

Molekularna detekcija hemotropnih mikoplazmi u mačaka

Piršić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:521395>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

Petra Piršić

Molekularna detekcija hemotropnih mikoplazmi u mačaka

Diplomski rad

Zagreb, 2023

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

Predstojnik: izv. prof. dr. sc. Vilim Starešina

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Doc. dr. sc. Matko Perharić
2. Izv. prof. dr. sc. Suzana Hađina
3. Izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš
4. Izv. prof. dr. sc. Zrinka Štritof (zamjena)

ZAHVALE

Najviše zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Josipi Habuš što mi je pomogla odabrati ovu temu te na svakom korisnom savjetu, izdvojenom vremenu i stručnom vodstvu te iznimnom strpljenju za vrijeme pisanja ovog rada.

Zahvaljujem dr. sc. Vesni Mojčec dipl. ing. mol. biol na velikoj pomoći pri radu u laboratoriju, na ljubaznom odnosu i prenesenom znanju.

Veliko hvala svim djelatnicima Klinike za zarazne bolesti te Klinike za kirurgiju, koji su me pripremali za rad u maloj praksi u sklopu volontiranja.

I na kraju, zahvaljujem svojoj obitelji na podršci i svim svojim kolegama i prijateljima što su mi uljepšali studentske dane.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA.....	2
2.1. Povijest.....	2
2.2. Etiologija.....	2
2.3. Epizootiologija.....	4
2.3.1. Prevalencija i rasprostranjenost.....	4
2.3.2. Izvori infekcije, načini širenja i ulazna vrata.....	5
2.3.3. Predisponirajući čimbenici.....	6
2.4. Patogeneza.....	6
2.5. Klinička slika.....	7
2.6. Dijagnostika.....	8
2.7. Liječenje.....	9
2.8. Preventiva.....	11
2.9. Zoonotski potencijal.....	11
3. MATERIJALI I METODE.....	12
3.1. Odabir uzoraka i obrada podataka.....	12
3.2. Izdvajanje DNK.....	12
3.2.1. Pribor i oprema.....	12
3.2.2. Postupak izdvajanja DNK iz krvi.....	13
3.3. Dokazivanje hemotropnih mikoplazmi pomoću lančane reakcije polimerazom.....	14

3.3.1. Pribor i oprema.....	14
3.3.2. Postupak izvođenja lančane reakcije polimerazom.....	15
3.3.3 Elektroforeza.....	15
4. REZULTATI.....	17
5. RASPRAVA.....	22
6. ZAKLJUČAK.....	25
7. LITERATURA.....	26
8. SAŽETAK.....	32
9. SUMMARY.....	33
10. ŽIVOTOPIS.....	34

POPIS PRILOGA

Slika 1. Krvni razmaz obojen po Romanowsky metodi

Slika 2. Prikaz varijacije broja mikroorganizama (*M. haemofelis*) u krvi mačke u periodu prije, za vrijeme i nakon liječenja doksiciklinom

Slika 3. Prikaz prevalencije infekcije hemotropnim mikoplazmama unutar pretraženog uzorka

Slika 4. Prikaz raspodjele spola unutar skupine PCR pozitivnih mačaka

Slika 5. Prikaz linijske krivulje koja prati broj mačaka pozitivnih na hemotropne mikoplazme u odnosu na dobne kategorije

Slika 6. Udio pozitivnih rezultata u skupinama mačaka razdijeljenim obzirom na njihovo porijeklo i podatke o kastraciji

Slika 7. Prikaz udjela pozitivnih životinja obzirom na njihov retrovirusni status

Slika 8. Usporedba učestalosti infekcije u mačaka uzevši u obzir vrijednosti njihovog hematokrita

Tablica 1. Rezultati obrade podataka

POPIS KRATICA

DNK - (*eng. Deoxyribonucleic acid, DNA*) – deoksiribonukleinska kiselina

FIV – (*eng. Feline immunodeficiency virus*) – virus mačje imunodeficijencije

FELV – (*eng. Feline leukemia virus*) - virus mačje leukemije

HIV – (*eng. Human immunodeficiency virus*) – virus humane imunodeficijencije

P – (*eng. Probability*) – vrijednost vjerojatnosti

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

Rcf - (*eng. Relative centrifugal force*) – relativna centrifugalna sila

1. UVOD

Hemotropne mikoplazme su bakterije iz roda *Mycoplasma* koje nemaju staničnu stijenku i ne mogu se kultivirati. Nakon infekcije, ove bakterije prihvaćaju se za eritrocite domaćina i mogu uzrokovati hemolitičku anemiju. Danas razlikujemo više vrsta hemotropnih mikoplazmi koje imaju sposobnost inficirati različite vrste domaćih životinja, a međusobno se razlikuju i po svojoj sposobnosti da uzrokuju klinički značajnu anemiju i pojavu pratećih kliničkih znakova bolesti.

Tri su vrste koje mogu inficirati mačke; *Mycoplasma haemofelis* (*M. haemofelis*), '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' ('*Ca. M. haemominutum*') i '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' ('*Ca. M. turicensis*'). Smatra se da sve tri vrste imaju široku geografsku rasprostranjenost, no njihova prevalencija znatno se razlikuje u pojedinim područjima. Kao što je već rečeno, zabilježene su i razlike u patogenosti. Najpatogenijom vrstom se smatra *M. haemofelis* koja tijekom akutne infekcije može izazvati klinički značajnu hemolitičku anemiju. S druge strane kronične infekcije ovom vrstom najčešće nisu praćene razvojem značajne anemije, pa tako niti pojavom kliničkih znakova bolesti. '*Ca. M. haemominutum*' i '*Ca. M. turicensis*' smatraju se slabije patogenim, ali razvoj bolesti je moguć u imunokompromitiranih mačaka.

Način prijenosa ovih bakterija još nije sasvim razjašnjen, no budući je zabilježeno geografsko grupiranje slučajeva kao i najviša prevalencija infekcije u muških, nekastriranih mačaka koji izlaze izvan kuće, pretpostavlja se da glavnu ulogu u prijenosu imaju vektori i kontakt sa krvlju do kojeg dolazi tijekom agresivnih interakcija između mačaka.

Budući da infekcija mačjim hemotropnim mikoplazmama može, ali i ne mora biti praćena pojavom kliničkih znakova, dijagnosticiranje infekcije može biti otežano. Otežanoj dijagnostici pridonosi i činjenica da se ovi mikroorganizmi ne mogu kultivirati te da citologija kao dijagnostička metoda nije dovoljno osjetljiva niti specifična. Zlatni je standard dijagnostika molekularnim metodama, koje su omogućile velik napredak u istraživanju hemotropnih mikoplazmi. Liječenje se preporučuje samo ukoliko je infekcija potvrđena u životinja s kliničkim znakovima odnosno kliničko-patološkim promjenama koje odgovaraju infekciji hemoplazmom.

Cilj ovog istraživanja bio je primjeniti molekularnu metodu lančane reakcije polimerazom i utvrditi učestalost infekcije hemotropnim mikoplazmama u mačaka - pacijenata Sveučilišne veterinarske bolnice.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. POVIJEST

Nomenklatura i klasifikacija mačjih hemotropnih mikoplazmi mijenjala se kroz povijest te se i u novije vrijeme odluka pripadnosti rodu *Mycoplasma* smatra kontroverznom (UILENBERG i sur., 2006.).

Prvo spominjanje bolesti i njenog uzročnika u literaturi datira iz 1942. godine, kad CLARK i sur. uzročnika bolesti svrstavaju u rod *Eperythrozoon* i daju mu ime *E. felis* (CLARK, 1942.). Svega nekoliko godina kasnije, dolazi do prve reklasifikacije; uzročnik se naziva *Haemobartonella felis*, a bolest infektivna anemija mačaka (FLINT i MOSS, 1953.). U to se doba, prije razvoja molekularnih metoda, smatralo da postoje dva tipa *H. felis*; tzv. "veliki", koji je češće bio povezan sa razvojem kliničkih znakova, i "mali", za kojeg se smatralo da je slabije patogen i rjeđe uzrokuje bolest.

Analizom 16S gena ribosomske RNA, hemotropne su mikoplazme u konačnici dodijeljene rodu *Mycoplasma* (RIKIHISA i sur., 1997.). Dva oblika koja su se ranije opisivala, zapravo su bile dvije vrste: *Mycoplasma haemofelis* i 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*'. Nedavno, otkrivena je i treća, koja je nazvana 'Candidatus *Mycoplasma turicensis*' (WILLI i sur., 2005).

U nastojanju davanja naglaska na tropizam prema eritrocitima, za sada se izdvojenost od klasičnih mikoplazmi postiže dodatkom prefiksa "*haemo-*" pri nazivu vrste, kao i korištenje izraza "*haemoplasma*" (GREENE, 2012.).

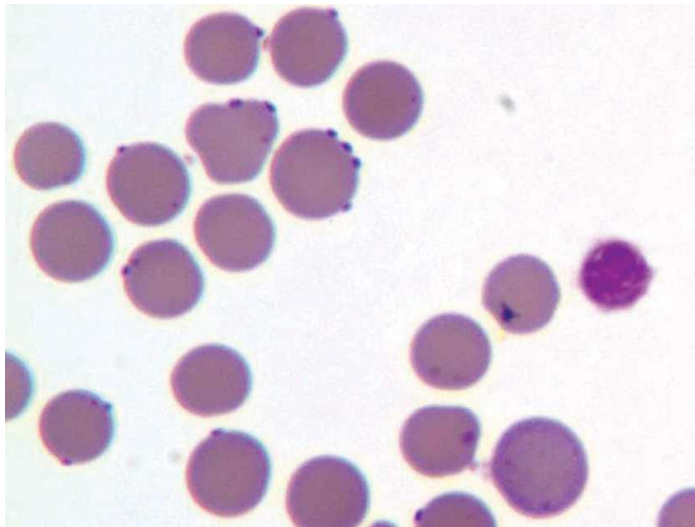
Budući da se ove bakterije, za razliku od većine ostalih mikoplazmi, ne mogu kultivirati, neki smatraju kako bi trebale pripadati novom, zasebnom rodu (HICKS i sur., 2014.).

