

Proširenost bakterija iz kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato unutar populacije mišolikih glodavaca

Ćorić, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:178:639236>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Tea Ćorić

**Proširenost bakterija iz kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato
unutar populacije mišolikih glodavaca**

Diplomski rad

Zagreb, 2020. godine

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

Predstojnik: Prof. dr. sc. Zoran Milas

Mentorica: Doc. dr. sc. Josipa Habuš

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

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

ZAHVALE

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

Zahvaljujem dr. sc. Vesni Mojčec Perko, dipl. ing. mol. biol. na stručnim savjetima, trudu, strpljenju i pomoći prilikom izvođenja praktičnog dijela rada te na profesionalnom i ljubaznom odnosu.

Također zahvaljujem doc. dr. sc. Marku Vucelji i Marku Boljfeću na stručnoj pomoći u prikupljanju uzoraka.

Veliko hvala mojim prijateljima i kolegama s fakulteta na uvijek prisutnoj podršci.

I na kraju posebno zahvaljujem svojoj obitelji na strpljenju, razumijevanju i podršci tijekom svih godina studiranja.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA | 2 |
| 2.1. Povijest | 2 |
| 2.2. Zemljopisna proširenost | 2 |
| 2.3. Etiologija | 3 |
| 2.4. Epizootiologija | 4 |
| 2.5. Patogeneza | 8 |
| 2.6. Klinička slika | 8 |
| 2.6.1. Životinje | 8 |
| 2.6.2. Ljudi | 9 |
| 2.7. Dijagnostika | 10 |
| 2.8. Liječenje | 12 |
| 2.9. Profilaksa | 13 |
| 3. MATERIJAL I METODE | 14 |
| 3.1. Pretraženi uzorci | 14 |
| 3.2. Izdvajanje DNK iz organa mišolikih glodavaca | 15 |
| 3.3. Uzorkovani organi mišolikih glodavaca te odabir PCR metoda i parova početnica | 16 |
| 3.3.1. Dokaz prisutnosti bakterije <i>B. burgdorferi</i> metodom „touchdown“ lančane reakcije polimerazom | 17 |
| 3.3.2. Dokaz prisutnosti bakterije <i>B. burgdorferi</i> metodom ugniježdene lančane reakcije polimerazom | 20 |
| 3.4. Elektroforeza | 22 |
| 3.5. Sekvenciranje pozitivnih uzoraka | 22 |
| 4. REZULTATI | 24 |
| 4.1. Izlovljena populacija mišolikih glodavaca | 24 |
| 4.2. Dokazivanje prisutnosti bakterije <i>B. burgdorferi</i> u mokraćnom mjehuru | 25 |
| 4.3. Dokazivanje prisutnosti bakterije <i>B. burgdorferi</i> u ostalim organima | 28 |
| 4.4. Sekvenciranje pozitivnih uzoraka | 29 |
| 5. RASPRAVA | 31 |
| 6. ZAKLJUČCI | 35 |
| 7. LITERATURA | 36 |
| 8. SAŽETAK | 45 |
| 9. SUMMARY | 46 |
| 10. ŽIVOTOPIS | 47 |

POPIS KRATICA

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

FlaA – flagelin A

FlaB – flagelin B

Osp (eng. Outer surface protein) – vanjski površinski protein

BSK - Barbour-Stoenner-Kelly medij

IgM – imunoglobulin M

IgG – imunoglobulin G

ELISA (eng. Enzyme-linked immunosorbent assay) – imunoenzimni test

IF – imunofluorescencija

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

TAE - Tris acetatni EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) puffer

POPIS SLIKA

Slika 1. Proširenost krpelja roda *Ixodes* u svijetu kao glavnih vektora Lymske borelioze

Slika 2. Epizootiološki ciklus bakterije *B. burgdorferi*

Slika 3. Prikaz zastupljenosti vrsta mišolikih glodavaca unutar dostupnog uzorka

Slika 4. Prikaz broja izlovljenih mišolikih glodavaca na pojedinim područjima

Slika 5. Gel elektroforeza PCR proizvoda pozitivnog uzorka mokračnog mjehura voluharice (M2003) u agaroznom gelu: A) dobivenog umnažanjem velikog odsječka *flaB* gena, B) dobivenog umnažanjem malog odsječka *flaB* gena, C) dobivenog umnažanjem odsječka *ospA* gena. Kolone 1-6: M2003, negativna kontrola, pozitivna kontrola *B. garinii*, pozitivna kontrola *B. afzelii*, pozitivna kontrola *B. burgdorferi* s.s., DNK biljeg (100 pb).

Slika 6. Gel elektroforeza PCR proizvoda pozitivnog uzorka mokračnog mjehura miša (M2182) u agaroznom gelu: A) dobivenog umnažanjem odsječaka *ospA* gena. Kolone 1-7: M2182, M2175, pozitivna kontrola *B. garinii*, pozitivna kontrola *B. afzelii*, pozitivna kontrola *B. burgdorferi* s.s., negativna kontrola, DNK biljeg. B) dobivenog umnažanjem malog odsječka *flaB* gena. Kolone 1-8: M2182, M2196, M2198, negativna kontrola, pozitivna kontrola *B. garinii*, pozitivna kontrola *B. afzelii*, pozitivna kontrola *B. burgdorferi* s.s., DNK biljeg (100 pb).

Slika 7. Gel elektroforeza PCR proizvoda pozitivnog uzorka uške voluharice (M2003) dobivenog umnažanjem malog odsječka *flaB* gena u agaroznom gelu. Kolone 1-4: M2003, pozitivna kontrola *B. garinii*, negativna kontrola, DNK biljeg (100 pb).

Slika 8. Gel elektroforeza PCR proizvoda pozitivnog uzorka uške miša (M2182) dobivenog umnažanjem malog odsječka *flaB* gena u agaroznom gelu. Kolone 1-6: M2182, negativna kontrola, pozitivna kontrola *B. garinii*, pozitivna kontrola *B. afzelii*, pozitivna kontrola *B. burgdorferi* s.s., DNK biljeg (100 pb).

Slika 9. Filogenijsko stablo dobiveno Maximum Likelihood algoritmom i Tamura-Nei modelom s 1000 „Bootstrap“ poduzorkovanja; skala na dnu slike označava evolucijsku udaljenost

POPIS TABLICA

Tablica 1. Prikaz datuma, mjesta izlova te broja jedinki na pojedinom lokalitetu

Tablica 2. Prikaz broja izlovljenih mišolikih glodavaca po vrstama

Tablica 3. Početnice korištene za „touchdown“ PCR reakcije

Tablica 4. Prikaz kemikalija koje čine PCR smjesu za mali odsječak flagelina „touchdown“ PCR reakcije

Tablica 5. Prikaz kemikalija koje čine PCR smjesu za veliki odsječak flagelina „touchdown“ PCR reakcije

Tablica 6. Prikaz programa za „touchdown“ PCR reakciju (mali i veliki odsječak flagelina)

Tablica 7. Početnice korištene u vanjskoj i unutarnjoj ugniježđenoj PCR reakciji

Tablica 8. Prikaz kemikalija koje čine PCR smjesu za vanjski dio ugniježđene PCR reakcije

Tablica 9. Prikaz kemikalija koje čine PCR smjesu za unutarnji dio ugniježđene PCR reakcije

