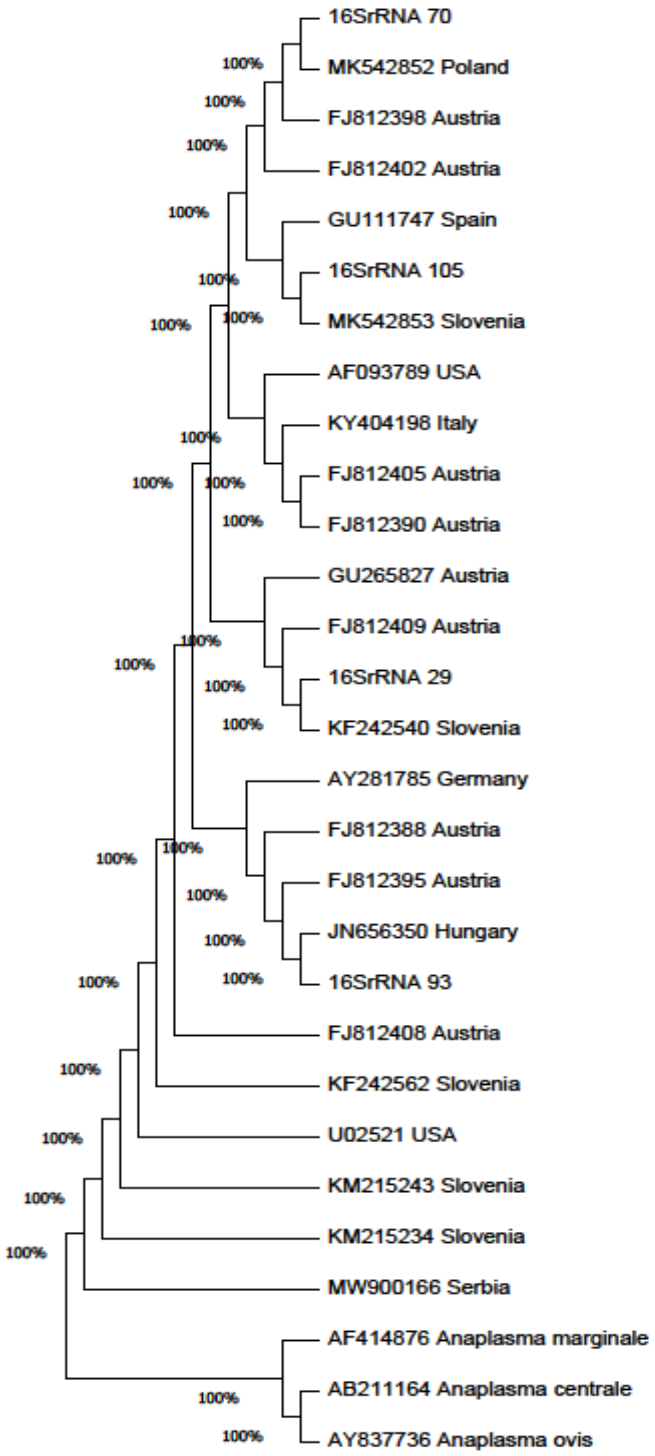
5.2.1.2. Rezultati računalnih analiza umnoženih odsječaka 16S rRNA i GroEL genoma *Anaplasma phagocytophilum*

Od ukupno devet uzoraka lisica koje su bile pozitivne na *A. phagocytophilum* primjenom SNAP® 4Dx® Plus testa četiri su uzorka bila pozitivna umnožavanjem odsječaka 16S rRNA i GroEL genoma *A. phagocytophilum.*

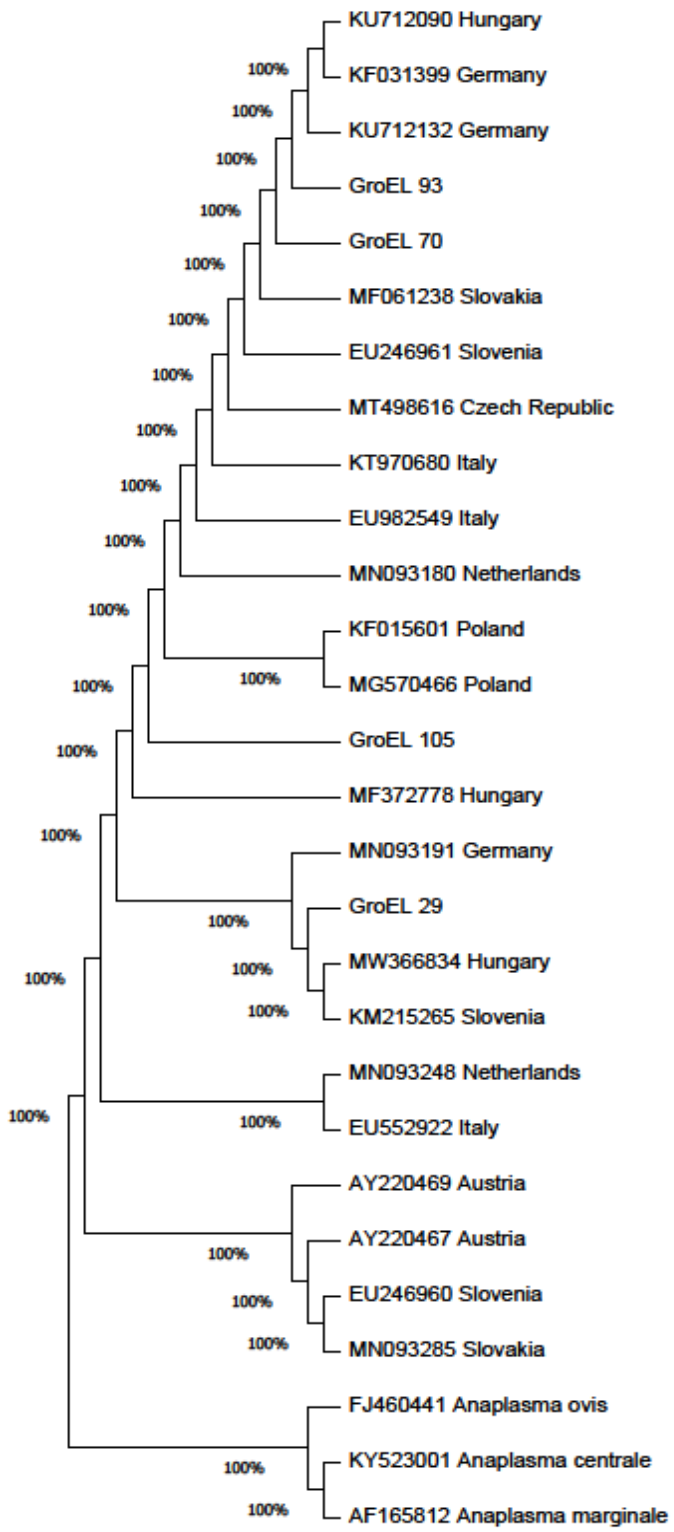
Filogenetska stabla za umnožene odsječke 16S rRNA (Slika 5.5) i GroEL (Slika 5.6.) izrađena su metodom susjednog sparivanja (engl. *neighbor-joining*) uz primjenu modela Kimura-2-parametra za uzorke 29, 70, 93 i 105. U analizu su uključene srodne sekvence koje su pronađene s pomoću algoritma BLAST. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene statističkom metodom samoučitavanja (*bootstrap*) u 1000 ponavljanja.

Izolat 16S rRNA-29 pokazao je najveću sličnost s izolatom MK542852 (ljudski izolat iz Poljske) od kojeg se razlikuje u dvama nukleotidima u 491 nukleotidnoj regiji, izolat 16S rRNA-70 s izolatom KF242562 (izolat divlje svinje iz Slovenije) od kojeg se razlikuje u jednom nukleotidu u 491 nukleotidnoj regiji, izolat 16S rRNA-93 s izolatom JN656350 (izolat psa iz Mađarske) s kojim je identičan, a izolat 16S rRNA-105 s izolatom KF242540 (izolat psa iz Slovenije) od kojeg se razlikuje u jednom nukleotidu u 491 nukleotidnoj regiji.

Izolat GroEL-29 pokazao je najveću sličnost s izolatom MW366834 (izolat iz *Ixodes ricinus* iz Mađarske) od kojeg se razlikuje u dvama nukleotidima u 445 nukleotidnih regija, izolati GroEL-70 i GroEL-93 s izolatima KU712090 (izolat psa iz Mađarske) i MF061238 (izolat domaće svinje iz Slovačke) s kojima su identični, izolat GroEL-105 s izolatom KF015601 (ljudski izolat iz Poljske) od kojeg se razlikuje u 13 nukleotida u 445 nukleotidnih regija.



Slika 5.5. Prikaz filogenetskog stabla za umnožene odsječke 16S rRNA (umnoženi su odsječci za uzorke 29, 70, 93 i 105) izrađenog metodom susjednog sparivanja (engl. *neighbor-joining*) uz primjenu modela Kimura-2-parametra. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene statističkom metodom samoučitavanja (*bootstrop*) u 1000 ponavljanja. Srodne su sekvence pronađene s pomoću algoritma BLAST.



Slika 5.6. Prikaz filogenetskog stabla za umnožene odsječke groEL (umnoženi su odsječci za uzorke 29, 70, 93 i 105) izrađenog metodom susjednog sparivanja (engl. *neighbor-joining*) uz primjenu modela Kimura-2-parametra. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene statističkom metodom samoučitavanja (*bootstrop*) u 1000 ponavljanja. Srodne su sekvence pronađene s pomoću algoritma BLAST.

5.2.1.3. Analiza PCR produkata *Borrelia burgdorferi*

Jedna od čestih vektorski prenosivih bolesti u domaćih i divljih životinja jest i *Borrelia burgdorferi*. Brzim SNAP® 4Dx® Plus dijagnostičkim testom nisu nađena protutijela za tu bakteriju. U cilju provjere negativnih rezultata brzog dijagnostičkog testa, ali i daljnje procjene moguće infekcije divljih lisica tom bakterijom, prikupljeni su uzorci lisica kako bi se dokazala prisutnost bakterije *B. burgdorferi* primjenom metode ugniježđene PCR reakcije. Provedenom molekularnom analizom ni u jednom od dvadeset nasumično odabranih uzoraka uški nije utvrđena prisutnost bakterije *B. burgdorferi*.

6. RASPRAVA

Provođenjem epidemiološkog istraživanja proširenosti vektorski prenosivih bolesti u lisica koje se mogu otkriti brzim *screening* SNAP® 4Dx® Plus testom koji se upotrebljava za detekciju cirkulirajućeg antigena *Dirofilaria immitis*, te protutijela za *Borrelia burgdorferi*, za *Anaplasma phagocytophilum* / *Anaplasma platys* i *Ehrlichia canis / Ehrlichia ewingii*, na području sjeverozapadne Hrvatske utvrđeno je ukupno 16,76 % (CI 95 %, 11,29 – 22,23 %) (N = 176) pozitivnih lisica, od čega je u 10,05 % (CI 95 %, 5,8 – 14,25 %) lisica bilo pozitivno na protutijela za *A. phagocytophilum / A. platys*, a 6,70 % (CI 95 %, 3,20 – 10,19 %) lisica bilo je pozitivno na cirkulirajući antigen *D. immitis*. To znači da je u ukupnom broju pozitivnih lisica (N = 30) omjer pozitivnih na anaplazmu i pozitivnih na dirofilariju iznosio 6:4, odnosno izloženost lisica anaplazmi bila je 1,63 puta veća u usporedbi s njihovom izloženosti dirofilariji, ali ta razlika nije bila statistički značajna (P = 0,2526, $\chi 2$ = 1,309). Slične rezultate dobili su EBANI i sur. (2011.) koji su u središnjoj Italiji utvrdili *A. phagocytophilum* u 16,6 % lisica, a manju su prevalenciju anaplazme u crvenih lisica utvrdili TORINA i sur. (2013.) na području Sicilije gdje je *A. phagocyitophilum* bila zastupljena u 1 % lisica. U Španjolskoj DIAZ-REGANON i sur. (2020.) brzim testom ustanovili su protutijela za *Anaplasma* spp. u 0.9 % pasa, a *D. immitis* cirkulirajući antigen u 0,18 %. Također, i KARBOWIAK i sur. (2009.) utvrdili su anaplazmu u manjem postotku od 2,7 % lisica. DUMITRACHE i sur. (2015.) u Rumunjskoj su utvrdili prevalenciju *A. phagocytophilum* od 2,55 % (CI 95 %, 1,25 – 4,96 %), a HÄRTWIG i sur. (2014.) utvrdili su je u Njemačkoj u 8,2 % lisica. MORGAN i sur. (2008.) istraživali su ulogu crvene lisice u prijenosu parazitarnih infekcija u Velikoj Britaniji te utvrdili opću prevalenciju od 7,3 %. GORTAZAR i sur. (1994.) utvrdili su *D. immitis* u 11 % pregledanih crvenih lisica u Španjolskoj. Prisutnost protutijela bakterija *B. burgdorferi* i *E. canis / E. ewingii* u ovom istraživanju brzim dijagnostičkim SNAP® 4Dx® Plus testom nije utvrđena, iako je poznato da crvena lisica igra važnu ulogu u epidemiologiji infekcije vrstama *E. canis* i *B. burgdorferi* te služi kao rezervoar za domaće pse (CARDOSO i sur. 2015.; MAIA i sur. 2015.; DUMITRACHE i sur. 2015.). Također je prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (Word Health Organisation, WHO) u Europi najučestalija bolest koja se prenosi krpeljima upravo lajmska bolest (ANONIMUS, 2020.).