2.2. ETIOLOGIJA

Mikoplazme su najmanji prokariotski mikroorganizmi koji se mogu samostalno razmnožavati. Trenutna sistematizacija u rod *Mycoplasma* svrstava i bakterije koji su prvotno svrstavane u rodove *Eperythrozoon* i *Haemobartonella*. Ta nova klasifikacija temelji se na nedostatku stanične stijenke navedenih bakterija, uporabi UGA kodona za sintezu triptofana i filogenijskoj analizi 16S rRNA gena. Ipak, bakterije iz tih rodova prilično se razlikuju od drugih mikoplazmi, pa je danas uvriježeno da ih nazivamo hemoplazmama ili hemotropnim mikoplazmama. Niti jednu vrstu hemotropnih mikoplazmi ne može se kultivirati čime je otežana

potpuna karakterizacija pojedinih vrsta pa se stoga, novoopisanim vrstama često pridaje dodatak "Candidatus" u nazivu (FOLEY, 2022.).

Hemotropne mikoplazme su kuglasta, štapićasta ili rijetko prstenasta oblika. Promatrane mikroskopom na krvnom razmazu obojanom polikromnim modrilom, hemotropne mikoplazme vide se kao maleni tamnoplavi koki ili štapići veličine 0,3-0,8 μ l, prihvaćeni na stijenku eritrocita (Slika 1.) (GREENE, 2012.).



Slika 1. Krvni razmaz obojen po Romanowsky metodi. Na slici jest *Mycoplasma haemofelis* vidljiva u obliku ljubičastih točkica prihvaćenih na stijenku eritrocita.

Izvor: Haemoplasmas: Lessons learnt from cats, New Zealand Veterinary Journal (BARKER i TASKER, 2013.).

Različite vrste hemotropnih mikoplazmi mogu inficirati različite vrste sisavaca, a zabilježeni su i slučajevi pojave infekcije u ljudi (SYKES, 2014.). Tri su vrste koje uzrokuju infekciju u mačaka; *Mycoplasma haemofelis*, 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' i 'Candidatus *Mycoplasma turicensis*' (BERGMANN i sur., 2017.). Smatra se da sve tri vrste imaju široku geografsku rasprostranjenost (SYKES, 2014.), no prevalencija se razlikuje ovisno o vrsti i pojedinom geografskom području.

Visoko patogenom smatra se *M. haemofelis*, dok su 'Ca. *M. haemominutum*' i 'Ca. *M. turicensis*' slabije patogene i rijetko samostalno uzrokuju bolest (TASKER, 2010.). Potvrđeno je da infekcija s dvije ili tri vrste istovremeno nije neuobičajena (BARKER i TASKER, 2013.).

Infekcija vrstom sličnom '*Candidatus Mycoplasma hematorparvorum*' utvrđena je u par slučajeva oboljenja mačaka u SAD-u, međutim nije dovoljno opisana (SYKES, 2007.).

2.3. EPIZOOTIOLOGIJA

2.3.1. Prevalencija i rasprostranjenost

Epizootiologija hemotropnih mikoplazmi ostaje nepotpuno razjašnjena, većim dijelom zahvaljujući činjenici da se ove bakterije ne mogu kultivirati pa je njihovo istraživanje bilo prilično otežano (OBARA i sur., 2011.). Međutim, razvitak molekularnih metoda detekcije i tipizacije danas pridonosi uspješnijem istraživanju te dobivanju podataka o prevalenciji (GENTILINI i sur., 2009.). Smatra se da su infekcije sa sve tri vrste mačjih hemotropnih mikoplazmi široko geografski rasprostranjene (SYKES, 2014.), no podaci o prevalenciji znatno se razlikuju u pojedinim područjima. Kao mogući razlog navode se klimatske razlike, primjerice neke studije dokazuju veću učestalost mačjih hemotropnih mikoplazmi u toplijim klimatskim područjima (ROSENQVIST i sur., 2016.). Ipak, razlike u dobivenim rezultatima ponajviše se pripisuju varijacijama u pretraživanim skupinama mačaka. Tako neke studije prezentiraju podatke dobivene pretraživanjem populacije zdravih mačaka, dok su u nekima kao ciljana skupina odabrane isključivo anemične mačke. Također, pojedine studije prikazuju rezultate pretraživanja mačaka bez obzira na njihovo zdravstveno stanje, no ovisno o tome borave li vani ili u kući (GREENE, 2012.; TASKER, 2018.). Istraživanja učestalosti infekcije mačjim hemotropnim mikoplazmama provedena u Europi pokazuju značajne varijacije u prevalenciji. Ona je, primjerice, u južnom dijelu Njemačke iznosila 9,4% (BERGMANN i sur., 2016.), u centralnoj Španjolskoj 10,6% (DIAZ-REGANON i sur., 2018.), u sjevernom dijelu Srbije 17,2% (SARVANI i sur., 2018.), u Ujedinjenom Kraljevstvu 18,3% (TASKER i sur., 2003.), u četiri turske provincije 18,9% (URAL i sur., 2009.), a u sjevernoj Italiji 33,1% (SPADA i sur., 2014.).

Od tri vrste, infekcija sa '*Ca. M. haemominutum*' uglavnom je bila najučestalija (4,4 - 46,7%), nakon koje je uslijedila infekcija sa *M. haemofelis* (0,4 - 27%) te infekcija sa '*Ca. M. turicensis*' koja je utvrđena u 0 - 26,0% pretraženih mačaka (TASKER, 2018.).

2.3.2. Izvori infekcije, načini širenja i ulazna vrata

Kao što je već spomenuto, epizootologija mačjih hemotropnih mikoplazmi nije u potpunosti razjašnjena, a način prijenosa i dalje ostaje djelomično nepoznat.

Izvorima infekcije smatraju se bolesne mačke, mačke kliconoše, krv bolesnih ili mačaka kliconoša te vjerojatno i artropodi (BARKER i TASKER, 2013.; GREENE 2012.; FOLEY, 2022.).

Zbog geografskog grupiranja te povećane prevalencije infekcija u toplijim klimatskim područjima (BERGMANN i sur., 2017.) i u pojedinim skupinama mačaka (nekastrirani mužjaci koji izlaze van kuće) već se dugo vremena pretpostavlja da su glavni načini prijenosa vezani uz vektore i prijenos krvlju do kojeg dolazi tijekom agresivne interakcije. Nažalost, usprkos velikom napretku u razvoju i istraživanju, još uvijek nemamo konkretnih, znanstvenih dokaza o načinima prijenosa ove bolesti. Različita istraživanja koja se bave ovom tematikom često daju sasvim suprotne rezultate.

Do danas je, uporabom molekularnih metoda, nedvojbeno dokazana prisutnost DNK mačjih hemotropnih mikoplazmi u različitim potencijalnim vektorima kao što su mačja buha (*Ctenocephalides felis*) (LAPPIN i sur., 2006.), komarci (*Aedes aegypti*) (REAGAN, 2017.) i krpelji (rodovi *Ixodes* i *Rhipicephalus*) (WILLI i sur., 2007). Ipak, pokušaj prijenosa eksperimentalnim infekcijama najčešće nije bio uspješan. Dodatno, DNK hemotropnih mikoplazmi u komaraca dokazana je nakon pokusne infekcije i hranjenja na inficiranim mačkama, ali nije dokazana niti u jednom uzorku koji je sadržavao „slobodnoživuće“ komarce, čak niti kad su oni bili hvatani u neposrednoj blizini mačjih kolonija (REAGAN, 2017.). Vrlo slično, DNK mačjih hemotropnih mikoplazmi dokazana je u krpeljima roda *Ixodes* i *Rhipicephalus* skinutih sa mačaka, no ne i u krpelja prikupljenih u okolišu (WILLI i sur., 2007.). Jedino su znanstvenici iz Japana, prijavili uspješan dokaz odsječka DNK '*Ca. M. haemominutum*' iz dvije vrste (*Ixodida*) krpelja koji su bili nenahranjeni i prikupljeni u okolišu.

Istraživan je i direktni način prijenosa, pa je tako DNK hemotropnih mikoplazmi osim u krvi, dokazan i u slini inficiranih životinja. Ipak, tijekom pokusnih studija, do uspješnog prijenosa došlo je samo nakon potkožne inokulacije krvi koja je sadržavala hemotropne mikoplazme, ali ne i nakon potkožne ili oronazalne inokulacije zaražene sline ili oralne inokulacije inficirane krvi (MUSEUX i sur., 2009.). Stoga, agresivno ponašanje i posljedičan direktan kontakt s krvi inficiranom mačjim hemotropnim mikoplazmama predstavlja najvjerojatniju mogućnost zaraze, a ostaje nejasno igra li slina ikakvu ulogu u širenju bolesti.

Jatrogen prijenos je bitan način širenja. Pri tome osobit problem predstavljaju mačke kliconoše (BARKER i TASKER, 2013.). Naime, hemotropne mikoplazme se s jedne životinje na drugu mogu prenijeti transfuzijom krvi te bi stoga u svih mačaka donora krvi trebalo napraviti pretragu na hemotropne mikoplazme (PENNISI i sur., 2015.).

Vertikalni prijenos ovih bakterija nije potvrđen (BARKER i TASKER, 2013.).

2.3.3. Predisponirajući čimbenici

Infekcija se najčešće javlja u nekastriranih muških mačaka koje borave vani, mačaka lualica te u životinja s anamnezom apscesa i ugriza (TASKER, 2003.; YASMIN i sur., 2022.). Pojedina istraživanja navode kako su mačke inficirane retrovirusima (osobito virusom mačje imunodeficijencije) podložnije infekciji mačjim hemotropnim mikoplazmama (BERGMANN i sur., 2017.), međutim neka istraživanja ne dijele iste rezultate (GENTILINI i sur., 2009.). Postavlja se i pitanje je li povezujući čimbenik zapravo način ponašanja (agresivni, teritorijalni mužjaci), a ne povećan rizik od infekcije zbog retrovirusnog statusa.

2.4. PATOGENEZA

Mačje hemotropne mikoplazme prihvaćaju se na stijenku eritrocita i mogu uzrokovati hemolitičku anemiju (TASKER, 2018.). Smatra se da je *M. haemofelis* najpatogenija od tri vrste i da ona može uzrokovati najtežu kliničku sliku odnosno čak i potencijalno i životno ugrožavajuću hemolitičku anemiju. Ovakvi teški klinički oblici mogući su i kod imunokompetentnih životinja bez dokazanih komorbiditeta. Kod drugih jedinki klinička slika pak može biti blaga ili pak dolazi do asimptomatske infekcije. S druge strane, infekcije '*Ca. M. haemominutum*' i '*Ca. M. turicensis*' mogu dovesti do pada broja eritrocita, hemoglobina i hematokrita, no klinička očitovanja bolesti javljaju se uglavnom u imunokompromitiranih jedinki (BARKER i TASKER, 2013.).