Tablica 10. Prikaz programa za vanjsku i unutarnju ugniježđenu PCR reakciju

Tablica 11. Prikaz pozitivnih DNK uzoraka mokraćnih mjehura

Tablica 12. Prikaz pozitivnih DNK uzoraka uški

1. UVOD

Lymska borelioza je zoonoza uzrokovana patogenim bakterijama iz kompleksa *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* s.l.). Unutar kompleksa nalazi se više od 20 različitih vrsta od kojih nekoliko uzrokuje bolest u ljudi i domaćih životinja (STANEK, 2018.). Najznačajniji patogeni iz ovog kompleksa su vrste *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (*B. burgdorferi* s.s.), *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis* i *B. spielmanii* (STANEK, 2018.). Lymska borelioza tipična je bolest endemskih žarišta. Naime, ovi patogeni ne mogu preživljavati izvan domaćina (GREENE i sur., 2012.) pa se u određenom ekosustavu održavaju kružeći između rezervoara (glodavci, ptice ali i neke druge toplokrvne životinje, pa i gmazovi) i vektora (krpelji roda *Ixodes*) (LANE i sur., 1991., RADOLF i sur., 2012.) dok su im ljudi i domaće životinje slučajni domaćini (TRACY i BAUMGARTH, 2017.). U Europi određene vrste glodavaca kao što su šumski miš (*Apodemus sylvaticus*), žutogrli miš (*Apodemus flavicollis*) i šumska voluharica (*Myodes glareolus*) istaknute su kao glavni rezervoari bakterija iz ovog kompleksa (KURTENBACH i sur., 1994.; GOMEZ-CHAMORRO i sur., 2019.).

Tijekom ovog istraživanja pretražili smo organe dobivene od 197 mišolikih glodavaca izlovljenih u endemskim područjima Lymske borelioze u Republici Hrvatskoj tijekom 2017. godine i 2018. godine. Iz mokraćnih mjehura pretraživanih glodavaca smo izdvojili DNK koju smo nakon toga pretražili uporabom lančane reakcije polimerazom u svrhu dokaza prisustva specifičnih odsječaka DNK patogenih bakterija kompleksa *Borrelia burgdorferi* s.l.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učestalost infekcije u mišolikih glodavaca u područjima u kojim se Lymska borelioza javlja endemski te utvrditi eventualnu povezanost pojedinih vrsta glodavaca sa određenim vrstama bakterija unutar kompleksa *Borrelia burgdorferi* s.l.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Povijest

Lymska boreliozna prva put je opisana početkom 1970-ih godina u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) u gradu Old Lyme u državi Connecticut na sjeveroistočnoj obali SAD-a. Bolest se tada nazivala Lymski artritis zbog zabilježene epidemije juvenilnog reumatoidnog artritisa kod djece koja su živjela na tom području (STEERE i sur., 1977.). Epidemiološkom analizom je utvrđeno kako su svi slučajevi, koji su se javljali tijekom ljeta i rane jeseni, bili povezani s ugrizom krpelja, čime se utvrdilo kako je bolest zapravo vektorska (STEERE i sur., 1978.). Uzročnik Lymske borelioze prvi je put izdvojen 1982. godine iz krpelja vrste *Ixodes scapularis* (*I. scapularis*) koji se tada naziva *Ixodes dammini* (BURGDORFER i sur., 1982.) te po otkrivaču dobiva i ime - *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*). Ubrzo nakon toga, spiroheta *B. burgdorferi* je prvi put izdvojena i iz krvi dvaju pacijenata s Lymskom boreliozom u državi New York u SAD-u (BENACH i sur., 1983.).

2.2. Zemljopisna proširenost

Proširenost bakterija iz kompleksa *B. burgdorferi* s.l. izravno je povezana s proširenošću krpelja koji imaju ulogu vektora. Krpelji roda *Ixodes* prošireni su po sjevernoj hemisferi pa se tako oboljevanja ljudi i životinja javljaju u Sjevernoj Americi te u zemljama s umjerenom klimom Europe i Azije (STANEK i sur., 2012.). Lymska boreliozna je najčešća vektorska bolest u SAD-u i pojavljuje se uglavnom na sjeveroistočnoj obali SAD-a, a od tamo se proširila i u Kanadu (STONE i sur., 2017.). U Europi, najčešći slučajevi oboljevanja ljudi zabilježeni su srednjoj Europi (SCHOTTHOEFER i FROST, 2015.), dok se u Aziji slučajevi ne javljaju tako često osim u Kini (FANG i sur., 2015.).

U Sjevernoj Americi, vrsta *B. burgdorferi* s.s. najčešći je uzročnik Lymske borelioze u ljudi, dok se *B. mayonii* javlja samo u određenim područjima (STANEK, 2018.). U Europi, uzročnici bolesti u ljudi su vrste *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis*, *B. burgdorferi* s.s., a povremeno i vrste *B. spielmanii* i *B. lusitaniae* (STANEK, 2018.), dok u Aziji prevladava vrsta *B. garinii* (STANEK, 2012.).

Endemska područja Lymske borelioze u Republici Hrvatskoj su središnja, sjeverna i istočna Hrvatska upravo zbog odgovarajuće klime i geografskog položaja koji pogoduje širenju vektora

(LIPOZENČIĆ i MARINOVIĆ, 2005.). Lymfska borelijoza kod ljudi se najčešće pojavljuje u Krapinsko-zagorskoj, Međimurskoj, Koprivničko-križevačkoj i u Zagrebačkoj županiji te u Gradu Zagrebu (DŽELALIJA i sur., 2015.).

2.3. Etiologija

Uzročnik Lymfske borelijoze su patogene spirohete iz kompleksa *B. burgdorferi* s.l. (STANEK i sur., 2012.). Do danas je opisano preko 20 različitih vrsta unutar navedenog kompleksa (STANEK, 2018.), a sve vrste pripadaju rodu *Borrelia*, porodici *Spirochaetaceae*, redu *Spirochaetales* te koljenu *Spirochaetes* (WANG i sur., 1999.).