Poznavanje prevalencije ovih vektorski prenosivih bolesti u populaciji lisica koje žive u suburbanim i ruralnim područjima važno je za procjenjivanje lisica kao potencijalnih rezervoara koji obitavaju odnosno žive u blizini pasa, što omogućuje lakši prijenos uzročnika vektorom u istom ekosustavu, poglavito iz razloga što je na području Hrvatske utvrđena seroprevalencija vektorski prenosivih bolesti u zdravih pasa (JURKOVIĆ i sur. 2019.; MRLJAK i sur. 2017.; MRAOVIĆ i sur. 2019.; HUBER i sur. 2017.). Uspoređujući dobivene rezultate u ovom istraživanju na lisicama i rezultate istraživanja u populaciji pasa na području kontinentalne Hrvatske, uočava se znatno veća prevalencija u lisica nego u pasa. Iako u ovom radu nije dokazana izravna povezanost lisice kao rezervoara anaplazmoze i dirofilarioze za pse, ne može se isključiti njezina uloga u održavanju infekcije na staništima (lovištima) na kojima su nađene pozitivne lisice, a koja su često i u blizini naselja ili u samim naseljima (slike 5.1., 5.2., Prilog 1). U takvim je naseljenim područjima izloženost pasa potencijalno pozitivnim vektorima veća. Na to upućuju i MILLER i sur. (2011.) koji su utvrdili da su psi koji su 50 % vremena provodili izvan kuće tijekom dana, bili statistički znatnije inficirani. Slične rezultate prevalencije crvenih lisica u urbanim sredinama dobili su MARKS i sur. (1998.) koji su, također, utvrdili da je 6,4 % crvenih lisica u urbanom području Melbourna u Australiji bilo pozitivno na *D. immitis*. Također, MAGI i sur. (2008.) proučavali su 132 ubijene lisice tijekom sezone lova 2005./2006. u središnjoj Italiji te utvrdili prisutnost *D. immitis* u njih 6,06 %. Ulogu crvene lisice kao rezervoara dirofilarije spominju i SEGOVIA i sur. (2004.), MORGAN i sur. (2008.) te HURNIKOVA i sur. (2015.). TOLNAI i sur. (2014.) ukazali su, također, na moguću ulogu lisice kao rezervoara vrste *D. immitis* za pse, a nađena prevalencija u lisica bila je gotovo dvostruko manja (3,7 %) nego u našem istraživanju.

Poznato je da prevalencija vektorski prenosivih bolesti ovisi o distribuciji i gustoći vektora odnosno o klimatskim (temperatura, vlaga) i stanišnim (vodena područja) uvjetima (ANGELOU i sur., 2019.; MORCHON i sur., 2022.) koji omogućuju razvoj vektora. Ovisno o tim uvjetima neka područja mogu predstavljati područja većeg rizika zbog veće distribucije i gustoće vektora. Kako u ovom radu jedini dostupni podaci područja bili su temeljeni na županijama, daljnja istraživanja usmjerena su na procjenu pojedinih županija kao mogućih rizičnih područja. Stoga je cijela istraživana populacija podijeljena na strate, tj. područja koja su bila definirana administrativnom jedinicom – županijom, te je daljnja detaljna analiza uključivala istraživanje prevalencije, a potom i procjenu vjerojatnosti izloženosti lisica istraženim vektorski prenosivim uzročnicima na pojedinim područjima (županijama). Od ukupno istraživanih devet županija, u daljnjoj je analizi uzeto u obzir njih sedam jer u dvjema

županijama (Grad Zagreb i Bjelovarsko-bilogorska županija) broj uzoraka nije bio dostatan za daljnje testiranje (n < 5). Statistički znatno veća prevalencija utvrđena je u Karlovačkoj županiji (38,45 %, CI 95 %, 19,75 – 57,15 %) u usporedbi s prevalencijom u Varaždinskoj županiji (7,70 %, CI 95 %, 6,79 – 22,19 %), Zagrebačkoj (13,21 %, CI 95 %, 4,09 – 22,33 %), Požeško-slavonskoj (9,09 %, CI 95 %, 2,92 – 21,10 %) i Međimurskoj županiji (10,53 %, CI 95 %, 3,73 – 24,33 %) (tablica 5.2.). Međutim, uspoređujući razlike u broju pozitivnih lisica prema uzročniku, nije nađena statistički bitna razlika u broju pozitivnih lisica na *Anaplasma* spp. (P > 0,05). Istodobno, za *D. immitis* utvrđena je statistički znatno niža prevalencija u Zagrebačkoj županiji (1,89%, CI 95%, 1,78 – 5,56%) u usporedbi s prevalencijom u ostalim županijama (P < 0,05) (tablica 5.5., grafikon 5.1.).

Iako je utvrđeno da je ukupna prevalencija pozitivnih lisica u Karlovačkoj županiji bila puno veća u usporedbi s Varaždinskom županijom (4,99 puta veća), Požeško-slavonskom (4,23 puta veća), Međimurskom (3,35 puta veća) i Zagrebačkom (2,91 puta veća), daljnjom epidemiološkom analizom procjene izloženosti lisica (OR) istraživanim vektorski prenosivim uzročnicima u pojedinim županijama, dobivene razlike nisu bile statistički bitne (P > 0,05) (tablica 5.9.). Vrijednosti izloženosti lisica istraživanim uzročnicima (OR) dobivene za pojedinu županiju uspoređene su s obzirom na područja s najmanjom prevalencijom, što je uzeto kao referirana vrijednost. Najniža ukupna prevalencija utvrđena je u Varaždinskoj županiji (7,70 %, CI 95 %, 6,79 – 22,19 %) te je izloženost u ostalim županijama bila od 1,60 puta (Krapinsko-zagorska) pa do 7,5 puta veća (Karlovačka županija) u usporedbi s Varaždinskom županijom (tablica 5.8.). No dobiveni rezultati nisu pokazali da su ta odstupanja bila statistički bitna. Rezultati analize procjene izloženosti prema pojedinom uzročniku (*Anaplasma* spp. i *D. immitis*) također nisu pokazala odstupanja u području statističke važnosti (P > 0,05) (tablice 5.9. i 5.10.). Iako se razlike nisu pokazale značajnim, usporedbom vodenih površina prema Nacrtu plana upravljanja vodnim područjima 2022. - 2027. (ANONIMUS, 2022.) najviše vodnih područja je u Karlovačkoj županiji, gdje je ustanovljen i najveći broj pozitivnih lisica. Na važnost područja kao jednog od glavnih rizičnih čimbenika za vektorski prenosive bolesti uputili su i GORTAZAR i sur. (1998.) koji su utvrdili veću prevalenciju vrste *D. immitis* u crvenih lisica u područjima uz glavne rijeke u sjevernoistočnom dijelu Španjolske. Osim toga, ukazali su na to da ta područja predstavljaju rezervoar nekih vrsta helminata za domaće pse ili vuka. U Iranu su MESHGI i sur. (2009.), također, utvrdili razlike kad je riječ o prevalenciji vrste *D. immitis* u crvenih lisica u trima različitim klimatskim zonama. Nadalje, značajnu ulogu u održavanju infekcije, ima i gustoća lisica na staništu, što su potvrdili i

HÄRTWIG i sur. (2014.) koji su zaključili da na područjima s većom populacijom lisica predstavljaju veći rizik i potencijalne rezervoare zoonotskih bolesti.

Kad je riječ o spolu, utvrđeno je 1,73 puta više ukupno pozitivnih ženskih lisica (22,39 %, CI 95 %, 12,41 – 32,38 %) u odnosu prema lisicama muškog spola (12,96 %, CI 95 %, 6,63 – 19,29 %) (tablica 5.3.). Također, utvrđena je i veća prevalencija pojedinih uzročnika (*A. phagocytophilum / A. platys, D. immitis)* u populaciji ženskih životinja. Izloženost ženske populacije lisica vrsti *D. immitis* bila je 2,28 puta veća (OR = 2,28, CI 95 %, 0,69 – 7,50) u odnosu prema muškoj populaciji, ali ta razlika nije bila statistički bitna (P = 0,1746). Iako je utvrđena 2,3 puta veća seroprevalencija za *A. phagocytophilum / A. platys* u ženskih životinja, što je rezultiralo i većom izloženosti ženki u odnosu prema muškim životinjama (OR = 2,53, CI 95 %, 0,91 – 9,14) ta razlika, također, nije bila statistički značajna (P = 0,0673) (tablice 5.6. i 5.9., grafikon 5.2.). HODŽIĆ i sur. (2015.) u 119 pretraženih crvenih lisica tijekom sezone lova 2013./2014. također nisu utvrdili statistički bitne razlike prema spolu. Slične rezultate dobili su i MORGAN i sur. (2008.) koji nisu utvrdili razlike u infekciji vrstom *D. immitis* između muških i ženskih lisica. PENEZIĆ i sur. (2014.) u istraživanju 738 divljih karnivora provedenom od 2009. do 2013. godine u Srbiji, utvrdili su neznatne razlike u broju pozitivnih muških (1,75 %) i broju pozitivnih ženskih (1,26 %) jedinki. U istraživanjima PETRUCCELLI i sur. (2022.) razlike po spolu i dobi nisu nađene niti u populaciji pasa u Italiji.

Uspoređujući opću prevalenciju kao i prevalenciju po uzročnicima prema dobnoj strukturi, uočeno je da je najveći broj pozitivnih lisica bio starosti od četiri godine (tablica 5.4. i 5.9.). Opća prevalencija kretala se od 12,50 % (CI 95 %, 3,71 – 28,71 %) u jedinki starosti između tri i četiri godine pa do 21,43 % (CI 95 %, 10,69 – 32,18 %) u lisica dobne skupine od jedne do dvije godine (P = 0,1039). S obzirom na uzročnike, *D. immitis* je 4,23 puta češće utvrđena u lisica starosti između jedne i dvije godine (14,29 %, CI 95 %, 6,34 – 25,50 %) u usporedbi s lisicama starosti između dvije i tri godine (3,23 %, CI 95 %, 2,99 – 9,45 %) (P = 0,1068) (tablica 5.7., grafikon 5.3.). U ostalim dobnim skupinama *D. immitis* nije utvrđena. Slične rezultate dobili su GORTAZAR i sur. (1994.) te MAGI i sur. (2008.) koji su, također, utvrdili češću prisutnost *D. immitis* u juvenilnih lisica. Protutijela za *A. phagocytophilum / A. platys* utvrđena su u našem istraživanju u lisica starosti do četiri godine. Najmanji broj serološki pozitivnih lisica nađen je u jedinki starosti od jedne do dvije godine (4,14 %, CI 95 %, 0,40 – 13,88 %), a najviše u juvenilnih lisica u dobi do jedne godine (20,00 %, CI 95 %, 0,24 – 40,24 %) (P > 0,05) (tablica 5.7.). No, te razlike po dobi nisu bile značajne. Slične rezultate dobili su

i MORGAN i sur. (2008.) te HODŽIĆ i sur. (2015.) kao i MEDKOUR i sur. (2020.) koji, također, nisu našli bitne razlike kad je riječ o usporedbi lisica prema dobnim skupinama.

Za procjenu dobi kao rizičnog čimbenika, uzete su u obzir tri dobne strukture: skupina lisica do jedne godine (juvenilne lisice), skupina lisica starosti od jedne do tri godine (mlađe adultne jedinke) te skupina lisica u dobi od četiri do sedam godina (starije adultne jedinke). Prema odnosu pozitivnih i negativnih jedinku u definiranim dobnim skupinama ustanovljena je veća vjerojatnost izloženosti starijih adultnih jedinki (3 – 7 godina) (2,33, puta više, CI 95 %, 0,41 –13,26) u usporedbi s juvenilnim jedinkama. Iako postoji razlika u izloženosti, ona nije bila statistički važna (tablica 5.8.).

Poznato je da crvena lisica ima važnu ulogu u održavanju i širenju borelioze i erlihioze. To su svojim istraživanjima potvrdili i ESTRADA-PEÑA i sur. (1995.), HEIDRICH i sur. (1999.), HORNOK i sur. (2013.) te DUMITRACHE i sur. (2015.). Na temelju tih spoznaja, kao i podataka broja prijavljenih slučajeva humane borelioze koji su bili zabilježeni na područjima sjeverozapadne i središnje Hrvatske (MULIĆ i sur. 2011.; ANONIMUS, 2020.), očekivano je da divlje životinje, pa tako i crvena lisica, imaju važnu ulogu u održavanju i širenju borelioze na područjima sjeverne, odnosno sjeverozapadne i središnje Hrvatske, koja su i predmet ovog istraživanja. No, unatoč spoznaji o prisustvu humane borelioze u tim dijelovima Hrvatske, ovim istraživanjem nije potvrđena uloga lisice u održavanju i širenju borelioze. Naime, *screening* SNAP® 4Dx® Plus testom ni u jednom uzorku nisu nađena protutijela za *Borrelia burgdorferi,* a što je potvrđeno i PCR testom. Protutijela za *Ehrlichia canis / Ehrlichia ewingii* također nisu nađena u lisica na istraživanim područjima Hrvatske.