Nakon ulaska *M. haemofelis* u cirkulaciju i njenog prihvaćanja za eritrocite dolazi do njihove destrukcije, a organizam odgovara snažnom retikulocitozom. Pretpostavlja se da je hemoliza uzrokovana hemotropnim mikoplazmama u mačaka posljedica djelovanja samog mikroorganizma. Pojava auto-aglutinacijskih protutijela i pozitivan Coombs-ov test bilježi se tek nakon pojave hemolize i smatraju se posljedicom, a ne uzrokom primarne hemolize (BARKER i

TASKER, 2013.). U ekperimentalnim studijama dokazano je da se broj *M. haemofelis* eksponencijalno povećava prvih 2-4 tjedna nakon infekcije. Nakon toga broj mikoplazmi u krvi značajno fluktuiraju. Uzroci takve fluktuacije nisu sasvim jasni. Sekvestracija u slezeni ili jetri tijekom faza u kojima je broj bakterija u krvi nizak nije dokazana kod infekcije *M. haemofelis*, ali jest kod infekcije s '*Ca. M. turicensis*' (NOVACCO i sur. 2013.).

Mačka se od akutne infekcije može oporaviti, međutim velik broj mačaka ostaje perzistentno inficiran te je moguća regresija bolesti uslijed stresa, graviditeta, promjene okoline ili drugih oboljenja (BARKER i TASKER, 2013.). U latentno inficiranih mačaka, umnažanje mikroorganizama te njihovo uklanjanje fagocitozom jest u ravnoteži. Takve se životinje doimaju klinički zdravima uz moguću pojavu blaže regenerativne anemije koja se može utvrditi hematloškom pretragom (GREENE, 2018.).

Splenektomija kao čimbenik utjecaja na tok infekcije hemoplazmoze za sada ostaje nepotpuno razjašnjena. Neka istraživanja zabilježila su da ona ne utječe na kliničku sliku u zaraženih mačaka, dok neka govore o postoperativnoj povratnoj bakterijemiji te posljedičnoj anemiji (SYKES, 2014.).

2.5. KLINIČKA SLIKA

Duljina inkubacije može varirati od 2 do 34 dana, nakon čega slijedi akutna faza s nastupom anemije u trajanju 18-30 dana (SYKES, 2014.).

Klinička slika ovisi o vrsti mikoplazme, stadiju infekcije, imunosnom statusu domaćina te prisustvu konkurentnih infekcija, kao što su retrovirusne bolesti (BARKER I TASKER, 2013.). Koinfekcija s više vrsta mikoplazmi može uzrokovati težu kliničku sliku (FOLEY, 2022.).

Klinički znakovi uključuju bljedilo sluznica, letargiju, dehidraciju, dispneju, tahipneju, hepatosplenomegaliju, limfadenopatiju, depresiju, inapetencu te intermitentnu vrućicu, koja može biti jedini klinički znak. Ikterus je rijedak, osim ako nije došlo do jake hemolize (BARKER I TASKER, 2013.).

Infekcija je uglavnom praćena razvojem makrocitne, hipokromne anemije uz napomenu da izražena retikulocitoza nije uvijek prisutna. Moguće su i promjene u bijeloj krvnoj slici u vidu leukopenije, limfopenije, eozinopenije i monocitoze. Kao što je već rečeno, bilirubinemija (osobito

izražena) nije učestala. Možemo naći i povišene vrijednosti alanin aminotransferaze zbog hipoksičnog oštećenja jetre (TASKER, 2018.).

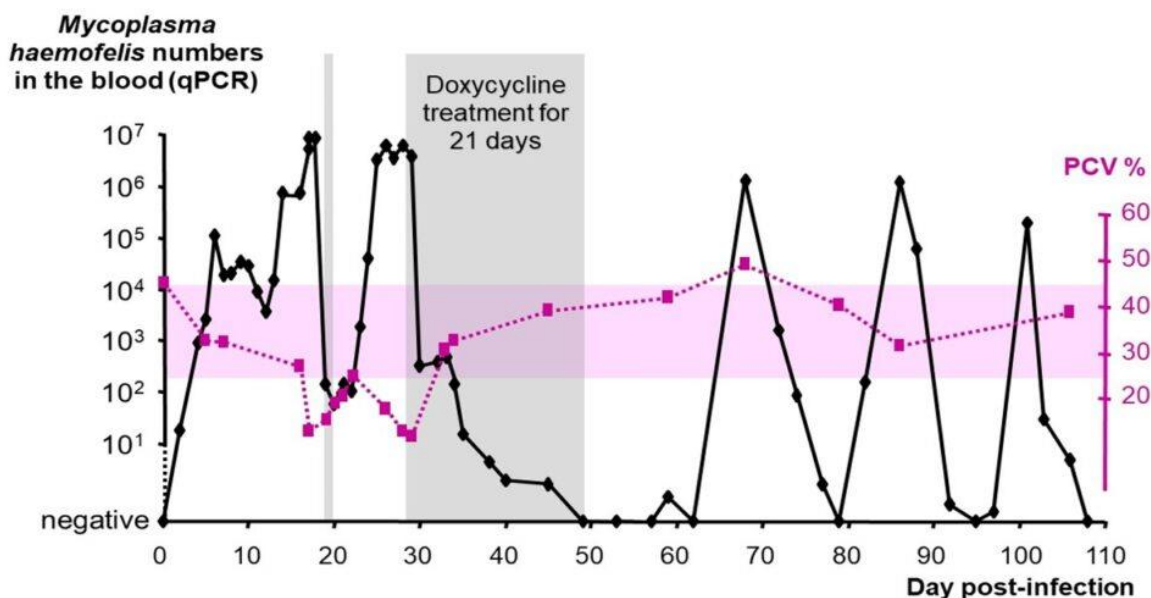
U jednom istraživanju utvrđeno je da su mačke inficirane sa *Ca. M. haemominutum* u krvnoj slici imale više vrijednosti ureje, kreatinina, proteina i lipaze u odnosu na mačke koje nisu bile inficirane, te im je češće bila dijagnosticirana bubrežna insuficijencija. Ipak, autori nisu uspjeli utvrditi je li utvrđena bubrežna insuficijencija bila uzrokovana hemotropnim mikoplazmama, ili je povezana sa nekim drugim čimbenikom, primjerice starijom dobi pretraživanih mačaka (WILLI i sur., 2006.).

2.6. DIJAGNOSTIKA

Dijagnostika hemotropnih mikoplazmi otežana je zbog nemogućnosti kultivacije ovih mikroorganizama. Mogu se dokazati citološkom pretragom krvnog razmaza obojenog bojama tipa Romanowsky (Giemsa Wright ili *Diff-Quick*) gdje su vidljive kao okrugla tjelešca na površini eritrocita. Ova metoda ima nisku osjetljivost (0-37,5%) te nešto višu specifičnost (84 to 98%) (BARKER i TASKER, 2013.). Mogući su lažno pozitivni rezultati budući da se hemotropne mikoplazme mogu zamijeniti za, primjerice, Howell-Jollyjeva tjelešca, precipitate boje, protozoe iz roda *Cytauxzoon* ili artefakte. Nadalje, ovom metodom ne može se izdiferencirati točna vrsta bakterije. Negativan nalaz pak, ne znači da bolest nije prisutna: broj hemotropnih mikoplazmi u krvi izraženo fluktuiraju, u slučajevima kad je broj mikroorganizama izuzetno nizak vrlo će ih se teško vizualizirati (FOLEY, 2022.), a *Ca. M. turicensis* ne može se izdiferencirati svjetlosnom mikroskopijom (BARKER i TASKER, 2013.), već jedino elektronskom (WILLI i sur. 2011.). Duljim skladištenjem u epruvetama s EDTA, ovi mikroorganizmi mogu se odvojiti od eritrocita (GREENE, 2012.), pa je preporučljivo krvne razmaze za pretragu raditi čim je prije moguće.

U dijagnostici hemotropnih mikoplazmi zlatni standard predstavlja molekularna metoda lančane reakcije polimerazom (eng. *Polymerase chain reaction, PCR*). PCR metoda visoko je osjetljiva i specifična te omogućuje detekciju dok je u krvi prisutan malen broj bakterija. Današnji PCR testovi korišteni u dijagnostici baziraju se na umnažanju dijela 16S rRNA gena zajedničkog svim mačjim hemotropnim mikoplazmama. Temeljem razlike u veličini PCR produkta ili analizom sekvenci moguće je odrediti o kojoj se vrsti hemoplazme radi (BARKER i TASKER, 2013.). U rutinskoj dijagnostici koriste se konvencionalni PCR, te tzv. „PCR u stvarnom vremenu“ (Real-

time PCR) koji je nešto osjetljiviji i omogućuje kvantifikaciju mikroorganizama u određenom volumenu uzorka. Ovi testovi omogućuju praćenje razine bakterijemije *in vivo* i odgovora na terapiju (Slika 2.).



Slika 2. Korištenjem metode lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu dobiven je prikaz varijacije broja mikroorganizama (*M. haemofelis*) u krvi mačke u periodu prije, za vrijeme i nakon liječenja doksiciklinom.

Izvor: Haemoplasmosis in cats, Journal of Felne Medicine and Surgery, 20 (TASKER, 2018.).

Serologija kao metoda dijagnostike rutinski se ne koristi, ponajviše jer nemogućnost *in vitro* kultivacije hemotropnih mikoplazmi onemogućava istraživanje i produkciju dovoljne količine antigena koji bi se koristio u komercijalni testovima (TASKER, 2018.). Određene eksperimentalne studije pokazuju da bi se serološke metode bazirane na dnaK antigenu mogle rabiti u distinkciji akutnih od kroničnih infekcija (WOLF-JACKEL, 2010.).

2.7. LIJEČENJE

Ne preporučuje se liječenje mačaka koje ne pokazuju kliničke znakove bolesti. Antimikrobna terapija smanjuje broj hemotropnih mikoplazmi u krvi te dovodi do poboljšanja

kliničke slike, međutim nijedan terapijski protokol ne dovodi pouzdano do potpune eliminacije ovih bakterija iz organizma (BARKER i TASKER, 2013.; GREENE, 2012.).