B. burgdorferi je spiralna bakterija dužine 10 do 30 µm. Građena je od unutrašnje i vanjske stanične membrane (BARBOUR, 1988.) između kojih se nalazi protoplazmatski cilindar koji se sastoji od citoplazme, unutrašnje stanične membrane i peptidoglikana (BARBOUR i HAYES, 1986.). Između protoplazmatskog cilindra i vanjske membrane nalazi se 7 do 11 periplazmatskih flagela (BARBOUR i HAYES, 1986.) koje omogućuju kretanje bakterije. Kao i ostale spirohete, *B. burgdorferi* ima sposobnost kretanja u viskoznoj okolini kao što je vezivno tkivo te mogu lakše prodrijeti kroz stanice i izvanstanični matriks inficiranog tkiva (GE i sur., 1998.; KIMSEY i SPIELMAN, 1990.). Periplazmatske flagele se sastoje od proteina flagelina B (FlaB) i flagelina A (FlaA) (GE i sur., 1998.) koji su važni antigeni u dijagnozi bolesti (AGUERO-ROSENFELD i sur., 2005.). *B. burgdorferi* se bitno razlikuje od tipične Gram negativne bakterije (STEERE i sur., 2016.). Vanjska stanična membrana ne sadrži lipopolisaharide već vanjske površinske lipoproteine – Osp (eng. Outer surface protein) (STANEK i STRLE, 2018.), koji su danas poznati kao faktori virulencije i zbog svoje uloge u prilagodbi na vektore i domaćine. Neki od tih lipoproteina bitni su za održavanje bakterije u vektorima, dok su drugi bitni za prijenos bakterije između vektora i domaćina (KENEDY i sur., 2012.). Većina borelijskih proteina sadrži veći broj epitopa, a osim antigenske heterogenosti (BARBOUR i sur., 1985.), borelije karakterizira sposobnost varijacije antigena ovisno o okolini u kojoj se nalaze čime uspješno izbjegavaju imunološki odgovor domaćina (NORRIS, 2006.). *B. burgdorferi* ima mali segmentirani genom (STEERE i sur., 2016.). Jedinствена karakteristika borelija je njihov linearni kromosom (BARBOUR i HAYES, 1986.), a osim toga, sadrže i brojne linearne i cirkularne plazmide (BARBOUR, 1988.). Unutar kompleksa *B. burgdorferi* s.l. pojedine bakterije se razlikuju po broju plazmida te se pretpostavlja da je to razlog varijabilnosti kliničke slike Lymfske borelijoze u

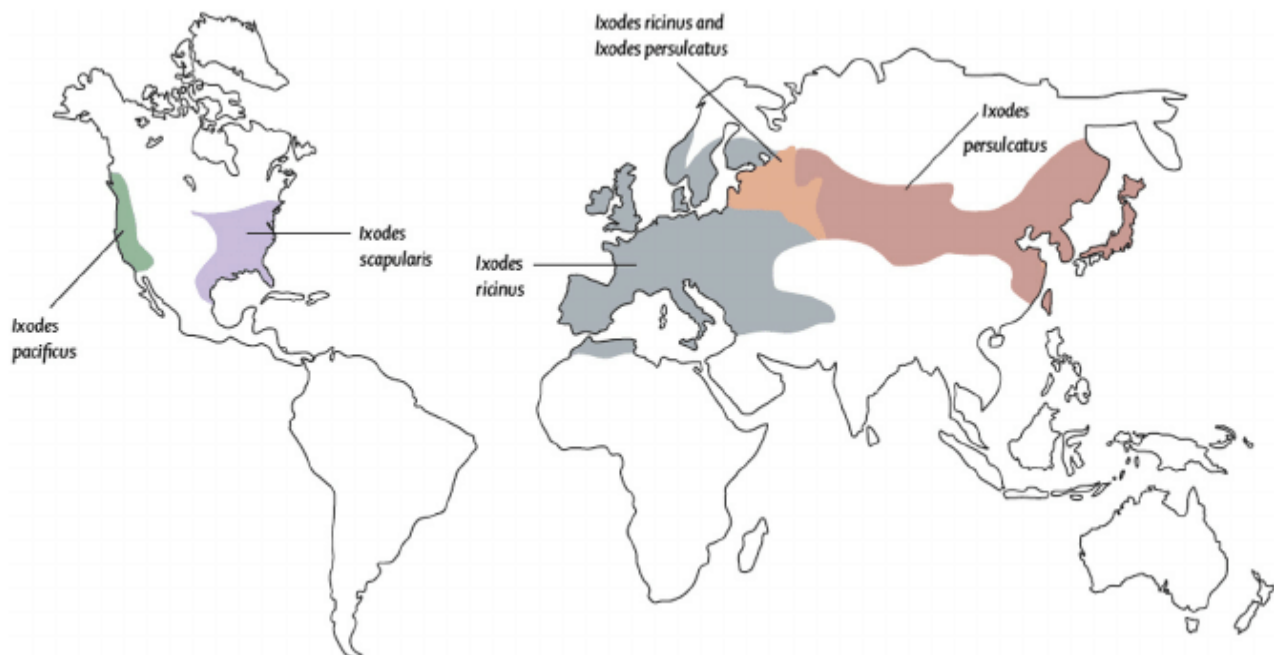
različitim geografskim područjima (STEERE i sur., 2016.). Bakterije rastu sporo te se uzgajaju na Barbour-Stoenner-Kelly (BSK) mediju pri temperaturi od 30-37°C (BARBOUR, 1984.), a prilikom mikroskopiranja najbolje se vide u tamnom polju (GREENE i sur., 2012.). Bakterija *B. burgdorferi* ne može preživjeti u okolini izvan domaćina ili vektora (GREENE i sur., 2012.).

2.4. Epizootiologija

Kako bi se dokazala infektivna doza bakterije, eksperimentalno su inokulirani miševi homogenatom nahranjenih nimfi krpelja *I. scapularis* inficiranih bakterijom *B. burgdorferi*. U navedenom pokusu infektivna doza (ID₅₀) iznosila je oko 30 spiroheta (KASUMBA i sur., 2016.).

Epizootiološki ciklus bakterije *B. burgdorferi* s.l. u prirodi uključuje horizontalni prijenos između hematofagnih artropoda vektora - krpelja roda *Ixodes* i rezervoara - kralježnjaka, najčešće malih glodavaca (LANE i sur., 1991.). Bakterija u domaćina ulazi kroz kožu ugrizom vektora te se to smatra glavnim načinom širenja uzročnika bolesti (STEERE i sur., 2016.).

Danas su poznate četiri vrste krpelja unutar roda *Ixodes* koji služe kao vektori prilikom prijenosa bakterije *B. burgdorferi* na ljude, a to su *Ixodes ricinus* (*I. ricinus*) u Europi, *I. scapularis* u istočnoj Sjevernoj Americi, *I. pacificus* u zapadnoj Sjevernoj Americi te *I. persulcatus* u Aziji (KILPATRICK i sur., 2017.). Krpelj *I. ricinus* je poznat kao glavni vektor bolesti u Republici Hrvatskoj. Patogeni unutar kompleksa *Borelia burgdorferi* s.l. koji su izdvojeni iz krpelja *I. ricinus* u sjeverozapadnoj Hrvatskoj su *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii* i *B. valaisiana* (LIPOZENČIĆ i ŠITUM, 2001.).



Slika 1. Proširenost krpelja roda *Ixodes* u svijetu kao glavnih vektora Lymške borelioze

(Izvor: STANEK i sur., 2012.)

Krpeljima roda *Ixodes* pogoduju područja sa toplim i vlažnim ljetima te blagim zimama (OSTFELD i BRUNNER, 2015.). Nimfe i odrasli krpelji aktivni su od proljeća pa sve do kasne jeseni (STANEK i sur., 2012.). Globalno zatopljenje ima veliki utjecaj na aktivnost krpelja jer im se zbog promjene klimatskih uvjeta danas omogućava aktivnost tijekom cijele godine (BEUGNET i MARIÉ, 2009.). Širenju krpelja, pa tako i bolesti, pogoduju i sve češća kretanja životinja rezervoara u nova područja (ESTRADA-PEÑA, 2015.).

