

# UZGOJ I GENSKA TIPIZACIJA BAKTERIJA RODA BARTONELLA IZDVOJENIH IZ MAČAKA NA PODRUČJU REPUBLIKE HRVATSKE DOKTORSKI RAD

---

Stepanić, Maja

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:552502>

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

Maja Stepanić

**UZGOJ I GENSKA TIPIZACIJA  
BAKTERIJA RODA *BARTONELLA*  
IZDVOJENIH IZ MAČAKA NA  
PODRUČJU REPUBLIKE HRVATSKE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Maja Stepanić

**BACTERIAL CULTURING AND  
GENOTYPING OF BACTERIA FROM THE  
GENUS *BARTONELLA* ISOLATED FROM  
CATS IN REPUBLIC CROATIA**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2022



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Maja Stepanić

**UZGOJ I GENSKA TIPIZACIJA  
BAKTERIJA RODA *BARTONELLA*  
IZDVOJENIH IZ MAČAKA NA  
PODRUČJU REPUBLIKE HRVATSKE**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

dr. sc. Relja Beck

izv. prof. dr. sc. Suzana Hađina

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Maja Stepanić

**BACTERIAL CULTURING AND  
GENOTYPING OF BACTERIA FROM THE  
GENUS *BARTONELLA* ISOLATED FROM  
CATS IN REPUBLIC CROATIA**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Relja Beck, PhD

Assoc. Prof. Suzana Hađina, PhD

Zagreb, 2022



Sveučilište u Zagrebu  
VETERINARSKI FAKULTET

## IZJAVA

Ja, **Maja Stepanić**, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima do onih navedenih u radu.

---

(potpis studenta)

Zagreb, 2022.

## ZAHVALA

Ponajprije zahvaljujem ravnateljima Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu, prethodnom ravnatelju akademiku Željku Cvetniću na ukazanom velikom povjerenju i pruženoj prilici te sadašnjem ravnatelju izv. prof. dr. sc. Borisu Habrunu na nastavku podrške tijekom rada na ovoj disertaciji.

Potom veliko hvala svim kolegama i tehničkim suradnicima u Laboratoriju za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti i u Laboratoriju za opću bakteriologiju i mikologiju za tehničku pomoć i moralnu podršku, osobito predstojniku dr.sc. Silviu Špičiću na potpori tijekom cijelog istraživanja.

Posebna zahvala kolegama koji su dali znatan doprinos u bitnim dijelovima istraživanja svaki na svoj način, dr. sc. Sanji Duvnjak, dr. sc. Željku Mihaljeviću, dr. sc. Gordanu Kompesu, doc. dr. sc. Miroslavu Beniću, dr. sc. Luki Cvetniću, dr. sc. Ireni Reil, dr. sc. Manueli Zadavec i preminulom dr. sc. Danku Deždeku. Posebno hvala kolegici dr. sc. Doroteji Huber za prikupljanje uzoraka uginulih mačaka.

Iskreno hvala svim djelatnicima mojeg Laboratorija za pripremu hranjivih podloga i sterilizaciju na strpljenju, razumijevanju i višegodišnjoj potpori.

Također zahvaljujem kolegama licenciranim veterinarima iz dvadeset hrvatskih veterinarskih ambulanti na izvrsnom odazivu i izrazitoj spremnosti za suradnju te nesebičnoj pomoći u prikupljanju potrebnih uzoraka, kao i mačkama i njihovim vlasnicima koji su ih ustupili.

Veliko hvala i prijateljima, obitelji i Nelly na neiscrpnim poticajima, ljubavi i strpljenju.

Na kraju, najljepše se zahvaljujem mentorima dr. sc. Relji Becku i izv. prof. dr. sc. Suzani Hadina na svakom prijađenom koraku, pomoći i pratnji od samog početka pa sve do privođenja ove disertacije kraju.

## SAŽETAK

### Uzgoj i genska tipizacija bakterija roda *Bartonella* izdvojenih iz mačaka na području Republike Hrvatske

Pripadnici roda *Bartonella* su Gram - negativne bacilarne bakterije, a danas je poznato više od 40 vrsta, podvrsta i kandidata. Najznačajnija vrsta, *Bartonella henselae*, glavni je uzročnik bolesti mačjeg ogreba (BMO) u ljudi. Primarni rezervoari bakterije su mačke, asimptomatski nositelji uzročnika u svojim eritrocitima. Iako su protokoli za dokazivanje bartonela različiti, uzgoj još uvijek predstavlja „zlatni standard” dijagnostike. Ujedno predstavlja metodu dobivanja dostatne količine DNA za daljnje genske analize, kao što je analiza sekvenci više gena (MLST). Zbog dugotrajnog rasta i zahtjevnog umnažanja bartonela, uzgoj na hranjivim podlogama predstavlja dijagnostički izazov.

Bartonele su proširene u cijelom svijetu i predstavljaju opasnost za zdravlje ljudi. No kulturna ili molekularna istraživanja vrsta u Hrvatskoj nisu do sada sustavno provedena. Istovremeno serološka istraživanja i razne kliničke manifestacije ljudi dokazuju prisutnost uzročnika u Hrvatskoj. Stoga je ovo prvo istraživanje takve vrste u Hrvatskoj. *B. henselae* genski je heterogena i dijeli se na 37 sekvencijskih tipova (ST). Osim istraživanja učestalosti i utvrđivanja optimalnog uzgojnog protokola, cilj ovog rada je genski tipizirati izolate, steći uvid u raznolikost i rasprostranjenost genotipova te doprinijeti poznavanju genetike samog uzročnika u jugoistočnoj Europi. Određivanje sekvencijskih tipova izoliranih iz mačaka u Hrvatskoj značajno je, jer se oni razlikuju u patogenosti i zoonotskom potencijalu.

Ukupno je pretraženo 279 mačaka. Metoda uzgoja uzoraka krvi 189 živih mačaka s 13 lokacija u Republici Hrvatskoj izvedena je korištenjem pet čvrstih i dvije bifazične hranjive podloge, a pretraženi su i lančanom reakcijom polimerazom. Uzgojem na istim hranjivim podlogama analizirano je i 90 uzoraka krvi iz srca uginulih mačaka. Za svaku životinju dostavljen je upitnik s anamnestičkim, kliničkim i epizootiološkim podacima, s ciljem određivanja čimbenika rizika povezanih s infekcijom mačaka. Za identifikaciju *Bartonella* sp. iz krvi i izolata konvencionalnim PCR-om korištene su početnice za ciljne gene 16SrRNA i ITS (16S-23S rRNA). Dokazivanje vrste *B. henselae* i njenih ST-ova provedeno je MLST metodom na osam genskih lokusa iz izolata uzgojenih iz krvi 31 mačke. Aleli i ST-ovi određivani su



korištenjem PubMLST baze podataka za bakteriju *B. henselae* i uspoređeni s postojećima iz ostalih regija svijeta. Umnažanjem i sekvenciranjem 16SrRNA gena i ITS regije dokazana je *B. henselae* i kod uginule mačke.

Bartonele su izdvojene iz 31 žive (16,4%) i jedne uginule (1,1%) mačke što daje ukupnu učestalost infekcije od 11,5%. Istovremeno lančanom reakcijom polimerazom u krvi 189 mačaka nije dokazan odsječak DNA *Bartonella* sp. Na svim korištenim čvrstim hranjivim podlogama u primoizolaciji zabilježen je porast kolonija nakon četiri do 56 dana inkubiranja. Najveća učestalost izdvajanja bakterije *B. henselae* utvrđena je na BH (87,5%) i COL (82,4%) agaru. MLST analizom identificirano je 30 potpunih alelnih profila iz kojih je proizašlo pet različitih sekvencijskih tipova. Najučestaliji ST5 izdvojen iz 17 (56,7%) mačaka, a dokazani su i ST6 (23,3%), ST1 (13,3%) i ST24 (3,3%). Usporedba alelnih profila rezultirala je jednim potpuno novim genotipom (ST33), pripisanom jednom od tri klonalna kompleksa vrste *B. henselae* (CC2).

Područje, dob i po prvi puta prisutnosti crijevnih parazita utvrđeni su kao čimbenici rizika za infekciju mačaka bakterijom *B. henselae* ( $p < 0,05$ ). Mačke starosti  $\leq 12$  mjeseci najučestalije su bile inficirane, a uočen je trend smanjivanja prevalencije s porastom dobi mačaka. Statistički značajna povezanost s infekcijom utvrđena je u mačaka s primorskih područja u odnosu na mačke s kontinenta, kao i u mačaka uzorkovanih u razdoblju od siječnja do travnja u odnosu na ostatak godine. Multivarijabilnom analizom prisutnost crijevnih parazita utvrđena je kao čimbenik najsnažnije povezan s bakterijemijom mačaka. Metoda uzgoja korištenjem različitih hranjivih podloga pokazala se uspješnom u izdvajanju većeg broja izolata. Dokaz zoonotskog genotipa ST5 kod najvećeg broja mačaka predstavlja javnozdravstveni značaj, osobito jer se u nekoliko mačaka dovodi u vezu s oboljenjima ljudi od BMO-a.

**Ključne riječi:** *Bartonella henselae*, mačka, prevalencija, uzgoj, hranjive podloge, MLST, sekvencijski tip, bolest mačjeg ogreba, čimbenici rizika

## ABSTRACT

### **Bacterial culturing and genotyping of bacteria from the genus *Bartonella* isolated from cats in Republic Croatia**

**Introduction.** Bacteria of the genus *Bartonella* sp. are small, short, pleomorphic, Gram-negative coccobacilli (0.5 by 1 to 2  $\mu\text{m}$ ), and today almost 40 species are known, along with numerous unnamed or *Candidatus* species. *Bartonella henselae* is the most important species of zoonotic significance, the principal etiologic agent of cat scratch disease (CSD) in humans, most commonly manifested by localized lymphadenopathy with or without bacteremia.

The main reservoirs of bacteria *B. henselae* are cats, and the causative agent is most often transmitted to humans by contamination of the scratch site with feces of the cat flea (*Ctenocephalides felis*), which contains viable multiplied pathogens. Cats are chronic asymptomatic carriers of bacteria *B. henselae*, which infects their erythrocytes, making isolation from the cat's blood on blood agar plates more successful than from other animals and humans.

Epizootiological studies have shown a prevalence of *Bartonella* infection in cats of 10-30% by culture from cat's blood. Although protocols for proving *Bartonella* are different, isolation by culture on agar plates is still considered the "gold standard" of diagnosis. It is also a method by which sufficient amounts of DNA can be obtained for further genetic analysis of bacteria *B. henselae*, such as analysis of multiple gene loci. Due to the slow growth and fastidious cultivation, isolation on culture media is a diagnostic challenge.

In spite of *Bartonella* are widespread throughout the world and pose a threat to human health, research on species / isolates in Croatia has not been carried out systematically so far. Serological studies and various clinical manifestations of people has proven the presence of pathogens in Croatia. To date, no studies by culture and / or molecular investigation of bacteria *B. henselae* in cats, or genotyping methods of species / isolates have been performed, so this is the first study of its kind in Croatia.

*B. henselae* isolates show a considerable genetic heterogeneity and bacteria is divided into sequence types (ST), which today are most often determined by multilocus

sequence typing (MLST) analysis. Prior to the start of this study, 32 different STs were known, and today there are a total of 37 enrolled in the PubMLST database (<https://pubmlst.org/organisms/bartonella-henselae>). Beside to study the prevalence of infection and optimal culture procedures, the aim of this paper is to perform *B. henselae*-genotyping, gain insight into the diversity and distribution of sequence types and contribute to knowledge of the genetics of the bacteria *B. henselae* in Southeast Europe. Determining the sequence types isolated from cats in Croatia is important, because they differ in virulence and zoonotic potential.

**Material and methods.** A total of 279 cats were searched. 189 blood samples of live cats collected in 20 veterinary clinics from 13 different locations in the Republic of Croatia were analyzed. Samples were inoculated on five types of solid and two types of biphasic culture media, previously tested using ATCC strains of bacteria *B. henselae* (49882) and *B. clarridgeiae* (700095), and analysed in parallel by polymerase chain reaction (PCR). Any colony growth indicating species of the genus *Bartonella* was screened by PCR, and isolates were stored in pure culture by freezing at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , in broths with added glycerol, or in a commercial bacterial storage system. In addition to samples of live cats, 90 samples of blood from the hearts of dead cats were analyzed, tested only by culture. Each sample was accompanied by a questionnaire which contains anamnestic, clinical and epizootiological data on animals, in order to determine the risk factors associated with infection of cats with bacteria of the genus *Bartonella* sp.

Five solid culture media were used, Columbia agar with 5% sheep blood (COL), Brain heart agar with 5% rabbit blood (BH), Chocolate agar with 10% sheep blood (ČOK), Tryptic soy agar with 5% sheep blood (TSA) and Esculin blood agar with 5% sheep blood (EKA). In addition, two biphasic media were used, made by a combination of liquid and solid culture media: Tryptic soy broth with Tryptic soy agar (TSA+TSB) and Brucella broth with Brain heart agar (BH+BB). To identify *Bartonella* sp. from blood and isolates by conventional PCR, primers for the target genes 16SrRNA and ITS (16S-23S rRNA) were used.

Detection of *B. henselae* species and sequence types determination was performed by multi locus sequence typing (MLST) at eight gene loci (16SrRNA, *batR*, *ftsZ*, *gltA*, *groEL*, *nlpD*, *ribC* and *rpoB*) from isolates obtained by culture of blood

samples of 31 cats. Nucleotide sequence determination was performed at the commercial company Macrogen Inc. (Amsterdam, The Netherlands). The obtained sequences were processed using the computer program BioNumerics, which compared the nucleotide sequences of both directions, in order to obtain a unique nucleotide sequence.

Alleles and STs were determined using the MLST online database (<https://pubmlst.org/organisms/bartonella-henselae>) for bacteria *B. henselae* and were assigned an eight-digit numerical code, consisting of a combination of alleles at each locus. Alleles were compared with each other on the basis of categorical coefficient and UPGMA, and presented in the form of dendrograms and MST (minimum spanning tree). The obtained STs with this research were compared with the existing STs from different countries and regions of the world.

In the statistical processing of epizootiological data, we used the computer program STATA 13.1. Univariate and multivariate logistic regression was used to analyze the statistical correlation of epizootiological data from the questionnaires and to determine risk factors associated with *B. henselae* infection. Independent variables statistically significant in univariate analysis (p-value <0,05) were included in multivariable model and further tested to evaluate if remained associated with feline *Bartonella* bacteremia.

**Results.** Out of a total of 279 cats searched, *Bartonella* spp. were isolated from 31 live and one dead cat. Determined prevalence was 16,4% (CI 11,074 – 21,730) (total frequency of isolation was 11,5%, in live cats 16,4% and in dead 1,1%). On all types of solid culture media used in the primoisolation a growth of colonies was recorded, and the typical colonies for species *B. henselae* (hard, dry, difficult to break, and firmly embedded to the surface) were observed after four to 56 days of incubation. *B. henselae* was identified by amplification and sequencing of the 16SrRNA gene and the ITS region. By analyzing the nucleotide sequences of eight gene loci of all isolates using the MLST method, five different sequence types (ST) of bacteria *B. henselae* were identified. Out of 31 infected live cats, a total of 30 complete MLST allelic profiles were obtained, and one was incomplete and was not assigned a sequence type with certainty.

The most common genotype was ST5, isolated from 17 (56,7%) cats, and of the other sequence types ST6 was detected in seven (23,3%) cats, ST1 in four (13,3%) and ST24 in one (13,3%). The genotype of one cat was completely new due to a new combination of alleles, and was deposited into an online database (<https://pubmlst.org/organisms/bartonella-henselae>) as a sequence type ST33. Based on the determined combination of alleles, MLST analysis assigned a numerical code 2-3-3-1-2-1-1-2, and phylogenetic analysis determined affiliation to one of the three previously described CCs of *B. henselae* species, clonal complex 2 (CC2).

The best efficiency of isolation of *B. henselae* – bacteria on seven types of culture media, comparing the growth rate (days of incubation) and the isolation rate (share of isolates obtained from infected blood samples on specific media), in the primary isolation was on BH agar (87.5%, 21/24 isolates) and COL agar (82.4%, 14/17 isolates). Cat's isolates with varying level of bacteremia were grown on both culture media, on BH agar with a range of 16 to 1960 CFU / mL, and on COL agar from 40 to 3050 CFU / mL. Slightly lower isolation rate was observed on EKA (80,0%) and ČOK (77,3%) agar and on biphasic medium TSA+TSB (80,0%). The advantage of a certain culture medium in the isolation of a particular sequence type of *B. henselae* has not been observed. *B. henselae* species was identified from an isolate grown on ČOK agar plate from a blood sample of a dead cat by PCR and sequencing. By examining the blood of live cats by PCR, we were unable to amplify the DNA fragment of *Bartonella*.

By processing epizootiological data from the live cat by survey questionnaires, a statistically significant association ( $p < 0,05$ ) was found between the infection of cats with *B. henselae* and the area, age of cats and first-time findings of intestinal parasites. The highest prevalence of infected animals was found in the cities of Zabok (66,7%, 2/3), Rijeka (50,0%, 5/10), Pula (40,0%, 8/20) and Jastrebarsko (30,4 %, 7/23), while in four out of the 13 locations (Osijek, Split, Vukovar and Velika Gorica) there were no cats infected with *Bartonella*. Cats  $\leq 12$  months of age were the most frequently infected (25,0%), and a trend of declining prevalence with increasing age of cats was observed. In the coastal area, cats were significantly more frequently infected than on the mainland, as were cats sampled between January and April compared to the rest of the year. Multivariate analysis revealed the strongest association between feline bacteremia and the presence of intestinal parasites.

**Conclusion.** The prevalence of cat infection with bacteria *B. henselae* obtained on culture media (16,4%) is within the range found in similar studies in cats in Europe and the rest of the world, and it is the third most common infection in the domestic cat group. A slightly higher rate of isolation was observed in cats with respect to lifestyle (going out, lack of owners). It was found that coastal cats were more frequently infected with *B. henselae* than continental. Such a finding could be associated with an average warmer climate of coastal locations, which is more conducive to the life of cat fleas, the main vectors in *Bartonella* transmission. Infection with intestinal parasites and age up to one year are risk factors that are significantly associated with infection of cats with *B. henselae*. On the other hand, factors such as sampling in the summer months, antibiotic administration, flea control treatments, and age above one year are possible causes of differences in prevalence between sites.

The identification of five different sequence types from isolates of 30 cats confirmed the genetic diversity of the bacterium *B. henselae* in the territory of the Republic of Croatia. For the first time in the Republic of Croatia and for the first time globally from the cat's blood has been proven the ST33 genotype. It was not observed association of other genotypes with particular location because they were equally distributed. The culture method has proven successful for detecting *B. henselae* bacteria from the blood of cats. Combined use of several different culture media, with extended incubation time up to 60 days, are recommended for the isolation of bacteria *B. henselae* by culture from the blood of the cats. The zoonotic genotype ST5 was isolated from three cats in households with CSD patients suggesting that it is a common and virulent zoonotic genotype.

**Key words:** *Bartonella henselae*, cat, prevalence, culture, culture media, MLST, sequence type, cat scratch disease, risk factors

## POPIS KORIŠTENIH KRATICA I ZNAKOVA

<u><b>μL</b></u>	mikrolitara
<u><b>16S rDNA</b></u>	16S ribosomal deoxyribonucleic acid, engl.
<u><b>16S rRNA</b></u>	16S ribosomalna RNA, engl.
<u><b>ATCC</b></u>	American Type Culture Collection, engl.
<u><b>B.</b></u>	prvo slovo roda <i>Bartonella</i>
<u><b>BadA</b></u>	<i>Bartonella</i> Adhesin A, engl.
<u><b>BAPGM</b></u>	<i>Bartonella</i> Alpha Proteobacteria Growth Medium, engl.
<u><b>batR</b></u>	two-component regulator, engl.
<u><b>BMO</b></u>	bolest mačjeg ogreba
<u><b>bp</b></u>	base pairs, engl. (parovi baza)
<u><b>BURST</b></u>	Based upon related sequence types, engl.
<u><b>°C</b></u>	Celzijevih stupnjeva
<u><b>CFU</b></u>	colony forming units, engl.
<u><b>CI</b></u>	confidence interval, engl. (raspon pouzdanosti)
<u><b>CO<sub>2</sub></b></u>	ugljični dioksid
<u><b>CSD</b></u>	cat scratch disease, engl.
<u><b>DNA</b></u>	deoxyribonucleic acid, engl. (deoksiribonukleinska kiselina)
<u><b>dNTP</b></u>	deoxynucleotide triphosphate, engl.
<u><b>ELISA</b></u>	enzyme-linked immunosorbent assay, engl.
<u><b>eno</b></u>	enolase, engl.
<u><b>FeLV</b></u>	feline leukemia virus, engl.
<u><b>FIV</b></u>	feline immunodeficiency virus, engl.
<u><b>ftsZ</b></u>	cell division protein, engl.
<u><b>g - force</b></u>	relative centrifugal force (RCF), engl.
<u><b>gltA</b></u>	citrate synthase, engl.
<u><b>groEL</b></u>	Hsp60 chaperone, engl.

<b><u>HIV</u></b>	human immunodeficiency virus, engl.
<b><u>IFA</u></b>	indirect immunofluorescence assay, engl.
<b><u>IgG</u></b>	immunoglobulin class G, engl.
<b><u>ITS</u></b>	internal transcribed spacer, engl.
<b><u>K2-EDTA</u></b>	dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid, engl.
<b><u>min</u></b>	minuta
<b><u>MLST</u></b>	multi locus sequence typing, engl.
<b><u>mM</u></b>	milimol
<b><u>nlpD</u></b>	Cell surface glycoprotein, engl.
<b><u>OR</u></b>	odds ratio, engl. (omjer izgleda)
<b><u>PBS</u></b>	phosphate buffered saline, engl.
<b><u>PCR</u></b>	polymerase chain reaction, engl.
<b><u>PCR-RLB</u></b>	Reverse Line Blotting PCR, engl.
<b><u>PFGE</u></b>	Pulsed-Field Gel Electrophoresis, engl.
<b><u>qPCR</u></b>	quantitative (real time) PCR, engl.
<b><u>ribC</u></b>	Riboflavin synthase, engl.
<b><u>RFLP</u></b>	Restriction fragment length polymorphism, engl.
<b><u>rpm</u></b>	revolutions per minute, engl.
<b><u>rpoB</u></b>	RNA polymerase beta subunit, engl.
<b><u>s</u></b>	sekunda
<b><u>SAD</u></b>	Sjedinjene Američke države
<b><u>spp.</u></b>	species, lat. (vrste)
<b><u>ST</u></b>	sequence type, engl. (sekvencijski tip)
<b><u>T4SS</u></b>	Type IV Secretion System, engl.
<b><u>U</u></b>	units, engl. (jedinica)
<b><u>UPGMA</u></b>	Unweighted pair group method with arithmetic mean, engl.



## SADRŽAJ:

1.	<b>UVOD</b>	1
2.	<b>PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA</b>	4
2.1.	POVIJEST	4
2.2.	ETIOLOGIJA	4
2.2.1.	<b>Morfološka i biološka svojstva bartonela</b>	5
2.2.2.	<b>Vrste bartonela</b>	6
2.2.3.	<b>Bartonele mačaka</b>	6
2.2.3.1.	<i>Bartonella henselae</i>	7
2.2.3.2.	Ostale vrste bartonela u mačaka	7
2.3.	PROŠIRENOST	9
2.4.	EPIZOOTIOLOGIJA	11
2.4.1.	<b>Infekcije u životinja uzrokovane vrstom <i>B. henselae</i></b>	12
2.4.2.	<b>Način širenja infekcije</b>	12
2.4.2.1.	Bartonele u ljudi	12
2.4.2.2.	Bartonele u životinja	12
2.4.2.3.	Zoonotske vrste bartonela	13
2.4.3.	<b>Vektori bartonela</b>	14
2.4.3.1.	Mačje buhe <i>C. felis</i> kao vektori bartonela	15
2.4.3.2.	Krpelji kao potencijalni vektori bartonela	17
2.4.3.3.	Prirodni ciklus prijenosa bartonela vektorima	19
2.4.3.4.	Zoonotska uloga vektora	20
2.5.	PATOGENEZA	20
2.5.1.	<b>Prirodni ciklus infekcije rezervoara</b>	21
2.6.	KLINIČKA SLIKA	24
2.7.	PATOANATOMSKI NALAZ	27
2.8.	DIJAGNOSTIKA	28
2.8.1.	<b>Serološka dijagnostika</b>	29
2.8.2.	<b>Lančana reakcija polimerazom (PCR)</b>	31
2.8.3.	<b>Uzgoj bartonela na hranjivim podlogama</b>	31
2.8.3.1.	Uzgoj bakterije <i>B. henselae</i> iz krvi mačaka	31
2.8.3.2.	Hranjive podloge za uzgoj bartonela	33
2.8.3.3.	Izazovi uzgoja drugih vrsta bartonela	35
2.9.	DIFERENCIJALNA DIJAGNOSTIKA	36
2.10.	TERAPIJA	37
2.11.	PROFILAKSA	38
2.12.	JAVNO ZDRAVSTVO	40
2.12.1.	<b>Bolest mačjeg ogreba</b>	40
2.13.	UČESTALOST INFEKCIJE MAČAKA BARTONELAMA	41

2.13.1.	<b>Istraživanja učestalosti umnažanjem na hranjivim podlogama</b>	43
2.13.2.	<b>Čimbenici rizika za infekciju mačaka bartonelama</b>	45
2.14.	<b>GENSKA TIPIZACIJA BAKTERIJE <i>B. henselae</i></b>	46
2.14.1.	<b>16S rRNA genotipovi bakterije <i>B. henselae</i></b>	48
2.14.2.	<b>MLST genotipovi bakterije <i>B. henselae</i></b>	48
2.14.3.	<b>MLST istraživanja bakterije <i>B. henselae</i></b>	50
3.	<b>OBRAZLOŽENJE TEME</b>	54
4.	<b>MATERIJAL I METODE</b>	56
4.1.	<b>UZGOJ BARTONELA NA HRANJIVIM PODLOGAMA</b>	56
4.1.1.	<b>Podrijetlo i priprema referentnih sojeva</b>	56
4.1.2.	<b>Hranjive podloge za umnažanje referentnih sojeva</b>	57
4.1.2.1.	Hranjive podloge za početno izdvajanje referentnih sojeva	58
4.1.2.2.	Hranjive podloge za precjepljivanje referentnih sojeva	58
4.1.3.	<b>Umnažanje referentnog soja <i>Bartonella henselae</i> ATCC® 49882™</b>	60
4.1.4.	<b>Umnažanje referentnog soja bakterije <i>Bartonella clarridgeiae</i> (ATCC® 700095™)</b>	63
4.1.4.1.	Umnažanje liofilizata	63
4.1.4.2.	Umnažanje žive kulture	63
4.1.5.	<b>Uzgoj <i>Bartonella</i> spp. iz krvi mačaka</b>	64
4.1.5.1.	Uzorci	64
4.1.5.2.	Uzorkovanje	66
4.1.5.3.	Hranjive podloge	67
4.1.5.4.	Nacjepljivanje krvi mačaka na hranjive podloge (primoizolacija)	69
4.1.5.5.	Inkubacija čvrstih hranjivih podloga	70
4.1.5.6.	Inkubacija bifazičnih medija	72
4.1.5.7.	Određivanje broja kolonija	73
4.1.5.8.	Pohrana izolata	73
4.1.6.	<b>Anketni upitnik</b>	74
4.2.	<b>MOLEKULARNA TIPIZACIJA BARTONELA</b>	75
4.2.1.	<b>Dobivanje početnog materijala za izdvajanje DNA</b>	76
4.2.2.	<b>Izdvajanje DNA</b>	78
4.2.2.1.	Priprema za izdvajanje DNA	78
4.2.2.2.	Automatsko izdvajanje DNA	79
4.2.3.	<b>Dokaz <i>Bartonella</i> sp. lančanom reakcijom polimerazom (PCR)</b>	80
4.2.3.1.	Ciljni geni i početnice	80
4.2.3.2.	Reakcijska mješavina i uvjeti ciklusa	81
4.2.3.3.	Kontrola izolacije i umnažanja	81
4.2.3.4.	Kapilarna elektroforeza	82
4.2.4.	<b>Sekvenciranje gena 16S rRNA i ITS</b>	82

4.2.5.	<b>Analiza nukleotidnih sljedova više genskih lokusa (MLST)</b>	83
4.2.5.1.	Lančana reakcija polimerazom (PCR)	83
4.2.5.2.	Pročišćavanje proizvoda umnažanja	84
4.2.5.3.	Sekvenciranje i analiza sekvenci	84
4.2.6.	<b>Filogenetska analiza</b>	85
4.3.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	86
5.	<b>REZULTATI</b>	89
5.1.	REZULTATI UMNAŽANJA BARTONELA NA HRANJIVIM PODLOGAMA	89
5.1.1.	<b>Rezultati umnažanja i identifikacije referentnog soja bakterije <i>Bartonella henselae</i> (ATCC® 49882™)</b>	89
5.1.2.	<b>Rezultati umnažanja i identifikacije referentnog soja bakterije <i>Bartonella clarridgeiae</i> (ATCC® 700095™)</b>	91
5.1.3.	<b>Rezultati umnažanja bartonela iz krvi mačaka na hranjivim podlogama</b>	93
5.1.4.	<b>Identifikacija bartonela iz mačaka</b>	95
5.1.4.1.	Identifikacija bartonela iz uzgojenih izolata	95
5.1.4.2.	Identifikacija bartonela iz krvi mačaka	97
5.1.5.	<b>Rezultati sekvenciranja gena 16SrRNA i ITS</b>	97
5.1.6.	<b>Rezultati genotipizacije (MLST)</b>	97
5.1.6.1.	Određivanje sekvencijskih tipova (ST) bakterije <i>B. henselae</i>	97
5.1.7.	<b>Rezultati filogenetske analize bakterije <i>B. henselae</i></b>	98
5.1.8.	<b>Osnivanje zbirke i čuvanje izolata bakterije <i>B. henselae</i></b>	101
5.2.	UČESTALOST I PROŠIRENOST INFEKCIJE MAČAKA BAKTERIJOM <i>B. henselae</i>	102
5.2.1.	<b>Učestalost i proširenost sekvencijskih tipova bakterije <i>B. henselae</i></b>	103
5.3.	UTVRĐIVANJE PRIKLADNOSTI HRANJIVIH PODLOGA ZA IZDVAJANJE BAKTERIJE <i>B. henselae</i>	105
5.3.1.	<b>Brzina porasta</b>	105
5.3.2.	<b>Učestalost izdvajanja bakterije <i>B. henselae</i> na hranjivim podlogama</b>	106
5.3.3.	<b>Učestalost izdvajanja sekvencijskih tipova bakterije <i>B. henselae</i></b>	107
5.3.4.	<b>Rezultati određivanja broja kolonija u jednom mililitru krvi (CFU/mL)</b>	107
5.4.	REZULTATI STATISTIČKE OBRADE ANKETNIH UPITNIKA	110
5.4.1.	<b>Opis populacije istraživanih mačaka</b>	110
5.4.2.	<b>Određivanje čimbenika rizika za infekciju mačaka bartonelama</b>	111
5.4.2.1.	Univarijantna analiza čimbenika rizika	112
5.4.2.2.	Multivarijantna analiza čimbenika rizika	119

5.4.3.	<b>Analiza anketnih upitnika uginulih mačaka</b>	121
6.	<b>RASPRAVA</b>	122
7.	<b>ZAKLJUČCI</b>	152
8.	<b>POPIS LITERATURE</b>	153
9.	<b>PRILOZI</b>	191
10.	<b>ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA</b>	197

“Culturing is hard, and there is no guarantee of success. But a novel microbe in culture opens the road for doing so much more biology down the road. We still need to culture microbes. Fewer and fewer people do that”

Mircea Podar, PhD

Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, SAD

(LEI TANG, 2019)

## 1. UVOD

“Intracelularna kolonizacija eritrocita bez posljedične hemolize i invazija endotelnih stanica čuva bartonele za efikasan prijenos vektorima, olakšava im kretanje kroz cirkulaciju, štiti od imunskog odgovora nositelja i potencijalno doprinosi smanjenoj antimikrobnoj učinkovitosti“ (BREITSCHWERDT, 2017).

Vrste roda *Bartonella* spp. (*B.*) su male, pleomorfne i nesporogene, Gram-negativne štapičaste bakterije (DIDDI i sur., 2013). Aerobne su ili mikroaerofilne, zahtjevne za uzgoj, pripadnici  $\alpha$ -2 podskupine *Proteobacteria*. Emergentni su patogeni životinja i ljudi s jedinstvenim intraeritrocitnim životnim stilom (OKARO i sur., 2017), a prenose ih hematofagni vektori člankonošci (BREITSCHWERDT, 2017; KOSOY i sur., 2018).

Bartonele su intracelularne bakterije, evolucijski dobro prilagođene na svoje rezervoare sisavce, u kojih obično uzrokuju kroničnu infekciju eritrocita i endotelnih stanica. Danas su brojne vrste uzročnici zoonoza, a stalno se otkrivaju nove vrste, kao i novi nositelji. S obzirom na visoku učestalost i veliki raspon nositelja, takva raznolikost vrsta i genotipova ne iznenađuje (BREITSCHWERDT, 2014; BREITSCHWERDT, 2017; KOSOY i sur., 2018).

Obilježja infekcije rezervoara su visoka učestalost, kronična asimptomatska bakterijemija i odsustvo većih organskih oštećenja, što se pripisuje strategijama prilagodbe bartonela na nositelja (JACOMO i sur., 2002; CHOMEL i sur., 2009; CHOMEL i KASTEN, 2010). Kao rezultat prilagodbe određene vrste bartonela postale su strogo specifične za svoje nositelje, poput vrste *B. henselae* za mačku, a pritom su naučile razne strategije izbjegavanja imunskog sustava nositelja (MINNICK i BATTISTI, 2009; GUPTILL, 2010; BUFFET i sur., 2013). Prilagodba bartonela na nositelje genski je uvjetovana, a pospješuje je evolucijski razvoj čimbenika virulencije zaslužnih za učestale infekcije rezervoara, bez pojave znakova bolesti (ENGEL i sur., 2011; HARMS i DEHIO, 2012; HARMS i sur., 2017; MULLINS i sur., 2017; WAGNER i DEHIO, 2019).

Bartonele su proširene svijetom i nastanjuju razna ekološka staništa (MASCARELLI i sur., 2013). Raznolike su i filogenetski složene, zbog čega su prikladne za ekološka i epidemiološka istraživanja, kojima se utvrđuje učestalost te identitet vrste i genotipa bakterija (KOSOY i sur., 2018). U Hrvatskoj i susjednim zemljama do sada na mačkama nisu provedena opsežnija epizootiološka istraživanja bakterija roda *Bartonella* spp. Štoviše, kliničko – epizootiološka istraživanja temeljena na potvrdi infekcije kulturnim metodama ili lančanom reakcijom polimerazom (engl. polymerase chain reaction, PCR) oskudna su i u Europi (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018).

Složenost dijagnostike i neizvjesnost uspjeha antimikrobnog liječenja obilježja su infekcije mačaka bartonelama (BRUNT i sur., 2006). Izdvajanje bakterija iz inficiranih životinja uzgojem ili PCR-om najpoželjnija je metoda dijagnostike i identifikacije vrsta *Bartonella* (GUTIERREZ i sur., 2017). Kronična bakterijemija prirodnih rezervoara najčešće se dokazuje iz klinički zdravih životinja (BREITSCHWERDT, 2017). Metode pokazuju različitu osjetljivost, a dijagnostički protokoli se razlikuju. Iako je uzgoj bartonela na hranjivim podlogama „zlatni standard“ dijagnostike, i dalje postoji potreba za njegovim poboljšanjem (BREITSCHWERDT, 2014; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018).

*B. henselae* nije genski jedinstven uzročnik. Najprije je raznolikost bakterije utvrđivana sekvenciranjem gena 16SrRNA, a danas analizom sekvenci više genskih lokusa (engl. multilocus sequence typing, MLST), kojom se *B. henselae* dijeli na sekvencijske tipove (engl. sequence type, ST) različite virulencije i zoonotskog potencijala (IREDELL i sur., 2003; GIL i sur., 2013; WOULDSTRA i sur., 2017). Patogeni potencijal mnogih vrsta bartonela povećao je interes za bartonele i unaprijedio njihovo istraživanje (GUTIÉRREZ i sur., 2017). Unatoč tome bartonele su nedovoljno upoznate i puno je neodgovorenih pitanja (BREITSCHWERDT, 2017). Zbog ograničenog broja karakteriziranih ljudskih izolata MLST-om, većina podataka o genskoj raznolikosti bakterije *B. henselae* u cijelom svijetu dobivena je upravo iz mačaka (GIL i sur., 2013).

U Hrvatskoj do sada ne postoje podaci o učestalosti i genskoj tipizaciji izolata bakterije *B. henselae* niti kod mačaka, niti kod ljudi. Istovremeno serološka istraživanja

na uzorcima ljudi dokazala su prisutnost uzročnika (PANDAK i sur., 2009; VILIBIĆ-ČAVLEK i sur., 2012). Cilj ovog rada je istražiti učestalost infekcije bakterijama roda *Bartonella* spp. kod mačaka na području Republike Hrvatske i povezati epizootiološke čimbenike s bakterijemijom mačaka. Iz dobivenih izolata cilj je provesti analizu nukleotidnih sljedova više genskih lokusa te odrediti učestalost, proširenost i zoonotski potencijal dokazanih vrsta i genotipova. Nadalje, cilj je usporediti osjetljivost dijagnostičkih metoda uzgoja i PCR-a te ustanoviti najprikladniji protokol uzgoja bakterija roda *Bartonella* korištenjem različitih hranjivih podloga, radi upotrebe u dijagnostičke svrhe.

## 2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

### 2.1. POVIJEST

Bartonele su poznate još od davnina. *B. quintana* otkrivena je u dentalnoj pulpi zuba čovjeka iz antičkog doba prije 4000 godina (OKARO i sur., 2017). *B. henselae* (genotip Houston-1) dokazna je i u dentalnoj pulpi mačaka koje su živjele u Francuskoj prije 800 godina, između 13. i 16. stoljeća (LA i sur., 2004). Prvi opis infekcije ljudi bartonelama potječe iz Perua još iz 16. stoljeća (JACOMO i sur., 2002). Vrstu *B. bacilliformis* otkrio je kod ljudi u Andama s anemijom i vrućicom peruanski mikrobiolog A. L. Barton 1905. godine, po kojem je rod *Bartonella* dobio ime (BRENNER i sur., 1993; JACOMO i sur., 2002). *B. quintana* je bila značajna kao uzročnik rovovske groznice vojnika u prvom i drugom svjetskom ratu (MAURIN i RAOULT, 1996). Iako su povijesno „bartoneloza“ nazivane isključivo infekcije ljudi uzrokovane vrstom *B. bacilliformis*, danas se taj izraz koristi za infekcije uzrokovane svim vrstama bartonela bilo gdje u svijetu (BREITSCHWERDT, 2014).

No moderno doba istraživanja bartonela počinje tek 1990-tih godina, razvojem i uvođenjem novih molekularnih metoda. Najprije su kod ljudi zaraženih virusom humane imunodeficijencije (engl. human immunodeficiency virus, HIV) kao uzročnici bacilarne angiomatoze i pelioze jetre u SAD-u dokazane vrste *B. quintana* i *B. henselae*, prvotno pripadnice roda *Rochalimaea* (RAOULT, 2007; KOSOY i sur., 2012). Vrstu *B. henselae* prvi su izdvojili iz krvi prirodno inficirane asimptomatske mačke u SAD-u Regnery i sur. 1992. godine, a naknadno je potvrđena i kao glavni uzročnik bolesti mačjeg ogreba (BMO) u ljudi (REGNERY i TAPPERO, 1995). Potom su slijedila izdvajanja bakterije *B. henselae* i drugih vrsta bartonela iz mačaka, pasa i drugih domaćih i divljih životinja širom svijeta (MAURIN i RAOULT, 1996; GUPTILL, 2010; BREITSCHWERDT, 2017).

### 2.2. ETIOLOGIJA

Rod *Bartonella* spp. jedini je pripadnik familije Bartonellaceae, reda *Rhizobiales*, razreda Alphaproteobacteria (alpha-2 podskupina) i koljena Proteobacteria (BRENNER i sur., 1993; MAURIN i RAOULT, 1996). DNA hibridizacijom i



sekvenciranjem gena 16SrRNA utvrđeno je da su vrste bartonela međusobno blisko srodne, kao i s drugim članovima  $\alpha$ -2 Proteobacteria. Nakon spoznaje da se mogu umnažati i izvan staničnih kultura, na umjetnim hranjivim podlogama, uklonjene su iz reda *Rickettsiales* (BRENNER i sur., 1993; MAURIN i RAOULT, 1996; CHOMEL i sur., 2004). Jedina vrsta roda *Bartonella* najprije je bila *B. bacilliformis*. No utvrđivanjem srodnosti s bakterijama roda *Rochalimea* (1993. godine) i *Grahamella* (1995. godine), tri roda ujedinjena su u zajednički rod *Bartonella*, koji je tada sadržavao samo desetak vrsta (BRENNER i sur., 1993; BIRTLES i sur., 1995; MAURIN i RAOULT, 1996).

### 2.2.1. Morfološka i biološka svojstva bartonela

Pripadnici roda *Bartonella* su teško uzgojive, aerobne do mikroaerofilne, Gram-negativne, nesporogene i nekapsulogene, fakultativne intracelularne bakterije. Po veličini su male i kratke (dimenzije 0,3 - 0,6  $\mu\text{m}$  x 1,0 - 1,7  $\mu\text{m}$ ), a po obliku pleomorfne, bacilarne ili kokobacilarne (JACOMO i sur., 2002; CHOMEL i sur., 2004; DIDI i sur., 2013; MINNICK i ANDERSON, 2015; OKARO i sur., 2017).

Bartonele su hemotropne intraeritrocitne bakterije (CHOMEL i sur., 2004). Mikroskopska identifikacija obojenim preparatima je teška za izvođenje i nepouzdana za interpretaciju. Bakterija *B. henselae* rutinski se slabo boji metodama po Gramu i Giemsi (CAPONETTI i sur., 2009; STAGGEMEIER i sur., 2010). Biokemijski su inertne, osim za tvorbu peptidaza, zbog čega su neprikladne za biokemijsku identifikaciju (JACOMO i sur., 2002; CHOMEL i sur., 2004; BOULOUIS i sur., 2005).

Rastu na različitim čvrstim i tekućim hranjivim podlogama, najčešće s dodatkom kuniće, konjske ili ovčje krvi, i ovisne su o heminu (AGAN i DOLAN, 2002; BOULOUIS i sur., 2005; OKARO i sur., 2017). Najlakše se izdvajaju iz krvi, ako su eritrociti prije naciepljivanja lizirani (CHOMEL i sur., 2004). Zbog sporog rasta i biokemijske inertnosti identificiraju se lančanom reakcijom polimerazom (PCR) i sekvenciranjem (CHOMEL i sur., 2004; CAPONETTI i sur., 2009; STAGGEMEIER i sur., 2010).

Iako nema objavljenih podataka koji se odnose na bartonele, smatra se da je kao i većina bakterija osjetljiva na dezinficijense poput 70%-tnog etanola, 1%-tnog natrij –

hipoklorita i 2%-tnog formaldehida ili fenola te 2%-tne otopine glutaraldehida i peroctene kiseline (0,001% do 0,2%). Bartonelle se mogu dekontaminirati i fizikalnim metodama poput vlažne sterilizacije u autoklavima na 121°C u trajanju od 15 do 30 minuta, ili suhom sterilizacijom na temperaturi od 160 do 170 °C kroz jedan do dva sata (SPICKLER, 2012).

### **2.2.2. Vrste bartonela**

Rod *Bartonella* krasi velika raznolikost vrsta, izdvojenih iz ljudi i brojnih životinjskih nositelja. Redovita primjena molekularnih metoda doprinjela je otkrivanju novih vrsta, podvrsta i vrsta sa statusom kandidata (lat. *Candidatus*) (REGIER i sur., 2016). Od reklasifikacije roda *Bartonella* 1993. godine broj im se stalno povećava tako da je danas poznato gotovo 40 vrsta i podvrsta bartonela te oko 20 još neimenovanih tzv. *Candidatus* vrsta (OKARO i sur., 2017; BREITSCHWERDT, 2017; DENG i sur., 2018; CHESLOCK i EMBERS, 2019). Za svaku vrstu poznat je barem jedan nositelj, takozvani „prirodni rezervoar“ (CHOMEL i sur., 2009). Uz nove vrste, stalno se otkrivaju i novi rezervoari *Bartonella* (OKARO i sur., 2017).

Za vrste *B. bacilliformis* i *B. quintana* rezervoari su isključivo ljudi, dok su rezervoari svih ostalih vrsta bartonela brojne kronično inficirane domaće ili divlje životinje iz razreda sisavaca (GUPTILL, 2010; BREITSCHWERDT, 2017; OKARO i sur., 2017), koje predstavljaju izvor zaraze za ljude ili druge životinje (BREITSCHWERDT i KORDICK, 2000). Da bi neka životinjska vrsta bila proglašena rezervoarom, očekuje se da omogući dugotrajni opstanak, umnažanje i prijenos nekog uzročnika (LI i sur., 2013).

### **2.2.3. Bartonele mačaka**

Danas je u cijelom svijetu zasigurno najznačajniji rezervoar mačka, glavni nositelj vrste *B. henselae*, glavnog uzročnika BMO-a u ljudi (CHOMEL i sur., 2006; IANNINO i sur., 2018). Procjenjuje se da je u svijetu 8% do 56% asimptomatskih mačaka supklinički inficirano bakterijom *B. henselae* (SPICKLER, 2012; SYKES i CHOMEL, 2014). Domaće mačke predstavljaju rezervoare više vrsta bartonela iz kojih je izolirana gotovo trećina zoonotskih vrsta (CHOMEL i KASTEN, 2010). Najznačajnije vrste u mačaka su *B. henselae*, *B. clarridgeiae* i *B. koehlerae*, za koje su

mačke prirodni rezervoari. Znatno rjeđe su opisane i druge vrste u mačaka poput vrsta *B. bovis*, *B. quintana* i *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, dokazane u svega nekoliko mačaka, bez čvrstih dokaza da su rezervoari (ROLAIN i sur., 2003; BREITSCHWERDT, 2008; VARANAT i sur., 2009b; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018). Od svih vrsta izdvojenih iz mačaka, samo *B. bovis* nije izdvojena iz čovjeka (REGIER i sur., 2016).

### **2.2.3.1. *Bartonella henselae***

Istraživanja bakterije *B. henselae* počela su od 1990. godine, kada je prvi puta dokazana lančanom reakcijom polimerazom umnažanjem 16SrRNA gena. Tada su u nekoliko istraživanja u Oklahomi i Houstonu (SAD) u pacijenata zaraženih virusom HIV – a (engl. human immunodeficiency virus) genskim analizama dokazane sekvence jednake tadašnjoj vrsti *Rochalimea henselae* (REGNERY i sur., 1995; REGNERY i TAPPERO, 1995; RAOULT, 2007). Kasnijom reklasifikacijom i premještanjem u rod *Bartonella* uzročnik je preimenovan u *Bartonella henselae*, nazvanu u čast mikrobiologinje Diane M. Hensel iz Oklahoma Citya (SAD), zaslužne još 1985. godine za izdvajanje prvih izolata (REGNERY i TAPPERO, 1995; CHOMEL i sur., 1995).

Izolat uzgojen u Houstonu iz čovjeka zaraženog HIV–om molekularno je tipiziran i danas predstavlja „prototip“ vrste *B. henselae*, deponiran u američku zbirku referentnih sojeva (engl. American Type Culture Collection, ATCC) kao *Bartonella henselae* ATCC 49882, genotip Houston-1. Regnery i suradnici su 1992. godine, nedugo nakon prvog izdvajanja bakterije *B. henselae* iz čovjeka, izdvojili prvi vrstu *B. henselae* iz krvi prirodno inficirane, seropozitivne asimptomatske mačke zdravog vlasnika (REGNERY i sur., 1992a). *B. henselae* je već 1993. godine dokazana kao uzročnik bolesti mačjeg ogreba (BMO) ljudi (CHOMEL i KASTEN, 2010). Nakon ovog otkrića slijedila su brojna epidemiološka istraživanja i dokazi bakterije *B. henselae* u krvi prirodno inficiranih mačkaka i dokazala su važnost domaće mačke (*Felis catus*) kao glavnog rezervoara bakterije *B. henselae* (BOULOUIS i sur., 2005; CHOMEL i KASTEN, 2010).

### **2.2.3.2. Ostale vrste bartonela u mačaka**

Mačke su rezervoari i vrste *Bartonella clarridgeiae*, no iz ljudi je izolirana znatno rjeđe u odnosu na vrstu *B. henselae* (CHOMEL, 2000; LOGAN i sur., 2019).

Prvi izolat bakterije *B. clarridgeiae* izdvojen je u SAD-u iz mačke vlasnika inficiranog HIV-om 1995. godine (CLARRIDGE i sur., 1995), a iduće godine je priznata za novu vrstu *B. clarridgeiae* (Lawson and Collins (1996), genotip Houston-2 cat, ATCC 51734). KORDICK i sur. (1997) opisali su prvi slučaj BMO-a povezan s vrstom *B. clarridgeiae*, izoliranom iz mačića od oboljelog veterinara s limfadenopatijom. *B. clarridgeiae* potom je izdvojena iz kućnih i uličnih mačaka u SAD-u, Europi (HELLER i sur., 1997) i Aziji gdje se učestalost infekcije kreće od 10% - 36%, a zabilježena je i istovremena infekcija s vrstom *B. henselae* (CHOMEL i sur., 2004). No iz mačaka se *B. clarridgeiae* izolira znatno rjeđe i nejednako je raspoređena u svjetskoj populaciji mačaka (CELEBI i sur., 2009; CHOMEL i KASTEN, 2010). Tehnikom genske tipizacije gel – elektroforeza u pulsirajućem polju (engl. pulsed field gel electrophoresis, PFGE) utvrđeno je da vrsta *B. clarridgeiae* ne pokazuje veliki raspon profila, za razliku od vrste *B. henselae* (CHOMEL i sur., 2004).

*Bartonella koehlerae* prvi put je izdvojena 1994. godine na području San Francisca (SAD), uzgojem iz krvi asimptomatskih farmskih mačića invadiranih buhama *C. felis*. Istraživačica Jane E. Koehler uzgojila je dva izolata C-29 i C-30 na čokoladnom agaru, što predstavlja prvi dokaz u mačaka. Izolat C-29 pohranjen je u zbirku izolata kao *B. koehlerae* ATCC 700693 (DROZ i sur., 1999). Poslije je *B. koehlerae* izolirana u Francuskoj iz krvi mačića (ROLAIN i sur., 2003) te i iz mačke litalice u Izraelu (AVIDOR i sur., 2004), a dokazana je i kao uzročnik endokarditisa pasa i ljudi (AVIDOR i sur., 2004; CHOMEL i KASTEN, 2010; MOLIA i sur., 2016; TABAR i sur., 2017).

Prvotno je postojala jedna vrsta *B. koehlerae*, no nakon dokaza izolata iz divljih felida u Kaliforniji, podijeljena je u tri podvrste. Prvi izolat iz mačke C-29 postao je podvrsta *Bartonella koehlerae* subsp. *koehlerae*, a ostale dvije podvrste iz puma (subsp. *boulouisii*) i risova (subsp. *bothieri*) opisali su CHOMEL i sur. (2016). U novijim molekularnim istraživanjima *B. koehlerae* je dokazivana u krvi mačaka u pojedinačnim slučajevima u SAD-u (FLEISCHMAN i sur., 2015a), Čileu (MÜLLER i sur., 2017) i Grčkoj (MYLONAKIS i sur., 2018) te iz više mačaka u Izraelu, s većom učestalošću kod uličnih (GUTIÉRREZ i sur., 2013). S obzirom na mali broj izolacija iz mačaka, za tu vrstu još nije poznata učestalost.

*Bartonella bovis* izdvojena je kao nova vrsta iz nekoliko mačaka u SAD-u, i privremeno nazvana *Bartonella weissii*. CHOMEL i sur. (2016) navode da su je po prvi puta izdvojili iz mačaka i opisali Regnery i suradnici 2000. godine u zborniku sažetaka (engl. 15th Meet. Am. Soc. Rickettsiol., Abstract 4, p. 15, 2000). Smatralo se da je porijeklom isključivo iz mačke, no kasnije je utvrđena genska jednakost novoj vrsti bartonela izdvojenoj iz mliječnih krava u Francuskoj. Pretpostavlja se da je mačji izolat nastao prelaskom uzročnika s populacije goveda na mačke, jer poslije *B. weissii* nije dokazana u mačaka. Vrsta je po novom nazvana *Bartonella bovis* Bermond *et al.* 2002, referentni soj je 91-4 (CIP 106692-CCUG 43828) izoliran iz krave, dok vrsta *B. weissii* ili *weissi* službeno ne postoji (BERMOND i sur., 2002). Do sada nije dokazan slučaj infekcije ljudi bakterijom *B. bovis*, no zbog visoke učestalosti i bliskog kontakta ljudi s inficiranim govedima i njihovim vektorima smatra se potencijalno zoonotskom (BERMOND i sur., 2002; MAILLARD i sur., 2007; RUDOLER i sur., 2014).

Iako eksperimentalnom inokulacijom izolata bakterije *B. quintana* u mačaka nije dokazana bakterijemija (CHOMEL i KASTEN, 2010), LA i sur. (2005) dokazali su DNA vrste *B. quintana* u dentalnoj pulpi eutanazirane mačke dok su je BREITSCHWERDT i sur. (2007) izolirali iz dvije farmske mačke u SAD-u. Za vrstu *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii* rezervoari su psi ili divlji kanidi npr. kojoti, a kod pasa su utvrđena četiri (I-IV) genotipa. Genotip II iz krvi mačke oboljele od osteomijelitisa i poliartritisa su prvi puta izolirali i molekularno dokazali umnažanjem u tekućoj BAPGM kulturi VARANAT i sur. (2009b). Izrazito teška klinička slika ujedno je i dokaz da mačke nisu prilagođene kao prirodni rezervoari na tu vrstu bartonela.

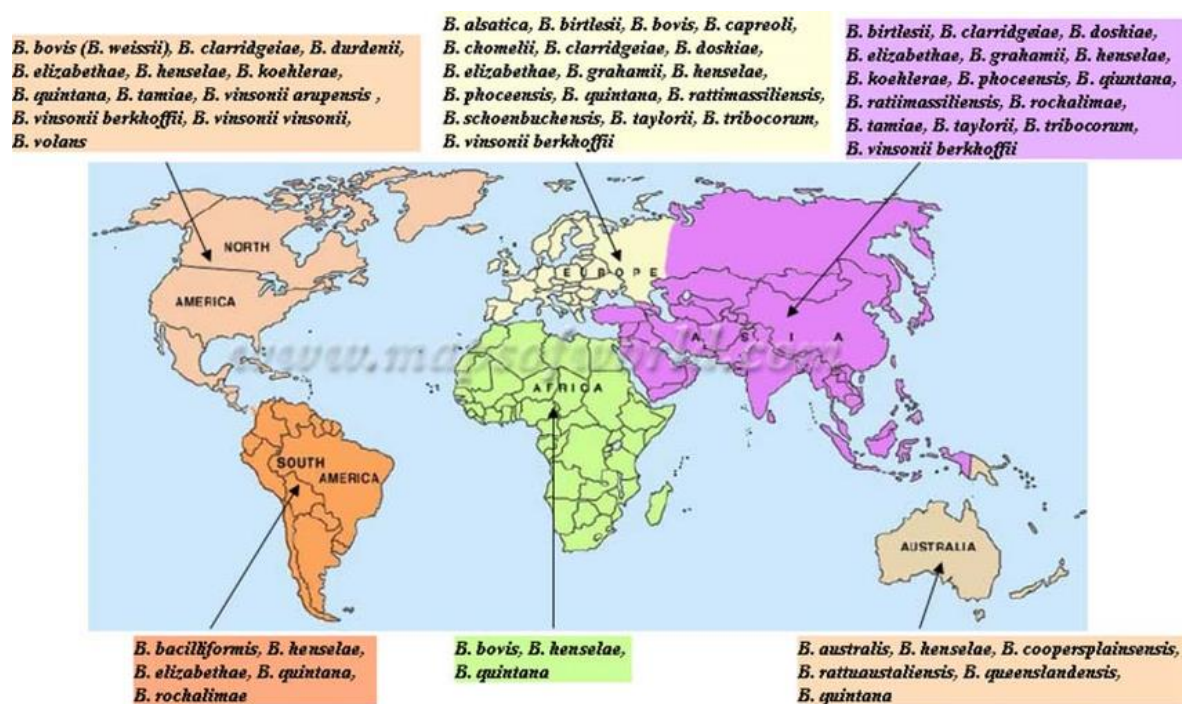
### 2.3. PROŠIRENOST

Bakterije roda *Bartonella* inficiraju ljude, domaće i divlje životinje diljem svijeta (Slika 1.) (SAISONKORH i sur., 2009; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018; DENG i sur., 2018; CHESLOCK i EMBERS, 2019). Proširene su na svim kontinentima, osim Antarktike (FRANK i sur., 2018). Kroz godine su identificirane razne vrste bartonela kod različitih vrsta sisavaca u cijelom svijetu, a prenose ih brojni vektori člankonošci. Međutim vrste su uglavnom specijalizirane za jednog vektora i

prilagođene na jednog rezervoara. Tako da učestalost pojave infekcije bartonelama i njihov veterinarski i javnozdravstveni značaj ponajprije ovisi o vrsti bartonela i zemljopisnom području (MASCARELLI i sur., 2013; REGIER i sur., 2016; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018).

Najviša prevalencija infekcije utvrđena je u toplim i vlažnim područjima, povoljnima za život vektora člankonožaca, osobito buha (GUPTILL, 2010; PENNISI i sur., 2013). Dok je vrsta *B. bacilliformis* vezana uz zemljopisnu lokaciju i endemsku prisutnost vektora papatača (*Lutzomya verrucarum*) u Andama u Južnoj Americi, *B. henselae* i brojne druge vrste dokazane su u cijelom svijetu (MOGOLLON-PASAPERA i sur., 2009; SAISONKORH i sur., 2009; OKARO i sur., 2017).

Na rasprostranjenost bakterije *B. henselae* po raznim dijelovima svijeta utječu globalizacijom uzrokovana kretanja ljudi i životinja, osobito kućnih ljubimaca i njihovih vektora ektoparazita (CHOMEL i sur., 2009; STÜTZER i HARTMANN, 2012). Epidemiološka istraživanja dokazala su prisutnost protutijela i bakterijemiju zdravih mačaka uzrokovanu bakterijom *B. henselae* na svim kontinentima (BREITSCHWERDT, 2008; CHOMEL i KASTEN, 2010).



**Slika 1.** Rasprostranjenost bakterija roda *Bartonella* spp. diljem svijeta (SAISONGKORH i sur., 2009).

## 2.4. EPIZOOTIOLOGIJA

### 2.4.1. Infekcije u životinja uzrokovane vrstom *B. henselae*

Do sada je najviše saznanja prikupljeno o vrsti *B. henselae* (GUPTILL, 2010). Infekcija mačaka bakterijom *B. henselae* većinom je kronična i bez vidljivih kliničkih znakova, koje ne primjećuju ni vlasnici (GUPTILL, 2010). Zbog toga su mačke skriven, velik i stalan izvor infekcije bakterije *B. henselae* za ljude i druge primljive vrste životinja (STÜTZER i HARTMANN, 2012; BREITSCHWERDT, 2017; OKARO i sur., 2017).

Raznolikost genotipova i sojeva omogućuje bartonelama infekciju različitih nositelja, što posebno vrijedi za vrstu *B. henselae* (CHOMEL i sur., 2009) te je čini epidemiološki složenom (BREITSCHWERDT, 2017). Osim iz mačaka koje su glavni rezervoari, vrsta *B. henselae* izdvojena je širom svijeta i iz pasa, konja, goveda, slobodnoživućih svinja, majmuna, malih kopnenih sisavaca, morskih sisavaca (tuljana, bijelih beluga kitova, pliskavica, morskih vidri) te morskih kornjača i kukcojeda. *B. henselae* serološki i molekularno dokazana je i kod brojnih vrsta divljih mesojeda, poput lisica, kojota, čaglja, vuka, mungosa, rakuna i američkih tvorova (SPICKLER, 2012; BREITSCHWERDT, 2017; OKARO i sur., 2017; KOSOY i GOODRICH, 2019). *B. henselae* izdvojena je i iz više vrsta divljih felida (puma, ris, lav, gepard), koji dijele ektoparazite uglavnom s mačkama lutalicama (CHOMEL i sur., 2016; MOLIA i sur., 2016). Svi ti nositelji potencijalni su izvor zaraze bakterije *B. henselae* za ljude i druge životinje, što čini tu vrstu bartonela epidemiološki izrazito složenom (SPICKLER, 2012; CHOMEL i sur 2016; BREITSCHWERDT, 2017; OKARO i sur., 2017; KOSOY i GOODRICH, 2019).

Za sada su oboljena uzrokovana bakterijom *B. henselae* opisana jedino kod pasa, kod kojih se javljaju endokarditis, hemangiosarkom slezene, pelioza jetre, limfadenopatija, granulomatozni hepatitis i dr. (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018). Iako su psi

prirodni rezervoari vrste *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, kućni psi inficiraju se vrstom *B. henselae* u bliskom kontaktu s mačkama i njihovim buhama (MAZUREK i sur., 2019). Kod pasa su dokazane i druge vrste bartonela porijeklom iz mačaka, kao što su *B. clarridgeiae* i *B. koehlerae* (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018). Osim u pasa, bakteriju *B. henselae* dokazali su MAGNI i sur. (2017) serološkim metodama i PCR-om i u krvi asimptomatskih konja i magaraca u Italiji, a već je prije dokazivana u konja s vaskulitisom i artropatijom.

#### **2.4.2. Način širenja infekcije**

Zbog velikog broja vrsta i životinjskih nositelja epidemiologija i epizootologija infekcija uzrokovanih bartonelama izrazito je složena (GUPTILL, 2010; BREITSCHWERDT, 2017). Kronično inficirani rezervoari izvor su uzročnika, a prenose se inficiranim vektorima člankonošcima (SAISONGKORH i sur., 2009; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018). Rjeđe se prenose ugrizom, ogrebom pa čak i ubodom igle (JACOMO i sur., 2002; BREITSCHWERDT, 2014). Zabilježen je i jatrogeni prijenos transfuzijom krvi mačaka, zbog čega se mačke donori krvi testiraju na prisutnost *Bartonella* (PITASSI i sur., 2015). Nedavni nalaz uzročnika u uzorcima fetusa i posteljice gravidnih ženki pokazuje da bakterija *B. henselae* ima afinitet za reproduktivno tkivo mačaka i da se treba razmotriti i vertikalni prijenos te utjecaj na reprodukciju (MANVELL i sur., 2021).

##### **2.4.2.1. Bartonele u ljudi**

Infekcija ljudi antropogenim vrstama ne nastaje izravnim prijenosom, već su u prijenos uvijek uključeni vektori člankonošci (MAURIN i RAOULT, 1996). *B. quintana* uzročnik je rovovske groznice (engl. trench fever), a *B. bacilliformis* Carrionove bolesti, nazvane još i Oroya groznica (engl. Oroya fever) i peruanske bradavice (španj. verruga peruana) (BREITSCHWERDT, 2017; MOZAYENI i sur., 2018). Dok je *B. bacilliformis* do sada izdvojena isključivo iz ljudi, DNA vrste *B. quintana* izdvojena je iz mačaka, mačjih buha i pasa (ROLAIN i sur., 2003; BREITSCHWERDT i sur., 2007; CHOMEL i KASTEN, 2010; GUPTILL, 2010).

##### **2.4.2.2. Bartonele u životinja**



Životinjski rezervoari bartonela su mačke i drugi felidi (ris, puma), psi i drugi kanidi (lisica, rakun, kojot), domaći i divlji preživači (goveda, ovce, srne), kunići, mali glodavci (miš, vjeverica, štakor, voluharica, rovka, gerbil), klokani, deve, a u novije vrijeme i šišmiši (JIYIPONG i sur., 2014; BREITSCHWERDT, 2017; OKARO i sur., 2017; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018; CHESLOK i EMBERS, 2019). Osim iz primarnih rezervoara, bartonele su izdvojene i iz drugih vrsta sisavaca kao na primjer kopitara ili morskih sisavaca, pa čak i iz kralježnjaka iz razreda gmazova (morske kornjače) (KOSOY i sur., 2012; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018).

Za razliku od ljudi, životinjski rezervoari inficirani bartonelama uglavnom ne pokazuju vidljive kliničke promjene, ali bartonele uzrokuju dugotrajnu asimptomatsku intravaskularnu infekciju (HARMS i DEHIO, 2012; KOSOY i sur., 2012; JIYIPONG i sur., 2014; OKARO i sur., 2017; DENG i sur., 2018). Razlog tome je dobra evolucijska prilagodba bartonela na svoje životinjske rezervoare sisavce, zbog koje rezervoari dobro toleriraju kroničnu intraeritocitnu bakterijemiju, što omogućuje dugotrajni uzajamni opstanak bakterije i nositelja. No slučajnom infekcijom ljudi ili životinja koji nisu rezervoari neke vrste bartonela, mogu se javiti razna akutna ili kronična oboljenja (GUPTILL, 2010; STÜTZER i HARTMANN, 2012; SYKES i CHOMEL, 2014).

#### **2.4.2.3. Zoonotske vrste bartonela**

Klinički zdravi prirodno inficirani životinjski rezervaori skriveni su izvor zoonotskih infekcija ljudi (OKARO i sur., 2017). Do danas je najmanje trinaest vrsta ili podvrsta bartonela prepoznato kao uzročnici oboljenja ljudi (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018; GADILA i EMBERS, 2021). Broj vrsta potencijalno patogenih za ljude kontinuirano se povećava i pretpostavlja se da bi svaka vrsta bartonela pronađena u životinja mogla inficirati i ljude (OKARO i sur., 2017). Ljudi se inficiraju slučajno, prijenosom sa životinjskih rezervoara (EICHER i DEHIO, 2012) i pokazuju različite kliničke manifestacije (BREITSCHWERDT, 2017; CHESLOCK i EMBERS, 2019).

Najpoznatija zoonotska vrsta je *B. henselae*, za koju su mačke primarni rezervoari, a glavni je uzročnik bolesti mačjeg ogreba (BMO). *B. henselae* najčešće je izolirana vrsta iz mačaka, a mačke su rezervoari i zoonotskih vrsta *B. clarridgeiae* i *B. koehlerae*. *B. clarridgeiae* je također dokazana u nekoliko pacijenata sa simptomima BMO-a, dok je

*B. koehlerae* dokazana kao uzročnik endokarditisa ljudi (YAMAMOTO i sur., 2002; CHOMEL i sur., 2006; BREITSCHWERDT, 2014). Ljudi se najčešće inficiraju kontaktom s naizgled zdravim mačkama invadiranim buhama (CHOMEL i KASTEN, 2010; GUPTILL, 2010; BREITSCHWERDT, 2017; DENG i sur., 2018). Nedavno je u krvi jedne mačke u Litvi dokazana i DNA vrste blisko srodne zoonotskoj vrsti *B. schoenbuchensis* (RAZGŪNAITĖ i sur., 2021), već izdvojene iz ljudi (VAYSSIER-TAUSSAUT i sur., 2016).