Usporedbom rezultata dobivenih brzim *screening* SNAP®4Dx® Plus testom s rezultatima primijenjenih molekularnih metoda, standardnom PCR i ugniježđenom PCR metodom, uočeno je da je SNAP®4Dx® Plus test pokazao negativan rezultat kod svih uzoraka koji su molekularnim metodama potvrđeni kao negativni. To upućuje na vrlo visoku specifičnost (od 100 %), što su potvrdili i LIU i sur. (2018.) koji su utvrdili specifičnost od 98 do 100 % za sve uzročnike te BURTON i sur. (2020.) koji su utvrdili specifičnost od 99,5 % za cirkulirajući antigen dirofilarije. KOTWA i sur. (2020.) također su potvrdili veću specifičnost (98.9 % CI 95 % 96.2–99.9%) u odnosu na osjetljivost (80 %, CI 95 % 44.4–97.5%) SNAP® 4Dx® Plus testa za *D. immitis* cirkulirajući antigen usporedivši test s nalazom obdukcije i pretragom pluća pretraženih divljih kanida. Pozitivni rezultati nalaza protutijela *A.*

phagocytophilum / *A. platys screening* postupkom upućuju na infekciju lisica koja je rezultirala razvojem protutijela, iako je ugniježđenom PCR metodom nađena u cirkulaciji u samo četiri od devet (44,44 %) pozitivnih životinja (Slike 5.5. i 5.6.). To se može objasniti time što SNAP®4Dx® Plus test detektira protutijela te je stoga koristan u kasnijoj fazi infekcije kad PCR, zbog niske bakterijemije ili nakon što uzročnik više nije detektabilan u krvi može dati negativan rezultat. Zbog izvedivosti testa na maloj količini krvnog uzorka, pozitivne rezultate dobivene *screening* testom trebalo bi uzeti u razmatranje bez obzira na PCR rezultat koji može biti negativan zbog neadekvatnog krvnog uzorka, a što je moguće pri uzimanju uzorka uginulih životinja. To potvrđuju i LARA i sur. (2020.) uspoređujući serološke i molekularne metode infekcije anaplazme i erlihije u pasa te upućuju na to da komercijalni brzi testovi temeljeni na detekciji protutijela mogu biti korisni i kad se pojavljuje PCR negativan rezultat.

Lisice koje su *screening* SNAP®4Dx® Plus testom pokazivale pozitivnu reakciju na cirkulirajući antigen *D. immitis,* bile su PCR negativne. No, kako cirkulirajući antigen je antigen adultnog oblika dirofilarije, a PCR postupkom se dokazuju i umnožavaju fragmenti DNA mikrofilarija, negativni nalaz SNAP®4Dx® Plus testom može s jedne strane ukazati da jedinka nije bila invadirana, jer ukoliko nema u organizmu adulta nema niti mikrofilarija ili pak broj adulta nije bio dovoljan da se mogao detektirati cirkulirajući antigen, na što ukazuju LOVRIĆ i sur. (2022.) u istraživanju dirofilarioze u pasa, koji nisu dokazali okultnu infekciju ali su u 8,2 % pasa ustanovili mikrofilarije Knottovim testom. Kao mogući razlog navode nedovoljnu količinu uzročnika ili pak nisku osjetljivost FASTest® HW testa. No, pozitivni SNAP®4Dx® Plus test na cirkulirajući antigen ukazuje na prisutnost adulta *D. immitis* u lisica, pa time i invadiranost. No, u tih lisica PCR testom nisu nađeni fragmenti DNA mikrofilarija. Dobiveni negativni PCR rezultati pozitivnih lisica *screening* testom na *D. immitis* mogu se objasniti nedostatnom količinom uzorka krvi za dokaz traženih fragmenata DNA mikrofilarija, pa time i malim brojem mikrofilarija. Nadalje, u razmatranju negativnog rezultata PCR testa treba uzeti u obzir kako su uzorci uzimani iz uginulih životinja, što također može imati utjecaj na dokazivanje mikrofilarija. Stoga možemo reći da pozitivni SNAP®4Dx® Plus test koji potvrđuje cirkulirajući antigen *D. immitis* ukazuje na ulogu lisica kao mogućeg rezervoara u nekim istraživanim područjima, no kako nije potvrđena prisutnost mikrofilarija u krvi, nema daljnje infestacije vektora, a time i širenja bolesti. Stoga ne može se sa sigurnošću odrediti njena stvarna uloga i jačina povezanosti s istraženim zoonozama, za što je svakako potrebno provesti daljnja istraživanja. Pozitivni nalazi dobiveni *screening* testom, ukazuju na visoku osjetljivost za dokaz cirkulirajućeg antigena. Slične rezultate dobili su RITTHIKULPRASERT i sur.

(2020.) uspoređujući PCR test i SNAP antigenski test za vrstu *D. immitis* u mačaka. Utvrdili su veću prevalenciju vrste *D. immitis* u mačaka antigenskim testom nego PCR testom, jer u pozitivnih mačaka sa SNAP antigenski testom, PCR testom nije nađena DNA u krvnom uzorku te zaključuju da se infekcija *D. immitis* nije mogla isključiti na temelju negativnog PCR rezultata. POTKONJAK i sur. (2020.) te ALBONICO i sur. (2014.) također potvrđuju da se primjenom standardne PCR metode mogu dobiti lažno negativni rezultati PCR testa jer su primjenom osjetljivijeg *real-time* PCR potupka u istim uzorcima potvrdili prisutnost DNA uzročnika. Prema istraživanjima LIU i sur. (2018.), SNAP®4Dx® Plus test pokazuje visoku osjetljivost na detekciju cirkulirajućeg antigena *D. immitis,* i to 94,1 %. HENRY i sur. (2018.) u usporedbi s obdukcijskim nalazom u pasa. Također potvrđuju visoku osjetljivost testa za *D. immits* i to u rasponu od 94,26 % do 99,18 %, a specifičnost je bila manja i iznosila je od 83,45 % do 98,75 %. GOMES-DE-SA i sur. (2022.) također su koristeći test za brzu detekciju cirkulirajućeg antigena (Uranotest Dirofilaria) potvrdili prisutnost cirkulirajućeg antigena u krvi u 15,8 % pretraženih crvenih lisica, dok u isto vrijeme nisu ustanovili prisutnost mikrofilarija.

LIZ i sur. (2002.) istraživali su ulogu divljih sisavaca, poput srne (*Capreolus capreolus*) i divokoze (*Rupicapra rupicapra*), u epidemiologiji granulocitne erlihioze u Švicarskoj. Uzorci krvi testirani su na sekvence s pomoću PCR-a kao i na protutijela imunoglobulina G posrednim ispitivanjem fluorescentnih protutijela (IFA). Tri su ispitana uzorka srndaća pokazala izražene stupnjeve sličnosti između djelomične sekvence gena 16S rRNA i groESL operona toplinskog šoka (> 99,7, odnosno > 98,6 %) i sekvenci granulocitnih erlihia izoliranih iz ljudi. Rezultati su potvrdili da su divokoze, a osobito srne, često zaražene granulocitnim erlihijama što dokazuje da su ti divlji sisavci potencijalni rezervoari za granulocitnu erlihiozu u Švicarskoj. U istraživanju koje su proveli upotrebljavale su se identične početnice i molekularna metoda za umnožavanje odsječka 16S rRNA gena za uzorke lisica 29, 70, 93 i 105.

U istraživanju koje su proveli ALBERTI i sur. (2005.) primjenom ugniježđene i semiugniježđene PCR reakcije prvi je put dokazana prisutnost *A. phagocytophilum* u sardinijskih konja i pasa što upućuje na pojavu vrste *A. phagocytophilum* u Italiji. Za dokazivanje prisutnosti vrste *A. phagocytophilum* u uzorcima krvi lisica u provedenom su istraživanju korištene identične početnice i molekularna metoda kojom su umnoženi odsječci groEL gena *A. phagocytophilum* za uzorke 29, 70, 93 i 105.

Rezultati dobiveni brzim *screening* SNAP®4Dx® Plus testom i primijenjenih molekularnih metoda, standardnom PCR i ugniježđenom PCR metodom, ukazuju na moguću primjenu brzog SNAP®4Dx® Plus testa u populaciji lisica kao *screening* metode za dokazivanje protutijela za *A. phagocytophilum* i cirkulirajućih antigena *D. immitis.* No, za daljnju evaluaciju testa potrebno je provesti daljnja istraživanja koja će uzeti u obzir konfirmacijske metode. Također, pozitivni nalazi se svakako trebaju uzeti u obzir u procjenjivanju prisutnosti uzročnika nekih vektorski prenosivih bolesti na nekom staništu. No, daljnja ciljana epidemiološka opservacijska istraživanja potrebno je provesti u cilju procjene stvarne uloge i utjecaja lisica u epidemiologiji ovih bolesti.

7. ZAKLJUČCI

- Rezultati epidemioloških istraživanja četiriju vektorski prenosivih zoonotskih uzročnika koji se detektiraju SNAP® 4Dx® Plus testom (*Dirofilaria immitis, Anaplasma phagocytophilum / Anaplasma platys, Borrelia burgdorferi i Ehrlichia canis / Ehrlichia ewingii)* provedenih u populaciji lisica s područja sjeverozapadne i središnje Hrvatske, upućuju na prisutnost infekcije lisica vrstom *Dirofilaria immitis* (dokaz cirkulirajućeg antigena) i *Anaplasma phagocytophilum / Anaplasma platys* (dokaz protutijela), a uloga lisice u održavanju i širenju borelioze i erlihioze nije potvrđena.

- Ukupna prevalencija dobivena primjenom *screening* SNAP®4Dx® Plus testa bila je 16,76 % (CI 95 %, 11,29 – 22,23 %), od čega je bilo 6,70 % (CI 95 %, 3,20 – 10,19 %) pozitivnih uzoraka na cirkulirajući antigen *Dirofilaria immitis* i 10,05 % (CI 95 %, 5,8 – 14,25 %) na protutijela za *Anaplasma phagocytophilum / Anaplasma platys.*

- Analizom prostorne distribucije udjela ukupno pozitivnih lisica po županijama protutijela za *A. phagocytophilum / A. platys* utvrđena su u svim istraživanim županijama (osim u Krapinsko-zagorskoj županiji i Gradu Zagrebu), i to u rasponu od 4,55 % (CI 95 %, 4,16 – 13,76 %) (Požeško-slavonska županija) do 23,08 % (CI 05 %, 6,88 – 39,28 %) (Karlovačka županija) ($P < 0,05$), dok se broj pozitivnih lisica na *D. immitis* u istraživanim županijama kretao u rasponu od 1,80 % (CI 95 %, 1,78 – 5,56 %) (Zagrebačka županija) do 15,39 % (CI 95 %, 1,52 – 29,06 %) (Karlovačka županija) ($P < 0,05$). U trima županijama, Varaždinskoj, Međimurskoj i Bjelovarsko-bilogorskoj, nije bilo pozitivnih lisica na *D. immitis*.

- U odnosu na spol i dob nisu nađene statistički bitne razlike.

- Glavni rizični čimbenik koji utječe na prevalenciju infekcije lisica anaplazmom i/ili dirofilarijom je geografski položaj koji pogoduje vektoru, jer je nađena razlika u broju pozitivnih lisica po područjima (županijama), u čemu se osobito ističe Karlovačka županija s najvećom prevalencijom za oba uzročnika, a za što je, svakako, uputno provesti dodatna istraživanja.

- Molekularnom analizom pozitivnih uzoraka lisica za *A. phagocytophilum* primjenom SNAP® 4Dx® Plus testa, potvrđene su četiri pozitivne lisice na *A. phagocytophilum* umnožavanjem odsječaka 16S rRNA i GroEL genoma *A. phagocytophilum* iz uzoraka krvi.

- Dobiveni rezultati SNAP® 4Dx® Plus testom i molekulskih metoda pokazali su da se ovim testom mogu naći protutijela za *A. phagocytophilum* kao i cirkulirajući antigen *D. immitis* u krvi uginulih lisica i onda kada se ne mogu dokazati uzročnici. Stoga ovaj test može biti prihvatljiv kao *screening* ovih vektorski prenosivih bolesti u lisica na nekom području, no potrebno je za daljnju evaluaciju testa provesti istraživanja koja će uzeti u obzir konfirmacijske metode.

- Ovo istraživanje je prvo istraživanje vektorski prenosivih zoonoza u populaciji crvene lisice u Hrvatskoj koje je pokazalo da populacija crvene lisice nije slobodna od anaplazmoze i dirofilarioze što treba uzeti u obzir u razmatranju lisice kao rezervoara na nekim područjima u Hrvatskoj, a za što dodatno treba provesti ciljana opservacijska epidemiološka istraživanja.

8. POPIS LITERATURE

ACOSTA-JAMETT, G., T. WEITZEL, J. LOPEZ, D. ALVARADO, K. ABARCA (2020): Prevalence and Risk Factors of Antibodies to *Anaplasma* spp. in Chile: A Household-Based Cross-Sectional Study in Healthy Adults and Domestic Dogs. Vector Borne Zoonotic Dis.
DOI: 10.1089/vbz.2019.2587.

AGUILAR-TIPACAMU, G., B. I. CARVAJAL-GAMEZ, J. GARCIJA-RAJON, C. MACHAIN-WILLIANS, J. MOSQUEDA (2020): Immuno-molecular prospecting for vector-borne diseases in central Mexico. Transbound. Emerg. Dis. 67, 185-192.
DOI: 10.1111/tbed.13504.

ALBONICO, F., M. LOIACONO, G. GIOIA, C. GENCHI, M. GENCHI, M. MORTARINO (2014): Rapid differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood by real-time PCR coupled to high resolution melting analysis. Vet. Parsitol. 200, 128-32.
DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.11.027.

ALBERTI, A., M. F. ADIS, O. SPARAGANO, R. ZOBBA, B. CHESSA, T. CUBEDDU, M. L. P. PARPAGLIA, M. ARDU, M. PITTAU (2005): *Anaplasma phagocytophilum*, Sardinia, Italy. Emerg. Inf. Dis. 11,8: 1322-4.
DOI:10.3201/eid1108.050085

ALEXANDER, K. A., P. W. KAT, R. K. WAYNE, T. K. FULLER (1994): Serologic survey of selected canine pathogens among free-ranging jackals in Kenya. J. Wildl. Dis. 30, 486-491.
DOI: 10.7589/0090-3558-30.4.486.