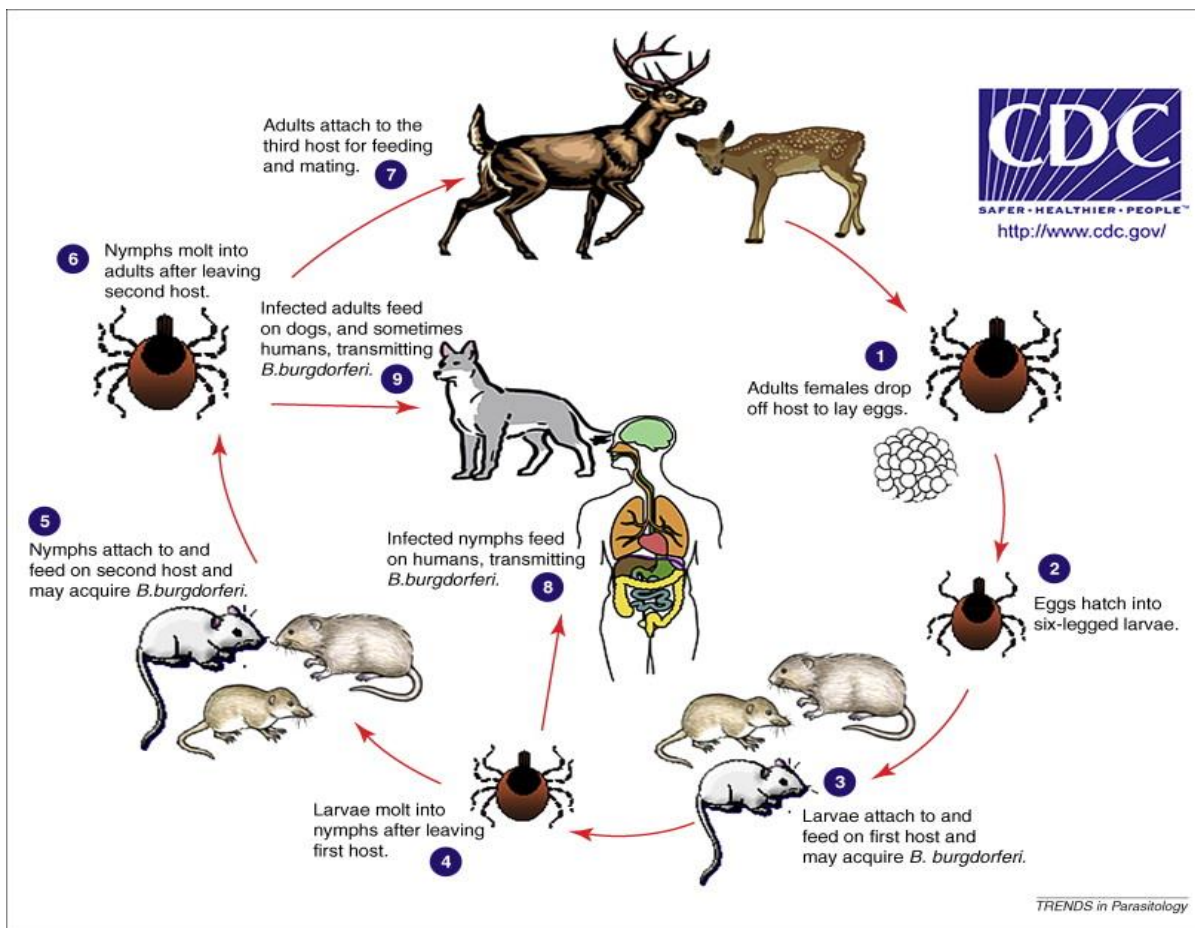
Svi razvojni stadiji vektora krpelja – ličinka, nimfa i odrasli krpelj hrane se krvlju domaćina i to samo jednom tijekom svakog aktivnog stadija (STANEK i STRLE, 2018.). Svaki od razvojnog stadija krpelja hrani se na drugom domaćinu pa tako u epizootiološkom ciklusu bakterije *B. burgdorferi* zapravo sudjeluju tri različita domaćina (RADOLF i sur., 2012.). Održavanju bakterije u populaciji krpelja značajno doprinosi njena sposobnost vertikalnog odnosno transstadijskog prijenosa na sljedeći razvojni stadij krpelja (STANEK i STRLE, 2018.).

Osim na malim glodavcima, krpelji roda *Ixodes* mogu se hraniti na svim kralježnjacima koji dijele njihovo stanište. Ličinke se najčešće hrane na malim sisavcima, uglavnom mišolikim

glodavcima, nimfe na sisavcima srednje veličine te na pticama i gmazovima, a odrasli oblici se većinom hrane na velikim sisavcima (MANNELLI i sur., 2012.). Različite vrste patogenih bakterija unutar kompleksa *B. burgdorferi* s.l. pokazuju sklonost infekcije određenih vrsta kralježnjaka koji im služe kao rezervoari (STANEK i sur., 2012.). U Europi, glavnim rezervoarima patogenih bakterija unutar kompleksa *B. burgdorferi* s.l. smatraju se razne vrste mišolikih glodavaca među kojima su šumski miš (*Apodemus sylvaticus*), žutogrli miš (*Apodemus flavicollis*) te šumska voluharica (*Myodes glareolus*) (KURTENBACH i sur., 1994.; GOMEZ-CHAMORRO i sur., 2019.).

Jeleni (lat. *Cervidae*) su poznati kao nekompetentni rezervoari za bakteriju *B. burgdorferi* koji služe kao izvor krvnog obroka za veliki broj odraslih oblika krpelja (STANEK i sur., 2012.). S obzirom da će odrasli oblici krpelja nakon hranjenja uginuti pa tako neće prenositi spirohetu na druge domaćine (RIZZOLI i sur., 2011.) te zbog toga što je transovarijalni prijenos spirohete jako rijedak (BELLET-EDIMO i sur., 2005.), jeleni nisu uključeni u enzooski ciklus bakterije *B. burgdorferi* (STEERE i sur., 2016.). Bez obzira na to, oni su bitni za širenje populacije krpelja jer se na njima odrasli krpelji pare i razmnožavaju (RADOLF i sur., 2012.).

Za razliku od „pravih“ rezervoara i nekompetentnih rezervoara koji ne oboljevaju od Lymške borelioze, ljudi i neke druge životinjske vrste, kao što su naprimjer psi ili konji, nakon infekcije mogu razviti različite kliničke oblike bolesti. Iako mogu oboljeti, oni se smatraju slučajnim domaćinima i nisu dio enzooskog ciklusa Lymške borelioze (TRACY i BAUMGARTH, 2017.; RADOLF i sur., 2012.).



Slika 2. Epizootiološki ciklus bakterije *B. burgdorferi*

(Izvor: LITTLE i sur., 2010.)

Od domaćih životinja klinički manifestni oblici Lymške borelioze uglavnom se javljaju u pasa (LITMANN i sur., 2018.), a zabilježena je i pojava bolesti kod konja (DIVERS i sur., 2018.). Mačke, iako često seropozitivne, otpornije su na bolest te najčešće ne pokazuju kliničke simptome (GREENE i sur., 2012.).

U ljudi, većina slučajeva Lymške borelioze je uzrokovana ugrizom nimfe i to iz razloga što su odrasli krpelji lako primijećeni te manualno uklonjeni (RIZZOLI i sur., 2011.).