Osim vrste *B. henselae*, najznačajniji uzročnici oboljenja ljudi i životinja su vrste *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* i *B. koehlerae* (BREITSCHWERDT, 2017). Ostale vrste potencijalno patogene za ljude (a ponekad i za životinje) su *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, *B. vinsonii* subsp. *vinsonii*, *B. alsatica*, *B. elizabethae*, *B. washoensis*, *B. grahamii*, *B. rattimassiliensis* i *B. tribocorum*, te vrste sa statusom kandidata *B. tamiae* i *B. melophagi* (CHOMEL i KASTEN, 2010; SPICKLER, 2012).

Zoonotske vrste bartonela izdvojene su i iz divljači, što je od javnozdravstvenog značaja (CHOMEL i sur., 2016; MARCIANO i sur., 2016). Nedavno je u Nizozemskoj vrsta *B. alsatica* izdvojena iz divljih i domaćih kunića (KIK i sur., 2021). Iste vrste kao iz domaćih mačaka (*B. henselae*, *B. clarridgeiae* i *B. koehlerae*) izdvojene su i iz divljih felida (puma, risova, divljih mačaka, geparda i lavova), koji se također smatraju rezervoarima (CHOMEL i sur., 2016; KOSOY i GOODRICH, 2019).

Najznačajnije vrste i rezervoari bartonela navedeni su u Tablici 1. (u prilogu), u kojoj su prikazane vrste i podvrste koje zadovoljavaju priznate kriterije ispravnog objavljivanja i taksonomskog nazivlja prema bazi nazivlja prokariota „LPSN“ (engl. List of procaryotic names with standing in nomenclature) (BREITSCHWERDT, 2017; OKARO i sur., 2017; CHESLOK i EMBERS, 2019; PARTE i sur., 2020).

#### **2.4.3. Vektori bartonela**

Većina bartonela ima svoje vrsno specifične vektore člankonošce, sudionike u njihovu prijenosu (JACOMO i sur., 2002). Za svega šest vrsta bartonela potvrđeno je da ih prenose hematofagni insekti člankonošci, a broj sumnjivih i potencijalnih vektora stalno raste. Kompetencija, odnosno sposobnost da služe kao vektori u prijenosu bartonela na ljude i životinje, eksperimentalno je dokazana za papatače *Lutzomyia*

*verrucarum* i vrstu *B. bacilliformis*, ljudske tjelesne uši *Pediculus humanus* i vrstu *B. quintana*, krpelje *Ixodes ricinus* i vrstu *B. birtlesii*, mačje buhe *Ctenocephalides felis* i vrstu *B. henselae* te buhe glodavaca *Ctenophthalmus nobilis* i vrste *B. grahamii* i *B. taylorii* (BILLETTER i sur., 2012; MASCARELLI i sur., 2013; REGIER i sur., 2016). No najpoznatiji vektori životinjskih vrsta bartonela općenito su buhe, s glavnom ulogom u prirodnom ciklusu prijenosa mnogih vrsta bartonela (CHOMEL i KASTEN 2010; BILLETTER i sur., 2012; KOSOY i sur., 2012; MASCARELLI i sur., 2013).

Sve više se raznih vrsta insekata člankonožaca spominju kao potencijalni vektori u prijenosu *Bartonella* spp. (MASCARELLI i sur., 2013). Osim buha i krpelja, te uši i papatača za antopogene vrste bartonela, kao potencijalni vektori u prijenosu *Bartonella* spp. navode se ostali hematofagni člankonošci kao npr. obadi, uši, papatači i muhe, a u novije vrijeme spominju se i krpuše, pauci, grinje glodavaca i šišmiša te muhe šišmiša (REGIER i sur., 2016; BREITSCHWERDT, 2017; OKARO i sur., 2017). Na temelju čestih dokazivanja DNA bartonela i drugi hematofagni člankonošci mogli bi predstavljati kompetentne vektore, no za sada nema dokaza o prijenosu (CHOMEL i sur., 2009; REGIER i sur., 2016; IANNINO i sur., 2018; WAGNER i DEHIO 2019).

#### **2.4.3.1. Mačje buhe *C. felis* kao vektori bartonela**

Buhe iz reda *Siphonaptera*, familije *Pulicidae*, rod *Ctenocephalides* najčešći su ektoparaziti mačaka i pasa u svijetu. Najraširenije i najvažnije među njima su mačje buhe, vrsta *Ctenocephalides felis felis* (*C. felis*), zbog sposobosti da služe kao kompetentni vektori zoonotskim uzročnicima poput *Bartonella* spp. (IANNINO i sur., 2017; ABDULLAH i sur., 2019). Mačja buha *C. felis* je glavni vektor bakterije *B. henselae* (CHOMEL i KASTEN, 2010; OKARO i sur., 2017). CHOMEL i sur. (1996) pokusno su dokazali kompetenciju mačjih buha *C. felis* kao vektora u prijenosu vrste *B. henselae*, a njihovu prisutnost ključnom za održavanje infekcije unutar populacije mačaka. O njoj ulozi u prijenosu vrste *B. henselae* među mačkama postoje eksperimentalni i epizootiološki dokazi u cijelom svijetu. Razmatra ih se i kao potencijalnim vektorima vrsta *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae* i *B. quintana*, jer je DNA tih vrsta bartonela često otkrivan u buha *C. felis* širom svijeta (BREITSCHWERDT, 2014; GUTIÉRREZ i sur., 2015).

HIGGINS i sur. (1996) dokazali su kontinuirano umnažanje bakterije *B. henselae* u probavnom sustavu mačke buhe (*C. felis*), jer je najveći broj živih bakterija u fecesu buhe potvrđen čak devet dana nakon pokusnog hranjenja, a bakterija je uzgojena i iz crijevnog epitela buha. BOUHSIRA i sur. (2013b) su nakon umjetnog hranjenja buha inficiranom krvlju dokazali DNA bakterije *B. henselae* u fecesu čak 12 dana od uzimanja pokusnog krvnog obroka. Nakon eksperimentalne infekcije buha *C. felis* bakterijom *B. henselae* hranjenjem na inficiranim mačkama, FINKELSTEIN i sur. (2002) su molekularno dokazali bakteriju u fecesu buha šest dana od početka hranjenja, te preživljavanje u okolišu buhe barem tri dana. BOUHSIRA i sur. (2013a) su nakon umjetnog hranjenja buha *C. felis* inficiranom krvlju dokazali u fecesu i preživljavanje vrsta *B. clarridgeiae*, *B. quintana*, *B. birtlesii* i *B. tribocorum*, a KERNIF i sur. (2014) vrste *B. quintana*, što ukazuje na potencijalnu vektorsku sposobnost buha i za druge vrste bartonela.

U jednom eksperimentu kod mačaka je dokazana bakterijemija nakon premještanja buha sa prirodno inficiranih mačaka na specific pathogen-free (SPF) mačke (CHOMEL i sur., 1996), kao i intradermalnom inokulacijom inficiranog fecesa buha, što se pokazalo uspješnijim od prijenosa slinom buhe tijekom uboda (FOIL i sur., 1998). Kasnije su BOUHSIRA i sur. (2013a) pokusno dokazali horizontalni prijenos slinom inficiranih buha, regurgitacijom DNA bakterije *B. henselae* tijekom imitacije hranjenja krvlju preko umjetne membrane. No uloga sline i ugriza buha u prirodnim uvjetima prijenosa nedovoljno je istražena, jer nema dokaza prisutnosti bakterije *B. henselae* u slinskim žlijezdama buhe, dakle niti dokaza da su one izvor zaraze za vrijeme ugriza ili hranjenja buha (OKARO i sur., 2017).

Bartonele su dokazane i u prirodno inficiranih mačjih buha *C. felis*. *B. henselae* prvi puta izolirana je iz mačjih buha (*C. felis*) sakupljenih s bakterijemičnih mačaka ranih 1990-tih u sjevernoj Kaliforniji (KOEHLER i sur., 1994). Sve vrste bartonela izdvojene iz mačaka dokazane su i u mačjih buha *C. felis* u mnogim državama Europe i Azije (Francuska, Velika Britanija, Thailand, Japan), SAD-u i Novom Zelandu. Molekularnim metodama najučestalije su dokazivane DNA vrsta *B. henselae* i *B. clarridgeiae*, a rjeđe *B. koehlerae* i *B. quintana* (AVIDOR i sur., 2004; BRUNT i sur., 2006; CHOMEL i KASTEN, 2010; REGIER i sur., 2016). Učestalost dokazivanja DNA

bartonela kod buha *C. felis* prikupljenih s prirodno inficiranih mačaka u raznim državama svijeta kreće se od 4,0% u Mađarskoj (SRÉTER-LANCZ i sur., 2006) do 98,0% u Kanadi (KAMRANI i sur., 2008).

ROLAIN i sur. (2003) su PCR-om gena *gltA* identificirali četiri vrste bartonela, *B. henselae* (9/89; 11,1%), *B. clarridgeiae* (55/89; 67,9%) i *B. koehlerae* (3/89; 3,7%) te po prvi puta u buha vrstu *B. quintana* (14/89; 17,3%). GUTIÉRREZ i sur. (2015) PCR-om su dokazali DNA bartonela iz 75,6% (68/90) buha *C. felis* prikupljenih s uličnih mačaka u Izraelu, a otkrili su četiri vrste: 38,9% *B. clarridgeiae*, 26,7% *B. henselae*, u jedne mačke *B. koehlerae* (1,1%), dok su u šest mačaka (6,7%) otkrili vrstu koja ima ITS sekvencu 100% kao *Bartonella elizabethae*. Isto tako u Velikoj Britaniji su ABDULLAH i sur. (2019) sekvenciranjem mačjih uzoraka buha *C. felis* iz 11/32 uzoraka dokazali vrstu *B. henselae* (Houston-1), vrstu *B. clarridgeiae* iz 17/32 uzoraka, a iz jedne buhe izolirana je i *B. grahamii*.

#### **2.4.3.2. Krpelji kao potencijalni vektori bartonela**

Osim buha, kao vektore u prijenosu bartonela na mačke, ljude, pse i druge sisavce treba razmotriti i ostale člankonošce, na prvom mjestu krpelje. Izolacija više vrsta bartonela iz malih glodavaca ukazuje na krpelje kao moguće vektore u prijenosu bartonela. DNA *Bartonella* spp. je dokazana u brojnih vrsta tvrdih krpelja diljem svijeta, prvenstveno krpelja roda *Ixodes* spp. i *Dermacentor* spp. (REGIER i sur., 2016), te *Rhipicephalus* spp. i *Haemaphysalis* spp. (CHOMEL i sur., 2009). No samo je jedan objavljeni slučaj uzgoja bartonela iz krpelja u Poljskoj (KRUSZEWSKA i TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA, 1996; BILLETER i sur., 2008).

Nalaz DNA bartonela u prirodno inficiranih krpelja nije rijetkost. DNA vrste *B. henselae* otkrivena je u krpelja *Ixodes pacificus*, *I. persulcatus*, *I. ricinus* i *R. sanguineus* (WECHTAISONG i sur., 2020). DIETRICH i sur. (2010) navode da se učestalost infekcije vrstom *B. henselae* u *I. ricinus* krpelja u Europi kreće do gotovo 40% (Francuska, Portugal). Krpelji *Ixodes ricinus* najvažnija su vrsta krpelja u pogledu zdravlja životinja i ljudi, prirodni domaćini su mu sve domaće i divlje životinje, dok se ljudi invadiraju slučajno, ulaskom u njihova staništa. Osim od vrste *B. henselae*, u krpelja su dokazane i DNA vrsta *B. quintana*, *B. washoensis* i *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* (JACOMO i sur., 2002; CHOMEL i sur., 2006; GUPTILL, 2010). KRÓL i

sur (2021) navode da je DNA vrste *B. henselae* i drugih zoonotskih vrsta često izdvojena iz krpelja skinutih s mačaka i ljudi. REGIER i sur. (2017) molekularno su je dokazali u 11 krpelja *I. ricinus* skinutih s jedne seropozitivne mačke, no unatoč tome uzgojem mačje krvi nisu izdvojene bartonele.

Rezultati pokusa o prijenosu bartonela krpeljima na modelu živih životinja podržavaju ulogu krpelja u prirodnom životnom ciklusu nekih vrsta bartonela (CHOMEL i sur., 2009; EREQAT i sur., 2016). COTTÈ i sur., (2008) eksperimentalno su demonstrirali kompetenciju krpelja *Ixodes ricinus* kao vektora vrste *B. henselae* tako što su dokazali prijenos bakterije *B. henselae* u krv hranjenjem preko sistema umjetne membrane, kao i prijenos uzročnika iz slinskih žlijezda krpelja na mačke. Nadalje, demonstrirali su da *B. henselae* može preživjeti u krpelju unatoč presvlačenju kroz razvojne stadije larve, nimfe i adulta. Na kraju, dokazali su *in vitro* i umnažanje uzročnika u krpeljima. No istraživači su podijeljeni glede tumačenja navedenog eksperimenta. Pojedini se slažu da je istraživanjem dokazano umnažanje bakterije *B. henselae* u krpeljima vrste *I. ricinus*, odnosno njihova kompetencija kao vektora (GUPTILL, 2010; EREQAT i sur., 2016; WECHTAISONG i sur., 2020). No pojedini kritiziraju prijenos vrste *B. henselae* s krpelja na sisavce hranjenjem preko umjetne membrane, jer za sada nema *in vivo* dokaza prirodno inficiranih krpelja kao vektora u prijenosu bartonela (BILLETTER i sur., 2008; ANGELAKIS i sur., 2010; REGIER i sur., 2016). CHOMEL i sur. (2009) smatraju da je za potvrdu infekcije mačaka bakterijom *B. henselae* nakon ugriza krpelja potrebna mačka kao model prijenosa uzročnika inficiranim krpeljima, kako bi se procijenio prirodni kapacitet krpelja *I. ricinus* za prijenos vrste *B. henselae* na mačke i ljude, kao i prilagodba bartonela na krpelje kao vektore bartonela.

Poslije su REIS i sur. (2011) dokazali su prvi *in vivo* dokaz prijenosa vrste *B. birtlesii* krpeljima na neinficirane miševe što je pretpostavka kompetencije krpelja *I. ricinus* kao vektora. Unatoč tome KRÓL i sur (2021) konstatiraju da niti najnovija istraživanja nisu uspjela sa sigurnošću dokazati kompetenciju krpelja vrste *I. ricinus* kao vektora u prijenosu bakterija roda *Bartonella* spp. Stoga se o ulozi krpelja i njihovoj kompetenciji kao vektora u prijenosu vrste *B. henselae* i drugih bartonela još uvijek

raspravlja i nužna su daljnja istraživanja (MOUTAILLER i sur., 2016; REGIER i sur., 2017).

#### **2.4.3.3. Prirodni ciklus prijenosa bartonela vektorima**

Bartonele se ne prenose izravno s jedinke na jedinku, već se primarno prenose hematofagnim vektorima člankonošcima (MAURIN i RAOULT, 1996). Vjeruje se da je model infekcije rezervoara i prijenosa zajednički za sve vrste bartonela. Ciklus prijenosa bartonela karakterističan je za bolesti prenosive vektorima i karakterizira ga kronična intraeritrocitna bakterijemija prirodnih rezervoara, koji predstavljaju trajni izvor infekcije člankonožaca (JACOMO i sur., 2002; CHOMEL i sur., 2009). Prilagodba na točno određene rezervoare i vektore strategija je bartonela za prijenos (CHOMEL i sur., 2009; MINNICK i BATTISTI, 2009; OKARO i sur., 2017; KOSOY i GOODRICH, 2019).

Infekcija bartonelama započinje inokulacijom bakterija povezanom s hranjenjem hematofagnih vektora člankonožaca (JACOMO i sur., 2002; MASCARELLI i sur., 2013). Buhe se hrane krvlju probadanjem krvnih žila, a uzročnike bolesti kao vektori prenose na dva načina, oralno (regurgitacijom krvnog obroka) i fekalno (kontaminiranim fecesom) (BITAM i sur., 2010). Odrasle buhe žive, hrane se i razmnožavaju na nositelju, i mogu unijeti do 13,6  $\mu$ L mačje krvi dnevno u nekoliko obroka (BOUHSIRA i sur., 2013a; IANNINO i sur., 2017). Nakon ingestije inficiranog krvnog obroka bartonele koloniziraju epitel srednjeg crijeva vektora, gdje se umnažaju, a potom izlučuju fecesom na kožu nositelja sisavaca (CHOMEL i sur., 2009; CHOMEL i KASTEN, 2010). Kroz kožu opet ulaze kontaminiranim fecesom tijekom češanja, ogrebom ili ugrizom (npr. kod buha, uši ili grinja), a rjeđe izravno ugrizom hematofagnog člankonošca (npr. kod krpelja ili papatača) (CHOMEL i sur., 2009; CHOMEL i KASTEN, 2010; BUFFET i sur., 2013; BREITSCHWERDT, 2017), što omogućuje ponavljanje ciklusa.

Infekcija mačaka ugrizom inficiranih buha *C. felis* eksperimentalno je dokazana (CHOMEL i sur., 1996; FOIL i sur., 1998), no nema dokaza da prirodno inficirane mačje buhe slinom prenose bakteriju *B. henselae* na mačke ili na ljude (TRAVERSA, 2013; OKARO i sur., 2017). Stoga je izloženost fecesu buha *C. felis* glavni put kojim se

inficiraju mačke, a slučajno i ljudi (BOUHSIRA i sur., 2013b) na način da se feces buha inokulira mačjim kandžama pod kožu ili sluznice mačaka, drugih životinja ili ljudi (GIL i sur., 2013; IANNINO i sur., 2017).

#### **2.4.3.4. Zoonotska uloga vektora**

U Španjolskoj su MÁRQUEZ i sur. (2009) iz buha *C. felis*, *C. canis*, *S. cuniculi* i *P. irritans* prikupljenih s mesojeda (mačaka, pasa i lisica) izolirali redom zoonotske vrste *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. alsatica* i *B. rochalimae*, što ih čini mogućim kompetentnim vektorima u prijenosu raznih vrsta bartonela na mačke, pse i ljude (BREITSCHWERDT, 2017; ABDULLAH i sur., 2019). Značajan je i pronalazak vrste *B. rochalimae* u buhama *P. irritans* prikupljenim s pasa, jer buhe *P. irritans* parazitiraju i na ljudima (IANNINO i sur., 2017; CALVANI i sur., 2020).

Iz krpelja roda *Ixodes* skinutih s ljudi dokazane su DNA vrsta *B. quintana*, *B. henselae* i *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii* (ZANGWILL i sur., 1993; CHOMEL i KASTEN, 2010), a iz ljudi u nakon uboda krpelja najčešće su izdvajane *B. henselae*, *B. koehlerae* i *B. vinsonii* ssp. *berkhoffii* (VAYSSIER-TAUSSAT i sur., 2016). U SAD-u je statistički dokazana značajna poveznica uboda krpelja i oboljenja ljudi od BMO-a uzrokovane bakterijom *B. henselae*, često dokazivane iz kronično oboljelih ili asimptomatskih ljudi koji navode ugriz krpelja (CHOMEL i sur., 2009; VAYSSIER-TAUSSAT i sur., 2016; REGIER i sur., 2016; EREQAT i sur., 2016; WECHTAISONG i sur., 2020). VAYSSIER-TAUSSAT i sur. (2016) u Francuskoj su iz tri uzorka kronično oboljelih ljudi nakon uboda krpelja uzgojili bakteriju *B. henselae* te tri nove vrste bartonela, *B. doshiae*, *B. tribocorum* i *B. schoenbuchensis*, koje su do tada dokazane jedino u životinja. Vrsta *B. henselae* je izdvojena uzgojem i iz krvi pacijenta s vrućicom poslije ugriza krpelja *R. sanguineus* (WECHTAISONG i sur., 2020). Smatra se da takva otkrića neizravno dokazuju prijenos bartonela krpeljima, čak i ako nema izravnog eksperimentalnog dokaza vektorske kompetencije krpelja (EREQAT i sur., 2016).

## **2.5. PATOGENEZA**



Opisati patogenezu prirodne infekcije bartonelama vrlo je izazovno, jer za proučavanje nedostaje relevantan životinjski model (BREITSCHWERDT, 2017). Bartonele su bakterije prenosive vektorima, s predispozicijom za infekciju eritrocita i endotelnih stanica te stvaranje vaskularnih proliferativnih lezija (ANDRÉ i sur., 2019). Obilježje bartonela je da u svojim rezervoara uzrokuju dugotrajnu intraeritrocitnu bakterijemiju, najčešće bez vidljivih posljedica. Nasuprot tome, slučajna infekcija organizama koji nisu primarni rezervoari, kod „žrtve“ dovodi do akutnih kliničkih manifestacija. U tom slučaju u toj fazi infekcije najčešće nisu uključeni eritrociti (DENG i sur., 2018).

Dugotrajna intraeritrocitna bakterijemija životinjskih rezervoara ključan je aspekt patogenosti i zaštitni znak infekcije bartonelama (MÄNDLE i sur., 2005, CHOMEL i KASTEN, 2010). Ovisno o nositelju, ciljne stanice bartonela su eritrociti ili endotelne stanice (ROLAIN i sur., 2004).

Kada se radi o rezervoarima, bartonele u njima uzrokuju kroničnu infekciju eritrocita i endotelnih stanica (BREITSCHWERDT, 2008; KOSOY i sur., 2012). Bartonele pokazuju jedinstvenu strategiju „parazitiranja“. Nazivaju ih „elegantnim hemotropnim parazitima“, zbog oskudnost kliničkih znakova u usporedbi s visokom učestalošću infekcije. Tom strategijom bartonele pažljivo iskorištavaju domaćina, na optimalan način za njihov prijenos (KOSOY i sur., 2012). Nakon infekcije umnažaju se u eritrocitima, a inficiraju i endotelne stanice, kao i progenitorne stanice koštane srži. Tada se uspostavlja kronična bakterijemija, koja može trajati tjednima, mjesecima ili više od godinu dana. Takav oblik adaptacije pogoduje prijenosu hematofagnim vektorima člankonošcima. Za razliku od ljudi, infekcija životinjskih rezervoara najčešće je supkliničkog tijeka (SYKES i CHOMEL, 2014).

S druge strane infekcija endotela češća je u slučajno inficiranih nositelja koji nisu rezervoari te vrste bartonela i zaslužna je za razvoj vaskuloproliferativnih oboljenja i endokarditisa. Proliferacije krvnih žila nastaju zbog stimulacije endotelnih stanica citokinima i inhibicije apoptoze endotelnih stanica (SYKES i CHOMEL, 2014). Zbog perzistirajuće intravaskularne infekcije, kod životinja i ljudi često se razvije endokarditis, miokarditis i drugi oblici vaskularne patologije (BREITSCHWERDT, 2017).

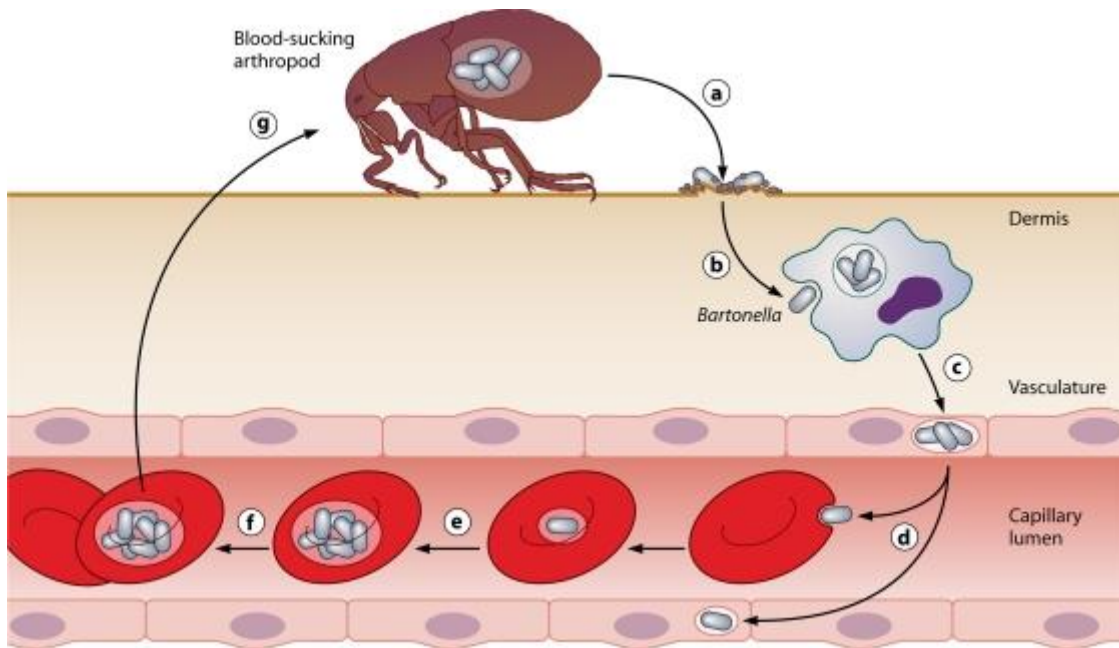
### **2.5.1. Prirodni ciklus infekcije rezervoara**

Bartonele se obično mogu naći u dva specifična okruženja: u crijevu hematofagnog vektora člankonošca te u cirkulaciji nositelja sisavca (DAHMANI i sur., 2018). Infekcija bartonelama započinje inokulacijom bakterija prilikom hranjenja hematofagnih vektora člankonožaca (JACOMO i sur., 2002; MASCARELLI i sur., 2013). Nakon ingestije krvnog obroka bakterije koloniziraju epitel srednjeg crijeva, gdje se umnažaju, a potom se izlučuju fecesom na kožu sisavca (CHOMEL i sur., 2009; CHOMEL i KASTEN, 2010).

U patofiziologiji infekcije važnu ulogu ima primarna niša, koju čine dermalna i vaskularna (endotelijalna) niša (BREITSCHWERDT, 2017). Bartonele ulaze kroz kožu tijekom češanja životinje, ogrebom ili ugrizom, ili kroz već postojeće abrazije kože. Rjeđe se inokuliraju izravno, ugrizom hematofagnog člankonošca (npr. kod krpelja ili papatača) (CHOMEL i sur., 2009; CHOMEL i KASTEN, 2010; BUFFET i sur., 2013; BREITSCHWERDT, 2017). Nakon inokulacije bartonele inficiraju dendritičke stanice kože, koje ih zatim makrofagima transportiraju do endotelnih stanica krvnih žila, gdje se opet intracelularno umnažaju (BEN-TEKAYA i sur., 2013; BREITSCHWERDT, 2017). Svakih pet dana bartonele se iz endotelnih stanica otpuštaju u krvotok, nakon čega inficiraju cirkulirajuće eritrocite, monocite i CD34+ progenitorne stanice koštane srži, a reinficiraju i primarnu nišu (BREITSCHWERDT, 2017).

Nakon prodiranja u eritrocite, bartonele invadiraju njihovu fagosomalnu membranu i ponovno se umnažaju te čekaju hranjive buhe koja usiše inficirane eritrocite. Zatim se nanovo umnažaju u crijevu buhe i izlučuju fecesom na kožu mačke gdje mogu preživjeti najmanje tri dana, što omogućuje ponavljanje ciklusa (CHOMEL i sur., 2009; HARMS i DEHIO, 2012; GUTIÉRREZ i sur., 2015; BREITSCHWERDT, 2017; KOSOY i sur., 2018; WAGNER i DEHIO, 2019).

Strategiju infekcije mačaka bakterijom *B. henselae* i važnost dermalne niše shematski su prikazali HARMS i DEHIO (2012) na Slici 2. (a do g).



**Slika 2.** Strategija infekcije bartonelama – opći koncept infekcije rezervoara. a -vektor člankonožac, b - migratorne stanice kože, c - endotel krvnih žila, d - krvotok, e - umnažanje u eritrocitima, f - opstanak u intraeritrocitnoj niši, g - sisanje krvi vektora (HARMS i DEHIO, 2012).

Infekciju pokreću dva glavna čimbenika patogenosti bakterije *B. henselae*, pripadnici transportnog sekrecijskog sustava tip IV (T4SS): VirB/VirD4, uključen u invaziju na primarnu nišu (eritrocite i endotelne stanice) i prilagodbu na nositelje sisavce te Trw (pilus), uključen u adheziju za površinu eritrocita (GUPTILL, 2010; BUFFET i sur., 2013; DENG i sur., 2018). U preglednom radu DENG i sur. (2018) opisali su na primjeru eksperimentalnih istraživanja *in vivo* na modelu miša, štakora i mačke univerzalni tijek infekcije eritrocita u pet koraka (1 - prije infekcije eritrocita, 2 – adhezija, 3 – invazija, 4 – replikacija, 5 – perzistencija). Dokazano je da bartonele ne mogu odmah inficirati eritrocite, već se nakon početne inokulacije i dolaska u cirkulaciju vraćaju u endotelne stanice, a tek peti dan se ponovo pojave u krvi.

Prije same infekcije eritrocita bartonele izbjegavaju imunski odgovor nositelja. Protiv fagocitoze i aktiviranja komplementa bartonele koriste čimbenike virulencije poput nisko potentnih lipopolisaharida (LPS), flagela i proteina adhezina A vanjske membrane (BadA). Potom slijedi adhezija bartonela na eritrocite, pa invazija eritrocita, kada bartonele u roku dva dana prodiru u zrele eritrocite. U adheziji na eritrocite

posreduju čimbenici virulencije kao što su proteinski kompleks na membrani bartonela Trw (pilus), ili flagele, ovisno o vrsti bartonela.

Pokretljive vrste bartonela, poput *B. bacilliformis*, *B. bovis*, *B. capreoli*, *B. chomelii*, *B. clarridgeiae* i *B. schoenbuchensis*, posjeduju unipolarne flagele (DENG i sur., 2018), dok *B. henselae* i *B. quintana* na površini membrane posjeduje pile, zaslužne za trzajuću pokretljivost uočljivu u nativnim preparatima (DIDDI i sur., 2013; MINNICK i ANDERSON, 2015). Flagele i pili sudjeluju u adheziji bartonela na eritrocite, međusobno su isključivi, a smatra se da je pilus funkcionalno zamijenio flagele kao drevne čimbenike virulencije kod nekih vrsta bartonela (ENGEL i sur., 2011; BUFFET i sur., 2013; DENG i sur., 2018; WAGNER i DEHIO, 2019).

Smatra se da na invazuju eritrocita utječu i čimbenici virulencije poput genskog lokusa povezanog s invazijom (IalB), deformina i hemolizina, koji uzrokuju suptilne promjene membrane eritrocita i ulazak bartonela. Jednom kad su unutra, bartonele se umnažaju u vakuolama uz membranu inficiranih eritrocita. Nakon nekoliko dana replikacija unutar eritrocita prestane jer se umnoži oko osam stanica kćeri. Bartonele u eritrocitima koriste razne genski uvjetovane mehanizme, da bi dobile hranjive tvari i kako bi se nosile sa stresorima iz okruženja (DENG i sur., 2018).

Intraeritrocitna prisutnost vrsta *B. henselae*, *B. clarridgeiae* i *B. koehlerae* utvrđena je u bakterijemičnih mačaka pomoću konfokalnog ili elektronskog mikroskopa (JACOMO i sur., 2002; ROLAIN i sur., 2004). Eritrociti su primarna meta kod infekcije ljudi samo kada se radi o vrstama za koje su rezervoari ljudi, *B. bacilliformis* i *B. quintana* (PITASSI i sur., 2007), za koje je dokazana intreritrocitna prisutnost (ROLAIN i sur., 2004).

## 2.6. KLINIČKA SLIKA

Značaj bartonela kao patogena za životinje još nije jasan jer su rezervoari u pravilu asimptomatski inficirani. U rijetkim slučajevima oboljenja inficiranih životinja teško je dokazati uzročnu povezanost navedenih znakova s bartonelama (SPICKLER, 2012). Raspon svih kliničkih i patoloških promjena u mačaka, ljudi i drugih životinja inficiranih bakterijom *B. henselae* još uvijek nije u potpunosti poznat, a ponajprije ovisi

o patogenosti soja, evolucijskoj prilagodbi bakterije na nositelja i imunosnom odgovoru nositelja (BREITSCHWERDT, 2017). Većina objavljenih podataka dobivena je od eksperimentalno ili prirodno inficiranih mačaka za vrstu *B. henselae* (GUPTILL, 2010) i većina inficiranih mačaka ne pokazuju znakove bolesti (PENNISI i sur., 2013).

Mačke eksperimentalno inficirane bakterijom *B. henselae* većinom su pokazivale različite kliničke znakove, a dokazana je i recidivirajuća bakterijemija (BREITSCHWERDT, 2008; GUPTILL, 2010). Pokusnom intradermalnom infekcijom mačaka čistom kulturom izolata LSU16 bakterije *B. henselae*, inficiranom krvlju i fecesom buha s inficiranih mačaka, sve inficirane mačke pokazivale su crvenila i otekline na mjestu inokulacije te vrućicu i letargiju (O'REILLY i sur., 1999). U mačaka inficiranih transfuzijom krvi koja sadrži bakteriju *B. henselae* i/ili *B. clarridgeiae* KORDICK i sur. (1999) zabilježili su samoograničavajuću vrućicu (48 do 72 sata), blagu anemiju i prolazne neurološke smetnje. Mačke eksperimentalno izložene buhama *C. felis* inficiranim bakterijom *B. henselae* razvile su vrućicu, ali i teže kliničke oblike poput endokarditisa i miokarditisa (BREITSCHWERDT, 2017; LAPPIN, 2018).

U drugim pokusima mačke su pokazivale i znakove anoreksije, limfadenopatije, mijalgije, agresivnosti, grčeva, nistagmusa, prolaznog tremora, reproduktivnih smetnji, a vrlo rijetko nisu razvile kliničke znakove (JACOMO i sur., 2002; BOULOUIS i sur., 2005; CHOMEL i sur., 2006). Eksperimentalno inficirane mačke razvile su kožne lezije na mjestu inokulacije unutar dva dana, i / ili vrućicu nakon dva do 16 dana, na temelju čega bi se moglo zaključiti o trajanju perioda inkubacije (SPICKLER, 2012).

Brojnim istraživanjima učestalosti u mačaka uočeno je da su u pravilu supklinički inficirane, odnosno ne pokazuju vidljive znakove bolesti (KORDICK i sur., 1999). Iako rijetko, prirodno inficirane mačke s vrstom *B. henselae* u manjem broju slučajeva pokazuju znakove kao što su vrućica, limfadenopatija, uveitis, endokarditis, miokarditis i osteomijelitis (BRUNT i sur., 2006; BREITSCHWERDT, 2017; LAPPIN, 2018; PERSICHETTI i sur., 2018). Laboratorijski nalazi inficiranih mačaka često pokazuju anemiju, eozinofiliju, hiperproteinemiju, hiperglobulinemiju, neutropeniju i trombocitopeniju (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018).

No za sada nije utvrđena tipična klinička slika za mačke inficirane bartonelama (IANNINO i sur., 2018), istraživanjima nedostaje statistička značajnost povezanosti s

aktivnom infekcijom bartonelama (GUPTILL, 2010), a malo je slučajeva potvrde uzročnika molekularnim ili kulturelnim metodama izravno u tkivima zahvaćenim kliničko - patološkim promjenama (BREITSCHWERDT, 2017).

Jedan takav primjer je dokaz bakterije *B. henselae* genotip I (Houston-1) kao etiološkog uzročnika infektivnog endokarditisa PCR-om izravno u oštećenom srčanom zalisku aorte za života u jedne prirodno inficirane mačke (CHOMEL i sur., 2003). Isti genotip potvrđen je i kod triju febrilnih mačaka invadiranih buhama, sa znakovima letargije, anoreksije te nalazom anemije i neutropenije (BREITSCHWERDT i sur., 2015). VARANAT i sur. (2012) navode da je jedan mačak s miokarditisom uzrokovanim vrstom *B. henselae* prije uginuća pokazivao znakove akutnog respiratornog distress sindroma, a drugi znakove vrućice i letargije (40,1°C).

Nadalje, SYKES i sur. (2010) su utvrdili značajnu povezanost bakterijemije i gingivostomatitisa u istraživanju provedenom na 298 mačaka u Kaliforniji. NAMEKATA i sur. (2010) su u briseva mačaka s oralnim lezijama PCR-om dokazali prisutnost *Bartonella* spp. u slini 38,3% mačaka (69/180). RAIMUNDO i sur. (2019) su kod mačaka uočili respiratorne smetnje i infekciju gljivicama roda *Sporothrix* spp., no nisu ih statistički značajno povezali s dokazom DNA *Bartonella* spp. Jedino je hematološki nalaz eozinofilije bio statistički značajno povezan s infekcijom mačaka.

UENO i sur. (1996) dovode u vezu istovremene infekcije bakterijom *B. henselae* i virusom FIV-a (virus mačke imunodeficijencije) s limfadenopatijom i gingivitisom, a POTKONJAK i sur. (2014) su u uličnih mačaka iz Srbije dokazali još i stomatitis i anoreksiju. Za razliku od njih, PERSICHETTI i sur. (2018) smatraju da nije jasno pridonosi li popratna infekcija mačaka hemotropnim mikoplazmama, virusom FIV-a (virus mačke imunodeficijencije) i/ili ponekad s više vrsta bartonela pojavi težih oblika bolesti. S druge strane LAPPIN (2018) navodi da se oboljenja gornjih dišnih puteva, stomatitis, konjunktivitis i pankreatitis ne dovode u vezu s mačjom bartonelozom, dok su dokazi za povezanost s uveitisom slabi (STILES, 2011; SPICKLER, 2012).

*B. henselae* kao vrsta posebno prilagođena na mačke kao rezervoare tipično ne izaziva nikakve simptome, dok infekcija mačaka vrstom za koju nije specijalno adaptirana može izazvati simptome, kao na primjer vrsta *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*

izdvojena iz mačke s osteomijelitisom (STÜTZER i HARTMANN, 2012; REGIER i sur., 2016) i endomiokarditisom (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018). Kod prirodno inficiranih mačaka vrstom *B. koehlerae* utvrđen je endomiokarditis lijevog ventrikula i kompleks fibroze endokarda, dok se s mačkama inficiranim vrstom *B. clarridgeiae* ne povezuju nikakve promjene (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018).

## 2.7. PATOANATOMSKI NALAZ

Kod mačaka eksperimentalno inficiranih vrstama *B. henselae* i *B. clarridgeiae* KORDICK i sur. (1999) na razudbi nisu uočili patoanatomske makroskopske promjene, ali su utvrdili patohistološke promjene u vidu hiperplazije perifernih limfnih čvorova, folikularne hiperplazije slezene, limfocitnog holangitisa i periholangitisa, hepatitisa, limfoplazmacitnog miokarditisa i intersticijalnog limfocitnog nefritisa.

Kod mačke uginule od endokarditisa uzrokovanog vrstom *B. henselae* (genotip D) CHOMEL i sur. (2003) su uočili hipertrofiju lijevog ventrikula, povećanje lijevog atrija, zadebljanje aortinih zalistaka s proliferacijom fibroznog tkiva te žarišnu hiperplaziju endotela. SYKES i CHOMEL (2014) navode da bi kod pasa i mačaka prisutnost mineralizacije zalistaka trebala pobuditi sumnju na enokarditis uzrokovan bartonelama, jer se rijetko povezuje s endokarditisima uzrokovanim drugim bakterijama. Dok patoanatomski nalaz pokazuje kongestivno zatajenje srca s kongestijom i edemom pluća, erozije i nodule na rubovima zalistaka te bijeli plak na površini endokarda, za patohistološki nalaz tipična je kronična upala s tvorbom fibroznog tkiva i mineralnih naslaga.

Kod dviju mačaka uginulih od miokarditisa i dijafragmatskog miozitisa uzrokovanog bakterijom *B. henselae* VARANAT i sur. (2012) našli su pleuralni izljev, obostranu dilataciju ventrikula i sitne (2 mm) bjelkaste piogranulomatozne upalne čvoriće u miokardu i dijafragmi. Uzročnik je dokazan PCR-om u tkivu srca obiju mačaka.

BUCHMANN i sur. (2010) kod mačaka istovremeno inficiranih bakterijom *B. henselae* i virusom FeLV-a, patohistološki i imunohistokemijski nisu našli lezije koje bi bile povezane s bartonelama. No ponekad je teško razlučiti da li su bartonele uzrokovale

određena oboljenja, osobito ako su znakovi nespecifični, ili su slučajan nalaz. Čak i dokaz uzročnika iz životinje PCR-om, uzgojem ili serološkim metodama ne garantira da je oboljenje uzrokovano bartonelama (SPICKLER, 2012), jer bakterijemija mačaka može biti popratna.

## **2.8. DIJAGNOSTIKA**

U suvremenoj laboratorijskoj dijagnostici infekcije vrstama roda *Bartonella* dokazuju se izravnim i neizravnim metodama, a dijagnostika je izrazito izazovna i teška. Izravne metode su bakteriološke i molekularne pretrage, a neizravne su serološke pretrage (NĂSOIU i sur., 2015; GUTIÉRREZ i sur., 2017; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2021). Prednosti seroloških testova su jednostavnost, brzina izvođenja te ekonomičnost, za razliku od uzgoja koji je često nedovoljno osjetljiv te zahtijeva posebne laboratorijske uvjete i produženo vrijeme inkubacije (ponekad čak četiri do šest tjedana) (NĂSOIU i sur., 2015; GUTIÉRREZ i sur., 2017). Izvođenje lančane reakcije polimerazom (PCR) također zahtijeva posebnu opremljenost laboratorija, metode nisu ujednačene ni jednako osjetljive, samo što su rezultati brži u odnosu na uzgoj (BRUNT i sur., 2006).

Prema nekim autorima izdvajanje bartonela iz krvi mačaka uzgojem na hranjivim podlogama s naknadnom potvrdom izolata PCR-om smatra se „zlatnim standardom“ dijagnostike aktivnih infekcija bartonelama (FABBI i sur., 2004; GUPTILL, 2010; BREITSCHWERDT, 2017; GUTIÉRREZ i sur., 2017). Dokazom DNA u uzorcima također se otkriva trenutna infekcija bartonelama, no za razliku od uzgoja pozitivan rezultat pretrage ne garantira i da je uzročnik živ (GUPTILL, 2010).

### **2.8.1. Serološka dijagnostika**

Serološke metode najviše su se koristile u počecima istraživanja bartonela u mačaka, a najčešće korištena metoda je indirektna (neizravna) imunofluorescencija (engl. indirect immunofluorescence assay, IFA), kojom se u inficiranih mačaka određuje prisutnost specifičnih protutijela. Mačke s titrom protutijela za bakteriju *B. henselae* većim od 1:64 smatraju se pozitivnima, no dokaz IgG protutijela ne znači i postojanje trenutne infekcije, već otkriva samo izloženost bartonelama (FABBI i sur.,



2004; NĀSOIU i sur., 2015). Dokazano je da IgG protutijela mogu opstati u serumu dugo nakon infekcije (GUPTILL, 2010; NĀSOIU i sur., 2015). Za mačke je zapravo od većeg značaja negativan rezultat serološkog testa, kojim se isključuje kontakt s bartonelama, jer su lažno negativni rezultati u mačaka rijetki (GUPTILL, 2010). Za razliku od mačaka, serološke metode u ljudi od većeg su značaja, jer uglavnom upotpunjuju kliničku dijagnozu. Barem četverostruko povećanje titra protutijela u razmaku od dva do tri tjedna potvrda je akutne bartoneloze ljudi (BREITSCHWERDT, 2017).

### 2.8.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Najčešće se bartonele dokazuju metodom lančane reakcije polimerazom, umnažanjem (amplifikacijom) specifičnih DNA sekvenci i djelomičnim sekvenciranjem gena (npr. 16S rRNA, *gltA* i *groEL*) izravno iz kliničkih uzoraka, ili iz čiste kulture uzgojenih izolata (CHOMEL i sur., 2004; BOULOUIS i sur., 2005; STAGGEMEIER i sur., 2010; GUTIÉRREZ i sur., 2017). Za razliku od uzgoja, molekularna dijagnostika bartonela PCR-om posebno je atraktivna zbog brze identifikacije i mogućnosti razlikovanja vrsta bartonela (MAGGI i BREITSCHWERDT, 2005).

Od svog razvoja 1983. godine, PCR je najraširenija molekularna metoda u kliničkoj mikrobiologiji te otkriva neuzgojive i teško uzgojive mikroorganizme (FOURNIER i sur., 2014), povećava dijagnostički potencijal dokazivanja i razlikovanja vrsta bartonela te dokazuje vrstu *B. henselae* kao etiološkog uzročnika većine slučajeva BMO-a (BOULOUIS i sur., 2005; GUTIÉRREZ i sur., 2017).

U novije vrijeme real- time PCR, nested PCR i konvencionalni (klasični) PCR zamjenjuju polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (engl. restriction fragment length polymorphism, RFLP), DNA-hibridizaciju i druge starije molekularne metode identifikacije i razlikovanja vrsta bartonela (GUTIÉRREZ i sur., 2017). Danas se koriste konvencionalni PCR s ciljnim genima 16S rRNA, *ribC*, *rpo B*, ITS i *gltA*. No novije metode kao PCR u stvarnom vremenu (engl. real time, qPCR) i ugniježdjeni (engl. nested) PCR sve više u laboratorijima zamjenjuju konvencionalni, jer su brži te puno osjetljiviji i specifičniji od svog predhodnika u otkrivanju bartonela iz mačje krvi (GUPTILL, 2010; NĀSOIU i sur., 2015; GUTIÉRREZ i sur., 2017).

Opisano je mnogo različitih parova početnica i tehnika za dokazivanje DNA bartonela PCR-om, no velike su razlike od laboratorija do laboratorija (GUPTILL, 2010; NĀSOIU i sur., 2015). Početnicama se umnaža odsječak nekog ciljnog gena bartonela, nakon čega nastane PCR produkt određene veličine izražene u parovima baza (engl. base pairs, bp), koji se dalje analizira do roda, vrste ili genotipa (GUTIÉRREZ i sur., 2017). Većina početnica korištenih u dijagnostici infekcije bartonelama specifične su za rod, a ne za vrstu, stoga se za identifikaciju vrste zahtijeva hibridizacija ili sekvenciranje umnožene DNA (NĀSOIU i sur., 2015).

Za karakterizaciju *Bartonella* spp. opisane su brojne PCR procedure različite osjetljivosti koje ciljaju različite sekvence konzerviranih i housekeeping ciljnih gena. Najčešće korišteni ciljni geni dobre osjetljivosti i velike razlikovne moći u molekularnim istraživanjima su gen 16SrRNA, unutarnja prepisujuća razmaknica (engl. 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer region, ITS), *gltA* i *rpoB*, a drugi geni su rjeđe zastupljeni. Primjena ciljnih gena ovisi o metodi PCR-a. Za konvencionalni PCR najčešći je gen ITS, za rt PCR geni ITS i *rpoB*, a za RFLP 16SrRNA, ITS i *gltA* (BOULOUIS i sur., 2005; MAGGI i BREITSCHWERDT, 2005; NĀSOIU i sur., 2015; GUTIÉRREZ i sur., 2017; KOSOY i sur., 2018).

Primjena ciljnih gena ovisi i o vrsti uzorka. Ciljni geni ITS i *gltA* pokazali su se najosjetljivijima u dokazivanju i genotipizaciji bartonela iz krvi i buha (MIETZE i sur., 2011; NĀSOIU i sur., 2015; KOSOY i sur., 2018), a za bakterijske izolate *gltA* i 16SrRNA kada je riječ o metodi PCR-RFLP (NĀSOIU i sur., 2015), odnosno 16S rRNA i ITS kada je riječ o konvencionalnom PCR-u (GARCÍA-ESTEBAN i sur., 2008; GIL i sur., 2010). Pritom se ciljni gen 16S rRNA pokazao osjetljivijim za izolate, a ITS za uzorke krvi i buha. GIL i sur. (2010) su koristili početnice prvenstveno dizajnirane za izdvajanje bartonela iz različitih kliničkih i okolišnih uzoraka mačaka i ljudi (npr. krv, uzorci tkiva oboljelih od BMO-a, mačje buhe itd.) i metoda im pokazuje odličnu osjetljivost i specifičnost.

Amplifikacija i sekvenciranje gena 16S rRNA koristi se za identifikaciju vrsta i rodova, ali ne i za genotipove, jer je jako konzerviran. U usporedbi s njim, gen ITS je varijabilniji i pokazuje veću rezoluciju za određivanje podtipova bakterija (MAGGI i BREITSCHWERDT, 2005; BRUNT i sur., 2006).

### **2.8.3. Uzgoj bartonela na hranjivim podlogama**

Metoda uzgoja na hranjivim podlogama najpouzdanija je tehnika dobivanja definitivne dijagnoze, jer znamo da je uzročnik živ (GUPTILL, 2010). Kako su kolonije bartonela fenotipski vrlo slične, zbog čega se ne mogu morfološki razlikovati, komplementarna primjena metoda uzgoja i PCR-a u dijagnostici *Bartonella* spp. je neminovna (NĀSOIU i sur., 2015; GUTIERREZ i sur., 2017). Od 1990. godine se objavljuju različiti dijagnostički pristupi dokazivanja vrste *B. henselae*, bazirani na uzgoju i molekularnoj potvrdi izolata umnažanjem i sekvenciranjem gena 16SrRNA (RAOULT, 2007).

Zbog neujednačenosti dijagnostičkih protokola, uzgoj bakterije *B. henselae* i drugih *Bartonella* spp. od samih početaka predstavlja izazov za istraživače. Još uvijek se teži njegovom poboljšavanju, s ciljem povećanja osjetljivosti i skraćivanja dijagnostičkog postupka, jer standardiziran protokol za optimalan rast bartonela za sada još nije definiran (DOERN, 2000; AGAN i DOLAN, 2002; LYNCH i sur., 2011; BREITSCHWERD, 2014; GUTIÉRREZ i sur., 2017).

#### **2.8.3.1. Uzgoj bakterije *B. henselae* iz krvi mačaka**

Primoizolacija bakterije *B. henselae* zahtijeva produženu inkubaciju od najmanje pet tjedana, atmosferu obogaćenu s CO<sub>2</sub> i agare za rast s dodatkom krvi (BRENNER i sur., 1997; MAURIN i sur., 1997). Uzgoj bartonela iz mačje krvi uspješniji je ako su eritrociti u uzorcima krvi lizirani prije naciepljivanja hranjivih podloga (MAURIN i sur., 1997; GUTIÉRREZ i sur., 2017). Dobri rezultati postignuti su upotrebom komercijalnih pedijatrijskih Isolator<sup>TM</sup> epruveta za kulturu krvi s otopinom za liziranje (engl. lysis centrifugation tubes) (BRENNER i sur., 1997; GUTIÉRREZ i sur., 2017) ili zamrzavanjem krvi na -20 do -85 °C u epruvetama s EDTA antikoagulansom (engl. ethylenediaminetetraacetic acid) kroz najmanje 24 sata (BRENNER i sur., 1997; AGAN i DOLAN, 2002; GUPTILL, 2010).

Općenito u primoizolaciji se smatra najboljom metodom izravno naciepljivanje krvi i tkiva na agare s dodatkom ovčje, kuničje ili konjske krvi (BRENNER i sur., 1997; JACOMO i sur., 2002; CHOMEL i sur., 2004; BOULOUIS i sur., 2005; BREITSCHWERDT, 2008; OKARO i sur., 2017). Kod inokulacije lizirane mačje krvi na površinu agara BRENNER i sur. (1997) preporučaju odmjeriti volumen od 200 – 250

$\mu\text{L}$  krvi po jednoj standardnoj (90 mm) Petrijevoj zdjelici. Kod nacjepljivanja uzoraka AGAN i DOLAN, (2002) preporučaju pustiti krv da se sama razlije po površini agara, jer mehanički potezi ezom smanjuju vjerojatnost rasta. Na isti način su u istraživanjima učestalosti LA SCOLA i sur. (2002) i SIĞIRCI i ILGAZ, (2013) pripremili uzorke mačaka za inkubiranje.

Bartonele najbolje rastu u vlažnoj atmosferi, s povišenom koncentracijom  $\text{CO}_2$  od 5-10%, na  $35^\circ$  ili  $37^\circ\text{C}$  (DOUGHERTY i sur., 1996; LA SCOLA i RAOULT, 1999; DOERN, 2000). LYNCH i sur. (2011) dokazali su jednaku uspješnost rasta i na  $35^\circ\text{C}$  i na  $37^\circ\text{C}$ , a uočeno je da zoonotske vrste rastu bolje na  $37^\circ\text{C}$  (MAURIN i sur., 1997; DOERN, 2000). Iznimku predstavlja vrsta *B. bacilliformis*, koja najbolje raste na  $28^\circ\text{C}$  ili  $30^\circ\text{C}$ , bez povišenog udjela  $\text{CO}_2$  (CLARRIDGE i sur., 1995; ANDERSON i NEUMAN 1997; OKARO i sur., 2017).

Spor rast za vrijeme inkubacije na čvrstim hranjivim podlogama najočitija je fenotipska osobina *Bartonella* spp. (GUTIÉRREZ i sur., 2017). Na površini agara vidljive kolonije primarnih izolata bartonela izdvojenih iz krvi mačaka se rijetko mogu dokazati unutar tri do pet dana, češće nakon 12- 14 dana, ili čak 45 - 56 dana poslije nacjepljivanja (BRENNER i sur., 1997; AGAN i DOLAN, 2002; JACOMO i sur., 2002; GUTIERREZ i sur., 2017). Višekratnim precjepljivanjima generacijsko vrijeme izoliranih kolonija obično se skraćuje na tri do pet dana (CLARRIDGE i sur., 1995; ANDERSON i NEUMAN, 1997), a ponekad rastu do deset dana (GUTIÉRREZ i sur., 2017).

Morfologija izdvojenih kolonija razlikuje se ovisno o broju pasaža na čvrstim hranjivim podlogama (MAURIN i sur., 1997; AGAN i DOLAN, 2002; GUTIÉRREZ i sur., 2017). Primarne kolonije bakterije *B. henselae* porasle izravno iz mačje krvi tipično su fenotipski hrapave, suhe, indurirane, uzdignute, strukture cvjetače ili cirkularne te mogu biti bijele, sive ili krem boje. Uglavnom čvrsto prijanjaju i duboko su utisnute u površinu agara (CLARRIDGE i sur., 1995; ANDERSON i NEUMAN, 1997; BRENNER i sur., 1997; MAURIN i sur., 1997; GUTIÉRREZ i sur., 2017). Morfološka svojstva i veličina kolonija ovise o vrsti bartonela. Primarne kolonije vrste *B. clarridgeiae* također su indurirane, ali nisu tako utisnute u agar. Kolonije vrsta *B. vinsonii* i *B. elizabethae* dva do četiri puta su veće od kolonija vrsta *B. henselae*, *B.*

*clarridgeiae* i *B. quintana* (CLARRIDGE i sur., 1995; ANDERSON i NEUMAN, 1997). Višekratnim precjepljivanjima morfologija kolonija mijenja se iz suhih i čvrsto priljubljenih u glatke, sluzave i slabije prijanjajuće (CLARRIDGE i sur., 1995; ANDERSON i NEUMAN, 1997).

### **2.8.3.2. Hranjive podloge za uzgoj bartonela**

Prvi podaci o kulturelnom izdvajanju bakterije *B. henselae* u primoizolaciji dobiveni su iz protokola za izdvajanje bartonela iz ljudi u SAD-u. WELCH i sur. (1993) izdvojili su bakteriju *B. henselae* na Čokoladnom (ČOK) agaru (engl. Chocolate agar), a precijepljene kolonije bolje su rasle na Agar u infuzije mozga i srca (engl. Brain heart infusion agar, BH), nego na Columbia (COL) agaru (engl. Columbia agar). Za razliku od njih, KOEHLER i sur. (1997) ustanovili su bolji rast primarnih izolata na BH agaru u odnosu na ČOK agar. DOUGHERTY i sur. (1996) su ustanovili da bakterija *B. henselae* u primoizolaciji uglavnom ne raste u tekućim komercijalnim sistemima za kulturu krvi, već samo na čvrstim hranjivim podlogama.

Istraživanja posvećena usporedbi više vrsta hranjivih podloga za izdvajanje primarnih izolata bakterije *B. henselae* i drugih vrsta bartonela iz krvi prirodno inficiranih domaćih mačaka vrlo su oskudna. GIL i sur. (2013) ustanovili su dobar porast kolonija bakterije *B. henselae* na tri vrste COL agara s različitim dodacima (ovčja, konjska i konjska krv s heminom), dok je vrsta *B. clarridgeiae* rasla samo na hranjivoj podlozi s dodatkom hemina.

FLEISCHMAN i sur. (2015a) uspoređivali su rast bartonela korištenjem tri različite metode nacjepljivanja 250 µL mačje krvi na agare s 5% kuničje krvi, kojoj su dodavali komercijalne medije za poticanje rasta staničnih kultura (M199 i Schneiderov medij na bazi stanica insekata). Prvo su pomiješali krv s medijem M199 i izravno nacjepljivali na površinu agara. U drugoj varijanti dodali su i Schneiderov medij i također izravno nacjepljivali. U trećoj varijanti uvođenjem predobogaćenja najprije su četiri dana inkubirali krv u tekućoj mješavini Schneiderovog i M199 medija, a potom precjepljivali na agare. Pokazalo se da dodatak Schneiderovog medija nije poboljšao uspješnost izdvajanja, jer je većina izolata (87%) vrsta *B. henselae* i *B. clarridgeiae* rasla podjednako dobro na sve tri varijante hranjivih podloga.

Za kulturno izdvajanje bakterije *B. henselae* i rjeđe drugih vrsta (*B. clarridgeiae* i *B. koehlerae*) iz krvi prirodno inficiranih mačaka u istraživanjima su korištene različite vrste čvrstih hranjivih podloga. Najčešće je korišten Agar infuzije srca s 5% kuničje krvi (engl. Heart infusion agar, HIA) na kojem su bartonele uspješno izdvojili KOEHLER i sur. (1994), DROZ i sur. (1999), CHOMEL i sur. (1995), MARUYAMA i sur. (1996), GURFIELD i sur. (2001), FABBI i sur. (2004), NAMEKATA i sur. (2010) te SIĞIRCI i ILGAZ, (2013). COL agar s 5% ovčje krvi koristili su BERGMANS i sur. (1997), LA SCOLA i sur. (2002), ROLAIN i sur. (2004), PONS i sur. (2005), MIETZE i sur. (2011), YUAN i sur. (2011) te GIL i sur. (2013).

Osim njih, najzastupljeniji je ČOK agar, kojeg su koristili KOEHLER i sur. (1994), DROZ i sur. (1999), GUPTILL i sur. (2004), MIETZE i sur. (2011) i TSAI i sur. (2011). Četvrti po redu je Agar infuzije mozga i srca (BH), na kojem su vrstu *B. henselae* izdvojili BRENNER i sur. (1997), JOSEPH i sur. (1997), ZANNUTO i sur. (2001) i AZZAG i sur. (2012). Osim njih, još je najmanje desetak vrsta čvrstih hranjivih podloga različitih sastava s dodatkom krvi korišteno u istraživanjima za primarno izdvajanje bartonela iz krvi prirodno inficiranih mačaka.

No neki su autori dobili bolje rezultate osjetljivosti i brzine rezultata uvođenjem postupka predobogaćenja bartonela u tekućim hranjivim podlogama, koje pospješuje oživljavanje i umnažanje bartonela, čime se povećava mogućnost otkrivanja bartonela u kliničkim uzorcima.

Najpoznatiji tekući medij je BAPGM (engl. *Bartonella* alpha Proteobacteria growth medium) na bazi stanica insekata, kojeg su razvili MAGGI i sur. (2005) za primarno izdvajanje vrste *B. henselae* iz uzoraka krvi i tjelesnih tekućina prirodno inficiranih mačaka, ali pospješuje i rast drugih vrsta bartonela (*B. quintana*, *B. clarridgeiae*, *B. elizabethae*, *B. grahamii*, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* i *B. doshiae*) te više vrsta odjednom u kraćem vremenu nego na čvrstim hranjivim podlogama. BAPGM (Galaxy Diagnostics, Durham, SAD) se smatra dijagnostičkom platformom koja se sastoji od umnažanja DNA bartonela PCR-om koji cilja gen ITS (16S – 23S intergenic spacer) i sekvenciranja, izdvojene iz uzoraka krvi, seruma, obogaćene kulture ili izolata dobivenih precjepljivanjem na Trypton – soja agar s 10% kuničje krvi (engl. Tryptic soy

agar, TSA). Dok TSAI i sur. (2011) nisu uspjeli izdvojili bartonele supkulturom s BAPGM-a na površinu ČOK agara, DRUMMOND i sur. (2018) su uspješno uzgojili bakteriju *B. henselae* iz mačje krvi u tekućem BAPGM mediju, kao i precjepljivanjem na agar s dodatkom 30% ovčje krvi.

Iako rastu na čvrstim (agari) i tekućim hranjivim podlogama (bujoni), uzgoj na agarima je bolji jer se na njima vidi intenzitet rasta, čistoća kulture i morfologija izdvojenih kolonija (MAGGI i sur., 2005; OKARO i sur., 2017). Nedostatak tekućih hranjivih podloga je i mogućnost kontaminacije popratnim bakterijama ili gljivicama u primoizolaciji, jer bujoni nisu selektivni samo za bartonele (GUTIÉRREZ i sur., 2017).

### **2.8.3.3. Izazovi uzgoja drugih vrsta bartonela**

Već kod prvog izdvajanja vrste *B. clarridgeiae* iz krvi mačića HIV – pozitivnog vlasnika je utvrđeno da se kolonije izolata (Houston 2–cat) razlikuju od vrste *B. henselae* i da se radi o novoj vrsti bartonela. Kolonije su bile indurirane, ali nisu bile utisnute u agar. Narasle su nakon osam dana na BH agaru s 10% ovčje krvi i na COL agaru s 5% ovčje krvi. Za razliku od vrste *B. henselae*, pod elektronskim mikroskopom bakterije ove vrste su posjedovale flagele (CLARRIDGE i sur., 1995). Nedugo poslije KORDICK i sur. (1997) su iz krvi mačića na TSA agaru s 5% kuničje krvi kulturelno izdvojili izolat (94-F40), no kolonije su porasle tek u drugom i trećem pokušaju uzgoja s razmakom od dva i pol mjeseca nakon 10 – 23 dana inkubiranja, na 35°C s dodatkom 5% CO<sub>2</sub>. Bile su glatke, pigmentirane, nehemolitične i uzdignutog središta, no slabo su prijanjale i nisu bile utisnute u podlogu. Izolat je pod elektronskim mikroskopom pokazivao lofotrihe flagele, a genotipizacijom je identificirana vrsta *B. clarridgeiae*, koja se prvi puta povezuje sa slučajem BMO-a.

HELLER i sur. (1997) su uspjeli uzgojiti 15 izolata vrste *B. clarridgeiae*, ali samo uz korištenje tekućeg BACTEC medija unutar dva do sedam tjedana. Nijedan izolat bakterije *B. clarridgeiae* nije narastao u primoizolaciji na čvrstim hranjivim podlogama, a precjepljivanjem iz tekućeg na čvrste hranjive podloge rast je bio slab i nekonzistentan. Smatraju da uspješnost uzgoja vrste *B. clarridgeiae* ponajprije ovisi o nutritivnim zahtjevima određenog izolata, kemijskom sastavu korištenog krvnog agara i uvjetima uzgoja, te da je zbog tih čimbenika ta vrsta bila dugo neprepoznata. BAI i sur.

(2015) također nisu uzgojili vrstu *B. clarridgeiae* iz mačje krvi na čvrstim hranjivim podlogama, iako je bakterija dokazana PCR-om izravno iz krvi 15 mačaka. Autori to pripisuju niskoj bakterijemiji, posebnim biološkim karakteristikama te vrste bartonela ili posebnim zahtjevima za rast. Za razliku od njih, FLEISCHMAN i sur. (2015a) izdvojili su je samo metodom uzgoja, ali ne i molekularno.

Smatra se da i vrsta *B. koehlerae* ima drugačije zahtjeve za uzgoj u odnosu na vrstu *B. henselae*. KOEHLER i sur. (1994) su izdvojili prve izolate (C-29 i C-30) vrste *B. koehlerae* iz dvaju mačića u San Franciscu (SAD) nacjepljivanjem krvi iz Isolator epruveta na HIA agar s 5% kuničje krvi i na ČOK agar, inkubiranjem na 35°C u atmosferi s 5% CO<sub>2</sub>. Kolonije su sporo rasle i nakon 14 dana bile sićušne. U supkulturi su se također umnažale duže od kolonija vrste *B. henselae*, bile su samo neznatno veće, ali proglašene do tada najzahtjevnijima za uzgoj. Izolati su bolje rasli na ČOK agaru, a nešto slabije na HIA agaru, što je bilo različito u odnosu na rast vrste *B. henselae* iz drugih mačaka u istom istraživanju. Nakon dobivanja prvih izolata iz mačaka, vrsta *B. koehlerae* izdvojena je na ČOK agaru tek iz jedne ulične mačke u Izraelu, a kolonije su bile izrazito sićušne. Međutim nije jasno je li izdvajanje bakterije *B. koehlerae* iz samo jedne prirodno inficirane domaće mačke uzrokovano niskom prevalencijom te vrste bartonela, zahtjevnijim potrebama za uzgoj te vrste bartonela, ili s oba čimbenika (AVIDOR i sur., 2004).

U novije vrijeme vrsta *B. koehlerae* je kulturelno izdvojena samo iz nekoliko puma i risova u Kaliforniji (SAD) (CHOMEL i sur., 2016) te iz krvi lava (MOLIA i sur., 2016), a sitne kolonije na HIA agaru s 5% kuničje krvi pojavile su se nakon 14 dana inkubacije. Kolonije su bile homogene, okrugle i sivo-bijele, promjera 0,3 - 1,0 mm i utisnute u podlogu; iz puma hrapave (*B. koehlerae* subsp. *boulouisii*), iz risova glatke površine (*B. koehlerae* subsp. *bothieri*).

## 2.9. DIFERENCIJALNA DIJAGNOSTIKA

STÜTZER i HARTMANN, (2012) smatraju da diferencijalno dijagnostički kod infekcija bartonelama treba razmotriti i osteomijelitis, koji je zabilježen kao posljedica infekcije mačaka vrstom *B. vinsonii* subspecies *berkhoffii*. Nadalje, kod mačaka je



najvažnije isključiti druge bakterijske uzročnike endokarditisa. Osim toga, u jedne mačke zabilježen je slučaj istovremene, kulturelno potvrđene infekcije bartonelama i zaraznog peritonitisa mačaka, manifestiran vrućicom i limfadenopatijom. Iako je nedostatak odgovora na antimikrobno liječenje potvrdio da je nalaz bartonela slučajan, diferencijalno dijagnostički poželjno je kod mačaka isključiti infekciju virusom zaraznog peritonitisa mačaka (SYKES i CHOMEL, 2014). Kod pasa su glavne diferencijalne dijagnoze drugi bakterijski uzročnici endokarditisa i druge bolesti prenosive vektorima poput erlihioze, anaplazmoze, babezioze i imunološki posredovanih upalnih oboljenja (SYKES i CHOMEL, 2014).

## **2.10. TERAPIJA**

Do danas nije utemeljen optimalan protokol za liječenje mačaka kronično inficiranih bakterijom *B. henselae* (BREITSCHWERDT, 2017) i premalo je podataka iz prirodno inficiranih mačaka (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018). Za sada ne postoji ni univerzalno stajalište o potrebi testiranja ili liječenja zdravih mačaka inficiranih bartonelama (LAPPIN i sur., 2019) niti ponavljanja testiranja nakon liječenja (BRUNT i sur., 2006). Testiranje i liječenje najviše se preporuča u slučaju kontakta imunosuprimiranih ljudi s mačkama, kliničkog oboljenja članova obitelji od bartoneloza (LAPPIN i sur., 2019) ili kod mačaka u kućanstvima s malom djecom (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018). Ali postoji konsenzus udruženja veterinara praktičara specijaliziranih za mačke u SAD-u (engl. American association of feline practitioners, AAFP) da se lijekovi korišteni kod ljudi (npr. azitromicin i fluorokinoloni) ne koriste za liječenje mačaka, ukoliko postoji drugi izbor (BRUNT i sur., 2006).