Prvi izbor u odabiru antimikrobne terapije su tetraciklini, prvenstveno doksiciklin. Preporučene peroralne doze doksiciklina su 10 mg/kg dnevno ili 5 mg/kg svakih 12 sati u trajanju od minimalno dva tjedna (2-4 tjedna), dok neki autori preporučuju liječenje i u trajanju od 6 tjedana (TASKER, 2018.). S obzirom na moguću pojavu ezofagitisa u mačaka, ovaj lijek uvijek je preporučeno davati uz hranu (BARKER i TASKER, 2013.; TASKER, 2018.). Od fluorokinolona mogu se koristiti pradofloksacin i marbofloksacin. Enrofloksacin ne preporuča se davati zbog toksičnog djelovanja na retinu (BARKER i TASKER, 2018.). Pradofloksacin se koristi per oralno u dozi od 5 mg/kg ili 10mg/kg dnevno. U istraživanju iz 2009. godine pokazao se djelotvornijim izborom antibiotika u uklanjanju *M. haemofelis* iz organizma u odnosu na doksiciklin (DOWERS i sur., 2009.). Marbofloksacin u dozi 2-4 mg/kg dnevno per oralno također se može koristiti, međutim upitna je njegova djelotvornost protiv '*Ca. M. haemominutum*' (TASKER, 2018.).

Obje skupine antibiotika smatraju se učinkovitima u smanjenju broja mikroorganizama u krvi, u poboljšanju kliničke slike te ispravljanju promijenjenih parametara u krvnoj slici. (BARKER i TASKER, 2013.).

U pojedinim slučajevima, kada je cilj povećati mogućnost potpune eliminacije mikroorganizma, antimikrobni pripravci mogu se kombinirati; primjerice kod prisutne teške kliničke slike, pri pojavi rekurentnih infekcija te kod uvođenja zaražene mačke u novu neinficiranu skupinu mačaka (TASKER, 2018.). U studiji provedenoj 2018. godine, kao protokol liječenja u mačaka s prisutnom bakterijemijom nakon terapije doksiciklinom, predložen je nastavak terapije uporabom marbofloksacina (2 mg/kg dnevno) u trajanju od 2 tjedna (NOVACCO i sur., 2018.). Taj se protokol pokazao djelotvornim u liječenju infekcije uzrokovane sa *M. haemofelis*.

Kao potporna terapija za ispravak dehidracije indicirana je primjena intravenoznih infuzijskih otopina te transfuzija krvi u slučajevima jake anemije.

Nema provedenih studija o učinku kortikosteroida na ishod infekcije mačjim hemotropnim mikoplazmama. Mačke kod kojih je Coombsov test bio pozitivan najčešće dobro odgovaraju na antimikrobnu i potpornu terapiju. Stoga, primjena kortikosteroida u liječenju infekcija izazvanih hemotropnim mikoplazmama često nije potrebna (BARKER i TASKER, 2013.). Ipak u slučajevima pojave jake, akutne hemolitičke anemije njihova je upotreba uobičajena.

2.8. PREVENTIVA

Budući da je način prijenosa bolesti i dalje nepoznat, nijedna preventivna mjera protiv infekcije hemotropnim mikoplazmama nije dokazana kao pouzdana. Uzevši u obzir da je infekcija s ovom bolesti učestalija u muških nekastriranih mačaka koje imaju pristup boravku vani, kastracija kao mjera prevencije svakako može smanjiti mogućnost širenja bolesti. Također je preporučljivo ograničiti kontakt s vanjskim mačkama te spriječiti kontakt s moguće zaraženim životinjama. Budući da je transmisivan prijenos vrlo vjerojatan, preporučena je redovita uporaba ektoparazitika. Obzirom da se radi o često subkliničkoj infekciji koja se prenosi krvlju smatra se da je pretraživanje krvi mačaka donora izuzetno bitno (PENNISI i sur., 2015.).

Imunoprofilaksa ove bolesti ne postoji (FOLEY, 2022.; TASKER, 2018.).

2.9. ZOONOTSKI POTENCIJAL

Infekcija hemotropnim mikoplazmama ne predstavlja značajan rizik u ljudi. Međutim, smatra se da zoonotski potencijal postoji; potvrđen je slučaj oboljenja u HIV pozitivnog muškarca iz Brazila (SANTOS i sur., 2008.) u kojeg je PCR metodom dokazana infekcija mikoplazmom nalik na *M. haemofelis* i s *Bartonella henselae*, koje su također dokazane u krvi njegovih mačaka.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Odabir uzoraka i obrada podataka

U ovom istraživanju korišteni su ostatni, arhivirani uzorci pune krvi mačaka- koje su liječene na klinikama Sveučilišne veterinarske bolnice u Zagrebu tijekom proljeća i ljeta 2021. godine. Iz arhive su nasumično odabrani uzorci onih mačaka za koje su postojali podatci o tome da barem povremeno borave vani. Ukupno je odabrano i molekularnom metodom lančane reakcije polimerazom pretraženo 105 uzoraka pune krvi. Osim podataka o prevalenciji hemotropnih mikoplazmi, zanimali su nas i potencijalni rizični čimbenici koji bi mogli utjecati na infekciju. Osnovni podatci o dobi, spolu, kastraciji, porijeklu (vlasničke ili mačke iz skloništa), hematokritu te retrovirusnom statusu dobiveni su pretraživanjem ambulantnog protokola.

Gore navedene podatke zatim smo uvrstili u tablicu Excell programa i statistički obradili kako bismo uvrđili utječu li oni na rizik od infekcije mačjim hemotropnim mikoplazmama. Razina značajnosti između ispitivanih varijabli ispitivana je pomoću *hi-kvadrat* i *Fischerov-im* testom, pri čemu je uzimana razina značajnosti $p < 0,05$.

3.2. Izdvajanje DNK

Postupak izdvajanja DNK iz uzoraka pune krvi prethodi metodi lančane reakcije polimerazom. Provođen je uporabom komercijalnog kompleta za izdvajanje nukleinskih kiselina, NucleoSpin® Tissue, Macherey Nagel, Njemačka, korištenog prema uputi proizvođača. Osnova djelovanja kompleta temelji se na oslobađanju DNK iz materijala te njenom vezanju na silikagelnu membranu pri čemu DNK biva izdvojena i pročišćena.

3.2.1. Pribor i oprema:

U sklopu NucleoSpin® Tissue kompleta:

- proteinaza K
- pufer za lizu B3
- pufer za ispiranje B5
- pufer za ispiranje BW

- pufer za otpuštanje s membrane BE
- epruvete sa silikagelnom membranom
- epruvete sakupljačice

Kemikalije koje su potrebne pri izdvajanju DNK iz materijala, a nisu sadržane u komercijalnom kompletu Nucleo Spin Tissue:

- Etilni alkohol (96%-tni)

Pribor i oprema:

- mikropipete Eppendorf s odgovarajućim nastavcima
- 1,5 mL Eppendorf epruvete
- centrifuga Eppendorf Mini Spin
- stolna tresilica, vortex mikser
- termomikser Eppendorf F1.5

Materijal:

- puna krv- 200 μ l

3.2.2. Postupak izdvajanja DNK iz krvi

U prethodno označenu Eppendorf epruvetu zapremnine 1,5 ml, pipetira se 200 μ l pune krvi kojoj sam dodala 25 μ l proteinaze K s ciljem oslobađanja nukleinske kiseline, razaranja proteina i inaktiviranja nukleaza.. Dodatnim dodavanjem 200 μ l B3 puferne otopine omogućena je stanična liza. Nakon miješanja u vorteksu te inkubacije na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta, uzorci su stavljeni u termomikser na temperaturu od 70°, u trajanju 20 minuta. Inkubacija na ovoj temperaturi pomaže denaturaciju proteina.

Uzorci su potom kratko centrifugirani te im je dodano 210 μ l 96%-tne otopine etanola, čime se postiže vezanje DNK na membranu. Zatim smo otpipetirali uzorak u epruvetu s membranom, koja se nalazi unutar epruvete sakupljačice. Nakon centrifugiranja na 11000 rcf u trajanju od 1 minute, sakupljačicu smo uklonili i zamijenili. Na taj je način DNK zadržana na membrani, a ostatne tvari su maknute. Uzorak je u idućem koraku ispran pomoću 500 μ l BW pufera te ponovno centrifugiran. Sadržaj sakupljačice je bačen, a uzorak ispran sa 600 μ l pufera B5. Korak centrifugiranja i odbacivanja filtrata je ponovljen, nakon čega se epruveta s membranom stavlja u novu, označenu

epruvetu u koju se dodaje 100 µl pufera BE. Nakon jednog minute inkubacije na sobnoj temperaturi te posljednjeg centrifugiranja 11000 rcf/1 minuta DNK je bila izdvojena i pročišćena.

3.3. Dokazivanje hemotropnih mikoplazmi pomoću lančane reakcije polimerazom

Metoda lančane reakcije polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) molekularna je metoda visoke osjetljivosti i specifičnosti koja omogućuje dokaz fragmenata nukleinskih kiselina specifičnih za određeni mikroorganizam. Zasniva se na umnažanju specifičnog slijeda nukleotida. Provedena je u svrhu dokaza DNK mačjih hemotropnih mikoplazmi u uzorku prethodno izdvojene DNK iz pune krvi. Za izvedbu ove metode korišten je komercijalni komplet EmeraldAmp® MAX HS PCR Master Mix.

3.3.1. Pribor i oprema:

U sklopu EmeraldAmp® MAX HS PCR Master Mix kompleta:

- PCR reakcijska smjesa EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix, 2x
- par početnica, uzvodna: HF (16S rRNA) ACGAAAGTCTGATGGAGCAATA
i nizvodna HR (16S rRNA) ACGCCCAATAAATCCGRATAAT
- Dnaze/ Rnaze
- slobodna ultračista voda

Pribor:

- sterilne Eppendorf epruvete zapremnine 1,5 i 0,2 ml
- mikropipete s odgovarajućim nastavcima s filtrima
- Erlenmayer tikvica
- agaroza, SIGMA
- TAE, 1x pufer
- Diamond Nucleic Acid Dye boja, Promega
- 100 bp marker, Lonza

Uređaji:

- Biozaštitna mikrobiološka komora
- BIO RAD T100 Thermal Cycler uređaj za izvođenje PCR reakcije
- BIORAD UV uređaj za očitavanje gelova s pripadajućom kamerom i uređajem za ispis fotografije

gela

- kadica za elektroforezu i izvor električne struje, Consort EV232

Materijal:

- prethodno izdvojena DNK
- pozitivna i negativna kontrola

3.3.2. Postupak izvođenja lančane reakcije polimerazom

Prije same izvedbe, izračunata je ukupna potrebna količina PCR reakcijske smjese, koja je ovisila o broju korištenih uzoraka u jednoj PCR reakciji. Zatim se u svaku epruvetu dodalo 6 µl EmeraldAmp® smjese, 0,25 µl početnice F (eng. *forward*), 0,25 µl početnice R (eng. *reversed*) te 5 µl destilirane vode. Pipetiranje se provodilo u mikrobiološkoj biozaštitnoj komori koja omogućava sterilan rad.