2.5. Patogeneza

Vanjski površinski proteini (Osp) glavni su čimbenici u patogenezu Lyme borelije. OspA i OspB imaju ulogu u održavanju bakterije *B. burgdorferi* unutar tankog crijeva krpelja prije krvnog obroka (SCHWAN i sur., 1995.; KENEDY i sur., 2012.). Krpelj nakon ugriza domaćina mora provesti na koži najmanje 24 sata (36 do 48 sati) kako bi došlo do prijenosa borelije u krv domaćina (BRATTON i sur., 2008.). Tijekom uzimanja krvnog obroka dolazi do promjena kao što su povišenje temperature, sniženje pH te razlika u tlaku kisika (STEERE i sur., 2016.), a sve to posljedično dovodi do izražaja OspC i stimuliranja borelije da se odvoji od epitela tankog crijeva krpelja te da kroz hemolimfu migrira do slinskih žlijezdi (STANEK i STRLE, 2018). Krpelj slinom prenosi bakteriju na domaćina prilikom ugriza. Pojedini proteini iz sline krpelja imaju lokalno imunosuprimirajuće djelovanje koje traje sve dok je krpelj prihvaćen za domaćina (TRACY i BAUMGARTH, 2017.). Jedan od tih proteina je Salp15 (eng. Salivary gland protein 15) koji u kombinaciji s OspC omogućuje bakterijsku kolonizaciju domaćina te lokalno umnažanje borelije u tkivu prije nego što diseminira tkivom, krvlju ili limfom do udaljenih lokacija (STEERE i sur., 2016.). *B. burgdorferi* ne proizvodi toksine, a većina oštećenja tkiva nastaju kao posljedica upalnog odgovora domaćina (STANEK i sur. 2012.). Bez obzira na snažni humoralni i stanični imunološki odgovor domaćina, bakterija se može dugo zadržati unutar organizma zahvaljujući ekspresiji određenih površinskih lipoproteina (eng. VlsE - variable major protein-like sequence, expressed). Spiroheta unutar domaćina zamijeni OspC s VlsE kojeg karakterizira sposobnost antigene varijacije pomoću čega bakterija uspješno izbjegava imunski odgovor domaćina (ZHANG i sur., 1997.).

2.6. Klinička slika

2.6.1. Životinje

Većina pasa seropozitivnih na bakteriju *B. burgdorferi* ne pokazuje nikakve kliničke simptome (LITTMAN i sur., 2018.). Ipak, u pojedinim životinja dolazi do kliničke manifestacije koja uključuje povišenu temperaturu, letargiju, šepanje, limfadenopatiju i anoreksiju (BREITSCHWERDT i sur., 1994.). Dva su glavna klinička oblika koji se javljaju kod pasa; poliartritis te puno rjeđi, ali ozbiljniji oblik, nefropatija (GREENE i sur., 2012.; LITTMAN i sur., 2018). Kod poliartritisa prvi ekstremitet zahvaćen artritismom je najčešće onaj koji je najbliži mjestu ugriza krpelja, a hromost je često praćena povišenom tjelesnom temperaturom. Šepanje

traje nekoliko dana, a onda može prijeći na druge ekstremitete ili nestati (GREENE i sur., 2012.). Simptomi zatajenja bubrega uključuju azotemiju, uremiju, proteinuriju, hematuriju, hipertenziju uz edem i/ili izljev, a većina tih slučajeva često završava letalno (LITTMAN i sur., 2006.; GRAUER i sur., 1988.). Na koži, na mjestu ugriza krpelja, često ostaje manja crvenkasta lezija koja nestaje unutar tjedan dana od ugriza (GREENE i sur., 2012.).

Iako klinička slika Lymske borelioze kod konja još uvijek nije dovoljno istražena, infekcija bakterijom *B. burgdorferi* kod konja povezana je sa pojavom neuroloških znakova (neuroborelioza), uveitisom i kožnim pseudolimfomom (DIVERS i sur., 2018.). Sindrom neuroborelioze karakterizira pojava sljedećih kliničkih znakova: mišićne atrofije, gubitka težine, ataksije u kombinaciji s parezom udova, fascikulacije, pareze jezika, disfagije, ukočenosti vrata, respiratornog distresa kao posljedice disfunkcije grkljana te disfonije (JOHNSTONE i sur., 2016). Uveitis se uglavnom javlja bilateralno te često u kombinaciji s neuroboreliozom (DIVERS i sur., 2018.; JOHNSTONE i sur., 2016). Kožni pseudolimfom karakterizira pojava papula na mjestu ugriza krpelja (SEARS i sur., 2012.).

2.6.2. Ljudi

Klinička slika u ljudi pojavljuje se kao rana lokalizirana Lymska borelioza, rana diseminirana Lymska borelioza te kasna Lymska borelioza (KRAJINOVIĆ i CVETKO, 2018.).

Lokalizirani oblik bolesti započinje na mjestu ugriza krpelja i karakteriziran je relativno karakterističnom kožnom promjenom koju nazivamo *Erythema migrans*, a koja se obično pojavljuje nekoliko dana do tjedana nakon ugriza (STEERE i sur., 2016.; STANEK i STRLE, 2018.). Kožna promjena započinje kao makula ili papula (STANEK i sur., 2010.), a zatim se s vremenom difuzno širi oko mjesta ugriza i formira karakteristično crvenilo uglavnom sa središnjim bljedilom, iako se može pojaviti i bez njega (MARETIĆ, 2008.). Kožna promjena je promjera većeg od 5 cm (VASUDEVAN i CHATTERJEE, 2013.) te obično nije bolna, iako bolesnici na mjestu ugriza mogu osjećati svrbež (KRAJINOVIĆ i CVETKO, 2018.). Moguća je i pojava borelijskog limfocitoma i to osobito na uskama kod djece te kod odraslih u području bradavica ili skrotuma (STRLE i sur., 1992.). Lokalizirani oblik bolesti mogu pratiti i ostali simptomi kao što su umor, glavobolja, atralgije, mijalgije, povišena temperatura te limfadenopatija (STANEK, 2018.; KRAJINOVIĆ i CVETKO, 2018.).

Diseminirani oblik bolesti nastaje kada *B. burgdorferi* diseminira iz eritema krvlju ili limfom do udaljenih dijelova kože pa sve do živčanog sustava, mišićno-koštanog sustava ili srca (MARETIĆ, 2008.). Neuroboreliozna se u odraslih uglavnom pojavljuje kao Bannwarthov sindrom, meningitis, mijelitis i rijetko encefalitis, a kod djece kao blagi meningitis ili facijalna paraliza (STANEK, 2018.). Karditis i ostale srčane promjene pojavljuju se rijetko, a unutar ranog diseminiranog oblika bolesti zabilježena je i zahvaćenost oka pa se tako javljaju konjuktivitis, keratitis, iridociklitis, episkleritis, panuveitis i panoftalmitis (STANEK i STRLE, 2018.).

Kasni oblik bolesti u SAD-u najčešće se očituje artritism; otečenjem i bolnošću jednog ili više zglobova (ARVIKAR i STEERE, 2015.), a može se razviti i do nekoliko godina nakon infekcije i to bez pojave ranog lokaliziranog ili ranog diseminiranog oblika Lymške borelioze (KRAJINOVIĆ i CVETKO, 2018.). U Europi je pak karakteristična pojava kroničnog atrofičnog akrodermatitisa koji se pojavljuje na ekstenzornim površinama ekstremiteta u obliku crvenkasto-plavičastih lezija koje s vremenom atrofiraju (MONIUSZKO-MALINOWSKA i sur., 2018.; STANEK, 2018.). Rijetko se i u kasnom obliku bolesti mogu pojaviti neurološki poremećaji (STEERE i sur., 2016.).