ALMEIDA, A. P., T. D. SOUZA, A. MARCILI, M. B. LABRUNA (2013): Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* agents infecting the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in South eastern Brazil. J. Med. Entomol, 50, 640-646.
DOI: 10.1603/me12272.

ALTSCHUL, S. F., W. GISH, W. MILLER, E. W. MYERS, D. J. LIPMAN (1990): Basic logical alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403-410.
DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

ANDRAŠIĆ, D. (1984): Zoologija divljači i lovna tehnologija. Sveučilište u Zagrebu, Šumarski Fakultet, Zagreb.

ANGELOU, A., A. I. GELASAKIS, N. VERDE, N. PANTCHEV, R. SCHAPER, R. CHANDRASHEKAR, E. PAPADOPOULOS (2019): Prevalence and risk factors for selected canine vector-borne diseases in Greece. Parasites Vectors. 12, 283. DOI: 10.1186/s13071-019-3543-3.

ANONIMUS (2020): Lyme borreliosis in Europe. WHO. Dostupno na: https://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0008/246167/Fact-sheet-Lyme-borreliosis-Eng.pdf

ANONIMUS (2022): Nacrt plana upravljanja vodnim područjima 2022 RH. Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja. Dostupno na: https://mingor.gov.hr/UserDocsImages//Uprava_vodnoga_gospodarstva_i_zast_mora/Planski_dokumenti_upravljanja_vodama//NACRT%20PLANA%20UPRAVLJANJA%20VODNIM%20PODRUCJIMA%202022.%20-%202027.%20-%20SIJECANJ%202022..pdf

AUER, H. (2004): Die Dirofilariose des Menschen – Epidemiologie und Nosologie einer gar nicht so seltenen Parasitose in Österreich (Nematoda, Spirurida, Onchocercidae). Denisia 13: 463–4

AUER, H., M. SUSANI (2008): Der erste autochthone Fall einer subkutanen Dirofilariose in Österreich. Wien. Klin. Wochenschr. 120, 104-106.
DOI: 10.1007/s00508-008-1031-4.

BARTH, C., R. K. STRAUBINGER, C. SAUTER-LOUIS, K. HARTMANN (2012): Prevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Anaplasma phagocytophilum* and their clinical relevance in dogs in Munich, Germany. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 125, 337-344.

BATINAC, T., D. PETRANOVIĆ, G. ZAMOLO, A. RUŽIĆ (2007): Lyme borreliosis and multiple sclerosis are associated with primary effusion lymphoma. Med, Hypotheses. 69, 117-119.
DOI: 10.1016/j.mehy.2006.11.015.

BECK, R., B. HABRUN, S. BOSNIĆ, M. BENIĆ, T. NEMETH-BLAŽIĆ, S. DUVNJAK (2010): Identifikation of pathogens in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* from public gardens in Zagreb, Croatia. Book of abstracts:12th International Conference on Lyme Borreliosis and other tick-borne diseases, Ljubljana, Slovenia 95-95.

BORETTI, F. S., A. PERRETEN, M. L. MELI, V. CATTORI, B. WILLI, N. WENGI, S. HORNOK, H. HONEGGER, D. HEGGLIN, R. WOELFEL, C. E. REUSCH, H. LUTZ, R. HOFMANN-LEHMANN (2009): Molecular investigation of *Rickettsia helvetica* infection in dogs, foxes, humans and *ixodes* ticks. Appl. Environ. Microbiol. 75, 3230-3237.
DOI: 10.1128/AEM.00220-09.

BURTON, W., J. LIU, J. P. DREXEL, C. PULASKI, S. HEARTSIL, C. DUPUY (2020): Comparative evaluation of field samples using 2 in-clinic assays for heartworm antigen detection in dogs. Vet. Parasitol. 283-291.
DOI: 10.1016/j.vetpar.2020.109163.

CABELLO, J., L. ALTET, C. NAPOLITANO, N. SASTRE, E. HIDALGO, J. A. DAVILA, J. MILLAN (2013): Survey of infectious agent sin the endangered Darwins fox (*Lycalopex fulvipes*): High prevalence and diversity of hemotrophic mycoplasmas. Vet. Microbiol. 167, 448-454.
DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.09.034.

CARDOSO, L., M. GILAD, H. C. CORTES, Y. NACHUM-BIALA, A. P. LOPES, M. J. VILA-VICOSA, M. SIMOES, P. A. RODRIGUES, G. BANETH (2015): First report of *Anaplasma platys* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) and molecural detection of *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* in foxes from portugal. Parasites Vectors. 8, 756-764.
DOI 10.1186/s13071-015-0756-y.

CHAUVE, C. M. (1997): Importance in France of the infestation by *Dirofilaria (Nochtiella) repens* in dogs. Parassitologia. 39, 393-395.

CHAZAN, B., A. SCHERBAKOV, H. KERNER, R. RAZ (2001): Autochthonous subcutaneous dirofilariosis in Israel. Harefuah. 140, 1125-6.

CIROVIĆ, D., A. PENEZIĆ, I. PAVLOVIC, Z. KULIŠIC, N. ĆOSIĆ, J. BURAZEROVIC, V. MALETIĆ (2014): First records of *Dirofilaria repens* in wild canids from the region of central Balkan. Acta Vet. Hung. 62, 481-488.
DOI: 10.1556/AVet.2014.021.

CROOKS, K. R., C. A. SCOTT, D. H. VAN VUREN (2001): Exotic disease and an insular endemic carnivore, the island fox. Biol. Conserv. 98, 55-60.
DOI:10.1016/S0006-3207(00)00141-5.

DIAZ-REGANON, D., X. ROURA, M. L. SUAREZ, M. LEON, A. SAINZ (2020): Serological evaluation of selected vector-borne pathogens in owned dogs from northern Spain based on a multicenter study using a commercial test. Parasit Vectors, 13, 301.
DOI: 10.1186/s13071-020-04172-5.

DOBY, J. M., C. BETREMIEUX, B. DEGEILH (1992): Interest of using antigens prepared from different *Borrelia burgdorferi* strains for the diagnosis of Lyme borreliosis in animals. Rev. Med. Vet. (Toulouse) 143, 617-622.

DOBY, J. M., C. BETREMIEUX, J. BARRAT, C. ROLLAND (1991): Tick spirochetosis by *Borrelia burgdorferi* in wild carnivorous in France-serological examination of 372 foxes. Bull. Soc. Pathol. Exot. 84, 46-53.

DOBY, J. M., G. BIGAIGNON, B. DEGEILH, C. GUIGUEN (1994): Ectoparasites of large wild mammals (deer and wild boars) and Lyme borreliosis. Search for *Borrelia burgdorferi* in more than 1400 ticks, lice, pupipares and fleas. Rev. Med. Vet. (Toulouse) 145, 743-748.

DUMIĆ, T., K. PINTUR, D. ŠLAT, R. BECK, S. OZIMEC, T. FLORIJANČIĆ (2020): Survey of hard ticks (Acari: *Ixodidae)* infestation on wild boar and health risk of tick-borne diseases in Croatia. J. Environ. Prot. Ecol. 21, 518-524.

DUMITRACHE, M. O., I. A. MATEI, A. M. IONICĂ, Z. KALMAR, G. D AMICO, S. SIKO-BARABASI, D. T. IONESCU, C. M. GHERMAN, A. D. MIHALCA (2015): Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* genospeciesin red foxes (*Vulpes vulpes*) from Romania. Parasites Vectors. 8, 514.-520. DOI: 10.1186/s13071-015-1130-9.

DUMLER, J. S., A. F. BARBET, C. P. 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* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophilum*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 2145–2165.
DOI: 10.1099/00207713-51-6-2145.

DUNCAN, A. W., M. T. CORREA, J. F. LEVINE, E. B. BREITSCHWERDT (2004): The dog as a sentinel for human infection: Prevalence of *Borrelia burgdorferi* C6 antibodies in dogs from southeastern and mid-Atlantic states. Vector Borne Zoonotic Dis. 4, 221-229.
DOI: 10.1089/vbz.2004.4.221.

DUSCHER, G. G., H. P. FUEHRER, A. KUBBER-HEISS (2014): Fox on the run – molecular surveillance of fox blood and tissue for the occurrence of tick-borne pathogens in Austria. Parasites Vectors 7, 521-529.
DOI: 10.1186/s13071-014-0521-7.

DUSCHER, G., M. LESCHNIK, H. P. FUEHRER, A. JOACHIM (2015): Wildlife reservoirs for vector-borne canine, feline and zoonotic infections in Austria. Int. J. Parasitol. Parasites Wildl. 4, 88-96.
DOI:10.1016/j.ijppaw.2014.12.001.

DYKSTRA, E. A., H. N. OLTEAN, D. KANGISER, N. MARSDEN-HAUG, S. M. RICH, G. XU, M. K. LEE, M. G. MORSHED, C. B. GRAHAM, R. J. EISEN (2020): Ecology and Epidemiology of Tickborne pathogens, Washington, USA, 2011-2016. Emerg. Infect. Dis. 26, 648-657,
DOI: 10.3201/eid2604.191382.

DŽAJA P., A. BECK, G. KIŠ, A. GUDAN KURILJ, T. ŽIVIČNJAK, B. ARTUKOVIĆ, R. BECK, M. HOHŠTETER, I. C. ZUCKERMANN ŠOŠTARIĆ. Ž. GRABAREVIĆ (2008): *Dirofilaria repens* infection in a dogi in Croatia-a case report. Vet. Arhiv. 78, 521-527.

EBANI, V. V., R. VERIN, F. FRATINI, A. POLI, D. CERRI (2011): Molecular survey of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Central Italy. J. Wild. Dis. 47, 699-703.
DOI: 10.7589/0090-3558-47.3.699.

EBANI V. V., F. BERTELLONI, B. TORRACCA, D. CERRI (2014): Serological survey of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia canis* infections in rural and urban dogs in Central Italy. Ann. Agric. Environ. Med. 21, 671 - 675.
DOI: 10.5604/12321966.1129912.

EBANI, V. V., C. TREBINO, L. GUARDONE, F. BERTELLONI, G. CAGNOLI, S. NARDONI, E. SEL, E. WILDE, A. POLI, F. MANCIANTI (2022): Occurrence of bacterial and protozoan pathogens in Red Foxes (*Vulpes vulpes*) in Central Italy. Animals. 12, 2891.
DOI: 10.3390/ani12202891.

ESTRADA-PEÑA, A., J. A. OTEO, R. ESTRADA-PEÑA, C. GORTAZAR, J. J. OSACAR, J. A. MORENO, J. CASTELLA (1995): *Borrelia burgdorferi sensu lato* ticks (Acari, *Ixodidae*) from 2 different foci in Spain. Exp. App. Acarol. 19, 173-180.
DOI: 10.1007/BF00046289.

FARKAS, R., M. GYURKOVSZKY, Z. LUKACS, B. ALADICS, N. SOLYMOSI (2014): Seroprevalence of Some Vector-Borne Infections of Dogs in Hungary. Vector Borne Zoonotic. Dis. 14, 256 – 260.
DOI: 10.1089/vbz.2013.1469.

FEDOROVA, N., J. E. KLEINJAN, D. JAMES, L. T. HUI, H. PEETERS, R. S. LANE (2014): Remarkable diversity of tick or mammalian-associated *Borreliae* in the metropolitan San Francisco Bay Area, California. Ticks Tick Borne Dis. 5, 951-961.
DOI: 10.1016/j.ttbdis.2014.07.015.

FISHMAN, Z., L. GONEN, S. HARRUS, D. STARUSS-AYALI, R. KING, G. BANETH (2004): A serosurvey of *Hepatozoon canis* and *Ehrlichia canis* antibodes in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from Israel. Vet. Parasitol. 119, 21-26.
DOI: 10.1016/j.vetpar.2003.08.012.

FURTADO, A. P., E. S. DE CARMO, E. G. GIESE, A. C. R. VALLINOTO, R. M. LANFREDI, J. N. SANTOS (2009): Detection of dog filariases in Marajo island, Brazil by classical and molecular methods. Parasitol. Res. 105, 1509-1515.
DOI: 10.1007/s00436-009-1584-9.

GABRIEL, M. W., R. N. BROWN, J. E. FOLEY, J. M. HIGLEY, R. G. BOTZLER (2009): Ecology of *Anaplasma phagocytophilum* infection in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) in northwestern California. J. Wildl. Dis. 45, 344-354.
DOI: 10.7589/0090-3558-45.2.344.

GARCES, A, I. PIRES (2021): Secrets of the Astute Red Fox (*Vulpes vulpes*, Linnaeus, 1758): An inside-ecosystem secret agent serving One Health. Environments, 8, 103.
DOI:10.3390/environments8100103

GOLUBIĆ, D., S. RIIPKEMA, N. TKALEC-MAKOVEC, E. RUŽIĆ (1998): Epidemiologic, ecologic and clinical characteristics of Lyme borrelliosis in northwest Croatia. Acta Med. Croatica. 52, 7-13.

GOMES-DE-SA, S., S. SANTOS-SILVA, A. DE SOUSA MOREIRA, P. FERREIRA BARRADAS, I. AMORIM, L. CARDOSO, J. R. MESQUITA (2022): *Dirofilaria immitis* antigenemia and microfilaremia in Iberian wolves and red foxes from Portugal. Parasites Vectors. 15, 119.
DOI: 10.1186/s13071-022-05170-5.