U sastav EmeraldAmp® smjese ulaze enzim Taq polimeraza (*Thermus aquaticus*), pufer te smjesa deoksiribonukleotida.

Korištene su početnice Hf (16S rRNA) ACGAAAGTCTGATGGAGCAATA i HFr (16S rRNA) ACGCCCAATAAATCCGRATAAT opisane u radu Jensena i suradnika iz 2001. godine.

U svaku je epruvetu potom dodano po 1 µl DNK odgovarajućeg uzorka. Kao negativnu koristila sam opisanu mješavinu kojoj je umjesto DNK dodana destilirana voda, dok su za pozitivnu kontrolu korišteni pozitivni i sekvenciranjem provjereni DNK uzorci. Pripremljene epruvete potom su stavljene u BIO RAD T100 Thermal Cycler uređaj za izvođenje PCR reakcije kojem se zadaje odgovarajući temperaturni protokol: 1 minuta na 94°C (inicijalna denaturacija) te zatim 45 ciklusa u kojima se izmjenjuje 1 minuta na 94°C (denaturacija), 1 minuta na 65°C (hibridizacija) i 30 s na 72°C (elongacija), te završna elongacija na 72°C kroz 10 minuta.. Za 2h i 30 minuta, reakcija je završena.

3.3.3 Elektroforeza

U idućem koraku učinjena je elektroforeza kojom se u agaroznom gelu vizualiziraju PCR proizvodi u svakom pojedinom PCR uzorku.

Za izvođenje metode potrebno je napraviti agarozni gel. U Erlenmeyer tikvicu dodaje se 0,5 g agaroze te 50 mL 1x TAE puferske otopine.

Za pripremu 1x TAE puferske otopine kao reagensi se koriste 93,5 g EDTA, 242 g Tris i 57 mL octene kiseline. Najprije se pripremi 0,5 molarna otopina EDTA na način da se 93,5 g EDTA stavi u 400 ml redestilirane vode, pri čemu se uz dodavanje kristala NaOH, pH namješta na 8,0. Otopini se dodaje redestilirana voda do 500 ml. U sljedećem koraku pripreme TAE puferske otopine, 242 g Tris otopi se u 750 ml redestilirane vode čemu se dodaje 57 ml octene kiseline i 100 ml 0,5 M EDTA. Zatim se redestilirana voda dodaje do ukupnog volumena od 1000 ml. Dobivena otopina je 50x koncentriran TAE pufer. Kako bismo dobili 1x koncentrirani TAE pufer, u 490 ml destilirane vode dodajemo 10 ml prethodno napravljenog 50x TAE pufera.

Nakon zagrijavanja 0,5 g agaroze te 50 mL 1x TAE puferske otopine u trajanju od 2-3 minute te hlađenja, dodaje se 3 μ l Diamond Nucleic Acid Dye boje, Promega. Ovako pripremljena otopina prenosi se u kalup za elektroforezu u kojem će se nakon sat vremena oblikovati u gel.

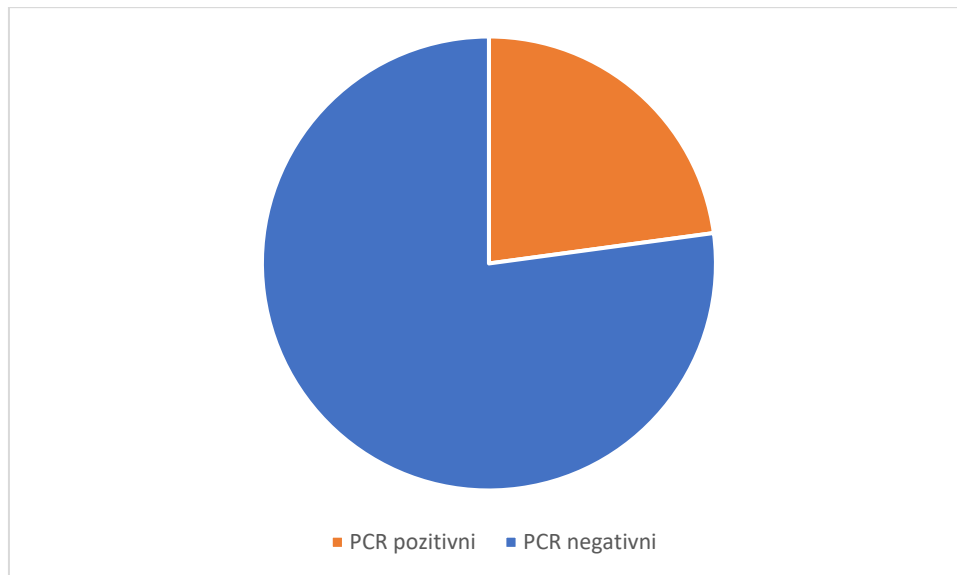
U jažice gela pipetirano je po 4 μ l PCR proizvoda. Kao DNA biljeg korišten je 100bp DNA Loading Buffer, Lonza. Kako bi se isječci DNK u gelu kretali, kalup s agaroznim gelom je uronjen u 1x TAE pufersku otopinu te su prispojene elektrode i pokrenuta je elektroforeza. Za to je korišten izvor el. struje Consort EV232. Namješten je napon od 100 V, struja od 80 mA u trajanju od sat vremena.

Gel je stavljen u BIORAD uređaj za očitavanje pod UV svjetlom, a dobivena slika je prenesena na računalo.

Pozitivan rezultat vidimo kao signal u gelu na mjestu jažice u koju je stavljen određeni PCR produkt.

4. REZULTATI

Od ukupno 105 pretraženih uzoraka krvi, u njih 24 (22,86%) utvrđena je prisutnost specifičnog odsječka DNK hemotropnih mikoplazmi (Slika 3.).



Slika 3. Prikaz prevalencije infekcije hemotropnim mikoplazmama unutar pretraženog uzorka

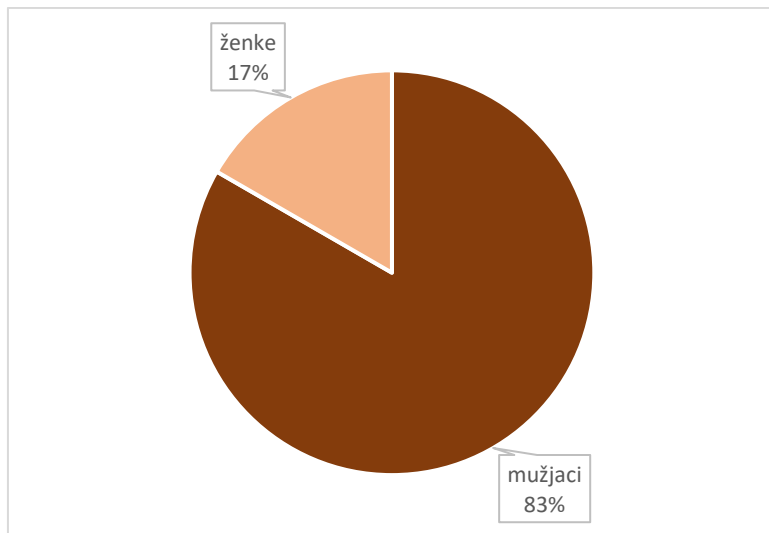
Tablica 1. sumarno prikazuje razlike u prevalenciji infekcije uzevši u obzir dob, spol, podatke o kastraciji, porijeklu (vlasničke ili mačke iz skloništa), hematokritu i retrovirusnom statusu.

Tablica 1. Rezultati obrade podataka

Varijabla	Ukupno pretraženih	Broj pozitivnih mačaka	Broj negativnih mačaka	p
SPOL	103			0,00537*
M	54 (52,43%)	20 (37,04%)	34 (62,96%)	
Z	49 (47,57%)	4 (8,16%)	45 (91,84%)	
DOB	99			0,037834*
Do 3 godine	45 (45,45%)	6 (13,33%)	39 (86,67%)	
4 i više godina	54 (54,55%)	18 (33,33%)	36 (66,67%)	
KASTRACIJA	64			0,397586
DA	57 (89,06%)	9 (15,79%)	48 (84,21%)	
NE	7 (10,94%)	2 (28,57%)	5 (71,43%)	
PORijekLO	98			0,086143
Vlasničke životinje	87 (88,78%)	19 (21,83%)	68 (78,16%)	
Životinje iz skloništa	11 (11,22%)	5 (45,45%)	6 (54,54%)	
FIV STATUS	60			0,000318*
FIV +	10 (16,67%)	7 (70,00%)	3 (30,00%)	
FIV -	50 (83,33%)	8 (16,00%)	42 (84,00%)	
FeLV STATUS	60			0,689157
FeLV +	10 (16,67%)	3 (30,00%)	7 (70,00%)	
FeLV -	50 (83,33%)	12 (24,00%)	38 (76,00%)	
HEMATOKRIT	99			0,005624*
Ispod 30%	16 (16,16%)	8 (50,00%)	8 (50,00%)	
30% i iznad	83 (83,83%)	15 (18,07%)	68 (81,93%)	

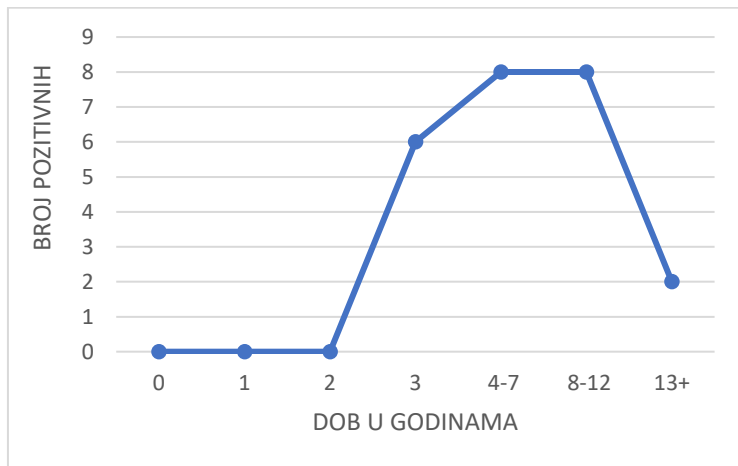
* upućuje na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$)

U našem istraživanju utvrdili smo statistički značajnu razliku u učestalosti infekcije u odnosu na spol; infekcija hemotropnim mikoplazmama bila je češća u mačaka muškog spola. Od ukupno 24 mačke kod kojih je PCR metodom utvrđena prisutnost hemotropnih mikoplazmi, čak 20 bilo je muškog spola (Slika 4.).