2.7. Dijagnostika

Dijagnoza Lymške borelioze temelji se na kliničkoj slici te anamnezi, odnosno podacima o izloženosti ljudi i životinja krpeljima, posebice boravkom u endemskim područjima (STANEK i sur., 2010.). To je od posebnog značaja kod ljudi s izraženom *Erythema migrans* s obzirom da protutijela u ranoj lokaliziranoj fazi bolesti ne moraju biti prisutna te tada serološko testiranje nije od velikog značaja (STANEK i sur., 2012.). IgM protutijela se pojavljuju prva i najčešće se mogu dokazati 3 do 6 tjedana od početka infekcije, dok se IgG protutijela javljaju kasnije, pa i do nekoliko mjeseci nakon primoinfekcije (HOFMANN i sur., 2017.). Specifična IgG i IgM protutijela mogu se serološki dokazati mjesecima i godinama nakon infekcije i liječenja antibioticima (KALISH i sur., 2001.). Upravo zbog toga, prisustvo protutijela je samo dokaz izloženosti organizma bakteriji *B. burgdorferi*, ali ne i dokaz da je Lymška boreliozna uzrok kliničke slike (GREENE i sur. 2012.), posebice ako su u pitanju artritis ili neurološki simptomi. Takvim pacijentima, ako su u prošlosti bili izloženi spiroheti, često se pogrešno postavlja dijagnoza Lymške borelioze (STEERE i sur., 2016.). Ipak, treba biti oprezan i ne isključiti mogućnost reinfekcije (HOFMANN i sur., 2017.).

Antigena varijacija patogenih vrsta unutar kompleksa *B. burgdorferi* s.l. te različita ekspresija antigena u vektoru i domaćinu otežava serološku dijagnostiku Lyme boreliozе (AGUERO-ROSENFELD i sur., 2005.). Zbog toga se danas u serologiji koriste dva koraka u dijagnozi Lyme boreliozе. Prvi korak je dokazivanje IgM i IgG protutijela usmjerenih protiv bakterija unutar kompleksa *B. burgdorferi* s.l. najčešće pomoću imunoenzimnog testa (eng. Enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA) ili imunofluorescencije (IF) (STANEK, 2018.). Na tržištu danas postoje brojni brzi dijagnostički kitovi koji se zasnivaju na ELISA testu te se koriste za brzi dokaz protutijela u serumu pasa sa sumnjom na infekciju uzrokovanu bakterijom *B. burgdorferi*, a najpopularniji je SNAP[®]4Dx[®] test (IDEXX Laboratories, SAD). Nakon što je kod psa dokazano prisustvo protutijela SNAP[®]4Dx[®] testom, često se provodi još jedan test - Lyme Quant C6 [®] Test (IDEXX Laboratories, SAD) kojim se utvrđuje eventualna povišena razina stvorenih protutijela što može upućivati na aktivnu infekciju. Drugi korak u serološkoj dijagnostici, uz dokaz protutijela pomoću ELISA ili IF, je imunobloting (Western blot) koji služi za dokazivanje protutijela prema određenim antigenima bakterije *B. burgdorferi* (STANEK, 2018.). Imunobloting se provodi odvojeno za IgG i IgM protutijela, a prilikom očitavanja tzv. bandova, odnosno linija gdje protutijela regiraju s antigenom, moraju biti prisutne barem dvije ili tri linije za pozitivan IgM Western blot te 5 do 10 linija za pozitivan IgG Western blot (MARQUES, 2015.). Ipak, i prvi i drugi pozitivan korak serološke dijagnostike ne znače nužno aktivnu infekciju te se bez prisutnih kliničkih simptoma ne može sigurno dijagnosticirati bolest (STANEK, 2018.).

Izravan dokaz *B. burgdorferi* uključuje mikroskopiranje, uzgajanje bakterije te lančanu reakciju polimerazom (eng. Polymerase chain reaction - PCR). Mikroskopiranjem se bakterija rijetko može vidjeti u tjelesnim tekućinama kao što je sinovijalna tekućina i to isključivo u tamnom polju, tako da se ovaj način dijagnostike ne preporučuje (GREENE i sur., 2012.). *B. burgdorferi* se uspješno uzgaja na BSK mediju, a uspjeh ovisi o tipu uzorka (RIZZOLI i sur., 2011.). Kultivacija bakterije je često nepotrebna metoda dokaza kod pacijenata kod kojih je prisutna *Erythema migrans* (STANEK i sur., 2012.), iako se uspješno kultivira iz bioptata kože kod takvih pacijenata. S druge strane, uspješnost kultivacije iz sinovijalne tekućine često nije uspješna zbog brojnih medijatora upale u takvoj sredini koji smanjuju broj i vijabilnost bakterija (ARVIKAR i STEERE, 2015.). Takav mali broj živih bakterija prisutnih u bioptatima pacijenta isključuje kultivaciju bakterije *B. burgdorferi* kao glavni dijagnostički postupak jer negativan

rezultat ne isključuje aktivnu infekciju, ali može poslužiti kao potvrda uz ostale metode dijagnostike (STANEK i sur., 2010.). PCR metoda omogućuje umnožavanje specifičnih odsječaka DNK patogenih bakterija iz kompleksa *B. burgdorferi* s.l. čime ima ulogu u dokazivanju prisutnosti bakterije u raznim uzorcima. Prilikom dijagnostike PCR metodom koriste se različiti protokoli koji dokazuju različite dijelove genoma unutar bakterije. Iako su svi protokoli slično specifični, oni nemaju jednaku osjetljivost. Za dijagnostiku pomoću PCR metode koriste se uzorci ovisno o kliničkoj lokalizaciji pa to mogu biti kožni bioptati, krv, cerebrospinalna tekućina ili sinovijalna tekućina (AGUERO-ROSENFELD i sur., 2005.). PCR metodom se dokazuje DNK bakterije *B. burgdorferi* koja može biti prisutna u uzorku i nakon smrti bakterije te zbog toga to nije sigurna metoda dijagnostike za otkrivanje aktivne infekcije (STANEK i STRLE, 2018.). Međutim, za razliku od često neuspješne kultivacije bakterije iz sinovijalne tekućine, PCR metodom se uspješnije dokazuje *B. burgdorferi* u takvoj sredini te u većini slučajeva uz pozitivan serološki rezultat i prisutnu kliničku sliku može se sa sigurnošću potvrditi dijagnoza artritisa uzrokovanog borelijom (ARVIKAR i STEERE, 2015.). Rezultati PCR metode mogu biti kvalitativni ili kvantitavni, a za dijagnozu bakterija unutar kompleksa *B. burgdorferi* s.l. uglavnom se koristi kvalitativni PCR, odnosno ugniježđena PCR metoda (AGUERO-ROSENFELD i sur., 2005). Negativan rezultat PCR metode i kultivacije bakterije ne isključuje aktivnu infekciju s obzirom da obje metode ovise o pogodnosti odabranog uzorka (STANEK i STRLE, 2018.).