Mačke s oblicima bolesti koji odgovaraju bartonelozi (endokarditis, miokarditis) te mačke s potvrđenom infekcijom liječe se antibioticima. Cilj liječenja je smanjenje koncentracije bakterija, čime se smanjuje i rizik za infekciju vektora i rizik prijenosa među mačkama i na ljude (BREITSCHWERDT, 2017; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018). Kao prvi izbor za liječenje akutno oboljelih mačaka s pozitivnim nalazom na bartonele opće je prihvaćen doksiciklin (10 mg/kg dnevno, peroralno (p/o), svakih 12 ili 24 sata), zatim i amoksicilin s klavulanskom kiselinom (22 mg/kg dnevno, p/o, svakih 12 sati). Ako ne dođe do poboljšanja indicirano je prijeći na azitromicin (10

mg/kg dnevno, p/o kroz jedan tjedan, a potom svakih 48 sati) ili fluorokinolone (BRUNT i sur., 2006; SYKES i CHOMEL, 2014).

Čini se da se dugotrajno liječenje antibioticima kroz četiri do šest tjedana (BREITSCHWERDT, 2017) u novije se vrijeme skraćuje, upravo da bi se izbjegla rezistencija. Također sve više se primjenjuje kombinacija antibiotika (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018; GADILA i EMBERS, 2021), jer se smatra da sam doksiciklin ne eliminira u potpunosti uzročnika. Isto tako zbog pojave rezistencije na makrolide monoterapija azitromicinom više se ne preporuča (BREITSCHWERDT, 2017; LAPPIN, 2018; LAPPIN i sur., 2019).

Za liječenje mačaka najviše se preporuča kombinacija doksiciklina i fluorokinolona (enrofloksacina ili orbifloksacina), u novije vrijeme za mačke i pse i pradofloksacina (7,5 mg/kg, peroralno, jednom dnevno), zbog najmanje mogućnosti rezistencije (BREITSCHWERDT, 2017; LAPPIN, 2018). Postoje istraživanja u kojima je nakon primjene enrofloksacina ili orbifloksacina vrlo brzo došlo do povlačenja vrućice (BRADBURY i LAPPIN, 2010). U pojedinim slučajeva mačke su dobro odgovorile na terapiju doksiciklinom i azitromicinom, no za razliku od ljudi, protuupalni učinak tih lijekova kod mačaka nije poznat (BRUNT i sur., 2006). Za liječenje endokarditisa uzrokovanog bartonelama GADILA i EMBERS, (2021) kod pasa i mačaka preporučaju kombinaciju doksiciklina i amikacina. No najvažnije od svega je liječenje mačaka kombinirati s eradikacijom buha na svim životinjati u kućanstvu i njihovom okruženju, radi izbjegavanja reinfekcije (BRUNT i sur., 2006).

## **2.11. PROFILAKSA**

Najbolja mjera prevencije infekcije bartonelama je cjelogodišnja kontrola invadiranosti mačaka buhama primjenom antiektoparazitika, što smanjuje mogućnost prijenosa bakterije *B. henselae* i drugih vrsta bartonela s mačke na mačku, a time i rizik prijenosa na ljude (SPICKLER, 2012; SYKES i CHOMEL, 2014; BOUHSIRA i sur., 2015). Eksperimentalno je dokazano da primjena akaricida ometa prijenos bakterije *B. henselae* buhama na mačke, a time i s mačaka na ljude (BREITSCHWERDT, 2014). Mačke tretirane antiparazitikom s djelatnim tvarima imidaklopid i moksidektin nisu se inficirale bakterijom *B. henselae* nakon premještanja inficiranih buha *C. felis*, za razliku

od netretiranih (BRADBURY i LAPPIN, 2010), kao ni mačke tretirane selamektinom (BOUHSIRA i sur., 2015). U prevenciji infekcije bartonelama naglašava se i važnost tretiranja buha u gravidnih mačaka i mladih mačića, koji su zbog nedostatka imunosne zaštite osobito osjetljivi na infekciju čak i unatoč prisutnosti majčinskih IgG protutijela (FLEISCHMAN i sur., 2015b).

Osim kontrole buha, u prevenciji prijenosa bartonela mora se imati na umu i redovita kontrola antiektoparazitcima i ostalih vektora člankonožaca (SPICKLER, 2012). Smanjenje izloženosti vektorima može se postići i kućnim načinom života, a time i prevenirati prijenos bartonela (SYKES i CHOMEL, 2014). Nadalje, mogućnost prijenosa postoji i transfuzijom mačje krvi. Jatrogeno širenje bartonela inokulacijom inficirane mačje krvi može se spriječiti testiranjem svih potencijalnih darivatelja prije uključivanja u program kombinacijom više dijagnostičkih metoda (uzgoj, PCR i IFA), jer inficirane mačke mogu biti i serološki negativne (SPICKLER, 2012; SYKES i CHOMEL, 2014; PENNISI i sur., 2015; SPADA, 2016).

Trenutno ne postoje vakcine za prevenciju infekcije bartonelama u životinja i ljudi (BREITSCHWERDT, 2014). Na primjeru vrste *B. henselae* dokazano je da su mačke postale otporne na reinfekciju istom vrstom bartonela (GREENE i sur., 1996; SYKES i CHOMEL, 2014), ali i da se mogu zaraziti drugom vrstom bartonela ili drugim genotipom (BREITSCHWERDT, 2008; SPICKLER, 2012). Kako prirodno inficirane mačke mogu biti inficirane s više vrsta ili genotipova bartonela, za potencijalnu vakcinu bilo bi poželjno da je polivalentna, odnosno da pokriva razne vrste i sojeve bartonela (BRUNT i sur., 2006; SYKES i CHOMEL, 2014; HUWYLER i sur., 2017).

Iz svega je jasno vidljiva uloga buha u epizootologiji te da je danas kontrola invadiranosti buhama primjenom antiparazitika kod mačaka jedini učinkoviti način prevencije od infekcije bakterijom *B. henselae* (BRUNT i sur., 2006; BOUHSIRA i sur., 2015), s obzirom da vakcine još nisu razvijene. Zbog poznavanja međudnosa uzročnika, mačaka i buha, veterinari su danas najvažnija karika javnog zdravstva u prevenciji širenja bartonela putem redovite komunikacije s klijentima (BREITSCHWERDT, 2017).

## 2.12. JAVNO ZDRAVSTVO

Glavninu kliničkih oboljenja ljudi uzrokuju tri vrste bartonela, *B. bacilliformis*, *B. quintana* i *B. henselae* (JIYIPONG i sur., 2014; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018). Gotovo polovica vrsta izdvojenih iz životinja može inficirati i ljude, a osim vrste *B. henselae*, epidemiološki značajne su još i *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* i *B. koehlerae* (BREITSCHWERDT, 2017). Klinička slika razlikuje se u imunokompetentnih i imunokompromitiranih ljudi (JACOMO i sur., 2002). Bartonele u ljudi najčešće uzrokuju dermatološke, okularne, ortopedske, neurološke i hematološke smetnje (BREITSCHWERDT, 2017) i izazivaju oboljenja i sindrome poput BMO-a, bacilarne angiomatoze, pelioze jetre, endokarditisa, bakterijemije, neuroretinitisa i encefalopatije (ROLAIN i sur 2004; BRUNT i sur., 2006). Najčešća infekcija bartonelama u ljudi danas je bolest mačjeg ogreba (BMO), uzrokovana pretežno vrstom *B. henselae* te rjeđe vrstom *B. clarridgeiae* (JACOMO i sur., 2002; BREITSCHWERDT, 2017).

### 2.12.1. Bolest mačjeg ogreba (BMO)

*B. henselae* je javnozdravstveno najznačajnija vrsta bartonela. BMO je najčešća zoonoza prenosiva s kućnih ljubimaca na ljude u razvijenim državama. Važnu ulogu u prijenosu na ljude imaju mačke invadirane buhama u cijelom svijetu (BREITSCHWERD i sur., 2010; NELSON i sur., 2016; BREITSCHWERDT, 2017). Prijenos bakterije *B. henselae* na ljude nastaje indirektno, inokulacijom kontaminiranog fecesa buha tijekom ogreba mačke, a rjeđe ugrizom mačke (OKARO i sur., 2017).

Blaži oblik BMO-a se tipično javlja u imunokompetentnih ljudi kao lokalizirana, regionalna, unilateralna limfadenopatija bez bakterijemije, a rjeđi su atipični oblici (CHOMEL i sur., 2006). Atipični oblik kod otprilike 5 - 14% imunokompetentnih pacijenata očituje se komplikacijama poput osipa, povećanja i oštećenja jetre i slezene, osteolize, dubokog limfadenitisa, Perinaudovog okuloglandularnog sindroma, neuroretinitisa, encefalitisa, osteomijelitisa, endokarditisa, konjunktivitisa, živčanih simptoma te vrućica nepoznatog porijekla, a može trajati i više mjeseci. Teži oblici poput bacilarne angiomatoze, pelioze jetre, hepatitisa, endokarditisa, vrućice i bakterijemije javljaju se u imunokompromitiranih ljudi (JACOMO i sur., 2002; BRUNT i sur., 2006; STÜTZER i HARTMANN, 2012; WOULDSTRA i sur., 2017; NELSON i sur., 2018).

U tipičnom obliku BMO-a na mjestu inokulacije u roku 14 dana nakon ogreba razvijaju se eritematozne papule i pustule, koje mogu trajati od par dana do nekoliko tjedana. Povećanje regionalnih limfnih čvorova javlja se između 12 – 50 dana poslije kontakta s mačkom, a može se povući spontano kroz nekoliko tjedana ili mjeseci, ili pretvoriti u gnojne apscese (JACOMO i sur., 2002; BRUNT i sur., 2006; NELSON i sur., 2018). Primijećeno je da na kliničku sliku utječe i izvor zaraze, jer kod ljudi nakon uboda krpelja nije zamijećen limfadenitis (RAOULT, 2007).

Dijagnoza u ljudi se postavlja klinički, iz anamnestičkog podatka o kontaktu s mačkom i serološkim testom IFA, s titrom IgG protutijela za vrstu *B. henselae*  $\geq 1:64$ . Uz serološke metode, razvoj tehnika molekularne biologije (PCR) poboljšao je identifikaciju tih zahtjevnih bakterija iz tkivnih biopsata, jer su bartonele iz uzoraka ljudi teško uzgojive te se uzgoj rutinski ne provodi (JACOMO i sur., 2002; BOULOUIS i sur., 2005; KLOTZ i sur., 2011).

Sustavne infekcije bartonelama su u porastu, a profesionalno izloženi ljudi poput veterinaru u većem su riziku od infekcije, zbog učestale izloženosti člankonošcima ili životinjama. OTEO i sur. (2017) dokazali su protutijela za bartonele metodom IFA u 73% zaposlenika veterinarskih klinika za kućne ljubimce u Španjolskoj. DNA *Bartonella* dokazana je u 28% veterinarskog osoblja u SAD-u, a sumnja se i na jatrogeni prijenos bartonela nakon uboda igle (BREITSCHWERDT, 2017). Nadalje, veterinari inficirani vrstama *B. koehlerae* i *B. henselae* razvili su reumatološke smetnje zglobova (MOZAYENI i sur., 2018), a vrstama *B. henselae* i *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* mijalgiju i neurološke smetnje (BREITSCHWERDT, 2017). Zabilježena je i bakterijemija asimptomatski inficiranih darivatelja krvi kod kojih su vrste *B. henselae* i *B. clarridgeiae* nakon ugriza mačke dokazane PCR-om iz obogaćene tekuće kulture krvi (VIEIRA-DAMIANI i sur., 2015). Iz ljudi s endokarditisom nakon kontakta s mačkama do sada su izdvojene *B. henselae*, *B. elizabethae*, *B. koehlerae*, *B. mayotimonensis*, a sumnja se i *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* (OKARO i sur., 2017).

### **2.13. UČESTALOST INFEKCIJE MAČKA BARTONELAMA**

Brojna serološka, kulturelna i molekularna istraživanja iz cijelog svijeta dokazala su da su mačke najčešće inficirane vrstama *B. henselae* i *B. clarridgeiae*, znatno rjeđe drugim vrstama bartonela. Vrsta *B. henselae* najčešće je kulturelno ili molekularno izdvajana iz krvi mačaka (BOULOUIS i sur., 2005; PENNISI i sur., 2013; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018), dok *B. clarridgeiae* obuhvaća 10 – 36% svih mačjih izolata (CHOMEL i sur., 2004).

U prvim istraživanjima učestalosti infekcije mačaka bartonelama uzgojem krvi na hranjivim podlogama, umnoženi izolati analizirani su PCR – RFLP analizom polimorfizma dužine restrikcijskog fragmenta (engl. restriction fragment length polymorphism analysis, RFLP) i sekvenciranjem gena 16SrRNA. Učestalost infekcije kretala se u rasponu od 1,6 % kod kućnih mačaka u Kanadi (KAMRANI i sur., 2008) do 62% kod mačaka lualica u Francuskoj (LA SCOLA i sur., 2002). Na hranjivim podlogama iz mačaka najčešće je izdvojena vrsta *B. henselae*, daleko manje *B. clarridgeiae* te sporadično *B. koehlerae*.

Najviša učestalost infekcije utvrđena uzgojem na hranjivim podlogama za vrstu *B. henselae* zabilježena je u mačaka u Kaliforniji (SAD), gdje je iznosila 39,5% (CHOMEL i sur., 1995) i 37,7% (KOEHLER i sur., 1994). Slična učestalost zabilježena je i u Francuskoj te iznosila 37,2% (HELLER i sur., 1997) i 36,1% (LA SCOLA i sur., 2002). Najviše učestalosti infekcije za vrstu *B. clarridgeiae* utvrđene uzgojem na hranjivim podlogama zabilježene su kod uličnih mačaka u Francuskoj i iznosile 26,2% (LA SCOLA i sur., 2002) i 15,9% (HELLER i sur., 1997).

U nekim istraživanjima dokazano je i da su mačke istovremeno bile inficirane i s dvije vrste bartonela, *B. henselae* i *B. clarridgeiae* (GURFIELD i sur., 2001), a neke i sa oba genotipa bakterije *B. henselae*, Houston-1 i Marseille (FABBI i sur., 2004; GUPTILL i sur., 2004; SYKES i sur., 2010).

Učestalost protutijela prema bakteriji *B. henselae* utvrđena serološkom metodom IFA uglavnom je bila gotovo dvostruko viša od bakterijemije u istim istraživanjima, neovisno o načinu života mačaka, a kretala se u Kaliforniji (SAD) od 26,2% kod mačića iz skloništa (FLEISCHMAN i sur., 2015a) do 70% kod mačaka lualica (CHOMEL i sur., 1995). GUPTILL i sur. (2004) ustanovili su i regionalne razlike u visini učestalosti bakterijemije kod kućnih mačaka u SAD-u, koja je varirala od 6% u Chicagu do 33% na

Floridi, a protutijela su dokazana kod 12% mačaka u Chicagu i 67% na Floridi. U pregledu literature ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur. (2018) uočili su da učestalost pojave protutijela često prelazi 50% u mačaka iz mediteranskih zemalja Europe (Španjolska, Francuska, Italija, Grčka). LA SCOLA i sur. (2002) dokazali su protutijela u 61% mačaka lualica u Parizu, a mačke su bile invadirane buhama, iz kojih su također dokazane bartonele.

Učestalost infekcije utvrđena molekularnim metodama kod kućnih mačaka u Kanadi bila je 3,8% (KAMRANI i sur., 2008), kod mačaka iz skloništa u Taiwanu 19,4% (TSAI i sur., 2011), kod mačaka iz veterinarskih klinika u Italiji 38,1% (PERSICHETTI i sur., 2016), a kod uličnih mačaka u Kanadi čak 57,7% (KAMRANI i sur., 2008). PCR-om u krvi mačaka najčešće je dokazivana vrsta *B. henselae*, zatim *B. clarridgeiae* te najrjeđe *B. koehlerae*.

### **2.13.1. Istraživanja učestalosti umnažanjem na hranjivim podlogama**

Istraživanja učestalosti infekcije bartonelama u različitim populacijama prirodno inficiranih mačaka utvrđene uzgojem na hranjivim podlogama provedena su u raznim državama svijeta, a samo trećina ih je iz Europe. U jednom od prvih istraživanja učestalosti infekcije bartonelama kod kućnih i mačaka iz skloništa, KOEHLER i sur. (1994) su kulturelno pretragom krvi 61 asimptomatske mačke u San Franciscu (SAD) utvrdili bakterijemiju u 41% (25/61) mačaka, većinom u mlađih. Usporedbom sekvenci gena 16SrRNA kod 23 mačke potvrđena je vrsta *B. henselae*, dok su se zbog manjih kolonija i sporijeg rasta izolati dviju mačaka razlikovali i genotipski i fenotipski, te je kasnije potvrđena *B. clarridgeiae*. Niska učestalost infekcije dokazana je u Japanu, gdje su MARUYAMA i sur. (1996) izdvojili bakteriju *B. henselae* iz 9% (3/33) pretraženih kućnih i napuštenih mačaka na HIA agaru s dodatkom 5% kuniće krvi. Sitne i hrapave kolonije pojavile su se nakon 14 dana, a potvrđene su RFLP-PCR analizom.

Visoku učestalost *Bartonella* spp. od 53% (50/94) ustanovili su HELLER i sur. (1997) pretraživanjem 200 µL krvi iz Isolator epruveta za liziranje gradskih uličnih mačaka u Francuskoj. Sekvenciranjem gena 16SrDNA iz izolata su identificirane vrste *B. henselae* i *B. clarridgeiae*. U istraživanju je vidljiva značajna uloga uličnih mačaka kao rezervoara dviju vrsta bartonela, a zanimljiva je i visoka učestalost bakterije *B. clarridgeiae* (16%). SIĞIRCI i ILGAZ, (2013) određivali su učestalost infekcije

mačaka bartonelama pretraživanjem 96 kućnih, uličnih i mačaka iz skloništa u Istanbulu. Krvi iz Isolator epruveta inokulirana je na HIA agar s 5% kuničje krvi, na način da se razlijeva po površini agara pomoću vlastite viskoznosti. Hrapave, suhe, karfiolaste, prijanjajuće kolonije porasle su na površini agara nakon šest dana inkubacije, a PCR-om koji cilja gen ITS identificirano je 27 izolata (28,1%) vrste *B. henselae*.

Nadalje, znatan je broj istraživanja koja su osim metode uzgoja uključivala i serološke pretrage (IFA), a ponekad još i molekularne (PCR), iz kojih je tada moguće usporediti učestalost infekcije utvrđenu sa tri različite dijagnostičke metode. U Kaliforniji (SAD) su CHOMEL i sur. (1995) izdvojili vrstu *B. henselae* iz krvi 39,5% (81/205) prirodno inficiranih mačaka (112 kućnih i 93 iz skloništa), a u metodom IFA utvrđeno je čak 81% mačaka serološki pozitivnih na bakteriju *B. henselae*. BERGMANS i sur. (1997) u Nizozemskoj utvrdili su *Bartonella* spp. bakterijemiju kod 22% (25/113) mačaka štíćenika skloništa, dok je serološkom metodom ELISA pozitivno bilo 50% životinja. GUPTILL i sur. (2004) pretragom krvi kućnih mačaka s četiri različite lokacije u SAD-u bakteriju *B. henselae* uzgojem su dokazali iz 65/271 (24%) uzoraka, dok je serološki pozitivno bilo 138/271 uzoraka (51%). Iz pretraženih uzoraka krvi 103 mačke iz skloništa u Taiwanu TSAI i sur. (2011) umnažanjem na ČOK agaru izdvojili su vrstu *B. henselae* iz krvi 21 mačke (20,4%), a bartonele su izolirane i PCR-om gena *gltA* iz 20 pretraženih mačaka (19,4%).

GUTIÉRREZ i sur. (2013) su istraživali učestalost infekcije bartonelama u kućnih i uličnih mačaka s 18 lokacija u Izraelu istovremenim korištenjem PCR-a u stvarnom vremenu (engl. real-time) i uzgoja na hranjivim podlogama, a vrste su potvrdili sekvenciranjem gena *rpoB* i 16S rRNA. Ukupna učestalost je iznosila 25,1% (84/334). Bakterijemija je dokazana u 9% (30/334) mačaka, a DNA bartonela u 23,7% (79/334). U obje skupine su dokazali vrste *B. henselae*, *B. claridgeiae* i *B. koehlerae* s time da je *B. henselae* bila podjednako zastupljena u obje skupine mačaka, a potonje dvije su bile znatno učestalije u uličnih. U sedam mačaka (2,1%) su otkrivene istovremene infekcije s dvije ili više vrsta. Također su zaključili da je real-time PCR znatno osjetljiviji od uzgoja na hranjivim podlogama.

U istraživanju učestalosti infekcije 351 mačke iz skloništa u San Franciscu (SAD) FLEISCHMAN i sur. (2015a) proveli su uzgoj, serologiju i PCR, a učestalost



*Bartonella* spp. utvrđena uzgojem iznosila je 32,8% (115/351). Izolati su potvrđeni RFLP/PCR analizom gena citrat sintaza (*glTA*), a dokazana je *B. henselae* u 95 mačaka i *B. clarridgeiae* u 20. Seropozitivno metodom IFA bilo je 26,2% (92/351) mačaka. Bartonelle su izdvojene i PCR-om izravno iz krvi 106/351 (30,2%) mačaka. Iz 105 krvi je potvrđena *B. henselae*, a iz jednog uzorka je dokazana i *B. koehlerae*.

### **2.13.2. Čimbenici rizika za infekciju mačaka bartonelama**

U epizootiološkim istraživanjima osim utvrđivanja prevalencije ponekad se istražuju i parametri čija prisutnost bi mogla imati utjecaj na nastanak infekcije ili stvaranje protutijela za bakterije roda *Bartonella* sp. u mačaka. Obradom prikupljenih podataka utvrđuje se statistička značajnost njihove povezanosti s dokazom uzročnika nekom od dijagnostičkih metoda u mačaka, s ciljem određivanja čimbenika rizika za nastanak infekcije bartonelama.

Čimbenike rizika za infekciju mačaka bakterijom *B. henselae* među prvima su istraživali u SAD-u CHOMEL i sur. (1995) navodeći mlađu dob, život na ulici i invadiranost buhama kao čimbenike rizika za bakterijemiju mačaka. BERGMANS i sur. (1997) u Nizozemskoj također su s bakterijemijom mačaka povezali prisutnost buha i dob mačaka do godinu dana. GURFIELD i sur. (2001) u Francuskoj su s bakterijemijom mačaka povezali trajanje vlasništva kraće od šest mjeseci, udomljavanje lualica ili mačaka iz skloništa i prisutnost više od jedne mačke u kućanstvu. Iste su čimbenike rizika utvrdili i za serološku pozitivnost, izuzev poveznice s trajanjem udomljavanja. GUPTILL i sur. (2004) u SAD-u su utvrdili značajnu povezanost dokaza bakterije *B. henselae* uzgojem s invadiranošću buhama i dobi mlađom od 13 mjeseci (osobito s mlađima od šest mjeseci). Sa dokazom protutijela povezali su invadiranost buhama, udomljavanje napuštenih mačaka, mogućnost lova i toplija klimatska područja (Florida i Kalifornija). S dokazom DNA bartonela povezali su toplije područje i izlaske van kuće.

SIĞIRCI i ILGAZ (2013) u Turskoj utvrdili su dob mačaka do godinu dana i invadiranost buhama kao čimbenike rizika statistički značajno povezane s infekcijom mačaka bartonelama. FLEISCHMAN i sur. (2015a) u San Franciscu (SAD) povezali su bakterijemiju uzrokovanu bakterijom *B. henselae* s dobi mačića do pet mjeseci, dok je starija dob (od pet do 12 mjeseci) povezana sa dokazom protutijela. Utvrdili su i da je bakterijemija bila značajno češća u jesen i zimi, a rjeđa u proljeće i ljeto. BUCHMANN

i sur. (2010) i SATO i sur. (2017) utvrdili su povezanost infekcije bartonelama s infekcijom virusom mačje leukemije (engl. feline leukemia virus, FeLV), dok ta povezanost nije utvrđena kod mačaka serološki pozitivnih na bartonele iz Srbije (POTKONJAK i sur., 2014). SRISANYONG i sur. (2016) na Tajlandu utvrdili su statistički značajno nižu učestalost infekcije u mačaka tretiranih protiv ektoparazita i onih koje žive kao jedine životinje u kućanstvu. PERSICHETTI i sur. (2018) u Italiji utvrdili su PCR-om statistički značajnu razliku u učestalost infekcije između mačaka koje žive vanjskim stilom života i nisu preventivno tretirane anti-ektoparaziticima i kućnih, tretiranih mačaka. RAIMUNDO i sur. (2019) u Brazilu utvrdili su da statistički značajno veće izgleda za infekciju imaju mačke koje nisu kastrirane, koje su češće izložene tučnjavama te istovremeno invadirane buhama.

MAZUREK i sur. (2020) u Poljskoj kao čimbenike rizika za infekciju mačaka bakterijom *B. henselae* utvrdili su vanjski način života, križanu pasminu, podkarpatsko područje (najtoplije i najvlažnije od pretraženih) i nedostatak profilakse protiv ektoparazita (buha i krpelja). ZHANG i sur. (2021) u Kini utvrdili su multivarijantnom logističkom regresijom da su dobne kategorije  $\leq 12$  mjeseci i od jedne do deset godina, za razliku od mačaka starijih od deset godina, značajno povezane s infekcijom mačaka bakterijom *B. henselae*. Nadalje, kao čimbenike rizika značajno povezane s infekcijom naveli su i mačke koje su nekada bile lualice te nedostatak tretiranja protiv ektoparazita.

#### **2.14. GENSKA TIPIZACIJA BAKTERIJE *B. henselae***

Za tipizaciju izolata vrste *B. henselae* i drugih vrsta *Bartonella* koriste se različiti pristupi. U počecima istraživanjima genotipizacije bartonela najprije je korišteno jedan ili dva genska lokusa, poput poput *gltA* i 16SrRNA (KOSOY i sur., 2012). Potom su postepeno uvedeni i drugi ciljni geni dobre filogenetske razlučivosti, kao na primjer ITS i *groEL*, koji su uz prethodna dva u početku najčešće korišteni za filogenetsku analizu bartonela, jer su bili sekvencirani za većinu vrsta bartonela (HOUPIKIAN i RAOULT, 2001). Od navedenih, citrat sintaza (*gltA*) najšire je korišten, najprikladniji i najpopularniji ciljni gen za identifikaciju i razlikovanje vrsta i genotipova bartonela, te

za filogenetska istraživanja. Osim toga, ima i najveću i najčešće ažuriranu bazu podataka GenBank za deponiranje *gltA* sekvenci. Za razliku od njega, gen 16SrRNA je visoko konzerviran i ne pruža uvid u heterogenost izolata (KOSOY i sur., 2018).

Nakon toga se broj korištenih genskih lokusa u istraživanjima stalno povećavao. Danas postoje razni ciljni geni dobre filogenetske razlučivosti i validirani parovi početnica za točnu genotipizaciju bartonela (GUTIERREZ i sur., 2017). Danas se za genotipizaciju *Bartonella* preporuča korištenje više genskih lokusa dobre razlikovne moći (*gltA*, *ITS*, *rpoB*, *ftsZ*, *ribC*, *groEL*, *nuoG*, *ssrA*, *gyrB*), s ciljem identifikacije, razlikovanja vrsta i izvođenja filogenetske analize. Iako se prvotno gen ITS koristio i za filogenetske analize, smatra se prikladnijim za identifikaciju vrsta i razlikovanje izolata bartonela (KOSOY i sur., 2012; 2018).

Na sličan način kao kod PCR-a, u genotipizaciji se ciljaju genske sekvence. Starije molekularne tehnike dokazivanja vrsta, kao što su sekvenciranje gena 16S rRNA i DNA - DNA hibridizacija, s vremenom su pokazale određene nedostatke (KOSOY i sur., 2018). Prve molekularne tehnike genotipizacije koje nisu bile temeljene na sekvenciranju, npr. gel – elektroforeza u pulsirajućem polju (engl. pulse field gel electrophoresis, PFGE) i PCR polimorfizam dužine restrikcijskog fragmenta (engl. restriction fragment length polymorphism, PCR - RFLP) sve više zamjenjuju novije molekularne metode genotipizacije.

Od metoda genotipizacije temeljenih na sekvenciranju najčešće se primjenjuje tipizacija temeljena na određivanju sljedova nukleotida više genskih lokusa (engl. multilocus sequence typing, MLST), koja je omogućila razlikovanje brojnih izolata *Bartonella* i identifikaciju novih vrsta (FOURNIER i sur., 2014) i u novije vrijeme nadvladala ostale tehnike tipizacije. Kod MLST-a razlike u alelima genskih lokusa više domaćinskih (engl. housekeeping) gena prikazuju se sekvenciranjem, a sekvence se pohranjuju u centralnoj internetskoj bazi podataka PubMLST (COOPER i FEIL, 2004; JOLLEY i sur., 2018).

Cjelokupnu važnost suvremene dijagnostike bartonela u jednom poglavlju preglednog rada o genotipizaciji bakterija roda *Bartonella* saželi su KOSOY i sur. (2018), koji navode da uzgojem dobivena kultura daje vrijedne podatke o brzini rasta,

morfologiji bakterija, istovremenoj prisutnosti više vrsta bartonela te o biokemijskom profilu, a kod genotipova izdvojenih uzgojem olakšano je izvođenje raznih genskih analiza (MLST ili sekvenciranje cijelog genoma) koje razjašnjavaju evolucijsku povijest. Iako je uzgoj bartonela dugotrajan, često kompliciran kontaminacijom te ne otkriva rast svih vrsta na standardnim krvnim agarima, a MLST je moćna tehnika čak i za neuzgojene izolate bakterija, uzgoj je presudan za identifikaciju, potpunu karakterizaciju i opis novih vrsta ili genotipova bartonela.

#### **2.14.1. 16S rRNA genotipovi bakterije *B. henselae***

Analizom sekvenci gena 16S rRNA među izolatima bakterije *B. henselae* dokazana su dva različita tipa sekvenci, na temelju kojih su identificirana dva glavna genotipa, genotip I (Houston-1) i genotip II (Marseille) (LA SCOLA i sur., 2002). Ta podjela postala je široko prihvaćena i dugo je smatrana najznačajnijom genotipskom podjelom unutar vrste (IREDELL i sur., 2003). 16SrRNA genotipovima bakterije *B. henselae* su pripisani jedan od dva alela gena 16SrRNA, aleli 1 ili 2, koje su kasnije IREDELL i sur. (2003) uključili u MLST- shemu za bakteriju *B. henselae* (VIEZENS i ARVAND, 2008).

Učestalost tih genotipova u populaciji mačaka razlikuje se ovisno o zemljopisnom području, a javljaju se i regionalne razlike unutar iste države (BRUNT i sur., 2006). Genotip II (Marseille) dominira u mačaka u Europi, Australiji i na zapadu SAD-a, a genotip I (Houston-1) prevladava u mačaka na istoku SAD-a i u Aziji (CHOMEL i sur., 2006; GIL i sur., 2013). Nadalje, u mačaka su utvrđene i istovremene infekcije s oba genotipa, u SAD-u kod tri (6,1%) mačke (GUPTILL i sur., 2004), a u Italiji je čak 18,3% (24/131) mačaka bilo istovremeno inficirano s oba genotipa (FABBI i sur., 2004). U prvoj izolaciji bakterije *B. henselae* iz 36 mačaka na afričkom kontinentu, 14 (38,9%) mačaka u Alžiru imalo je genotip I, 10 (27,8%) mačaka genotip II, a šest (16,7%) mačaka bilo je inficirano s oba genotipa (AZZAG i sur., 2012).

#### **2.14.2. MLST genotipovi bakterije *B. henselae***

MLST pristup u proučavanju populacijske strukture bakterije *B. henselae* na devet različitih gena prvi su primijenili IREDELL i sur. (2003), na uzorcima 37 arhivskih izolata (17 ljudskih i 20 mačjih) od kojih su 33 bila iz iz Australije, a ostali iz

Europe, SAD-a i Novog Zelanda. Izbor genskih lokusa po ovoj shemi uključuje genske odsječke koji kodiraju dobro karakterizirane „housekeeping“ funkcije (16S rDNA, *eno*, *ftsZ*, *gltA*, *groEL*, *ribC* i *rpoB*), zajedno s genima koji kodiraju proteine (*batR*, *nlpD*). Za svaki lokus alelima je dodijeljen broj, a za svaki izolat kombinacija alela svih pretraženih genskih lokusa (alelni profil) definirala je sekvencijski tip (ST) izolata. Kasnije su ARVAND i sur. (2007) procjenjivali prikladnost sekvence genskog lokusa *eno* pri čemu nisu našli raznolikost alela te su zaključili da ta regija nije prikladna za MLST shemu bakterije *B. henselae*, tj. da se može izostaviti iz navedene sheme, što je prihvaćeno u naknadnim istraživanjima uvođenjem sekvenciranja osam genskih lokusa .

Do početka izrade ovog doktorskog rada MLST metodom identificirana su 32 različita sekvencijska tipa (ST) bakterije *B. henselae*, od kojih su svi dokazani u mačaka, a samo osam u ljudi (GIL i sur., 2013). Danas je dokazano 37 različitih tipova sekvenci, upisanih u internetsku PubMLST (<https://pubmlst.org/organisms/bartonella-henselae>) bazu podataka za bakteriju *B. henselae* (FURQUIM i sur., 2021). U cijelom svijetu u mačaka je do sada dokazano 34 različitih tipova sekvenci (sve osim ST34, ST35 i ST36), a u ljudi samo 11 (ST1 do ST8, ST34, ST35 i ST36) (JOLLEY i sur., 2018).

MLST pristupom dokazana je velika genska raznolikost mačjih izolata bakterije *B. henselae*, što ponekad rezultira s desetak različitih sekvencijskih tipova u pojedinim istraživanjima. Za razliku od mačjih, izolati iz ljudi uglavnom su homogeniji i razvrstani u četiri do šest različitih ST-ova (LINDROOS i sur., 2006; ARVAND i sur., 2007; MIETZE i sur., 2011; CHALONER i sur., 2011; GIL i sur., 2013).

Filogenetskom analizom strukture populacije bakterije *B. henselae* određuje se odnos između ST-ova i utvrđuje pripadnost klonalnom kompleksu najčešće pomoću eBURST (<http://burst.mlst.net>) programa (IREDELL i sur., 2003; CHALONER i sur., 2011), rjeđe drugim metodama poravnavanja sekvenci i grupiranja genotipova u klastere (YANAGIHARA i sur., 2010; GIL i sur., 2013).

Klonalni kompleks sadrži ST-ove koji imaju sedam od ukupno osam zajedničkih alela, a utemeljitelj (engl. primary founder) je ST s najčešćom pojavom unutar klonalnog kompleksa. Svi do sada poznati ST-ovi svrstani su prema porijeklu vrste *B.*

*henselae* u tri skupine, odnosno u tri klonalna kompleksa (engl. clonal complex, CC) označena 1, 2 i 3 (IREDELL i sur., 2003; ARVAND i sur., 2007; MIETZE i sur., 2011; YUAN i sur., 2011; CHALONER i sur., 2011).

### **2.14.3. MLST istraživanja bakterije *B. henselae***

Iz 37 uzoraka mačjih i ljudskih izolata IREDELL i sur. (2003) utvrdili su sedam različitih sekvencijskih tipova (ST) kojima su dodijeljeni brojevi prema redu pojavljivanja, od ST1 do ST7. Mačji izolati *B. henselae* genski su bili raznolikiji od ljudskih, jer među 20 mačjih izolata dokazano šest različitih genotipova (svi osim ST2), dok su kod 17 ljudskih izolata dokazana četiri različita ST-a (ST1, ST2, ST5, ST6). Genotip ST1 bio je najčešće izoliran genotip dokazan 16 puta od čega 12 puta u ljudi. Mačji izolati bili su jednoličnije raspoređeni, a najučestaliji je bio ST6 (8/19 izolata). Prema zemljopisnoj proširenosti, među izolatima iz Australije i Novog Zelanda otkriveni su ST1, ST5 i ST6, u Oceaniji, SAD-u i Francuskoj ST1 i ST6, a ST7 u Njemačkoj. Sedam sekvencijskih tipova vrste *B. henselae* svrstano je u tri klonalna kompleksa, ST1 do ST5 u CC1 (utemeljitelj ST1), ST6 u CC2, a ST7 u CC3.

LINDROOS i sur. (2006) analizirali su 27 mačjih i 11 ljudskih izolata bakterije *B. henselae* porijeklom iz SAD-a, Europe, Azije i Afrike i dokazali šest tipova sekvenci. Najčešći izolat sa sedam ljudskih i 16 mačjih je bio ST1 (60,5%), a dokazani su i ST5 (21%) te ST2, ST4, ST6 i ST7. Mačji izolati su bili raznolikiji, dok su ljudski podijeljeni na samo tri ST-a (ST1, ST5 i ST8).

ARVAND i sur. (2007) analizirali su 182 arhivska izolata bakterije *B. henselae* (158 mačjih i 24 ljudska) iz Europe, Sjeverne Amerike i Australije. Otkrili su 14 različitih ST-ova, od toga šest novih porijeklom iz mačaka dokazanih po prvi put, svrstanih od ST9 do ST14. Najviše izolata pripalo je genotipu ST7 (43) i svi su bili mačji pa se pretpostavlja da je ST7 možda manje virulentan za ljude. Nadalje, od 38 izolata ST5 (20,8%) čak 33 su bila mačja, a samo pet ljudskih. Ljudski izolati (24) svrstani su u samo četiri različita ST-a, ST1, ST5, ST6 i ST2. Genotipovi ST1, ST5 i ST6 nađeni su na sva tri kontinenta, dok je ST7 otkriven samo u Europi. Novi genotipovi ST9 do ST14 su svi porijeklom iz Europe, osim ST12 iz Izraela.

YANAGIHARA i sur. (2010) u Japanu su analizirali 55 izolata bakterije *B. henselae* pretraživanjem 24 kliničkih uzoraka pacijenata oboljelih od BMO-a i 31 izolata iz domaćih mačaka. Identificirana su tri različita tipa sekvenci, a čak 52/55 izolata (94,5%) pripalo je genotipu ST-1 (svih 24 ljudskih i 28/31 mačjih). Preostali mačji izolati bili su ST6 u dva slučaja, a potpuno novi ST15 filogenetski je srodan zoonotskom genotipu ST1, koji prevladava u Japanu.

MIETZE i sur. (2011) genski su tipizirali neukleotidne sekvence 39 mačjih izolata bakterije *B. henselae* iz više gradova u Njemačkoj. Čak 14 izolata imalo je potpuno novu kombinaciju alela što je rezultiralo s 11 novih sekvencijskih tipova označenih ST16 do ST26. Ostalih 25/39 izolata svrstano je u sekvencijske tipove ST1, ST5, ST7, ST8 i ST14. Otkriće čak 11 novih sekvencijskih tipova među malim brojem izolata potvrđuje veliku gensku raznolikost mačjih izolata bakterije *B. henselae*, dok su ljudski izolati i ovdje svrstani u samo četiri različita ST-a. Novi ST-ovi smješteni su u tri postojeća klonalna kompleksa i proširili su CC1 s primarnim osnivačem ST5 s deset na 16 ST-ova (16, 17, 18, 20, 23 i 24), a osnivačima podgrupa postali su ST1 i ST8. U CC2 pridruženi su i ST22 i ST26, a primarni osnivač je postao ST6. ST7 (jedini član CC3) postao je vodeći, a pridruženi su mu još i ST19, ST21 i ST25.

Učestalost i populacijsku strukturu bakterije *B. henselae* kod 361 mačke u Kini MLST-om su istraživali YUAN i sur. (2011) i dokazali 26 izolata. Sedamnaest izolata (65,4%) pripadalo je genotipu ST1, a ostali genotipovima ST16, ST 17 i ST18. Do ovog istraživanja u svijetu je pomoću MLST-a identificirano ukupno 26 različitih ST-ova mačjih izolata *B. henselae*, a MIETZE i sur. (2011) netom prije toga otkrili su tipove ST16 do ST26. Međutim, podaci o sekvencama za te ST-ove nisu bili deponirani u neku od javno dostupnih baza podataka te su kineski autori pripisali svoje izolate novim ST-ovima ST16 do ST18, prema redu otkrivanja. Svi novoidentificirani ST-ovi svrstani su u CC1, a ST1 je imenovan utemeljiteljem kompleksa, dok je ST5 posljedično postao utemeljiteljem podgrupe.

Gensku raznolikost izolata bakterije *B. henselae* u Velikoj Britaniji ustanovili su i CHALONER i sur. (2011), istraživanjem populacijske strukture 118 izolata bakterije *B. henselae* (98 mačjih i 20 ljudskih) iz 1782 uzorka mačje krvi. Dokazali su 12 različitih

sekvencijskih tipova, među kojima su otkrivena i tri nova (ST27, ST28 i ST29) te otprije poznati ST1, ST2, ST4, ST5, ST6, ST7, ST8, ST11 i ST23. U mačjoj populaciji dominirala su četiri ST-a (ST4, ST6, ST7 i ST8), a najčešći je bio ST6 (41%), koji ipak nije izoliran iz ljudi. Genotipovi ST4, ST6 i ST7 sačinjavali su 74% svih mačjih izolata. Iz ljudi oboljelih od BMO-a su najčešće izolirani ST8 (8/20), a potom ST2 (6/20) i ST5 u (3/20), koji zajedno čine većinu (85%) zoonotskih izolata. Utvrđena je statistički značajna razlika u povezanosti genotipova ST2, ST5 i ST8 sa zoonotskim porijeklom te ST6 sa mačjim. Filogenetskom analizom tri nova ST-a nisu pokazali osobitu srodnost jedan drugom te su svrstani u različite klonalne komplekse (ST27 u CC2, ST28 u CC1, a ST29 u CC3).

ZHAO i sur. (2011) istraživanjem 80 izolata bakterije *B. henselae* MLST pristupom u Kini otkrili su tri različita sekvencijska tipa. Genotipu ST1 pripalo je 90% izolata (72/80), sedam izolata bilo je ST9 (8,75%), a jedan izolat je bio potpuno novi (ST30). Svi izolati iz ovog istraživanja su pripadnici CC1, što ukazuje na malu raznolikost mačjih izolata *B. henselae* u Kini.

GIL i sur. (2013) u Španjolskoj također su otkrili veliku gensku raznolikost vrste *B. henselae* iz 46 kliničkih uzoraka oboljelih ljudi, 39 izolata iz krvi mačaka te tri izolata dobivenih PCR-om iz mačjih buha (*C. felis*). MLST analiza rezultirala je s ukupno deset različitih sekvencijskih tipova, uključujući dva nova još neopisana ST31 i ST32, nakon otkrivanja dva nova alela. Iz mačjih izolata najčešće su dokazani ST5, ST6 i ST9 te ST2, ST7 i ST8. Iz ljudskih izolata dobiveni su najčešće ST5, ST8 i ST1 te ST2 i ST3. Prevladavajući sekvencijski tip bio je ST5, s učestalošću od 54,3% u ljudi (25/46) i 61,5% u mačaka (24/39), a utvrđeni je i iz izolata tri buhe sakupljene s dvije ulične mačke. Među ljudskim izolatima bili su uglavnom uzorci pacijenata oboljelih od BMO, iz kojih su utvrđeni ST6, ST4 i ST5, a ST1 se statistički značajno povezuje s atipičnom kliničkom slikom za BMO (endokarditis, vrućica nepoznatog uzroka i pelioza jetre).

Genotipovi ST34 i ST35 izdvojeni su iz ljudi oboljelih od BMO-a u Španjolskoj, dok je ST36 izoliran iz čovjeka s endokarditisom. Upisani su u PubMLST internetsku bazu podataka za bakteriju *B. henselae* (JOLLEY i sur., 2018). U prvom istraživanju s MLST pristupom mačjih izolata bakterije *B. henselae* u Brazilu otkrivena su dva različita alelna profila, ST9 i ST37. Dok je genotip ST9 izdvojen iz mačaka s područja



države São Paulo, potpuno novi genotip ST37 dokazan je isključivo u mačaka uzorkovanih na području države Minas Gerais, što ukazuje na klonalnu evoluciju bartonela na određenim zemljopisnim područjima (FURQUIM i sur., 2021).

### 3. OBRAZLOŽENJE TEME

Pripadnici roda *Bartonella* su Gram-negativne kokobacilarne bakterije iz  $\alpha$ -2 podskupine *Proteobacteria*. Danas je poznato više od četrdeset vrsta, od kojih se gotovo polovica povezuje s infekcijama ljudi. Najznačajnija vrsta u Hrvatskoj je *Bartonella henselae*, koja se prenosi s mačaka na ljude i glavni je uzročnik bolesti mačjeg ogreba. Metode uzgoja na hranjivim podlogama se razlikuju, no istodobno uzgoj predstavlja „zlatni standard” dijagnostike te je neophodan za daljnju gensku tipizaciju uzročnika.

Poznato je da je bolest mačjeg ogreba često serološki i klinički dokazana u oboljelih ljudi u Republici Hrvatskoj, no učestalost uzročnika bakterije *B. henselae* u mačaka koje su rezervoari do sada nije istražena. Hipoteza ovog istraživanja jest da je uzročnik zasigurno prisutan u mačaka, da metode dokazivanja bartonela imaju različitu osjetljivost, a same metode uzgoja na hranjivim podlogama nisu standardizirane. Nadalje, učestalost infekcije mačaka također ovisi o različitim epizootiološkim čimbenicima, kao što su prisutnost buha, starost životinja, način držanja i drugo. Bakterija *B. henselae* nije genski jedinstven uzročnik i danas se dijeli na sekvencijske tipove (37) različite proširenosti i zoonotskog potencijala. Stoga je za pretpostaviti da genske razlike postoje i u mačaka u Republici Hrvatskoj.

Osnovni cilj ovog istraživanja je izdvojiti bakterije roda *Bartonella* spp. iz krvi mačaka na sedam različitih hranjivih podloga te analizom nukleotidnih sljedova više gena tipizirati uzgojene izolate.

Specifični ciljevi su:

1. izabrati najprimjereniju metodu uzgoja bakterija *Bartonella* spp. te standardizirati postupak uzgoja, u svrhu određivanja optimalnog protokola za dokaz uzročnika u dijagnostičke svrhe.
2. analizom sekvenci više gena te njihove usporedbe s poznatim sekvencama dostupnima u bazama gena cilj je odrediti njihove genotipove (sekvencijske tipove, ST).
3. utvrditi učestalost infekcija mačaka vrstama roda *Bartonella* spp. te njihovu povezanost s epizootiološkim podacima prikupljenim prilikom vađenja krvi.
4. utvrditi potencijalnu gensku raznolikost vrsta iz roda *Bartonella* te proširenost njihovih genotipova i/ili sekvencijskih tipova na području Republike Hrvatske.

5. na osnovi rezultata dvaju dijagnostičkih postupaka cilj je usporediti osjetljivost metoda lančane reakcije polimerazom i uzgoja na hranjivim podlogama.
6. iz bakterija izdvojenih na hranjivim podlogama cilj je izraditi zbirku pohranjenih izolata bakterije *B. henselae* i drugih vrsta *Bartonella* spp., prvu takve vrste u Hrvatskoj.

Zbog sveopćeg manjka istraživanja izdvajanja bartonela izravno iz krvi prirodno inficiranih mačaka koja uključuju i usporedbu hranjivih podloga u primoizolaciji, istraživanje će upotpuniti prazninu i doprinijeti novim saznanjima iz područja laboratorijske dijagnostike bartonela u mačaka.

Nadalje, dobiveni rezultati će znatno pridonijeti poznavanju učestalosti i proširenosti infekcije mačaka, kao i poznavanju genoma samog uzročnika, pošto slična istraživanja ne postoje u jugoistočnoj Europi.

Konačno, uključivanjem Hrvatske među regije svijeta gdje su mačke potvrđene kao rezervoari vrsta roda *Bartonella* spp., pridonijeti će se poznavanju javnozdravstvenog značaja, epizootologije i epidemiologije uzročnika u cijelom svijetu.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. UZGOJ BARTONELA NA HRANJIVIM PODLOGAMA

#### 4.1.1. Podrijetlo i priprema referentnih sojeva

Bakterijski sojevi dviju različitih vrsta bartonela iz američke zbirke standardnih referentnih mikroorganizama „ATCC<sup>®</sup>“ (engl. American type culture collection), *Bartonella henselae* ATCC<sup>®</sup> 49882<sup>TM</sup> i *Bartonella clarridgeiae* ATCC<sup>®</sup> 700095<sup>TM</sup>, korišteni su za provjeru sposobnosti rasta na hranjivim podlogama.

Soj *Bartonella henselae* ATCC<sup>®</sup> 49882<sup>TM</sup> izdvojen je u Houstonu (Texas, SAD) iz krvi muškarca inficiranog virusom HIV-a za kojeg je na temelju anamnestičkih podataka utvrđen bliski kontakt s mačkama bez evidentiranih ogreba ili ugriza, ali s potvrđenim ugrizima buha (REGNERY i sur., 1992a; BRENNER i sur., 1993). Soj *B. clarridgeiae* (ATCC 700095) izdvojen je u Sjevernoj Karolini (SAD) iz krvi udomljenog mačića u vlasništvu veterinaru oboljelog od bolesti mačjeg ogreba (KORDICK i sur., 1997).

Za vjerodostojnost samog istraživanja navedenim sojevima prvo je istražena učinkovitost naših laboratorijskih uvjeta i proizvedenih hranjivih podloga, kako bi se metoda mogla dalje koristiti za naciepljivanje uzoraka krvi mačaka. Željelo se ispitati mogućnost primjene hranjivih podloga preporučenih od ATCC-a, kao i podloga već provjerenih u drugim istraživanjima te još nekoliko do sada neistraženih, jer su se neki dodaci pokazali prikladnima za uzgoj drugih zahtjevnih vrsta bakterija.

Uspješnost uzgoja navedenih sojeva istražena je s ciljem odabira najprimjerenije metode uzgoja na različitim hranjivim podlogama za istraživanje, ali i za dokaz uzročnika u dijagnostičke svrhe. Osim raspoznavanja tipičnih kolonija za bartonele, uvođenjem metode uzgoja na već poznatim referentnim sojevima dobiven je i uvid u pouzdanost naših molekularnih metoda u identifikaciji izolata *Bartonella* spp.

Pripreme za umnažanje referentnih sojeva *B. henselae* (ATCC 49882) i *B. clarridgeiae* (ATCC 700095) izvedene su u mikrobiološkoj komori LFVP12 (Iskra PIO, Šentjernej, Slovenija), a radna površina prethodno je dezinficirana otopinom Ecocida<sup>®</sup>S (Krka, Novo Mesto, Slovenija). Liofilizirane kulture bakterija *B. henselae* i *B.*

*clarridgeiae* dostavljene su u staklenim ampulama, a živa kultura *B. clarridgeiae* (ATCC 700095) u epruveti s bifazičnim medijem. Ambalaža je otvarana pored plinskog plamenika, a proizvodima je rukovano prema priloženim uputama proizvođača (ATCC), u skladu s laboratorijskim procedurama o razini biosigurnosti 2 (engl. biosafety level 2, BSL 2).

Bartonele rastu polako, a najbolje rastu na 35° ili 37°C u uvjetima povišene vlage (85 – 95%) s povećanom koncentracijom CO<sub>2</sub> (5-10%) (DOUGHERTY i sur., 1996; DOERN, 2000; LA SCOLA i RAOULT, 1999). Takvi mikroaerofilni (za rast je potrebna samo mala količina kisika) i kapnofilni (rast se potiče u atmosferi povišene koncentracije CO<sub>2</sub>) uvjeti najčešće se postižu upotrebom CO<sub>2</sub> inkubatora (MINNICK i ANDERSON, 2015). Prema uputama proizvođača (Thermo Scientific, Waltham, SAD), atmosfera s povišenom vlagom u inkubatoru postiže se smještanjem otvorenih posudica s vodom na dno inkubatora, što ograničava isparavanje vode iz čvrstih hranjivih podloga. Pasivnim isparavanjem se ujedno smanjuje koncentracija kisika na nižu od atmosferske (20 - 21%) te često padne čak do 14%. Povećanjem koncentracije CO<sub>2</sub> značajno iznad atmosferske (0,03-0,06%), stvaraju se uvjeti slični mikroaerofilnima, pogodnima za rast *Bartonella* spp.

Priprema inkubatora Midi 40 CO<sub>2</sub> Incubator, (Thermo Scientific, Waltham, SAD) izvedena je u skladu s propisanim laboratorijskim postupcima čišćenja i dezinfekcije, otopinom za prevenciju kontaminacije inkubatora i mikrobioloških kabineta Incubator-Clean™ (AppliChem, Darmstadt, Njemačka).

#### **4.1.2. Hranjive podloge za umnažanje referentnih sojeva**

Za oživljavanje bakterija iz liofilizata i umnažanje žive bakterijske kulture te za daljnja precjepljivanja umnoženih ATCC sojeva korištene su čvrste hranjive podloge (agari), tekuće hranjive podloge (bujoni) i bifazični mediji koji se sastoje od čvrste hranjive podloge stvrđnute u kosom položaju u epruveti ili bočici na koju je naslojena tekuća hranjiva podloga.

Hranjive podloge za umnažanje liofilizata i tekuće žive kulture referentnih sojeva *B. henselae* (ATCC 49882) i *B. clarridgeiae* (ATCC 700095) izrađene su u Laboratoriju za pripremu hranjivih podloga i sterilizaciju Hrvatskog veterinarskog

instituta u Zagrebu iz komercijalnih dehidriranih baza prema uputama proizvođača. Sve hranjive podloge su svježe izrađene, što je od primarne važnosti, te upotrebljavane tek nakon provjere sterilnosti inkubiranjem na 37°C kroz 72 sata. Neposredno prije same upotrebe zagrijane su na sobnu temperaturu.

#### **4.1.2.1. Hranjive podloge za početno izdvajanje referentnih sojeva**

Za početno izdvajanje bartonela iz dostavljenih ATCC sojeva korištene su sljedeće hranjive podloge preporučene od proizvođača ATCC sojeva:

Tripton – soja agar (engl. Tryptic soy agar, TSA) s dodatkom 5% defibrinirane ovčje krvi ili 5% defibrinirane kuničje krvi, čvrsta hranjiva podloga koja sadrži peptone kazeina i soje, izrađena iz komercijalne dehidrirane baze (Merck, Darmstadt, Njemačka).

Tripton – soja bujon (engl. Tryptic soy broth, TSB), tekuća hranjiva podloga koja sadrži peptone kazeina i soje, izrađena iz komercijalne dehidrirane baze (Merck, Darmstadt, Njemačka). Koristi se za otapanje liofilizata, za izradu bifazičnih medija i za pohranu umnoženih izolata.

Bifazični medij (TSA+TSB) koji se sastoji od čvrste hranjive podloge TSA stvrdnute u kosom položaju u epruveti ili bočici na koju je naslojena tekuća hranjiva podloga TSB.

Agar infuzije mozga i srca (engl. Brain heart (infusion) agar, BH) s dodatkom 5% defibrinirane kuničje krvi, čvrsta hranjiva podloga koja sadrži ekstrakate moždanog i srčanog tkiva i peptone kazeina i mesa, preporučena za uzgoj zahtjevnijih vrsta bakterija, izrađena iz komercijalne dehidrirane baze (Merck, Darmstadt, Njemačka).

Navedene hranjive podloge do sada su korištene i u drugim istraživanjima za preliminarno ispitivanje rasta ATCC soja bakterije *B. henselae* (DIDDI i sur., 2013) ili za izdvajanje bartonela iz krvi mačaka, poput TSA (KOEHLER i sur., 1994; KORDICK i sur., 1995) i BH (CELEBI i sur., 2009; AZZAG i sur., 2012).

#### **4.1.2.2. Hranjive podloge za precjepljivanje referentnih sojeva**

Za provjeru uspješnosti umnažanja uvedene su i dodatne čvrste hranjive podloge već korištene u dosadašnjim istraživanjima:

Columbia agar (COL) s dodatkom 5% defibrinirane ovčje krvi (engl. Columbia agar base), je čvrsta neselektivna hranjiva podloga izrazito obogaćena peptonima kazeina i mesa te ekstraktom kvasca i škrobom kukuruza, a dodatak ovčje krvi daje joj izvrsna uzgojna svojstva. Za izradu je korištena komercijalna dehidrirana baza (Merck, Darmstadt, Njemačka).

Čokoladni agar (ČOK) je neselektivna čvrsta hranjiva podloga za uzgoj zahtjevnih bakterija, izrađena iz komercijalne dehidrirane baze Columbia agar base (Merck, Darmstadt, Njemačka) s dodatkom 10% defibrinirane ovčje krvi i 5% konjskog seruma. Tijekom pripreme na temperaturi od 80°C u krvi su lizirani eritrociti, nakon čega on poprima boju čokolade. Može se koristiti i obogaćen vitaminsko – aminokiselinskim dodatkom Vitox (Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija).

GC čokoladni agar je čvrsti agar za uzgoj zahtjevnijih bakterija, sastavljen od mješavine peptona biljnih i životinjskih tkiva i kukuruznog škroba, izrađen iz komercijalne dehidrirane baze GC agar base (Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija). Sadrži 5% defibrinirane konjske krvi, otopinu hemoglobina (HBG) izrađenu iz komercijalnog praha Soluble haemoglobin powder (Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija) koja mu osigurava željezo iz hemina neophodno za rast bartonela te Vitox (V) (Oxoid, Basingstoke, Velika Britanija) koji mu osigurava bogatstvo vitamina i aminokiselina.

COL agar do sada je korišten za izdvajanje bartonela iz krvi prirodno inficiranih mačaka u istraživanjima koje su proveli BERGMANS i sur. (1997), LA SCOLA i sur. (2002), ROLAIN i sur. (2004), PONS i sur. (2005) i drugi. Na ČOK agaru bartonele su uspješno izdvojili GUPTILL i sur. (2004), YANAGIHARA i sur. (2010), TSAI i sur. (2011) i drugi. Za izdvajanje bartonela rijetko je korišten i GC čokoladni agar (MINNICK i ANDERSON, 2015).

Za provjeru uspješnosti umnažanja bartonela korištene su i hranjive podloge uvedene po prvi puta u ovom istraživanju:

Krvni agar (KA) je neselektivna čvrsta hranjiva podloga s dodatkom 5% defibrinirane ovčje krvi, obogaćena peptonima i ekstraktom jetre i kvasca. Izrađena je iz

dehidrirane baze (engl. Blood agar base No2) komercijalnog proizvođača (Merck, Darmstadt, Njemačka).

EKA (eskulin – krvni agar) je krvni agar (KA) s dodatkom otopine eskulina, glikozida kojeg hidroliziraju neke vrste bakterija poput streptokoka, uzrokujući zacrnjenje agara. Ukoliko bakterije ne hidroliziraju eskulin, boja agara ostaje nepromijenjena.

CEMO agar je čvrsta hranjiva podloga sastavljena od peptona kazeina i soje, a koristi se za uzgoj zahtjevnijih vrsta bakterija. Služi za izradu čokoladnog agara iz komercijalne dehidrirane baze (engl. C.E.M.O. agar) komercijalnog proizvođača (Mast Group, Bootle, Velika Britanija), zagrijavanjem podloge na 80°C nakon dodavanja 7% defibrinirane konjske krvi.

Bifazični medij (BH+BB) koji se sastoji od čvrste hranjive podloge BH stvrdnute u kosom položaju u epruveti ili bočici na koju je naslojena tekuća hranjiva podloga Bujon za brucele (engl. Brucella broth, BB). BB se koristi za uzgoj brucela i drugih zahtjevnih mikroorganizama, sastavljen je od peptona iz kazeina i životinjskih tkiva. Izrađen je iz komercijalne dehidrirane baze (BD BBL, Sparks, SAD). Koristi se za izradu bifazičnih medija i pohranu umnoženih izolata.

Defibrinirana ovčja krv (DOK), defibrinirana kuničja krv (DKK), defibrinirana konjska krv (DKoK) i lizirana konjska krv (LKO) aseptički su dobivene iz klinički zdravih životinja i nabavljene od komercijalnih dobavljača.

#### **4.1.3. Umnažanje referentnog soja *Bartonella henselae* ATCC® 49882™**

Rukovanje liofiliziranim sojem, uvjeti uzgoja, korištene hranjive podloge i postupanje s izolatom izvedeni su prema uputama proizvođača (ATCC).

Nakon otvaranja zaštitne ampule, cijeli sadržaj bočice s liofiliziranim sojem *B. henselae* (ATCC 49882) rehidriran je s 0,5 mL TSB-a korištenjem Pasteurove pipete te potom dobro promiješan, čime je dobivena bakterijska suspenzija.

Volumen od 0,4 mL bakterijske suspenzije naslojen je na kosinu TSA agara pripremljenog u staklenoj epruveti, čime je dobiven bifazični medij TSA+TSB naciepljen sojem *B. henselae* (ATCC 49882). Preostalih 0,1 mL suspenzije razmazano je ezom na jednu ploču TSA agara.



Nacijepljena epruveta s bifazičnim medijem (TSA+TSB) s labavo pričvršćenim čepom i ploča TSA agara inkubirane su na temperaturi od 37°C i s koncentracijom CO<sub>2</sub> od 5%. Istovremeno je kao negativna kontrola inkubirana i jedna nenacijepljena ploča TSA agara.

Hranjive podloge su prvi puta pregledavane nakon sedam dana. Prema napomeni proizvođača, unutar 5 - 10 dana od početka inkubiranja očekivan je rast *B. henselae* - tipičnih bakterijskih kolonija na površini TSA agara te na spoju kosine agara i bujona, kao i na dnu tekuće faze bifazičnog TSA+TSB medija.

Osmi dan inkubiranja strugotine dobro poraslih i čvrsto prianjajućih kolonija s kose površine agara i s ploče agara TSA precijepljene su na nove hranjive podloge sa ciljem daljnjeg umnažanja izolata. Kolonije s ploče TSA ezom su raspršene u 1 mL TSB-a, a potom je po 100 µL suspenzije nacijepljeno na 10 novih ploča TSA. Kolonije s površine agara bifazičnog medija TSA+TSB ezom su razmazane na pet novih kosih epruveta bifazičnog medija TSA+TSB.

Ostatak „originalnog“ bujona bifazičnog medija s umnoženim bakterijskim sojem razdijeljen je u ependorfice po 100 µL i pohranjen zamrzavanjem na -80°C, u Bujon za brucele s dodatkom 10% glicerola.

Nakon osam dana inkubiranja porasle kolonije s kosih površina bifazičnog TSA+TSB medija ezom su precijepljene na pet ploča TSA+DKK agara. Istovremeno je s jedne ploče TSA agara s gustim porastom bakterija dodatkom 1 mL TSB-a izrađena bakterijska suspenzija, koja je u količini od 200 µL naslojena na kosine dva bifazična medija TSA+TSB, a ezom od 10 µL u duplikatu na agare s kunićjom (TSA, BH), ovčjom (TSA, COL, ČOK, EKA) i konjskom krvi (CEMO).

Nakon osam dana inkubiranja datkom 1 mL TSB-a na podloge s gustim porastom (EKA i TSA+DKK) napravljene bakterijske suspenzije su ezom od 10 µL na isti način precijepljene na BH i ČOK agar. Kolonije porasle na tim agarima nakon osam dana precijepljene su na devet hranjivih podloga različitog sastava navedenih u Tablici 2. i isprobane za provjeru rasta bakterije *B. henselae* po prvi puta za potrebe ovog istraživanja.

Nacijepeljene hranjive podloge pregledavane su svakih sedam dana, a inkubirane su najmanje četiri tjedna od dana nacjepeljivanja. Bilježena je brzina i kvaliteta porasta kolonija na površinama agara, a ukoliko nije bilo vidljivog rasta, podloge su proglašene „negativnima“ i odbačene. Umnoženi izolati soja *B. henselae* (ATCC 49882) pohranjeni su u Bujon za brucele s koncentracijom glicerola od 10%, zamrzavanjem na temperaturi od -80°C, prema preporuci ATCC-a.

**Tablica 2.** Hranjive podloge za provjeru rasta umnoženog bakterijskog soja *Bartonella henselae* ATCC® 49882™

<b>Naziv hranjive podloge (HP)*</b>	<b>Sastav HP (komercijalna baza (engl.) i dodaci)</b>	<b>Kratica HP**</b>
Krvni agar s 5% kunićje krvi	Blood agar base No2, defibrinirana kunićja krvi	KA+DKK
Agar infuzije mozga i srca s 5% kunićje krvi	Brain heart agar, defibrinirana kunićja krv, amphotericin B 10 mg/L (aB)	BH+DKK+aB
CEMO čokoladni agar sa 7% konjske krvi	C.E.M.O. agar, defibrinirana konjska krv	CEMO+DKoK
Trypton - soja agar s 5% konjske krvi	Tryptic soy agar, defibrinirana konjska krv	TSA+DKoK
GC agar sa 7% konjske krvi i dodatkom Vitox-a	GC agar base, Vitox, defibrinirana konjska krv	GC+DKoK+V
Columbia agar sa 7% lizirane konjske krvi	Columbia agar base, lizirana konjska krv	COL+LKoK
GC čokoladni agar	GC agar base, Hemoglobin powder (HGB), Vitox (V)	GC+ HGB+V
Bifazični medij (TSA s 5 % kunićje krvi i BB)	Tryptic soy agar, Brucella broth, defibrinirana kunićja krv	TSA+BB
Bifazični medij (BH s 5% kunićje krvi i BB)	Brain heart agar, Brucella broth, defibrinirana kunićja krv	BH+BB

\*Hranjive podloge navedenog sastava su prvi puta korištene za rast bartonela za potrebe ovog istraživanja

\*\* Značenje kratica naziva hranjivih podloga i dodataka navedeno je u prethodnim poglavljima

#### **4.1.4. Umnažanje referentnog soja bakterije *Bartonella clarridgeiae* (ATCC<sup>®</sup> 700095<sup>™</sup>)**

Za umnažanje referentnog soja bakterije *Bartonella clarridgeiae* (ATCC<sup>®</sup> 700095<sup>™</sup>) karakteristično je da nije izdvojen iz dostavljenih liofilizata, već je uspješno umnožen samo iz žive kulture soja dostavljenog na bifazičnom mediju TSA+TSB.

##### **4.1.4.1. Umnažanje liofilizata**

Unatoč strogom rukovanju liofiliziranim sojem *Bartonella clarridgeiae* ATCC<sup>®</sup> 700095<sup>™</sup> prema uputama proizvođača (ATCC), umnažanje nije uspjelo niti u dva odvojena pokušaja. Postupak je izveden na sličan način kao prilikom umnažanja soja *B. henselae* (ATCC 49882), s manjim razlikama i preinakama prema preporukama mikrobiologa. Zbog neuspjelog prvog izdvajanja nakon rehidracije liofilizata cijela količina od 0,5 mL bakterijske suspenzije u TSB-u aseptički je naslojena na kosinu TSA agara bifazičnog medija TSA+TSB, a posljednjih nekoliko kapi iz ampule ezom je inokulirano na jednu ploču TSA agara. Hranjive podloge inkubirane su u istim uvjetima kao i soj *B. henselae* (ATCC 49882), koji je paralelno inkubiran naciepljivanjem na TSA agar kao pozitivna kontrola.

Hranjive podloge su prvi puta pregledavane nakon sedam i deset dana, a potom nakon tri tjedna inkubiranja. Prema napomeni proizvođača očekivan je rast *Bartonella* – tipičnih bakterijskih kolonija 7 -10 dana od početka inkubiranja na spoju agara i bujona bifazičnog medija (TSA+TSB), bez nužno vidljivog zamućenja bujona bifazičnog medija.