GORTAZAR, C., J. A. CASTILLO, J. LUCIENTES, J. C. BLANCO, A. ARRIOLABENGOA, C. CALVETE (1994): Factors affecting *Dirofilaria immitis* prevalence in red foxes in northeastern Spain. J. Wildl. Dis. 30, 545-547.
DOI: 10.7589/0090-3558-30.4.545.

GORTAZAR, C., R. VILLAFUERTE, J. LUCIENTES, D. FERNANDEZ-DE-LUCO (1998): Habitat related differences in helminth parasites of red foxes in the Ebro valley. Vet. Parasitol. 80, 75-81.
DOI: 10.1016/s0304-4017(98)00192-7.

GRANICK, J. L., P. J. ARMSTRONG, J. B. BENDER (2009): *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs: 34 cases (2000-2007). J. Am. Vet. Med. Assoc. 234, 1559-1565.
DOI: 10.2460/javma.234.12.1559.

GROEN, J., P. KORAKA, Y. A. NUR, T. AVSIC-ZUPANC, W. H. F. GOESSENS, A. OTT, A. D. M. E. OSTERHAUS (2002): Serologic evidence of *ehrlichiosis* among humans and wild animals in the Netherlands. Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis. 21, 46-49,
DOI: 10.1007/s10096-001-0659-z.

GUARDONE, L., M. SCHNYDER, F. MACCHIONI, P. DEPLAZES, M. MAGI (2013): Serological detection of circulating *Angiostrongylus vasorum* antigen and specific antibodies in dogs from central and northern Italy. Vet. Parasitol. 192, 192-198.
DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.10.016.

GUY, E. C., G. STANEK (1991): Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. J. Clin. Pathol. 44, 601-611.
DOI: 10.1136/jcp.44.7.610.

HALL, T. A. (1999): BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41, 95-98.

HÄRTWIG, V., F. D. VON LOEWENICH, C. SCHULZE, R. K. STRAUBINGER, A. DAUGSCHIES, V. DYACHENKO (2014): Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) and raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) from Brandenburg, Germany. Ticks Tick Borne Dis. 5, 277-280.
DOI: 10.1016/j.ttbdis.2013.11.001.

HEIDRICH, J., A. SCHONBERG, S. STEUBER, K. NOCKLER, P. SHULZE, W. P. VOIGT, E. SCHEIN (1999): Investigation of skin samples from red foxes (*Vulpes vulpes*) in eastern Brandenburg (Germany) for the detection of *Borrelia burgdorferi s. l.* Zentralbl. Bacteriol. 289, 666-672.
DOI: 10.1016/s0934-8840(99)80026-7.

HENNINGSSON, A. J., B. E. MALMVALL, J. ERNERUDH, A. MATTUSEK, P. FORSBERG (2010): Neuroborreliosis-an epidemiological, clinical and healthcare cost study from an endemic area in the south-east of Sweden. Clin. Microbiol. Infect. 16, 1245-1251.
DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.03059.x.

HENRY, L. G., K. J. BRUNSON, H. S. WALDEN, N. WENZLOW, S. E. BEACHBOARD, K. L. BARR, M. T. LONG (2018): Comparison of six commercial antigen kits for detection of *Dirofilaria immitis* infections in canines with necropsy-confirmed heartworm status. Vet. Parasitol. 254, 178-182.
DOI: 10.1016/j.vetpar.2018.02.037.

HERNANDEZ-CAMACHO, N., G. J. CANTO-ALARCON, R. W. JONES, S. ZAMORA-LEDESMA, J. M. RUIZ-BOTELLO, B. CAMACHO-MACIAS (2015): *Dirofilaria immitis* (Spiruda: *Onchocercidae*) filariae in grey fox (*Urocyn cinereoargenteus*) in Mexico. Rev. Mex. Biodivers. 86, 252-254.
DOI: 10.7550/rmb.45845.

HERNANDEZ-CAMACHO, N., R. PINEDA-LOPEZ, C. A. LOPEZ-GONZALES, R. W. JONES (2011): Nematodes parasites of the grey fox (*Urocyn cinereoargenteus* Schreber, 1775) in the seasonally dry tropical highlands of central Mexico. Parasitol. Res. 108, 1425-1429.
DOI: 10.1007/s00436-010-2191-5.

HODŽIĆ, A., A. ALIĆ, H. P. FUEHRER, J. HARL, W. WILLE-PIAZZAI, G. G. DUSCHER (2015): A molecular survey of vector-borne pathogens in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Bosnia and Herzegovina. Parasites Vectors. 8:88.
DOI 10.1186/s13071-015-0692-x.

HODŽIĆ, A., I. GEORGES, M. POSTL, G. G. DUSCHER, D. JESCHKE, C. A. SZENTIKS, H. ANSORGE, M. HEDDERGOTT (2020): Molecular survey of tick-borne pathogens reveals a high prevalence and low genetic variability of *Hepatozoon canis* in free-ranging grey wolves (*Canis lupus*) in Germany. Ticks Tick Borne Dis. 11.
DOI: 10.1016/j.ttbdis.2020.101389.

HORNOK, S., J. DE LA FUENTE, G. HORVATH, I. G. F. DE MERA, M. WIJNVELD, B. TANCZOS, R. FARKAS, F. JONGEJAN (2013): Molecular evidence of *Ehrlichia canis* and *Rickettsia massiliae* in Ixodid ticks of carnivores from south Hungary. Acta Vet. Hung. 61, 42-50.
DOI: 10.1556/AVet.2012.050.

HOSMER, D. W., S. LEMESHOW (2000): Applied logistic regression. Second edition. JohnWiley and Sons, Inc. 46.

HUBER, D., I. REIL, S. DUVNJAK, D. JURKOVIC, D. LUKACEVIC, M. PILAT, A. BECK, Z. MIHALJEVIC, L. VOJTA, A. POLKINGHORNE, R, BECK (2017): Molecular detection of *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Wolbachia* spp. but not *Ehrlichia canis* in Croatian dogs. Parasitol. Res. 116, 3019-3026.
DOI: 10.1007/s00436-017-5611-y.

HULINSKA, D., K. LANGROVA, M. PEJCOCH, I. PAVLASEK (2004): Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in animals by real-time polymerase chain reaction. APMIS 112, 239-247.
DOI: 10.1111/j.1600-0463.2004.apm11204-0503.x.

HURNIKOVA, Z., M. MITERPAKOVA, G. ZALESNY (2015): Epidemiological coherency of vulpine dirofilariosis in environmental conditions of Slovakia. Helminthologia. 52, 11-16.
DOI: https://doi.org/10.1515/helmin-2015-0003.

IONICĂ, A. M., I. A. MATEI, G. D'AMICO, J. ABABII, A. A. DASKALAKI, A. D. SÁNDOR, D. V. ENACHE, C. M. GHERMAN, A. D. MIHALCA (2017): Filaroid infections in wild carnivores: a multispecies survey in Romania. Parasites Vectors.
DOI 10.1186/s 13071-017-2269-3.

ISOGAI, E., H. ISOGAI, H. KAWABATA, T. MASUZAWA, Y. YANAGIHARA, K. KIMURA, T. SAKAI, Y. AZUMA, N. FUJII, S. OHNO (1994): Lyme-disease spirochetes in a wild fox (*Vulpes vulpes* schrencki) and ticks. J. Wild. Dis. 30, 439-444.
DOI: 10.7589/0090-3558-30.3.439.

JAHVARI, S., E. C. COIPAN, M. FONVILLE, A. D. VAN LEEUWEN, P. HANGEVELD, D. HEYLEN, P. HEYMAN, C. VAN MAANEN, C. M. BUTLER, G. FOLDVARI, S. SZEKERES, G. VAN DUIJVENDIJK, W. TACK, J. M. RIJKS, J. VAN DER GIESSEN, W. TAKKEN, S. E. VAN WIEREN, K. TAKUMI, H. SPRONG (2014): Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. Parasites Vectors 7, 365-372.
DOI: 10.1186/1756-3305-7-365.

JANZEN, T., M. PETERSSON, M. HAMMER, A. ASPAN, P. DINNETZ (2019): Equine Granulocytic Anaplasmosis in Southern Sweden: Associations with coniferous forest, water bodies and landscape heterogeneity. Agric. Ecosyst. Environ. 285. DOI:10.1016/j.agee.2019.106626.

JIANG, M., Y. LI, S. XIE, S. XIAO, Y. ZHANG, Y. YANG, Y. WANG, J. SHENG (2020): *Anaplasma ovis* and *Anaplasma phagocytophilum* Infection in Sheep and Wild Rodents from Northern Xinjiang, Northwest China. Kafkas Univ.Vet. Fak. Derg. 26, 295-298.
DOI: 10.9775/kvfd.2019.22317.

JOHNSON, J. L., H. S. GINSBERG, E. ZHIOUA, U. G. WHITWORTH, D. MARKOWSKI, K. E. HYLAND, R. J. HU (2004): Passive tick surveillance, dog seropositivity, and incidence of human Lyme disease. Vector Borne Zoonotic Dis. 4, 137-142.
DOI: 10.1089/1530366041210710.

JURIĆ, B., R. BECK, F. MARTINKOVIĆ, A. MILOSAVLJEVIĆ, S. PAHOVIĆ, A. MATIĆ, A. MARINCULIĆ (2007): The prevalence of *Dirofilaria* infekctions among truffle dogs in Istria, Croatia. Proceedings of the First European Dirofilaria Days. Abstract book, Zagreb, 36-36.

JURKOVIĆ, D., A. BECK, D. HUBER, Z. MIHALJEVIĆ, A. POLKINGHORNE, F. MARTINKOVIĆ, D. LUKAČEVIĆ, M. PILAT, R. BREZAK, S. BOSNIĆ, R. BECK (2019): Seroprevalence of vector-borne pathogens in dogs from Croatia. Parasitol. Res. 118, 347-352.
DOI: 10.1007/s00436-018-6129-7.

JURKOVIĆ, D. (2021): Genska tipizacija krpelja i patogena prenosivih krpeljima na području Republike Hrvatske, Doktorski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Repozitorij. Broj: urn:nbn:hr:178:482342

KAISER, R. (1988): Neuroborreliosis. [Review]. J. Neurol. 245, 247-255.

KALINOVA, Z., L. CISLAKOVA, M. HALANOVA (2009): Ehrlichiosis/Anaplasmosis. Klinicka mikrobiologije a infekcni lekarstvi. 15, 210-213.

KARBOWIAK, G., B. VICHOVA, V. MAJLATHOVA, J. HAPUNIK, B. PETKO (2009): *Anaplasma phagocytophilum* infection of red foxes (*Vulpes vulpes*). Ann. Agric. Environ. Med. 16, 299-300.

KIRTZ, G., B. CZETTEL, D. THUM, E. LEIDINGER (2007): *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Austria: A serological prevalence study (2001-2006). Kleintierpraxis 52, 562-568.

KODAMA, K., C. MASSONE, A. CHOTT, D. METZE, H. KERL, L. CERRONI (2005): Primary cutaneous large B-cell lymphomas: clinicopathologic features, classification, and prognostic factors in a large series of patients. Blood. 106, 2491-2497.
DOI: 10.1182/blood-2005-03-1175.

KOHN, B., C. SILAGHI, D. GALKE, G. ARNDT, K. PFISTER (2011): Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. Res Vet Sci. 91, 71 – 76.
DOI: 10.1016/j.rvsc.2010.08.008.

KOTWA, J. D., C. M. JARDINE, D. L. PEARL, O. BERKE, N. J. MERCER, A. S. PEREGRINE (2020): Evaluation of the SNAP® 4Dx® plus test for the detection of *Dirofilaria immitis* antigen and characterization of exposure to tick-borne pathogens in wild canids in southern Ontario. Vet. Parasitol. 283.
DOI: 10.1016/j.vetpar.2020.109176 .

LANGENWALDER, D. B., C. SILAGHI, M. NIEDER, M. PFEFFER, F. D. VON LOEWENICH (2020): Co-infection, reinfection and superinfection with *Anaplasma phagocytophilum* strains in a cattle herd based on ankA gene and multilocus sequence typing. Parasites Vectors. 13, 157-169.
DOI:10.1186/s13071-020-04032-2.

LARA, B., A. CONAN, M. THRALL, J. KETZIS, G. C. BRANFORD, S, RAJEEV (2020): Serologic and Molecular Diagnosis of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* Infection in Dogs in an Endemic Region. Pathogens. 9, 488-497. DOI: 10.3390/pathogens9060488.

LEFKADITIS, M., S. KOUKERI, V. COZMA (2010): An endemic area of *Dirofilaria immitis* seropositive dogs at the eastern foothills of Mt Olimpus, Northern Greece. Helminthologia. 47, 3-7.
DOI:10.2478/s11687-010-0001-3.

LEVETT, P. N. (2011): Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rew. 14, 296-326.
DOI: 10.1128/CMR.14.2.296–326.2001

LI, H., Y. C. ZHENG, L. MA, N. JIA, B. G. JIANG, R. R. JIANG, Q. B. HUO, Y. W. WANG, H. B. LIU, L. Y. CHU, Y. D. SONG, N. N. YAO, T. SUN, F. Z. ZENG, S. J. DUMLER, J. F. JIANG, W. C. CAO (2015): Human infection with a novel tick-borne *Anaplasma* species in China: a surveillance study. Lancet Infect Dis. 15, 663–670.
DOI: 10.1016/S1473-3099(15)70051-4.

LIU, J., J. P. DREXEL, B. ANDREWS, M. EBERTS, E. B. BREISCHWERDT, R. CHANDRASHEKAR (2018): Comparative Evaluation of 2 In-Clinic Assays for Vector-Borne Disease Testing in Dogs. Top. Companion Anim. Med. 33, 114-118.
DOI: 10.1053/j.tcam.2018.09.003.