Slika 4. Prikaz raspodjele spola unutar skupine PCR pozitivnih mačaka

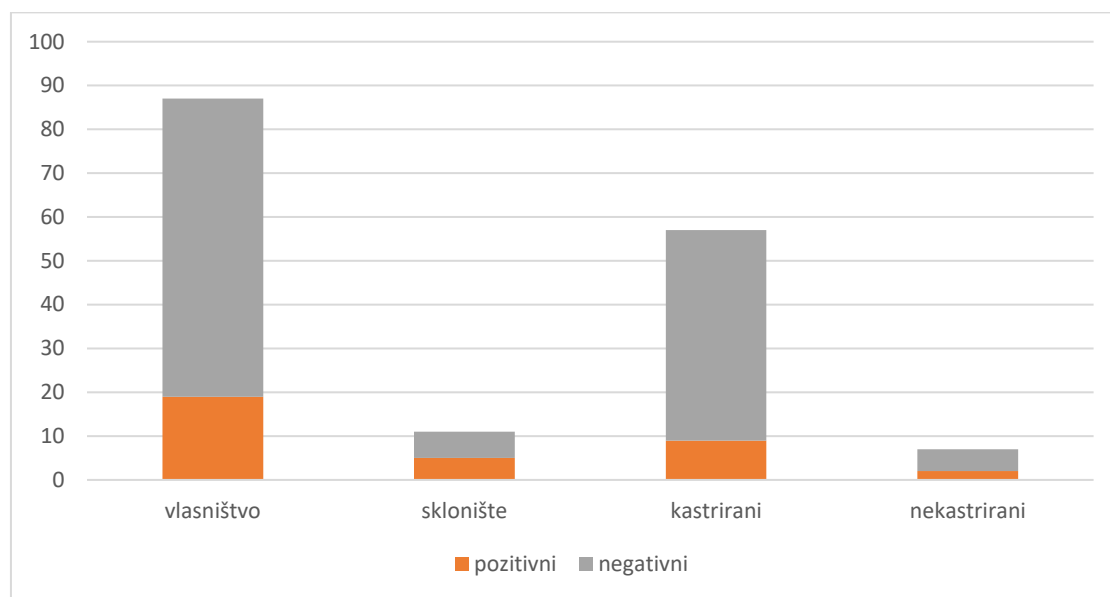
Također smo utvrdili statistički značajnu razliku u učestalosti infekcije ovisno o dobnoj kategoriji mačaka. Starije mačke bile su sklonije infekciji. Za ukupno 99 mačaka imali smo podatke o dobi. Sveukupno 30 mačaka bilo je mlađe od 3 godine starosti te nijedna od njih nije bila pozitivna na hemotropne mikoplazme. Na slici 5. možemo vidjeti kako prevalencija infekcijom hemotropnim mikoplazmama raste sa starosti.



Slika 5. Prikaz linijske krivulje koja prati broj mačaka pozitivnih na hemotropne mikoplazme u odnosu na dobne kategorije

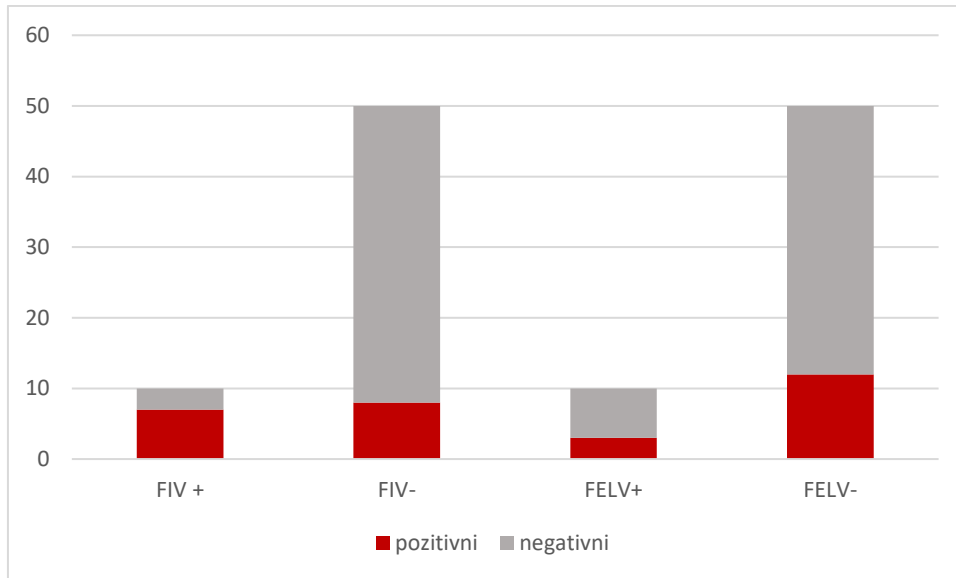
U ovom istraživanju nismo utvrdili statistički značajnu razliku u učestalosti infekcije obzirom na porijeklo i kastraciju.

Međutim, ako promatramo samo skupinu mačaka iz skloništa, među njima je, od 11, čak 5 mačaka bilo pozitivno, što iznosi 45,45% (Slika 6).



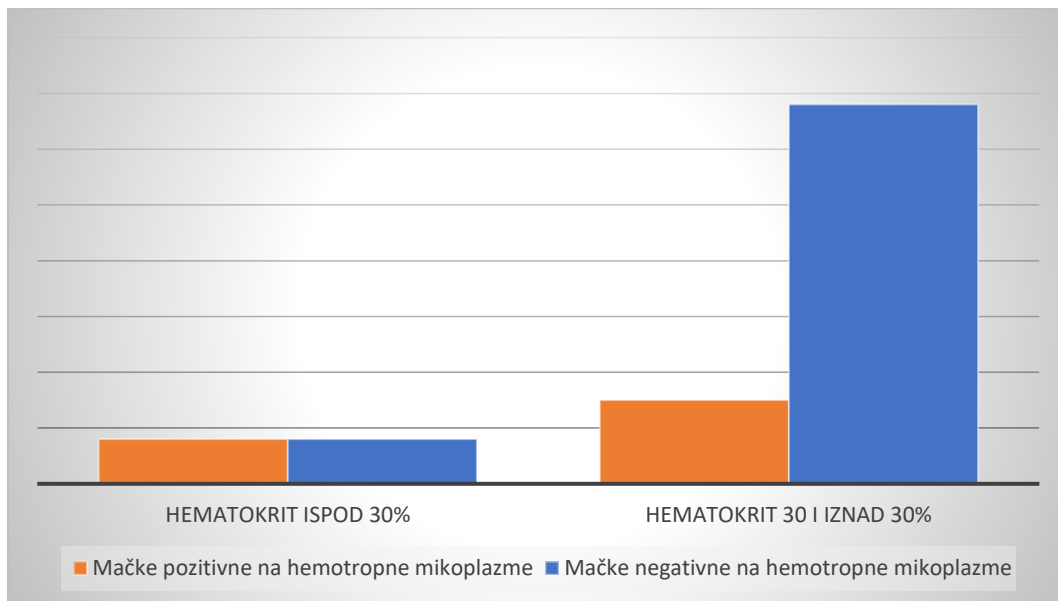
Slika 6. Udio pozitivnih rezultata u skupinama mačaka razdijeljenim obzirom na njihovo porijeklo i podatke o kastraciji

Za ukupno 60 mačaka imali smo dostupne podatke o testiranju na mačje retrovirusne bolesti (FIV i FeLV). Utvrdili smo da je infekcija hemotropnim mikoplazmama bila češća u mačaka inficiranih mačjim virusom imunodeficijencije (FIV pozitivne mačke; $p < 0,05$) (Slika 7.). Istodobna FIV i FeLV infekcija utvrđena je u 3 mačke. Sve tri mačke bile su nekastrirani mužjaci i kod sve tri rezultat PCR pretrage na hemotropne mikoplazme bio je pozitivan.



Slika 7. Prikaz udjela pozitivnih životinja obzirom na njihov retrovirusni status

Prilikom usporedbe udjela pozitivnih mačaka uzevši u obzir vrijednosti njihovog hematokrita, ustanovili smo da je infekcija hemotropnim mikoplazmama češća u anemičnim mačkama (Slika 8.).



Slika 8. Usporedba učestalosti infekcije u mačaka uzevši u obzir vrijednosti njihovog hematokrita

5. RASPRAVA

U našem istraživanju prevalencije hemotropnih mikoplazmi kod mačaka, ona je iznosila 22,86%.

Kako u Hrvatskoj do sada nema podataka o prevalenciji infekcije mačjim hemotropnim mikoplazmama, ovaj podatak možemo usporediti samo sa istraživanjima provedenim u okolnim zemljama Europe. Ako uzmemo u obzir da je prevalencija u južnom dijelu Njemačke iznosila 9,4% (BERGMANN i sur., 2016.), u centralnoj Španjolskoj 10,6% (DIAZ-REGANON i sur., 2018.), u Danskoj 16,4% (ROSENQVIST i sur., 2016.), u sjevernom dijelu Srbije 17,2% (SARVANI i sur., 2018.), u Ujedinjenom Kraljevstvu 18,3% (TASKER i sur., 2003.), u četiri turske provincije 18,9% (URAL i sur., 2009.), u Grčkoj 20,6% (MAHER i sur., 2010.), u sjevernoj Italiji 33,1% (SPADA i sur., 2014.), a u Portugalu 46,43% (MARTINEZ-DIAZ i sur., 2013.), možemo zaključiti da se radi o relativno visokoj prevalenciji. Kako je već ranije navedeno, unatoč širokoj geografskoj rasprostranjenosti tri vrste hemotropnih mikoplazmi, podaci o prevalenciji značajno variraju. Dosadašnja istraživanja prevalencije u Europi pokazuju da je prevalencija infekcije hemotropnim mikoplazmama uglavnom viša u južnijem i mediteranskom području, nego u zemljama centralne i sjeverne Europe (ROSENQVIST i sur., 2016.), u što se uklapaju i podatci dobiveni u našem istraživanju.

Kod tumačenja i usporedbe rezultata treba imati na umu da se u različitim istraživanjima dosta razlikuju i pretraživane skupine mačaka (GREENE, 2012.; TASKER, 2018.). U ovom istraživanju tako su ciljane skupina bile mačke koje redovito ili povremeno izlaze van kuće/stana, dok primjerice u istraživanju prevalencije hemotropnih mikoplazmi u centralnoj Španjolskoj, to nije bio slučaj, već je 75% mačaka uključenih u istraživanje boravilo isključivo unutra. Pretpostavka da će mačke koje češće idu van imati veću mogućnost zaraze hemotropnim mikoplazmama, zasniva se na činjenici da će vanjske mačke lakše stupiti u kontakt s drugim mačkama i češće biti infestirane buhama i drugim ektoparazitima.