##### **4.1.4.2. Umnažanje žive kulture**

Sa 100 µL tekuće faze iz epruvete s živom kulturom *B. clarridgeiae* (ATCC 700095) naciepljene su dvije ploče TSA agara, jedna epruveta bifazičnog medija (TSA+TSB), a zbog zahtjevnosti rasta dodatno i ploče BH i ČOK agara. Izolati porasli iz žive kulture precijepljeni su na nove četiri čvrste hranjive podloge, s ciljem praćenja rasta i umnažanja izolata u čistoj kulturi. Hranjive podloge korištene za umnažanje i provjeru rasta bakterijskog soja *B. clarridgeiae* (ATCC<sup>®</sup> 700095<sup>™</sup>) opisane su u prethodnim poglavljima i navedene u Tablici 3.

Sve hranjive podloge su inkubirane na isti način i u istim uvjetima kao i prethodno, a prvi puta su pregledavane nakon sedam dana. Umnoženi izolati bakterije *B. clarridgeiae* (ATCC 700095) pohranjeni su u Bujon za brucele s dodatkom 10% glicerola zamrzavanjem na temperaturi od -80°C (PONS i sur., 2005).

**Tablica 3.** Hranjive podloge za umnažanje i provjeru rasta bakterijskog soja *Bartonella clarridgeiae* (ATCC® 700095™)

<b>Hranjive podloge (naziv i kratica)</b>
<b>Nacjepljivanje suspenzije liofilizata i žive kulture</b>
Tripton - soja agar s 5% defibrinirane ovčje krvi, TSA
Tripton - soja agar / bujon s 5% defibrinirane ovčje krvi, TSA+TSB (bifazični)
Agar infuzije mozga i srca s 5% defibrinirane kuničje krvi, BH
Čokoladni Columbia agar s 10% defibrinirane ovčje krvi, ČOK
<b>Precjepljivanje</b>
Čokoladni Columbia agar s 10% defibrinirane ovčje krvi, ČOK
Čokoladni Columbia agar s dodatkom Vitox-a i 10% defibrinirane ovčje krvi, ČOK+V
Tripton - soja agar s 5% defibrinirane ovčje krvi, TSA
Columbia agar s 5% defibrinirane ovčje krvi, COL
Eskulin - krvni agar s 5% defibrinirane ovčje krvi, EKA

#### **4.1.5. Uzgoj *Bartonella* spp. iz krvi mačaka**

##### **4.1.5.1. Uzorci**

Istraživanje je provedeno u razdoblju od 2014. do 2017. godine u laboratorijima Odjela za bakteriologiju i parazitologiju Hrvatskog veterinarskog instituta, Zagreb. Sveukupno je pretraženo 279 mačaka, od čega je 189 uzoraka pune krvi sakupljeno od živih mačaka i 90 uzoraka krvi iz srca uginulih mačaka. Uzorci krvi prikupljeni su isključivo za potrebe ovog istraživanja nasumičnim odabirom veterinara, neovisno o zdravstvenom stanju ili razlogu zaprimanja mačaka. Na mjesta uzorkovanja poslani su pribor za uzorkovanje te pismeni naputci o načinu uzimanja, pohrane i dostave uzoraka

krvi na Hrvatski veterinarski institut. Uz svaki uzorak ispunjen je i dostavljen anketni upitnik (Slika 5. u Prilogu). Radi jednostavnijeg uzorkovanja i postizanja aseptičnih uvjeta, preporučano je uzimanje krvi mačkama u općoj anesteziji, za vrijeme kastracije ili drugih lakših operativnih zahvata.

Uzorci živih mačaka potjecali su od redovitih pacijenata, posjetitelja veterinarskih ambulanti, od čega su 156 bili uzorci mačaka s vlasnicima, a 33 uzorci mačaka bez vlasnika (uličnih ili zbrinutih od udruga). Četrdeset od 189 mačaka zaprimljeno je na liječenje zbog različitih kliničkih tegoba, dok su razlozi posjeta ostalih mačaka uglavnom bili cijepljenja, ili manji kirurški zahvati poput kastracija, amputacija repa i slično. Prikupljeni su u 20 veterinarskih ambulanti, na području grada Zagreba te iz još deset županija s različitih područja Republike Hrvatske (13 lokacija). Najveći broj uzoraka prikupljen je u gradu Zagrebu (57), 40 uzoraka bilo je iz Zagrebačke županije, dok su iz ostalih dijelova Hrvatske prikupljena ukupno 92 uzorka (Tablica 4.).

Uzorci 90 krvi iz srca uginulih mačaka su prikupljeni u istom razdoblju u Zagrebu, od toga 87 uzoraka u sekcionim dvoranama Veterinarskog fakulteta i tri uzorka iz Laboratorija za patologiju Hrvatskog veterinarskog instituta.

Uzorci krvi živih mačaka pretraženi su uzgojem na hranjivim podlogama i lančanom reakcijom polimerazom (PCR), dok su uzorci uginulih mačaka pretraženi samo uzgojem. S ciljem dobivanja što većeg broja uzgojenih izolata, iz kojih je moguća detaljnija molekularna analiza, zbog malih volumena krvi iz srca uginulih mačaka dali smo prednost uzgoju na hranjivim podlogama u odnosu na PCR.

**Tablica 4.** Raspodjela prikupljenih uzoraka krvi živih mačaka po godinama, veterinarskim ambulantom i lokacijama na području Republike Hrvatske

<b>Ukupan</b>				
<b>broj uzorka</b>	<b>Vetrinarska ambulanta</b>	<b>Lokacija</b>	<b>Broj uzoraka po godinama</b>	
10	Veterina Branimir	Zagreb	8	2014.
	„	„	2	2015.
8	Veterinarska ambulanta Vetvision (Hop)*	„	8	2015.

1	Veterinarska ambulanta Buba	„	1	2015.
3	Veterinarska ambulanta Goldi	„	3	2015.
9	Veterinarska ambulanta Ljubimac	„	3	2015.
	„	„	6	2016.
6	Veterinarska ambulanta Šegota	„	6	2016.
8	Veterinarska ambulanta Fabela	„	8	2016.
12	Veterinarska ambulanta Dodo-vet	„	12	2016.
17	Veterinarska stanica Velika Gorica	Velika Gorica	9	2014.
	„	„	8	2016.
23	Veterinarska stanica Jastrebarsko	Jastrebarsko	22	2016.
	„	„	1	2018.
12	Veterinarska stanica Osijek	Osijek	12	2016.
11	Veterinarska ambulanta Anubis Klub	Vukovar	8	2016.
	„	Vinkovci	2	2016.
	„	Osijek	1	2016.
3	Veterinarska stanica Zabok	Zabok	3	2017.
11	Veterinarska ambulanta Pilić	Split	11	2017.
9	Veterinarska ambulanta Pula	Pula	9	2017.
10	Veterinarska ambulanta Kućni ljubimci	Rijeka	10	2017.
10	Veterinarska stanica Bjelovar	Bjelovar	10	2017.
9	Veterinarska ambulanta Bobanović	Dubrovnik	9	2017.
6	Veterinarska ambulanta Cestica	Varaždin	6	2017.
11	Veterinarska ambulanta Hajster	Pula	11	2017.

**189**

**20 vet. ambulanti**

**13 lokacija**

\*promjena naziva veterinarske ambulante tijekom istraživanja

#### 4.1.5.2. Uzorkovanje

Venepunkcija je provedena uz strogo pridržavanje aseptičnih uvjeta sterilnom iglom i brizgalicom, ili zatvorenim pedijatrijskim vakuumskim sistemom za uzimanje krvi, iz površinskih vena prednje noge ili vrata (lat. vena cephalica antebrachii, vena jugularis). Volumen krvi u dostavljenim uzorcima kretao se od 0,5 mL do 3 mL. Uzorci pune krvi uzimani su u vakuum epruvete Vacuette s dikalijevom soli i etilendiamintetraoctenom kiselinom (K2-EDTA) (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austrija), jer se ta metoda zajedno sa smrzavanjem krvi nakon prikupljanja pokazala vrlo osjetljivom u izdvajanju bartonela iz krvi mačaka. Naime, smrzavanjem i odmrzavanjem eritrocita u uzorcima pune krvi izaziva se liza eritrocita, s ciljem oslobađanja bakterija iz eritrocita, zbog čega se lakše umnažaju (BRENNER i sur., 1997; AGAN i DOLAN, 2002). Istu metodu uzorkovanja za izdvajanje bartonela u

svojim istraživanjima koristili su i ROLAIN i sur. (2004), CHALONER i sur. (2011), FLEISCHMAN i sur. (2015a) i drugi. Iz navedenih razloga su uzorci krvi odmah nakon prikupljanja do transporta i daljnje obrade pohranjeni zamrzavanjem u ledenicama na mjestu uzorkovanja, a zamrzavanjem su zaštićeni i od kontaminacije.

Nakon zaprimanja uzoraka na Hrvatski veterinarski institut, isti su pohranjeni do trenutka obrade na  $-20^{\circ}\text{C}$ , ako su pristigli svježi ili smrznuti. Uzorci koji su pristigli transportirani prekonocnom poštanskom pošiljkom na temperaturi od  $+2$  do  $+8^{\circ}\text{C}$  obrađeni su na dan dostave, te nisu ponovno zamrzavani.

Krvi iz srca uginulih mačaka također su prikupljane u Vacuette K2-EDTA vakuum epruvete, prebacivanjem sadržaja unutrašnjosti srca sterilnim priborom na aseptički način, te pohranjene na  $-20^{\circ}\text{C}$  do trenutka obrade. Uzorci krvi iz srca uginulih mačaka dostavljeni su u količini od svega nekoliko kapi (oko  $25\ \mu\text{L}$ ) pa do najviše  $1,5\ \text{mL}$ , a po konzistenciji su bili formirani ugrušci, ili kombinacija ugrušaka i seruma.

#### **4.1.5.3. Hranjive podloge**

Za naciepljivanje uzoraka krvi mačaka korištene su hranjive podloge na kojima je prethodno provjerena sposobnost umnažanja ATCC sojeva dviju različitih vrsta bartonela izdvojenih iz mačaka, *B. henselae* i *B. clarridgeiae*. Od sveukupno sedam hranjivih podloga pet ih je bilo čvrste konzistencije (agari) i dva bifazična medija koji sadrže tekuću hranjivu podlogu (bujon) naslojen na kosi agar (Tablica 5.). Detaljniji podaci o hranjivim podlogama opisani su u prethodnom poglavlju o ATCC sojevima.

Sve hranjive podloge za naciepljivanje uzoraka izrađene su u Laboratoriju za pripremu hranjivih podloga i sterilizaciju Hrvatskog veterinarskog instituta. Korištene su isključivo svježe pripremljene, stare najviše sedam dana. Svaka izrađena serija podloga prekontrolirana je na sterilnost, inkubiranjem kroz 72 sata na temperaturi od  $37^{\circ}\text{C}$ . Podloge su izrađene iz dehidriranih baza prema uputama proizvođača Merck (Darmstadt, Njemačka) i BD BBL (Sparks, SAD).

**Tablica 5.** Hranjive podloge za primarno izdvajanje i precjepljivanje bartonela iz uzoraka krvi mačaka

<b>Hranjive podloge (naziv, kratica i komercijalni naziv)</b>
<b>Čvrste hranjive podloge</b>
Tripton - soja agar s 5% defibrinirane ovčje krvi, TSA (engl. Tryptic soy agar)
Agar infuzije mozga i srca s 5% defibrinirane kuničje krvi, BH (engl. Brain heart agar)
Columbia agar s 5% defibrinirane ovčje krvi, COL (engl. Columbia agar base)
Čokoladni agar s 10% defibrinirane ovčje krvi (ČOK) (engl. Chocolate agar)
Eskulin - krvni agar s 5 % defibrinirane ovčje krvi, EKA (engl. Blood agar base No2)
<b>Bifazični mediji</b>
Tripton - soja agar/bujon, TSA+TSB (engl. Tryptic soy agar/broth)
Agar infuzije mozga i srca i Brucella bujon, BH+BB (engl. Brain heart agar, Brucella broth)

Broj naciepljenih podloga po uzorku ovisio je o dostavljenom volumenu krvi. Uzorci krvi živih mačaka naciepljeni su na najmanje dvije vrste hranjivih podloga, kako bi se povećala uspješnost izdvajanja, usporedila uspješnost uzgoja na različitim hranjivim podlogama te smanjila mogućnost gubitka izolata zbog kontaminacije.

Za izravno naciepljivanje odmrznutih krvi u primoizolaciji prvenstveno su korištene čvrste hranjive podloge, dok su bifazični mediji korišteni znatno rjeđe. Jedan od razloga bila je činjenica da izdvajanje bartonela na čvrstim hranjivim podlogama predstavlja prvi izbor metode uzgoja (FABBI i sur., 2004; GUTIÉRREZ i sur., 2017), a drugi ograničavajući volumen dostavljenog uzorka krvi.

Bifazični mediji korišteni su isključivo kod uzoraka većeg volumena u kojima je ostalo dovoljno krvi nakon što je dostatna količina iskorištena za naciepljivanje više vrsta čvrstih hranjivih podloga i lančanu reakciju polimerazom. Bifazični mediji pogodni su za izravnu identifikaciju DNA uzročnika iz tekuće faze lančanom reakcijom polimerazom, umnažanje uzoraka s malim brojem uzročnika predobogaćenjem te za istraživanje teže uzgojivih vrsta bartonela.



Slika 3. prikazuje čvrste i bifazične hranjive podloge korištene u ovom istraživanju. Čvrste hranjive podloge su u Petrijevim zdjelicama, a bifazične u McCartneyevim bočicama.



**Slika 3.** Hranjive podloge s dodatkom krvi za izdvajanje bakterija roda *Bartonella* spp. Čvrste hranjive podloge su u Petrijevim zdjelicama, a bifazične u McCartneyevim bočicama (Izvor: Maja Stepanić).

#### **4.1.5.4. Nacjepljivanje krvi mačaka na hranjive podloge (primoizolacija)**

Uzorci su prije nacjepljivanja morali biti odmrznuti, a podloge zagrijane na sobnu temperaturu. Uzorci krvi volumena od 150 – 250  $\mu$ L nacijepljeni su u aseptičnim uvjetima na površinu agara. Uzorci dostavljeni u malom volumenu (0,5 mL) nacijepljeni su na dva različita agara, a uzorci većeg volumena na više vrsta. Po 200  $\mu$ L krvi iz svakog uzoraka odvojeno je za dokaz DNA bartonela PCR analizom izravno iz uzoraka krvi.

Odleženi uzorci krvi prije nacjepljivanja na hranjive podloge dobro su promiješani vrhom pipete, ili lagano vorteksirani nekoliko sekundi. Nakon nacjepljivanja krvi sterilnom Pasteurovom pipetom, Petrijeve zdjelice su poklopljene i

lagano rotirane pod kutem od 45°, kako bi se krv slijala niz agara. Na taj način omogućena je ravnomjerna raspodjela uzorka po površini hranjive podloge, jer mehaničko razmazivanje ezom smanjuje uspješnost rasta (BRENNER i sur., 1997; AGAN i DOLAN, 2002). Poklopljene Petrijeve zdjelice ostavljene su oko 15 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega su pohranjene u termostat.

Prilikom naciepljivanja uzorka u McCartneyeve bočice s bifazičnim medijem, volumen od 250 µL naslojen je na kosu površinu čvrste hranjive podloge u bočici u kojoj se nalazilo i 2,5 mL bujona. Tekuća faza u epruveti zatim je lagano promiješana, a naciepljene podloge su inkubirane pod kutem od 5° do 10° s lagano pričvršćenim čepom.

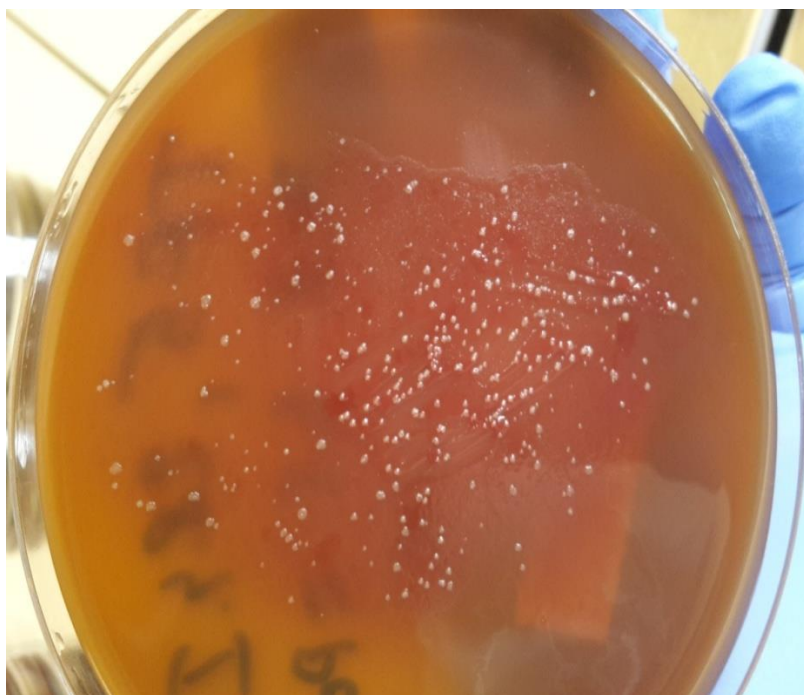
#### **4.1.5.5. Inkubacija čvrstih hranjivih podloga**

Prije naciepljivanja krvi mikrobiološki kabinet i inkubator pripremljeni su na način kako je opisano u poglavlju o referentnim ATCC sojevima. Naciepljene hranjive podloge inkubirane su na temperaturi od 37 °C, u CO<sub>2</sub> inkubatoru MIDI 40 Thermo Scientific, (Waltham, Massachusetts, SAD), u atmosferi povišene vlage i s koncentracijom CO<sub>2</sub> od 8 % (MAURIN i sur., 1997; DOERN, 2000). Petrijeve zdjelice su u početku položene u inkubator s hranjivom podlogom na donjoj strani i poklopcem na gornjoj strani. Nakon jedan do tri dana ploče su okrenute na drugu stranu, kako bi se spriječila kontaminacija plijesnima najčešće nastala uslijed kondenzacije vlage na površini poklopca (MAURIN i sur., 1997; DOERN, 2000). Prilikom svakog pregleda naciepljenih agara provjeravana je razina vode u posudi na dnu inkubatora. Podloge su pregledavane dva do tri puta tjedno, radi praćenja brzine i intenziteta porasta bakterijskih kolonija na površini podloge.

Pregledom podloga tražene su kolonije tipičnog izgleda za bakterije roda *Bartonella* spp. (male, okrugle, konveksne, pigmentirano bijele, hrapave, suhe, tvrde, teško lomljive i čvrsto utisnute uz podlogu) (MAURIN i sur., 1997; BOULOUIS i sur., 2005). Svaki porast kolonija morfološki nalik na bartonele precijepljen je radi umnažanja na nove ploče iste hranjive podloge, a u slučaju gustog porasta i na druge vrste, s ciljem pohrane u čistoj kulturi i molekularne identifikacije izolata (BAI i sur., 2015).

U slučaju slabijeg porasta kolonija bez kontaminacije, pojedinačne kolonije precijepljivane su na nove podloge, radi umnažanja i molekularne potvrde izolata. U slučaju gustog porasta kolonija u čistoj kulturi već u primoizolaciji, nekoliko pojedinačnih kolonija odvojenih ezom je odmah uzeto za PCR, dok su ostale istovremeno precijepljene na nove ploče agara, radi daljnjeg umnažanja (Slika 4.).

Prema kvaliteti se intenzitet porasta izolata bartonela može podijeliti na šest supnjeva, pri čemu se nedostatak porasta označava s (-), porast nekoliko kolonija na površini agara sa ( $\pm$ ), porast kolonija na manje od četvrtine površine agara u Petrijevoj zdjelici (ploče) sa (+), porast kolonija na pola površine agara sa (++) , porast kolonija na dvije trećine površine agara sa (+++) i prekrivanje kolonijama cijele površine agara sa (++++) (TSUNEOKA i sur., 2004).



**Slika 4.** Gust porast bakterije *B. henselae* na površini agara u standardnoj Petrijevoj zdjelici Ø 90 mm (Izvor: Maja Stepanić).

Kolonije iz primoizolacije, porasle izravno nacjepljivanjem uzoraka mačje krvi, precijepljivane su na nove ploče pomoću eze zapremine 1  $\mu$ L. Zbog tvrdoće i suhoće

kolonija bartonela čvrsto uraslih u podlogu u primoizolaciji, pažljivo su odvajane ezom od površine podloge. Ukoliko je došlo do kontaminacije hranjive podloge kod koje je utvrđen porast bakterijskih kolonija morfologijom tipičnom za bartonele, kulture su precijepljivane nekoliko puta, s ciljem dobivanja dostatnog porasta bakterija u čistoj kulturi, za molekularnu tipizaciju i pohranu izolata. Hranjive podloge kod kojih je utvrđen visoki stupanj kontaminacije plijesnima ili drugim bakterijskim vrstama prilikom redovnih pregleda odmah su uklonjene iz inkubatora i zbrinute kao mikrobiološki otpad laboratorija. Podloge bez vidljivog porasta bakterija inkubirane su kroz najmanje četiri tjedna, prije nego su proglašene „negativnima“.

#### **4.1.5.6. Inkubacija bifazičnih medija**

Zajedno s naciijepljenim pločama čvrstih hranjivih podloga pregledavane su naciijepljene površine agara i bujoni bifazičnih medija. U slučaju gustog porasta kolonija na kosoj površini agara, kolonije su odmah sastrugane za molekularnu pretragu te paralelno precijepljene na nove ploče agara radi daljnjeg umnažanja. U slučaju pojave samo nekoliko pojedinačnih kolonija, kolonije su najprije precijepljene na nove ploče agara u svrhu umnažanja, a potom pretražene PCR-om. U slučaju kontaminacije drugim bakterijama ili plijesnima, kolonije su najprije precijepljene na nove hranjive podloge, a nakon porasta u čistoj kulturi pokupljene su za molekularnu identifikaciju i pohranu izolata.

Epruvete s bifazičnim medijem bez vidljivog porasta na kosoj površini agara prilikom pregledavanja svakih nekoliko dana lagano su promiješane i dalje inkubirane pod kutem na isti način. Kontaminirane podloge uklonjene su iz inkubatora, a podloge bez vidljivog porasta na kosini agara inkubirane su do isteka četiri tjedna, kada su proglašene negativnima.

Ukoliko nije utvrđen porast kolonija na površini agara, jednom tjedno je 250  $\mu$ L tekućeg dijela bifazičnog medija precijepljivano na nove ploče s čvrstom hranjivom podlogom, s ciljem otkrivanja kolonija tipičnih za bartonele. Pasteurovom pipetom sadržaj je prebačen na površinu agara te ravnomjerno raspoređen rotiranjem ploče pod kutem, bez korištenja eze. Podloge su inkubirane u istim uvjetima i pregledavane dva do tri puta tjedno kroz četiri tjedna. Prije odbacivanja bifazičnih medija molekularno je pretraženo i 100  $\mu$ L tekuće faze iz svake naciijepljene bočice. Bifazični mediji su proglašeni negativnima ukoliko na površinama agara nije bilo porasta kolonija niti

nakon četiri tjedna inkubiranja, a rezultat molekularne pretrage tekuće faze je bio negativan.

#### **4.1.5.7. Određivanje broja kolonija**

U svrhu određivanja koncentracije vijabilnih bakterijskih stanica u početnom uzorku brojane su porasle kolonije bartonela. Ukupni broj bakterijskih stanica izražava se u broju kolonija bakterija u mililitru krvi (engl. colony forming units, CFU).

Brojanje vijabilnih bakterijskih stanica (engl. viable plate counting) u Petrijevoj zdjelici s čvrstom hranjivom podlogom (ploči agara) tradicionalna je metoda koja predstavlja zlatni standard određivanja broja bakterija (BRUGGER i sur., 2012). Vrlo je osjetljiva metoda mjerenja porasta bakterijskih kolonija brojanjem golim okom.

Ploče s većim brojem kolonija brojane su s posebnom pažnjom uz pomoć lupe, a radi osiguranja točnosti pobrojane kolonije su označavane markerom. Uz navedeno, korištena je i inačica manualnog bojanja na ekranu pomoću fotografija visoke rezolucije, 3000 do 4000 pixela (BRUGGER i sur., 2012).

Najprije su izbrojane kolonije u naciepljenim volumenima od 150 do 250  $\mu\text{L}$ , a potom preračunavane na broj u mililitru krvi, jer se uzorci kod naciepljivanja krvi nisu razrjeđivali. Vorteksiranjem ili miješanjem uzoraka prije naciepljivanja na čvrste hranjive podloge omogućena je jednolika raspodjela u uzorku te sprječavanje pregustog rasta i preklapanja kolonija.

Ploče s većim brojem kolonija nisu razdjeljivanje na sektore jer kolonije nisu rasle na cijeloj površini agara jednolično, već samo na mjestu naciepljene krvi (BRUGGER i sur., 2012). Iz dobivenih podataka je izračunata koncentracija uzročnika u početnom volumenu krvi. Naknadna razrjeđenja uzoraka nisu rađena jer je sva krv utrošena na primoizolaciju i PCR.

Zbog karakteristične morfologije i načina rasta kolonija bartonela na površini agara, bilo je moguće izbrojati i ploče sa preko 300 CFU/mL. Iz dobivenog CFU-a utvrđen je stupanj bakterijemije inficiranih mačaka te su podijeljene na tri kategorije, nisko, srednje i visoko bakterijemične (do 100, 100 do 1000, i iznad 1000 CFU/mL).

#### **4.1.5.8. Pohrana izolata**

Nakon postizanja dobrog porasta bakterijskih kolonija dobivenog nakon jednog ili dva precjepljivanja s originalne ploče, izolati *Bartonella* spp. potvrđeni lančanom reakcijom polimerazom su pohranjeni u čistoj kulturi zamrzavanjem na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  na jedan od dva načina, u bujone s dodatkom glicerola ili u komercijalni sistem „Cryoinstant“ (Deltalab, Barcelona, Španjolska) za pohranu bakterijskih kultura. Na isti su način pohranjeni izolati referentnih sojeva (*B. henselae* ATCC 49882 i *B. clarridgeiae* ATCC 700095).

Za pohranu izolata korišteni su Bujon za brucele (BB) s dodatkom 10% glicerola (v/v) (PONS i sur., 2005; BAI i sur., 2015) i Tripton - soja bujon (TSB) s dodatkom 15 ili 20% glicerola (GUPTILL i sur., 2004), jer prema preporuci ATCC-a koncentracija glicerola od 10 – 20 % osigurava dugotrajnu zaštitu mikroorganizama pohranom pri niskim temperaturama. Plastične kriotube „Cryoinstant“ sadrže 25 keramičkih šupljih kuglica u 2 mL bujona, čime proizvođač garantira preživljavanje 25 identičnih kultura originalnog mikroorganizma kroz više godina.

Iz molekularno tipiziranih izolata pohranjenih u čistoj kulturi izrađena je laboratorijska zbirka uzgojenih izolata bakterije *B. henselae*. Izolati su označeni datumom pohrane, jedinstvenom oznakom izolata i brojem pasaža umnoženih bakterijskih kolonija (II ili III). Zbirka će se održavati precjepljivanjem te ponovnom pohranom umnoženih izolata svakih pet godina.

#### **4.1.6. Anketni upitnik**

Uz svaki uzorak mačje krvi u veterinarskoj ambulanti vlasnici i veterinari ispunili su popratni Upitnik, koji uz osnovne podatke o vlasniku, datumu i području uzimanja krvi, imenu životinje, pasmini, spolu, dobi i kastraciji, sadrži pitanja o anamnestičkim i epizootiološkim podacima, eventualnoj kliničkoj slici bolesti i liječenju u trenutku uzorkovanja te radnoj dijagnozi, u slučaju ako je životinja zaprimljena zbog zdravstvenih problema. Prikupljeni su epizootički podaci o cijepjenju, podrijetlu i eventualnom transportu mačkaka, načinu života i području na kojem obitavaju, životu s drugim mačkama i ostalim životinjama u kućanstvu i eventualnom kontaktu s divljači.

Osim toga u Upitniku su prikupljeni podaci o prisutnosti ektoparazita (buha i krpelja) i eventualnoj zaštiti od istih, podacima o dijagnostici dviju najvažnijih

retrovirusnih zaraznih bolesti mačaka (infekcije virusom zarazne leukemije i virusom mačje imunodeficijencije), eventualnoj transfuziji krvi, uočavanju prisustva crijevnih parazita te kožnih promjena uzrokovanih dermatofitima.

Upitnik je sadržavao i pitanja o zdravstvenom stanju ukućana (prisutnost imunodeficijencija, kroničnih, malignih i autoimunih oboljenja ili transplantacija i eventualnoj prisutnosti kliničkih znakova ili dijagnosticiranoj bolesti mačjeg ogreba) te poznavanju BMO-a u ljudi.

Uzorci su uzimani isključivo uz pristanak vlasnika koji su bili upoznati sa svrhom uzimanja krvi. S Upitnikom i protokolom vađenja krvi u okviru disertacije suglasno je bilo Povjerenstvo za etiku Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu donošenjem Odluke o etičkoj prihvatljivosti istraživanja.

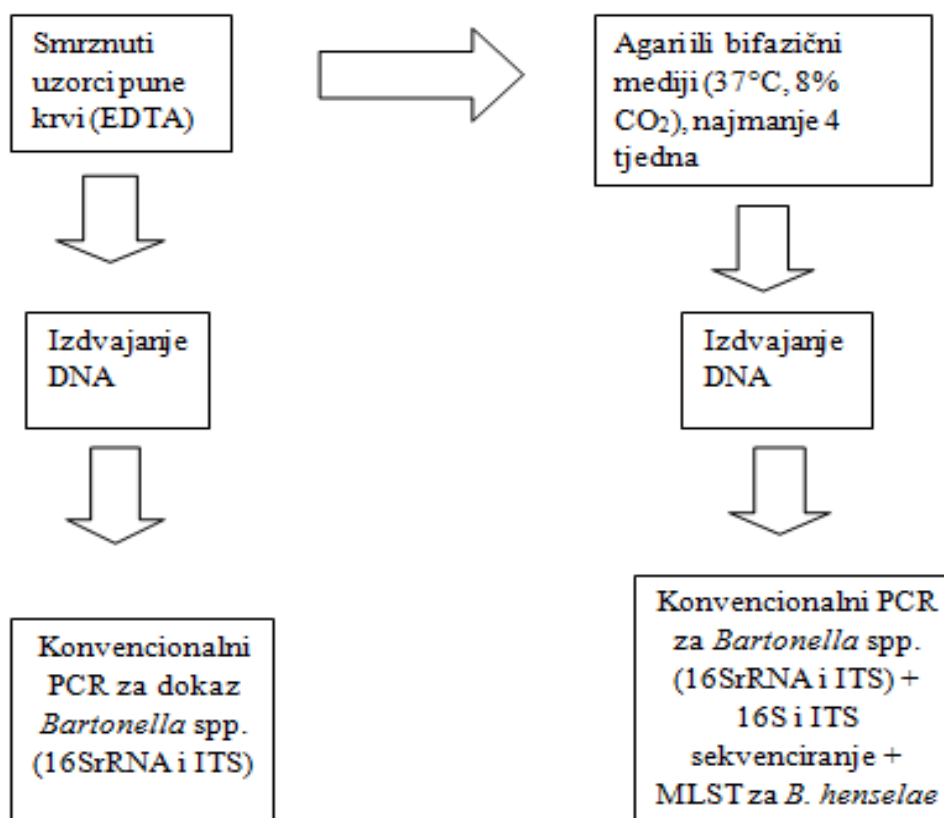
Uz svaki uzorak uginulih mačaka u sekcionima dvoranama također je ispunjavan Upitnik, s obavezom ispunjavanja samo poznatih podataka o životinji, te utvrđenih patoanatomskih promjena.

Primjerak obrasca Upitnika s listom pitanja nalazi se na Slici 5. (u Prilogu). Iz rezultata Upitnika nakon statističke obrade podataka doneseni su zaključci o povezanosti pojedinih varijabli s infekcijom mačaka bartonelama, odnosno zaključci o postojanju potencijalnih čimbenika rizika za infekciju mačaka.

## **4.2. MOLEKULARNA TIPIZACIJA BARTONELA**

Molekularna pretraga krvi i molekularna tipizacija uzgojenih izolata provedena je metodama lančane reakcije polimerazom (engl. polymerase chain reaction, PCR), sekvenciranjem gena 16SrRNA i ITS i metodom određivanja sekvencijskih tipova na više lokusa (engl. multilocus sequence typing, MLST), u Laboratoriju za bakterijske zoonoze i molekularnu dijagnostiku bakterijskih bolesti Hrvatskog veterinarskog instituta. Najprije su PCR-om potvrđeni izolati dvaju ATCC referentnih sojeva, bakterija *Bartonella henselae* ATCC<sup>®</sup> 49882<sup>™</sup> i *Bartonella clarridgeiae* ATCC<sup>®</sup> 700095<sup>™</sup>, na razini dvaju gena 16SrRNA i ITS. Potom je pretraženo svih 189 uzoraka krvi živih mačaka, kao i svi izolati dobiveni uzgojem krvi živih i uginulih mačaka. Sekvenciranjem gena 16SrRNA i ITS pretražen je izolat izdvojen na hranjivim podlogama iz jedne uginule mačke.

Određivanje sekvencijskih tipova (engl. sequence type, ST) bakterije *B. henselae* MLST analizom provedeno je na uzgojenim bakterijskim kulturama krvi 31 žive mačke, na osam genskih lokusa prema shemi (IREDELL i sur., 2003) navedenoj u PubMLST bazi podataka za bakteriju *B. henselae* (<https://pubmlst.org/organisms/bartonella-henselae>). Dobiveni sekvencijski tipovi obrađeni su filogenetskom analizom, uspoređeni s postojećim ST-ovima te prikazani u obliku minimalnog razapinjućeg stabla (engl. minimum spanning tree, MST). Slika 6. prikazuje dijagram tijekom dijagnostičkih postupaka za identifikaciju bartonela iz krvi mačaka.



**Slika 6.** Dijagram tijekom kulturelnih i molekularnih postupaka identifikacije bakterija roda *Bartonella* spp. iz krvi mačaka.

#### 4.2.1. Dobivanje početnog materijala za izdvajanje DNA



Početni materijal za izdvajanje DNA dobiven je iz uzoraka pune krvi mačaka te iz bakterijskih kultura poraslih na čvrstim i bifazičnim hranjivim podlogama naciepljenim uzorcima krvi i referentnim sojevima (*Bartonella henselae* ATCC<sup>®</sup> 49882<sup>™</sup> i *Bartonella clarridgeiae* ATCC<sup>®</sup> 700095<sup>™</sup>).

Najprije su pretraženi izolati dobiveni iz referentnih ATCC sojeva bakterija *Bartonella henselae* ATCC<sup>®</sup> 49882<sup>™</sup> i *Bartonella clarridgeiae* ATCC<sup>®</sup> 700095<sup>™</sup>, a potom izolati dobiveni iz mačjih uzoraka. Morfologija izdvojenih kolonija iz krvi mačaka razlikuje se ovisno o vrsti, kao i o broju pasaža na čvrstim hranjivim podlogama. Tako na primjer kolonije bakterije *B. henselae* u primoizolaciji su male, okrugle ili karfiolaste, uzdignute, cjelovitih rubova, pigmentirano bijele, hrapave, tvrde, teško lomljive, teško razmazive i duboko urasle u podlogu. Nakon nekoliko pasaža na odgovarajućim hranjivim podlogama kolonije postaju glatke, mekanije, slabije pričvršćene uz površinu agara i lakše razmazive (BRENNER i sur., 1997; MAURIN i sur., 1997; BOULOUIS i sur., 2005; GUTIÉRREZ i sur., 2017).

Za molekularnu pretragu referentnih sojeva *Bartonella henselae* ATCC<sup>®</sup> 49882<sup>™</sup> i *Bartonella clarridgeiae* ATCC<sup>®</sup> 700095<sup>™</sup> eza zapremine 1 µL puna izolata poraslih na površini agara premještena je u otopinu za izdvajanje DNA. Zbog velikog broja pasaža, bakterijska kultura referentnih ATCC sojeva lako razmazive konzistencije dobro se raspršuje u otopini.

Kod gustog porasta kolonija u čistoj kulturi na hranjivoj podlozi u primoizolaciji (prve kolonije porasle nakon inkubacije izravno naciepljenih uzoraka mačje krvi) za molekularnu pretragu nasumce je odabrano tri do pet pojedinačnih kolonija. Zbog suhoće i tvrdoće kolonija čvrsto utisnutih u agar, ezom zapremine 1 µL kolonije su pažljivo odvojene od površine agara i premještene u otopinu za izdvajanje DNA.

Kod slabijeg porasta *Bartonella* spp. u primoizolaciji (npr. samo 1-5 kolonija na površini agara), ili kod kontaminacije dijela površine ploča bakterijama ili plijesnima, kolonije su najprije precjepljivane na nove hranjive podloge. Tek nakon ponovnog porasta kolonija u čistoj kulturi, izolati su korišteni za molekularnu pretragu. Narasle kolonije nisu više bile pojedinačne, suhe i čvrste, već difuzno raspoređene po površini

agara. U tom slučaju u otopini za izolaciju razmućena je eza puna izolata lako mazive konzistencije.

U početku je pretraživan svaki porast kolonija na pločama agara, s ciljem identifikacije bakterija roda *Bartonella* spp. Nakon uspješnog umnažanja prvih izolata i stjecanja iskustva u prepoznavanju tipičnih kolonija, pretraživane su samo kolonije tipičnog izgleda, koje su morfološki ukazivale na bartonele.

Za molekularnu pretragu izolata bifazičnih hranjivih podloga pipetom je odvojeno 100 µL tekuće faze, ili nekoliko nasumce odabranih kolonija s kose površine agara, u otopinu za izdvajanje DNA.

Početni materijal za izdvajanje DNA izravno iz krvi mačaka dobiven je odvajanjem 200 µL krvi iz uzoraka pune krvi 189 živih mačaka. Uzorci su aseptički premješteni u sterilnu Eppendorf epruvetu i odmah upućeni na izdvajanje DNA.

#### **4.2.2. Izdvajanje DNA**

##### **4.2.2.1. Priprema za izdvajanje DNA**

DNA *Bartonella* spp. izdvojen je iz bakterijskih kultura dobivenih umnažanjem dvaju referentnih sojeva (*Bartonella henselae* ATCC<sup>®</sup> 49882<sup>™</sup> i *Bartonella clarridgeiae* ATCC<sup>®</sup> 700095<sup>™</sup>) i iz izolata dobivenih naciepljivanjem uzoraka krvi mačaka na čvrste i bifazične hranjive podloge. U slučaju kontaminacije površine agara, izdvajanje DNA iz poraslih kolonija izvedeno je tek nakon dobivanja izolata u čistoj kulturi, nakon jednog ili nekoliko precjepljivanja.

Izdvajanje DNA iz bakterijskih kolonija izvedeno je na način da smo punu ezu bakterijske kulture razmutili u Eppendorf epruvetici zapremine 2 mL u kojoj se nalazilo 180 µL pufera za liziranje (Buffer AL) i 20 µL enzima proteinaze (Proteinase K) iz komercijalno dostupnog kompleta QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka). Zatim su bakterijske kolonije dodatno raspršene u suspenziji pomoću vrtložne mješalice Stuart (Cole–Parmer, Vernon Hills, Illinois, SAD) u trajanju oko 1 – 2 minute pri brzini od 2000 okretaja u minuti (engl. revolutions per minute, rpm). Potom je suspenzija bakterijskih kolonija inkubirana na temperaturi 56°C u tresilici Thermo - shaker TS100 (Biosan, Riga, Latvija) kroz 20 minuta, do potpune lize. Na kraju je suspenzija liziranih

bakterijskih stanica centrifugirana jednu minutu pri 6000g i ohlađena na sobnu temperaturu, a nakon centrifugiranja nadtalog s ekstrahiranom DNA je proslijeđen na daljnju obradu.

Izdvajanje bakterijske DNA iz bujona bifazičnih medija izvedeno je na način da smo otopili 100  $\mu$ L tekuće faze u 180  $\mu$ L pufera (Buffer AL) i 20  $\mu$ L proteinaze (Proteinase K) iz kompleta QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka). Prije samog premještanja tekuće kulture iz epruvete s bifazičnim medijem u otopinu za izdvajanje DNA, epruveta bifazičnog medija dobro je promiješana, da bi se talog nastao tijekom inkubiranja jednolično pomiješao s ostatkom tekuće faze. Tek tada je pipetiranjem odvojeno 100  $\mu$ L suspenzije u 200  $\mu$ L navedene mješavine pripremljene za izdvajanje DNA. Ukoliko je na kosini agara bifazičnog medija bilo porasta kolonija izgleda tipičnih za bartonele u primoizolaciji, pažljivo su zahvaćene ezom zapremine 1 $\mu$ L i premještene u otopinu za izdvajanje DNA. Postupak miješanja, inkubiranja i centrifugiranja izveden je na isti način kao kod izdvajanja DNA iz bakterijskih kolonija, a nadtalog s ekstrahiranom DNA je proslijeđen na daljnju obradu.

Iz svakog dostavljenog uzorka pretraženo je 200  $\mu$ L EDTA pune krvi nakon odmrzavanja, u koje je dodana mješavina 180  $\mu$ L pufera (Buffer AL) i 20  $\mu$ L proteinaze (Proteinase K) iz kompleta QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka). Uzorci u smjesi proteinaze i pufera inkubirani su na 56°C kroz 10 minuta te potom kratko centrifugirani.

#### **4.2.2.2. Automatsko izdvajanje DNA**

Izdvajanje DNA iz tako pripremljenih uzoraka nastavljeno je u QIAcube uređaju za automatiziranu izolaciju DNA (Qiagen, Hilden, Njemačka), pomoću kojeg je DNA ekstrahirana iz prethodno liziranih uzoraka, praćenjem protokola za krvi nakon ručne lize uzoraka. Svakom uzorku dodano je 200  $\mu$ L Pufera AL te su inkubirani 10 minuta na 70°C. Zatim je dodano 200  $\mu$ L etanola (96 - 100%) i kratko centrifugirano. Sadržaj epruvete prenešen je u epruvetu za filtriranje i centrifugiran pri 6000 g jednu minutu. Zatim je dodano 500  $\mu$ L pufera za ispiranje AW1 i na isti način centrifugirano, a potom 500  $\mu$ L pufera za ispiranje AW2 i centrifugirano tri minute pri punoj brzini. Epruveta za filtriranje zatim je prebačena u novu epruvetu od 1,5 mL. Dodano je 200 mL elucijskog

AE pufera, inkubirano jednu minutu pri sobnoj temperaturi i centrifugirano pri brzini od 6000 g / 1 min. Na kraju je dobiveno 200 µL izdvojene DNA koja je poslužila kao predložak za umnažanje PCR analizom, a svi uzorci DNA pohranjeni su na -20°C.

Izdvajanje DNA izravno iz uzoraka krvi provedeno je pomoću komercijalnog sustava QIAcube za automatsko izdvajanje DNA, korištenjem kompleta QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka). DNA je izdvojena automatski, praćenejm protokola proizvođača za krv i tjelesne tekućine. Izdvojena DNA bila je predložak za umnažanje PCR analizom i pohranjena na - 20°C.

#### **4.2.3. Dokaz *Bartonella* spp. lančanom reakcijom polimerazom (PCR)**

PCR analiza je izvođena na DNA izdvojenoj iz uzgojenih izolata podrijetlom od ATCC sojeva i uzoraka krvi te na DNA izdvojenoj izravno iz mačje krvi. U svakoj reakciji upotrijebljeno je 2 µL izdvojene DNA, koja je služila kao predložak za konvencionalni PCR.

##### **4.2.3.1. Ciljni geni i početnice**

Radi potvrde izolata konvencionalnim PCR-om izvedena su dva PCR testa, jedan koji cilja gen 16SrRNA i drugi koji cilja unutarnju prepisujuću razmaknicu, 16S - 23S rRNA (engl. internal transcribed spacer, ITS). Odabrani su konzervirani ciljni gen 16SrRNA i hipervarijabilni gen ITS. Odsječci gena 16SrRNA i ITS regije iz lizata bakterijske DNA umnoženi su početnicama za PCR koje su opisali GARCÍA-ESTEBAN i sur. (2008) i GIL i sur. (2010).

Za ciljni gen ITS korištene su slijedeće prednje (engl. forward, F) i stražnje (engl. reverse, R) početnice u koncentraciji 0,5 µM (GARCÍA-ESTEBAN i sur., 2008; GIL i sur., 2010):

1. Bart/16-23F (oligonukleotidni sljedovi: 5'-TTG ATA AGC GTG AGG TCG GAG G-3')
2. Bart/16-23R (oligonukleotidni sljedovi: 5'-CAA AGC AGG TGC TCT CCC AG-3')

Za ciljni gen 16SrRNA korištene su slijedeće prednje (engl. forward, F) i stražnje (engl. reverse, R) početnice u koncentraciji od 0,5  $\mu$ M (GIL i sur., 2010):

1. 16S-R kao početnica F (oligonukleotidni sljedovi: 5'-GCC YCC TTG CGG TTA GCA CAG CA-3')
2. P24E mod kao početnica R (oligonukleotidni sljedovi: 5'-CCT TCA GTT MGG CTG GAT C-3')

Očekivana veličina proizvoda umnožavanja tim početnicama za vrstu *B. henselae* je 438 baznih parova (engl. base pair, bp) za gen 16SrRNA i 452 bp za gen ITS (GARCÍA-ESTEBAN i sur., 2008).

#### 4.2.3.2. Reakcijska mješavina i uvjeti ciklusa

Izdvojena DNA je podvrgnuta PCR protokolu za gene 16SrRNA i ITS (GARCÍA-ESTEBAN i sur., 2008).

Reakcijske mješavine pripremane su sigurnosnom kabinetu u sterilnim uvjetima. Za sve reakcije korištena je ista mješavina ukupnog volumena 20  $\mu$ L. Sastojala se od 10  $\mu$ L otopine HotStarTaq Master Mix sastavljene od DNA polimeraze (2,5 U), pufera s  $MgCl_2$  (1,5 mM) i dNTP-a (800  $\mu$ M). U otopinu je dodano i 7  $\mu$ L DNase i RNase slobodne vode (DNase/RNase-free water) (Quiagen, Hilden, Njemačka), 0,5  $\mu$ M svake od početnica (Macrogen, Amsterdam, Nizozemska) i 2  $\mu$ L istraživanog izolata DNA.

Umnažanje odsječaka gena 16SrRNA i ITS iz izolata izvođeno je u toplokružniku (engl. thermal cycler) Pro Flex PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California, SAD). Uvjeti PCR ciklusa bili su: jedan ciklus od 95°C kroz 15 minuta za aktivaciju polimeraze. Zatim 40 ciklusa od tri koraka: 95°C kroz 45 sekundi za razdvajanje lanca, 55°C kroz 45 sekundi za vezanje početnica te 72°C kroz 45 sekundi za produžavanje lanca. Konačni ciklus bio je produžavanje na 72°C kroz 10 minuta te 4°C beskonačno (zaustavljanje reakcije).

Svi proizvodi umnažanja su pohranjeni na temperaturi od – 20°C u svrhu izvođenja naknadnih genskih analiza.

#### 4.2.3.3. Kontrola izolacije i umnažanja

Za kontrolu izolacije (KI), prilikom svakog ciklusa izdvajanja korišteno je 200  $\mu$ L otopine za izolaciju DNA bez dodataka, sastava 180  $\mu$ L pufera (AL buffer) i 20  $\mu$ L proteinaze (Proteinase K). Prilikom svakog provođenja PCR-a kao negativna kontrola (NK) korišteno je 2  $\mu$ L sterilne destilirane vode (RNA-ase free water). Za pozitivnu DNA kontrolu (PK) korišteno je 2  $\mu$ L pročišćene DNA referentnog soja *B. henselae* Huston-1 (ATCC 49882).

#### **4.2.3.4. Kapilarna elektroforeza**

Uspješnost umnažanja i vizualizacija produkata umnažanja provjeravana je kapilarnom elektroforezom, na uređaju za kapilarnu elektroforezu QIAxcel System (Qiagen, Hilden, Njemačka). Rezultati dobivenih proizvoda umnažanja PCR-om prikazani su pomoću QIAxcel DNA Screening Kita (Qiagen, Hilden, Njemačka), biljega za poravnavanje QX DNA Alignment Marker s odsječcima 15 do 3000 bp (Qiagen, Hilden, Njemačka) i biljega za određivanje veličine umnoženih odsječaka QX DNA Size Marker (Qiagen, Hilden, Njemačka) veličine 100 do 2500 bp. Prisutnost PCR produkta i veličina amplikona određena je usporedbom s markerom.

#### **4.2.4. Sekvenciranje gena 16S rRNA i ITS**

Konvencionalnim PCR-om korištenjem početnica za ciljne gene 16SrRNA i međugensku regiju 16S-23S rRNA (ITS) iz kolonija izdvojenih na ČOK agaru uzgojem krvi jedne uginule mačke dokazan je DNA *Bartonella* spp. Produkt umnožavanja dobiven PCR-om pročišćen je pomoću komercijalnog reagensa ExoSAP-IT<sup>®</sup> (USB, Cleveland, Ohio, SAD) prema uputama proizvođača. Postupak je detaljnije opisan u idućem poglavlju (MLST sekvenciranje). Nakon slanja pročišćenog proizvoda umnažanja (PCR produkta) na DNA sekvenciranje u komercijalnu tvrtku Macrogen (Amsterdam, Nizozemska), dobivene sekvence obrađene su pomoću računalnog programa SeqMan II (DNASTAR, Madison Wisconsin, SAD) s pripadajućim potprogramima SeqMan i EditSeq. Ovim programom obrađene sekvence spremljene su u FASTA format kako bi se usporedili nukleotidni sljedovi oba smjera.

Dobivene nukleotidne sekvence sastavljene su pomoću programa za poravnavanje. Razina sličnosti (homolognost) dobivenih sljedova nukleotida provjeravana je uspoređivanjem s dostupnim sekvencama u bazi podataka GenBank

(NCBI) putem tražilice BLAST (engl. Basic Local Alignment Search Tool), kako bi se dobio jedinstven nukleotidni slijed i utvrdila srodnost, odnosno odredila vrsta bartonela. Svim ostalim izolatima mačaka vrsta je određivana kombinacijom PCR i MLST metode.

#### **4.2.5. Analiza nukleotidnih sljedova više genskih lokusa (MLST)**

Pohranjena DNA prethodno izdvojena iz bakterijskih kultura molekularno je tipizirana analizom sekvenci više gena (engl. multilocus sequence typing, MLST), prema metodi utemeljenoj na devet genskih lokusa „housekeeping“ gena za bakteriju *B. henselae* (IREDELL i sur., 2003), naknadno modificiranoj za osam genskih lokusa, zbog izostavljanja lokusa *eno* (ARVAND i sur., 2007; JOLLEY i sur., 2018). Analizirani su uzgojeni izolati svih živih mačaka, potvrđeni PCR-om kao *Bartonella* sp.

Prema dosadašnjim istraživanjima MLST metodom i službenoj PubMLST bazi podataka (<https://pubmlst.org/organisms/bartonella-henselae>) prije početka ovog istraživanja utvrđena su 32 različita sekvencijska tipa (engl. sequece types, ST) bakterije *B. henselae* (GIL i sur., 2013), dok ih je sada već 37, smještenih u tri klonalna kompleksa (JOLLEY i sur., 2018; FURQUIM i sur., 2021).

##### **4.2.5.1. Lančana reakcija polimerazom (PCR)**

MLST analiza izvedena je PCR umnažanjem i sekvenciranjem osam genskih lokusa „housekeeping“ gena (16SrRNA, *batR*, *ftsZ*, *gltA*, *groEL*, *nlpD*, *ribC* i *rpoB*). Unutarnji odsječci raspona veličine sekvenci 321 do 522 bp umnoženi su pomoću osam parova početnica dizajniranih za MLST analizu bakterije *B. henselae* (IREDELL i sur., 2003; GIL i sur., 2013).

PCR protokol za umnažanje izveden je kao i u prethodnom poglavlju. Reakcijske mješavine (20 µL) i uvjeti umnožavanja u toplokružniku za MLST analizu bili su 95°C 15 min praćeni s 40 ciklusa: 96°C 10 s, 55°C 10 s i 72°C 50 s, konačnim produljivanjem na 72°C 10 min te 4°C beskonačno.

Sekvence početnica (Macrogen, Amsterdam, Nizozemska) i genski lokusi za umnažanje DNA (<https://pubmlst.org/organisms/bartonella-henselae>) navedeni su u Tablici 6.

Uspješnost i vizualizacija proizvoda umnažanja provjeravana je na uređaju za kapilarnu elektroforezu QIAxcel Advanced system (Qiagen, Hilden, Njemačka) uz biljeg veličine 100 – 3000 bp (Qiagen, Hilden, Njemačka), a veličina amplikona uspoređena je sa standardom. U PCR su bili uključeni i pozitivna i negativna kontrola.

**Tablica 6.** Nukleotidni sljedovi početnica korištenih u MLST analizi bakterije *B. henselae* (IREDELL i sur., 2003)

Lokus	Veličina odsječka	Prednja početnica(5' - 3')	Stražnja početnica(5' - 3')
16SrDNA	511	AGAGTTTGATCCTGGYTCAG	CTTTACGCCARTAAWTCCG
<i>batR</i>	487	GACCGCAATATTTTGACATC	GCATCCATCAAAGCATCAGACTT
<i>eno</i>	472	AGCAGCAGAGTCATTGTC	CTCAGCCATACCATCTTC
<i>ftsZ</i>	522	GCCTTCTCATCCTCAACTTC	CTTTGTTTTAAACGCTGCC
<i>gltA</i>	379	GGGGACCAGCTCATGGTGG	AATGCAAAAAGAACAGTAAACA
<i>groEL</i>	405	GTTGATGATGCCTTGAAC	TGGTGTGTCTTTCTTTGG
<i>nlpD</i>	494	GGCGCTGGTATGATACAA	GACATCTGTGCGGAAGAA
<i>ribC</i>	321	AGCGAGGATCAAAACAAC	GCTCTTCAACACAATTAACG
<i>rpoB</i>	471	CGTGACGTACATCCTACA	AACAGCAGCTCCTGAATC

#### 4.2.5.2. Pročišćavanje proizvoda umnažanja

Umnoženi odsječci gena pročišćeni su od neželjenih komponenti iz reakcijske mješavine pomoću komercijalnog kompleta za pročišćavanje ExoSAP-IT<sup>®</sup> (USB, Cleveland, Ohio, SAD) prema uputama proizvođača, na način da je u svaki proizvod umnažanja dodano 8 µL ExoSAP-IT otopine enzima. Postupak inkubacije je proveden pomoću uređaja Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, California, SAD) prema slijedećem programu u dva koraka: najprije jedan ciklus pri 37°C 15 minuta, a potom jedan ciklus pri 80°C 15 minuta. Pročišćavanjem je uklonjen višak nukleotida i početnica koje se nisu vezale u reakciji, nakon čega je proizvod spreman za sekvenciranje. Pročišćeni DNA proizvod je prije sekvenciranja pohranjen na -20°C.

#### 4.2.5.3. Sekvenciranje i analiza sekvenci



Umnožene kopije odsječaka DNA nakon pročišćavanja poslane su na sekvenciranje u tvrtku Macrogen (Amsterdam, Nizozemska). Proizvodi umnažanja sekvencirani su metodom po Sangeru. Dobiveni sljedovi nukleotida svih osam lokusa izolata obrađeni su na način da su sastavljeni, poravnati po svakom lokusu, provjereni i međusobno uspoređeni pomoću računalnog programa za analizu podataka BioNumerics, verzija 7.6 (Applied Maths, Gent, Belgija) i korištenjem javno dostupne internetske MLST baze podataka za bakteriju *B. henselae* (<https://pubmlst.org/organisms/bartonella-henselae>).

Za svaki izolat kombinacija alela sa svakog pretraženog lokusa daje osmeročlani brojčani kod, na temelju kojeg nastaje alelni profil izolata i dodjeljuje mu se određeni sekvencijski tip (ST) (IREDELL i sur., 2003; GIL i sur., 2013; <https://pubmlst.org/organisms/bartonella-henselae>). Poznatim izolatima dodijeljeni su već postojeći sekvencijski tipovi. Izolat s novom jedinstvenom kombinacijom alela također je upisan u spomenutu bazu podataka i registriran kao potpuno novi sekvencijski tip bakterije *B. henselae* (<https://pubmlst.org/organisms/bartonella-henselae>).

#### **4.2.6. Filogenetska analiza**

Filogenetska analiza je provedena poravnavanjem sljedova nukleotida osam ciljnih gena pomoću računalnog programa BioNumerics, verzija 7.6 (Applied Maths, Gent, Belgija) prema shemi MLST-a (IREDELL i sur., 2003; JOLLEY i sur., 2018). Aleli i ST-ovi određivani su korištenjem MLST baze podataka za bakteriju *B. henselae*, kojoj se može pristupiti putem BioNumerics programa, u skladu s objavljenim podacima (JOLLEY i sur., 2018). Osmeročlane brojčane kodove statistički smo analizirali kroz BioNumerics.

Na temelju rezultata poravnavanja ulančanih sekvenci izvedeni su filogenetski zaključci o novom ST-u iz ovog istraživanja s novom kombinacijom alela, kao i za još 36 ST-ova pohranjenih u PubMLST internetskoj bazi podataka bakterije *B. henselae*.

Svi postojeći ST-ovi su međusobno uspoređivani na osnovu kategoričkog koeficijenta i pomoću metode grupiranja prosječne udaljenosti (engl. unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA), koja za analizu skupina koristi

aritmetičke sredine i slikovito su prikazani u obliku minimalnog razapinjućeg stabla (engl. minimum spanning tree, MST), konstruiranog iz ulančanih alelnih sekvenci svih postojećih MLST profila bakterije *B. henselae* korištenjem programa BioNumerics.

Filogenetskom analizom izolati *B. henselae* svrstani su u klonalne komplekse (engl. clonal complex, CC), koje čine ST-ovi sa sedam od osam zajedničkih alela (ARVAND i sur., 2007; MIETZE i sur., 2011; CHALONER i sur., 2011; GIL i sur., 2013). Klonalni kompleks je rastući klaster različitih genotipova neke bakterije, u kojem su svi potekli od istog drevnog pretka (klona) procesom rekombinacije (SPRATT, 2004). MLST je metoda genske karakterizacije klonova, pomoću koje se mogu pratiti hipervirulentni genotipovi i ispitivati način na koji bakterijska populacija i klonovi evoluiraju (FEIL i sur., 2004). Konstrukcijom filogenetskog stabla utvrđena je razina srodnosti svih ST-ova. Dobiveni zaključci o ST-ovima iz ovog istraživanja uspoređeni su s postojećim ST-ovima iz različitih država i regija svijeta.

#### **4.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA**

Raspodjela prikupljenih epizootioloških podataka o mačkama istražena je grafički i neparametrijskim Shapiro – Wilk W testom. Nakon testiranja raspodjele u analizi statističke povezanosti epizootioloških podataka s infekcijom bartonelama korištena je univarijantna i multivarijantna logistička regresija. Budući da je utvrđeno da epizootiološki podaci nisu u normalnoj raspodjeli, varijable su transformirane logaritmiranjem prije analize statističke povezanosti.

Inicijalno je konstruiran univarijantni model slučajni (engl. random) efekt logističkim regresijskim modelom uporabom prikupljenih epizootioloških podataka iz anketnih upitnika (starost, spol, kastracija, pasmina, boja, zdravstveno stanje, antimikrobna terapija, prisutnost ektoparazita, zaštita od ektoparazita, rezultati testiranja na virusne bolesti, transfuzija krvi, crijevni paraziti, kožni dermatofiti, vakcinacija protiv virusnih bolesti mačaka, postavljena dijagnoza bolesti, način života, tip naselja gdje životinja živi, druge mačke u kućanstvu, druge životinjske vrste u kućanstvu, kontakt s divljači, porijeklo mačke, putovanja, oboljenje ljudi, ima li u kući ljudi s slabijim imunitetom) kao nezavisne varijable i dokaz infekcije bakterijom *B. henselae* kao zavisne (ciljne) varijable. Ciljna varijabla u našem modelu je pozitivna (inficirana)

odnosno negativna (neinficirana) mačka, ovisno o rezultatu uzgoja na hranjivim podlogama i potvrde molekularnim testom. Nezavisne varijable procjenjivane su kako bi se identificirali potencijalni čimbenici rizika povezani s bakterijemijom mačaka. Univarijantnom analizom određeni su mogući epizootiološki podaci kao kovarijante za multivarijantni model ovisno o rezultatu Wald hi - kvadrat testa.

Na temelju podataka iz ispunjenih epizootioloških upitnika nezavisne varijable statistički značajne u univarijantnoj analizi (p-vrijednost  $<0,05$ ) dalje su testirane multivarijabilnim modelom logističke regresije da se opetovano propita njihova povezanost s bakterijemijom, koja eventualno nije bila uočena u univarijantnoj analizi. Univarijantnom analizom analizira se svaka zavisna varijabla zasebno, a multivarijantnom se odjednom razmatra skup više zavisnih varijabli zajedno. P-vrijednost  $<0,05$  smatrana je statistički značajnom u obje analize, univarijantnoj i multivarijantnoj.

Nadalje, u postupku odabira najznačajnijih epizootioloških čimbenika u završnoj jednadžbi (engl. "model building") korišten je pristup postepenog biranja (engl. "stepwise selection") na način da su pojedinačni čimbenici eliminirani iz modela kada nisu pokazali statističku značajnost u multivarijantnom modelu s alfa vrijednosti većom od 0,05, ili kada izuzeti iz modela nisu mijenjali rezultat za više od 20%. Tada se analiziraju i veze između više nezavisnih varijabli te se uzimaju u obzir složeniji odnosi među varijablama. Svi su modeli konstruirani radi utvrđivanja rizika za bakterijemiju.

U izradi modela razlike između skupina kvantitativno su izražene omjerom izgleda (engl. odds ratio, OR) i njegovim 95%-tnim rasponom pouzdanosti (engl. 95% confidence interval, 95% CI). Omjer izgleda je mjera povezanosti u logističkoj regresiji koja govori o snazi povezanosti između statusa bolesti (infekcije) i izloženosti čimbeniku rizika. Omjerom izgleda procjenjuje se jesu li izgledi da mačke budu inficirane bakterijom *B. henselae* veće u nekoj skupini, ili su izgledi za infekciju jednaki u ispitanika iz obje skupine. Kada je  $OR = 1$ , znači da nema povezanosti između čimbenika i infekcije. Kada je  $OR < 1$ , izloženost nekom čimbeniku smanjuje rizik za infekciju, odnosno uloga čimbenika je zaštitna. OR vrijednost  $> 1$  implicira pozitivnu povezanost između nezavisne i zavisne varijable, odnosno govori da izloženost nekom čimbeniku povećava izgled za infekciju, pri čemu se isti proglašava čimbenikom rizika. Veći broj OR vrijednosti ukazuje na veću snagu povezanosti.

U praksi je uvriježeno da se raspon pouzdanosti (95% CI) često koristi kao zamjenski pokazatelj prisutnosti statističke značajnosti ako se ne preklapa s nulnom vrijednosti (npr. OR=1), odnosno kada ne uključuje „1,0“. Rizik u izloženoj skupini je veći ako su obje granice raspona CI veće od 1, ili manji ako su obje granice raspona CI manje od 1. Međutim, važno je spomenuti da za razliku od p-vrijednosti 95% CI ne govori primarno o mjeri statističke značajnosti (SZUMILAS i sur., 2010), već pruža važne informacije o preciznosti i smjeru učinka. Stoga je u prikazivanju omjera izgleda (OR) korisno objavljivati obje statističke mjere, raspon pouzdanosti (95% CI) i pripadajuće p - vrijednosti, jer se međusobno upotpunjuju (JAKOBSEN i sur., 2014), čak i ako nisu statistički značajne.

U statističkoj obradi podataka korišten je računalni program STATA 13.1. (StataCorp. 2016. Stata Statistical Software: Release 13.1, College Station, Texas, SAD).

## 5. REZULTATI

### 5.1. REZULTATI UMNAŽANJA BARTONELA NA HRANJIVIM PODLOGAMA

#### 5.1.1. Rezultati umnažanja i identifikacije referentnog soja bakterije *Bartonella henselae* (ATCC<sup>®</sup> 49882<sup>™</sup>)

Referentni soj bakterije *Bartonella henselae* (ATCC<sup>®</sup> 49882<sup>™</sup>) uspješno je umnožen nakon sedam dana inkubacije iz suspenzije liofilizata naciepljene na hranjive podloge preporučene od proizvođača (ATCC). Bjelkaste kolonije na površini TSA agara čvrte i bifazične hranjive podloge porasle su nakon sedam dana inkubiranja. Na spoju agara i bujona u epruveti s bifazičnim medijem (TSA+TSB) također je uočena bijela nakupina poraslih kolonija, dok je bujon bifazičnog medija ostao proziran.

Precjepljivanjem umnoženog soja bakterije *B. henselae* (ATCC49882) na 16 testiranih vrsta hranjivih podloga utvrđen je zadovoljavajući porast nakon pet dana na deset čvrstih hranjivih podloga i dva bifazična medija, dok na četiri vrste čvrstih hranjivih podloga porast nije bio zadovoljavajući (Tablica 7.).

Prema kvaliteti porasta umnoženog soja *B. henselae* (ATCC49882) uočena su četiri stupnja rasta izolata, gust, dobar i slab, te nedostatak porasta. Kod gustog porasta je cijela površina agara bila prekrivena razvijenim i gusto izraslim te dobro vidljivim bakterijskim kolonijama. Kod dobrog porasta kolonije su bile razvijene i dobro vidljive, no izolat je rastao slabije i nije prerastao cijelu površinu naciepljenog agara. Kod slabog porasta kolonije su bile nježne i slabije uočljive, a izolat je rastao samo iznad naciepljene površine agara. Nedostatak porasta podrazumijeva odsutnost bakterijskih kolonija na površini čvrste hranjive podloge (TSUNEOKA i sur., 2004).

Najbolji (gust) porast utvrđen je na ČOK agaru i na agarima s dodatkom defibrinirane kuniće krvi (TSA i BH sa i bez dodatka amfotericina B), a potom na hranjivim podlogama s dodatkom defibrinirane ovčje (TSA, COL i EKA), konjske (TSA i COL) i kuniće krvi (KA). Dobar porast zabilježen je i na bifazičnim medijima (TSA+TSB i BH+BB), kao i na hranjivoj podlozi GC+DKoK+V.

Čvrste hranjive podloge s utvrđenim slabim porastom (GC+HGB+V, TSA+DKoK i COL+LKoK) procijenjene su neodgovarajućima za daljnju uporabu,

zajedno s jednom hranjivom podlogom na kojoj nije bilo porasta kolonija niti nakon 28 dana inkubiranja (CEMO+DKoK agar).

Narastle kolonije bakterije *B. henselae* (ATCC49882) su bile male, bijele, okrugle, konveksne, sjajne, međusobno spojene i lako razmazive. PCR-om gena 16SrRNA i ITS iz svih izolata bakterijskog soja *B. henselae* (ATCC49882) umnoženog na hranjivim podlogama potvrđena je pripadnost rodu *Bartonella* spp.

Brzina i stupanj porasta soja bakterije *B. henselae* (ATCC49882) te ocjena upotrebljivosti različitih hranjivih podloga navedeni su u Tablici 7.