LIZ, J. S., J. W. SUMNER, K. PFISTER, M. BROSSARD (2002): PCR Detection and Serological Evidence of Granulocytic Ehrlichial Infection in Roe Deer (*Capreolus capreolus*) and Chamois (*Rupicapra rupicapra*). J. Clin. Microbiol. 40, 892-897. DOI:10.1128/JCM.40.3.892-897.

LOFTIS, A. D., W. K. REEVES, D. E. SZUMLAS, M. M. ABBASSY, I. M. HELMY, J. R. MORIARITY, G. A. DASCH (2006): Rickettsial agent sin Egyptian ticks collected from domestic animals. Exp. Appl. Acarol. 49, 67-81.
DOI: 10.1007/s10493-006-9025-2.

LOVRIĆ, L., V. VAVŽIL, T. ŽIVIČNJAK (2022): Subclinical dirofilariosis in dogs in Croatia – results of retrospective research based on archived blood samples. Vet. Arhiv, 92,323 – 330.
DOI: 10.24099/vet.arhiv.1453.

MADISON-ANTENUCCI, S., L. D. KRAMER, L. L. GEBHARDT, E. KAUFFMAN (2020): Emerging Tick-Borne Diseases. Clin. Microbiol. Rev. 33,
DOI: 10.1128/CMR.00083-18.

MAGI, M., P. CALDERINI, S. GABRIELLI, M. DELL OMODARME, F. MACCHIONI, M. C. PRATI, G. CANCRINI (2008): *Vulpes vulpes*: A possible wild reservoir for zoonotic filariae. Vector Borne Zoonotic Dis. 8, 249-252.
DOI: 10.1089/vbz.2007.0207.

MAIA, C., B. ALMEIDA, M. COIMBRA, M. C. FERNANDES, J. M. CRISTOVAO, C. RAMOS, A. MARTINS, F. MARTINHO, P. SILVA, N. NEVES, M. NUNES, M. V. VIEIRA, L. CARDOSO, L. CAMPINO (2015): Bacterial and protozoal agents of canine vector-born diseases in the blood of domestic and stray dogs from southern Portugal. Parsit. Vector 8, 138.
DOI: 10.1186/s13071-015-0759-8.

MANNELLI, A., U. KITRON, C. J. JONES, T. L. SLAJCHERT (1993): *Ixodes-dammini* (Acari, *Ixodidae*) infestation on medium-sized mammals and blue jays in northwestern Illinois. J. Med. Entomol. 30, 950-952.
DOI: 10.1093/jmedent/30.5.950.

MARCONCINI, A., M. MAGI, G. MACCHIONI, M. SASSETTI (1996): Filarioses in foxes in Italy. Vet. Res. Commun. 20, 316-319.
DOI: 10.1007/BF00366537.

MARKS, C. A., T. E. BLOOMFIELD (1998): Canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) detected in red foxes (*Vulpes vulpes*) in urban Melbourne. Vet. Parasitol. 78, 147-154. DOI:10.1016/S0304-4017(98)00131-9.

MASCARELLI, P. E., S. A. ELMORE, E. J. JENKINS, R. T. ALISAUSKAS, M. WALSH, E. B. BREITSCHWERDT, R. G. MAGGI (2015): Vector-borne pathogenics in arctic foxes, *Vulpes lagopus*, from Canada. Res. Vet. Sci. 99, 58-59.
DOI: 10.1016/j.rvsc.2014.12.011.

MASUZAWA, T., B. WILSKE, T. KOMIKADO, H. SUZUKI, H. KAWABATA, N. SATO, K. MURAMATSU, N. SATO, E. ISOGAI, H. ISOGAI, R. C. JOHNSON, Y. YANAGIHARA (1996): Comparison of OspA serotypes for *Borrelia burgdorferi sensu lato* from japan, Europe and North America. Microbio. Immunol. 40, 539-545.
DOI: 10.1111/j.1348-0421.1996.tb01106.x.

MATEI I, A., A. ESTRADA-PEÑA, S. J. CUTLER, M. VAYSSIER-TAUSSAT, L. VARELA-CASTRO, A. POTKONJAK, H. ZELLER, A. D. MIHALCA (2019): A review on the eco-epidemiology and clinical management of human granulocytic anaplasmosis and its agent in Europe. Parasites Vectors. 12, 599-618.
DOI:10.1186/s13071-019-38.

MATEI, I. A., I. TALIDA, A. M. IONICA, G. D AMICO, G. DEAK, G. C. NADAS, C. S. NOVAC, C. M. GHERMAN, A. D. MIHALCA (2021): *Anaplasma phagocytophilum* in multiple tissue samples of wild carnivores in Romania. J. of Wild. Dis. 57, 949-953.
DOI: 10.7589/JWD-D-20-00158.

MEDKOUR, H., Y. LAIDOUDI, J. L. MARIE, F. FENOLLAR, B. DAVOUST, O. MEDIANNIKOV (2020): Molecular investigation of vector-borne pathogens in red foxes (*vulpes vulpes*) from southern france. J. of Wild. Dis. 56, 837-850.
DOI: 10.7589/2019-09-234.

MENCKE, N. (2013): Future challenges for parasitology: Vector control and „One health“ in Europe the veterinary medicinal view on CVBDs such as tick borreliosis and canine leishmaniosis. Vet. Parasitol. 195, 256-271.
DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.04.007.

MESHGI, B., A. ESLAMI, A. R. BAHONAR, M. KHARRAZIAN-MOGHADAM, A. GERAMI-SADEGHIAN (2009): Prevalence of parasitic infections in red fox (*Vulpes vulpes*) and golden jackal (*Canis aureus*) in Iran. Iran. J Vet. Res. 10, 387-391.

MILAS, Z., N. TURK, Z. JANICKI, A. SLAVICA, V. STAREŠINA, LJ. BARBIĆ, M. LOJKIĆ, Z. MODRIĆ (2006): Leptospiral antibodies in red foxes (*Vulpes vulpes*) in northwest Croatia. Vet. Arhiv 51-57, 77.

MILLAN, J., M. A. JIMENEZ, M. VIOTA, M. G. CANDELA, L. PENA, L. LEON-VIZCAINO (2008): Disseminated Bovine Tuberculosis in a Wild Red Fox (*Vulpes vulpes*) in Southern Spain, J. Wildl. Dis. 44, 701-706.
DOI;10.7589/0090-3558-44.3.701.

MILLER, D. S., B. G. CAMPBELL, R. G. MCLEAN, E. CAMPOS, D. F. COVELL (1998): Parasites of swift fox (*Vulpes velox*) from southeastern Colorado. Southwest. Nat. 43, 476-479.

MILLER, L. L., P. R. CROSBIE (2011): Canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) in Fresno and Madera Counties, California: prevalence differences between foothill and valley habitats. Vet. Parasitol. 175, 84-91.
DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.10.008.

MIRCEAN, V., M. O. DUMITRACHE, A. GYORKE, N. PANTCHEV, R. JODIES, A. D. MIHALCA, V. COZMA (2012): Seroprevalence and Geographic Distribution of *Dirofilaria immitis* and Tick-Borne Infections (*Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and *Ehrlichia canis*) in Dogs from Romania. Vector Borne Zoonotic Dis. 12, 595 - 604.
DOI: 10.1089/vbz.2011.0915.

MIYOSHI, T., H. TSUBOUCHI, A. IWASAKI, T. SHIRAISHI, K. NABESHIMA, T. SHIRAKUSA (2006): Human pulmonary dirofilariasis: A case report and review of the recent Japanese literature. Respirology 11, 343-347.
DOI: 10.1111/j.1440-1843.2006.00855.

MORCHON, R., E. CARRETON, J. GONZALEZ-MIGUEL, I. MELLADO-HERNANDEZ (2012): Heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) and their vectors in Europe - New distribution trends. Front. Physiol. 3, 196.
DOI:10.3389/fphys.2012.00196.

MORCHON, R., J. A. MONTOYA-ALONSO, I. RODRIGUEZ-ESCOLAR, E. CARRETON (2022): What Has Happened to Heartworm Disease in Europe in the Last 10 Years?. Pathogens. 11, 1042.
DOI: 10.3390/pathogens11091042

MORGAN, E. R., A. TOMLINSON, S. HUNTER, T. NICHOLS, E. ROBERTS, M. T. FOX, M. A. TAYLOR (2008): *Angiostrongylus vasorum* and *Eucoleus aerophilus* in foxes (*Vulpes vulpes*) in Great Britain. Vet. Parasitol. 154, 48-57.
DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.02.030.

MORSHED, M. G., J. D. SCOTT, K. FERNANDO, L. BEATI, D. F. MAZEROLLE, G. GEDDES, L. A. DURDEN (2005): Migratory songbirds disperse tick across Canada, and first isolation of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, from the avian tick, *Ixodes auritulus*. J. Parasitol. 91, 780-790.
DOI: 10.1645/GE-3437.1.

MRAOVIĆ, J., B. JURIĆ, M. KRZNARIĆ, Z. TUS, M. LONČAR, V. VRKIĆ, A. MARINCULIĆ, K. KRIVIČIĆ, M. PAVLAK (2019): Epidemiološko istraživanje nekih zoonoza u pasa i procjena rizičnih čimbenika. Vet. Stanica 50, 425-436.

MRLJAK, V., J. KULES, Z. MIHALJEVIC (2017): Prevalence and Geographic Distribution of Vector-Borne Pathogens in Apparently Healthy Dogs in Croatia. Vector Borne Zoonotic Dis. 17, 398-408.
DOI: 10.1089/vbz.2016.1990.

MULIĆ, R., B. PETROVIĆ, Z. KLIŠMANIĆ, I. JERONČIĆ (2011): Bolesti koje se prenose krpeljima na području Hrvatske. Liječ. Vjesn. 133, 89-95.

NICHOLSON, C. P., M. S. ALLEN, V. F. TRASTEK, H. D. TAZELAAR, P. C. PAIROLERO (1992): *Dirofilaria immitis* – a rare, increasing cause of pulmonary nodules. Mayo Clin. Proc. 67, 646-650.
DOI: 10.1016/s0025-6196(12)60718-6.

NIETO, N. C., S. LEONHARD, J. E. FOLEY, R. S. LANE (2010): Coinfection of Western gray squirel (*Sciurus griseus*) and other sciurid rodents with *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and *Anaplasma phagocytophilum* in California. J. Wildl. Dis. 46, 291-296.
DOI: 10.7589/0090-3558-46.1.291.

PANTCHEV, N., M. SCHNYDER, M. G. VRHOVEC, R. SCHAPER, I. TSACHEV (2015): Current Surveys of the Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi, Ehrlichia canis, Anaplasma phagocytophilum, Leishmania infantum, Babesia canis, Angiostrongylus vasorum* and *Dirofilaria immitis* in Dogs in Bulgaria. Parasitol. Res. 114, 117 - 130. DOI: 10.1007/s00436-015-4518-8.

PANTCHEV, N., R. SCHAPER, S. LIMOUSIN, N. NORDEN, M. WEISE, L. LORENTZEN (2009): Occurrence of *Dirofilaria immitis* and Tick-Borne Infections Caused by *Anaplasma phagocytophilum, Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Ehrlichia canis* in Domestic Dogs in France: Results of a Countrywide Serologic Survey. Parasitol. Res. 105, 101 - 113.
DOI: 10.1007/s00436-009-1501-2.

PEKACZ, M., K. BASAŁAJ, A. KALINOWSKA, M KLOCKIEWICZ, D. STOPKA, P. BĄSKA, E. DŁUGOSZ, J. KARABOWICZ, D. MŁOCICK, M. WIŚNIEWSKI, A. ZAWISTOWSKA-DENIZIAK (2022): Selection of new diagnostic markers for *Dirofilaria repens* infections with the use of phage display technology. Scientific Reports, 12, 22.
DOI:.org/10.1038/s41598-022-06116-

PENEZIĆ, A., S. SELAKOVIĆ, I. PAVLOVIĆ, D. CIROVIĆ (2014): First findings and prevalence of adult heartworms (*Dirofilaria immitis*) in wild carnivores from Serbia. Parasitol. Res. 113, 3281-3285.
DOI: 10.1007/s00436-014-3991-9.

PETRUCCELLI, A., G. FERRARA, G. IOVANE, R. SCHETTINI, R. CIARCIA, V. CAPUTO, M. POMPAMEO, U. PAGNINI, S. MONTAGNARO (2020): Seroprevalence of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and *Dirofilaria immitis* in Stray Dogs, from 2016 to 2019, in Southern Italy. Animals. 11, 9. DOI: 10.3390/ani11010009.

POLJAK, I., B. TROSELJ-VUKIĆ, B. MILETIĆ (2000): Low sero-prevalence of Lyme borreliosis in the forested mountainous area of Gorski Kotar. Croatia. Croat. Med. J. 41, 433-436.

POTKONJAK, A., A. ROJAS, R. GUTIÉRREZ, Y. NACHUM-BIALA, G. KLEINERMAN, S. SAVIĆ, V. POLAČEK, I. PUŠIĆ, S. HARRUS, G. BANETH (2020): Molecular survey of *Dirofilaria* species in stray dogs, red foxes and golden jackals from Vojvodina, Serbia. Comparative Immunology, Microbiol. Infect. Dis. 68,
DOI: 10.1016/j.cimid.2019.101409.

POTKONJAK, A., V. VRACAR, S. SAVIĆ, B. LAKO, V. RADOSAVLJEVIĆ, M. CINCOVIĆ, L. SUVAJDŽIĆ, A. JURIŠIĆ, A. PETROVIĆ (2015): The seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs in the Autonomous Province of Vojvodina, Serbia. Vet. Arhiv. 85, 385 - 394.