Osim utvrđivanja učestalosti, cilj ovog istraživanja bio je i analizirati određene rizične čimbenike vezane uz infekciju hemotropnim mikoplazmama u mačaka. Rezultati su pokazali da je infekcija bila češća u muških mačaka, što odgovara rezultatima većine drugih istraživanja (TASKER, 2003., YASMIN i sur., 2022.). U istraživanjima u Španjolskoj i Njemačkoj, prevalencija je također bila viša u muških mačaka, ali primjerice, u istraživanju u Portugalu, nije bilo značajne razlike u odnosu na spol (MARTINEZ-DIAZ i sur., 2013.). Smatra se da je povećani rizik od infekcije u mužjaka

vezan uz činjenicu da oni češće ispoljavaju agresivno ponašanje. Agresivno, odnosno teritorijalno ponašanje mačaka karakteristično je za spolno intaktne mužjake pa je, s tim u vezi postavljena i pretpostavka da će se infekcije češće javljati u nekastriranih životinja (mužjaka) (TASKER, 2003., YASMIN i sur., 2022.). Ovu pretpostavku u našem radu nismo uspjeli dokazati vjerojatno zbog činjenice da za velik broj mačaka nismo imali podatke o kastraciji, a i razlika između pretraženih skupina bila je velika.

U dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da je prevalencija infekcije viša u starijih životinja, odnosno da sa dobi raste i mogućnost izlaganja uzročniku koji će dovesti do kronične infekcije (ROSENQVIST i sur., 2016.). Tako je u istraživanju u Španjolskoj infekcija utvrđena u životinja starijih od godinu dana (DIAZ-REGANON i sur., 2018.) dok su primjerice u Danskoj, mačke starije od 8 godina imale najveći rizik od infekcije (ROSENQVIST i sur., 2016.). U našem istraživanju, infekcija hemotropnim mikoplazmama bila je dokazana u mačaka 3 godine starosti i starijih. Nijedna mačka mlađa od 3 godine, od ukupno 30, nije bila pozitivna na hemotropne mikoplazme. Pad prevalencije u mačaka starijih od 12 godina koji smo zabilježili možemo pripisati tome da je broj mačaka unutar 13+ dobne skupine bio znatno manji u odnosu na ostale pretražene dobne skupine.

Istraživanje provedeno u Španjolskoj utvrdilo je veću učestalost infekcije u mačaka lualica (TASKER, 2003., YASMIN i sur., 2022.), no u našem istraživanju, ovaj se čimbenik nije pokazao statistički značajnim, moguće zbog velike razlike u broju životinja unutar pretraživanih skupina. Retrovirusne bolesti također se mogu smatrati rizičnim čimbenikom budući da oslabljuju imunost status i čine životinju prijemljivijom na razne bolesti (AQUINO i sur., 2014.). U našem istraživanju, infekcija FIV-om pokazala se značajnim rizičnim čimbenikom. Mačke koje su imale FIV, imale su veću vjerojatnost infekcije hemotropnim mikoplazmama. Međutim, infekcija FeLV-om nije se pokazala kao čimbenik koji pospješuje infekciju. Ovakav se rezultat podudara sa rezultatima istraživanja u centralnoj Španjolskoj te Njemačkoj, gdje autori navode kako je mogućnost infekcije FIV-om velika u slučaju ugriza, što također ide u prilog vjerojatnom horizontalnom prijenosu mačjih hemotropnih mikoplazmi (BERGMANN i sur., 2016.). S druge strane FeLV se prenosi i tijekom socijalnih kontakata unutar stabilnih zajednica bez zabilježene agresije.

Ipak, u pojedinim istraživanjima dobiveni su i drugačiji rezultati; u onom provedenom u Portugalu (MARTINEZ-DIAZ i sur., 2013.) i FIV i FeLV pokazali su se kao značajan rizik

infekcije hemotropnim mikoplazmama, dok u istraživanju u sjevernoj Italiji (GETILINI i sur., 2009.), ni FIV ni FeLV nisu utjecali na pojavnost infekcije hemotropnim mikoplazmama.

Infekcija hemotropnim mikoplazmama može uzrokovati anemiju, a uslijed pojave imunoposredovane hemolitičke anemije može doći i do razvoja teže kliničke slike (BARKER I TASKER, 2013.). Sukladno navedenom bilo bi logično očekivati veću učestalost infekcije u anemičnih mačaka koja je potvrđena i u našem istraživanju. Ipak, obzirom da su uzorci za ovo istraživanje prikupljeni nasumično, a u analizi nismo uzimali u obzir primarne dijagnoze ovih pacijenata ne možemo tvrditi da je anemija isključivo posljedica infekcije hemotropnim mikoplazmama, a ne možda drugog uzroka.

6. ZAKLJUČCI

1. Ovo je prvo istraživanje prevalencije hemotropnih mikoplazmi u mačaka u Hrvatskoj. Dobivena prevalencija od 22,86% može se smatrati relativno visokom u odnosu na onu utvrđenu u drugim državama Europe.
2. Infekcija je bila značajno češća u muških u odnosu na ženske mačke.
3. Hemotropne mikoplazme nisu utvrđene kod mačaka mlađih od 3 godine starosti. Infekcija je bila češća u starijih životinja.
4. FIV status pokazao se značajnim rizikom za infekciju mačjim hemotropnim mikoplazmama.
5. Utvrđena je veća učestalost infekcije hemotropnim mikoplazmama u anemičnih mačaka.
6. U budućim istraživanjima rizičnih čimbenika i razjašnjavanju načina prijenosa preporuča se prospektivni pristup na način da se osigura prikupljanje strukturiranih anamnestičkih podataka (npr. uporaba unaprijed pripremljenog upitnika) koji bi uvelike olakšali analizu rizika.
7. Kako bismo uspješno povezali infekciju hemotropnim mikoplazmama s pripadajućom kliničkom slikom i laboratorijskim nalazima potrebno je provesti daljnja istraživanja koja će uključivati veći broj životinja i uzeti u obzir primarne dijagnoze i komorbiditete koji također mogu uzrokovati anemiju. Prilikom ovog istraživanja trebalo bi determinirati točnu vrstu hemotropnih mikoplazmi, budući da se zna da sve hemotropne mikoplazme nisu jednako patogene.

7. LITERATURA

1. AQUINO L.C., HICKS C.A., SCALON M.C., LIMA M.G., LEMOS S., PALUDO G.R., HELPS C.R., TASKER S. (2014): Prevalence and phylogenetic analysis of haemoplasmas from cats infected with multiple species. *J. Microbiol. Methods.* 107:189-96. doi: 10.1016/j.mimet.2014.10.013
2. BARKER E. & TASKER S. (2013): Haemoplasmas: Lessons learnt from cats. *N. Z. Vet. J.* 61:4, 184-192, DOI: 10.1080/00480169.2013.771760
3. BERGMANN M., ENGLERT T., STUETZER B., HAWLEY J.R., LAPINN M.R., HARTMANN K. (2017): Risk factors of different hemoplasma species infections in cats. *BMC Vet. Res.* 13:52, DOI 10.1186/s12917-017-0953-3
4. CLARK R. (1942): *Eperythrozoon felis* (sp. Nov) in a cat. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 13, 15–6.
5. DOWERS K.L., TASKER S., RADECKI S.V., LAPPIN M.R. (2009): Use of pradofloxacin to treat experimentally induced *Mycoplasma hemofelis* infection in cats. *Am. J. Vet. Res.* 70(1), 105-111.
6. DUPLAN F., DAVIES S., FILLER S., ABDULLAH S., KEYTE S., NEWBURY H., HELPS C.R., WALL R., TASKER S. (2018): *Anaplasma phagocytophilum*, *Bartonella* spp., hemoplasma species and *Hepatozoon* spp. in ticks infesting cats: a large-scale survey. *Parasites Vectors.* 11(1), 201.
7. FLINT J.C., MOSS L. C. (1953): Infectious anaemia in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 122, 45–8.

8. FOLEY J. (2022): Hemotropic mycoplasma infections in animals. MSD veterinary manual.

9. GENTILINI F., NOVACCO M., TURBA M.E., WILLI B., BACCI M.L., HOFMANN-LEHMANN R. (2009): Use of combined conventional and real-time PCR to determine the epidemiology of feline haemoplasma infections in northern Italy. *J. Feline Med. Surg.* 11(4):277-285. doi:10.1016/j.jfms.2008.06.008

10. GREENE, C.E. (2012): Hemotropic mycoplasmosis (Hemobartonellosis). *U: Infectious disease of the dog and cat*, Fourth edition; Elsevier Saunders, Missouri; str. 310-319.

11. GUIMARAES A.M., SANTOS A.P., NASCIMENTO N.C., TIMENETSKY J., MESSICK J.B. (2014): Comparative genomics and phylogenomics of hemotrophic mycoplasmas. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0091445

12. HICKS C. A., BARKER E. N., BRADY C., STOKES C. R., HELPS C. R., TASKER S. (2014): Non-ribosomal phylogenetic exploration of Mollicute species: new insights into haemoplasma taxonomy. *Infect. Genet. Evol.* 23, 99-105.

13. JENSEN W.A., LAPPIN M.R., KAMKAR S., REAGAN W.J. (2001): Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. *Am. J. Vet. Res.* 2001;62:604–608.

14. LAPPIN M. R., GRIFFIN B., BRUNT J. (2006): Prevalence of Bartonella species, haemoplasma species, Ehrlichia species, Anaplasma phagocytophilum, and Neorickettsia risticii DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. *J. Feline Med. Surg.* 8(2):85-90. doi:10.1016/j.jfms.2005.08.003

15. MAHER I.E., TASKER S., POLIZOPOULOU Z., DASOPOULOU A., EGAN K., HELPS C.R. i sur. (2010): Polymerase chain reaction survey of feline haemoplasma infections in Greece. *J. Feline Med. Surg.* 12. 601–5.
16. MARTINEZ-DIAZ V.L., SILVESTRE-FERREIRA A.C., VILHENA H., PASTOR J., FRANCINO O., ALTET L. (2013): Prevalence and co-infection of haemotropic mycoplasmas in Portuguese cats by real-time polymerase chain reaction. *J. Feline Med. Surg.* 15. 879–85.
17. MUSEUX K. (2009): In vivo transmission studies of 'Candidatus *Mycoplasma turicensis*' in the domestic cat. *BMC Vet. Res.* 40.5 1-14.
18. NOVACCO M., MELI M.L., GENTILINI F. (2010): Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. *Vet. Microbiol.* 142, 276-284.
19. NOVACCO M., SUGIARTO S., WILLI B., BAUMANN J., SPIRI A.M., OESTMANN A., RIOND B., BORETTI F.S., NAEGELI H., HOFMANN- LEHMANN R. (2018): Consecutive antibiotic treatment with doxycycline and marbofloxacin clears bacteremia in *Mycoplasma haemofelis*-infected cats. *Vet. Microbiol.* 217, 112-120.
20. OBARA H., FUJIHARA M., WATANABEY. (2011): A feline hemoplasma, 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*', detected in dog in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 73, 841-3.
21. PENNISI M.G., HARTMANN K., ADDIE D.D., LUTZ H., GRUFYDD-JONES T. (2015): Blood Transfusion in Cats ABCD guidelines for minimising risks of infectious iatrogenic complications. *J. Feline Med. Surg.* 17(7), 588-593.