**Tablica 7.** Rezultati umnažanja i precjepljivanja izolata bakterijskog soja *B. henselae* (ATCC49882) na različitim hranjivim podlogama

R. br.	Hranjiva (HP)	podloga	Porast <i>B. henselae</i> (ATCC 49882)	Dani porasta	Ocjena HP
<b>Umnažanje liofilizata</b>					
1	TSA		Vidljivi porast na ploči i kosini epruvete	Nakon 7 dana	Zadovoljava
2	TSA+TSB, bifazična		Vidljivi porast na kosini i dnu (spoju agara i bujona)	Nakon 7 dana	Zadovoljava
<b>Umnažanje izolata precjepljivanjem na različite hranjive podloge</b>					
1	ČOK		Gust porast	Nakon 5 dana	Zadovoljava
2	TSA+DKK		Gust porast	Nakon 5 dana	Zadovoljava
3	BH		Gust porast	Nakon 5 dana	Zadovoljava
4	BH+aB		Gust porast	Nakon 5 dana	Zadovoljava
5	TSA		Dobar porast	Nakon 5 dana	Zadovoljava
6	KA+DKK		Dobar porast	Nakon 5 dana	Zadovoljava
7	EKA		Dobar porast	Nakon 5 dana	Zadovoljava
8	COL		Dobar porast	Nakon 5 dana	Zadovoljava
9	COL+DKoK		Dobar porast	Nakon 5 dana	Zadovoljava
10	GC+DKoK+V		Dobar porast	Nakon 5 dana	Zadovoljava

11	TSA+TSB, bifazična	Dobar porast	Nakon 5 dana	Zadovoljava
12	BH+BB, bifazična	Dobar porast	Nakon 5 dana	Zadovoljava
13	GC+HGB+V	Slab porast	Nakon 5 dana	Ne zadovoljava
14	TSA+DKoK	Slab porast	Nakon 5 dana	Ne zadovoljava
15	COL+LKoK	Slab porast	Nakon 5 dana	Ne zadovoljava
16	CEMO+DKoK	Nema porasta	Nakon 28 dana	Ne zadovoljava

DOK = defibrinirana ovčja krv; DKK = defibriniranakuničja krv; DKoK = defibrinirana konjska krv; DKoK = defibrinirana konjska krv; LKoK = lizirana konjska krv; aB = amphotericin B; V = Vitox; HGB = hemoglobin

### 5.1.2. Rezultati umnažanja i identifikacije referentnog soja bakterije *Bartonella clarridgeiae* (ATCC<sup>®</sup> 700095<sup>™</sup>)

Referentni soj bakterije *Bartonella clarridgeiae* (ATCC<sup>®</sup> 700095<sup>™</sup>) uspješno je umnožen iz žive kulture, nakon dva neuspjela pokušaja umnažanja iz suspenzije liofilizata, nacjepljivanjem na TSA agar i bifazični medij TSA+TSB, hranjive podloge preporučene od proizvođača (ATCC). Zbog dovoljne količine materijala za umnažanje i uzgojne zahtjevnosti izolata, za umnažanje žive kulture su korištene još i čvrste hranjive podloge ČOK i BH.

Najbrži porast ostvaren je na ČOK agaru nakon osam dana, a zatim na TSA agaru nakon 16 dana inkubiranja, dok na bifazičnom mediju TSA+TSB i na BH agaru nije bilo porasta kolonija referentnog soja *B. clarridgeiae* niti nakon 28 dana inkubacije.

Precjepljivanjem umnoženog soja *B. clarridgeiae* s površine ČOK agara na četiri vrste čvrstih hranjivih podloga (ČOK, COL, TSA i EKA), soj je uspješno porastao samo na površini ČOK agara, na kojem je porast kolonija postao vidljiv nakon četiri dana inkubacije. Precjepljivanjem umnoženog soja s površine TSA agara na ČOK i TSA hranjive podloge, kolonije su porasle samo na površini ČOK agara nakon tri dana inkubacije.

Daljnijim precjepljivanjem umnoženog izolata *B. clarridgeiae* (ATCC 700095) s površina ČOK agara na nove ploče ČOK i ČOK+V agara, uspješan porast bakterijskih kolonija ustanovljen je peti dan inkubacije.

Kolonije bakterijskog soja *B.clarridgeiae* (ATCC 700095) bile su sitne, bjelkaste, sjajne, okrugle, uzdignute, glatke, cjelovite, mekane i lako razmazive.

Paralelnom inkubacijom prethodno umnoženih izolata referentnog soja *B. henselae* (ATCC49882) na površini TSA agara porasle su vidljive kolonije bakterije *B. henselae* nakon sedam dana inkubacije, što je dokazalo opravdanost primjene naših tehnika uzgoja.

PCR-om gena 16SrRNA i ITS iz svih izolata bakterijskog soja *B.clarridgeiae* (ATCC 700095) umnoženog na hranjivim podlogama potvrđena je pripadnost rodu *Bartonella* spp.

Brzina i stupanj porasta soja bakterije *B.clarridgeiae* (ATCC 700095) te ocjena upotrebljivosti različitih hranjivih podloga navedeni su u Tablici 8.

**Tablica 8.** Rezultati umnažanja i precjepljivanja izolata soja bakterije *B.clarridgeiae* (ATCC 700095) na različitim hranjivim podlogama

R. br.	Hranjiva podloga (HP)	Porast <i>B.clarridgeiae</i> (ATCC 700095)	Dani porasta	Ocjena HP
<b>Umnažanje liofilizata</b>				
1	TSA	Nema porasta	Nakon 10 dana	-
2	TSA+TSB, bifazična	Nema porasta	Nakon 10 dana	-
<b>Umnažanje žive kulture</b>				
1	ČOK	Gust porast	Nakon 8 dana	Zadovoljava
2	TSA	Dobar porast	Nakon 16 dana	Zadovoljava
3	TSA+TSB, bifazična	Nema porasta	Nakon 28 dana	Ne zadovoljava
4	BH	Nema porasta	Nakon 28 dana	Ne zadovoljava
<b>Provjera umnažanja precjepljivanjem na različite hranjive podloge</b>				
1	ČOK	Dobar porast	Nakon 3 i 4 dana	Zadovoljava
2	COL	Nema porasta	Nakon 28 dana	Ne zadovoljava
3	TSA	Nema porasta	Nakon 28 dana	Ne zadovoljava
4	EKA	Nema porasta	Nakon 28 dana	Ne zadovoljava
<b>Naknadna precjepljivanja s ČOK na ČOK</b>				



1	ČOK	Gust porast	Nakon 5 dana	Zadovoljava
2	ČOK+V	Gust porast	Nakon 5 dana	Zadovoljava

DOK = defibrinirana ovčja krv; DKK = defibrinirana kunićja krv; DKoK = defibrinirana konjska krv; LKoK = lizirana konjska krv; aB = amphotericin B; V = Vitox; HGB = hemoglobin

### 5.1.3. Rezultati umnažanja bartonela iz krvi mačaka na hranjivim podlogama

Izravnim naciepljivanjem 189 uzoraka krvi mačaka na odabrane hranjive podloge, izolati bartonela rasli su na svim vrstama korištenih hranjivih podloga. Porast kolonija karakterističnih za bartonele utvrđen je na površini pet čvrstih hranjivih podloga, a bartonele su rasle i u dva bifazična medija.

Na čvrstim hranjivim podlogama u primoizolaciji kolonije su porasle na površini agara između 4. i 56. dana od početka inkubacije. Preciepljivanjem primarnih izolata s ciljem umnažanja, bartonele su uspješno rasle na istim vrstama čvrstih i bifazičnih hranjivih podloga kao i primoizolati. No s povećanjem broja pasaža izolati su rasli brže te su se prve bakterijske kolonije na površini agara mogle vidjeti u roku tri do sedam dana.

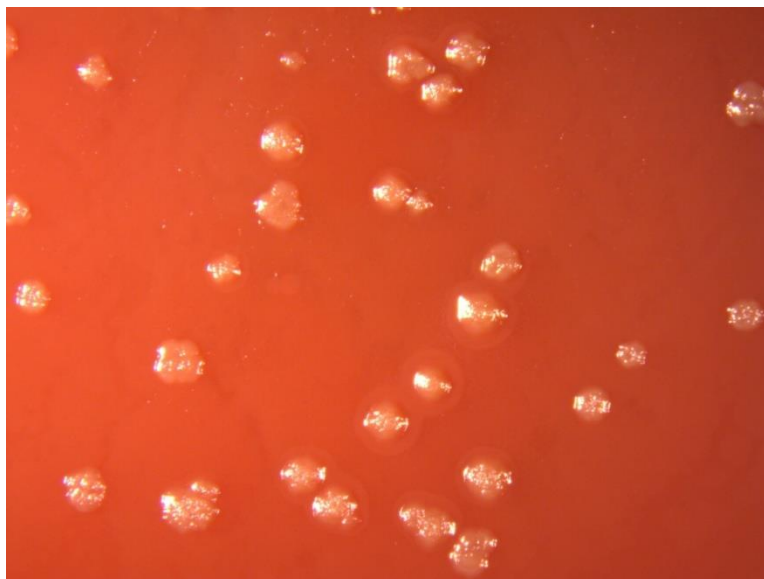
Jedini uzorak iz kojeg je porasla bartonela u skupini uginulih mačaka zbog malog volumena krvi naciepljen je na samo jednu ploču ČOK agara, a rast sitnih kolonija nalik bartonelama prvi puta je uočen na površini hranjive podloge nakon sedam dana inkubiranja. Preciepljivanjem na novu ploču ČOK agara izolat je porastao nakon pet dana.

Kolonije bartonela na površini čvrstih hranjivih podloga, uzgojene izravno iz mačje krvi (primoizolacija), bile su pojedinačne, male (promjera do 1 mm), okrugle, uzdignute, glatkih rubova, tvrde, suhe, pigmentirano bijele i nehemolitične (Slika 7., lijevo). Čvrsto su prijanjale uz podlogu, od koje su se teško odvajale. Zbog suhe teksture nisu se ljepile za ezu, s čijeg otvora su ispadale prilikom preciepljivanja. Zbog tvrde konzistencije bile su teško lomljive, teško mazive i teško topive u suspenziji.



**Slika 7.** Tipične kolonije bakterije *B. henselae* izdvojene iz krvi mačaka na čvrstim hranjivim podlogama nakon primarnog izdvajanja (lijevo) i precjepljivanja (desno)  
(Izvor: Maja Stepanić).

Mikroskopski pod povećanjem je dobiven još jasniji uvid u morfologiju primarnih kolonija bakterije *B. henselae*, koje su bile sjajne, ponekad karfiolaste i neravnih rubova, zrnate površine te više konveksog profila (Slika 8.).



**Slika 8.** Primarne kolonije bakterije *B. henselae* na agaru s dodatkom krvi pod povećanjem od 70x (Izvor: Relja Beck).

Precijepivanjem primarnih izolata na nove čvrste hranjive podloge s ciljem njihovog umnažanja, kolonije bartonela su postajale sitnije, sjajnije, vlažnije i mekše konzistencije, zbog čega su dobro prianjale uz otvor eze s kojeg su se lakše skidale i razmazivale po površini čvrstih hranjivih podloga (Slika 7., desno).

U neznatno zamućenim bujonima bifazičnih medija prilikom rasta bartonela na dnu epruvete se stvarao bjelkasti talog, koji se nakon tresenja raspršio u plutajuće krpice, a na kosini agara rasle su kolonije tipičnog izgleda za bartonele.

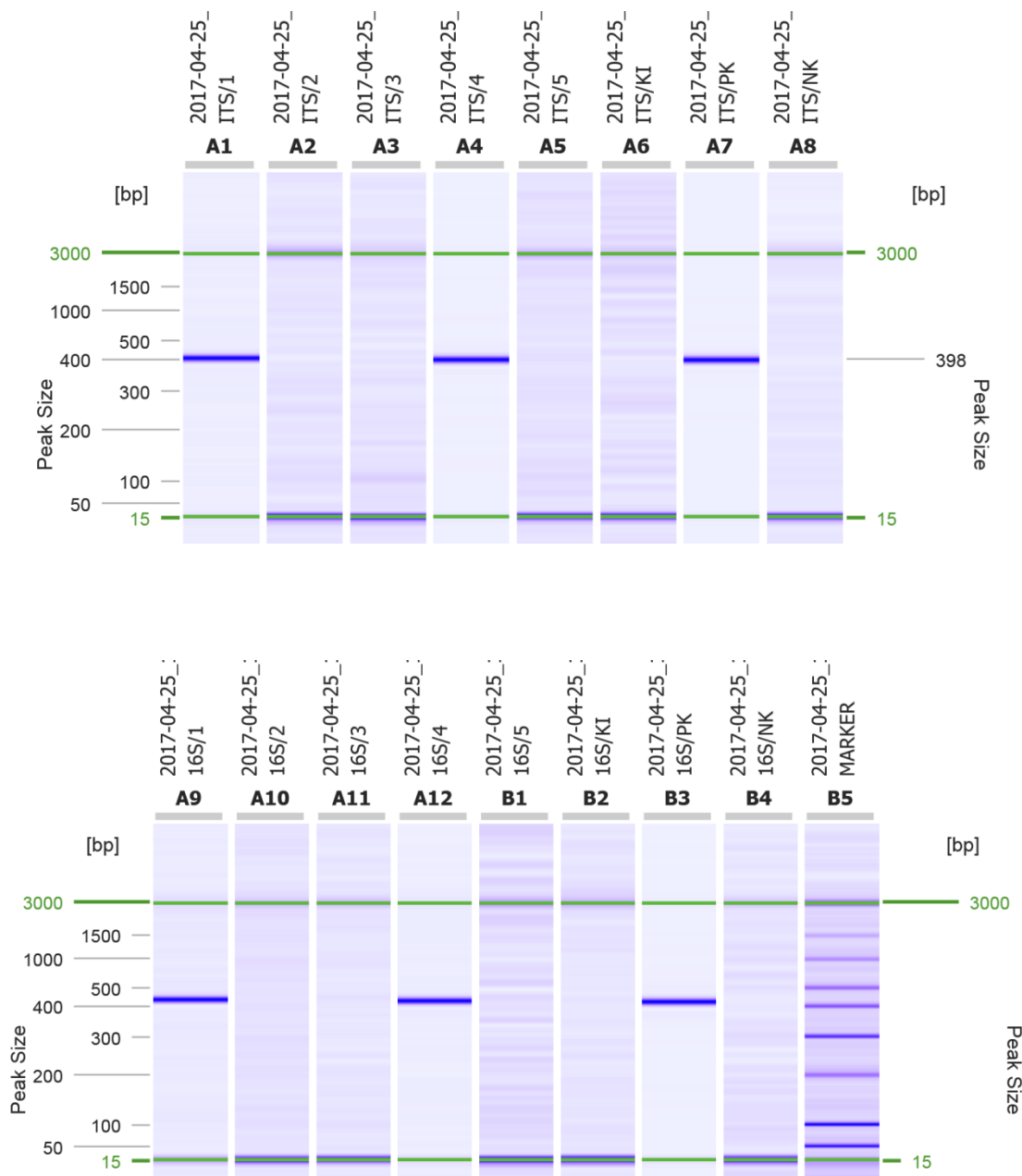
Svaki sumnjivi porast kolonija tipičnih za bartonele (engl. *Bartonella*-like colonies) s površine čvrstih hranjivih podloga, kao i tekuća faza bifazičnih medija, pretraženi su lančanom reakcijom polimerazom s ciljem dokazivanja DNA bakterija roda *Bartonella* spp.

#### **5.1.4. Identifikacija bartonela iz mačaka**

##### **5.1.4.1. Identifikacija bartonela iz uzgojenih izolata**

Umnažanjem gena 16SrRNA i ITS regije PCR-om iz umnoženih bakterijskih izolata (Slika 9.), dobivenih uzgojem krvi 31 žive i jedne uginule mačke na hranjivim

podlogama, kod svih izolata potvrđena je pripadnost bakterijskom rodu *Bartonella* sp. Umnožena DNA svih uzoraka pohranjena je radi izvođenja MLST analize na osam genskih lokusa, kojom se određuju vrste i genotipovi bartonela.



**Slika 9.** Prikaz rezultata PCR amplifikacije odsječaka gena ITS (gornja slika) i 16SrRNA (donja slika) uzoraka *Bartonella* sp. izdvojenih iz krvi mačaka. Prisutnost odsječaka DNA bartonela (A1, A4, A9, A12) utvrđena je kapilarnom elektroforezom u visini pozitivne kontrole oko 440 bp-a (A7, B3).

#### **5.1.4.2. Identifikacija bartonela iz krvi mačaka**

Lančanom reakcijom polimerazom izravno iz krvi 189 živih mačaka nismo dokazali prisutnost DNA bartonela.

#### **5.1.5. Rezultati sekvenciranja gena 16SrRNA i ITS**

Izolat uginule mačke ujedno je i prvi izolat bartonela uzgojen 2014. godine iz krvi prirodno inficirane mačke u ovom istraživanju. Konvencionalnim PCR-om korištenjem početnica koje ciljaju 16S rRNA i 16S-23S rRNA međugensku regiju (ITS) iz kolonija izdvojenih na ČOK agaru dokazali smo prisutnost DNA roda bartonela (*Bartonella* sp.). Nakon sekvenciranja pročišćenog proizvoda umnoženog PCR-om dokazana je vrsta *B. henselae*.

#### **5.1.6. Rezultati genotipizacije (MLST)**

##### **5.1.6.1. Određivanje sekvencijskih tipova (ST) bakterije *B. henselae***

Analizom nukleotidnih sljedova osam genskih lokusa iz izolata umnoženih na hranjivim podlogama iz krvi 31 mačke svi izolati dokazani su kao vrsta *B. henselae*. Ukupno je dobiveno 30 potpunih MLST – profila bakterije *B. henselae*, a jedan je bio nepotpun (uzorak DUB5), te mu nije sa sigurnošću određen sekvencijski tip. Identificirano je pet različitih sekvencijskih tipova (ST) bakterije *B. henselae*.

Najučestaliji genotip bio je ST5, izdvojen iz 17 (56,7%) mačaka, a ostali dokazani sekvencijski tipovi bili su ST6 u sedam (23,3%) mačaka, ST1 u četiri (13,3%) te po jednom ST24 (3,3%) i ST33 (3,3%). Kod uzorka DUB5 nije bilo moguće sa sigurnošću analizirati alel genskog lokusa *gltA*, te je stoga ostalo upitno radi li se o genotipu ST5 ili ST24.

Usporedba alelnih profila rezultirala je jednim novim ST-om (ST33), koji je dokazan po prvi puta u ovom istraživanju. Genotip ST33 (uzorak MICIKA) imao je novu kombinaciju alela te je upisan u javno dostupnu PubMLST internetsku bazu podataka za bakteriju *B. henselae* pod oznakom CRO\_MICIKA, identifikacijski broj izolata „id 447“ (<https://pubmlst.org/organisms/bartonella-henselae>). Na temelju utvrđene kombinacije alela (16S, *batR*, *ftsZ*, *gltA*, *groEL*, *nlpD*, *ribC* i *rpoB*) MLST analizom dodijeljen mu je osmeroznamenasti brojčani kod 2-3-3-1-2-1-1-2, koji

označava tip nukleotidnog sljeda, odnosno sekvencijski tip (ST). Oznake 30 pozitivnih mačaka i pripadajući sekvencijski tipovi bakterije *B. henselae* pripisani mačjim izolatima nakon provedene MLST analize prikazani su u Tablici 8.

**Tablica 8.** Sekvencijski tipovi izolata bakterije *B. henselae* dokazani MLST metodom iz uzoraka mačje krvi na području Republike Hrvatske

Redni broj	Oznaka uzorka	Sekvencijski tip (ST)	Redni broj	Oznaka uzorka	Sekvencijski tip (ST)
1	VB8	5	16	VAP2	6
2	H3	6	17	VAP3	5
3	H6	5	18	VAP5	6
4	H8	5	19	VAP8	1
5	BUBA	5	20	TF4	6
6	SNJEŠKA	5	21	TF5	5
7	KRON	5	22	TF7	5
8	ĐIĐI	1	23	TF8	5
9	<b>MICIKA</b>	<b>33</b>	24	TF9	5
10	JUG1	5	25	BJ8	24
11	JUG2	6	26	CES4	5
12	JUG3	5	27	VAH4	6
13	AK8	1	28	VAH5	6
14	CEZAR	5	29	VAH10	1
15	VAP1	5	30	SIVKO	5

\* novom profilu (MICIKA) pripisan je ST33 (**crveno**)

### 5.1.7. Rezultati filogenetske analize bakterije *B. henselae*

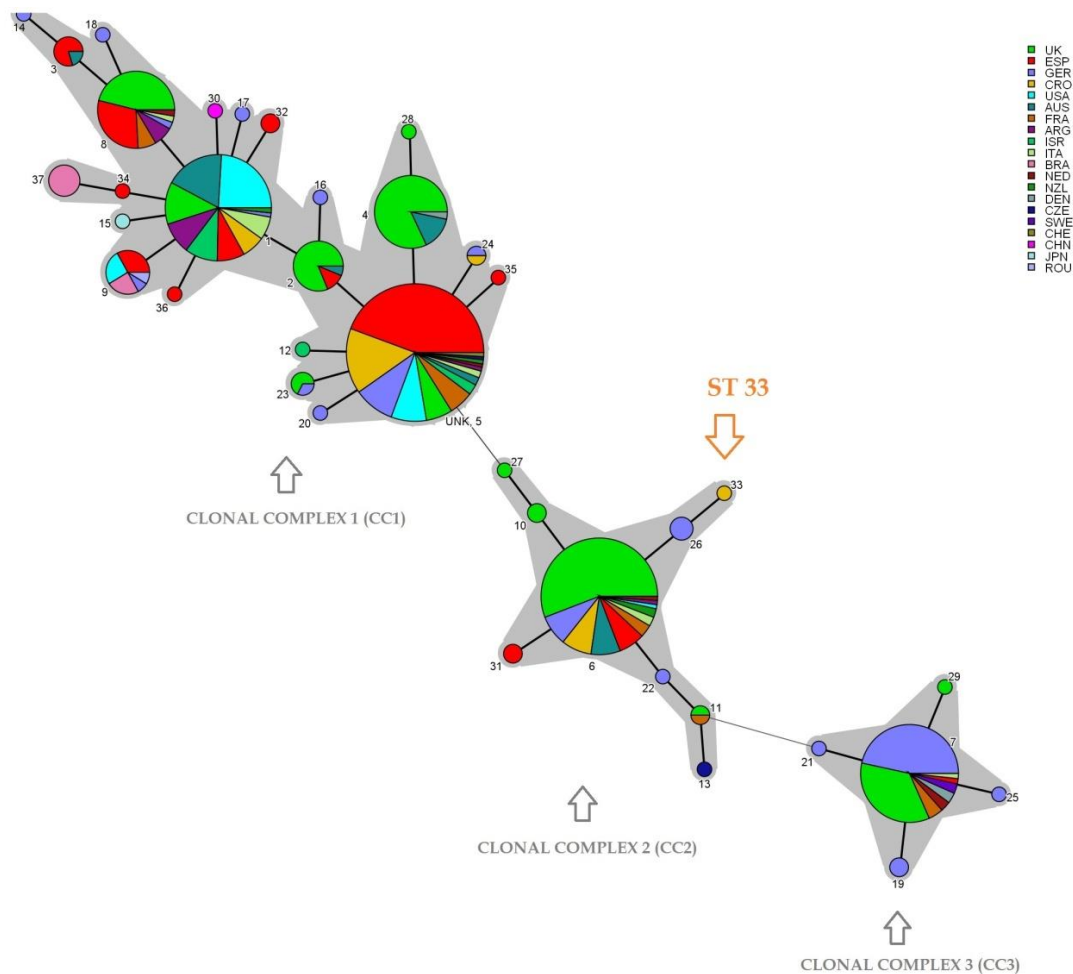
O filogenetskom odnosu između novog ST33 iz ovog istraživanja i ostalih 36 ST-ova pohranjenih u internetskoj bazi podataka PubMLST zaključeno je na temelju poravnavanja i usporedbe sljedova nukleotida osam ciljnih gena MLST-a korištenjem programa BioNumerics.

Analiza klastera za sve do sada opisane MLST alelne profile (ST-ove) i novi ST33 bakterije *B. henselae* izvedena je UPGMA metodom (engl. unweighted pair group

method with arithmetic mean), kojom je konstruirano filogenetsko stablo u obliku MST (engl. minimum spanning tree) prikaza pomoću računalnog programa BioNumerics. Na taj način su vizualizirani podaci dobiveni MLST-om i slikovito prikazani evolucijski odnosi i srodnost među alelnim profilima. Za izvođenje filogenetskih zaključaka korišteni su MLST profili sekvencijskih tipova pohranjeni u PubMLST bazi podataka za bakteriju *B. henselae* (<https://pubmlst.org/organisms/bartonella-henselae>).

Prema podrijetlu identificirana su tri odvojena klastera (skupine) unutar vrste *B. henselae* (CHALONER i sur., 2011; MIETZE i sur., 2011). Filogenetska analiza je pokazala da 37 ST-ova bakterije *B. henselae* dokazanih do danas (uključujući ST33 iz ovog istraživanja) također tvore tri odvojena klastera. Naša analiza pokazala je usklađenost s do sada najčešće korištenim eBURST pristupom (engl. enhanced based upon related sequence types, BURST), kojim su ST-ovi unutar populacije bakterije *B. henselae* klasificirani u tri klonalna kompleksa (<http://eburst.mlst.net>; CHALONER i sur., 2011). Usporedba alelnih profila ST-ova metodom UPGMA rezultirala je pridruživanjem novog ST33 jednom od tri već prethodno opisana klonalna kompleksa vrste *B. henselae*, klonalnom kompleksu 2 (engl. clonal complex 2, CC2). Time je CC2 povećan s osam na devet članova (Slika 10.).

Slika 10. prikazuje filogenetski odnos među svim postojećim ST-ovima bakterije *B. henselae* određeno metodom UPGMA i vizualizirano pomoću MST prikaza. Osjenčana pozadina jasno pokazuje grupiranje srodnih ST-ova u tri klastera, kao i pripadnost genotipa ST33 klonalnom kompleksu 2.



**Slika 10.** MST prikaz filogenetskih odnosa među različitim ST-ovima bakterije *B. henselae*, određeno metodom UPGMA (BioNumerics).

Deblja linija na MST prikazu odraz je bliskije srodnosti ST-ova i predstavlja razliku u jednom alelu. Dužina grane također je proporcionalna broju razlika i srodnosti među izolatima. Kraća tanka linija predstavlja razliku u dva, a duža u tri alela. Izolati su grupirani prema sekvencijskim tipovima i označeni prema državi podrijetla. Veličina kruga odnosi se na učestalost određenog ST-a te pokazuje da je primarni utemeljitelj glavnog klonalnog kompleksa 1 (ST5) vrlo čest klon. Boja isječka u krugu odnosi se na zemljopisno podrijetlo dokazanog MLST profila. ST33 jedini je izolat iz Hrvatske i označen je krugom oker žute boje.

Utvrđivanje razine srodnosti novootkrivenog ST33 s dosadašnjim ST-ovima pokazalo je njegovu blisku srodnost s genotipom ST26 dokazanim u Njemačkoj



(MIETZE i sur., 2011) i ST27 dokazanim u Velikoj Britaniji (CHALONER i sur., 2011). Ustanovljeno je da ST33 s njima dijeli sedam od osam zajedničkih alela (Tablica 9.).

**Tablica 9.** Brojčani kodovi osam genskih lokusa poznatih sekvencijskih tipova bakterije *B. henselae* utvrđenih u ovom istraživanju (ST1, ST5, ST6 i ST24) i novog ST33 te njemu filogenetski srodnih genotipova ST26 i ST27, s kojima se razlikuje u samo jednom genskom lokusu

ST	16S rDNA ( <i>rrs</i> )	<i>batR</i>	<i>ftsZ</i>	<i>gltA</i>	<i>groEL</i>	<i>nlpD</i>	<i>ribC</i>	<i>rpoB</i>	CC
	RNA small subunit	Two-component regulator	Cell division protein	Citrate synthase	Hsp60 chaperone	Cell surface glycoprotein	Riboflavin synthase	RNA polymerase beta subunit	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	2	1	1	1	2	1	1	1	1
6	2	3	2	2	2	1	1	2	2
24	2	1	1	2	2	1	1	1	1
26	2	3	3	2	2	1	1	2	2
27	2	3	1	1	2	1	1	2	2
33*	2	3	3	1	2	1	1	2	2

\*mačji izolat bakterije *B. henselae* izdvojen 2016. godine (Jastrebarsko, Hrvatska), upisan 2017. godine u internetsku bazu MLST podataka za bakteriju *B. henselae* pod nazivom CRO\_MICIKA. Mačka je bila križana, stara šest mjeseci, ženskog spola, asimptomatska, s prijašnjom invadiranošću buhama.

ST = sekvencijski tip. CC = klonalni kompleks. Plavo = engleski nazivi osam genskih lokusa.

### 5.1.8. Osnivanje zbirke i čuvanje izolata bakterije *B. henselae*

Izolati bakterije *B. henselae* pohranjeni su u bujone s dodatkom glicerola i u komercijalni sistem za pohranu Cryobank. Iz molekularno tipiziranih izolata pohranjenih u čistoj kulturi izrađena je laboratorijska zbirka uzgojenih izolata bakterije *B. henselae*. Izolati su označeni datumom pohrane, jedinstvenom oznakom izolata i

brojem pasaža umnoženih bakterijskih kolonija (II ili III). Zbirka će se održavati redovnim precjepljivanjem te ponovnom pohranom umnoženih izolata svakih pet godina.

## 5.2. UČESTALOST I PROŠIRENOST INFEKCIJE MAČAKA BAKTERIJOM *B. henselae*

Učestalost infekcije mačaka bakterijom *B. henselae* utvrđena metodom uzgoja na hranjivim podlogama iz uzoraka krvi mačaka prikupljenih od 2014. do 2017. godine s 13 lokacija na području Republike Hrvatske iznosila je 16,4% (31/189; CI 11,1 -21,7), dok kod 158 (83,6%) mačaka nije utvrđena bakterijemija (Tablica 10.).

Osim toga, uzgojem na hranjivim podlogama pretraženo je i 90 uzoraka krvi iz srca uginulih mačaka, a bakterija *B. henselae* je uspješno izdvojene u samo jedne mačke (1,1%) s područja Zagreba. Ukupna učestalost iznosila je 11,5% (32/279).

Tablica 10. prikazuje učestalost i raspodjelu inficiranih mačaka bakterijom *B. henselae* na različitim lokacijama u Republici Hrvatskoj. Bakterija *B. henselae* izdvojena je na devet od 13 (69,2%) uzorkovanih lokacija, dok na četiri (30,8%) lokacije (Velika Gorica, Osijek, Vukovar i Split) nije bilo inficiranih mačaka. U tablici je navedena i učestalost infekcije mačaka prema svakoj pojedinoj lokaciji.

Podijelimo li lokacije prema klimatskim obilježjima, među 139 pretraženih mačaka s devet kontinentalnih lokacija *B. henselae* je izdvojena iz njih 17 (12,2%), a među 50 pretraženih mačaka na četiri primorske lokacije iz 14 mačaka (28,0%).

**Tablica 10.** Učestalost infekcije mačaka bakterijom *B. henselae* utvrđena iz uzoraka 189 živih mačaka prema veterinarskim ambulantom i lokacijama u Republici Hrvatskoj

Veterinarska ambulanta	Broj uzoraka	Broj (%) pozitivnih	Lokacija	Broj pretraženih	Br. poz.	%
Veterina Branimir	10	1 (10)	Zagreb	57	5	8,8
Vetvision (Hop)	8	3 (37,5)				
Buba	1	1 (100,0)				
Goldi	3	0 (0)				

Ljubimac	9	0 (0)				
Šegota	6	0 (0)				
Fabela	8	0 (0)				
Dodo-vet	12	0(0)				
Velika Gorica	17	0 (0)	V. Gorica	17	0	0
Jastrebarsko	23	7 (30,4)	Jastrebarsko	23	7	30,4
Zabok	3	2 (66,7)	Zabok	3	2	66,7
Bjelovar	10	1 (10)	Bjelovar	10	1	10,0
Cestica	6	1 (16,7)	Cestica	6	1	16,7
Osijek	12	0 (0)	Osijek	13	0	0
	1	0(0)				
Anubis Klub	2	1 (50,0)	Vinkovci	2	1	50,0
	8	0 (0)	Vukovar	8	0	0
Pula	9	5 (55,5)	Pula	20	8	40,0
Hajster	11	3 (27,3)				
Kućni ljubimci	10	5 (50,0)	Rijeka	10	5	50,0
Pilić	11	0 (0)	Split	11	0	0
Bobanović	9	1 (11,1)	Dubrovnik	9	1	11,1
<b>Ukupno</b>	<b>189</b>	<b>31</b>	<b>Hrvatska</b>	<b>189</b>	<b>31</b>	<b>*16,4</b>

\*Utvrđena je prevalencija infekcije mačaka od 16,4% (31/189; CI 11,1 - 21,7)

### 5.2.1. Učestalost i proširenost sekvencijskih tipova bakterije *B. henselae*

Na osam lokacija s područja Republike Hrvatske u mačaka je utvrđeno 30 potpunih MLST profila razvrstanih u pet različitih sekvencijskih tipova (ST) bakterije *B. henselae* (Slika 11.). Najučestaliji sekvencijski tip ST5 (56,7%; 17/30) utvrđen je na šest od osam lokacija (Zabok, Zagreb, Jastrebarsko, Cestica, Rijeka i Pula). Drugi po učestalosti genotip ST6 (23,3%; 7/30) utvrđen je na četiri od osam lokacija (Zagreb, Jastrebarsko, Rijeka i Pula). Treći po učestalosti ST1 (13,3%; 4/30) utvrđen je na tri od osam lokacija (Jastrebarsko, Vinkovci i Pula). ST24 i ST33 pojedinačno su dokazani svaki u jedne (3,3%) mačke, prvi u Bjelovaru, a drugi u Jastrebarskom.

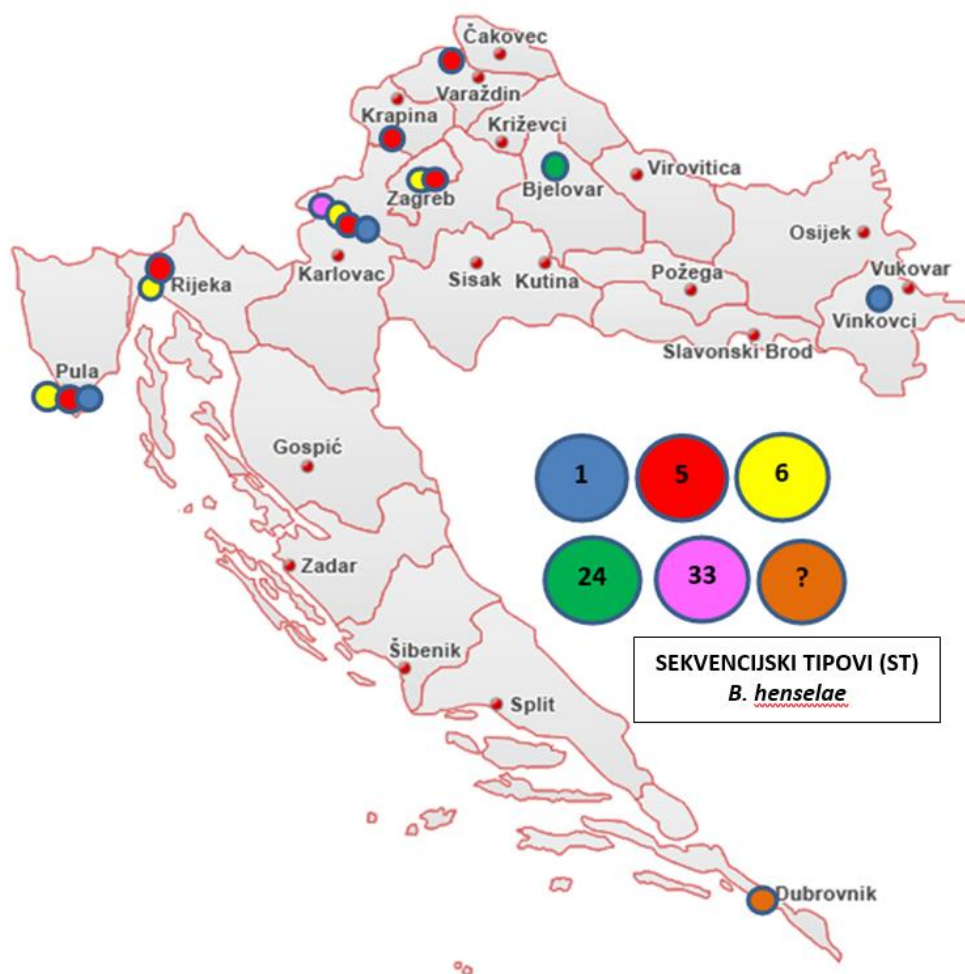
U mačaka s kontinentalnog područja (Zagreb, Jastrebarsko, Vinkovci, Zabok, Cestica i Bjelovar) dokazani su svi sekvencijski tipovi (ST1, ST5, ST6, ST24 i ST33). Među pet izolata u Zagrebu izdvojeni su samo ST5 (80,0%) i ST6 (20,0%). U Jastrebarskom je u četiri mačke dokazan ST5 (57,1%), a ST1, ST6 i ST33 dokazani su svaki u jedne mačke (14,3%). U Vinkovcima je u jedne (100,0%) mačke dokazan ST1. Objе mačke u Zaboku (100,0%) bile su inficirane genotipom ST5, kao i jedna mačka u

Cestici (Varaždinska županija). Rjedak genotip ST24 (100,0%) dokazan je u jedne mačke u Bjelovaru.

U mačaka s primorskih lokacija (Pula i Rijeka) dokazani su sekvencijski tipovi ST1, ST5 i ST6. U Puli je bio najučestaliji ST6 (4/8; 50,0%), a po dvije (25,0%) mačke bile su inficirane svakim od genotipova ST1 i ST5. U Rijeci je prevladavao ST5 (4/5; 80,0%), dok je jedna mačka (20,0%) nosila genotip ST6.

Najveća raznolikost sekvencijskih tipova dokazana je na području grada Jastrebarsko, gdje su dokazana četiri različita ST-a (ST1, ST5, ST6 i ST33), a potom u Puli gdje su dokazana tri različita ST-a bakterije *B. henselae* (ST1, ST5 i ST6). Na području gradova Rijeka i Zagreb dokazana su po dva različita genotipa, ST5 i ST6. U Zaboku i Cestici dokazan je genotip ST5, u Vinkovcima ST1, a u Bjelovaru ST24.

Slikoviti prikaz zemljopisne rasprostranjenosti i raznolikosti ST-ova na različitim lokacijama s područja Republike Hrvatske predložen je na Slici 11.



**Slika 11.** Zemljopisna proširenost pet sekvencijskih tipova (ST) bakterije *B. henselae* na osam lokacija s područja Republike Hrvatske.

### 5.3. UTVRĐIVANJE PRIKLADNOSTI HRANJIVIH PODLOGA ZA IZDVAJANJE BAKTERIJE *B. henselae*

Izolati bakterije *B. henselae* rasli su na svih sedam vrsta korištenih hranjivih podloga što je detaljno prikazano u Tablicama 11., 12. i 13. (Tablice 12. i 13. u Prilogu).

#### 5.3.1. Brzina porasta

Prve kolonije bakterije *B. henselae* najbrže su porasle na pločama BH agara (četvrti dan), kada je uzročnik dokazan i iz bifazičnog medija TSA+TSB. Na TSA agaru kolonije bakterije *B. henselae* porasle su prvi puta nakon šest dana, na COL i ČOK

agaru nakon sedam dana te na EKA agaru nakon deset dana. Uzročnik je iz bifazičnog medija BH+BB dokazan prvi put nakon 12 dana inkubacije (Tablica 12.).

Vidljivo je da je gotovo tri četvrtine izolata (72,2%; 60/83) bakterije *B. henselae* poraslo u roku 21 dana, a više od pola (55,4%; 46/83) izolata na hranjivim podlogama pojavilo se tijekom drugog tjedna inkubacije (od 7. do 12. dana), najčešće 11. dan (18 izolata). Porast kolonija za dva izolata utvrđen je nakon 25 dana inkubacije, a u pojedinačnim slučajevima izolati su porasli nakon 32, 35, 38 i 56 dana (Tablica 12.).

Rezultati izdvajanja bakterije *B. henselae* na korištenim hranjivim podlogama navedeni su u Tablici 11.

### **5.3.2. Učestalost izdvajanja bakterije *B. henselae* na hranjivim podlogama**

Za naciepljivanje krvi 32 inficirane mačke u primoizolaciji ukupno je korišteno 112 različitih hranjivih podloga, a porast izolata bakterije *B. henselae* dokazan je na 83 hranjive podloge (74,1%), od toga je 92,8% (77/83) izolata izdvojeno na čvrstim hranjivim podlogama i 7,2% (6/83) na bifazičnim hranjivim podlogama.

Na 102 čvrste hranjive podloge naciepljene s krvi inficiranih mačaka kolonije bakterije *B. henselae* su porasle na njih 77 (75,5%), dok je bakterija izdvojena iz 60,0% (6/10) bifazičnih hranjivih podloga. Najveća učestalost izdvajanja bakterije *B. henselae* iz inficiranih uzoraka krvi na čvrstim hranjivim podlogama postignuta je na BH agaru (87,5%) i COL agaru (82,4%), a potom na EKA agaru (80,0%) i ČOK agaru (77,3%), dok je najmanje izolata bakterije *B. henselae* poraslo na pločama TSA agara (54,2%). Na bifazičnim hranjivim podlogama utvrđena je učestalost izdvajanja bakterije *B. henselae* 80,0% za TSA+TSB i 40,0% za BH+BB.

Iz Tablice 12. se razabire i da na 29 (34,9%) od 112 hranjivih podloga nisu porasli izolati bakterije *B. henselae* naciepljivanjem krvi inficiranih mačaka, iako su istovremeno porasli na drugim hranjivim podlogama. U 29 hranjivih podloga bez dokazanog porasta uključeno je svih sedam vrsta hranjivih podloga. Izolati nisu rasli tri (10,3%) puta na BH, COL i EKA agaru, pet puta na ČOK agaru (17,2%), 11 puta na TSA agaru (37,9%), tri puta u mediju BH+BB (10,3%) te jednom u mediju TSA+TSB (3,4%).

### 5.3.3. Učestalost izdvajanja sekvencijskih tipova bakterije *B. henselae*

Sekvencijski tipovi bakterije *B. henselae* dokazani u izolatima izdvojenim na sedam vrsta hranjivih podloga navedeni su u Tablicama 11. i 12.

Učestalost izdvajanja pojedinih genotipova bakterije *B. henselae* na 83 hranjive podloge iznosila je 61,4% za ST5, 12,5% za ST6, 10,8% za ST1 te 3,6% za ST24 i ST33. Izolati najučestalijih genotipova (ST5 i ST6) uspješno su rasli na svih pet vrsta čvrstih hranjivih podloga. ST5 je jedini dokazan na svih sedam vrsta hranjivih podloga, a ST6 na svima, osim na BH+BB. ST1 je dokazan samo na čvrstim hranjivim podlogama, s izuzetkom TSA. ST33 je dokazan na BH, COL i ČOK agaru, a ST24 samo na BH agaru (Tablica 12.).

U 29 hranjivih podloga bez dokazanog porasta uključeni su svi genotipovi, osim ST33. Porast izolata nije ustanovljen 13 puta za genotip ST5 (44,8%), osam puta za ST6 (27,6%), četiri puta za ST1 (13,8%) i jednom za ST24 (3,4%), te za tri (10,3%) uzorka bez utvrđenog sekvencijskog tipa.

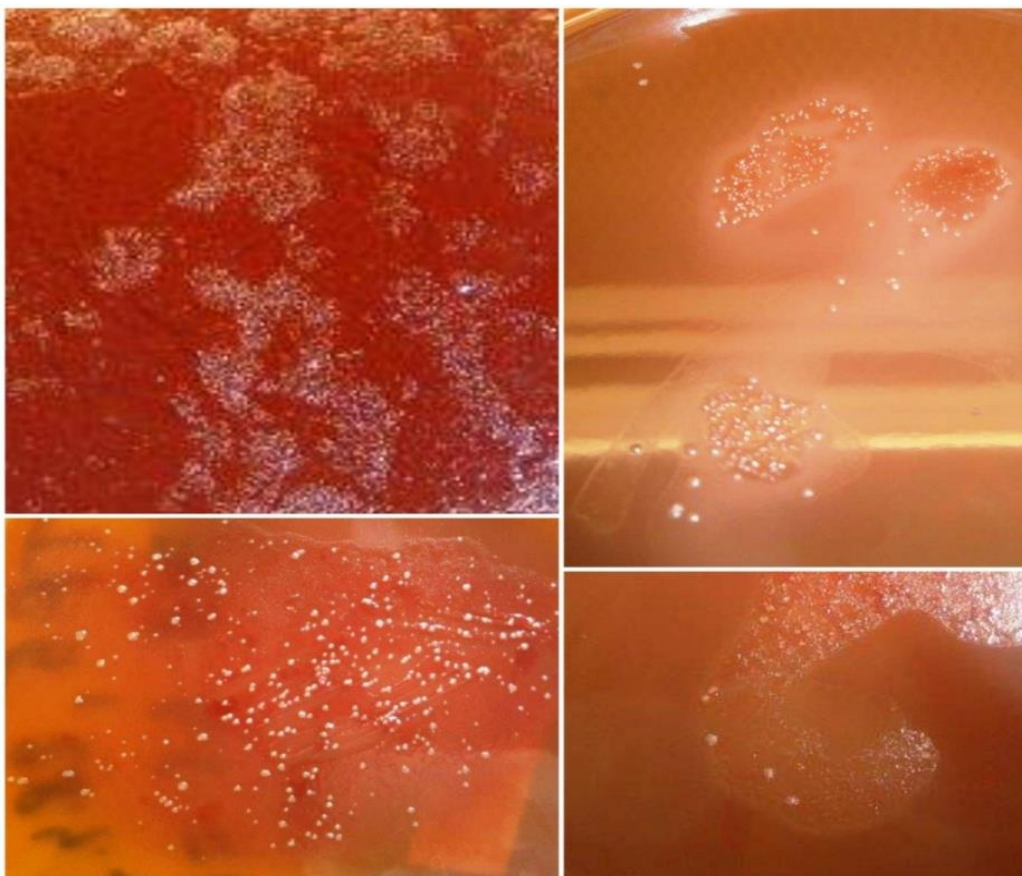
U bujonu hranjive podloge BH+BB dokazan je jedini pozitivni uzorak mačke kojem se nije mogao odrediti sekvencijski tip (uzorak DUB5), jer zbog nedostatka porasta kolonija bartonela na čvrstim hranjivim podlogama nije bilo dovoljno materijala za izvođenje genskih analiza. Zbog malog broja naciepljenih hranjivih podloga ne mogu se izvući zaključci o rastu pojedinih genotipova na bifazičnim hranjivim podlogama.

### 5.3.4. Rezultati određivanja broja kolonija u jednom mililitru krvi (CFU/mL)

Broj kolonija (CFU) po mililitru krvi određen je za bakteriju *B. henselae* iz 24 uzoraka krvi živih mačaka (Tablica 13., u Prilogu). Nakon naciepljivanja uzoraka krvi broj poraslih kolonija na hranjivoj podlozi pomnožen je s njegovim proporcionalnim alikvotom u svrhu procjene broja kolonija bartonela u jednom mL krvi. Primjerice, ukoliko je na hranjivu podlogu naciepljeno 250  $\mu$ L, broj poraslih kolonija pomnožen je s brojem četiri i izražen kao CFU/mL krvi (GREENE i sur., 1996) (Tablica 13.).

Zbog tipičnog oblika i teksture kolonija *B. henselae*, bilo je moguće izbrojati umnožene primoizolate na površinama čvrstih hranjivih podloga na kojima je bilo i oko

600 bakterijskih kolonija, jer su kolonije bile velike, tvrde i pojedinačne. Samo u jednom slučaju visoko bakterijemične mačke, kolonije su bile preguste da bi se u potpunosti mogle izbrojati (uzorak H3) te je broj određen procjenom (>3750) (Slika 12.).



**Slika 12.** Različita gustoća porasta kolonija bakterije *B. henselae* u primoizolaciji na površini čvrstih hranjivih podloga (gore lijevo: gust porast, uzorak H3; dolje lijevo: pojedinačne kolonije – visoki stupanj bakterijemije, gore desno: pojedinačne kolonije – srednji stupanj bakterijemije, dolje desno: pojedinačne kolonije – niski stupanj bakterijemije) (Izvor: Maja Stepanić).

Broj kolonija (CFU) po mililitru krvi utvrđen je u rasponu od 4 do  $\geq 3000$  CFU/mL (Tablica 11.). Kod pretraženih uzoraka krvi mačaka utvrđena su tri stupnja bakterijemije, niska, srednja i visoka. Svi uzorci krvi s utvrđenim brojem kolonija preko 1000 CFU/mL smatraju se visokim stupnjem bakterijemije mačaka, koja može dostići i



$\geq 4000$  CFU/mL krvi za vrstu *B. henselae* (CHOMEL i sur., 1995) te čak 10000 CFU/mL za vrstu *B. clarridgeiae* (ROLAIN i sur., 2004).

Kod devet (29,0%) mačaka utvrđen je visok stupanj bakterijemije s najvišim vrijednostima u uzorcima krvi od dviju mačaka, kod kojih je utvrđen broj kolonija veći od 3000 CFU/mL. U dvije (6,5%) mačke utvrđena je srednja razina bakterijemije (100 – 1000 CFU/mL), a u 14 (45,2%) mačaka niska razina bakterijemije (1 – 100 CFU/mL) (Tablica 13.).

Za sedam mačaka kod kojih su porasle kolonije iz uzoraka krvi nije određena koncentracija bakterija u početnom uzorku (CFU/mL krvi). Naime, zbog osjetljivosti uzročnika i zahtjevnosti same metode uzgoja, u nedostaku materijala nastojalo se sačuvati što više izolata za umnažanje precjepljivanjem i daljnje molekularne i genske pretrage dobivenih izolata. Značajke mačaka, lokacije uzorkovanja, hranjive podloge, utvrđeni sekvencijski tipovi, dani porasta kolonija i CFU/mL za 24 pretražene mačke navedeni su u Tablici 13.

**Tablica 11.** Rezultati izdvajanja bakterije *B. henselae* na različitim hranjivim podlogama utvrđeni uzgojem krvi mačaka u primoizolaciji (uključene žive i uginule mačke)

Hranjiva podloga	*Broj naciepljenih	**Broj izolata	Uspješnost izdvajanja	Dan porasta	Raspon CFU/mL	Dokazani ST-ovi
<b>Čvrste hranjive podloge:</b>						
BH	24	21	87,5%	4	16-1960	1, 5, 6, 24, 33
COL	17	14	82,4%	7	40-3050	1, 5, 6, 33
EKA	15	12	80,0%	10	4-1920	1, 5, 6
ČOK	22	17	77,3%	7	40-3750	1, 5, 6, 33
TSA	24	13	54,2%	6	4-1816	5, 6
<b>Čvrste:</b>	<b>102</b>	<b>77</b>	<b>75,5%</b>	-	-	-

<b>Bifazični mediji:</b>						
TSA+TSB	5	4	80,0%	4	-	5, 6
BH+BB	5	2	40,0%	12	-	5
<b>Bifazične:</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>60,0%</b>	-	-	-
<b>Sveukupno čvrste i bifazične hranjive podloge:</b>						
<b>Ukupno:</b>	<b>112</b>	<b>83</b>	<b>74,1%</b>	-	-	-

\* broj hranjivih podloga naci jepljenih uzorcima mačaka s dokazanom bakterijemijom

\*\* broj poraslih izolata iz naci jepljenih uzoraka krvi pozitivnih mačaka

**Napomena:** uspješnost izdvajanja za svaku hranjivu podlogu izračunata je tako da se podijeli broj potvrđenih izolata bakterije *B. henselae* sa te hranjive podloge sa ukupnim brojem naci jepljenih uzoraka inficirane krvi na tu hranjivu podlogu

## 5.4. REZULTATI STATISTIČKE OBRADJE ANKETNIH UPITNIKA

### 5.4.1. Opis populacije istraživanih mačaka

Krv je prikupljena od 189 mačaka redovitih pacijenata 20 veterinarskih ambulanti s 13 lokacija na području Republike Hrvatske (Tablica 10.). Ukupno je pretraženo 112 (59,3%) ženskih i 77 (40,7%) muških mačaka. Kastrirano je bilo 25% (40/160) mačaka, dok za ostale nije bilo podataka. Raspon dobi svih 189 mačaka pretraženih u ovom istraživanju bio je od četiri mjeseca do 16 godina (prosjeak 32 mjeseca, medijan 27 mjeseci, mod 12 mjeseci). Mačke stare  $\leq 36$  mjeseci činile su 76,2% (144/189) pretraženih mačaka, od kojih je više od pola (76/189; 40,2%) bilo u dobnoj kategoriji  $\leq 12$  mjeseci. Samo su četiri (2,1%) mačke pripadale određenim pasminama, dok ih je 185 (97,9%) bilo križanih.

Za 156 (82,5%) mačaka vlasnik je bio poznat, dok 33 (17,5%) mačke nisu imale vlasnika (25 živjelo na ulici, osam smještenih u udruge). Od 156 mačaka s vlasnikom, njih 30 (19,2%) je živjelo strogo u kući, dok su ostale mogle izlaziti i van. Od 189 mačaka, njih 137 (72,5%) živjelo je na području gradova, dok su ostale živjele na selu. Od 156 vlasničkih mačaka, 92 (59,0%) su živjele u kućanstvu s jednom ili više mačaka, a 64 su živjele same. Od mačaka s vlasnikom njih 39,7% živjelo je sa psima i 9,6% s ostalim životinjama (kunići, tvorići, kornjače, miševi, konji i druge domaće životinje).

Od 189 mačaka za 35 (18,5%) mačaka naveden je mogući kontakt s divljači. Za 12 (6,3%) mačaka navedeno je da povremeno mijenjaju mjesto prebivališta.

Od 189 mačaka, četrdeset (21,2%) mačaka je u trenutku uzorkovanja bilo klinički bolesno, a 23 (12,2%) mačke su primale antimikrobnu terapiju. Ostale mačke (78,8%; 149/189) bile su bez simptoma. U kućanstvu s ljudima oboljelim od BMO-a živjelo je deset pretraženih mačaka (5,3%), od kojih je samo jedna bila akutno bolesna. Buhama je bilo invadirano 33,3% pretraženih mačaka (63/189), krpeljima 3,2% (6/189), a šugarcima 2,1% (4/189). Ukupno 86 (45,5%) mačaka bilo je tretirano protiv ektoparazita u posljednja tri mjeseca. Kod 17 (9,9%) mačaka u izmetu su uočeni crijevni paraziti (gliste i trakavice), a kod sedam (3,7%) mačaka kožne promjene uzrokovane dermatofitima.

Trideset i devet (20,6%) mačaka testirano je na retrovirusne zarazne bolesti mačaka (FIV i FeLV). Kod jedne mačke (0,5%) utvrđeni su pozitivni rezultati testa za oba uzročnika, kod jedne (0,5%) je dokazan virusni antegen za FeLV virus, dok su kod četiri (2,1%) mačke otkrivena specifična protutijela za virus FIV-a. Za 35 (18,5%) mačaka navedeno je da su cijepljene protiv zaraznih bolesti mačaka. Niti jedna od 189 pretraživanih mačaka nije primala transfuziju krvi.

S obzirom na samo jedan uzorak s dokazanom bakterijom *B. henselae* iz krvi uginulih mačaka, kao i nedostak nekih ključnih podataka, podaci prikupljeni iz anketnih upitnika uginulih mačaka izuzeti su od statističke obrade s ciljem utvrđivanja čimbenika rizika koji bi mogli utjecati na infekciju mačaka bakterijama roda *Baronella* sp. Kod uginulih mačaka uzeta je u obzir jedino primjena antimikrobne terapije, koja bi mogla biti čimbenik povezan s rezultatom izdvajanja bakterija roda *Bartonella* sp. iz krvi uginulih mačaka. Naime, analizom Upitnika utvrđeno je da je 46,5% (40 od 86) mačaka za koje postoje podaci primalo antimikrobnu terapiju.

#### **5.4.2. Određivanje čimbenika rizika za infekciju mačaka bartonelama**

Kako bi se odredili potencijalni čimbenici rizika za infekciju mačaka bakterijom *B. henselae* (zavisna varijabla), individualno su procjenjivane slijedeće nezavisne varijable iz ispunjenih anketnih upitnika 189 uzorkovanih mačaka: pasmina (križana – čistokrvna), spol (muško – žensko), dob (u mjesecima), postojanje vlasnika (ima –

nema), pristup vanjskom svijetu (izlazi – ne izlazi van), tip naselja (grad – selo), područje (13 lokacija), prisutnost ektoparazita - buha, krpelja, šugaraca (ima - nema), tretiranje protiv ektoparazita (tretirana – nije tretirana), zdravstveno stanje (zdrava – bolesna), primjena antimikrobnih pripravaka (prima – ne prima), prisutnosti crijevnih parazita (uočeni – nisu uočeni), prisutnost dermatofita (ima – nema znakova), rezultati pretraga na FIV i FeLV (pozitivna – negativna), cijepljeni status (cijepljena – nije cijepljena), transfuzija krvi (ikad – nikad), druge mačke u kućanstvu (ima – nema), psi u kućanstvu (ima – nema), druge životinje u kućanstvu (ima – nema), promjena mjesta boravka (putuje – ne putuje) i prisutnost BMO-a u kućanstvu (ima – nema). Povezanost je smatrana statistički značajnom pri vrijednosti  $p < 0,05$ , a točne p - vrijednosti za svaki parametar navedene su u tekstu i Tablici 14.

Od 189 pretraženih mačaka, iz 31 mačke izdvojeni su izolati *Bartonella* sp. uzgojem krvi na hranjivim podlogama te identificirani PCR-om gena 16SrRNA i ITS (16S-23S). Utvrđena je prevalencija infekcije mačaka od 16,4% (31/189; CI 11,1 -21,7) (Tablica 14.). Prema rezultatu sekvenciranja izolata MLST metodom na više genskih lokusa, mačke su podijeljene na dvije skupine: *B. henselae* - negativne i *B. henselae* - pozitivne.

#### **5.4.2.1. Univarijantna analiza čimbenika rizika**

Univarijantnim testom identificirano je nekoliko čimbenika rizika za infekciju mačaka bakterijom *B. henselae*. Od svih analiziranih parametara utvrđeno je da su samo područje, dob i prisutnost crijevnih parazita statistički značajno povezane s bakterijemijom mačaka ( $p < 0,05$ ). Za ostale parametre nije utvrđena statistički značajna povezanost ( $p > 0,05$ ). Za svaku varijablu izračunat je i omjer izgleda (OR) s rasponom pouzdanosti (95% CI), koji govori o snazi, smjeru i širini povezanosti određenog čimbenika s infekcijom mačaka. Omjeri izgleda (OR), rasponi pouzdanosti (95% CI) i p-vrijednosti za sve parametre univarijantne analize prikazane su u Tablici 14.

Uzorci su prikupljeni u 20 veterinarskih ambulanti sa 13 različitih lokacija na području Republike Hrvatske. Prevalencija infekcije utvrđena prema lokacijama razlikovala se te je iznosila redom 66,7% (2/3) za mačke u Zaboku, 50,0% (5/10) u Rijeci, 50,0% (1/2) u Vinkovcima, 40,0% (8/20) u Puli, 30,4% (7/23) u Jastrebarskom,

16,7% (1/6) u Varaždinu, 11,1% (1/9) u Dubrovniku, 10,0% (1/10) u Bjelovaru i 8,8% u Zagrebu (5/57). Bakterije roda *Bartonella* sp. nisu izdvojene iz uzoraka mačaka na četiri lokacije (Velika Gorica, Split, Osijek i Vukovar) te je zbog toga utvrđena statistički značajna povezanost infekcije mačaka i područja ( $p=0,007$ ; OR = 1,129, CI 1,021 – 1,249). Analizom svakog uzorkovanog područja zasebno, nije utvrđena statistički značajna povezanost neke lokacije s bakterijemijom mačaka ( $p>0,05$ ).

Za dob, univarijantna analiza je pokazala da se prevalencija infekcije bakterijom *B. henselae* smanjuje s porastom dobi mačaka i trend je pokazao statističku značajnost ( $p=0,0047$ ; OR = 0,985, CI 0,974 – 0,997). Inficirane mačke prosječno su bile stare 16 mjeseci (medijan 11 mjeseci, mod 12 mjeseci), s rasponom dobi od pet mjeseci do pet i pol godina. Međutim značajno viša prevalencija zabilježena je u skupini mačaka je u prvoj godini života i iznosila je 25,0% (19/76; CI 16,5–36,0), a u skupini mačaka od 13 do  $\leq 36$  mjeseci 14,7% (10/68; CI 8,1-25,3). Usporedbom prevalencija između tih dviju dobnih skupina utvrđeno je da su mačke starije od 13 mjeseci imale upola manje izgleda za bakterijemiju u odnosu na mlađe mačke starosti  $\leq 12$  mjeseci (OR = 0,517; CI 0,221 – 1,208). U starosnoj skupini od 37 do  $\leq 72$  mjeseci prevalencija je iznosila 7,14% (CI 1,8-24,7), te su izgledi za infekciju u toj skupini bili gotovo 80% manji (OR = 0,231; CI 0,050 – 1,065) u odnosu na prethodnu skupinu. Kako u kategoriji starijih od šest godina nije bilo mačaka inficiranih bartonelama, nije utvrđena povezanost (OR = 1).

Prisutnost crijevnih parazita (gliste i trakavice) treći je parametar kod kojeg je utvrđena statistički značajna razlika ( $p=0,0279$ ) u prevalenciji infekcije bakterijom *B. henselae* između skupina invadiranih crijevnim parazitima (35,3%, CI 16,7 – 59,8) i mačaka bez crijevnih parazita (14,5%, CI 10,0 – 20,7). S obzirom na snagu povezanosti, mačke invadirane crijevnim parazitima imale su trostruko veće izgleda za bakterijemiju uzrokovanu bakterijom *B. henselae* u odnosu na neinvadirane mačke (OR= 3,207; CI 1,088 – 9,457).

Nadalje, prevalencija infekcije bila je značajno viša u mačaka s primorskih lokacija u odnosu na kontinentalne ( $p=0,0191$ ). Među 139 pretraženih mačaka s devet kontinentalnih lokacija bakterija *B. henselae* je izdvojena iz njih 17 (12,2%; CI 7,7 - 18,9%), a među 50 pretraženih mačaka na četiri primorske lokacije iz 14 mačaka (28,0%; CI 15,99 - 40,65%). Izgledi za infekciju mačaka s primorskih lokacija bili su

dva i pol puta veći u odnosu na mačke s kontinentalnih područja (OR = 2,592; CI = 1,150 – 5,838).

Razdoblje uzorkovanja također se pokazalo statistički značajnim čimbenikom za infekciju mačaka bartonelama. Sve inficirane mačke bile su uzorkovane u periodu od rujna do svibnja, dok kod mačaka uzorkovanih od lipnja do kolovoza nisu dokazane bartonele. Utvrđeno je da su mačke učestalije bile inficirane bakterijom *B. henselae* u periodu od siječnja do travnja (21,7%, CI 14,68 -30,63), nego od svibnja do prosinca (8,54%, CI 4,1 -16,97%) i razlika je bila statistički značajna ( $p=0,0148$ ). Najveći broj mačaka s dokazanom infekcijom zabilježen je u travnju (35,5%; 11/31), većinom na području Pule i Rijeke (10/11) te jednom u Bjelovaru. Univarijantna analiza pokazala je da su mačke uzorkovane od svibnja do prosinca imale za dvije trećine manje izgleda za infekciju bakterijom *B. henselae* u odnosu na skupinu mačaka uzorkovanih od siječnja do travnja (OR = 0,337; CI = 0,137 – 0,830).

Na osnovu rezultata univarijantne logističke regresije nije utvrđena statistički značajna povezanost ostalih parametara s infekcijom mačaka bartonelama. Između dva tipa pasmine vjerojatnost za infekciju čistokrvnih mačaka (25,0%, CI 3,28 – 76,59) bila je veća u odnosu na križane (16,2%, CI 11,54 – 22,31), međutim razlika nije bila statistički značajna ( $p=0,6397$ ; OR = 1,722, CI 0,173 – 17,120). Učestalost infekcije mačaka bila je viša kod muškog (22,1%, CI 14,13 – 32,79), nego kod ženskog spola (12,5%, CI 7,51 – 20,09). Međutim spol također nije bio statistički značajan čimbenik rizika za infekciju iako su ženske mačke imale upola manje izgleda za infekciju u odnosu na muški spol ( $p=0,0814$ ; OR = 0,504, CI 0,232 – 1,097).

Što se tiče načina života, prevalencija infekcije bila je viša u skupini mačaka bez vlasnika (21,2%, CI 10,4 – 38,46) u odnosu na mačke s vlasnikom (15,4%, CI 10,49 – 22,00), kao i kod mačaka koje izlaze van (17,0%, CI 11,87 – 23,70) u odnosu na strogo kućne mačke (13,3%, 5,05 – 30,80). Utvrđeno je da mačke koje izlaze imaju za 30% veće izgleda za bakterijemiju u odnosu na strogo kućne mačke, ali povezanost nije bila statistički značajna ( $p=0,6216$ ; OR= 1,330, CI 0,429 – 4,121). Za mačke koje žive s vlasnicima utvrđeno je da imaju za trećinu manje izgleda biti inficirane bartonelama u odnosu na mačke bez vlasnika (iz udruga ili s ulice), međutim razlika nije bila statistički značajna ( $p=0,4127$ ; OR = 0,675; CI 0,264 – 1,731). Nadalje, nije utvrđena statistički

značajna povezanost infekcije bakterijom *B. henselae* i mjesta stanovanja mačaka ( $p=0,8364$ ; OR = 1,094, CI 0,467 – 2,562), jer je uočena podjednaka zastupljenost inficiranih mačaka u obje skupine, u gradu (16,1%, CI 10,77 – 23,26) i na selu (17,3%, CI 9,20 – 30,18). Također nije utvrđena statistički značajna povezanost infekcije bakterijom *B.henselae* i putovanja ( $p=0,1138$ ; OR = 1,0), jer inficirane mačke nisu mijenjale mjesto boravka.

Podaci o učestalosti i izgledima za infekciju mačaka invadiranih ektoparazitima (uključujući buhe, krpelje i šugarce) te svakoj od vrsta posebno navedeni su u Tablici 14. S obzirom na invadiranost buhama, bakterijom *B. henselae* gotovo dvostruko učestalije su bile inficirane mačke invadirane buhama (22,2%, CI 13,56 – 34,22) u odnosu na mačke bez buha (13,5%, CI 8,52 – 20,71), no razlika nije bila statistički značajna ( $p=0,1275$ ; OR = 1,832, CI 0,837 – 4,011). Nije utvrđena niti statistički značajna povezanost infekcije mačaka bartonelama i upotrebe proizvoda protiv ektoparazita, jer su netretirane mačke bile samo neznatno učestalije inficirane (17,5%; CI 11,25 – 26,13) u odnosu na tretirane mačke (15,1%; CI 8,94 – 24,41). Međutim univarijantna analiza pokazala je da tretiranje mačaka protiv ektoparazita ima blagi zaštitni učinak protiv infekcije mačaka bakterijom *B.henselae* ( $p=0,6635$ ; OR = 0,841, CI 0,386 – 1,833).