2.8. Liječenje

S obzirom na otežanost postavljanja dijagnoze Lymске borelioze, često se empirijski koriste antibiotici u svrhu postavljanja dijagnoze, ali i eventualnog izlječenja pacijenata (GREENE i sur., 2012.). Rani lokalizirani i rani diseminirani oblici bolesti kod ljudi često prolaze spontano, međutim upotreba antibiotika je opravdana u slučajevima kada se želi skratiti trajanje kliničkih simptoma, ali i kako bi se spriječila pojava kasnijih komplikacija bolesti (STANEK i STRLE, 2018.). In-vitro istraživanja pokazala su kako su patogene vrste unutar *B. burgdorferi* s.l. kompleksa osjetljive na peniciline, cefalosporine druge i treće generacije, tetracikline i makrolide (HUNFELD i sur., 2005.). Kod ljudi, terapija antibioticima traje ovisno o obliku bolesti pa se tako u slučajevima ranog lokaliziranog i ranog diseminiranog oblika bolesti preporuča primjena antibiotika kroz 14 dana, a u slučajevima kasnog oblika bolesti 28 dana (STANEK I STRLE, 2018.). Kod životinja, odnosno pasa, antibiotik glavnog izbora je doksiciklin koji se primjenjuje

kroz 30 dana (GREENE i sur., 2012.). Uz antibiotike, poželjna je i upotreba analgetika ili nesteroidnih protuupalnih lijekova, ovisno o kliničkoj slici pacijenta (LITTMAN i sur., 2018.). Kliničko poboljšanje uočava se već 24-48 sati nakon primjene antibiotske terapije, a najbolji rezultati se postižu ako se krene s liječenjem već u ranoj fazi bolesti (GREENE i sur., 2012.). Međutim, kod pasa nakon završetka primjene antibiotske terapije može doći i do ponovnog pojavljivanja kliničkih znakova (LITTMAN i sur., 2018.). Zasad još uvijek nije u potpunosti jasno radi li se u tim slučajevima o relapsu ili pak o reinfekciji. NADELMAN i sur., 2012. opisuje ponovno pojavljivanje *Erythema migrans* u ljudi kod kojih je provedena potpuna i pravilna antibiotska terapija, te na kraju zaključuje da se ne radi o relapsu bolesti već upravo o reinfekciji. Još uvijek ostaje za istražiti možemo li isti zaključak primijeniti i za pse.

2.9. Profilaksa

Najbolja profilaksa Lymске borelioze za ljude i za životinje je preveniranje ugriza krpelja, posebice u endemskim područjima, te pregled kože nakon boravka u prirodi. Danas su dostupni razni repelenti protiv krpelja, a u slučaju nalaza krpelja na koži treba što prije treba izvaditi krpelja skupa sa glavom, kako ne bi došlo do mogućeg prijenosa bakterije *B. burgdorferi*. Mjesto ugriza je preporučljivo pratiti kroz 6 tjedana (HOFMANN i sur., 2017.). Za pse na tržištu postoje brojni ektoparazitici koji se primjenjuju u svrhu sprječavanja ugriza i ubijanja krpelja. U endemskim područjima Lymске borelioze u SAD-u i u Europi uz upotrebu tih proizvoda preporučuje se i cijepljenje pasa jednim od dostupnih cjepiva na tržištu (LITTMAN i sur., 2018.; GREENE i sur., 2012.). Trenutno ne postoji cjepivo protiv Lymске borelioze za ljude, iako je u SAD-u 1998. razvijeno rekombinantno OspA cjepivo (STEERE i sur., 1998.), međutim 2002. godine je povučeno sa tržišta zbog ekonomskih razloga, ali i zbog sumnje u njegovu dugotrajnu učinkovitost (RIZZOLI i sur., 2011.).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Pretraženi uzorci

Tijekom ovog istraživanja pretražili smo uzorke mokraćnih mjehura 197 mišolikih glodavaca izlovljenih u endemskim područjima za Lymsku boreliozu u Republici Hrvatskoj. Osim uzoraka mokraćnih mjehura, naknadno su pretraženi i uzorci uške, jetre, bubrega i slezene glodavaca u čijim je uzorcima mokraćnih mjehura dokazano prisustvo bakterije *B.burgdorferi*.

Izlovljavanje je provedeno na sedam različitih lokacija unutar tri županije u periodu od 2. lipnja 2017. godine do 6. veljače 2018. godine. Osim mjesta i datuma ulova, za svakog ulovljenog mišolikog glodavca zabilježeni su i podatci o njihovoj vrsti i spolu.

Od ukupno 197 mišolikih glodavaca koji su izlovljeni na endemskim područjima najzastupljenija vrsta su bili miševi, a zatim voluharice. Tijekom izlova uhvaćene su i dvije rovke. Iako rovke ne spadaju u glodavce već u red kukcojeda, uzorak mokraćnog mjehura porijeklom od ove životinje također je pretražen u sklopu ovog istraživanja. U najvećem broju je bio zastupljen žutogrli miš (*Apodemus flavicollis*), zatim obični šumski miš (*Apodemus sylvaticus*), poljski miš (*Apodemus agrarius*), šumska voluharica (*Myodes glareolus*), livadna voluharica (*Microtus agrestis*), poljska voluharica (*Microtus arvalis*) te rovka (*Sorex spp.*).

Podatci o broju jedinki izlovljenih na pojedinom području određenog datuma prikazani su u Tablici 1, dok je u Tablici 2 prikazan broj izlovljenih jedinki po vrstama mišolikih glodavaca.

Tablica 1. Prikaz datuma, mjesta izlova te broja jedinki na pojedinom lokalitetu

| DATUM IZLOVA | ŽUPANIJA | MJESTO IZLOVA | LOKALITET | BROJ JEDINKI |
|--------------|--------------------|---------------|-----------|--------------|
| 2.6.2017. | Zagrebačka | Velika Gorica | 79A | 5 |
| 2.6.2017. | Zagrebačka | Velika Gorica | 7A | 6 |
| 7.6.2017. | Sisačko-moslovačka | Lipovljani | 119B | 8 |
| 7.6.2017. | Sisačko-moslovačka | Lipovljani | 175A | 11 |
| 26.10.2017. | Sisačko-moslovačka | Lipovljani | 175A | 9 |
| 26.10.2017. | Sisačko-moslovačka | Lipovljani | 119B | 12 |
| 12.7.2017. | Zagrebačka | Sljeme | L1 | 10 |
| 12.7.2017. | Zagrebačka | Sljeme | L2 | 14 |
| 12.7.2017. | Zagrebačka | Sljeme | L3 | 15 |
| 12.7.2017. | Zagrebačka | Sljeme | L4 | 11 |

| | | | | |
|-------------|------------------------|----------------------|-----|----|
| 12.10.2017. | Koprivničko-križevačka | Koprivnica | 29A | 8 |
| 13.10.2017. | Koprivničko-križevačka | Koprivnica | 29A | 12 |
| 13.10.2017. | Koprivničko-križevačka | Koprivnica | 32D | 17 |
| 19.10.2017. | Sisačko-moslovačka | Lekenik | 37B | 13 |
| 19.10.2017. | Sisačko-moslovačka | Lekenik | 51A | 11 |
| 20.10.2017. | Sisačko-moslovačka | Lekenik | 51A | 3 |
| 27.10.2017. | Zagrebačka | Turopoljski lug | 7A | 12 |
| 27.10.2017. | Zagrebačka | Šiljakovačka Dubrava | 69C | 7 |
| 6.2.2018. | Zagrebačka | Šiljakovačka Dubrava | 69C | 13 |