PUIZINA-IVIĆ, N., N. DŽAKULA, J. BEZIĆ, V. PUNDA-POLIĆ, S. SARDELIĆ, I. KUZMIĆ-PRUSAC (2003): First two cases of human dirofilariasis recorded in Croatia. Parasite, 10,4,382-384

PUPIĆ-BAKRAČ, A., J. PUPIĆ-BAKRAČ, D. JURKOVIĆ, M. CAPAR, L. LAZARIĆ STEFANOVIĆ, I. ANTUNOVIĆ ĆELOVIĆ, J. KUČINAR, A. POLKINGHORNE, R. BECK (2020): The trends of human dirofilariasis in Croatia: Yesterday-Today-Tomorrow. One Health, 10.
DOI:10.1016/j.onehlt.2020.100153.

PUSTERIA, N., P. DEPLAZES, U. BRAUN, H. LUTZ (1999): Serological evidence of infection with *Ehrlichia* spp. in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Switzerland. J. Clin. Microbiol. 37, 1168-1169.
DOI: 10.1128/JCM.37.4.1168-1169.1999.

RIEBENBAUER, K., P. B. WEBER, J. WALOCHNIK, F. KARLGOFER, S, WINKLER, S. DORFERI, H. AUER, J. VALENCAKI, M. LAIMER, A. HANDISURYA (2021): Human dirofilariosis in Austria: the past, the present, the future. Parasite Vectors, 14, 227.
DOI: 10.1186/S13071-021-04696-4

RIDYARD, A. (2005): Heartworm and lungworm in dogs and cats in the UK. In Practice. 27, 147-153.
DOI: 10.1136/inpract.27.3.147.

RIIPKEMA, S., D. GOLUBIC, M. MOLKENBOER, N. VERBEEK-DE KRUIF, J. SCHELLEKENS (1996): Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. Exp. Appl. Acarol. 20, 23-30.
DOI: 10.1007/BF00051474.

RISHNIW, M., S. C. BARR, K. W. SIMPSON, M. F. FRONGILLO, M. FRANZ, J. L. DOMINGUEZ ALPIZAR (2006): Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. Vet. Parasitol. 135, 303–314.
DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.10.013.

RITTHIKULPRASERT, S., P. JIRAPITI, S. PENGPIS (2020): Molecular and antigen detection of *Dirofilaria immitis* infection in client-owned cats in Bangkok, Thailand. Thai. J. Vet. Med. 50, 109-113.

ROEMER, G. W., T. J. COONAN, D. K. GARCELON, C. H. STARBIRD, J. W. MCCALL (2000): Spatial and temporal variation in the seroprevalence of canine hertworm antigen in the island fox. J. Wild. Dis. 36, 723-728.
DOI: 10.7589/0090-3558-36.4.723.

SALKELD, D. J., S. LEONHARD, Y. A. GIRARD, N. HAHN, J. MUN, K. A. PIDGETT, R. S. LANE (2008): Identifying the reservoir hosts of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* in California: The role of the western gray squirel (*Sciurus griseus*). Am. J. Trop. Med. Hyg. 79, 535-540.

SCARAMOZZINO, P., S. GABRIELLI, M. DI PAOLO, M. SALA, F. SCHOLL, G. CANCRINI (2005): Dog filariosis in the Lazio region (Central Italy): first report on the presence of *Dirofilaria repens*. BMC Infect. Dis. 5:75.
DOI: 10.1186/1471-2334-5-75.

SCHOFFEL, I., E. SCHEIN, U. WITTSTADT, J. HENTSCHE (1991): Parasites of red fox in Berlin (west). Berl. Munch.Tierarztl. Wochenschr. 104, 153-157.

SEGOVIA, J. M., J. TORRES, J. MIQUEL (2004): Helminth parasites of the red fox (*Vulpes vulpes* L., 1758) in the Iberian peninsula: an ecological study. Acta Parasitol. 49, 67-79.

SEO, M. G., O. D. KWON, D. KWAK (2019): *Anaplasma bovis* infection in a horse: First clinical report and molecular analysis. Vet. Microbiol. 233, 47-51.
DOI: 10.1016/j.vetmic.2019.04.024.

SIMÓN, F., M. SILES-LUCAS, R. MORCHÓN, J. GONZÁLEZ-MIGUEL, I. MELLADO, E. CARRETÓN, J. A. MONTOYA-ALONSO (2012): Human and Animal Dirofilariosis: the Emergence of a Zoonotic Mosaic. Clin. Microbiol. Rev. 25, 507-544.
DOI:10.1128/CMR.00012-12.

SLAVICA, A., D. DEŽDEK, D. KONJEVIĆ, Z. CVETNIĆ, M. SINDIČIĆ, D. STANIN, J. HABUS, N. TURK (2011): Prevalence of leptospiral antibodies in the red foh (*Vulpes vulpes)* population of Croatia. Vet. Med. (Praha) 56, 209-213.

SOCOLOVSCHI, C., O. MEDIANNIKOV, D. RAOULT, P. PAROLA (2009): Update on tick-borne bacterial diseases in Europe. Parasite 16, 259-273.
DOI: 10.1051/parasite/2009164259.

SRETER, T., Z. SRETER-LANCZ, Z. SZELL, D. KALMAN (2004): *Anaplasma phagocytophilum:* an emerging tick-borne pathogen in Hungary and central eastern Europe. Ann.Trop. Med. Parasitol. 98, 401-405.
DOI: 10.1179/000349804225003343.

STILLMAN, B. A., M. MONN, J. LIU, B. THATCHER, P. FOSTER. B. ANDREWS, S. LITTLE, M. EBERTS. E. B. BREITSCHWERDT, M. J. BEALL, R. CHANDRASHEKAR (2014): Performance of a commercially available in-clinic ELISA for detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum, Anaplasma platys, Borrelia burgdorferi, Ehrlichia canis, Ehrlichia ewingii* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 245, 80-86.
DOI: 10.2460/javma.245.1.80.

SVIBEN, M., T. MEŠTROVIĆ, K. NEMER, K. PALKO-BARTULOVIĆ, R. ŠKARA, G. MLINARIĆ-GALINOVIĆ (2003): Dirofilaria repens as a cause of subconjunctival infection in a 77-years old female patient from Croatia – a case report. Coll. Antropol. 37, 3, 995-997.

SZEKERES, S., A. D. VAN LEEUWEN, E. TOTH, G. MAJOROS, H. SPRONG, G. FOLDVARI (2019): Road-killed mammals provide insight into tick-borne bacterial pathogen communities within urban habitats. Transound. Emerg. Dis. 66, 277-286. DOI:10.1111/tbed.13019.

TAMURA, K., D. PETERSON, N. PETERSON, G. STECHER, M. NEI, S. KUMAR (2011): MEGA5. molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutioary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28,:2731-2739.
DOI:10.1093/molbev/msr121.

TATE, C. M., E. HOWERTH, D. MEAD, V. G. DUGAN, M. P. LUTTRELL, A. I. SAHORA, U. G. MUNDERLOH, W. R. DAVIDSON, M. YABSLEY (2013): *Anaplasma odocoilei* spp. nov. (Family *Anaplasmataceae*) from whitetailed deer (*Odocoileus virginianus*). Ticks Tick Borne Dis. 4, 110–119.
DOI: 10.1016/j.ttbdis.2012.09.005.

TOLNAI, Z., Z. SRETER-LANCZ, T. SRETER (2015): Spatial distribution of *Anaplasma phagocytophilum* and *Hepatozoon canis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Hungary. Ticks Tick Borne Dis. 6, 645-648.
DOI: 10.1016/j.ttbdis.2015.05.009.

TOLNAI, Z., Z. SZELL, A. SPROCH, I. SZEREDI, T. SRETER (2014): *Dirofilaria immitis*: An emerging parasite in dogs, red foxes and golden jackals in Hungary. Vet. Parasitol. 203, 339-342.
DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.04.004.

THOMPSON, J. D., T. J., GIBBSON, F. PLEWNIAK, F. JEANMOUGIN, D. G. HIGGINS (1997): The Clustal_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 25, 4876-4882.
DOI:10.1093/nar/25.24.4876.

TOPOLOVEC, J., D. PUNTARIC, A. ANTOLOVIC-POZGAIN, D. VUKOVIC, Z. TOPOLOVEC, J. MILAS, V. DRUSKO-BARISIC, M. VENUS (2003): Serologically detected "new" tick-borne zoonoses in eastern Croatia. Croat. Med. J. 44, 626-629.

TORGERSON, R. P., C. N. L. MACPHERSON (2011): The socioeconomic burden of parasitics zoonoses; Global trends. Vet. Parasitol. 182, 79-95.
DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.07.017.

TORINA, A., V. BLANDA, F. ANTOCI, S. SCIMECA, R. D AGOSTINO, E. SCARIANO, A. PIAZZA, P. GALLUZZO, E. GIUDICE, S. CARACAPPA (2013): A molecular survey of *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Ehrlichia canis* and *Babesia microti* in foxes and fleas from Sicily. Transbound. Emerg. Dis. 60, 125-130.
DOI: 10.1111/tbed.12137.

TURK, N., A. MARINCULIĆ, Z. MODRIC (2000): Serologic studies of canine Lyme borreliosis in the Zagreb area (Croatia). Vet. Arhiv 70, 39-45.

TURK, N., Z. MILAS, J. MARGALETIC, R.TURK, LJ. BARBIC, D. KONJEVIC, S. PERIC, Z. STRITOF, V. STARESINA (2008): The role of fat dormouse (*Glis glis* L.) as reservoir host for spirochete *Borrelia burgdorferi sensu lato* in the region of Gorski Kotar, Croatia. Eur. J. Wildl. Res. 54, 117–121.
DOI: 10.1007/s10344-007-0119-x.

VERA, C. P., S. KAPIAINEN, S. JUNNIKKALA, K. AALTONEN, T. SPILLMANN, O. VAPALAHTI (2014): Survey of selected tick-borne diseases in dogs in Finland. Parasit. Vectors. 7:285.
DOI: 10.1186/1756-3305-7-285.

VICHOVA, B., V. MAJLATHOVA, M. NOVAKOVA, M. STANKO, I. HVISCOVA, L. PANGRACOVA, T. CHRUDIMSKY, J. CURLIK, B. PETKO (2014): Anaplasma infections in ticks and reservoir host from Slovakia. Infect. Genet. Evol. 22, 265-272.
DOI: 10.1016/j.meegid.2013.06.003.

WIKERHAUSER T., J. BRGLEZ (1996): Atlas parazita uzročnika zoonoza u Hrvatskoj i Sloveniji. Školska knjiga. Zagreb, 52-54.

WIXSOM, M. J., S. P. GREEN, R. M. CORWIN, E. K. FRITZELL (1991): *Dirofilaria immitis* in coyotes and foxes in Missouri. J. Wild. Dis. 27, 166-169.
DOI: 10.7589/0090-3558-27.1.166.

WOAH (2020): *Borrelia* spp. Technical Disease Cards. Dostupno na: https://www.oie.int/app/uploads/2021/05/*borrelia*-spp-infection-with.pdf

WODECKA, B., J. MICHALIK, R. GROCHOWALSKA (2022): Red foxes (*Vulpes vulpes*) are exposed to high diversity of *Borrelia burgdorferi sensu lato* species infecting fox-derived *Ixodes* ticks in West-Central Poland. Pathogens. 11, 696.
DOI: 10.3390/pathogens11060696.

XHAXHIU, D., I. KUSI, D. RAPTI, E. KONDI, R. POSTOLI, L. RINALDI, Z. M. DIMITROVA, M. VISSER, M. KNAUS, S. REHBEIN (2011): Principal intestinal parasites of dogs in Tirana, Albania. Parasitol. Res. 108, 341-353.
DOI: 10.1007/s00436-010-2067-8

ZANET, S., E. BATTISTI, P. PEPE, L. CIUCA, L. COLOMBO, A. TRISCIUOGLIO, E. FERROGLIO, G. CRINGOLI, L. RINALDI, M. P. MAURELLI (2020): Tick-borne pathogens in *Ixodidae* ticks collected from privately-owned dogs in Italy: a country-wide molecular survey. BMC Vet. Res. 16:46.
DOI: 10.1186/s12917-020-2263-4.

ŽIVANOVIĆ, B., Z. LER, R. CEKANAC (1991): Risk of infection with *Borrelia burgdorferi* in an area endemic for Lyme disease. Vojnosanit. Pregled. 48, 400-404.

ŽIVIČNJAK, T., F. MARTINKOVIĆ, R. BECK (2006): Dirofilariosis in Croatia: spread and public health impact. 5th Croatian Congress on Infective Diseases, Zadar, Croatia, Abstract book, 23 - 27.