U pogledu suživota s drugim mačkama (od jedne do trinaest), iako je infekcija bartonelama dokazana malo češće u mačaka koje žive s drugim mačkama (17,8%, CI 11,48 – 26,62) nego u mačaka koje žive same (14,8%, CI 8,73 – 23,90), nije utvrđena statistički značajna povezanost infekcije bakterijom *B.henselae* i prisutnosti drugih mačaka u kućanstvu ( $p=0,5733$ ; OR = 1,251, CI 0,574 – 2,726). Nije utvrđena statistički značajna povezanost infekcije bakterijom *B. henselae* niti za mačke koje žive sa psima ili drugim životinjama (domaće životinje, kunići, tvorići, miševi i kornjače), kao ni za mačke za koje je naveden mogući kontakt s divljači. P-vrijednosti, OR i 95% CI vrijednosti za navedene čimbenike prikazani su u Tablici 14.

S obzirom na zdravstveno stanje, bakterijom *B. henselae* bilo je inficirano 18,8% (CI 13,26 – 25,95) asimptomatskih mačaka i 7,5% (CI 2,41 – 21,00) klinički bolesnih mačaka. Temeljem toga nije utvrđena statistički značajna povezanost infekcije bakterijom *B. henselae* i kliničkog oboljenja mačaka, odnosno izgledi da mačke budu

kulturelno pozitivne na bakteriju *B. henselae* bili su za 70% manji u bolesnih mačaka ( $p=0,0877$ ; OR = 0,350, CI 0,101 – 1,218). Od tri simptomatske mačke inficirane bakterijom *B. henselae*, dvije su bile akutno bolesne, s promjenama općeg stanja. Jedna je pokazivala respiratorne smetnje, rane oko ušiju zbog ušnih šugaraca i invadiranost trakavicom, a druga znakove stomatitisa. Treća mačka bila je kronično bolesna sa znakovima letargije, tipičnim promjenama na koži za mačju šugu (potvrđenu mikroskopskom pretragom uzorka kože) i pozitivnim rezultatom testa na virus mačje imunodeficijencije (FIV). Zbog malog broja slučajeva nije se mogla utvrditi povezanost bartonela s točno određenim simptomima.

S obzirom na primanje antimikrobne terapije, prevalencija infekcije bakterijom *B. henselae* bila je veća u mačaka koje nisu liječene (18,1%, CI 12,89 – 24,74) u odnosu na terapiране mačke (4,4%, CI 0,6 – 25,57), jer je samo jedna mačka s dokazanom bakterijemijom primala antimikrobnu terapiju. S obzirom na osjetljivost bartonela prema antimikrobnim lijekovima možemo reći da je uočen zaštitni učinak primjene antimikrobnih lijekova na dokaz bakterijemije mačaka ( $p=0,0966$ ; OR = 0,206, CI 0,026 – 1,589), jer je univarijantna analiza pokazala da terapiране mačke imaju 80% manje izgleda da im se dokaže infekcija. Štoviše, u skupini mačaka pod terapijom njih 95,7% imalo je negativan nalaz na bartonele (22/23). Većina tih mačaka podrijetlom je s lokacija na kojima nisu dokazane bartonele, iz Osijeka (38,5%; 5/13), Velike Gorice (23,5%; 4/17), Splita (18,2%; 2/11) i Vukovara (12,5%; 1/8).

Nadalje, nije dokazana povezanost bakterijemije i infekcije virusom FeLV-a, jer nije bilo mačaka istovremeno inficiranih s oba uzročnika ( $p=0,4808$ , OR = 1,0). Značajna povezanost nije utvrđena ni sa virusom FIV-a, jer je samo jedna mačka (20,0%, CI 2,46 – 71,23) bila istovremeno inficirana bartonelama i virusom FIV-a ( $p=0,8995$ ; OR = 1,167, CI 0,110 – 12,381). Kako mačke u Hrvatskoj nisu primale transfuziju krvi, nije utvrđena njena poveznica s infekcijom ( $p=1$ ,  $p>0,05$ ). Nije utvrđena ni povezanost infekcije vrstom *B. henselae* i prisutnosti kožnih dermatofita, jer nije bilo mačaka istovremeno inficiranih dermatofitima ( $p=0,6635$ ; OR = 1,0).

Utvrđeno je da su izgledi za oboljenje ukućana od BMO-a više nego dvostruko veći ( $p=0,2340$ ; OR = 2,311, CI 0,564 – 9,479) ako se u kući nalaze inficirane mačke,



jer se s pojavom bolesti mačjeg ogreba u ukućana povezuje 30,0% (CI 9,87 – 62,66) mačaka s dokazanom infekcijom bakterijom *B.henselae*, dok se 15,6% (CI 10,99 – 21,79) inficiranih mačaka ne povezuje s oboljenjem od BMO-a. Ipak, razlika nije bila statistički značajna. No važno je spomenuti da je kod svih triju mačaka u kontaktu s oboljelim ljudima dokazan zoonotski sekvencijski tip ST5, kod dvije mačke iz Zaboka i jedne mačke iz Zagreba.

U Tablici 14. su navedeni parametri za koje je statističkom obradom univarijantnom logističkom regresijom određivana značajnost njihove povezanosti s dokazanom bakterijemijom mačaka. Varijable za koje je utvrđena statistički značajna povezanost ( $p < 0,05$  i OR koji ne uključuje „1,0“) smatraju se čimbenicima rizika za infekciju mačaka bakterijom *B. henselae* na području Republike Hrvatske. Međutim, nedostatak statističke značajnosti ne može se smatrati i nedostatkom međusobne povezanosti te su stoga i takve varijable uzete u obzir za interpretaciju (SZUMILAS, 2010). Kako je OR vrijednost ujedno i pokazatelj snage i smjera povezanosti između varijabli, važno ga je prikazati u rezultatima i neovisno o statističkoj značajnosti. Štoviše, 95% CI (raspon pouzdanosti) omjera izgleda (OR) smatra se čak i informativnijim u interpretaciji rezultata od same p-vrijednosti.

**Tablica 14.** Rezultati univarijantne analize čimbenika rizika za infekciju mačaka bakterijom *B. henselae* i statistička značajnost povezanosti (p-vrijednost, OR)

Parametri (čimbenici)	Pretraga na <i>B. henselae</i>		p-vrijednost	OR (95% CI)
	Pozitivna (31)	Negativna (158)		
Područje			$p=0,007$	1,129 (1,021-1,249)
Dob			$p=0,0047$	0,985 (0,974 - 0,997)
Dobne kategorije	0/12 mj.	19 (25,00%)	$P= 0,0247$	0,517 (0,221–1,208) 0,231 (0,050-1,065) 1 <b>0,356 (0,161–0,787)</b>
	13/36 mj.	10 (14,71%)		
	37/72 mj.	2 (7,14%)		
	>73 mj.	0 (0,00%)		
Pasmina	Križana	30 (16,22%)	$p=0,6397$	1,722 (0,173 – 17,120)
	Čistokrvna	1 (25,00%)		
Spol	Muški	17 (22,08%)	$p=0,0814$	0,504 (0,232 – 1,097)
	Ženski	14 (12,50%)		

Klinički znakovi	Nema	28 (18,79%)	121 (81,21%)	p=0,0877	0,350 (0,101 – 1,218)
	Bolesna	3 (7,50%)	37 (92,50%)		
Antimikrobne tvari	Ne prima	30 (18,07%)	136 (81,93%)	p=0,0966	0,206 (0,026 – 1,589)
	Prima	1 (4,35%)	22 (95,65%)		
Ektoparaziti	Nema	16 (13,33%)	104 (86,67%)	p=0,1340	1,806 (0,830 – 3,928)
	Prisutni	15 (21,74%)	54 (78,26%)		
Buhe	Nema	17 (13,49%)	109 (86,51%)	p=0,1275	1,832 (0,837 – 4,011)
	Ima	14 (22,22%)	49 (77,78%)		
Krpelji	Nema	29 (15,85%)	154 (84,15%)	p=0,2563	2,655 (0,465 – 15,175)
	Ima	2 (33,33%)	4 (66,67%)		
Šugarci	Nema	30 (16,22%)	155 (83,78%)	p=0,6397	1,722 (0,173- 17,121)
	Ima	1 (25,00%)	3 (75,00%)		
Tretiranje ektoparazita	Ne	18 (17,48%)	85 (82,52%)	p=0,6635	0,841 (0,386 – 1,833)
	Da	13 (15,12%)	73 (84,88%)		
FIV rezultat testa	Negativna	6 (17,65%)	28 (82,35%)	p=0,8995	1,167 (0,110-12,381)
	Pozitivna	1 (20,00%)	4 (80,00%)		
FeLV rezultat testa	Negativna	7 (20,59%)	27 (79,41%)	p=0,4808	1 -
	Pozitivna	0 (0,00%)	2 (100,00 %)		
Cijepljenje virusne bolesti	Nije	28 (18,18%)	126 (81,82%)	p=0,1669	0,422 (0,121 – 1,476)
	Cijepljena	3 (8,57%)	32 (91,43%)		
<b>Crijevni paraziti</b>	Nema	25 (14,53%)	147 (85,47%)	<b>p=0,0279</b>	<b>3,207 (1,088 - 9,457)</b>
	<b>Ima</b>	<b>6 (35,29%)</b>	<b>11 (64,71%)</b>		
Dermatofiti	Nema	31 (17,03%)	151 (82,97%)	p=0,6635	1 -
	Ima	0 (0,00%)	7 (100,00%)		
Transfuzija krvi	Ne	31 (16,40%)	158 (83,60%)	p=1 p>0,05	-
	Primala	-	-		
Način života	Ne ide van	4 (13,33%)	26 (86,67%)	p=0,6216	1,330 (0,429 – 4,121)
	Ide van	27 (16,98%)	132 (83,02%)		
Mjesto života	Grad	22 (16,06%)	115 (83,94%)	p=0,8364	1,094 (0,467 – 2,562)
	<b>Selo</b>	<b>9 (17,31%)</b>	<b>43 (82,69%)</b>		
Vlasnik	Nema	7 (21,21%)	26 (78,79%)	p=0,4127	0,675 (0,264 – 1,731)
	Ima	24 (15,38%)	132 (84,62%)		
Podrijetlo lualica	Udruga	2 (25,00%)	6 (75,00%)	p=0,7668	0,750 (0,115 – 4,898)
	<b>Ulična</b>	<b>5 (20,00%)</b>	<b>20 (80,00%)</b>		
Putovanja	Ne putuje	31 (17,51%)	146 (82,49%)	p=0,1138	1 -
	Putuje	0 (0,00%)	12 (100,00%)		
Druge mačke	Nema	13 (14,77%)	75 (85,23%)	p=0,5733	1,251 (0,574 – 2,726)
	Ima	18 (17,82%)	83 (82,18%)		
Druge životinje	Nema	30 (17,34%)	143 (82,66%)	p=0,2529	0,318 (0,040 – 2,499)
	Ima	1 (6,25%)	15 (93,75%)		
Psi	Nema	20 (15,75%)	107 (84,25%)	p=0,7289	1,154 (0,514 – 2,588)
	Ima	11 (17,74%)	51 (82,26%)		
Divljač	Nema	28 (18,18%)	126 (81,82%)	p=0,1669	0,422 (0,121,- 1,476)
	Moguć	3 (8,57%)	32 (91,43%)		
BMO ukućana	Zdravi	28 (15,64%)	151 (84,36%)	p=0,2340	2,311 (0,564 – 9,479)
	Oboljeli	3 (30,0%)	7 (70,0%)		

Godišnje doba	I - IV mj.	24 (22,4%)	83 (77,6%)	p=0,0148	0,337 (0,137 – 0,830)
	V - XII mj.	7 (8,5%)	75 (91,5%)		
Klimatsko područje	Kontinent	17 (12,2%)	122 (87,8%)	p=0,0191	2,592 (1,150 – 5,838)
	Primorje	14 (28,0%)	36 (72,0%)		

**Crveno:** statistički značajne vrijednosti ( $p < 0,05$ ); OR (omjer izgleda) i njegov 95% CI (raspon pouzdanosti). **Plavo:** statistički značajan OR (ne sadrži „1,0“). **Podobljano crno:** varijabla na koju se rezultat OR odnosi. **Podobljano plavo:** statistički značajna razlika između mačaka dobi  $\leq 12$  mj. i ostalih.

#### 5.4.2.2. Multivarijabilna analiza čimbenika rizika

Nezavisne varijable za koje je univarijantnom analizom utvrđena statistička značajna povezanost s infekcijom mačaka bakterijom *B.henselae* ( $p < 0,05$ ) potom su uključene u model multivarijabilne logističke regresije, s ciljem detaljnije provjere statističke povezanosti i složenosti odnosa navedenih varijabli i bakterijemije mačaka.

Šest čimbenika iz univarijantne analize (Tablica 14.) uključeni su u multivarijantni model na način da je ispitivana statistička značajnost ( $p$ , 95% CI) i snaga povezanosti (OR) svake nezavisne varijable odabirane za korištenje u konačnom modelu. Pojedine varijable izuzete su iz modela sistemom eliminacije u svakom koraku kada nisu pokazale statistički značajnu povezanost. Postupkom odabira modela složeni su parovi varijabli za koje se pretpostavljao njihov međusobni učinak i konstruiran je konačni model učinaka za pretraživanje multivarijabilnom logističkom regresijom.

Varijable čiji smo učinak kontrolirali multivarijabilnom analizom bile su crijevni paraziti, dobna kategorija, područje, klimatski uvjeti i razdoblje uzorkovanja (Tablica 15.). U prvom modelu „kontrolirajući učinak dobne kategorije“ svim parovima varijabli utvrđena je statistički značajna povezanost. U ostalim modelima (kontrolirajući učinak područja, godišnjeg doba i klime) određivana je statistička značajnost i snaga povezanosti varijabli s infekcijom mačaka. U svim modelima najviše OR vrijednosti i najniže  $p$  – vrijednosti utvrđene multivarijabilnom logističkom regresijom pokazale su da je prisutnost crijevnih parazita čimbenik rizika najsnažnije povezan s infekcijom mačaka bartonelama.

Najveća snaga povezanosti čimbenika prisutnosti crijevnih parazita i infekcije mačaka bakterijom *B.henselae* pri kojoj je utvrđena statistička značajnost povezanosti uočena je u modelu 1 nakon kontroliranja učinka dobne kategorije ( $p = 0,0119$ ; OR =

4,241, CI 1,243 – 14,47) te u modelu 2 nakon kontroliranja učinka godišnjih doba ( $p=0,034$ ; OR = 3,410, CI 1,095 – 10,177). Još snažnija povezanost utvrđena je u modelu 4 nakon kontroliranja učinka područja (OR = 7,011, 95% CI 0,863 – 56,971) te pokazuje da su izgledi za infekciju sedam puta veći kod mačaka invadiranih crijevnim parazitima u odnosu na neinvadirane mačke ( $p = 0,0337$ ).

Prikaz sva četiri multivarijabilna modela, parovi varijabli i rezultati interakcija (OR i 95% CI, p-vrijednost) dobiveni multivarijabilnom analizom pomoću „stepwise selection“ postupka prikazani su u Tablici 15.

**Tablica 15.** Rezultati multivarijabilne analize čimbenika rizika povezanih s infekcijom mačaka bakterijom *B. henselae*

<b>Model</b>	<b>OR (95% CI)</b>	<b>p-vrijednost</b>
<b>Model 1 (kontrolirajući dobnu kategoriju)</b>		
Crijevni paraziti / dobna kategorija	<b>4,241 (1,243 – 14,47)</b>	<b>0,0119</b>
Područje / dobna kategorija	<b>1,125 (1,014 – 1,249)</b>	<b>0,0257</b>
Godišnje doba / dobna kategorija	<b>0,396 (0,159 – 0,987)</b>	<b>0,0395</b>
Klimatsko područje / dobna kategorija	<b>2,567 (1,114 – 5,915)</b>	<b>0,0216</b>
<b>Model 2 (kontrolirajući godišnje doba)</b>		
Crijevni paraziti / godišnje doba	<b>3,410 (1,095 – 10,177)</b>	<b>0,034</b>
Područje / godišnje doba	1,075 (0,966 – 1,196)	0,182
Klimatsko područje / godišnje doba	1,991 (0,837 – 4,733)	0,112
<b>Model 3 (kontrolirajući klimatsko područje)</b>		
Crijevni paraziti / klimatsko područje	3,029 (0,974 – 9,422)	<b>0,044</b>
Područje / klimatsko područje	1,074 (0,925 – 1,248)	0,345
<b>Model 4 (kontrolirajući područje)</b>		
Crijevni paraziti / područje	7,011 (0,863 – 56,971)	<b>0,0337</b>

**Podebljano:** statistički značajno ( $p$ -vrijednosti  $<0,05$ ; OR ne sadrži „1,0“).

#### 5.4.3. Analiza anketnih upitnika uginulih mačaka

Jedina uginula mačka s dokazanom bakterijemijom (1,1%; 1/90) uzorkovana u sekcionoj dvorani Zavoda za patologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu s područja je

Zagreba, ženskog spola, križane pasmine, kastrirana, stara deset godina i imala je vlasnika. Naglo je uginula bez prethodnog liječenja te nije primala antimikrobnu terapiju. U anamnezi nisu bili navedeni simptomi, a buhe su pronađene. Na obdukciji sluznice su bile cijanotične i suhe, bila je vidljiva opća dehidracija i adipoznost, a limfni čvorovi bili su smanjeni. Navodi se uginuće zbog zatajivanja rada srca (hipertrofija miokarda).

Za ostale pretražene uginule mačke (89/90; 98,9%) nisu utvrđivani čimbenici rizika. Nije naodmet spomenuti da je u anketnim upitnicima navedeno da je 33,3% (23/69) pretraživanih mačaka za koje imamo podatke prije uginuća bilo liječeno antimikrobnim pripravcima, što je moglo utjecati na dobivene rezultate pretraživanja.

## 6. RASPRAVA

Iako su poznate još od davnina, bakterije roda *Bartonella* značajnije se istražuju tek od 1990. godine, usporedno sa razvojem molekularnih metoda (KOSOY i sur., 2012). Danas je bakterija *B. henselae* najistraživanija i javnozdravstveno najznačajnija vrsta bartonela, a domaće mačke širom svijeta glavni su rezervoari uzročnika (BREITSCHWERDT, 2017). Do sada u Republici Hrvatskoj nisu provedena istraživanja utvrđivanja učestalosti infekcija uzrokovanih bartonelama u mačaka, a jedini molekularni dokaz vrste *B. henselae* u mačaka pružili su STEPANIĆ i sur. (2018, 2019).

Bez obzira na razvoj dijagnostičkih postupaka za dokazivanje bakterije *B. henselae* u zadnjih trideset godina, dijagnostika je i danas izazovna i složena, a primjenjuju se uzgoj na hranjivim podlogama, serološko dokazivanje protutijela i molekularne metode (GUTIÉRREZ i sur., 2017; KOSOY i sur., 2018). Unatoč razvoju novih metoda, izdvajanje bakterija iz krvi uzgojem na hranjivim podlogama još uvijek predstavlja „zlatni standard“ dijagnostike bartonela u mačaka (FABBI i sur., 2004; GUTIÉRREZ i sur., 2017).

Istraživanja utvrđivanja prevalencije infekcije bakterijama roda *Bartonella* uzgojem krvi mačaka na hranjivim podlogama provedena su u brojnim državama svijeta, a izdvojene su vrste *B. henselae* i *B. claridgeiae* te u pojedinim slučajevima *B. koehlerae*. Međutim, na području jugoistočne Europe do sada nisu zabilježena takva istraživanja (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018). Ovisno o karakteristikama populacije mačaka, u svijetu su utvrđene velike razlike u prevalenciji infekcije mačaka bakterijama roda *Bartonella* spp. (GIL i sur., 2013).

Sadašnjim istraživanjem učestalosti infekcije bartonelama u populaciji mačaka s različitih područja Republike Hrvatske u razdoblju od 2014. do 2017. godine, uzgojem na hranjivim podlogama dokazali smo infekciju vrstom *B. henselae* u 11,5% (32/279) mačaka. Znatno veća učestalost infekcije utvrđena je u živih mačaka i iznosila je 16,4% (31/189), u odnosu na uginule mačke (1,1%; 1/90).

Mačke su bile redoviti pacijenti 20 veterinarskih klinika, uzorkovane na 13 različitih lokacija, za istraživanje birane nasumičnim odabirom. Dobiveni rezultati su

unutar raspona učestalosti ustanovljene u prijašnjim istraživanjima na mačkama metodom uzgoja na hranjivim podlogama. U Europi su gotovo jednaku učestlost od 16,5% (72/436) dokazali GURFIELD i sur. (2001) kod mačaka uzorkovanih u veterinarskim klinikama na području Pariza. Za razliku od sadašnjeg istraživanja, vrstom *B. henselae* bilo je inficirano manje mačaka (11,2%), jer je dokazana i vrsta *B. clarridgeiae* (3,4%), te istovremene infekcije s obje vrste u 1,8% mačaka. Slične rezultate utvrdili su i JOSEPH i sur. (1997) u Novom Zelandu, dokazom bakterije *B. henselae* kod 17% pretraženih mačaka s područja grada Aucklanda.

No u drugim istraživanjima u Europi uočeno je da je učestalost infekcije samo za vrstu *B. henselae* u populaciji mačaka redovitih pacijenata veterinarskih klinika uglavnom niža od utvrđene u ovom istraživanju. PONS i sur. (2005) u Španjolskoj su izdvojili bakteriju iz 7% pretraženih mačaka, a CHALONER i sur. (2011) u Velikoj Britaniji 5,4% (96/1782). U Njemačkoj su 13% inficiranih mačaka identificirali SANDER i sur. (1997) u Freiburgu, a samo 2,0% (10/507) MIETZE i sur. (2011) na području osam gradova. Višu učestalost infekcije vrstom *B. henselae* od utvrđene u ovom istraživanju na populaciji mačaka sličnih karakteristika ustanovili su jedino CHOMEL i sur. (2002) u Danskoj (22,6%) i SIĞIRCI i ILGAZ (2013) u Istanbulu u Turskoj (28,1%).

U ovom istraživanju po prvi puta dokazana je bakterija *B. henselae* u mačaka na području Republike Hrvatske. Utvrđena je statistički značajna povezanost infekcije bartonelama i područja ( $p=0,007$ ), jer je *B. henselae* dokazana na devet (69,2%) od 13 lokacija. Istovremeno nije dokazana u svega četiri (30,8%) grada (Osijek, Split, Velika Gorica i Vukovar), dok je drugdje učestalost infekcije varirala od 8,8% u Zagrebu do 66,7% u Zaboku. Razlike u prevalenciji mačaka ovise o raznim čimbenicima, a najznačajniji za spomenuti su invadiranost buhama, starost životinja, klimatski uvjeti, način života (kućna ili ulična) i podrijetlo (KAMRANI i sur., 2008; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018).

Nije u potpunosti jasno zašto su dobiveni rezultati toliko različiti, no za naglasiti je razliku u broju pretraženih mačaka, odnosno heterogenost istraživane populacije mačaka. Nadalje, ista ili slična istraživanja nisu provedena u Hrvatskoj stoga nije moguće usporediti i komentirati učestalost. Također možemo isključiti i značaj porijekla

mačaka, pošto su bile podjednako inficirane, a učestalija infekcija ruralne populacije za 1,2% u odnosu na urbanu nije bila statistički značajna ( $p=0,8364$ ). U prilog navedenoj pretpostavci ukazuju i serološka istraživanja ljudi kojima nisu dokazane razlike između urbane i ruralne populacije (PANDAK i sur., 2009; VILIBIĆ-ČAVLEK i sur., 2012).

Osim toga nisu bile statistički značajne ni razlike u prevalenciji između mačaka bez vlasnika (21,2%; 7/33) i mačaka koje žive s vlasnicima (15,4%; 24/156) te između mačaka u doticaju s vanjskim svijetom (17,0%; 27/159) i strogo kućnih mačaka (13,3%; 4/30). Rjeđu pojavu bakterijemije u strogo kućnih mačaka ustanovili su i ROLAIN i sur. (2004). Veća razlika u prevalenciji između uličnih (18,6%; 8/43) i kućnih (5,8 %; 18/313) mačaka zabilježena je i u Kini (YUAN i sur., 2011), a još veća u Berlinu (Njemačka), 1% kod kućnih (1/97) i 18,7 % (18 /96) kod uličnih mačaka (ARVAND i sur., 2001). Za razliku od nas, MAZUREK i sur. (2020) su statistički značajno povezali infekciju mačaka i način života koji uključuje doticaj s vanjskim svijetom.

Ipak, u brojnim istraživanjima dokazano je da su ulične mačke te mačke smještene u različita prihvatilišta (skloništa, udruge) učestalije inficirane bartonelama u odnosu na kućne mačke (CHOMEL i KASTEN, 2010; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018). Najnižu učestalost infekcije u populaciji napuštenih mačaka ustanovili su AZZAG i sur. (2012) izdvajanjem bakterije *B. henselae* iz 17% gradskih uličnih mačaka u Alžiru. FABBI i sur. (2004) izdvojili vrstu *B. henselae* iz 18% mačaka lotalica u Italiji, BERGMANS i sur. (1997) iz 22% mačaka iz skloništa u Nizozemskoj. No daleko najvišu učestalost infekcije utvrđenu metodom uzgoja na hranjivim podlogama ustanovili su u Francuskoj LA SCOLA i sur. (2002) kod 62% mačaka lotalica iz jedne vojne baze i HELLER i sur. (1997) kod 53% gradskih uličnih mačaka, a dokazane su vrste *B. henselae* i *B. clarridgeiae*. Kako je populacija mačaka u ovom istraživanju mješovita, a prevladavaju mačke koje žive sa vlasnicima (82,5%), ne možemo u potpunosti isključiti utjecaj načina života na navedene razlike u prevalenciji mačaka. Razlike u prevalenciji između kućnih i nezbrinutih mačaka zasigurno su posljedica nedostatka primjerene skrbi u pogledu prehrane, zdravstvene zaštite, a osobito kontrole buha (SRISANYONG i sur., 2016; ZHANG i sur., 2021).

No razlike između područja ipak možemo povezati s klimatskim karakteristikama uzorkovanih lokacija, jer je razlika u prevalenciji na četiri primorske



lokacije (28,0%) u odnosu na devet kontinentalnih područja (12,2%) bila statistički značajna ( $p=0,0191$ ). Od četrnaest mačaka s primorskih područja, infekcija bakterijom *B. henselae* utvrđena je u osam mačaka iz Pule, pet mačaka iz Rijeke i jedne mačke iz Dubrovnika. Razlike u prevalenciji među različitim područjima unutar iste države već su ustanovljene u drugim istraživanjima, jer su topla i vlažna klimatska područja pogodna za razmožavanje buha, zbog čega su mačke češće invadirane, a posljedično i učestalije inficirane bartonelama (SIĞIRCI i ILGAZ, 2013). GUPTILL i sur. (2004) i NAMEKATA i sur. (2010) su otkrili u SAD-u višu prevalenciju kod mačaka invadiranih buhama u toplim i vlažnim područjima (Florida i Kalifornija), nego u Washingtonu, Chicagu i Michiganu. Viša prevalencija infekcije mačaka uočena je i u drugim mediteranskim državama Europe (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018), zbog čega je za očekivati da je prosječno toplija klima na obali Jadrana zasigurno povoljnija za razvoj mačjih buha u većem dijelu godine.

Nadalje, razlike između mačaka možemo povezati i s vremenom uzorkovanja, jer su mačke uzorkovane od siječnja do travnja bile značajno učestalije inficirane bakterijom *B. henselae* (22,4%) u odnosu na uzorkovane od svibnja do prosinca (8,5%) ( $p=0,0148$ ). Zanimljivo je primijetiti da među mačkama uzrokovanim od lipnja do kolovoza nije dokazano inficiranih mačaka. Najviša učestalost infekcije zabilježena je u travnju (35,5%), a potom u siječnju (16,1%) i ožujku (16,1%). Mačke inficirane u travnju najvećim brojem dolaze iz primorskih područje, Pule (7) i Rijeke (3), a jedna dolazi iz Bjelovara. ZHANG i sur. (2021) također su zabilježili su najvišu prevalenciju u proljeće, ali bez statističke značajnosti. Takav rezultat možemo povezati s toplijom klimom pogodnom za život buha na području grada Pule i Rijeke. Nasuprot tome, mačke iz Velike Gorice, Osijeka i Vukovara najvećim dijelom uzorkovane su u ljetnim mjesecima, što se u ovom istraživanju ne povezuje s infekcijom bartonelama. Takav se nalaz podudara se i sa sezonalnošću infekcije bakterijom *B. henselae* kod ljudi i pojavom bolesti mačjeg ogreba u Hrvatskoj (od kolovoza do ožujka) i Francuskoj (od rujna do travnja), jer su mačke u jesen i zimi češće s vlasnicima u kući (VILIBIĆ-ČAVLEK i sur., 2012).

Iako je invadiranost buhama najčešće povezivan čimbenik sa infekcijom mačaka bartonelama, jer je mačja buha *C. felis* dokazana kao glavni vektor u prijenosu bartonela

(CHOMEL i sur., 1996), u ovom istraživanju nismo ga značajno povezali s infekcijom mačaka ( $p=0,1275$ ). CHOMEL i sur. (1995) utvrdili su da je 90,5% mačaka inficiranih bakterijom *B. henselae* invadirano buhama, a u ovom istraživanju samo 22,2%. Slične rezultate ustanovili su GIL i sur (2013), koji također nisu statistički povezali infekciju mačaka i invadiranosti buhama. Nasuprot tome, GUPTILL i sur. (2004), SIĞIRCI i ILGAZ, (2013) i RAIMUNDO i sur. (2019) utvrdili su invadiranost buhama *C. felis* kao čimbenik rizika za infekciju mačaka bartonelama, dok su GURFIELD i sur. (2001) značajno povezali invadiranost buhama sa dokazom protutijela.

U ovom istraživanju nije utvrđena statistički značajna povezanost bakterije *B. henselae* ni s invadiranošću krpeljima ili šugarcima, jer su krpelji pronađeni samo kod dvije (6,4%), a šugarci kod jedne (3,2%) mačke. Za razliku od krpelja, ne postoje eksperimentalni dokazi da su mačji šugarci *Sarcoptes scabiei* i *Notoedres cati* kompetentni vektori u prijenosu bartonela, iako je bakterija *B. henselae* povremeno izdvojena iz ljudi nakon prijenosa šugarca (*S. scabiei* ili *N. cati*) s mačaka (KAUFMAN i sur., 2017). Zanimljivo je da su ponekad ušni šugarci *Otodectes cynotis* češće dokazivani na mačkama od mačjih buha u Europi (BEUGNET i sur., 2014) ili na divljim felidima u SAD-u (YAMAMOTO i sur., 1997) te ih se također preporuča imati u vidu kao potencijalne vektore bartonela.

Tretiranje protiv ektoparazita čimbenik je koji se u istraživanjima uglavnom statistički značajno povezuje s nižom prevalencijom infekcije mačaka, odnosno pripisuje mu se zaštitna uloga (SRISANYONG i sur., 2016; PERSICHETTI i sur., 2018; RAIMUNDO i sur., 2019; MAZUREK i sur., 2020). I u ovom istraživanju *B. henselae* je nešto učestalije dokazana kod netretiranih (17,5%) mačaka u odnosu na tretirane (15,1%), no utvrđena razlika nije bila statistički značajna. Za naglasiti je da u ovom istraživanju bartonele nisu dokazane čak kod 73 (38,6%) mačke tretirane anti-ektroparaziticima, što bi i mogao biti razlog izostanka infekcije i nedostatka statističke značajnosti. Naime, u više istraživanja dokazano je da primjena akaricida na mačkama smanjuje mogućnost infekcije bartonelama (BRADBURY i LAPPIN, 2010; BOUHSIRA i sur., 2015).

Kako je kontrola buha uglavnom otežana u kućanstvima gdje istovremeno živi više mačaka, u nekim istraživanjima suživot više mačaka utvrđen je čimbenikom rizika

pozitivno povezanim s infekcijom mačaka (GURFIELD i sur., 2001; SRISANYONG i sur., 2016). U ovom istraživanju je 18 (17,8%) inficiranih mačaka živjelo u kućanstvu s barem još jednom mačkom, a 13 (14,8%) mačaka su bile jedine, no razlika u prevalenciji nije bila statistički značajna. GUPTILL i sur. (2004) također nisu utvrdili značajnu povezanost između broja mačaka u kućanstvu i bakterijemije ili prisutnosti protutijela. BEUGNET i sur. (2014) ističu buhe u stadiju kukuljice iz okruženja mačaka kao glavni izvor invazije mačaka, što treba uzeti u obzir prilikom tretiranja mačaka protiv buha. SANDER i sur. (1997) ustanovili su da je status infekcije bartonelama kod mačaka iz istih kućanstava uglavnom uniforman, odnosno da su mačke ili pozitivne ili negativne. No ovo istraživanje ne podupire u potpunosti navedene prepostavke, jer su utvrđena kućanstva u kojima istovremeno živjele inficirane i neinficirane mačke (Zagreb, Jastrebarsko, Rijeka, Vinkovci).

Nadalje, mačke invadirane buhama češće su invadirane i crijevnim parazitima (BEUGNET i sur., 2014). Po prvi puta u ovom istraživanju utvrđena je prisutnost crijevnih parazita u mačaka kao čimbenik rizika za infekciju bakterijom *B. henselae* ( $p=0,0279$ ). Naime, infekcija je bila češća u mačaka invadiranih crijevnim parazitima (35,3%; 6/17) u odnosu na mačke bez crijevnih parazita (14,5%; 25/172) i utvrđeno je da mačke invadirane crijevnim parazitima imaju barem tri puta veće izgleda da budu inficirane bartonelama. Takav nalaz predstavlja novost, međutim previše ne iznenađuje, jer se može tumačiti različito. Veće je iznenađenje što u drugim istraživanja nije utvrđivana takva povezanost. Naime, do sada su samo PONS i sur. (2005) i RAIMUNDO i sur. (2019) razmotrili prisutnosti i odsutnosti crijevnih parazita kao čimbenik rizika, no nisu ih povezali s infekcijom bartonelama. Kako invadiranost parazitima općenito oslabljuje imunološki sustav životinje, moguće je da su mačke stoga podložnije infekciji bartonelama. S druge strane mačke invadirane buhama, vektorima u prijenosu bartonela, pretpostavljaju i smanjenu brigu vlasnika i u pogledu tretiranja crijevnih parazita. Nadalje, mačke bez vlasnika ili sa slabijom brigom vlasnika više su sklone lutanju, ostvaruju više kontakata te su zbog nedostatka prevencije i higijene izloženiije jajašcima endoparazita u okolišu, a time i mogućnosti invazije.

Prema podacima iz epizootioloških upitnika, u izmetu mačaka uočeni su obli i plosnati crvi (gliste *Toxocara cati* i trakavice *Dipylidium caninum*). Za ovo istraživanje

zanimljiva je trakavica *D. caninum*, jer s bartonelama dijeli buhe, kao prenositelje uzročnika na mačke i ljude (TRAVERSA, 2013; BEUGNET i sur., 2014; DIAKOU i sur., 2017). U ovom istraživanju je četiri od šest (66,7%) mačaka s bakterijemijom bilo istovremno invadirano buhama i crijevnim parazitima, a pet od šest mačaka bile su kućne mačke s vlasnikom. Trakavica *D. caninum* najučestalija je zoonotska trakavica pasa i mačaka. Njena prisutnost u kućnih mačaka značajna je, jer postoji mogućnost zoonotskog prijenosa (TRAVERSA, 2013; DIAKOU i sur., 2017). Međutim nije za zanemariti niti nalaz oblog crva *Toxocara cati*, najčešćeg crijevnog parazita mačaka, ponajprije zbog mogućeg zoonotskog prijenosa na djecu (TRAVERSA, 2013; BEUGNET i sur., 2014; DIAKOU i sur., 2017). Stoga je nalaz crijevnih parazita u mačaka uvijek uputno klinički povezati s mačjim buhama *C. felis*, a time i s bakterijom *B. henselae*. Temeljem toga neupitna je važnost simultanog tretiranja ektoparazita i endoparazita mačaka, kao i održavanja osnovne higijene, s ciljem prevencije prijenosa na druge životinje i ljude (BEUGNET i sur., 2014; DIAKOU i sur., 2017).

U skladu s drugim istraživanjima, statistički značajno povezali smo dob mačaka s infekcijom bartonelama ( $p=0,0047$ ), jer je infekcija bila nejednolično raspoređena među dobnim kategorijama mačaka. Poznato je da su mačke starosti do godinu dana češće inficirane bartonelama (CHOMEL i KASTEN, 2010; GUPTILL, 2010). I u ovom istraživanju bakterijemija je dokazana kod 25% (19/76) mačaka starosti do godinu dana ( $\leq 12$  mjeseci) te samo kod 10,6% (12/113) starijih, dok u starijih od šest godina nije bilo inficiranih. Nadalje, uočen je i trend smanjivanja prevalencije sa povećanjem životne dobi mačaka. Razlika u prevalenciji bila je statistički značajna između mačaka u prvoj godini života i ostalih mačaka, kod kojih je utvrđeno da imaju gotovo 65% manje izgleda da budu inficirane bakterijom *B. henselae* i odnosu na mlađe mačke (OR = 0,356).

SIĞIRCI i ILGAZ (2013) su usporedbom dobnih kategorija mačaka starosti do godinu dana (41,7%) i starijih od godinu dana (20%) također utvrdili statistički značajnu razliku. I u drugim istraživanjima je *B. henselae* češće izdvajana iz mladih mačaka, nego iz starijih (KOEHLER i sur., 1994; CHOMEL i sur., 1995; HELLER i sur. 1997; GUPTILL i sur., 2004). Takvi rezultati najčešće se pripisuju nedostatku

protutijela u akutno inficiranih mladih mačaka, jer su protutijela daleko učestalija u mačaka starije dobi (CHOMEL i sur., 1995; HELLER i sur., 1997; GUPTILL, 2010).

U ovom istraživanju najviša prevalencija utvrđena je u mačića starosti do šest ( $\leq 6$ ) mjeseci (33,3%; 6/18), a najmlađa inficirana mačka bila je stara pet mjeseci. Infekciju mladih mačaka već su opisali FLEISCHMAN i sur. (2015a), a utvrdili su veću učestalost u mačaka starosti pet do 12 mjeseci (41,1%), nego u mačića starih od šest do 17 tjedana (25,9%). Smatraju da se i mačići u toj dobi inficiraju prirodno, putem buha, jer majčinska protutijela nestaju iz cirkulacije nakon šest tjedana. CHOMEL i sur. (1995) ističu epidemiološki značaj infekcije mladih mačaka, jer se u brojnim istraživanjima upravo dob do godinu dana povezuje s oboljenjima ljudi od BMO-a, osobito kada su u pitanju djeca i mladi mačići (RIDDER-SCHRÖTER i sur., 2008).

Većina mačaka inficiranih bartonelama naizgled su zdrave (STÜTZER i HARTMANN, 2012; VARANAT i sur., 2012) te ni vlasnici ne mogu naslutiti da su inficirane bartonelama (GUPTILL, 2010). Rijetko mačke s dokazanom bakterijemijom pokazuju određene kliničke znakove, no unatoč konstantnom nastojanju istraživača, do sada u mačaka nije utvrđena klinička slika tipična za bartonele (IANNINO i sur., 2018). Štoviše, često su određeni simptomi posljedica infekcije drugim uzročnicima, a nalaz bartonela u krvi uglavnom je slučajan. Nadalje, znakovima bolesti povezanim s bartonelama najčešće nedostaje statističke značajnosti (GUPTILL, 2010; RAIMUNDO i sur., 2019). U jednom od rijetkih slučajeva gingivostomatitis je bio značajno povezan ( $p=0,001$ ) s bakterijemijom mačaka (SYKES i sur., 2010). U ovom istraživanju je *B. henselae* učestalije izdvojena iz mačaka bez simptoma (18,8%; 28/149), nego iz akutno bolesnih mačaka (7,5%; 3/40), zbog čega i nije utvrđena poveznica.

U ovom istraživanju samo su tri inficirane mačke pokazivale kliničke znakove, što je premali broj oboljelih za izvođenje pouzdanih zaključaka. Nasuprot tome, kod čak 37 (92,5%) mačaka sa simptomima bartonele nisu dokazane, zbog čega su utvrđeni čak i manji izgledi za infekciju u mačaka sa razvijenim simptomima (OR = 0,350). Jedna inficirana mačka pokazivala je znakove stomatitisa, kojeg su SYKES i sur. (2010) već prije statistički značajno ( $p=0,001$ ) povezali s bakterijemijom. Druga je pokazivala znakove otežanog disanja, što su u mačaka uočili RAIMUNDO i sur. (2019). Treća je pokazivala znakove letargije, koju su već prije uočili BREITSCHWERDT i sur.

(2015a). Međutim, za čvršće dokaze je li infekcija bartonelama slučajan nalaz, ili je povezana s kliničkim ili patoanatomskim promjenama, potreban je veći broj slučajeva, molekularni ili kulturni dokaz uzročnika u tkivima te statistička značajnost povezanosti s infekcijom mačaka (GUPTILL, 2010; SYKES i CHOMEL, 2014; BREITSCHWERDT, 2017).

Primjena antimikrobnih lijekova se smatra najznačajnijim zaštitnim čimbenikom, s utjecajem na smanjenje učestalosti kulturnog izdvajanja bakterije *B. henselae*, jer koči rast bakterija. Kako je u ovom istraživanju samo jedna (4,4%) inficirana mačka primala antimikrobne lijekove, infekcija mačaka bila je češća (18%) u neterapiranih mačaka, no razlika nije bila statistički značajna. Ni GUPTILL i sur. (2004) nisu utvrdili statističku značajnost utjecaja primjene antibiotika na kulturno izdvajanje bartonela. Zanimljivo je naglasiti da su čak 22 mačke bez dokazane infekcije u ovom istraživanju u trenutku uzorkovanja primale antimikrobnu terapiju, što znači da za 13,9% mačaka ne znamo jesu li prethodno bile inficirane bartonelama. „Zaštitni“ učinak primjene antimikrobne terapije uočen je i na primjeru ljudi s endokarditisom, jer su LA SCOLA i RAOULT (1999) uspjeli izdvojiti bartonele jedino iz pacijenata koji nisu bili liječeni.

Vratimo li se na razlike u učestalosti infekcije mačaka na 13 lokacija s utvrđenom bakterijemijom i pokušamo li ih povezati s navedenim epizootiološkim čimbenicima, u ovom istraživanju su invadirane buhama bile samo tri mačke iz primorskih područja (Rijeka), za razliku od 11 mačaka iz kontinentalnog dijela. Zbog takvog nalaza razlika u prevalenciji u primorskim i kontinentalnim područjima ne može se izravno pripistati trenutnoj invadiranosti buhama. Osim trenutne invadiranosti, i prijašnja invadiranosti buhama također se smatra važnim čimbenikom za infekciju mačaka bartonelama (GUPTILL i sur., 2004; RAIMUNDO i sur., 2019), jer je dokazano da bakterijemija mačaka može trajati još tjednima ili mjesecima poslije eliminacije buha (CHOMEL i sur., 1995), što bi za mačke s primorskih područja bilo ključno u povezivanju s s navedenim rezultatom. Nadalje, od 14 mačaka s primorskih područja šest ih nije imalo vlasnika, što podrazumijeva isključivo vanjski način života, kao i nedostatak odgovarajuće brige i tretiranja protiv buha. Od kućnih mačaka, samo jedna je živjela sama strogo u kući, dok su ostale slobodno izlazile van i živjele s još

mačaka u istom kućanstvu (od jedne do dvanaest). Dob mačaka također je rizična, jer je osam mačaka (57,1%) bilo starosti do godinu dana, dok su ostale bile starije. Kako su svi navedeni čimbenici do sada u istraživanjima povezivani s učestalijom infekcijom mačaka, i ovdje ih smatramo ključnima za razlike u prevalenciji infekcije mačaka.

Obratimo li pažnju na mačke s „negativnih“ lokacija, od 37 mačaka 13 (35,1%) je primalo antimikrobnu terapiju, a 12 (32,4%) je tretirano protiv buha. Dakle trećina mačaka bila je izložena utjecaju čimbenika sa „zaštitnim“ učinkom. Na kraju, zanimljivost predstavljaju mačke iz Splita, jedine lokacije s priobalnog područja bez dokazane bakterijemije mačaka. Štoviše, samo je jedna (0,9%) od jedanaest primala antimikrobnu terapiju, niti su bile tretirane akaricidima. Nadalje, sve su uzorkovane u mjesecu ožujku, što se također pokazalo čimbenikom sa gotovo 70% većim izgledima za infekciju. Unatoč tome, na toj lokaciji ipak nije bilo inficiranih mačaka. Međutim, činjenica da nisu bile invadirane buhama, da je samo jedna (9,1%) imala crijevne parazite, da su bile starije od godinu dana i sve osim dvije imale vlasnike, govori u prilog negativnom rezultatu pretrage.

Do sada nisu provedena istraživanja genske tipizacije bakterija roda *Bartonella* na mačkama u Republici Hrvatskoj (RH). Da bismo odredili gensku raznolikost bakterije *B. henselae*, analizirali smo izolate mačaka uzgojene na hranjivim podlogama MLST-om. MLST je danas najprihvaćenija metoda tipizacije bakterije *B. henselae*, kojom se bakterija dijeli na sekvencijske tipove (ST), prikladna za izvođenje filogenetskih analiza i epidemioloških istraživanja (IREDELL i sur., 2003; LI i sur., 2009; KOSOY i sur., 2018). MLST metoda do sada nije korištena u Hrvatskoj, a u Europi je provedena samo na populacijama mačkama u Njemačkoj (MIETZE i sur., 2011), Velikoj Britaniji (CHALONER i sur., 2011) i Španjolskoj (GIL i sur., 2013).

MLST-om smo identificirali ukupno pet različitih sekvencijskih tipova bakterije *B. henselae* iz 30 mačaka, što dokazuje popriličnu varijabilnost genotipova na području RH. Značajno je spomenuti da je jedan genotip (ST33) dokazan po prvi puta u ovom istraživanju, jer su na početku ovog istraživanja postojala 32 genotipa (GIL i sur., 2013), a danas ih je 37 (FURQUIM i sur., 2021). Prevladavao je genotip ST5 (56,7%), a potom ST6 (23,3%), koje su izdvojili i GIL i sur. (2013) u Španjolskoj. Za razliku od

ovog istraživanja, treći po učestalosti u ovom istraživanju (ST1; 13,3%) u Španjolskoj nije dokazan. Međutim ARVAND i sur. (2007) dokazali su ga kao najučestaliji (52,2%; 12/23) u mačaka sa mediteranskog područja Europe.

Dva su genotipa izdvojena svaki samo iz jedne mačke, ST24 (3,3%; 1/30), i ST33 (3,3%; 1/30) s novom kombinacijom alela. MLST profil jedne mačke nije se mogao točno odrediti, zbog nedostatka podataka o sekvencama genskog lokusa *gltA*, zbog čega je ostalo dvojbeno radi li se o genotipu ST5 ili ST24. Rezultati ovog istraživanja jasno ukazuju na gensku heterogenost bakterije *B. henselae* kod prirodno inficiranih mačaka u Republici Hrvatskoj, koja je u skladu s ostalim MLST istraživanjima u Europi.

Najveću gensku raznolikost u jednom istraživanju utvrdili su u Njemačkoj MIETZE i sur. (2011). Iz 39 mačjih izolata bakterije *B. henselae* dokazali su 16 različitih sekvencijskih tipova na području osam gradova, od kojih je 11 bilo potpuno novih (ST16 do ST26). CHALONER i sur. (2011) su u Velikoj Britaniji iz 98 mačaka otkrili 12 različitih ST-ova, od kojih su tri bila nova (ST27, ST28 i ST29). GIL i sur. (2013) su u Španjolskoj iz 39 mačaka otkrili osam različitih ST-ova, među kojima su ST31 i ST32 bili novi. U Španjolskoj su u mačaka prevladavali ST5, ST6 i ST9, u Velikoj Britaniji ST4, ST6 i ST7, a u Njemačkoj ST5 i ST7. Evidentno je da su genotipovi ST5 i ST6 najučestaliji u mačaka u Europi, što je u potpunosti u skladu s ovim istraživanjem.

Međutim raznolikost genotipova nije jednako izražena u svim dijelovima svijeta, jer su u Aziji izolati mačaka u pravilu manje heterogeni i uglavnom dominira ST1 (GIL i sur., 2013). Po tri različita ST-a dokazali su YANAGIHARA i sur. (2010) u Japanu (ST1, ST6 i novi ST15) i ZHAO i sur. (2011) u Kini (ST1, ST9 i novi ST30), dok su YUAN i sur. (2011) u Kini otkrili četiri različita ST-a (ST1 i tri nova, ST16, ST17 i ST18).

Sveukupno ST5, ST1 i ST6 sačinjavaju 93,3% svih ST-ova u Hrvatskoj. Sva tri genotipa već su otkrivena kod mačaka u Europi, Sjevernoj Americi, Australiji i Africi (IREDELL i sur., 2003; LINDROOS i sur., 2006; BERGHOFF i sur., 2007; ARVAND i sur., 2007; CHALONER i sur., 2011; AZZAG i sur., 2012), što ukazuje na proširenost u



cijelom svijetu (MIETZE i sur., 2011). Štoviše, ARVAND i sur. (2007) su ih pronašli i u mačaka s mediteranskih i zapadnoeuropskih područja te je za pretpostaviti da su isti prisutni i na ostalim područjima u Hrvatskoj. Takvog smo mišljenja jer su ti genotipovi dokazani i u kontinentalnom i u primorskom području RH. Od navedenih, u Aziji su do sada otkriveni samo ST1 i ST6 (YANAGIHARA i sur., 2010; YUAN i sur., 2011), a u Južnoj Americi ST1 (CICUTTIN i sur., 2014).

Najučestaliji genotip u ovom istraživanju, ST5 (56,7%), prvi su dokazali IREDELL i sur. (2003) kod jedne mačke u Australiji. LINDROOS i sur. (2006) su ga izdvojili iz 18,5% mačjih izolata podrijetlom iz Grčke i SAD-a, a ARVAND i sur. (2007) iz 20,9% mačjih izolata iz Francuske. Učestalost infekcije genotipom ST5 je najbližnja rezultatima istraživanja koje su proveli GIL i sur. (2013) u Španjolskoj, gdje je otkriven kod 61,5% mačjih izolata. ST5 je dokazan i u Njemačkoj kod 25,6% mačaka (MIETZE i sur., 2011), u Velikoj Britaniji kod 2,0% (CHALONER i sur., 2011), dok ga u Aziji nema.

Drugi najučestaliji genotip ST6 (23,3%;) prvi put je dokazan kod osam (40,0%) mačaka u Australiji (IREDELL i sur., 2003) i kod 26 (16,5%) mačaka porijeklom iz SAD-a, Australije i Europe (ARVAND i sur., 2007). LINDROOS i sur. (2006) dokazali su ga kod dvije (7,4%) mačke, iz SAD-a (Virginia) i Afrike (Zimbabve). Poslije toga je dokazan kod dvije (6,5%) mačke u Japanu (YANAGIHARA i sur., 2010) i šest (15,4%) mačaka u Španjolskoj (GIL i sur., 2013). ST6 je bio najučestaliji genotip u Velikoj Britaniji, gdje je dokazan kod čak 40 (40,8%) mačaka (CHALONER i sur., 2011), dok ga u istraživanju provedenom u Njemačkoj nije bilo (MIETZE i sur., 2011).

Sekvencijski tip ST1 najučestaliji je mačji i ljudski genotip bakterije *B. henselae* uopće. Treći je po učestalosti u ovom istraživanju (13,3%), a dokazali su ga i ARVAND i sur. (2007) u 17,1% mačjih izolata porijeklom sa tri kontinenta (Europa, Sjeverna Amerika i Australija). ST1 je dominirao s 90,3% među mačjim izolatima u Japanu (YANAGIHARA i sur., 2010) te s 90,0% (ZHAO i sur., 2011) i 63,0% (YUAN i sur. 2011) u Kini. Znatno manju učestalost genotipa ST1 kod mačaka ustanovili su CHALONER i sur. (2011) u Velikoj Britaniji (5,1%; 5/98) i MIETZE i sur. (2011) u Njemačkoj (2,6%; 1/39).

Osim u ovom istraživanju, genotip ST24 dokazan je do sada samo kod jedne mačke u Hannoveru (Njemačka) (MIETZE i sur., 2011) i jedne u Alžiru (Alžir) (AZZAG i sur., 2012). Genotip ST33 po prvi puta je dokazan kod jedne mačke u ovom istraživanju, što predstavlja veliki znanstveni doprinos regionalnom i globalnom poznavanju epidemioloških /epizootioloških svojstava bakterije *B. henselae* na području Hrvatske i jugoistočne Europe.

U ovom istraživanju po prvi puta u Hrvatskoj dokazana je bakterije *B. henselae* u mačaka, a po prvi puta u svijetu iz jedne mačke novi genotip ST33. Razlike u genotipovima između država mogu biti vezane uz samo zemljopisno područje, ili uz patogenost pojedinog ST-a. Dokaz tri učestala genotipa ST1, ST5 i ST6 bakterije *B. henselae* i ST24 ne predstavlja novost, ali novootkriveni ST33 za sada je vezan samo uz Hrvatsku. Patogenost za ljude dokazana je samo za ST1, ST5 i ST6, dok genotipovi ST24 i ST33 nisu dokazani kod ljudi. Otkriće pet različitih sekvencijskih tipova MLST analizom po prvi puta na ovom području na devet odvojenih lokacija svakako je pridonijelo poznavanju genetičke strukture populacije bakterije *B. henselae* u Republici Hrvatskoj.

Nadalje, u ovom istraživanju nije uočena učestalija pojava ili povezanost pojedinog genotipa s određenim područjem, jer su učestaliji genotipovi (ST1, ST5 i ST6) bili podjednako raspodijeljeni na kontinentalnim i primorskim lokacijama. Štoviše, uočena je podjednaka raspodjela dokazanih ST-ova na više različitih lokacija. Najučestaliji ST5 je dokazan na šest lokacija, ST6 na četiri, ST1 na tri, a ST24 i ST33 svaki na jednoj. CHALONER i sur. (2011) u Velikoj Britaniji dokazali su iz 96 mačaka 12 različitih ST-ova i tri nova (ST27 do ST29) na području šest gradova, ali također nisu našli povezanost pojedinog ST-a s određenim zemljopisnim područjem. Za razliku od njih, GIL i sur. (2013) u Španjolskoj su ustanovili značajnu povezanost sekvencijskih tipova ST6 (La Rioja) i ST9 (Catalonia) sa zemljopisnim područjem. FURQUIM i sur. (2021) u Brazilu ustanovili su povezanost genotipa s područjem za države São Paulo (ST9) i Minas Gerais (ST37).

U ovom istraživanju izrazito je zanimljiv nalaz više različitih ST-ova na područjima pojedinih gradova relativno male površine od 20 do 50 km<sup>2</sup>. Na primjer u Jastrebarskom su dokazana četiri ST-a, a u Puli tri. Po dva različita genotipa dokazana

su u Rijeci i Zagrebu. Štoviše, genska raznolikost bakterije *B. henselae* dokazana je i u mačaka iz istih kućanstava. U Jastrebarskom je u istom kućanstvu iz dviju mačaka izdvojen ST5, a iz jedne ST6. Iz dviju mačaka istog vlasnika i u Rijeci su dokazani genotipovi ST5 i ST6. U Puli su iz iste udruge za zbrinjavanje mačaka dokazane mačke s genotipom ST1 i ST6. Temeljem toga možemo zaključiti da je iz relativno malog broja pretraženih uzoraka na nekoliko odvojenih zemljopisnih mikrolokacija utvrđena velika genska raznolikost vrste *B. henselae*.

Ipak daleko najveću raznolikost genotipova unutar iste države na području devet gradova sjeverne i zapadne Njemačke ustanovili su MIETZE i sur. (2011), dokazom 16 različitih ST-ova iz 39 mačjih izolata, od kojih je 11 bilo potpuno novih (ST16 do ST26). Najveća raznolikost dokazana je na području grada Hannovera, pronalaskom devet različitih ST-ova iz devet mačaka, a svima osim jednog izolata dokazana je nova kombinacija alela. Bez obzira što se radi o većoj gradskoj površini grada Hannovera (200 km<sup>2</sup>), nalaz toliko novih ST-ova na području jednog grada za sada predstavlja iznimku. U istom istraživanju novi ST-ovi utvrđeni su još u četiri grada, ili kod više mačaka u istom gradu (ST26), ili kod mačaka u različitim gradovima (ST19). Međutim, ne postoje podaci potječu li pojedine mačke iz istih kućanstava. Gensku raznolikost različitih područja objašnjavaju razmjenom uzročnika između mačaka i njihovih buha na manjoj površini, a ne između mačaka sa udaljenih lokacija, jer navode da mačke obično imaju lokalno ograničeno kretanje. Za raznolike izolate na istom području tumače da se razvijaju procesom klonalne evolucije bakterije *B. henselae*.

Nalaz više različitih genotipova na nekom zemljopisnom području podrazumijeva i infekciju buha tim istim ST-ovima, jer se različite genske varijante bakterije *B. henselae* s vremenom razvijaju kako se uzročnik prenosi između mačaka na istom području (GUPTILL i sur., 2004). Do sada je jedino genotip ST5 dokazan MLST-om iz triju buha u Španjolskoj (GIL i sur., 2013). No samo jedan dokaz nije dovoljan za izvođenje potpunijih zaključaka o prijenosu ST-ova buhama, zbog čega su potrebna dodatna istraživanja.

Lokacije mačaka s dokazanom bakterijom *B. henselae* u ovom istraživanju međusobno su udaljene od 35 km (Zagreb - Jastrebarsko) do 700 km (Pula - Dubrovnik). Kada je riječ o bartonelama, uzročnik i pojedini genotipovi se s jedne na

drugu lokaciju mogu prenositi samo dolaskom mačka i buha inficiranih bartonelama (SIĞIRCI i ILGAZ, 2013). Međutim u ovom istraživanju prijenos uzročnika buhama između pojedinih lokacija ionako nije bio moguć, jer inficirane mačke nisu mijenjale mjesto boravka.

Unatoč dokazu istih genotipova na različitim lokacijama, kod infekcija mačaka bartonelama ne može se govoriti o epizootijama, nego o lokalnom širenju infekcije u međusobno neovisnim žarištima. Iznimku predstavlja mačka s novim genotipom (ST33), za koju se postavlja pitanje da li je novi genotip razvijen lokalno u Jastrebarskom, gdje je boravila u trenutku uzorkovanja, ili je prenesen s područja Primoštena, gdje je boravila prije udomljavanja. Kako se kod mačke navodi prijašnja invadiranost buhama, a mačke mogu ostati bakterijemične i više mjeseci (GUPTILL i sur., 2004), ovu hipotezu bilo bi poželjno istražiti u budućim istraživanjima. Vjerujemo i da će buduća istraživanja dodatno razjasniti postoje li određena žarišta s endemskom prisutnošću bakterije *B. henselae* ili njenih genotipova na određenim područjima Hrvatske, jer ovo je do sada jedino provedeno istraživanje genske tipizacije izolata bakterije *B. henselae* izdvojene iz mačaka u Republici Hrvatskoj.

U ovom istraživanju filogenetsko stablo (dendrogram), konstruirano UPGMA metodom grupiranja, pokazuje je da je svih 37 do sada poznatih ST-ova bakterije *B. henselae* grupirano u tri odvojena klastera, koji odgovaraju klonalnim kompleksima određenim eBURST analizom (FEIL i sur., 2004). Filogenetskom analizom utvrđena je bliska srodnost ST-ova dokazanih u ovom istraživanju s postojećima u svijetu, jer su svi izolati razvrstani u dva od tri otprije poznata klonalna kompleksa bakterije *B. henselae* (IREDELL i sur., 2003; ARVAND i sur., 2007; MIETZE i sur., 2011; CHALONER i sur., 2011). Klonalni kompleks čine ST-ovi koji imaju sedam od osam zajedničkih alela (ARVAND i sur., 2007; MIETZE i sur., 2011).

Novi sekvencijski tip ST33 dodijeljen je klonalnom kompleksu 2 (CC2), nastalom još u prvom MLST istraživanju (IREDELL i sur., 2003), kada mu je pripadao samo ST6. Kasnije su mu pridruženi ST10, ST11 i ST13 (ARVAND i sur., 2007), ST22 i ST26 (MIETZE i sur., 2011), ST27 (CHALONER i sur., 2011) i ST31 (GIL i sur., 2013). MIETZE i sur. (2011) u Njemačkoj identificirali su ST6 kao utemeljiteljski genotip CC2, što je ostalo i do danas.

Analiza filogenetskog stabla otkrila je da je ST33 blisko srodan genotipu ST26, izdvojenom iz tri mačke u Njemačkoj (MIETZE i sur., 2011) i genotipu ST27 iz jedne mačke u Velikoj Britaniji (CHALONER i sur., 2011). Uključenje genotipa ST33 u CC2 nije značajno promijenilo karakteristike klonalnog kompleksa, ali ga je povećalo na devet članova. Otkriće novog genotipa bakterije *B. henselae* (ST33), kao i nedavno otkriće genotipa ST37 u Brazilu (FURQUIM i sur., 2021), ukazuje da vrsta *B. henselae* i dalje klonalno evoluira.

Zanimljivo je naglasiti da su osim genotipa ST6 svi ST-ovi iz CC2 otkriveni isključivo kod mačaka s područja Europe, i to iz Velike Britanije (ST10), Francuske (ST11) i Češke (ST13) (ARVAND i sur., 2007), Velike Britanije (ST11) (CHALONER i sur., 2011) i Njemačke (ST22) (MIETZE i sur., 2011), a dokaz genotipa ST33 kod mačke s područja Republike Hrvatske samo nastavlja niz. Vrlo je značajno spomenuti i da do sada nisu dokazivani u uzorcima ljudi te da su pripadnici 16S rRNA genotipa II, što ukazuje na potencijalno manju patogenost za ljude (GIL i sur., 2013).

Osim u ovom istraživanju, genotip ST6 iz mačaka je izdvojen i u Velikoj Britaniji (CHALONER i sur., 2011) i Španjolskoj (GIL i sur., 2013), ali nije dokazan u izolatima ljudi. Ipak, u prvim istraživanjima ST6 su izdvojili iz ljudskih izolata IREDELL i sur. (2003) i ARVAND i sur. (2007). Stoga otkriće genotipa ST6 iz mačaka u ovom istraživanju ipak u potpunosti ne isključuje njegov zoonotski potencijal i ukazuje na oprez i potrebitost daljnjih istraživanja.

Ostali dokazani genotipovi (ST1, ST5 i ST24) pripadnici su klonalnog kompleksa 1 (CC1), dok niti jedan izolat iz ovog istraživanja nije pripadnik najmalobrojnijeg klonalnog kompleksa, CC3. Rezultati ovog istraživanja upotpunili su filogenetske podatke prethodnog istraživanja (GIL i sur., 2013) i popunili prazninu nastalu nedavnim izdvajanjem novog genotipa ST37 iz mačaka u Brazilu (FURQUIM i sur., 2021).

Bartonele su zahtjevne za uzgoj i laboratoriji često pribjegavaju modifikaciji postojećih metoda. Za izdvajanje izolata potrebne su specijalne hranjive podloge i produženo vrijeme inkubacije (DOUGHERTY i sur., 1996), s time da se uporaba

različitih hranjivih podloga i postupci uzgoja između laboratorija jako razlikuju, a posljedično i dobiveni rezultati (LA SCOLA i RAOULT, 1999). Ovo istraživanje je provedeno s ciljem utvrđivanja najprikladnijeg protokola za izdvajanje bakterija *Bartonella* spp. iz krvi mačaka na različitim hranjivim podlogama i njihove upotrebljivosti u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici. U Republici Hrvatskoj do sada nisu postojali podaci o uzgoju bartonela na hranjivim podlogama, niti iz ljudi, niti iz mačaka.

Istraživanje je provedeno nacjepljivanjem krvi na sedam različitih hranjivih podloga, pet čvrstih (BH, COL, ČOK, TSA i EKA) i dvije bifazične (TSA/TSB i BH/BB). Čvrste podloge su imale prednost nad bifazičnima, jer se na njima može pratiti intenzitet rasta, čistoća kulture i morfologija izdvojenih kolonija (MAGGI i sur., 2005; OKARO i sur., 2017). Uz to, za određivanje vrste i genotipa bakterije *B. henselae* analizom nukleotidnih sljedova više gena (MLST) neophodne su bakterijske kolonije izdvojene s površine agara (GUTIÉRREZ i sur., 2017; KOSOY i sur., 2018).

Hranjive podloge su odabrane na temelju preliminarne provjere kvalitete porasta ATCC sojeva dviju vrsta bartonela za koje su mačke prirodni rezervoari. Cilj je bio ispitati vjerodostojnost laboratorijske metodologije prije samog nacjepljivanja uzoraka krvi. Dvanaest od šesnaest (75,0%) korištenih hranjivih podloga pokazalo se uspješnima za rast soja *B. henselae* (ATCC 49882), a dvije od sedam (28,6%) za soj *B. clarridgeiae* (ATCC 700095).

I drugi su istraživali rast bartonela reprezentativnim sojevima raznih vrsta, da bi provjerili uporabljivost hranjivih podloga u svrhu porasta i lakšeg prepoznavanju kolonija bartonela (CLARRIDGE i sur., 1995; LA SCOLA i RAOULT, 1999; TSUNEOKA i sur., 2004; DIDI i sur., 2013). Za razliku od prethodnih, sadašnjim istraživanjem uspješnost rasta istražena je na znatno većem broju hranjivih podloga. DIDI i sur. (2013) ustanovili su da bakterija *B. henselae* (ATCC 49882) raste na četiri od šest hranjivih podloga, koliko su ih testirali i CLARRIDGE i sur. (1995) i ustanovili dobar rast sojeva pet vrsta bartonela, s neznatno boljim rastom na HIA i COL agaru. LA SCOLA i RAOULT (1999) testirali su četiri hranjive podloge sa četiri vrste bartonela i nisu uočili superiornost određenog agara prema rastu sojeva bartonela.

Pelimirne provjere rasta bakterija na hranjivim podlogama u istraživanju bartonela nisu rijetkost, međutim vrlo je malo istraživanja utvrđivanja dijagnostičkih protokola i usporedbe rasta izolata na različitim hranjivim podlogama u primoizolaciji. Izdvajanje bartonela iz pohranjenih reprezentativnih sojeva višestrukim pasažama ipak nije istovjetno primarnom izdvajanju uzročnika izravno iz krvi prirodno inficiranih nositelja, jer su referentni sojevi dobro poznatih karakteristika, a izolati u supkulturi rastu znatno brže u odnosu na primoizolaciju (LA SCOLA i RAOULT, 1999).

Za uzgoj krvi mačaka odabrali smo agare BH, COL i ČOK, već korištene u dosadašnjim istraživanjima. Vrstu *B. henselae* i druge vrste bartonela na BH agaru s kuničjom krvi uspješno su izdvojili CLARRIDGE i sur. (1995), DOUGHERTY i sur. (1996), BRENNER i sur. (1997), JOSEPH i sur. (1997), LA SCOLA i RAOULT (1999), ZANNUTO i sur. (2001), CELEBI i sur. (2009) i AZZAG i sur. (2012). Na COL agaru s ovčjom krvi u dosadašnjim istraživanjima vrste *B. henselae* i *B. clarridgeiae* izdvojili su BERGMANS i sur. (1997), LA SCOLA i sur. (2002), ROLAIN i sur. (2004), PONS i sur. (2005), MIETZE i sur. (2011), YUAN i sur. (2011) i GIL i sur. (2013). ČOK agar također su koristili za izdvajanje vrsta *B. henselae*, *B. clarridgeiae* i *B. koehlerae* KOEHLER i sur. (1994), DROZ i sur. (1999), GUPTILL i sur. (2004), KAMRANI i sur. (2008), YANAGIHARA i sur. (2010), MIETZE i sur. (2011) i TSAI i sur. (2011).