22. REAGAN K.L., CLARKE L.L., HAWLEY J.R., LIN P., LAPPIN M.R. (2017): Assessment of the ability of *Aedes* species mosquitoes to transmit feline *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*'. *J. Feline Med. Surg.* 19(8), 798-802.
23. RIKIHISA Y., KAWAHARA M., WEN B., KOCIBA G.J., FUERST P., KAWAMORI F., SUTO C., SHIBATA S., FUTOHASHI M. (1997): Western immunoblot analysis of *Haemobartonella muris* and comparison of 16S rRNA gene sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*. *J. Clin. Microbiol.* 35, 823–9.
24. SPADA E., PROVERBIO D., GALLUZZO P. i sur. (2014): Prevalence of haemoplasma infections in stray cats in northern Italy. *ISRN Microbiol.* doi:10.1155/2014/298352
25. TASKER S. (2010): Haemotropic mycoplasmas: what's their real significance in cats? *J. Feline Med. Surg.* 12:369–381.
26. TASKER S. (2018): Haemoplasmosis in cats. *J. Feline Med. Surg.* 20, 256-261.
27. TASKER S., CANEY S.M., DAY M.J. i sur. (2006): Effect of chronic FIV infection , and efficacy of marbofloxacin treatment, on *Mycoplasma haemofelis* infection. *Vet. Microbiol.* 117:169-179
28. TASKER S., BINNS S.H., DAY M.J., GRUFFYDD- JONES T.J., HARBOUR D.A., HELPS C.R., JENSEN W.A., OLVER C.S., LAPPIN M.R. (2003): Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma*

haemominutum' in cats in the United Kingdom. *Vet. Rec. Open.* 15;152(7):193-8. doi: 10.1136/vr.152.7.193. PMID: 12620033.

29. TAROURA S. i sur. (2005): Detection of DNA of Candidatus *Mycoplasma haemominutum* and *Spiroplasma* sp. in unfed ticks collected from vegetation in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 67.12 1277-1279.

30. SANTOS A.P., SANTOS R.P., BIONDO A.W., DORA J.M., GOLDANI L.Z., OLIVEIRA S.T., SA GUIMARAES A.M., TIMENETSKY J., MORAIS H.A., GONZALEZ F.H., MESSICK J.B. (2008): Hemoplasma infection in HIV-positive patient, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 14(12), 1922-4.

31. SYKES, J.E. (2014): Hemoplasma infections. U: Canine and feline infectious disease, Elsevier Saunders, Missouri. 390.-398.

32. SYKES, J.E., DRAZENOVICH N.L., BALL L.M., LEUTENEGGER C.M. (2007): Use of conventional and real-time polymerase chain reaction to determine the epidemiology of hemoplasma infections in anemic and nonanemic cats. *J. Vet. Intern. Med.* 21. 685-93.

33. UILENBERG G., THIAUCOURT F., JONGEJAN F. (2006): *Mycoplasma* and *Eperythrozoon* (Mycoplasmataceae). Comments on a recent paper. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 13-4.

34. WILLI B. i sur. (2006): Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 44.3, 961-969.

35. WILLI B., BORETTI F.S., CATTORI V., TASKER S., MELI M.L., REUSCH C.E., LUTZ H., HOFMANN-LEHMANN R. (2005): Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2581–5.

36. WILLI B., BORETTI F.S., MELI M.L., BERNASCONI M.V., CASATI S., HEGGLIN D., PUORGER M., NEIMARK H., CATTORI V., WENGI N., REUSCH C.E., LUTZ H., HOFMANN-LEHMANN R. (2007): Real-time PCR investigation of potential vectors, reservoirs and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasma. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, str. 3798-3802.

37. WILLI B., MUSEUX K., NOVACCO M., SCHRANER E., WILD P., GROEBEL K., ZIEGLER U., WOLF- JACKEL G.A., KESSLER Y., GERET C., TASKER S., LUTZ H., HOFMANN-LEHMANN R. (2011): First morphological characterization of '*Candidatus* Mycoplasma turicensis' using electron microscopy. *Vet. Microbiol.* 149 (3-4): 367-373.
doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.11.020

38. WOLF- JACKEL G., JACKEL C., MUSEUX K., HOELZLE K., TASKER S., HANS LUTZ, HOFMANN-LEHMANN R. (2010): Identification, Characterization, and Application of a Recombinant Antigen for the Serological Investigation of Feline Hemotropic Mycoplasma Infections. *Clin. Vaccine Immunol.* 17(12): 1917–1925.

39. YASMIN A.R., PENG T.L., ABDUL- AZEEZ I.O., NUR ATIKAH H., SALMA C.W., HAMDAN R.H., LOONG S.K. (2022): Retrospective prevalence and associated risk factors of *Mycoplasma haemofelis* infection in owned cats. *Trop. Biomed.* 39(3): 444-450.

8. SAŽETAK

Naslov: Molekularna detekcija hemotropnih mikoplazmi u mačaka

Ime i prezime: Petra Piršić

Hemotropne mikoplazme su bakterije iz roda *Mycoplasma* koje nemaju staničnu stijenu i ne mogu se kultivirati. Tri su vrste koje mogu inficirati mačke; *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum* i '*Candidatus Mycoplasma turicensis*. Način prijenosa ovih bakterija još nije potpuno razjašnjen; pretpostavlja se da glavnu ulogu u prijenosu imaju vektori i kontakt sa krvlju do kojeg dolazi tijekom agresivnih interakcija između mačaka. Nakon infekcije, ove bakterije prihvaćaju se za eritrocite domaćina i mogu uzrokovati hemolitičku anemiju. Prevalencija infekcije mačjim hemotropnim mikoplazmama znatno se razlikuje u pojedinim geografskim područjima, a podatci o prevalenciji u Hrvatskoj potpuno nedostaju. Stoga je cilj ovog istraživanja bio primjeniti molekularnu metodu lančane reakcije polimerazom i utvrditi učestalost infekcije hemotropnim mikoplazmama u mačaka - pacijenata Sveučilišne veterinarske bolnice. Dodatno su istraženi mogući rizični čimbenici povezani s infekcijom. Lančanom reakcijom polimerazom ukupno je pretraženo 105 arhiviranih uzoraka pune krvi mačaka, prikupljenih tijekom proljeća i ljeta 2021. godine. Utvrđena je ukupna prevalencija od 22,86%. Učestalost infekcija bila je značajno viša u anemičnih životinja, a veća vjerojatnost infekcije utvrđena je u muških mačaka te općenito u starijih životinja. Životinje inficirane mačjim virusom imunodeficijencije također su bile statistički značajno podložnije infekciji hemotropnim mikoplazmama. Naši rezultati početak su istraživanja molekularne detekcije hemotropnih mikoplazmi mačaka u Hrvatskoj. U daljnjim istraživanjima pomoću detaljnijih, strukturiranih anamnestičkih podataka, potrebno je analizirati veći broj rizičnih čimbenika infekcije i utvrditi klinički značaj infekcije pojedinim vrstama hemotropnih mikoplazmi.

KLJUČNE RIJEČI: hemotropne mikoplazme, prevalencija, PCR, mačka

9. SUMMARY

Title: Molecular detection of hemotropic mycoplasmas in cats

Name: Petra Piršić

Hemotropic mycoplasmas are a group of bacteria of the *Mycoplasma* genus that do not have a cell wall and cannot be cultured. Three species are known to infect cats; *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus* Mycoplasma haemominutum' and '*Candidatus* Mycoplasma turicensis'. The mode of transmission of these bacteria is not fully understood; it is assumed that the main role in transmission is through vectors and contact with blood that occurs during aggressive interactions between cats. After infection, these bacteria attach to host's erythrocytes and can cause immune-mediated hemolytic anemia. The prevalence of feline hemotropic mycoplasma infection varies significantly in certain geographical areas, and there is a complete lack of data on the prevalence in Croatia. Therefore, the aim of this research was to apply the molecular method of polymerase chain reaction and determine the frequency of infection with hemotropic mycoplasmas in cats - patients of the University Veterinary Hospital. In addition, possible risk factors for infection were investigated. A total of 105 archived whole blood samples of cats, collected during the spring and summer of 2021, were analyzed for the presence of hemotropic mycoplasmas using conventional polymerase chain reaction (PCR). An overall prevalence of 22.86% was determined. The frequency of infections was significantly higher in anemic animals, and a higher probability of infection was found in male cats and in older animals in general. Animals infected with feline immunodeficiency virus were also statistically significantly more susceptible to hemotropic mycoplasma infection. Our results are the beginning of research on the molecular detection of hemotropic mycoplasmas in cats in Croatia. For further research, more detailed, structured anamnestic data should be used, it is necessary to analyze a larger number of risk factors for infection and to determine the clinical significance of infection with certain types of hemotropic mycoplasmas.

KEY WORDS: hemotropic mycoplasmas, prevalence, PCR, cat

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1996. godine u Zagrebu. Osnovnu i srednju školu pohađala sam u Zagrebu. Veterinarski fakultet upisujem 2015. godine. Na četvrtoj godini studija, odlučujem se za volontiranje na Klinici za zarazne bolesti. Tamo se susrećem s praktičnim dijelom veterinarske medicine i sve dotadašnje znanje nadograđujem. Nakon godinu i pol, počinjem volontirati na Klinici za kirurgiju, gdje volontiram do zadnje godine studija. Tijekom studija sudjelovala sam na kongresima i na reptilomaniji. Radila sam u veterinarskoj ljekarni. Na zadnjoj godini studija odlučujem riješiti sve studentske obaveze i ostvariti erasmus praksu te work and travel USA program. Erasmus praksu odrađujem u institutu za divlje životinje na Cipru. Tijekom svih godina studiranja pratio me moj najdraži pas Barni.