9. PRILOZI

Prilog 1. Popis broja uzorkovanih lisica te broj dobivenih pozitivnih uzoraka po pojedinom staništu (lovištu) i županijama

ŽUPANIJA	LOVIŠTE	BROJ UZORAKA	Pozitivni ANAPLAZMA	Pozitivni DIROFILARIJA
Zagrebačka	I/101 ZAPREŠIĆ	2	2	
Zagrebačka	I/102 JABLANOVEC	1		
Zagrebačka	I/108 BRDOVEČKO PRIGORJE	1	1	
Zagrebačka	I/109 SVETONEDELJSKO – SAMOBORSKO POLJE	2		
Zagrebačka	I/111 SAMOBORSKA GORA	3		
Zagrebačka	I/112 BREZOVA GORICA – LIPOVAC	1		1
Zagrebačka	I/117 GLAVICE	1		
Zagrebačka	I/118 SVETA JANA	1	1	
Zagrebačka	I/121 CVETKOVIĆ	1		
Zagrebačka	I/122 Jastrebarsko	1		
Zagrebačka	I/124 BRATINA	1		
Zagrebačka	I/125 PISAROVINA – JAMNICA	1		
Zagrebačka	I/126 KUPČINSKO POLJE	1		
Zagrebačka	I/131 KLJUČIĆ BRDO	1		
Zagrebačka	I/132 KRAVARSKO	2		
Zagrebačka	I/133 MRACLIN	1		
Zagrebačka	I/135 VUKOVINA	1		
Zagrebačka	I/136 VELIKA GORICA	5		
Zagrebačka	I/138 ČRNKOVEC	2		
Zagrebačka	I/139 NOVO ČIČE	1		
Zagrebačka	I/14 TUROPOLJSKI LUG II	2		
Zagrebačka	I/140 ORLE	3		
Zagrebačka	I/146 KOMINE – TURENTAKS	2		
Zagrebačka	I/148 BERTOVINA STRMEC	4	1	

Zagrebačka	I/149 SUŠAK – ZELINSKA GORA	3		
Zagrebačka	I/150 RADOIŠĆE MOKRICA	1		
Zagrebačka	I/152 Lonjica	1		
Zagrebačka	I/155 ORAO	1		
Zagrebačka	I/157 ČRET	2		
Zagrebačka	I/158 MOKRICE	1		
Zagrebačka	I/160 Varoška	1		
Zagrebačka	I/161 GAJ	1		
Zagrebačka	I/7 SOPOT	1	1	
	UKUPNO	**53**	**6**	**1**
Krapinsko-zagorska	II/101 HUM NA SUTLI	1		
Krapinsko-zagorska	II/102 DESINIĆ	3		
Krapinsko-zagorska	II/103 Pregrada	1		
Krapinsko-zagorska	II/108 ĐURMANEC	1		
Krapinsko-zagorska	II/111 Krapina	1		
Krapinsko-zagorska	II/112 Radoboj	1		1
Krapinsko-zagorska	II/117 Zabok	2		
Krapinsko-zagorska	II/118 BEDEKOVČINA	1		
Krapinsko-zagorska	II/120 LOBOR	1		1
Krapinsko-zagorska	II/123 ZLATAR BISTRICA	1		
Krapinsko-zagorska	II/126 KONJŠČINA	1		
Krapinsko-zagorska	II/127 OROSLAVJE	1		
Krapinsko-zagorska	II/130 MARIJA BISTRICA	2		
	UKUPNO	**17**	**0**	**2**
Sisačko-moslavačka	III/10 Gušće	1		
Sisačko-moslavačka	III/104 Odransko polje	2		
Sisačko-moslavačka	III/108 POPOVAČA	1		
Sisačko-moslavačka	III/11 JAMARIČKO BRDO	1		
Sisačko-moslavačka	III/123 HRVATSKA KOSTAJNICA	1		

Sisačko-moslavačka	III/124 DIVUŠA	1		1
Sisačko-moslavačka	III/126 HRVATSKI ČUNTIĆ	1		
Sisačko-moslavačka	III/127 PETRINJA	1		
Sisačko-moslavačka	III/128 GORA	1		
Sisačko-moslavačka	III/129 GLINSKO NOVO SELO	1		
Sisačko-moslavačka	III/13 KLJUKA	1		1
Sisačko-moslavačka	III/130 MAJA	1		
Sisačko-moslavačka	III/14 KOTAR ŠUMA	1		
Sisačko-moslavačka	III/20 MAJDAN 1	1		
Sisačko-moslavačka	III/24 ORLOVA	2		1
Sisačko-moslavačka	III/36 VIŠNJIČKI BOK	1		
Sisačko-moslavačka	III/38 MAJDAN II	3	1	
	UKUPNO	**21**	**1**	**3**
Karlovačka	IV/102 JAŠKOVO	2		
Karlovačka	IV/103 RIBNIK	1		
Karlovačka	IV/106 VRHOVAC	1		1
Karlovačka	IV/117 TUŠILOVIĆ	1		
Karlovačka	IV/119 KRNJAK	1		
Karlovačka	IV/126 ZVEČAJ	2	1	
Karlovačka	IV/127 BELAJ	2	1	
Karlovačka	IV/130 BOSILJEVAC	1		
Karlovačka	IV/132 MEĐUVOĐE	1	1	
Karlovačka	IV/135 DREŽNICA	1		
Karlovačka	IV/136 TROJVRH	1	1	
Karlovačka	IV/142 PRIMIŠLJE	4	1	
Karlovačka	IV/145 MAŠVINA	1		
Karlovačka	IV/146 RAKOVICA	1		1
Karlovačka	IV/147 NOVA KRŠLJA	1		1
Karlovačka	IV/151 RADATOVIĆ	2		
Karlovačka	IV/152 VOJNIĆ	2	1	
Karlovačka	IV/19 MALA JAVORNICA	1		1
	UKUPNO	**26**	**6**	**4**

Varaždinska	V/102 VINICA	1		
Varaždinska	V/103 KALNIK	1		
Varaždinska	V/103 Zelendvor	1		
Varaždinska	V/104 PETRIJANEC	4	1	
Varaždinska	V/111 LUDBREG	2		
Varaždinska	V/113 ŠAULOVEC	1		
Varaždinska	V/118 Bednja	1		
Varaždinska	V/129 BREZNICA	1		
	UKUPNO	**12**	**1**	**0**
Bjelovarsko-bilogorska	VII/15 ZAPNADNA GARJEVICA	1		
Bjelovarsko-bilogorska	VII/505 Daruvar – Dolovi	1		
Bjelovarsko-bilogorska	VII/7 JAVORNIK	1	1	
Bjelovarsko-bilogorska	VII/8 Končanica	1		
	UKUPNO	**4**	**1**	**0**
	UKUPNO	**1**	**0**	**0**
Požeško-slavonska	XI/103 ORLJAVAC	2		
Požeško-slavonska	XI/104 BRESTOVAC	1		
Požeško-slavonska	XI/105 BIŠKUPCI	1		
Požeško-slavonska	XI/106 VELIKA	1		
Požeško-slavonska	XI/107 POŽEGA I	2		
Požeško-slavonska	XI/108 KAPTOL	2		
Požeško-slavonska	XI/109 POŽEGA II	1		
Požeško-slavonska	XI/111 JAKŠIĆ	1		
Požeško-slavonska	XI/114 BUK	1		
Požeško-slavonska	XI/115 BEKTEŽ	1		
Požeško-slavonska	XI/119 Bučje	1		1
Požeško-slavonska	XI/122 Trokut	1		
Požeško-slavonska	XI/18 POŽEŠKA GORA	2		
Požeško-slavonska	XI/19 SJEVERNA BABJA GORA I	1	1	
Požeško-slavonska	XI/2 ISTOČNI PSUNJ	1		

Požeško-slavonska	XI/21 SJEVERNA BABJA GORA III	1		
Požeško-slavonska	XI/25 ZVEČEVO	1		
Požeško-slavonska	XI/8 JUŽNI PAPUK III	1		
	UKUPNO	**22**	**1**	**1**
Međimurska	XX/103 DRAŠKOVEC	2		
Međimurska	XX/105 Hodošan	1		
Međimurska	XX/106 Prelog	1		
Međimurska	XX/108 DEKANOVEC	3		
Međimurska	XX/109 Mala Subotica	3	1	
Međimurska	XX/110 ČAKOVEC I	1		
Međimurska	XX/111 Nedelišće	3	1	
Međimurska	XX/114 ŠTRIGOVA	1		
Međimurska	XX/115 SVETI MARTIN NA MURI	1		
Međimurska	XX/116 MURSKO SREDIŠĆE	1		
Međimurska	XX/118 ČAKOVEC II	1		
Međimurska	XX/120 ČAKOVEC	1		
	UKUPNO	**19**	**2**	**0**
Grad Zagreb	XXI/1 OBREŠKI LUG	1		1
Grad Zagreb	XXI/102 Brezovica - Kupinečki Kraljevec	1		
Grad Zagreb	XXI/103 SVETA KLARA	1		
Grad Zagreb	XXI/108 BELOVAR MORAVČE	1		
	UKUPNO	**4**	**0**	**1**
	SVEUKUPNO	**179**	**18**	**12**

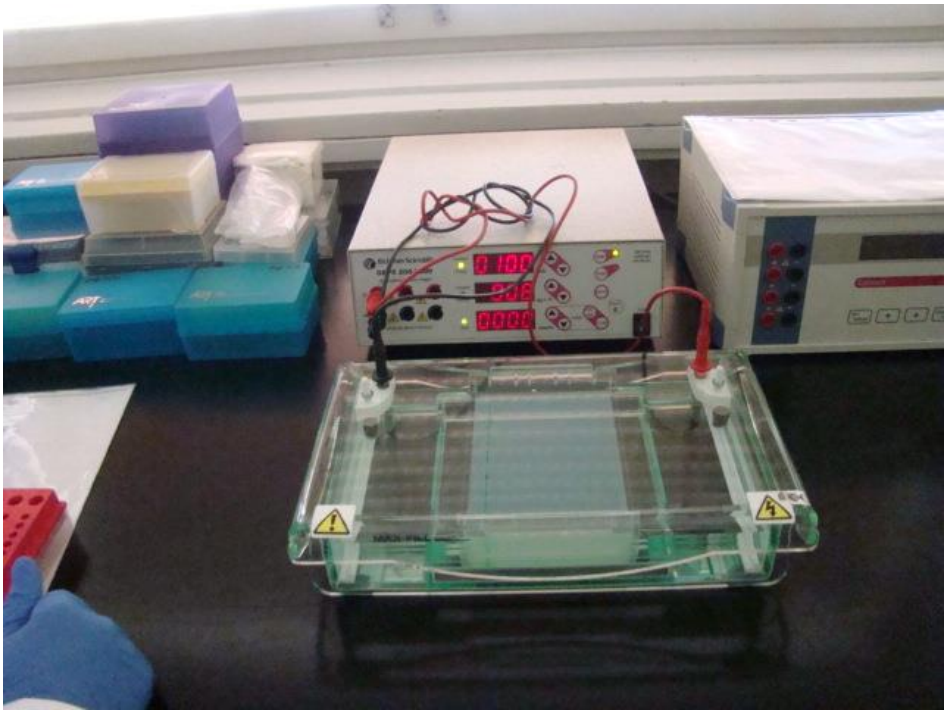
Prilog 2. Provođenje istraživanja i izvođenje metoda

Uzimanje uzorka krvi za SNAP® 4Dx® Plus test i dodavanje konjugata u uzorak krvi za SNAP® 4Dx® Plus test

Ulijevanje konjugata i krvi u bazenčić uzorka za SNAP® 4Dx® Plus test

Postupak izdvajanja DNA iz uzorka krvi primjenom komercijalnog kita ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, SAD)

Umnožavanje ciljnog dijela DNA u uređaju GenAmp System 9700 (Applied Biosystems, SAD)



Provjera dobivenih PCR produkata elektroforezom u 2-postotnom agaroznom gelu (SCIE-PLAS, UK)

10. ŽIVOTOPIS AUTORA TE POPIS OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

Rođen sam 5. kolovoza 1963. godine u Zagrebu. Osnovnu školu polazim u Vrbovcu od 1970. do 1978. godine kad upisujem Srednju školu u Vrbovcu. U njoj ostajem do 1980. godine kad prelazim u Srednju školu „Poljoprivredni institut Križevci“, smjer veterinarski pomoćnik, koju završavam 1982. godine. Iste godine upisujem Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu te odlazim na odsluženje vojnog roka. Diplomski studij polazim od 1983. godine do 1991. godine. Iste se godine zapošljavam u Mesnoj industriji PIK Vrbovec kao tehnolog u proizvodnji. U mesnoj industriji ostajem do 2000. godine otkad radim na raznim poslovima vezanim za komercijalu. Od 2008. godine radim u Ministarstvu poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja kao inspektor za SAPARD/IPARD mjere. Od 2009. godine zaposlen sam u Agenciji za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju na poziciji Višeg stručnog savjetnika za kontrolu mjera izravne potpore i ruralnog razvoja.
Godine 2009. dobio sam stipendiju Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja iz darovnice Kraljevine Nizozemske. Na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu upisujem zadnji semestar magisterija znanosti, no nakon što se uspostavlja doktorski studij, upisujem isti i prekidam magisterij. Od 2011. godine pohađam doktorski studij, a 2018. branim temu i privodim doktorski rad kraju.

Objavljeni znanstveni radovi:

CVITKOVIĆ D., **K. TRNINIĆ**, S. PAŠIĆ, K. VLAHOVIĆ4, M. PAVLAK (2020): Analytical assessment of some variables in cross-compliance control on livestock production farms in Croatia. Veterinarski arhiv 90, 341-352.
DOI: 10.24099/vet.arhiv.0977.

TRNINIĆ, K., M. PAVLAK (2019): Analiza rezultata procjene rizika u postupku kontrole višestruke sukladnosti na poljoprivrednim gospodarstvima. Zbornik radova Veterinarski dani 2019 / Harapin, Ivica (ur.). Primošten, Hrvatska: Tisak Zelina d.d., str. 183.

VUČEMILO, M., K. MATKOVIĆ, V. VUČEVAC BAJT, M. BENIĆ, **K. TRNINIĆ** (2013): Proširenost infekcije virusom Zapadnog Nila u domaćih životinja u Hrvatskoj i okruženju. Zbornik radova seminara „DDD i ZUPP 2013- novi izazovi“. (Korunić, J. (ur.), Zagreb, (predavanje, međunarodna recenzija, cjeloviti rad (*in extenso*), stručni).