Osim njih, odabrali smo i TSA agar i bifazični medij TSA/TSB preporučene od ATCC-a za oživljavanje i umnažanje referentnih sojeva iz liofilizata, a na TSA agaru vrstu *B. henselae* izdvojili su iz krvi prirodno inficiranih mačaka KOEHLER i sur. (1994) i KORDICK i sur. (1995). U dosadašnjim istraživanjima bifazični mediji korišteni su samo za preliminarnu provjeru rasta ATCC soja *B. henselae* ATCC 49882 (DIDDI i sur., 2013) i rijetko za izdvajanje *Bartonella* spp. iz kliničkih uzoraka (ANDERSON i NEUMAN, 1997).

Po prvi puta su za izdvajanje bartonela na hranjivim podlogama korišteni EKA agar i bifazični medij BH/BB, koji do sada nisu opisani u drugim istraživanjima. EKA agar s dodatkom eskulina rutinski se koristi u našim laboratorijima i poznato je da podupire rast više zahtjevnih bakterijskih vrsta. BH/BB uveden je kao drugi bifazični medij, jer se sastavom u kombinaciji BH agara i predobogaćenjem u Bujonu za brucele

(PONS i sur., 2005) nametnuo kao dobar izbor prilikom ispitivanja uspješnosti umnažanja ATCC sojeva. Važno je spomenuti da smo različitim dodacima poput ovčje, kuničje i čokoladne krvi, kao i mogućnošću predobogaćenja u tekućoj fazi bifazičnih medija, pokušali stvoriti uvjete za dokaz i drugih vrsta bartonela, jer je poznato da su *B. clarridgeiae* i *B. koehlerae* zahtjevnije za uzgoj od vrste *B. henselae*.

Izborom provjerenih recepura osigurali smo mogućnost izdvajanja, a uvođenjem novih doprinjeli novim spoznajama, jer su izolati bakterije *B. henselae* rasli na svim korištenim hranjivim podlogama. Najveći broj uzoraka naciepljen je na TSA (24) i BH agar (24), a potom na ČOK (22), COL (17) i EKA (15). Najbolja učestalost izdvajanja postignuta je na BH agaru (87,5%) i COL agaru (82,4%), a potom na EKA (80,0%) i ČOK agaru (77,3%), dok se najmanje uspješnim pokazao TSA agar (54,2%). Od bifazičnih hranjivih podloga, prema porastu izdvojenih izolata TSA+TSB se pokazala uspješnijom (80,0%; 4/5) u odnosu na BH+BB (40,0%; 2/5). Ukupna učestalost izdvajanja izolata bakterije *B. henselae* iznosila je 74,1% (83/112), a uspješnija je bila na čvrstim (75,5%; 77/102), u odnosu na bifazične hranjive podloge (60%; 6/10).

Slično istraživanje usporedbe pet različitih hranjivih podloga za primoizolaciju bartonela iz krvi mačaka u Berlinu (Njemačka) proveo je jedino KLOSE (2009), koji je isto ustanovio veću uspješnost izdvajanja bartonela na čvrstim podlogama (95%) u odnosu na tekuće (70%). Najprikladnijim se pokazao ČOK agar (90%), osobito za vrstu *B. clarridgeiae*, koja je rasla isključivo na ČOK agaru. Takav rezultat u skladu je rezultatom ovog istraživanja, u kojem je ATCC soj *B. clarridgeiae* najbolje umnožen na ČOK agaru. Nadalje, naciepljivanjem inficiranih krvi bakterije su izdvojene na 80% naciepljenih COL agara na 50% BH agara. U tekućim medijima s dodatkom hemina (BBFH i RPMI) uspješnost umnažanja uzročnika iz inficiranih uzoraka krvi bila je 75%, odnosno 20%.

Jedino istraživanje detaljnije procjene prikladnosti protokola (uvjeta uzgoja i hranjivih podloga) za uzgoj zahtjevnih mikroorganizama izdvojenih iz krvi pacijenata inficiranih virusom humane imunodeficijencije u primarnom izdvajanju i supkulturi proveli su DOUGHERTY i sur. (1996). Od desetak hranjivih podloga vrsta *B. henselae* izdvojena je samo na čvrstim hranjivim podlogama (BH agaru i Agar za brucele s dodatkom krvi), ali ne i na tekućim. Izolati su rasli na 35°C, u atmosferi s 5 do 8% CO<sub>2</sub>,



a zbog porasta kolonija nakon 42 dana preporučili su produženu inkubaciju od dva mjeseca. Poslije nisu provedena istraživanja koja bi na ovaj način utvrđivala optimalne medije i uvjete rasta za izdvajanje vrsta *Bartonella* spp., s ciljem određivanja upotrebljivosti protokola u dijagnostičke svrhe, osobito ne na prirodno inficiranim mačkama.

U rijetkim istraživanjima koja prikazuju usporedbu rasta na hranjivim podlogama GIL i sur. (2013) postigli su dobar porast kolonija bakterije *B. henselae* na tri vrste COL agara s različitim dodacima (ovčja, konjska i konjska krv s heminom), dok je vrsta *B. clarridgeiae* rasla samo na agaru s dodatkom hemina. FLEISCHMAN i sur. (2015a) uspoređivali su tri tipa hranjivih podloga. Čvrsta i tekuća hranjiva podloga s dodatkom Schneiderovog medija nisu se pokazale uspješnijima od standardnog naciepljivanja krvi na agar s 5% kuničje krvi, jer je većina (87%) izolata bakterija *B. henselae* i *B. clarridgeiae* podjednako dobro rasla na svim hranjivim podlogama.

Ovo je do sada jedino istraživanje u kojem su izolati iz krvi mačaka uspješno umnoženi i identificirani u primoizolaciji na sedam različitih hranjivih podloga, na kojima je ujedno ostvaren rast pet različitih sekvencijskih tipova bakterije *B. henselae*. Na BH agaru uspješno su rasli svi ST-ovi dokazani u ovom istraživanju, na COL i ČOK agaru ST1, ST5, ST6 i ST33, a na EKA agaru ST1, ST5 i ST6. Zbog dostavljenog ograničenog volumena krvi uzorci iz kojih su izdvojeni genotipovi ST24 i ST33 nisu naciepljeni na sve hranjive podloge. ST24 je rastao na TSA, BH i EKA agaru, ali nije na ČOK agaru, dok je ST33 rastao na svim hranjivim podlogama na koje je krv naciepljena (BH, COL i ČOK). Ukupno, na hranjivim podlogama najčešće je izdvajan genotip ST5, koji je na BH agaru činio 57,1% izolata, a na COL agaru 50,0%. Nadalje, izolati svih sekvencijskih tipova u supkulturi su uspješno rasli na svih sedam vrsta hranjivih podloga. Stoga opravdano smatramo da sve čvrste hranjive podloge podjednako podržavaju rast svih ST-ova bakterije *B. henselae* dokazanih u ovom istraživanju.

Za razliku od ovog istraživanja, u drugim MLST istraživanjima za primarno izdvajanje bakterije *B. henselae* na hranjivim podlogama iz krvi mačaka korištene su jedna do tri vrste hranjivih podloga i nije procjenjivan rast sekvencijskih tipova na pojedinim hranjivim podlogama (YANAGIHARA i sur., 2010; MIETZE i sur., 2011;

YUAN i sur., 2011; CHALONER i sur., 2011; AZZAG i sur., 2012; GIL i sur., 2013). Samo su FLEISCHMAN i sur. (2015a) uspoređivali rast 16SrRNA genotipova bakterije *B. henselae* korištenjem tri različite metode uzgoja i također ustanovili da su izolati oba genotipa (I i II) podjednako uspješno rasli upotrebom tri različita protokola za uzgoj bartonela kojima je zajedničko naciepljivanje krvi na agar s dodatkom 5% kunićje krvi, sa i bez predobogaćenja. Kako su izolati ovog istraživanja prema 16SrRNA genotipu svrstani u genotip I (ST1) i II (ostali ST-ovi), također nisu uočene razlike u rastu izolata bakterije *B. henselae* na korištenim hranjivim podlogama, osim što izolati pripisani genotipu I nisu rasli na TSA-u. Stoga nismo u mogućnosti uspoređivati s drugim istraživanjima razlike u porastu izolata pojedinih sekvencijskih tipova bakterije *B. henselae* na različitim hranjivim podlogama.

Korištenjem više različitih hranjivih podloga na uzorku od jedne životinje u ovom istraživanju pokušali smo maksimalno iskoristiti uzorke krvi, omogućiti izdvajanja više vrsta bartonela i spriječiti propadanje uzorka zbog kontaminacije. Korištenje kombinacije čvrstih i bifazičnih podloga na uzorcima u istom istraživanju pokazalo se opravdanim ponajprije zbog manjih gubitaka izolata i težeg propuštanja inficiranih mačaka, s obzirom da nisu svi izolati jednako rasli na svim hranjivim podlogama.

Bifazični mediji su manje zastupljeni jer su naciepljivani samo uzorcima većeg volumena u kojima je ostala dostatna količina krvi te je istraživana brzina umnažanja i mogućnost identifikacije bartonela u tekućoj fazi PCR-om (DRUMMOND i sur., 2018). Njihovo korištenje pokazalo se opravdanim jer smo iz njih dokazali jednu inficiranu mačku više, čiji izolat nismo uspjeli izdvojiti na čvrstim hranjivim podlogama. Nedostatak je što iz tog uzorka nismo uspjeli izdvojiti dovoljnu količinu DNA za dobivanje potpunog profila MLST-om, kao što bismo dobili iz bakterijskih kolonija. No da bi se procjenila uspješnost uzgoja bartonela na bifazičnim hranjivim podlogama potrebno je istražiti znatno veći broj uzoraka. Važno je za naglasiti, kako u znanstvenoj literaturi do sada ne postoje podaci o izdvajanju bartonela u primoizolaciji na bifazičnim hranjivim podlogama pa unatoč malom broju ispitanih uzoraka u ovom istraživanju porast sekvencijskih tipova ST5 i ST6 predstavlja posebnu znanstvenu vrijednost.

O kvaliteti same metode i korištenih hranjivih podloga govori i podatak da su se pokazale uspješnima i u dokazivanju različitih stupnjeva bakterijemije mačaka, a broj poraslih kolonija iznosio je u rasponu od četiri do iznad 3000 CFU/mL uzoraka krvi. Dobiveni rezultati također su u skladu s rezultatima ostalih istraživanja na prirodno inficiranim mačkama, u kojima broj kolonija varira od osam do  $\geq 4000$  CFU/mL (CHOMEL i sur., 1995), od jedne do preko 2000 CFU/mL (BERGMANS i sur., 1997; CHOMEL i sur., 2002), od četiri do 2400 CFU/mL (YUAN i sur., 2011) i od 40 do 1480 CFU/mL (BAI i sur., 2015).

Primijećeno je da je brzina rasta u ovom istraživanju u korelaciji s razinom bakterijemije mačka, što su uočili i ROLAIN i sur. (2004), jer su izolati na hranjivim podlogama kod mačaka s visokim stupnjem bakterijemije ( $>1000$  CFU/mL) dokazani nakon četiri do 13 dana. S druge strane kod mačaka s nižim stupnjem bakterijemije ( $<100$  CFU/mL) rast je utvrđen nakon sedam do 38 dana. Visoki stupanj bakterijemije dokazan je na svim čvrstim hranjivim podlogama, a najčešće na BH agaru, dok su dva izolata s najvećom koncentracijom bakterija ( $\geq 3000$  CFU/mL) izdvojena na COL i ČOK agaru. Visoki stupanj bakterijemije dokazan je među mačkama sa svim utvrđenim sekvencijskim tipovima (ST1, ST5, ST6, ST33) osim ST24, kod koje je u ovom istraživanju utvrđena niska razina bakterijemije (24 CFU/mL).

Za spomenuti su i dobri rezultati brzine izdvajanja, jer je porast kolonija u primoizolaciji na BH agaru već nakon četiri dana uspješniji od drugih istraživanja u kojima su izolati *B. henselae* na BH agaru porasli nakon šest (SIĞIRCI i ILGAZ, 2013) i 14 dana inkubacije (MARUYAMA i sur., 1996). Brži porast kolonija utvrđen je i na COL agaru i to nakon sedam dana, dok im je u drugim istraživanjima za vidljivi porast bilo potrebno 10 do 15 dana (PONS i sur., 2005), odnosno 18 dana (ROLAIN i sur., 2004).

Na temelju iskustva sa sporim rastom kolonija bakterije *B. henselae*, DOUGHERTY i sur. (1996) preporučili su inkubaciju čvrstih hranjivih podloga u trajanju od 60 dana, a LA SCOLA i sur. (2002) čak 90 dana, jer se u počecima istraživanja bartonela zbog prekratke inkubacije događalo da bakterije ostanu neotkrivene (WELCH i sur., 1993; REGNERY i TAPPERO, 1995). I u ovom istraživanju inkubacijom nacijepjenih hranjivih podloga dužom od predviđena četiri

tjedna uspjeli smo dobiti još četiri izolata bakterije *B. henselae*. Stoga se na temelju iskustva iz ovog istraživanja (porast izolata nakon 32, 38 i 56 dana), što je već zabilježeno u istraživanjima (BREITSCHWERDT, 2008; GUTIERREZ i sur., 2017), slažemo sa navedenim preporukama da se uzorci krvi mačaka kada je god moguće inkubiraju do 60 dana.

U ovom istraživanju bakterija *B. henselae* nije porasla na 25,9% (29/112) hranjivih podloga naciepljenih uzorcima krvi podrijetlom od 19 inficiranih mačaka. Od svake navedene mačke barem na jednoj od korištenih hranjivih podloga nije došlo do porasta bartonela. Na osnovi toga vidljiva je prednost korištenja više vrsta hranjivih podloga u istom istraživanju. Pogotovo zbog činjenice da u ovom istraživanju PCR-om izravno iz uzoraka krvi nije dokazana DNA bartonela.

Posebno je važno naglasiti minimalnu kontaminaciju hranjivih podloga tijekom inkubacije, s kojom se laboratoriji često susreću, čime je također spriječen gubitak izolata. To je postignuto strogim pridržavanjem aseptičnog vađenja krvi, pravilnim rukovanjem uzorcima i preventivnim mjerama za sprječavanje kontaminacije tijekom inkubacije i naciepljivanja, kao i pažljivom pripremom hranjivih podloga. Svi su koraci izrazito važni za dobivanje izolata u čistoj kulturi.

Isto tako uspješnost metode očitovala se i dobivanjem izolata na svim hranjivim podlogama i u supkulturi, iako je zabilježeno da se izolati preciepljivanjem gube (LA SCOLA I RAOULT, 1999), osobito izolati vrste *B. clarridgeiae* (CLARRIDGE i sur., 1995; KLOSE, 2009). Štoviše, supkultura je omogućila ostvarenje jednog od ciljeva istraživanja kao što je formiranje zbirke izolata, prve takve vrste u Hrvatskoj.

Na kraju, metodom uzgoja na hranjivim podlogama u populaciji kućnih mačaka treća po visini utvrđena učestalost infekcije mačaka vrstom *B. henselae* u Europi, poslije one koju su utvrdili CHOMEL i sur. (2002) i SIGIRCI i ILGAZ (2013), dokaz je uspješnosti funkcioniranja metode, unatoč određenim nedostacima s dodatnim naglaskom na ograničenost volumena uzoraka krvi. Naime, planirani protokol izdvajanja bartonela konstantno zahtijeva određene modifikacije što je bilo potrebno već na prvom uzorku iz uginule mačke, gdje plan naciepljivanja uzorka na više od jedne hranjive podloge nije bio izvediv zbog izrazito male količine dostavljene krvi.

Temeljem navedenog razvidna je dobra učinkovitost korištenih hranjivih podloga i uvjeta uzgoja u dokazivanju vrste *B. henselae* iz krvi prirodno inficiranih mačaka. Smatramo da je navedeni protokol upotrebljiv za izdvajanje svih sekvencijskih tipova bakterije *B. henselae* dokazanih u ovom istraživanju i kao takvome opravdana mu je upotreba na uzorcima u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici, osobito BH i COL agar na kojima su rasli izolati svih sekvencijskih tipova.

Zaključno, sve čvrste hranjive podloge dobre su za korištenje na uzorcima, redom kojim su se pokazale najosjetljivijima, a za bifazične hranjive podloge potrebna su dodatna istraživanja. Na osnovu rezultata ovog istraživanja vidljivo je da je paralelna upotreba različitih hranjivih podloga u primoizolaciji bartonela povećala ukupnu učestalost izdvajanja, nego što bi se postiglo korištenjem samo jedne ili dvije vrste hranjivih podloga. Kao u svakom istraživanju tako i u ovome postoje nedostaci korištenja većeg broja različitih hranjivih podloga, zbog čega je teže provesti detaljniju analizu korištenih hranjivih podloga, ali mišljenja smo da dobivanje većeg broja izolata opravdava navedeni nedostatak korištene metodologije. U ovom slučaju različite hranjive podloge pokazale su se adekvatnima za izdvajanje i uzgoj bartonela te smatramo da su sigurno pridonjele većoj uspješnosti njihovog izdvajanja, a time smo dobili značajno kvalitetniju informaciju o prevalenciji infekcije bakterijama roda *Bartonella* u mačaka.

Međutim, *B. henselae* je jedina vrsta bartonela izdvojena iz mačaka u ovom istraživanju, istovjetno nekima od ostalih istraživanja (GUPTILL i sur., 2004; SIGIRCI i ILGAZ, 2013). Već se preliminarnim umnažanjem ATCC soja uvidjelo da je vrsta *B. clarridgeiae* zahtjevnija za uzgoj od vrste *B. henselae*, jer je uspješno umnožen samo iz žive kulture, ali ne i iz liofilizata. Istraživanja na prirodno inficiranim mačkama također potvrđuju da je vrsta *B. clarridgeiae* teško uzgojiva u kulturi (HELLER i sur., 1997; BAI i sur., 2015). Neki od razloga mogu biti da druge vrste bartonela nisu bile prisutne u uzorcima krvi mačaka, nedovoljna osjetljivost hranjivih podloga ili neodgovarajući uvjeti za uzgoj drugih vrsta bartonela. Do sada je DNA bakterije *B. clarridgeiae* u Hrvatskoj dokazana PCR-om i sekvenciranjem samo iz tkiva jetre uginule mačke (HUBER i sur., 2017), iz čije krvi u ovom istraživanju uzgojem na hranjivim

podlogama nisu izdvojene bartonele, što potvrđuje zahtjevnost izdvajanja te vrste bartonela.

SIĞIRCI i ILGAZ, (2013) pripisuju nedostatak izdvajanja vrste *B. clarridgeiae* na HIA agaru s 5% kunićje krvi njezinoj smanjenoj prisutnosti u populaciji mačaka, što se pokazalo točnim, jer su je nekoliko godina kasnije uspješno izdvojili u sličnom istraživanju koristeći iste hranjive podloge. Jedinu razliku primijenili su u tehnici nacjepljivanja, koristeći epruvete s EDTA antikoagulansom umjesto epruveta za liziranje, s korakom centrifugiranja i nacjepljivanja samog taloga na površinu agara (SIĞIRCI i sur., 2016). Ni GUPTILL i sur. (2004) nisu uzgojili vrstu *B. clarridgeiae* iz krvi mačaka. Za razliku od prethodnog primjera, kao razloge navode upravo uzorkovanje krvi u EDTA epruvete, umjesto u komercijalne Isolator<sup>TM</sup> epruvete za liziranje te korištenje samo jedne vrste hranjivih podloga (ČOK agar) u svom istraživanju. Takva zapažanja se razlikuju od ovog istraživanja, u kojem je vrsta *B. clarridgeiae* iz ATCC soja porasla upravo na ČOK i ČOK+V agaru, unatoč korištenju još pet različitih hranjivih podloga. KLOSE (2009) je izdvojio bakteriju *B. clarridgeiae* također samo na čokoladnom agaru. Ni BAI i sur. (2015) nisu uzgojili vrstu *B. clarridgeiae* korištenjem BH agara s 10 % kunićje krvi, iako je molekularnim metodama dokazana u krvi 15 mačaka, što se pripisuje niskom stupnju bakterijemije, zahtjevnijem uzgoju te vrste i malom volumenu nacijepljene krvi.

Nasuprot tome, FLEISCHMAN i sur. (2015a) izdvojili su bakteriju *B. clarridgeiae* samo uzgojem, ali ne i PCR-om, nacjepljivanjem 250 µL krvi na tri različite vrste hranjivih podloga s dodatkom 5% kunićje krvi, a uzorkovanje krvi u epruvete s EDTA nije utjecalo na porast vrste *B. clarridgeiae*. Unatoč različitim izazovima, vrsta *B. clarridgeiae* je do sada uspješno izdvojena i na COL agaru s 5% konjske krvi i heminom (GIL i sur., 2013), COL agaru s 10% konjske krvi (CHALONER i sur., 2011) i na COL agaru s ovčjom krvi (MIETZE i sur., 2011). Ipak, ona se smatra znatno zahtjevnijom za uzgoj u kulturi, jer je uočeno i propadanje izolata tijekom umnažanja ili u supkulturi (CLARRIDGE i sur., 1995), a čini se i u ovom istraživanju jer je na isti način unatoč početnom rastu uočeno propadanje (resorpcija) kolonija. Može se pokušati izdvojiti vrstu *B. clarridgeiae* snižavanjem temperature inkubacije na 35°C, jer je bakterija više puta izdvojena pri toj temperaturi

(NAMEKATA i sur., 2010; FLEISCHMAN i sur., 2015a), što predstavlja temelj za daljnja istraživanja uzgoja ove bakterije.

Uzgoj izolata jedne uginule mačke jedini je slučaj uzgoja bartonela iz krvi uginulih prirodno inficiranih mačaka. Prema našim saznanjima nema podataka o izdvajanju bartonela iz krvi uginulih mačaka niti u Republici Hrvatskoj, niti u svijetu. Izdvajanje bartonela samo iz jedne (1,1%; 1/90) uginule mačke dokazalo je mogućnost izdvajanja bakterije *B. henselae* metodom uzgoja na hranjivim podlogama iz uzoraka krvi aseptički prikupljenih iz srca uginulih mačaka. Ipak, znatno niža prevalencija u odnosu na žive mačke navodi nas na razmišljanje o razlozima navedene razlike. Osim zbog nedostatka uzročnika u uzorcima, niska prevalencija moguća je i zbog propadanja uzročnika u anaerobnim uvjetima tijekom autolitičkih i truležnih procesa nastalih usljed nedostatka kisika u tkivima nakon uginuća. Nadalje, za 46,5% (40 od 86) mačaka navedeno je da su prije uginuća primale antimikrobnu terapiju, što bi mogao biti i najvažniji razlog negativnih rezultata uzgoja. Činjenica da mačka u ovom istraživanju prije uginuća nije bila liječena i da je imala buhe zasigurno je utjecala na uspješno izdvajanje bakterije *B. henselae* na hranjivim podlogama. No na žalost iz izolata nije bilo moguće naknadno dokazati sekvencijski tip, jer je kvaliteta DNA bila premalena za izvođenje MLST analize, pretpostavlja se zbog degradacije DNA tijekom pohrane. To je ujedno bila i prva bartonela identificirana na samom početku ovog istraživanja analizom sekvenci gena 16S rRNA i ITS regije (16S-23S rRNA).

Zbog malog volumena krvi uzorci uginulih mačaka nisu analizirani PCR-om, već samo uzgojem bakterija na hranjivim podlogama što je bio glavni cilj ovog istraživanja. S obzirom na naciepljivanje krvi samo na jednu ploču ČOK agara, nismo mogli uspoređivati rast s drugim izolatima. Unatoč tome, mišljenja smo da je odabir metode uzgoja kod uginulih mačaka prihvatljiviji od PCR-a, jer je u sekcijama dvoranama zabilježena unakrižna kontaminacija s DNA materijalom podrijetla od bartonela i mogućnost dobivanja lažno pozitivnih rezultata (VARANAT i sur., 2009a). Ipak je izdvajanje bakterija uzgojem jedini dokaz živih uzročnika u uzorku, odnosno definitivna potvrda trenutne infekcije bartonelama (NĀSOIU i sur., 2015).

Iz dostavljenog Upitnika navodi se da je patonomskim nalazom uginule mačke potvrđena hipertrofija miokarda, a kao uzrok uginuća zatajivanje rada srca. Iako su

mačke asimptomatski nositelji bakterije, do sada su zabilježena uginuća mačaka samo kao posljedica patoloških promjena na srcu uzrokovanih bakterijom *B. henselae* u vidu endokarditisa (CHOMEL i sur., 2003) i miokarditisa (VARANAT i sur., 2012). Uzmemo li u obzir u ovom istraživanju starost mačke od deset godina, ne možemo sa sigurnošću znati da li je infekcija bartonelama slučajan nalaz, ili je povezana s promjenama na srcu. Dokaz bartonela izravno iz srčanog tkiva metodom uzgoja ili PCR-om vjerojatno bi razjasnio spomenute dvojbe.

U ovom istraživanju izolati *Bartonella* identificirani su PCR-om gena 16SrRNA i intergenske regije ITS (16S-23S). Tipizacijom više genskih sljedova (MLST) izolata 31 mačke i sekvenciranjem gena 16SrRNA i ITS regije izolata uginule mačke, potvrđena je vrsta *B. henselae*. Za razliku od uzgoja na hranjivim podlogama, metodom lančane reakcije polimerazom u krvi 189 mačaka u ovom istraživanju nije dokazana prisutnost DNA bakterija roda *Bartonella*, što ide u prilog većoj osjetljivosti metode uzgoja.

Do danas razlozi manje osjetljivosti konvencionalnog PCR-a nisu sa sigurnošću utvrđeni, a mogu biti vezani uz izbor početnica i ciljnih gena, opremu, metodologiju i vrstu uzorka (LASHNITS i sur., 2021). Izvođenju PCR-a mogu smetati i inhibitorne tvari u krvi (RAMPERSAD i sur., 2005), poput željeza, imunoglobulina, heparina ili leukocitne DNA (OPOTA i sur., 2015).

Manja osjetljivost konvencionalnog PCR-a u dokazivanju bartonela izravno iz krvi nije rijetkost i već je primijećena u drugim istraživanjima (LA SCOLA i RAOULT, 1999; DUNCAN i sur., 2007; KAMRANI i sur., 2008; MAGGI i sur., 2011; OTEO i sur., 2017; DRUMMOND i sur., 2018). DRUMMOND i sur. (2018) je objašnjava ju koncentracijom DNA u početnom uzorku nižom od minimalnog praga detekcije, a LAPPIN (2009) navodi kao razlog cikličku pojavu bakterijemije tipičnu za mačke kao kronično i subklinički inficirane rezervoare bakterije *B. henselae*.

Sukladno ovom istraživanju u kojem su metodom uzgoja iz krvi mačaka dokazane bartonele, ZANUTTO i sur. (2001) i KAMRANI i sur. (2008) nisu uspjeli utvrditi bartonele raznim protokolima za konvencionalni PCR. Prednost uzgoja



bartonela u odnosu na PCR metodu istaknuli su BERGMANS i sur. (1997) i FLEISCHMAN i sur. (2015a) koji su PCR-om dokazali 24%, odnosno 13,9% inficiranih mačaka manje u odnosu na metodu uzgoja. Većina autora kao glavni razlog navodi prenisku koncentraciju bakterija u uzorcima krvi za metodu PCR.

Za razliku od ovog istraživanja, veću osjetljivost raznih vrsta lančanih reakcija polimerazom u odnosu na uzgoj bartonela u kulturi dokazali su KAMRANI i sur. (2008) za konvencionalni PCR, MIETZE i sur. (2011) i GUTIÉRREZ i sur. (2013) za PCR u stvarnom vremenu te BAI i sur. (2015) za ugniježđeni PCR. U novije vrijeme PCR u stvarnom vremenu ili ugniježđeni PCR pokazali su se osjetljivijima od konvencionalnog PCR-a u otkrivanju bartonela izravno iz mačje krvi (NÃSIOU i sur., 2015; GUTIÉRREZ i sur., 2017). RAMPERSAD i sur. (2005) nisu uspjeli konvencionalnim PCR-om izdvojiti bartonele iz mačje krvi, već su povećali osjetljivost tek uvođenjem protokola za ugniježđeni PCR.

Iz svega se može zaključiti da je krv kao uzorak izrazito zahtjevna za izdvajanje bakterija, no da određena poboljšanja u metodologiji mogu u budućnosti dati željene rezultate. Upravo zbog navedene različite osjetljivosti metoda dijagnostike bartonela vidljiva je potreba istovremenog korištenja najmanje dviju različitih metoda u dijagnostici infekcija mačaka bakterijama iz roda *Bartonella*.

S obzirom na vrlo malu zastupljenost sličnih istraživanja prevalencije infekcije mačaka bartonelama u kojima se komparativno pretražuju uzorci krvi prirodno inficiranih mačaka metodom uzgoja na čvrstim hranjivim podlogama u kombinaciji s konvencionalnim PCR-om (SYKES i CHOMEL, 2014; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ i sur., 2018), detaljnija usporedba rezultata ovog istraživanja s drugim istraživanjima nije moguća.

Značaj istraživanja koja pokazuju gensku raznolikost nekog zoonotskog uzročnika je mogućnost procjene javnozdravstvenog rizika za neko područje (GIL i sur., 2013). Za tri od deset (30,0%) pretraživanih mačaka u ovom istraživanju smatra se da su bile izvorom zaraze bakterije *B. henselae* za ljude oboljele od BMO-a, dok su mačke zdravih vlasnika bile rjeđe inficirane (15,6%; 28/179). No razlika nije bila statistički značajna. Za razliku od nas, KORDICK i sur. (1995) otkrili su bakterijemiju u 84,2%

(16/19) mačaka povezanih sa slučajevima BMO-a, a CHOMEL i sur. (1995) u 70% (7/10). Prisutnost bakterije *B. henselae* u hrvatskih mačaka pokazuje da su mačke rezervoari uzročnika s potencijalom za zoonotski prijenos na ljude. Za sve tri mačke pretpostavlja se da su predstavljale najvjerojatniji izvor zaraze za ljude oboljele od BMO, a dva su slučaja opisali STEPANIĆ i sur. (2018).

Sve mačke bile su asimptomatske sa sadašnjom (dvije mačke) ili prijašnjom (jedna mačka) invadiranošću buhama, što ide u prilog tvrdnjama da su bartonele najčešće izdvajane iz zdravih mačaka invadiranih buhama (REGNERY i sur., 1995; BREITSCHWERDT, 2017). Jedna mačka bila je stara dvije godine, a dvije mačke su bile mlađe od godinu dana, što je tipična dob za infekciju bartonelama. Mlade mačke i mačići često se povezuju s prijenosom bartonela na ljude (GUPTILL i sur., 2004; CHOMEL i KASTEN, 2010). Bakterijemija je kod mačaka utvrđena u listopadu, siječnju i ožujku, paralelno sa serološkom potvrdom infekcije kod njihovih ukućana, što je u skladu sa sezonalnošću pojave BMO-a ljudi u Hrvatskoj i u cijelom svijetu (VILIBIĆ-ČAVLEK i sur., 2012; OKARO i sur., 2017).

Sukladno ovom istraživanju, KORDICK i sur. (1995) uzgajili su bakteriju *B. henselae* iz mačaka oboljelih vlasnika. Iako u istraživanju nije bilo ljudskih izolata, autori smatraju da je jasna poveznica između bakterijemije mačaka i oboljenja ljudi. Za razliku od njih, KOEHLER i sur. (1994) i CHANG i sur. (2002) uzgajili su bakteriju *B. henselae* iz krvi mačaka i tkiva njihovih imunodeficientnih vlasnika. U četiri slučaja izolati ljudi i mačaka pokazali su gensku podudarnost, sugerirajući prijenos sa mačaka na ljude.

Sekvencijski tipovi bakterije *B. henselae* razlikuju se po zoonotskom potencijalu. U ovom istraživanju nalaz zoonotskog sekvencijskog tipa ST5 (16S rRNA genotip II) kod triju mačaka povezanih s BMO-a ukazuje na patogenost za ljude. Već su ga prije ARVAND i sur. (2008) izdvojili iz mačaka u Njemačkoj i povezali s oboljenjem pacijenata od BMO-a, a LINDROOS i sur. (2006) dokazali su ST5 u uzorcima ljudi oboljelih od BMO-a i izolatima njihovih mačaka u SAD-u (California, Georgia). Nadalje, CHALONER i sur. (2011) izdvojili su u Velikoj Britaniji ST5 iz biopsata limfnih čvorova ljudi oboljelih od BMO. GIL i sur. (2013) u Španjolskoj dokazali su ga u 54,3% (25/46) pretraženih uzoraka ljudi, od kojih je 24 (96,0%)

potjecalo od pacijenata oboljelih od BMO-a. Izuzev genotipa ST6, tri četvrtine (76,7%) mačjih izolata u ovom istraživanju čine najvirulentniji zoonotski genotipovi (ST1 i ST5). Najučestaliji genotip izdvojen iz ljudi (ST1) dokazan je u više istraživanja iz uzoraka ljudi oboljelih od BMO-a, dok genotip ST6 uopće nije izdvojen iz ljudi na području Europe (CHALONER i sur., 2011; GIL i sur., 2013).

Rezultati ovog istraživanja jasno pokazuju da je prisutnost triju zoonotskih genotipova, a osobito genotipa ST5, prijetnja za prijenos bakterije *B. henselae* s mačaka na ljude. Za dobivanje potpunijih epidemioloških zaključaka ponajprije nam nedostaju podaci o tipizaciji izolata iz hrvatskih pacijenata, kod kojih do sada nije izvođena MLST analiza. Oboljeli ukućani mačaka iz ovog istraživanja potječu iz Zagreba i Zaboka pa se pretpostavlja da su to i lokacije gdje bi ST5 mogao biti prisutan i u ljudi. Najčvršći dokaz prijenosa *B. henselae* s mačke na čovjeka svakako bi bio nalaz istog genotipa u pacijenta i njihovih mačaka, što je imperativ za buduća istraživanja.

Znanstveni doprinos ovog istraživanja je u tome što je na relativno maloj površini na čak devet odvojenih lokacija pronađena povećana raznolikost sekvencijskih tipova bakterije *B. henselae*, što predstavlja temelj za provođenje daljnjih istraživanja i razjašnjenja epizootioloških aspekata ove infekcije u mačaka kako u Republici Hrvatskoj, tako i u jugoistočnoj Europi i šire.

## 7. ZAKLJUČCI

Bakterija *B. henselae* je izdvojena uzgojem na hranjivim podlogama iz krvi 16,4% živih mačaka i 1,1% uginulih mačaka s ukupnom učestalosti infekcije od 11,5%, ali ne i lančanom reakcijom polimerazom što jasno ukazuje na veću osjetljivost metode uzgoja na hranjivim podlogama u odnosu na lančanu reakciju polimerazom i nisku razinu bakterijemije.

Na svim korištenim čvrstim hranjivim podlogama u primoizolaciji zabilježen je porast kolonija nakon četiri do 56 dana inkubiranja, a najveća uspješnost izdvajanja utvrđena je na BH (87,5%) i COL (82,4%) agaru.

Usporedno umnažanje na više različitih hranjivih podloga, uz produženo vrijeme inkubacije do 60 dana, omogućilo je izdvajanje većeg broj izolata tj. povećalo učestalost kulturnog izdvajanja bartonela iz krvi mačaka i otkrivanje stvarne učestalosti infekcije u mačaka.

Uspješan rezultat MLST analize iz izolata umnoženih na čvrstim hranjivim podlogama omogućilo je izvođenje opsežnijih genskih analiza za koje su bile neophodne bakterijske kolonije s površine čvrstih hranjivih podloga.

Dokaz virulentnih zoonotskih sekvencijskih tipova (ST1, ST5, ST6) na sedam različitih lokacija u Republici Hrvatskoj ukazuje na stvarnu javnozdravstvenu prijetnju i nužnost kontrole vektora, mačje buhe *C. felis*.

Nalazom pet različitih sekvencijskih tipova potvrđena je genska raznolikost bakterije *B. henselae* na području Republike Hrvatske. Otkriće novog sekvencijskog tipa (ST33) upotpunilo je genetičku strukturu populacije bakterije *B. henselae* te ukazalo da vrsta *B. henselae* u svijetu kontinuirano klonalno evoluirala.

## 8. POPIS LITERATURE

ABDULLAH, S., C. HELPS, S. TASKER, H. NEWBURY, R. WALL (2019): Pathogens in fleas collected from cats and dogs: distribution and prevalence in the UK. *Parasite. Vector.* 12(1), 71.

DOI: 10.1186/s13071-019-3326-x

AGAN, B. K., M. J. DOLAN (2002): Laboratory diagnosis of *Bartonella* infections. *Clin. Lab. Med.* 22, 937–962.

DOI: 10.1016/S0272-2712(02)00017-3

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A., E. B. BREITSCHWERDT, L. SOLANO-GALLEGO (2018): *Bartonella* infections in cats and dogs including zoonotic aspects. *Parasite. Vector.* 11(1), 624.

DOI:10.1186/s13071-018-3152-6

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A., M. BAXARIAS, D. PRANDI, E. B. BREITSCHWERDT, L. SOLANO-GALLEGO (2021): *Bartonella henselae* Antibodies in Serum and Oral Fluid Specimens from Cats. *Pathogens* 10, 329.

DOI: 10.3390/pathogens10030329

ANDERSON, B. E., M. A. NEUMAN (1997): *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 10(2), 203–219.

DOI: 10.1128/CMR.10.2.203-219.1997

ANDRÉ, M. R., R. A. M. CANOLA, J. B. BRAZ, I. F. S. PEROSI, A. C. CALCHI, P. IKEDA, R. Z. MACHADO, R. O. VASCONCELOS, A. A. CAMACHO (2019): Aortic valve endocarditis due to *Bartonella clarridgeiae* in a dog in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol.* V. 28(4):661-670.

DOI: 10.1590/S1984-29612019078

ANGELAKIS, E., S. A. BILLETER, E. B. BREITSCHWERDT, B. B. CHOMEL, D. RAOULT (2010): Potential for Tick-borne *Bartonelloses*. *Emerg. Infect. Dis.* 16(3), 385–391.

DOI: 10.3201/eid1603.091685

ARVAND, M., A. J. KLOSE, D. SCHWARTZ-PORSCHE, H. HAHN, C. WENDT (2001): Genetic variability and prevalence of *Bartonella henselae* in cats in Berlin, Germany, and analysis of its genetic relatedness to a strain from Berlin that is pathogenic for humans. *J Clin Microbiol.* 39(2), 743-746.

DOI: 10.1128/JCM.39.2.743-746.2001

ARVAND, M., E. J. FEIL, M. GILADI, H. J. BOULOUIS, J. VIEZENS (2007): Multi-locus sequence typing of *Bartonella henselae* isolates from three continents reveals hypervirulent and feline-associated clones. *Plos One* 2(12): e1346.

DOI:10.1371/journal.pone.0001346

ARVAND, M., J. VIEZENS, J. BERGHOFF (2008): Prolonged *Bartonella henselae* Bacteremia Caused by Reinfection in Cats. *Emerg. Infect. Dis.* 14(1), 152–154.

DOI: 10.3201/eid1401.070768

AZZAG, N., N. HADDAD, B. DURAND, E. PETIT, A. AMMOUCHE, B. CHOMEL, H. J. BOULOUIS (2012): Population structure of *Bartonella henselae* in Algerian urban stray cats. *Plos One.* 7(8), e43621.

DOI: 10.1371/journal.pone.0043621

AVIDOR, B., M. GRAIDY, G. EFRAT, C. LEIBOWITZ, G. SHAPIRA, A. SCHATNER, O. ZIMHONY, M. GILADI (2004): *Bartonella koehlerae*, a new cat-associated agent of culture-negative human endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* 42(8), 3462–3468.

DOI:10.1128/JCM.42.8.3462-3468.2004

BAI, Y., M. F. RIZZO, D. ALVAREZ, D. MORAN, L. F. PERUSKI, M. KOSOY (2015): Coexistence of *Bartonella henselae* and *B. clarridgeiae* in populations of cats and their fleas in Guatemala. J. Vector. Ecol. 40, 327-32.

DOI: 10.1111/jvec.12171

BEN-TEKAYA, H., J. - P. GORVEL, C. DEHIO (2013): *Bartonella* and *Brucella* - Weapons and strategies for stealth attack. C. S. H. Perspect. Med. 3: a010231.

DOI: 10.1101/cshperspect.a010231

BERGHOFF, J., J. VIEZENS, L. GUPTILL, M. FABBI, M. ARVAND (2007): *Bartonella henselae* exists as a mosaic of different genetic variants in the infected host. Microbiology+ 153(Pt 7), 2045-2051.

DOI:10.1099/mic.0.2007/006379-0

BERGMANS, A. M. C., C. M. A. DE JONG, G. VAN AMERONGEN, C. S. SCHOT, L. M. SCHOOLS (1997): Prevalence of *Bartonella* species in domestic cats in The Netherlands. J. Clin. Microbiol. 35(9), 2256-2261.

DOI: 10.1128/jcm.35.9.2256-2261.1997

BERMOND, D., H. J. BOULOUIS, R. HELLER, G. VAN LAERE, H. MONTEIL, B. B. CHOMEL, A. SANDER, C. DEHIO, Y. PIÉMONT (2002): *Bartonella bovis* Bermond *et al.* sp. nov. and *Bartonella capreoli* sp. nov., isolated from European ruminants. Int. J. Syst. Evol. Micr. 52(Pt 2), 383-390.

DOI: 10.1099/00207713-52-2-383

BEUGNET, F., M. LABUSCHAGNE, J. FOURIE, G. JACQUES, R. FARKAS, V. COZMA, L. HALOS, K. HELLMANN, M. KNAUS, S. REHBEIN (2014): Occurrence of *Dipylidium caninum* in fleas from client-owned cats and dogs in Europe using a new PCR detection assay. Vet. Parasitol. 205(1-2), 300-306.

DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.06.008

BILLETER, S. A., M. G. LEVY, B. B. CHOMEL, E. B. BREITSCHWERDT (2008): Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potential for tick transmission. *Med. Vet. Entomol.* 22, 1-15.

DOI: 10.1111/j.1365-2915.2008.00713.x

BILLETER, S. A., D. T. S. HAYMAN, A. J. PEEL, K. S. BAKER, J. L. N. WOOD, A. A. CUNNINGHAM, R. D. SUU-IRE, K. DITTMAR, M. Y. KOSOY (2012): *Bartonella* species in bat flies (Diptera: Nycteribiidae) from western Africa. *Parasitology* 139, 324–329.

DOI: 10.1017/S0031182011002113

BIRTLES, R. J., T. G. HARRISON, N. A. SAUNDERS, D. H. MOLYNEUX (1995): Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45(1), 1-8.

DOI: 10.1099/00207713-45-1-1

BITAM, I., K. DITTMAR, P. PAROLA, M. F. WHITING, D. RAOULT (2010) Fleas and flea-borne diseases. *Int. J. Infect. Dis.* 14(8): e667-76.

DOI: 10.1016/j.ijid.2009.11.011

BOUHSIRA, E., Y. FERRANDEZ, M. LIU, M. FRANC, H. J. BOULOUIS, F. BIVILLE (2013a): *Ctenocephalides felis* an in vitro potential vector for five *Bartonella* species. *Comp. Immunol. Microb.* 36(2), 105-111.

DOI: 10.1016/j.cimid.2012.10.004

BOUHSIRA, E., M. FRANC, H. J. BOULOUIS, P. JACQUIET, I. RAYMOND-LETRON, E. LIÉNARD (2013b): Assessment of Persistence of *Bartonella henselae* in *Ctenocephalides felis*. *Appl. Environ. Microb.* 79(23), 7439–7444.

DOI: 10.1128/AEM.02598-13



BOUHSIRA, E., M. FRANC, E. LIENARD, C. BOUILLIN, C. GANDOIN, T. GEURDEN, C. BECSKEI, P. JACQUIET, A. THOMAS, H. J. BOULOUIS (2015): The efficacy of a selamectin (Stronghold ®) spot on treatment in the prevention of *Bartonella henselae* transmission by *Ctenocephalides felis* in cats, using a new high-challenge model. Parasitol. Res. 114(3), 1045-1050.

DOI: 10.1007/s00436-014-4271-4

BOULOUIS, H. J., C. C. CHANG, J. B. HENN, R. W. KASTEN, B. B. CHOMEL (2005): Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. Vet. Res. 36, 383-410.

DOI: 10.1051/vetres:2005009

BRADBURY, C. A., M. R. LAPPIN (2010): Evaluation of topical application of 10% imidacloprid-1% moxidectin to prevent *Bartonella henselae* transmission from cat fleas. J. Am. Vet. Med. Assoc. 236(8), 869-873.

DOI: 10.2460/javma.236.8.869

BREITSCHWERDT, E. B., D. L. KORDICK (2000): *Bartonella* infection in animals: carriership, reservoir potential, pathogenicity, and zoonotic potential for human infection. Clin. Microbiol. Rev. 13, 428-438.

DOI: 10.1128/CMR.13.3.428

BREITSCHWERDT, E. B., R. G. MAGGI, B. SIGMON, W. L. NICHOLSON (2007): Isolation of *Bartonella quintana* from a Woman and a Cat following Putative Bite Transmission. J. Clin. Microbiol. 45(1), 270–272.

DOI: 10.1128/JCM.01451-06

BREITSCHWERDT, E.B. (2008): Feline bartonellosis and cat scratch disease. Vet. Immunol. Immunop. 123(1-2), 167–171.

DOI: 10.1016/j.vetimm.2008.01.025

BREITSCHWERD, E. B., R. G. MAGGI, B. B. CHOMEL, M. R. LAPPIN (2010): Bartonellosis: an emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. *J. Vet. Emerg. Crit. Car. (San Antonio)*. 20(1), 8–30.

DOI: 10.1111/j.1476-4431.2009.00496.x

BREITSCHWERDT, E. B. (2014): *Bartonellosis: One Health perspectives for an emerging infectious disease*. *ILAR J.* 55 (1), 46-58.

DOI: 10.1093/ilar/ilu015

BREITSCHWERDT, E. B., J. J. BROADHURST, N. A. CHERRY (2015): *Bartonella henselae* as a cause of acute-onset febrile illness in cats. *J. Feline Med. Surg. Open Rep.* 1(2): 2055116915600454.

DOI: 10.1177/2055116915600454

BREITSCHWERDT, E. B. (2017): Bartonellosis, One Health and all creatures great and small. *Vet. Dermatol.* 28(1), 96-e21.

DOI: 10.1111/vde.12413

BRENNER, D. J., S. P. O'CONNOR, H. H. WINKLER, A. G. STEIGERWALT (1993): Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order Rickettsiales. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43(4), 777-786.

DOI: 10.1099/00207713-43-4-777. PMID: 8240958

BRENNER, S.A., J. A. ROONEY, P. MANZEWITSCH, R. L. REGNERY (1997): Isolation of *Bartonella (Rochalimaea) henselae*: effects of methods of blood collection and handling. *J. Clin. Microbiol.* 35 (3), 544–547.

DOI:10.1128/jcm.35.3.544-547.1997

BRUGGER, S. D., C. BAUMBERGER, M. JOST, W. JENNI, U. BRUGGER, K. MÜHLEMANN (2012): Automated counting of bacterial colony forming units on agar plates. PLoS One. 7(3): e33695.

DOI: 10.1371/journal.pone.0033695

BRUNT, J., L. GUPTILL, D. L. KORDICK, S. KUDRAK, M. R. LAPPIN (2006): American association of feline practitioners 2006 panel report on diagnosis, treatment, and prevention of *Bartonella* spp. infections. J. Feline Med. Surg. 8, 213-226.

DOI: 10.1016/j.jfms.2006.05.006

BUCHMANN, A. U., O. KERSHAW, V. A. J. KEMPF, A. D. GRUBER (2010): Does a Feline Leukemia Virus Infection Pave the Way for *Bartonella henselae* Infection in Cats? J. Clin. Microbiol. 48(9), 3295-3300.

DOI: 10.1128/JCM.00750-10

BUFFET, J. P., B. PISANU, S. BRISSE, S. ROUSSEL, B. FÉLIX, L. HALOS, J. L. CHAPUIS, M. VAYSSIER-TAUSSAT (2013): Deciphering *Bartonella* diversity, recombination, and host specificity in a rodent community. PloS One 8(7), e68956.

DOI:10.1371/journal.pone.0068956

CALVANI, N. E. D., L. BELL, A. CARNEY, C. DE LA FUENTE, T. STRAGLIOTTO, M. TUNSTALL, J. ŠLAPETA (2020): The molecular identity of fleas (Siphonaptera) carrying *Rickettsia felis*, *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella rochalimae* from dogs and cats in Northern Laos. Heliyon. 6(7): e04385.

DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04385

CAPONETTI, G. C., L. PANTANOWITZ, S. MARCONI, J. M. HAVENS, L. W. LAMPS, C. N. OTIS (2009): Evaluation of immunohistochemistry in identifying *Bartonella henselae* in cat-scratch disease. Am. J. Clin. Pathol. 131(2), 250-6.

DOI: 10.1309/AJCPMNULMO9GPLYU

CELEBI, B., S. KILIC, N. AYDIN, G. TARHAN, A. CARHAN, C. BABUR (2009): Investigation of *Bartonella henselae* in Cats in Ankara, Turkey. *Zoonoses Public Hlth.* 56, 169-175.

DOI: 10.1111/j.1863-2378.2008.01170.x

CHALONER, G. L., T. G. HARRISON, K. P. COYNE, D. M. AANENSEN, R. J. BIRTLES (2011): Multilocus sequence typing of *Bartonella henselae* in the United Kingdom indicates that only a few, uncommon sequence types are associated with zoonotic disease. *J. Clin. Microbiol.* 49(6), 2132–2137.

DOI: 10.1128/JCM.00275-11

CHANG, C. C., B. B. CHOMEL, R. W. KASTEN, J. W. TAPPERO, M. A. SANCHEZ, J. E. KOEHLER (2002): Molecular epidemiology of *Bartonella henselae* infection in human immunodeficiency virus-infected patients and their cat contacts, using pulsed-field gel electrophoresis and genotyping. *J. Infect. Dis.* 186(12), 1733-9.

DOI: 10.1086/345764

CHESLOCK, M. A., M. E. EMBERS (2019): Human Bartonellosis: An Underappreciated Public Health Problem? *Trop Med Infect Dis.* 4(2), 69.

DOI: 10.3390/tropicalmed4020069

CHOMEL, B. B., R. C. ABBOTT, R. W. KASTEN, K. A. FLOYD-HAWKINS, P. A. KASS, C. A. GLASER, N. C. PEDERSEN, J. E. KOEHLER (1995): *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. *J. Clin. Microbiol.* 33(9), 2445-2450.

DOI: 10.1128/jcm.33.9.2445-2450.1995

CHOMEL, B. B., R. W. KASTEN, K. FLOYD-HAWKINS, B. CHI, K. YAMAMOTO, J. ROBERTS-WILSON, A. N. GURFIELD, R. C. ABBOTT, N. C. PEDERSEN, J. E. KOEHLER (1996): Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J. Clin. Microbiol.* 34(8), 1952-1956.

DOI: 10.1128/jcm.34.8.1952-1956.1996

CHOMEL, B.B. (2000): Cat scratch disease. Rev. Sci. Tech. OIE 19(1), 136-150.

DOI: 10.20506/rst.19.1.1204. PMID: 11189710

CHOMEL, B. B., H. J. BOULOUIS, H. PETERSEN, R. W. KASTEN, K. YAMAMOTO, C. C. CHANG, C. GANDOIN, C. BOUILLIN, C. M. HEW (2002):. Prevalence of *Bartonella* infection in domestic cats in Denmark. Vet. Res. 33(2), 205-213.

DOI: 10.1051/vetres:2002008

CHOMEL, B. B., A. C. WEY, R. W. KASTEN, B. A. STACY, P. LABELLE (2003): Fatal case of endocarditis associated with *Bartonella henselae* type I infection in a domestic cat. J. Clin. Microbiol. 41(11):5337-9.

DOI: 10.1128/JCM.41.11.5337-5339.2003

CHOMEL, B. B., H. J. BOULOUIS, E. B. BREITSCHWERDT (2004): Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections. J. Am. Vet. Med. Assoc. 224(8), 1270-1279.

DOI: 10.2460/javma.2004.224.1270

CHOMEL, B. B., H. J. Boulouis, S. Maruyama, E. B. Breitschwerdt (2006): *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. Emerg. Infect. Dis. 12(3), 389–394.

DOI: 10.3201/eid1203.050931

CHOMEL, B. B., H. J. BOULOUIS, E. B. BREITSCHWERDT, R. W. KASTEN, M. VAYSSIER-TAUSSAT, R. J. BIRTLES, J. E. KOEHLER, C. DEHIO (2009): Ecological fitness and strategies of adaptation of *Bartonella* species to their hosts and vectors. Vet. Res. 40(2), 29.

DOI: 10.1051/vetres/2009011

CHOMEL B. B., R. W. KASTEN (2010): Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. J. Appl. Microbiol. 109, 743-50.

DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04679.x

CHOMEL, B. B., S. MOLIA, R. W. KASTEN, G.M. BORGO, M. J. STUCKEY, S. MARUYAMA, C.C. CHANG, N. HADDAD, J. E. KOEHLER (2016): Isolation of *Bartonella henselae* and Two New *Bartonella* Subspecies, *Bartonella koehlerae* Subspecies *boulouisii* subsp. nov. and *Bartonella koehlerae* Subspecies *bothieri* subsp. nov. from Free-Ranging Californian Mountain Lions and Bobcats. PLoS ONE, 11(3): e0148299.

DOI: 10.1371/journal.pone.0148299

CICUTTIN, G.L., D. F. BRAMBATI, M. F. DE GENNARO, F. CARMONA, M. L. ISTURIZ, L. E. PUJOL, G. C. BELERENIAN, H. GIL (2014): *Bartonella* spp. in cats from Buenos Aires, Argentina. Vet Microbiol. 168(1), 225-228.

DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.10.016

CLARRIDGE, J. E. 3RD, T. J. RAICH, D. PIRWANI, B. SIMON, L. TSAI, M. C. RODRIGUEZ-BARRADAS, R. REGNERY, A. ZOLLO, D. C. JONES, C. RAMBO (1995): Strategy to detect and identify *Bartonella* species in routine clinical laboratory yields *Bartonella henselae* from human immunodeficiency virus-positive patient and unique *Bartonella* strain from his cat. J. Clin. Microbiol. 33(8), 2107–2113.

DOI: 10.1128/jcm.33.8.2107-2113.1995

COOPER, J. E., E. J. FEIL (2004): Multilocus sequence typing - what is resolved? Trends Microbiol.12(8), 373-377.

DOI: 10.1016/j.tim.2004.06.003

COTTÉ, V., S. BONNET, D. LE RHUN, E. LE NAOUR, A. CHAUVIN, H. J. BOULOUIS, B. LECUELLE, T. LILIN, M. VAYSSIER-TAUSSAT (2008): Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. Emerg. Infect. Dis. 14, 1074–80.

DOI: 10.3201/eid1407.071110

DAHMANI, M., G. DIATTA, N. LABAS, A. DIOP, H. BASSENE, D. RAOULT, L. GRANJON, F. FENOLLAR, O. MEDIANNIKOV (2018): Noncontiguous finished

genome sequence and description of *Bartonella mastomydis* sp. nov. *New Microbes and New Infect.* 25, 60-70.

DOI: 10.1016/j.nmni.2018.03.005

DENG, H., Q. PANG, B. ZHAO, M. VAYSSIER-TAUSSAT (2018): Molecular Mechanisms of *Bartonella* and Mammalian Erythrocyte Interactions: A Review. *Front. Cell. Infect. Mi.* 8, 431.

DOI: 10.3389/fcimb.2018.00431

DIAKOU, A., A. DI CESARE, P. M. ACCETTURA, L. BARROS, R. IORIO, B. PAOLETTI, A. FRANGIPANE DI REGALBONO, L. HALOS, F. BEUGNET, D. TRAVERSA (2017): Intestinal parasites and vector-borne pathogens in stray and free-roaming cats living in continental and insular Greece. *PLoS Neglect. Trop. D.* 11(1): e0005335.

DOI: 10.1371/journal.pntd.0005335

DIDDI, K., R. CHAUDHRY, N. SHARMA, B. DHAWAN (2013): Strategy for identification & characterization of *Bartonella henselae* with conventional & molecular methods. *Indian J. Med. Res.* 137(2), 380–387.

DIETRICH, F., T. SCHMIDGEN, R. G. MAGGI, D. RICHTER, F. R. MATUSCHKA, R. VONTHEIN, E. B. BREITSCHWERDT, V. A. KEMPF (2010): Prevalence of *Bartonella henselae* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* DNA in *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Appl. Environ. Microb.* 76(5):1395-8.

DOI: 10.1128/AEM.02788-09

DOERN, G.V. (2000): Detection of selected fastidious bacteria. *Clin. Infect. Dis.* 30, 166-173.

DOI: 10.1086/313586

DOUGHERTY, M. J., D. H. SPACH, A. M. LARSON, T. M. HOOTON, M. B. COYLE (1996): Evaluation of an extended blood culture protocol to isolate fastidious organisms from patients with AIDS. *J. Clin. Microbiol.* 34(10):2444-7.

DOI: 10.1128/jcm.34.10.2444-2447.1996

DROZ, S., B. CHI, E. HORN, A. G. STEIGERWALT, A. M. WHITNEY, D. J. BRENNER (1999): *Bartonella koehlerae* sp. nov., Isolated from Cats. J. Clin. Microbiol. 37(4), 1117–1122.

DOI: 10.1128/JCM.37.4.1117-1122.1999

DRUMMOND, M. R., B. G. LANIA, P. P. V. P. DINIZ, R. GILIOLI, D. M. R. DEMOLIN, D. G. SCORPIO, E. B. BREITSCHWERDT, P. E. N. F. VELHO (2018): Improvement of *Bartonella henselae* DNA Detection in Cat Blood Samples by Combining Molecular and Culture Methods. J. Clin. Microbiol. 56(5): e01732-17.

DOI: 10.1128/JCM.01732-17

DUNCAN, A.W., R. G. MAGGI, E. B. BREITSCHWERDT (2007): A combined approach for the enhanced detection and isolation of *Bartonella* species in dog blood samples: pre-enrichment liquid culture followed by PCR and subculture onto agar plates. J Microbiol Methods. 69(2), 273-281.

DOI: 10.1016/j.mimet.2007.01.010

EICHER, S. C., C. DEHIO (2012): *Bartonella* entry into host cells. Cell. Microbiol. 14, 1166-1173.

DOI: 10.1111/j.1462-5822.2012.01806.x

ENGEL, P., W. SALZBURGER, M. LIESCH, C. C. CHANG, S. MARUYAMA, C. LANZ, A. CALTEAU, A. LAJUS, C. MÉDIGUE, S. C. SCHUSTER, C. DEHIO (2011): Parallel Evolution of a Type IV Secretion System in Radiating Lineages of the Host-Restricted Bacterial Pathogen *Bartonella*. PLoS Genet. 7(2), e1001296.

DOI: 10.1371/journal.pgen.1001296

EREQAT, S., A. NASEREDDIN, M. VAYSSIER-TAUSSAT, A. ABDELKADER, A. AL-JAWABREH, T. ZAID, K. AZMI, Z. ABDEEN (2016): Molecular Evidence of *Bartonella* Species in Ixodid Ticks and Domestic Animals in Palestine. Front. Microbiol. 7, 1217.

DOI: 10.3389/fmicb.2016.01217



FABBI, M., L. DE GIULI, M. TRANQUILLO, R. BRAGONI, M. CASIRAGHI, C. GENCHI (2004): Prevalence of *Bartonella henselae* in Italian stray cats: Evaluation of serology to assess the risk of transmission of *Bartonella* to humans. J. Clin. Microbiol. 42(1), 264–268.

DOI: 10.1128/JCM.42.1.264-268.2004

FEIL, E. J., B. C. LI, D. M. AANENSEN, W. P. HANAGE, B. G. SPRATT (2004): eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J Bacteriol. 186(5), 1518-1530.

DOI: 10.1128/JB.186.5.1518-1530.2004

FINKELSTEIN, J. L., T. P. BROWN, K. L. O'REILLY, J. Jr WEDINCAMP, L. D. FOIL (2002): Studies on the growth of *Bartonella henselae* in the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). J. Med. Entomol. 39(6), 915-919.

DOI: 10.1603/0022-2585-39.6.915

FLEISCHMAN, D. A., B. B. CHOMEL, R. W. KASTEN, M. J. STUCKEY, J. SCARLET, H. LIU, H. J. BOULOUIS, N. HADDAD, N. C. PEDERSEN (2015a): *Bartonella* infection among cats adopted from a San Francisco shelter, revisited. Appl. Environ. Microb. 81(18), 6446-6450.

DOI: 10.1128/AEM.01864-15

FLEISCHMAN, D. A., B. B. CHOMEL, K. BURGOS, R. W. KASTEN, M. J. STUCKEY, M. R. DURDEN, H. MIRRASHED, P. P. DINIZ (2015b): Impact of queen infection on kitten susceptibility to different strains of *Bartonella henselae*. Vet. Microbiol. 180(3-4), 268-72.

DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.09.020

FOIL, L., E. ANDRESS, R. FREELAND, A. F. ROY, R. RUTLEDGE, P. C. TRICHE, K. L. O'REILLY (1998): Experimental infection of domestic cats with *Bartonella henselae* by inoculation of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae) feces. J. Med. Entomol. 35(5), 625-628.

DOI: 10.1093/jmedent/35.5.625

FOURNIER, P. - E., G. DUBOURG, D. RAOULT (2014): Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era. *Genome Med.* 6, 114.

DOI: 10.1186/s13073-014-0114-2

FRANK, H. K., S. D. Boyd , E. A. Hadly (2018): Global fingerprint of humans on the distribution of *Bartonella* bacteria in mammals. *PLoS Neglect. Trop. D.* 12(11). e0006865.

DOI: 10.1371/journal.pntd.0006865

FURQUIM, M.E.C., R. DO AMARAL, C. M. DIAS, L. R. GONÇALVES, L. PERLES, C. A. P. LIMA, D. M. BARROS-BATTESTI, R. Z. MACHADO, M. R. ANDRÉ (2021): Genetic diversity and Multilocus Sequence Typing Analysis of *Bartonella henselae* in domestic cats from Southeastern Brazil. *Acta Trop.* 222: 106037.

DOI: 10.1016/j.actatropica.2021.106037

GADILA, S. K. G., M. E. EMBERS (2021): Antibiotic Susceptibility of *Bartonella* Grown in Different Culture Conditions. *Pathogens* 10(6), 718.

DOI: 10.3390/pathogens10060718

GARCÍA-ESTEBAN, C., H. GIL, M. RODRÍGUEZ-VARGAS, X. GERRIKAGOITIA, J. BARANDIKA, R. ESCUDERO, I. JADO, C. GARCÍA-AMIL, M. BARRAL, A. L. GARCÍA-PÉREZ, M. Bhide, P. ANDA (2008): Molecular Method for *Bartonella* Species Identification in Clinical and Environmental Samples. *J. Clin. Microbiol.* 46(2), 776–779.

DOI: 10.1128/JCM.01720-07

GIL, H., C. GARCÍA-ESTEBAN, J. F. BARANDIKA, J. PEIG, A. TOLEDO, R. ESCUDERO, I. JADO, M. RODRÍGUEZ-VARGAS, C. GARCÍA-AMIL, B. LOBO, P. ROALES, I. RODRÍGUEZ-MORENO, A. S. OLMEDA, A. L. GARCÍA-PÉREZ, P. ANDA (2010): Variability of *Bartonella* genotypes among small mammals in Spain. *Appl. Environ. Microb.* 76(24), 8062-8070.

DOI: 10.1128/AEM.01963-10.

GIL, H., R. ESCUDERO, I. PONS, M. RODRÍGUEZ-VARGAS, C. GARCÍA-ESTEBAN, I. RODRÍGUEZ-MORENO, C. GARCÍA-AMIL, B. LOBO, F. VALCÁRCEL, A. PÉREZ, S. JIMÉNEZ, I. JADO, R. JUSTE, F. SEGURA, P. ANDA (2013): Distribution of *Bartonella henselae* Variants in Patients, Reservoir Hosts and Vectors in Spain. PLoS One 8(7), e68248.

DOI: 10.1371/journal.pone.0068248

GREENE, C. E., M. MCDERMOTT, P. H. JAMESON, C. L. ATKINS, A. M. MARKS (1996): *Bartonella henselae* Infection in Cats: Evaluation during Primary Infection, Treatment, and Rechallenge Infection. J. Clin. Microbiol. 34(7), 1682-1685.

DOI: 10.1128/jcm.34.7.1682-1685.1996

GUPTILL, L., C. C. WU, H. HOGENESCH, L. N. SLATER, N. GLICKMAN, A. DUNHAM, H. SYME, L. GLICKMAN (2004): Prevalence, risk factors, and genetic diversity of *Bartonella henselae* infections in pet cats in four regions of the United States. J. Clin. Microbiol. 42(2), 652-659.

DOI: 10.1128/JCM.42.2.652-659.2004

GUPTILL, L. (2010): Bartonellosis. Vet. Microbiol. 140(3-4), 347-359.

DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.11.011.

GURFIELD, A. N., H. J. BOULOUIS, B. B. CHOMEL, R. W. KASTEN, R. HELLER, C. BOUILLIN, C. GANDOIN, D. THIBAUT, C. C. CHANG, F. BARRAT, Y. PIEMONT (2001): Epidemiology of *Bartonella* infection in domestic cats in France. Vet. Microbiol. 80(2), 185-198.

DOI: 10.1016/S0378-1135(01)00304-2

GUTIÉRREZ, R., D. MORICK, I. GROSS, R. WINKLER, Z. ABDEEN, S. HARRUS (2013): *Bartonella* in domestic and stray cats from Israel – Comparison of Bacterial cultures and high-resolution melt HRM real - time PCR as diagnostic methods. Vector-Borne Zoonot. 13 (12), 857-864.

DOI: 10.1089/vbz.2013.1308

GUTIÉRREZ, R., Y. NACHUM-BIALA, S. HARRUS (2015): Relationship between the Presence of *Bartonella* Species and Bacterial Loads in Cats and Cat Fleas (*Ctenocephalides felis*) under Natural Conditions. *Appl. Environ. Microb.* 81(16), 5613–5621.

DOI: 10.1128/AEM.01370-15

GUTIÉRREZ, R., M. VAYSSIER-TAUSSAT, J. - P. BUFFET, S. HARRUS (2017): Guidelines for the isolation, molecular detection, and characterization of *Bartonella* species. *Vector-Borne Zoonot.* 17, 42-50.

DOI: 10.1089/vbz.2016.1956

HARMS, A., C. DEHIO (2012): Intruders below the Radar: Molecular Pathogenesis of *Bartonella* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 25(1), 42–78.

DOI: 10.1128/CMR.05009-11

HARMS, A., F. H. SEGERS, M. QUEBATTE, C. MISTL, P. MANFREDI, J. KÖRNER, B. B. CHOMEL, M. KOSOY, S. MARUYAMA, P. ENGEL, C. DEHIO (2017): Evolutionary Dynamics of Pathoadaptation Revealed by Three Independent Acquisitions of the VirB/D4 Type IV Secretion System in *Bartonella*. *Genome Biol. Evol.* 9(3), 761-776.

DOI: 10.1093/gbe/evx042

HELLER, R., M. ARTOIS, V. XEMAR, D. DE BRIEL, H. GEHIN, B. JAULHAC, H. MONTEIL, Y. PIEMONT (1997): Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats. *J. Clin. Microbiol.* 35(6), 1327–1331.

DOI: 10.1128/jcm.35.6.1327-1331.1997.

HIGGINS, J. A., S. RADULOVIC, D. C. JAWORSKI, A. F. AZAD (1996): Acquisition of the cat scratch disease agent *Bartonella henselae* by cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae). *J. Med. Entomol.* 33, 490-495.

DOI: 10.1093/jmedent/33.3.490

HOUPIKIAN, P., D. RAOULT (2001): Molecular phylogeny of the genus *Bartonella*: what is the current knowledge? FEMS Microbiol Lett. 200(1), 1-7.

DOI: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10684.x

HUBER, D., A. BECK, D. JURKOVIĆ, R. BECK (2017): Vector-borne infections in Croatian cats: pathologic and molecular study. Book of Abstracts 7th International Congress "Veterinary Science and Profession". 05. do 07. listopada, Veterinarski fakultet, Zagreb, str. 93-93.

HUWYLER, C., N. HEINIGER, B. B. CHOMEL, M. KIM, R. W. KASTEN, J. E. KOEHLER (2017): Dynamics of Co-Infection with *Bartonella henselae* Genotypes I and II in Naturally Infected Cats: Implications for Feline Vaccine Development. Microb. Ecol. 74(2), 474-484.

DOI: 10.1007/s00248-017-0936-8

IANNINO, F., N. SULLI, A. MAITINO, I. PASCUCCI, G. PAMPIGLIONE, S. SALUCCI (2017): Fleas of dog and cat: species, biology and flea-borne diseases. Vet. Ital. 53(4), 277-288.

DOI: 10.12834/VetIt.109.303.3

IANNINO, F., S. SALUCCI, A. DI PROVVIDO, A. PAOLINI, E. RUGGIERI (2018): *Bartonella* infections in humans, dogs and cats. Vet. Ital. 54(1), 63-72.

DOI: 10.12834/VetIt.398.1883.2

IREDELL, J., D. BLANCKENBERG, M. ARVAND, S. GRAULING, E. J. FEIL, R. J. BIRTLES (2003): Characterization of the natural population of *Bartonella henselae* by multilocus sequence typing. J. Clin. Microbiol. 41(11), 5071-5079.

DOI: 10.1128/JCM.41.11.5071-5079.2003

JACOMO, V., P. J. KELLY, D. RAOULT (2002): Natural History of *Bartonella* Infections (an Exception to Koch's Postulate). Clin. Diagn. Lab. Immun. 9(1), 8-18.

DOI: 10.1128/CDLI.9.1.8-18.2002

JAKOBSEN, J.C., C. GLUUD, P. WINKEL, T. LANGE, J. WETTERSLEV (2014): The thresholds for statistical and clinical significance - a five-step procedure for evaluation of intervention effects in randomised clinical trials. *BMC Med Res Methodol.* 14:34.

DOI: 10.1186/1471-2288-14-34

JIIYIPONG, T., S. JITTAPALAPONG, S. MORAND, J.-M. ROLAIN (2014): *Bartonella* species in small mammals and their potential vectors in Asia. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 4(10), 757-767.

DOI: 10.12980/apjtb.4.2014c742

JOLLEY, K. A., J. E. BRAY, M. C. J. MAIDEN (2018): Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.* 3: 124.

DOI: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1

JOSEPH, A. K., C. W. WOOD, J. M. ROBSON, S. L. PAUL, A. J. MORRIS (1997): *Bartonella henselae* bacteraemia in domestic cats from Auckland. *N Z Vet J.* 45(5), 185-187.

DOI: 10.1080/00480169.1997.36023

KAMRANI, A., V. R. PARREIRA, J. GREENWOOD, J. F. PRESCOTT (2008): The prevalence of *Bartonella*, hemoplasma, and *Rickettsia felis* infections in domestic cats and in cat fleas in Ontario. *Can. J. Vet. Res.* 72(5), 411-419

KAUFMAN, D. L., A. M. KOGELNIK, R. B. MOZAYENI, N. A. CHERRY, E. B. BREITSCHWERDT (2017): Neurological and immunological dysfunction in two patients with *Bartonella henselae* bacteremia. *Clin Case Rep.* 5(6), 931-935.

DOI: 10.1002/ccr3.977

KERNIF, T., H. LEULMI, C. SOCOLOVSCHI, J. M. BERENGER, H. LEPIDI, I. BITAM, J. M. ROLAIN, D. RAOULT, P. PAROLA (2014): Acquisition and excretion of *Bartonella quintana* by the cat flea, *Ctenocephalides felis felis*. *Mol. Ecol.* 23(5), 1204-12.

DOI: 10.1111/mec.12663

KIK, M., R. I. JAARSMA, J. IJZER, H. SPRONG, A. GRÖNE, J. RIJKS (2021): *Bartonella alsatica* in Wild and Domestic Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in The Netherlands. *Microbiol. Res.* 12, 524-527.

DOI: 10.3390/microbiolres12020036

KLOSE, A. (2009): Prävalenz und molekulare Epidemiologie der *Bartonella henselae*-Infektion bei Katzen in Berlin. PhD Thesis (Diss.), Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Berlin, Deutschland. (dostupno na: <https://refubium.fu-berlin.de>)

KLOTZ, S. A., V. IANAS, S. P. ELLIOTT (2011): Cat-scratch disease. *Am. Fam. Physician* 83, 152-155.

KOEHLER, J. E., C. A. GLASER, J. W. TAPPERO (1994): *Rochalimaea henselae* infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir. *JAMA-J. Am. Med. Assoc.* 271, 531-535.

DOI: 10.1001/jama.1994.03510310061039

KOEHLER, J.E., M. A. SANCHEZ, C. S. GARRIDO, M. J. WHITFIELD, F. M. CHEN, T. G. BERGER, M. C. RODRIGUEZ-BARRADAS, P. E. LEBOIT, J. W. TAPPERO (1997): Molecular epidemiology of *Bartonella* infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. *N Engl J Med.* 337(26), 1876-1883.

DOI: 10.1056/NEJM199712253372603

KORDICK, D. L., K. H. WILSON, D. J. SEXTON, T. L. HADFIELD, H. A. BERKHOFF, E. B. BREITSCHWERDT (1995): Prolonged *Bartonella* bacteremia in cats associated with cat-scratch disease patients. *J. Clin. Microbiol.* 33(12), 3245–3251.

DOI: 10.1128/jcm.33.12.3245-3251.1995

KORDICK, D. L., E. J. HILYARD, T. L. HADFIELD, K. H. WILSON, A. G. STEIGERWALT, D. J. BRENNER, E. B. BREITSCHWERDT (1997): *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (Cat scratch disease). *J. Clin. Microbiol.* 35(7), 1813–1818.

DOI: 10.1128/jcm.35.7.1813-1818.1997.

KORDICK, D. L., T. T. BROWN, K. SHIN, E. B. BREITSCHWERDT (1999): Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. J. Clin. Microbiol. 37(5), 1536-1547.

DOI: 10.1128/JCM.37.5.1536-1547.1999

KOSOY, M., D. T. HAYMAN, K. S. CHAN (2012): *Bartonella* bacteria in nature: where does population variability end and a species start? Infect. Genet. Evol. 12, 894-904.

DOI: 10.1016/j.meegid.2012.03.005

KOSOY, M., C. MCKEE, L. ALBAYRAK, Y. FOFANOV (2018): Genotyping of *Bartonella* bacteria and their animal hosts: current status and perspectives. Parasitology 145(5), 543-562.

DOI: 10.1017/S0031182017001263

KOSOY, M., I. GOODRICH (2019): Comparative Ecology of *Bartonella* and *Brucella* Infections in Wild Carnivores. Front Vet Sci. 5, 322.

DOI: 10.3389/fvets.2018.00322

KRÓL, N., N. MILITZER, E. STÖBE, A. M. NIJHOF, M. PFEFFER, V. A. J. KEMPF, A. OBIEGALA (2021): Evaluating Transmission Paths for Three Different *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* Ticks Using Artificial Feeding. Microorganisms 9(5):901.

DOI: 10.3390/microorganisms9050901

KRUSZEWSKA, D., S. TYLEWSKA-WIERZBANOWSKA (1996): Unknown species of rickettsiae isolated from *Ixodes ricinus* tick in Wałcz. Roczn. Akad. Med. Białymst. 41(1), 129-135.

LA, V. D., B. CLAVEL, S. LEPETZ, G. ABOUDHARAM, D. RAOULT, M. DRANCOURT (2004): Molecular Detection of *Bartonella henselae* DNA in the Dental Pulp of 800-Year-Old French Cats. Clin. Infect. Dis. 39(9), 1391–1394.

DOI: 10.1086/424884



LA, V. D., L. TRAN-HUNG, G. ABOUDHARAM, D. RAOULT, M. DRANCOURT (2005): *Bartonella quintana* in Domestic Cat. *Emerg. Infect. Dis.* 11(8), 1287–1289.

DOI: 10.3201/eid1108.050101

LANTOS, P. M., R. G. MAGGI, B. FERGUSON, J. VARKEY, L. P. PARK, E. B. BREITSCHWERDT, C. W. WOODS (2014): Detection of *Bartonella* species in the blood of veterinarians and veterinary technicians: a newly recognized occupational hazard? *Vector-Borne Zoonot.* 14(8), 563-570.

DOI: 10.1089/vbz.2013.1512

LAPPIN, M. R., E. BREITSCHWERDT, M. BREWER, J. HAWLEY, B. HEGARTY, S. RADECKI (2009): Prevalence of *Bartonella* species antibodies and *Bartonella* species DNA in the blood of cats with and without fever. *J Feline Med Surg.* 11(2), 141-148.

DOI: 10.1016/j.jfms.2008.06.005

LAPPIN, M. R. (2018): Update on flea and tick associated diseases of cats. *Vet. Parasitol.* 254, 26-29.

DOI: 10.1016/j.vetpar.2018.02.022

LAPPIN, M. R., T. ELSTON, L. EVANS, C. GLASER, L. JARBOE, P. KARZMAR, C. LUND, M. RAY (2019): AAFP Feline Zoonoses Guidelines. *J. Feline Med. Surg.* 21(11):1008-1021.

DOI: 10.1177/1098612X19880436

LASHNITS, E., P. NEUPANE, J. M. BRADLEY, T. RICHARDSON, R. G. MAGGI, E. B. BREITSCHWERDT (2021): Comparison of Serological and Molecular Assays for *Bartonella* Species in Dogs with Hemangiosarcoma. *Pathogens.* 10(7), 794.

DOI: 10.3390/pathogens10070794

LA SCOLA, B., D. RAOULT (1999): Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from Human Samples: a 5-Year Experience (1993 to 1998). *J. Clin. Microbiol.* 37(6), 1899–1905.

DOI: 10.1128/JCM.37.6.1899-1905.1999

LA SCOLA, B., B. DAVOUST, M. BONI, D. RAOULT (2002): Lack of correlation between *Bartonella* DNA detection within fleas, serological results, and results of blood culture in a *Bartonella*-infected stray cat population. Clin. Microbiol. Infec. 8(6), 345-351.

DOI: 10.1046/j.1469-0691.2002.00434.x

LI, W., D. RAOULT, P.E. FOURNIER (2009): Bacterial strain typing in the genomic era. FEMS Microbiol Rev. 33(5), 892-916.

DOI: 10.1111/j.1574-6976.2009.00182.x

LI, H., J. Y. BAI, L. Y. WANG, L. ZENG, Y. S. SHI, Z. L. QIU, H. H. YE, X. F. ZHANG, Q. B. LU, M. KOSOY, W. LIU, W. C. CAO (2013): Genetic diversity of *Bartonella quintana* in macaques suggests zoonotic origin of trench fever. Mol. Ecol. 22(8), 2118-27.

DOI: 10.1111/mec.12261

LINDROOS, H., O. VINNERE, A. MIRA, D. REPSILBER, K. NÄSLUND, S. G. ANDERSSON (2006): Genome rearrangements, deletions, and amplifications in the natural population of *Bartonella henselae*. J. Bacteriol. 188(21), 7426-7439.

DOI: 10.1128/JB.00472-06

LOGAN, J., J. L. HALL, V. J. CHALKER, B. O'CONNELL, R. J. BIRTLES (2019): *Bartonella clarridgeiae* infection in a patient with aortic root abscess and endocarditis. Access microbiol. 1(10): e000064.

DOI: 10.1099/acmi.0.000064

LYNCH, T., J. IVERSON, M. KOSOY (2011): Combining culture techniques for *Bartonella*: The best of both worlds. J. Clin. Microbiol. 49, 1363-1368.

DOI: 10.1128/JCM.02403-10

MAGGI, R. G., E. B. BREITSCHWERDT (2005): Potential Limitations of the 16S-23S rRNA Intergenic Region for Molecular Detection of *Bartonella* Species. *J. Clin. Microbiol.* 43(3), 1171–1176.

DOI: 10.1128/JCM.43.3.1171-1176.2005

MAGGI, R. G., A. W. DUNCAN, E. B. BREITSCHWERDT (2005): Novel chemically modified liquid medium that will support the growth of seven *bartonella* species. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2651-55.

DOI: 10.1128/JCM.43.6.2651-2655.2005

MAGGI, R. G., P. E. MASCARELLI, E. L. PULTORAK, B. C. HEGARTY, J. M. BRADLEY, B. R. MOZAYENI, E. B. BREITSCHWERDT (2011): *Bartonella* spp. bacteremia in high-risk immunocompetent patients. *Diagn. Micr. Infect. Dis.* 71(4), 430-437.

DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.09.001

MAGNI, E., F. BERTELLONI, M. SGORBINI, V. V. EBANI (2017): *Bartonella* infection in asymptomatic horses and donkeys from Tuscany, Central Italy. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 10(11):1077-1079.

DOI: 10.1016/j.apjtm.2017.10.011

MANVELL, C., K. FERRIS, R. MAGGI, E. B. BREITSCHWERDT, E. LASHNITS (2021): Prevalence of Vector-Borne Pathogens in Reproductive and Non-Reproductive Tissue Samples from Free-Roaming Domestic Cats in the South Atlantic USA. *Pathogens* 10(9):1221.

DOI: 10.3390/pathogens10091221

MAILLARD, R., E. PETIT, B. CHOMEL, C. LACROUX, F. SCHELCHER, M. VAYSSIER-TAUSSAT, N. HADDAD, H. J. BOULOUIS (2007): Endocarditis in cattle caused by *Bartonella bovis*. *Emerg. Infect. Dis.* 13(9), 1383–1385.

DOI: 10.3201/eid1309.070236

MÄNDLE, T., H. EINSELE, M. SCHALLER, D. NEUMANN, W. VOGEL, I. B. AUTENRIETH, V. A. KEMPF (2005): Infection of human CD34<sup>+</sup> progenitor cells with *Bartonella henselae* results in intraerythrocytic presence of *B henselae*. *Blood* 106(4), 1215-1222.

DOI: 10.1182/blood-2004-12-4670

MARCIANO, O., R. GUTIÉRREZ, D. MORICK, R. KING, Y. NACHUM-BIALA, G. BANETH, S. HARRUS (2016): Detection of *Bartonella* spp. in wild carnivores, hyraxes, hedgehog and rodents from Israel. *Parasitology* 143(10), 1232-42.

DOI: 10.1017/S0031182016000603

MÁRQUEZ, F. J., J. MILLÁN, J. J. RODRÍGUEZ-LIÉBANA, I. GARCÍA-EGEA, M. A. MUNIAIN (2009): Detection and identification of *Bartonella* sp. in fleas from carnivorous mammals in Andalusia, Spain. *Med. Vet. Entomol.* 23(4), 393-8.

DOI: 10.1111/j.1365-2915.2009.00830.x

MARUYAMA, S., S. NOGAMI, I. INOUE, S. NAMBA, K. ASANOME, Y. KATSUBE (1996): Isolation of *Bartonella henselae* from domestic cats in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 58(1), 81-3.

DOI: 10.1292/jvms.58.81

MASCARELLI, P. E., R. G. MAGGI, S. HOPKINS, B. R. MOZAYENI, C. L. TRULL, J. M. BRADLEY, B. C. HEGARTY, E. B. BREITSCHWERDT (2013): *Bartonella henselae* infection in a family experiencing neurological and neurocognitive abnormalities after woodlouse hunter spider bites. *Parasite. Vector.* 6, 98.

DOI: 10.1186/1756-3305-6-98

MAURIN, M., D. RAOULT (1996): Bartonella (Rochalimaea) quintana infections. *Clin Microbiol Rev.* 1996 Jul;9(3):273-92.

DOI: 10.1128/CMR.9.3.273

MAURIN, M., R. BIRTLES, D. RAOULT (1997): Current knowledge of *Bartonella* species. Eur. J. Clin. Microbiol. 16(7), 487-506.

DOI: 10.1007/BF01708232

MAZUREK, Ł., S. WINIARCZYK, M. SKRZYPCZAK, L. ADASZEK (2019): Cats as a reservoir of *Bartonella henselae* for dogs. Ann Agric Environ Med. 26(4), 669-671.

DOI: 10.26444/aaem/105396

MAZUREK, L., A. CARBONERO, M. SKRZYPCZAK, S. WINIARCZYK, Ł. ADASZEK (2020): Epizootic Situation of Feline *Bartonella* Infection in Eastern Poland. J. Vet. Res. 64(1), 79–83.

DOI: 10.2478/jvetres-2020-0019

MIETZE, A., D. MORICK, H. KOHLER, S. HARRUS, C. DEHIO, I. NOLTE, R. GOETHE (2011): Combined MLST and AFLP typing of *Bartonella henselae* isolated from cats reveals new sequence types and suggests clonal evolution. Vet. Microbiol. 148(2-4), 238–245.

DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.08.012

MINNICK, M. F., J. M. BATTISTI (2009): Pestilence, persistence and pathogenicity: infection strategies of *Bartonella*. Future Microbiol. 4(6), 743–758.

DOI: 10.2217/fmb.09.41

MINNICK, M.F., B.E. ANDERSON (2015): *Bartonella*. In book: Molecular Medical Microbiology (Second Edition, Chapter 105). Editors: Tang et al. Publisher: Academic Press, London, pp. 1911-1939.

DOI: 10.1016/B978-0-12-397169-2.00105-0

MOGOLLON-PASAPERA, E., L. Jr OTVOS, A. GIORDANO, M. CASSONE (2009): *Bartonella*: emerging pathogen or emerging awareness? Int. J. Infect. Dis. 13(1), 3-8.

DOI: 10.1016/j.ijid.2008.04.002

MOLIA, S., R. W. KASTEN, M. J. STUCKEY, H. J. BOULOUIS, J. ALLEN, G. M. BORGIO, J. E. KOEHLER, C. C. CHANG, B. B. CHOMEL (2016): Isolation of *Bartonella henselae*, *Bartonella koehlerae* subsp. *koehlerae*, *Bartonella koehlerae* subsp. *bothieri* and a new subspecies of *B. koehlerae* from free-ranging lions (*Panthera leo*) from South Africa, cheetahs (*Acinonyx jubatus*) from Namibia and captive cheetahs from California. *Epidemiol. Infect.* 144(15), 3237-3243.

DOI: 10.1017/S0950268816001394

MOUTAILLER, S., C. VALIENTE MORO, E. VAUMOURIN, L. MICHELET, F. H. TRAN, E. DEVILLERS, J. - F. COSSON, P. GASQUI, V. T. VAN, P. MAVINGUI, G. VOUREC'H, M. VAYSSIER-TAUSSAT (2016): Co-infection of Ticks: The Rule Rather Than the Exception. *PLoS Neglect. Trop. D.* 10(3), e0004539.

DOI: 10.1371/journal.pntd.0004539

MOZAYENI, B. R., R. G. MAGGI, J. M. BRADLEY, E. B. BREITSCHWERDT (2018): Rheumatological presentation of *Bartonella koehlerae* and *Bartonella henselae* bacteremias: A case report. *Medicine* 97(17), e0465.

DOI: 10.1097/MD.00000000000010465

MULLINS, K. E., J. HANG, R. J. CLIFFORD, F. ONMUS-LEONE, Y. YANG, J. JIANG, M. LEGUIA, M. R. KASPER, C. MAGUINA, E. P. LESHIO, R. G. JARMAN, A. RICHARDS, D. BLAZES (2017): Whole-Genome Analysis of *Bartonella ancashensis*, a Novel Pathogen Causing Verruga Peruana, Rural Ancash Region, Peru. *Emerg. Infect. Dis.* 23(3), 430-438.

DOI: 10.3201/eid2303.161476

MÜLLER, A., R. WALKER, P. BITTENCOURT, R. Z. MACHADO, J. L. BENEVENUTE, R. B. DO AMARAL, L. R. GONÇALVES, M. R. ANDRÉ (2017): Prevalence, hematological findings and genetic diversity of *Bartonella* spp. in domestic cats from Valdivia, Southern Chile. *Parasitology* 144(6), 773-782.

DOI: 10.1017/S003118201600247X

MYLONAKIS, M. E., M. SCHREEG, M. K. CHATZIS, J. PEARCE, H. S. MARR, M. N. SARIDOMICHELAKIS, A. J. BIRKENHEUER (2018): Molecular detection of vector-borne pathogens in Greek cats. *Ticks Tick-Borne Dis.* 9(2), 171-175.

DOI: 10.1016/j.ttbdis.2017.08.013

NAMEKATA, D. Y., R. W. KASTEN, D. A. BOMAN, M. H. STRAUB, L. SIPERSTEIN-COOK, K. COUVELAIRE, B. B. CHOMEL (2010): Oral shedding of *Bartonella* in cats: correlation with bacteremia and seropositivity. *Vet. Microbiol.* 146(3-4), 371-5.

DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.05.034.

NĂSOIU, L. I., I. L. MITREA, M. IONIȚĂ (2015): Advanced diagnostic methods as tools to investigate the exposure to *Bartonella* infections in cats. *Proc. Rom. Acad. Series B, Supplement 1, 4th ISAA.* 145-150.

NELSON, C. A., S. SAHA, P. S. MEAD (2016): Cat-Scratch Disease in the United States, 2005–2013. *Emerg. Infect. Dis.* 22(10), 1741-1746.

DOI: 10.3201/eid2210.160115

NELSON, C. A., A. R. MOORE, A. E. PEREA, P. S. MEAD (2018): Cat scratch disease: U.S. clinicians' experience and knowledge. *Zoonoses Public Hlth* 65(1), 67–73.

DOI: 10.1111/zph.12368

OKARO, U., A. ADDISU, B. CASANAS, B. ANDERSON (2017): *Bartonella* Species, an Emerging Cause of Blood-Culture-Negative Endocarditis. *Clin. Microbiol. Rev.* 30(3), 709–746.

DOI: 10.1128/CMR.00013-17

OPOTA, O., K. JATON, G. GREUB (2015): Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood. *Clin Microbiol Infect.* 21(4), 323-331.

DOI: 10.1016/j.cmi.2015.02.005

O'REILLY, K. L., R. W. BAUER, R. L. FREELAND, L. D. FOIL, K. J. HUGHES, K. R. ROHDE, A. F. ROY, R. W. STOUT, P. C. TRICHE (1999): Acute Clinical Disease in Cats following Infection with a Pathogenic Strain of *Bartonella henselae* (LSU16). *Infect. Immun.* 67(6), 3066–3072.

DOI: 10.1128/IAI.67.6.3066-3072.1999

OTEO, J. A., R. G. MAGGI, A. PORTILLO, J. A. BRADLEY, L. GARCÍA-ÁLVAREZ, M. SAN-MARTÍN, X. J. ROURA, E. BREITSCHWERDT (2017): Prevalence of *Bartonella* spp. by culture, PCR and serology, in veterinary personnel from Spain. *Parasite. Vector.* 10, 553.

DOI: 10.1186/s13071-017-2483-z

PANDAK, N., O. DAKOVIĆ-RODE, I. CABRAJA, Z. KRISTOF, S. KOTARAC (2009): Prevalence of *Bartonella henselae* antibodies in children and blood donors in Croatia. *Infection* 37, 166-167.

DOI: 10.1007/s15010-008-8113-0

PARTE, A. C., J. SARDÀ CARBASSE, J. P. MEIER-KOLTHOFF, L. C. REIMER, M. GÖKER (2020): List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 70, 5607-5612.

DOI: 10.1099/ijsem.0.004332

PENNISI, M. G., F. MARSILIO, K. HARTMANN, A. LLORET, D. ADDIE, S. BELÁK, C. BOUCRAUT-BARALON, H. EGBERINK, T. FRYMUS, T. GRUFFYDD-JONES, M. J. HOSIE, H. LUTZ, K. MÖSTL, A. RADFORD, É. THIRY, U. TRUYEN, M. C. HORZINEK (2013): *Bartonella* species infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 15, 563–569.

DOI: 10.1177/1098612X13489214

PENNISI, M. - G., M. - F. PERSICHETTI, L. SERRANO, L. ALTET, S. REALE, L. GULOTTA, L. SOLANO-GALLEGO (2015): Ticks and associated pathogens collected from cats in Sicily and Calabria (Italy). *Parasite. Vector.* 8, 512.



DOI: 10.1186/s13071-015-1128-3

PERSICHETTI, M. F., L. SOLANO-GALLEGO, L. SERRANO, L. ALTET, S. REALE, M. MASUCCI, M. G. PENNISI (2016): Detection of vector-borne pathogens in cats and their ectoparasites in southern Italy. *Parasit Vectors*. 9, 247.

DOI: 10.1186/s13071-016-1534-1

PERSICHETTI, M. F., M. G. PENNISI, A. VULLO, M. MASUCCI, A. MIGLIAZZO, L. SOLANO-GALLEGO (2018): Clinical evaluation of outdoor cats exposed to ectoparasites and associated risk for vector-borne infections in southern Italy. *Parasit Vectors*. 11(1), 136.

DOI: 10.1186/s13071-018-2725-8

PITASSI, L. H., R. F. MAGALHÃES, M. L. BARJAS-CASTRO, E. V. DE PAULA, M. R. FERREIRA, P. E. VELHO (2007): *Bartonella henselae* infects human erythrocytes. *Ultrastruct. Pathol.* 31(6), 369-72.

DOI: 10.1080/01913120701696510

PITASSI, L. H., P. P. DE PAIVA DINIZ, D. G. SCORPIO, M. R. DRUMMOND, B. G. LANIA, M. L. BARJAS-CASTRO, R. GILIOLI, S. COLOMBO, S. SOWY, E. B. BREITSCHWERDT, W. L. NICHOLSON, P. E. VELHO (2015): *Bartonella* spp. bacteremia in blood donors from Campinas, Brazil. *PLoS Neglect. Trop. D.* 9(1): e0003467.

DOI: 10.1371/journal.pntd.0003467

PONS, I., I. SANFELIU, M. QUESADA, E. ANTON, M. SAMPERE, B. FONT, J. PLA, F. SEGURA (2005): Prevalence of *Bartonella henselae* in cats in Catalonia, Spain. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 453-7.

POTKONJAK, A., V. VRAČAR, I. STANČIĆ, LJ. SPASOJEVIĆ KOSIĆ, D. BACIĆ, M. CINCOVIĆ, B. TOHOLJ, O. STEVANČEVIĆ, Z. RISTIĆ (2014): Occurrence of *Bartonella henselae*, Felv and Fiv Infection in 60 Stray Cats from Serbia / Pojava *Bartonella henselae*, Felv I Fiv infekcije kod 60 uličnih mačaka u Srbiji. *Acta Veterinaria*. 64.

DOI: 10.2478/acve-2014-0036

RAIMUNDO, J. M., A. GUIMARÃES, G. M. AMARO, A. T. DA SILVA, C. F. M. BOTELHO, C. L. MASSARD, E. R. S. DE LEMOS, A. R. M. FAVACHO, C. D. BALDANI (2019): Molecular Survey of *Bartonella* Species in Shelter Cats in Rio De Janeiro: Clinical, Hematological, and Risk Factors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 100(6), 1321-1327.

DOI: 10.4269/ajtmh.18-0585

RAMPERSAD, J. N., J. D. WATKINS, M. S. SAMLAL, R. DEONANAN, S. RAMSUBEIK, D. R. AMMONS (2005): A nested-PCR with an Internal Amplification Control for the detection and differentiation of *Bartonella henselae* and *B. clarridgeiae*: an examination of cats in Trinidad. *BMC Infect Dis.* 5, 63.

doi: 10.1186/1471-2334-5-63

RAOULT, D. (2007): From Cat Scratch Disease to *Bartonella henselae* Infection. *Clin. Infect. Dis.* 45(12), 1541–1542.

DOI: 10.1086/523716

RAZGŪNAITĖ, M., I. LIPATOVA, A. PAULAUSKAS, B. KARVELIENĖ, V. RIŠKEVIČIENĖ, J. RADZIJEVSKAJA (2021): *Bartonella* Infections in Cats and Cat Fleas in Lithuania. *Pathogens (Basel, Switzerland)* 10(9), 1209.

DOI: 10.3390/pathogens10091209

REGIER, Y., F. O'ROURKE, V. KEMPF (2016): *Bartonella spp.* - A chance to establish One Health concepts in veterinary and human medicine. *Parasite. Vector.* 9(1), 261.

DOI: 10.1186/s13071-016-1546-x

REGIER, Y., W. BALLHORN, V. A. J. KEMPF (2017): Molecular detection of *Bartonella henselae* in 11 *Ixodes ricinus* ticks extracted from a single cat. *Parasite. Vector.* 10, 105.

DOI: 10.1186/s13071-017-2042-7

REGNERY, R. L., B. E. ANDERSON, J. E. CLARRIDGE, M. C. RODRIGUEZ BARRADAS, D. C. JONES, J. H. CARR (1992a): Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *J. Clin. Microbiol.* 30, 265-274.

DOI: 10.1128/jcm.30.2.265-274.1992

REGNERY, R. L., J. G. OLSON, B. A. PERKINS, W. BIBB (1992b): Serological response to "*Rochalimaea henselae*" antigen in suspected cat-scratch disease. *Lancet* 339(8807), 1443-1445.

DOI: 10.1016/0140-6736(92)92032-b

REGNERY, R. L., J. E. CHILDS, J. E. KOEHLER (1995): Infections associated with *Bartonella* species in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* 21 (Suppl 1), S94-S98.

DOI : 10.1093/clinids/21.Supplement\_1.S94

REGNERY, R., J. W. TAPPERO (1995): Unraveling Mysteries Associated with Cat-Scratch Disease, Bacillary Angiomatosis, and Related Syndromes. *Emerg. Infect. Dis.* 1(1), 16-21.

DOI : 10.3201/eid0101.090103

REIS, C., M. COTE, D. LE RHUN, B. LECUELLE, M. L. LEVIN, M. VAYSSIER-TAUSSAT, S. I. BONNET (2011): Vector competence of the tick *Ixodes ricinus* for transmission of *Bartonella birtlesii*. *PLoS Neglect. Trop. D.* 5(5): e1186.

DOI: 10.1371/journal.pntd.0001186

RIDDER-SCHRÖTER, R., A. MARX, M. BEER, D. TAPPE, H. W. KRETH, H. J. GIRSCHICK (2008): Abscess-forming lymphadenopathy and osteomyelitis in children with *Bartonella henselae* infection. *J. Med. Microbiol.* 57, 519-524.

DOI: 10.1099/jmm.0.47438-0

ROLAIN, J.-M., M. FRANC, B. DAVOUST, D. RAOULT (2003): Molecular Detection of *Bartonella quintana*, *B. koehlerae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *Rickettsia felis*, and *Wolbachia pipientis* in Cat Fleas, France. *Emerg. Infect. Dis.* 9(3), 339–342.

DOI: 10.3201/eid0903.020278

ROLAIN, J. M., C. LOCATELLI, L. CHABANNE, B. DAVOUST, D. RAOULT (2004): Prevalence of *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella henselae* in domestic cats from France and detection of the organisms in erythrocytes by immunofluorescence. *Clin. Diagn. Lab. Immun.* 11(2), 423-5.

DOI: 10.1128/cdli.11.2.423-425.2003

RUDOLER, N., M. RASIS, B. SHARIR, A. NOVIKOV, G. SHAPIRA, M. GILADI (2014): First description of *Bartonella bovis* in cattle herds in Israel. *Vet. Microbiol.* 173(1-2), 110-7.

DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.07.006

SAISONKORH, W., J. M. ROLAIN, Y. SUPUTTAMONGKOL, D. RAOULT (2009): Emerging *Bartonella* in humans and animals in Asia and Australia. *J. Med. Assoc. Thailand* 92(5):707-31.

SANDER, A., C. BÜHLER, K. PELZ, E. VON CRAMM, W. BREDT (1997): Detection and identification of two *Bartonella henselae* variants in domestic cats in Germany. *J. Clin. Microbiol.* 35(3), 584-587.

DOI: 10.1128/jcm.35.3.584-587.1997

SATO, S., H. KABEYA, A. NEGISHI, H. TSUJIMOTO, K. NISHIGAKI, Y. ENDO, S. MARUYAMA (2017): Molecular survey of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in pet cats across Japan by species-specific nested-PCR. *Epidemiol Infect.* 145(13), 2694-2700.

DOI: 10.1017/S0950268817001601

SİĞIRCI, B. D., A. ILGAZ (2013): Detection of the Presence of *Bartonella henselae* in Cats in Istanbul. *J. Fac. Vet. Med. Istanbul Univ.* 39(2), 209-217.

SIGIRCI, D., B., B. B. CELIK, B. B. KAHRAMAN, B. GUMUS, K. METINER, M. ADIGUZEL, S. IKIZ, F. BAGCIGIL, N. OZGUR, S. AK (2016): A Comparative Study on Detection of *Bartonella henselae* Infection by Culture followed by PCR, Nested-PCR and IFA. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi. 23.

DOI: 10.9775/kvfd.2016.16632

SPADA, E. (2016): Screening Feline Blood Donors for *Bartonella henselae* Infection: Comparison between Indirect Immunofluorescent Antibody Test (IFAT) and Polymerase Chain Reaction (PCR) Results. J Vet Clin Pract Pet Care 1, 1-9.

DOI: 10.17303/jvcpc.2016.104

SPICKLER, A. R. (2012): Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections. Iowa State University Center for Food Security and Public Health *Technical Factsheets*. Preuzeto iz: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>.

SPRATT, B. G. (2004): Exploring the concept of clonality in bacteria. *Methods Mol. Biol.* 266, 323-352.

DOI: 10.1385/1-59259-763-7:323

SRÉTER-LANCZ, Z., K. TORNYAI, Z. SZÉLL, T. SRÉTER, K. MÁRIALIGETI (2006): *Bartonella* infections in fleas (Siphonaptera: Pulicidae) and lack of *Bartonellae* in ticks (Acari: Ixodidae) from Hungary. *Folia Parasit. (Praha)* 53(4), 313-316.

DOI: 10.14411/fp.2006.039

SRISANYONG, W., R. TAKHAMPUNYA, T. BOONMARS, A. KERDSIN, F. SUKSAWAT (2016): Prevalence of *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae*, and *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* in pet cats from four provincial communities in Thailand. *Thai J. Vet. Med.* 46, 663-670.

STAGGEMEIER, R., C. A. VENKER, D. H. KLEIN, M. PETRY, F. R. SPILKI, V. V. CANTARELLI (2010): Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats in the south of Brazil: a molecular study. *Mem. I. Oswaldo Cruz* 105(7), 873-878.

DOI: 10.1590/S0074-02762010000700006

STEPANIĆ, M., S. DUVNJAK, I. REIL, S. ŠPIČIĆ, G. KOMPES, D. JURKOVIĆ, B. ZIDAR, R. BECK (2018): Prvi dokaz sekvencijskog tipa 5 *Bartonella henselae* u mačaka: najvjerojatniji izvor zaraze za djecu oboljelu od bolesti mačjeg ogreba. Program i zbornik sažetaka radionice s međunarodnim sudjelovanjem: Emergentne i zapostavljene zoonoze u kontekstu "Jednog zdravlja", Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 18. do 19. listopada, Zagreb, str. 81-82.

STEPANIĆ, M., S. DUVNJAK, I. REIL, S. ŠPIČIĆ, G. KOMPES, R. BECK (2019): First isolation and genotyping of *Bartonella henselae* from a cat living with a patient with cat scratch disease in Southeast Europe. BMC Infect. Dis. 19(1), 299.

DOI: 10.1186/s12879-019-3929-z

STÜTZER, B., K. HARTMANN (2012): Chronic Bartonellosis in cats: what are the potential implications? J. Feline Med. Surg. 14(9), 612-21.

DOI: 10.1177/1098612X12458208

STILES, J. (2011): Bartonellosis in cats: a role in uveitis? Vet. Ophthalmol. 14, 9-14.

DOI: 10.1111/j.1463-5224.2011.00901.x

SYKES, J., J. L. WESTROPP, R. W. KASTEN, B. CHOMEL (2010): Association between *Bartonella* species infection and disease in pet cats as determined using serology and culture. J. Feline Med. Surg. 12, 631-636.

DOI: 10.1016/j.jfms.2010.04.003

SYKES, J. E., B. B. CHOMEL (2014): Bartonellosis. Canine and Feline Infectious Diseases 498–511.

DOI: 10.1016/B978-1-4377-0795-3.00052-1

SZUMILAS, M. (2010): Explaining odds ratios [published correction appears in J Can Acad Child Adolesc Psychiatry. 2015 Winter; 24(1): 58]. J Can Acad Child Adolesc Psychiatry. 19(3), 227-229.

TABAR, M. D., L. ALTET, R. G. MAGGI, J. ALTIMIRA, X. ROURA (2017): First description of *Bartonella koehlerae* infection in a Spanish dog with infective endocarditis. Parasite. Vector. 10(1), 247.

DOI: 10.1186/s13071-017-2188-3

TANG, L. (2019): Culturing uncultivated bacteria. *Nat Methods* 16, 1078.

DOI: 10.1038/s41592-019-0634-1

TRAVERSA, D. (2013): Fleas infesting pets in the era of emerging extra-intestinal nematodes. *Parasite. Vector.* 6, 59.

DOI: 10.1186/1756-3305-6-59

TSAI, Y. L., C. C. LIN, B. B. CHOMEL, S. T. CHUANG, K. H. TSAI, W. J. WU, C. G. HUANG, J. C. YU, M. H. SUNG, P. H. KASS, C. C. CHANG (2011): *Bartonella* infection in shelter cats and dogs and their ectoparasites. *Vector-Borne Zoonot.* 11(8), 1023-1030.

DOI: 10.1089/vbz.2010.0085

TSUNEOKA, H., C. ISHIDA, A. UMEDA, H. INOKUMA, M. TSUKAHARA (2004): Evaluation of isolation media for the detection of *Bartonella henselae* - isolation of *Bartonella henselae* from domestic cats. *Jpn. J. Infect. Dis.* 78(7), 574-579.

DOI: 10.11150/kansenshogakuzasshi1970.78.574

UENO, H., T. HOHDATSU, Y. MURAMATSU, H. KOYAMA, C. MORITA (1996): Does coinfection of *Bartonella henselae* and FIV induce clinical disorders in cats? *Microbiol. Immunol.* 40(9), 617-620.

DOI: 10.1111/j.1348-0421.1996.tb01118.x

VARANAT, M., R. G. MAGGI, K. E. LINDER, S. HORTON, E. B. BREITSCHWERDT (2009a): Cross-contamination in the molecular detection of *Bartonella* from paraffin-embedded tissues. *Vet Pathol.* 46(5), 940-944.

doi: 10.1354/vp.08-VP-0259-B-BC

VARANAT, M., A. TRAVIS, W. LEE, R. G. MAGGI, S. A. BISSETT, K. E. LINDER, E. B. BREITSCHWERDT (2009b): Recurrent osteomyelitis in a cat due to

infection with *Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii* genotype II. J. Vet. Intern. Med. 23(6), 1273-1277.

DOI: 10.1111/j.1939-1676.2009.0372.x

VARANAT, M., J. BROADHURST, K. E. LINDER, R. G. MAGGI, E. B. BREITSCHWERDT (2012): Identification of *Bartonella henselae* in 2 cats with pyogranulomatous myocarditis and diaphragmatic myositis. Vet. Pathol. 49(4):608-11.

DOI: 10.1177/0300985811404709

VAYSSIER-TAUSSAT, M., S. MOUTAILLER, F. FÉMÉNIA, P. RAYMOND, O. CROCE, B. LA SCOLA, P.-E. FOURNIER, D. RAOULT (2016): Identification of Novel Zoonotic Activity of *Bartonella* spp., France. Emerg. Infect. Dis. 22(3), 457–462.

DOI: 10.3201/eid2203.150269

VIEIRA-DAMIANI, G., P. P. DINIZ, L. H. PITASSI, S. SOWY, D. G. SCORPIO, B. G. LANIA, M. R. DRUMMOND, T. C. SOARES, M. BARJAS-CASTRO, E. B. BREITSCHWERDT, W. L. NICHOLSON, P. E. VELHO (2015): *Bartonella clarridgeiae* Bacteremia Detected in an Asymptomatic Blood Donor. J. Clin. Microbiol. 53(1), 352–356.

DOI:10.1128/JCM.00934-14

VIEZENS, J., M. ARVAND (2008): Simultaneous presence of two different copies of the 16S rRNA gene in *Bartonella henselae*. Microbiology (Reading, Engl.). 154(Pt9), 2881-2886.

DOI: 10.1099/mic.0.2008/018630-0

VILIBIC-CAVLEK, T., D. KARLOVIC-MARTINKOVIC, S. LJUBIN-STERNAK, I. TABAIN, Z. PERSIC, G. MLINARIC-GALINOVIC (2012): High prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* antibodies in Croatian patients presenting with lymphadenopathy. Pol. J. Microbiol. 61(4), 315-317.

DOI: 10.33073/pjm-2012-043



WAGNER, A., C. DEHIO (2019): Role of distinct type-IV-secretion systems and secreted effector sets in host adaptation by pathogenic *Bartonella* species. *Cell. Microbiol.* 21(3), e13004.

DOI: 10.1111/cmi.13004

WECHTAISONG, W., S. I. BONNET, Y. - Y. LIEN, S. - T. CHUANG, Y. - L. TSAI (2020): Transmission of *Bartonella henselae* within *Rhipicephalus sanguineus*: Data on the Potential Vector Role of the Tick. *PLoS Neglect. Trop. D.* 14(10), e0008664.

DOI: 10.1371/journal.pntd.0008664

WELCH, D. F., D. M. HENSEL, D. A. PICKETT, V. H. SAN JOAQUIN, A. ROBINSON, L. N. SLATER (1993): Bacteremia due to *Rochalimaea henselae* in a child: practical identification of isolates in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 31(9), 2381–2386.

DOI: 10.1128/jcm.31.9.2381-2386.1993

WOUDSTRA, C., P. FACH, B. B. CHOMEL, N. HADDAD, H. - J. BOULOUIS (2017): Draft Genome Sequences of 12 Feline *Bartonella henselae* Isolates. *Genome Announcements* 5(13), e00075–17.

DOI: 10.1128/genomeA.00075-17

YAMAMOTO, K., B. CHOMEL, L. LOWENSTINE, L. PHILLIPS, J. BLACKWELL, R. KASTEN, N. PEDERSEN (1997): Prevalence of *Bartonella henselae* antibodies in captive wild felids, California, and association with ectoparasite infestation. *International Symposia on Veterinary Epidemiology and Economics proceedings, ISVEE 8: Proceedings of the 8th Symposium, Paris, France, Epidemiology & wildlife session, 01.A01, Jul 1997.*

YAMAMOTO, K., B. B. CHOMEL, R. W. KASTEN, C. M. HEW, D. K. WEBER, W. I. LEE, S. DROZ, J. E. KOEHLER (2002): Experimental infection of domestic cats with *Bartonella koehlerae* and comparison of protein and DNA profiles with those of other *Bartonella* species infecting felines. *J. Clin. Microbiol.* 40(2), 466-474.

DOI: 10.1128/JCM.40.2.466-474

YANAGIHARA, M., H. TSUNEOKA, S. HOSHIDE, E. ISHIDO, A. UMEDA, M. TSUKAHARA, J. NOJIMA, K. ICHIHARA, K. HINO, I. HIRAI, Y. YAMAMOTO (2010): Molecular typing of *Bartonella henselae* DNA extracted from human clinical specimens and cat isolates in Japan. FEMS Immunol. Med. Mic. 60(1), 44-48.

DOI: 10.1111/j.1574-695X.2010.00711.x

YUAN, C., C. ZHU, Y. WU, X. PAN, X. HUA (2011): Bacteriological and molecular identification of *Bartonella* species in cats from different regions of China. PLoS Neglect. Trop. D. 5(9), e1301.

DOI: 10.1371/journal.pntd.0001301

ZANGWILL, K. M., D. H. HAMILTON, B. A. PERKINS, R. L. REGNER, B. D. PLIKAYTIS, J. L. HADLER, M. L. CARTTER, J. D. WENGER (1993): Cat Scratch Disease in Connecticut - Epidemiology, Risk Factors, and Evaluation of a New Diagnostic Test. New Engl. J. Med. 329, 8-13.

DOI: 10.1056/NEJM199307013290102

ZANUTTO, M. D. S., E. M. MAMIZUKA, R. RAIZ-JÚNIOR, T. M. D. LIMA, C. L. DIOGO, T. S. OKAY, M. K. HAGIWARA (2001): Experimental infection and horizontal transmission of *Bartonella henselae* in domestic cats. Rev. Inst. Med. Trop. SP 43(5), 257-261.

DOI: 10.1590/S0036-46652001000500004

ZHANG Y, Z. ZHANG, Y. LOU, Y. YU (2021): Prevalence of hemoplasmas and *Bartonella* species in client-owned cats in Beijing and Shanghai, China. J Vet Med Sci. 83(5), 793-797.

doi: 10.1292/jvms.20-0681

ZHAO, F., X. P. SONG, D. M. LI, R. T. HUANG, Z. F. LI, Q. Y. LIU (2011): Multilocus sequence typing analysis for *Bartonella henselae* isolates in China. Chin J Zoonoses. 27(7), 592-596.

## 9. PRILOZI

### Prilog 1:

**Tablica 1.** Vrste, rezervoari, vektori i zoonotski potencijal 41 vrste i podvrste bartonela iz LPNS baze nazivlja prokariota

Broj	Vrsta	Rezervoar	Vektor	Ljudi
1	<i>B. acomydis</i>	Zlatni bodljasti miš	?	-
2	<i>B. alsatica</i>	Divlji kunić	Buhe, krpelji	+
3	<i>B. ancashensis</i>	Čovjek	?	-
4	<i>B. apis</i>	Medonosna pčela	?	-
5	<i>B. bacilliformis</i>	Čovjek	Buhe, papatači	-
6	<i>B. birtlesii</i>	Šumski miš	Buhe	-
7	<i>B. bovis</i> (prije <i>B. weissii</i> )	Govedo (mačka)	Obadi, krpelji	+/-
8	<i>B. callosciuri</i>	Bananina vjeverica	?	-
9	<i>B. capreoli</i>	Srna	Obadi, krpelji	-
10	<i>B. chomelii</i>	Govedo	Obadi, krpelji	-
11	<i>B. clarridgeiae</i>	Mačka	Buhe, krpelji*	+
12	<i>B. coopersplainsensis</i>	Štakor	?	-
13	<i>B. doshiae</i>	Voluharica, štakor	Buhe	+
14	<i>B. elizabethae</i>	Štakor, pas	Buhe	+
15	<i>B. florencae</i>	Rovka, miš	?	-
16	<i>B. fuyuanensis</i>	Poljski miš	?	-
17	<i>B. grahamii</i>	Miš, voluharica	Buhe	+
18	<i>B. heixiaziensis</i>	Voluharica	?	-
19	<i>B. henselae</i>	Mačka	Buhe, krpelji*	+
20	<i>B. jaculi</i>	Skočimiš	?	-

21	<i>B. japonica</i>	Poljski miš	Mišja uš	-
22	<i>B. koehlerae</i> subsp. <i>koehlerae</i>	Mačka, gerbil	Buhe	+
23	<i>B. koehlerae</i> subsp. <i>bothieri</i>	Ris, gepard	Buhe	+
24	<i>B. koehlerae</i> subsp. <i>boulouisii</i>	Puma	Buhe	+
25	<i>B. kosoyi</i>	Štakor	Buhe	-
26	<i>B. krasnovii</i>	Štakor	Buhe	-
27	<i>B. pachyuromydis</i>	Gerbil	?	-
28	<i>B. peromysci</i>	Poljski miš	Buhe	-
29	<i>B. queenslandensis</i>	Štakor	Buhe	-
30	<i>B. quintana</i>	Čovjek	Tjelesna uš	+/-
31	<i>B. rattaaustraliani</i>	Štakor	Buhe	-
32	<i>B. rochalimae</i>	Lisica, rakun, kojot	Buhe*, krpelji*	+
33	<i>B. schoenbuchensis</i>	Srna, govedo	Uš jelena, krpelj	+
34	<i>B. senegalensis</i>	Glodavci	Meki krpelji	-
35	<i>B. silvatica</i>	Poljski miš	?	-
36	<i>B. talpae</i>	Krtice	Buhe	-
37	<i>B. taylorii</i>	Glodavci	Buhe	-
38	<i>B. tribocorum</i>	Štakor, miš	Buhe	+
39	<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	Pas, miš, govedo	Buhe, krpelji	+
40	<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	Psi, kojoti, lisice	Buhe*, krpelji*	+
41	<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i>	voluharice	ušna grinja	+

\* = nije potvrđeni kompetentni vektor; ? = vektori još nisu poznati; + = zoonotske vrste čiji rezervoari su životinje; +/- = rezervoari su ljudi, potencijalni prijenos životinjama

## Prilog 2:

Veterinarska ambulanta:

Datum uzimanja krvi: \_\_\_\_\_ Oznaka na epruveti s krvi: \_\_\_\_\_

Upitnik za svaku životinju (zaokružiti ili nadopuniti - **HVALA!**):  
(Ispitivanje krvi mačaka na prisutnost bakterije *Bartonella henselae* – uzročnika  
„bolesti mačjeg ogreba“)

Vrsta:	Mačka	Ime i adresa vlasnika (uz pristanak):	
Ime:		Pasmina:	a) domaća – križana b) pasmina _____
Starost:			
Spol:	M / Ž		
Kastriran/a:	DA / NE	Boja:	

### MOŽE I VIŠE ODGOVORA!

Trenutno zdravstveno stanje:	a) zdrava b) akutno bolesna c) kronično bolesna	i) smetnje urogenitalnog sustava j) neurološke smetnje k) žutica l) povećani limfni čvorovi m) promjene na koži ( _____ ) n) drugo	
Da li je trenutno na terapiji antibiotcima:	a) ne prima antibiotike b) prima ant. već __ dana (koji _____)	Način života:	a) strogo u kući / stanu b) u kući i vani c) samo izvan kuće
Ima li sada / prije <b>ektoparazite</b> na koži:	a) da – sad ima buhe b) da – sad ima krpelje c) trenutno nisu uočeni d) prije je imala	Područje gdje životinja živi:	a) grad _____ b) selo _____ c) blizina šume
Da li je tretirana protiv buha u zadnja 3mjeseca:	a) da – ampula - sprej b) da - drugo _____ c) nije tretirana	Druge mačke u kućanstvu:	a) nema b) ima - broj ( ____ ) c) ako ima: <b>zdrave - bolesne</b>
Da li je kad testirana na virusne bolesti (leukoza, FIV..):	a) testirana je, pozitivna je na b) negativna je na sve c) nije testirana	Druge životinjske vrte u kućanstvu:	a) psi b) kunići - glodavci ____ c) domaće životinje
Transfuzija krvi druge mačke:	a) nikad do sada nije primala b) primila je krv druge mačke	Kontakt s divljači:	a) da b) ne
Crijevni paraziti:	a) ima (gliste – trakavice) b) nisu uočeni	Porijeklo:	a) omacila se kod vlasnika b) kupljena c) udomljena / pronađena
Kožni dermatofiti (mikrosporoza..):	a) nema znakova b) ima znakova c) trenutno je na terapiji	Putovanja – promjena mjesta boravka:	a) ne mijenja boravište b) inozemstvo _____ c) Jadran d) kontinentalna Hrvatska
Vakcinacija protiv virusnih bolesti mačaka:	a) nikada nije cijepljena b) samo protiv bjesnoće c) uredno je cijepljena d) povremeno cijepljena	Da li je tko obolio od bolesti mačjeg ogreba:	a) da b) ne c) ne poznaju tu bolest
Dijagnoza (kod bolesnih):	a) jasna _____ b) još nije postavljena	Ima li u kući ljudi sa slabim imunitetom (uz pristanak):	a) maligni, kronični b) autoimune, transplantacija c) nema
Simptomi (kod bolesnih):	a) povišena temperatura b) <b>inapetencija</b> c) letargija d) upalne promjene na očima e) upalne promjene usne šupljini f) smetnje dišnog sustava g) kardiovaskularne smetnje h) smetnje probavnog sustava	<p><b>NAPOMENA:</b> podaci će se koristiti isključivo za izradu doktorskog rada Maje Štepanić, <b>dr.vet.med.</b> (HVI Zagreb) i neće se dalje neovlašteno predavati, a vlasnicima životinja jamči se diskrecija. Kontakt telefon: 01/ 6123 – 615, 8–15h.</p>	

Mob: 095 998 1115. EPRUVETU S KRVI DO DOSTAVE  
POHRANITI U **ZAMRZIVAČ!**

**Slika 5.** Primjer obrasca anketnog Upitnika. Podaci su prikupljeni s ciljem utvrđivanja čimbenika rizika koji bi se mogli dovesti u vezu s infekcijom mačaka bakterijama roda *Bartonella*.

**Prilog 3:**

**Tablica 12.** Rezultati porasta izolata bakterije *B. henselae* i njezinih sekvencijskih tipova (ST) na korištenim hranjivim podlogama nacijepljenim uzorcima krvi mačaka u primoizolaciji

Br.	Uzorak	ST	Nacijepljene (x) i pozitivne (+) hranjive podloge te dani porasta (u zagradi)						Br. izolata		
			TSA	BH	COL	ČOK	EKA	TSA+ TSB		BH+ BB	
<b>Sekvencijski tip 5</b>											
1	VB8	5				x	x	x/+ (14)	x	1	
2	H6	5	x	x/+ (7)				x/+ (10)	x/+ (7)	3	
3	H8	5		x/+ (16)	x			x/+ (10)		2	
4	BUBA	5	x/+ (6)	x/+ (6)	x			x/+ (18)	x	3	
5	SNJEŠKA	5						x/+ (12)		1	
6	KRON	5		x/+ (12)	x/+ (12)					2	
7	JUG1	5	x	x/+ (8)	x/+ (8)			x/+ (8)		3	
8	JUG3	5	x/+ (15)	x/+ (13)						2	
9	CEZAR1	5	x/(+10)	x/+ (4)	x/+ (12)			x/+ (15)	x/+ (10)	x/+ (4)	6
	CEZAR2	5		x/+ (21)	x/+ (12)			x/+ (21)	x/+ (21)	x/+ (12)	5
10	VAP1	5	x/+ (11)	x/+ (11)						2	
11	VAP3	5	x/+ (11)	x	x/+ (17)			x/+ (11)		3	
12	TF5	5	x/+ (6)	x/+ (11)				x/+ (17)	x/+ (11)	4	
13	TF7	5	x/+ (11)					x/+ (11)	x/+ (11)	3	
14	TF8	5	x/+ (38)					x	x/+ (32)	2	
15	TF9	5	x/+ (11)					x/+ (17)		2	
16	CES4	5	x	x/+ (13)	x/+ (13)			x/+ (10)		3	
17	SIVKO	5	x/+ (8)	x/+ (8)	x/+ (21)			x/+ (19)	x	x	4
<b>Sekvencijski tip 6</b>											
18	H3	6	x	x/+ (7)				x/+ (10)	x/+ (7)	x	3
19	JUG2	6	x/+ (18)	x/+ (8)	x/+ (11)			x/+ (11)			4
20	VAP2	6	x	x/+ (11)							1
21	VAP5	6		x/+ (11)	x/+ (11)			x/+ (11)			3
22	TF4	6	x					x/+ (17)			1
23	VAH4	6	x/+ (19)	x/(+56)	x			x			2
24	VAH5	6	x		x/+ (19)			x			1

Sekvencijski tip 1							
25	ĐIDI	1		x/+ (7)	x/+ (7)	x/+ (12)	3
26	AK8	1	x	x/+ (13)	x/+ (11)	x/+ (11)	3
27	VAP8	1	x			x/+ (17)	1
28	VAH10	1	x	x	x/+ (7)	x/+ (25)	2
Sekvencijski tip 24							
29	BJ8	24	x/+ (11)	x/+ (11)		x	x/+ (25)
Sekvencijski tip 33							
30	MICIKA	33		x/+ (7)	x/+ (7)	x/+ (12)	3
Nije određen sekvencijski tip (ST5 ili ST24?) (živa mačka)							
31	DUB5	-	x	x		x	x/(35)
Nije određen sekvencijski tip (uginula mačka)							
32	DD5	-				x/+ (7)	1

Hranjive podloge korištene na uzorcima krvi mačaka: TSA s dodatkom 5% defibrinirane ovčje krvi; BH s dodatkom 5% defibrinirane kuničje krvi; COL s dodatkom 5% defibrinirane ovčje krvi; ČOK agar s dodatkom 10% defibrinirane ovčje krvi; EKA (Eskulin krvni agar) s dodatkom 5% defibrinirane ovčje krvi; TSA+TSB (eng. Tryptic soy agar/ Broth), bifazični medij s dodatkom 5% defibrinirane ovčje krvi u agaru; BH+BB (eng. Brain heart agar, Brucella broth) bifazični medij s dodatkom 5% defibrinirane kuničje krvi u agaru

#### Prilog 4:

**Tablica 13.** Broj kolonija (CFU/mL) određen na različitim hranjivim podlogama u 24 mačke s dokazanom bakterijemijom uzrokovanom bakterijom *B. henselae*

Oznaka uzorka (ST)	Spol	Dob	Način života	Lokacija	*HP (dan porasta)	Broj kolonija na površini / volumen krvi	CFU/mL krvi
H3 (6)	M	6 mj.	kućna	Zagreb	ČOK (10)	750 200 µL	>3750
H6 (5)	M	5 mj.	kućna	Zagreb	BH (7)	392 200 µL	1960
				Zagreb	ČOK (10)	346 200 µL	1730
H8 (5)	Ž	6 mj.	kućna	Zagreb	BH (16)	388 200 µL	1940
BUBA (5)	Ž	10 mj.	kućna	Zagreb	BH (6)	251 250 µL	1004
				Zagreb	TSA (6)	204 250 µL	816
SNJEŠKA (5)	Ž	8 mj.	kućna	Jastrebarsko	ČOK (12)	8 200 µL	40
KRON (5)	M	8 mj.	kućna	Jastrebarsko	COL (12)	16 200 µL	80
					BH (12)	12 200 µL	60
CEZAR 1 (5)	M	2 g.	kućna	Zabok	BH (4)	378 250 µL	1512
					EKA (10)	283 250 µL	1132
CEZAR 2 (5)	M	2 g.	kućna	Zabok	BH (21)	4 250 µL	16
					ČOK (21)	14 250 µL	56
					EKA (21)	10 250 µL	40
ĐIDI (1)	M	3 g.	kućna	Jastrebarsko	BH (7)	217 200 µL	1085

					COL (7)	610	200 µL	3050
MICIKA (33)	Ž	6 mj.	kućna	Jastrebarsko	BH (7)	408	250 µL	1632
					COL (7)	385	250 µL	1540
AK8 (1)	M	2g.	kućna	Vinkovci	BH (13)	20	250 µL	80
JUG3 (5)	M	2g.	kućna	Jastrebarsko	BH (13)	3	150 µL	20
					TSA (15)	3	150 µL	20
VAP3 (5)	M	8 mj.	kućna	Pula	EKA (11)	288	150 µL	1920
VAP5 (6)	Ž	1,5g.	ulična	Pula	EKA (11)	1	250 µL	4
VAP8 (1)	Ž	7 mj.	kućna	Pula	EKA (17)	4	250 µL	16
TF4 (6)	Ž	1g.	kućna	Rijeka	EKA (17)	4	250 µL	16
TF5 (5)	M	1 g.	kućna	Rijeka	TSA (6)	454	250 µL	1816
TF8 (5)	Ž	3 g.	ulična	Rijeka	EKA (32)	1	250 µL	4
					TSA (38)	1	250 µL	4
TF7 (5)	Ž	2g.	ulična	Rijeka	TSA (11)	10	250 µL	40
					EKA (11)	7	250 µL	28
TF9 (5)	Ž	1g.	ulična	Rijeka	TSA (11)	5	250 µL	20
					EKA (17)	8	250 µL	32
BJ8 (24)	Ž	3g.	kućna	Bjelovar	BH (7)	6	250 µL	24
VAH4 (6)	Ž	1g.	kućna	Pula	TSA (19)	1	250 µL	4
VAH5 (6)	M	6 g.	udruga	Pula	COL (19)	25	250 µL	100
VAH10 (1)	M	1g.	udruga	Pula	COL (7)	10	250 µL	40
					ČOK (25)	10	250 µL	40
SIVKO (5)	M	5 mj.	kućna	Zabok	COL (21)	20	250 µL	80
	M	5 mj.	kućna	Zabok	BH (8)	20	250 µL	80
	M	5 mj.	kućna	Zabok	ČOK (19)	10	250 µL	40
	M	5 mj.	kućna	Zabok	TSA (8)	30	250 µL	120

\*HP = hranjiva podloga. **Napomena:** uočena je korelacija prvog dana porasta kolonija i stupnja bakterijemije mačaka; izolati brže rastu kod visokog, a sporije kod niskog stupnja bakterijemije.



## **10. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA**

Maja Stepanić rođena je 3.5.1975. u Zagrebu. Osnovnu školu završila je u Velikoj Gorici. Nakon završene XI. gimnazije u Zagrebu, 1993. godine upisala je Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 27.9.2000. godine s temom „Provjera učinkovitosti inaktivirane vakcine protiv bolesti Aujeskoga na štakorima“, pod vodstvom akademika Josipa Madića.

Tijekom studija volontirala je u klinikama za male životinje u mjestu stanovanja u Velikoj Gorici (Veterinarska ambulanta Ava) i 1999. godine u Rosenheimu u Njemačkoj (Tierklinik dr. Suren). Od veljače 2001. godine u Veterinarskoj stanici Jastrebarsko započela je vježbenički staž po čijem završetku je zaposlena u ambulanti za male životinje i u veterinarskoj ljekarni, a nakon završene izobrazbe 2002. godine radila je i poslove postmortalne dijagnostike trihineloze. Po završetku Državnog stručnog ispita 2004. godine u svojstvu ovlaštenog veterinarara obavljala je i poslove veterinarsko - zdravstvenih pregleda i službenih kontrola.

Od kolovoza 2007. godine do danas radi u Laboratoriju za pripremu hranjivih podloga i sterilizaciju Odjela za bakteriologiju i parazitologiju Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu na radnom mjestu višeg stručnog suradnika, a voditeljica laboratorija je od 2010. godine u kojem se bavi izradom hranjivih podloga u rutinske i znanstvene svrhe. Kontinuirano pohađa edukacije iz područja pripreme hranjivih podloga, sterilizacije, pročišćavanja i pripreme laboratorijske vode te postupanja i zbrinjavanja otpada.

Doktorski studij iz veterinarskih znanosti upisuje 2012. godine. Od tada sudjeluje kao koautor na nešto više od desetak publikacija u suradnji sa znanstvenicima Hrvatskog veterinarskog instituta. Mogućnost istraživanja uzgoja bartonela iz krvi mačaka i ektoparazita u sklopu redovnog radnog mjesta pokazala se izvrsnom za temu ove disertacije. Aktivno se služi engleskim i njemačkim jezikom.

Od 2019. godine majka je djevojčice Nelly.

### Radovi u časopisima:

STEPANIĆ, M., S. DUVNJAK, I. REIL, S. ŠPIČIĆ, G. KOMPES, R. BECK (2019): First isolation and genotyping of *Bartonella henselae* from a cat living with a patient with cat scratch disease in Southeast Europe. BMC Infect. Dis. 19 (1), 299.

DOI: 10.1186/s12879-019-3929-z

STOJEVIĆ, D., M. STEPANIĆ, V. DOBRANIĆ, A. HUMSKI (2016): Određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka na Baird-Parker selektivnoj podlozi različitih proizvođača. Veterinarska stanica 47 (4), 309-315.

CVETNIĆ, L., M. BENIĆ, B. HABRUN, G. KOMPES, M. STEPANIĆ, M. SAMARDŽIJA (2016): Najčešći uzročnici mastitisa u krava i koza u Republici Hrvatskoj. Veterinarska stanica 47 (2), 109-116.

CVETNIĆ, Ž., S. DUVNJAK, M. ZDELAR-TUK, I. REIL, B. HABRUN, M. BENIĆ, R. BECK, G. KOMPES, M. STEPANIĆ, S. ŠPIČIĆ (2015): Primjena različitih molekularnih metoda u tipizaciji vrsta roda *Brucella* (II. dio). Veterinarska stanica, 46 (4), 273-279.

CVETNIĆ, Ž., S. DUVNJAK, M. ZDELAR-TUK, I. REIL, B. HABRUN, M. BENIĆ, R. BECK, G. KOMPES, M. STEPANIĆ, S. ŠPIČIĆ (2015): Primjena različitih molekularnih metoda u tipizaciji vrsta roda *Brucella* (I. dio). Veterinarska stanica, 46 (3), 187-195.

ŠPIČIĆ, S., I. RAČIĆ, M. ANDRIJANIĆ, S. DUVNJAK, M. ZDELAR-TUK, M. STEPANIĆ, Ž. CVETNIĆ (2015): Emerging cases of chlamydial abortion in sheep and goats in Croatia and Bosnia and Herzegovina. Berl. Münch. Tierärztl. 128 (5/6), 183-187.

DOI:10.2376/0005-9366-128-183

ŠPIČIĆ, S., K. LAROUCAU, M. ZDELAR-TUK, S. DUVNJAK, Ž. PAVLINEC, I. REIL, G. KOMPES, B. HABRUN, M. STEPANIĆ, D. ŽELJEŽIĆ, Ž. CVETNIĆ (2018): Maleus (sakagija) gotovo zaboravljena zoonoza. Veterinarska stanica, 49 (1), 31-36.

CVETNIĆ, L., M. BENIĆ, B. HABRUN, G. KOMPES, M. STEPANIĆ, M. SAMARDŽIJA (2016): Pojava i suzbijanje mastitisa na farmi mliječnih krava : opis slučaja. Veterinarska stanica, 47 (4), 387-394.

STEPANIĆ, M., M. BENIĆ, B. HABRUN, G. KOMPES, L. CVETNIĆ, M. PERKOVIĆ (2014): Uzročnici mastitisa niske pojavnosti. Veterinarska stanica 45 (1), 41-45.

**Sudjelovanje posterom i power point usmenom prezentacijom na radionici s međunarodnim sudjelovanjem:**

STEPANIĆ, M., S. DUVNJAK, I. REIL, S. ŠPIČIĆ, G. KOMPES, D. JURKOVIĆ, B. ZIDAR, R. BECK (2018): Prvi dokaz sekvencijskog tipa 5 *Bartonella henselae* u mačaka: najvjerojatniji izvor zaraze za djecu oboljelu od bolesti mačjeg ogreba. Program i zbornik sažetaka radionice s međunarodnim sudjelovanjem: Emergentne i zapostavljene zoonoze u kontekstu "Jednog zdravlja", Hrvatski zavod za javno zdravstvo, 18. do 19. listopada, Zagreb, str. 81-82.

**Sažeci sa skupova u zbornicima i časopisima:**

ZADRAVEC, M., V. JAKI TKALEC, D. MAJNARIĆ, M. STEPANIĆ, M. MITAK (2016): Kontaminacija zraka kvascima i plijesnima u pakirnicama mljekara. Hrvatski simpozij mljekarskih stručnjaka. Hrvatska mljekarska udruga, str. 89-90. Lovran, 9. do 12. studenog 2016.

DEŽDEK, D., T. KEROS, A. SLAVICA, L. JEMERŠIĆ, M. STEPANIĆ (2014): European brown hare syndrome (EBHS) in Croatia. 11th EWDA Conference Edinburgh, Velika Britanija, 25. do 28. kolovoza. The Royal (Dick) School of Veterinary Studies The University of Edinburgh.