Tablica 2. Prikaz broja izlovljenih mišolikih glodavaca po vrstama

| VRSTA GLODAVCA | BROJ IZLOVLJENIH JEDINKI |
|--|---------------------------------|
| Žutogrli miš / <i>Apodemus flavicollis</i> | 65 |
| Obični šumski miš / <i>Apodemus sylvaticus</i> | 53 |
| Poljski miš / <i>Apodemus agrarius</i> | 36 |
| Šumska voluharica / <i>Myodes glareolus</i> | 35 |
| Livadna voluharica / <i>Microtus agrestis</i> | 3 |
| Poljska voluharica / <i>Microtus arvalis</i> | 3 |
| Rovka / <i>Sorex</i> spp. | 2 |

3.2. Izdvajanje DNK iz organa mišolikih glodavaca

Svi uzorci mokraćnog mjehura, uške, slezene, jetre te bubrega prije izdvajanja DNK bili su pohranjeni na temperaturi od -20°C. Za izdvajanje DNK korišten je komercijalni komplet NucleoSpin® Tissue (*Macherey-Nagel GmbH & Co. KG*, Njemačka). Nakon što su se uzorci odmrznuli na sobnoj temperaturi, usitnjeni su u mikrobiološkoj biozaštitnoj komori sa sterilnim instrumenatima – igla, pinceta i skalpel. Od svakog uzorka odvagano je 0,025 g tkiva koji se zatim pohranio u Eppendorf epruvetu zapremnine 1,5 ml. Potom je u tu istu epruvetu s uzorkom tkiva dodano 180 µl pufera T1 te 25 µl enzima proteinaze K u svrhu stanične lize. Svi uzorci su promiješani uz pomoć stolne laboratorijske mješalice (vorteksa) te zatim u termomješalici (ThermoMixer) inkubirani preko noći na 56°C uz brzinu miješanja od 300 rpm-a kako bi došlo do potpune lize stanica. Idući dan, svi uzorci su najprije vorteksirani te zatim stavljeni u centrifugu na 11000 rcf-a kroz 25 sekundi. Zatim je u svaki uzorak dodano 200 µl pufera B3. Nakon vorteksiranja, uzorci su stavljeni u termomješalicu te inkubirani 10 minuta na 70°C uz

brzinu miješanja od 300 rpm-a. Kako bi se zaostala tekućina spustila s poklopca epruvete, svi uzorci su nakon inkubacije stavljeni u centrifugu na 11000 rcf-a kroz 25 sekundi. U uzorke je zatim dodano 210 µl 96 %-tnog etanola, nakon čega su uzorci vorteksirani te ponovno centrifugirani na 11000 rcf-a kroz 25 sekundi. Zatim je uzorak (650 µl) iz svake epruvete prebačen u sakupljačku epruvetu u koju je stavljena Eppendorf epruveta sa silikagel membranom koja služi kako bi se na njoj zadržala DNK. Svi uzorci su stavljeni u centrifugu na 11000 rcf-a kroz jednu minutu. Epruvete sa silikagelnom membranom su zatim stavljene u nove sakupljačke epruvete dok su stare bačene. Zatim slijedi prvo ispiranje silikagelne membrane tijekom kojeg se dodaje 500 µl pufera BW u svaki uzorak te se uzorci centrifugiraju jednu minutu na 11000 rcf-a. Nakon toga, epruvete sa silikagelnom membranom se ponovno stavljaju u nove sakupljačke epruvete dok se stare bacaju. Tijekom drugog ispiranja silikagel membrane dodaje se 600 µl pufera B5 u svaki uzorak te se isti dva puta centrifugiraju kroz jednu minutu na 11000 rcf-a. Nakon toga, epruvete sa silikagelnom membranom stavljaju se u sterilne Eppendorf epruvete zapremnine 1,5 ml, a stare sakupljačke epruvete se bacaju. U svaku Eppendorf epruvetu se zatim dodaje 100 µl pufera BE kako bi se DNK otpustio sa silikagel membrane. Uzorci se inkubiraju na sobnoj temperaturi jednu minutu, a zatim se centrifugiraju na 11000 rcf-a kroz jednu minutu. Po završetku centrifugiranja, epruveta sa silikagelnom membranom se baca, a u Eppendorf epruveti se na kraju nalazi izdvojena DNK iz tkiva. Svi uzorci DNK su potom pohranjeni na -20°C.

3.3. Uzorkovani organi mišolikih glodavaca te odabir PCR metoda i parova početnica

S ciljem dokazivanja prisutnosti bakterije *B. burgdorferi*, u ovom istraživanju uzorkovani su mokraćni mjehuri svih 197 izlovljenih mišolikih glodavaca. Naknadno su od dvaju pozitivnih glodavaca iz arhive odabrani i svi ostali dostupni pohranjeni organi; uška, bubreg, slezena i jetra. Za ovo istraživanje odabrana je „touchdown“ PCR metoda uz korištenje parova početnica BF i BR koji dokazuju veliki odsječak *flaB* gena veličine 966 pb (TADIN i sur., 2016.). Kasnije tijekom istraživanja, nasumičnim odabirom izdvojili smo 20 (10%) mišolikih glodavaca čije smo uzorke mokraćnih mjehura dodatno pretražili slijedeći dva druga PCR protokola. Jedan od navedenih protokola uključivao je „touchdown“ PCR metodu korištenjem parova početnica BF1 i BR1 koje umnažaju mali odsječak *flaB* gena veličine 110 pb (TOKARZ i sur., 2009.), a drugi ugniježdenu PCR metodu gdje korišteni parovi početnica N1 i C1 te N2 i C2 umnažaju dio *ospA*

gena veličine 560 pb te 351 pb (GUY i STANEK, 1991.). Uzorci uške, bubrega, slezene i jetre dvaju glodavaca pretraženi su koristeći sva tri PCR protokola. Time je, osim utvrđivanja točnosti rezultata, cilj bio utvrditi koja od dvije navedene PCR metode ima veću osjetljivost, odnosno koji par početnica koristiti prilikom dokazivanja patogenih bakterija iz kompleksa *B. burgdorferi* s.l. u uzorcima organa mišolikih glodavaca.

Za izvođenje PCR metoda korišten je komercijalni kit *TaKaRa Taq™ Hot Start Version* (Takara Bio Inc., Japan). Također, za kontrolu uspješnosti PCR reakcije, prilikom izvođenja obje PCR metode korištene su tri pozitivne i jedna negativna kontrola reakcije. Sve tri pozitivne kontrole poklonjene s ljubaznošću prof. dr. Eve Ružić-Sabljić s Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani. DNK patogenih vrsta *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* te *B. garinii* poslužile su kao pozitivne kontrole, a za negativnu kontrolu u PCR smjesu je dodana pročišćena voda.

3.3.1. Dokaz prisutnosti bakterije B. burgdorferi metodom „touchdown“ lančane reakcije polimerazom

Tijekom „touchdown“ PCR metode dolazi do promjene u koraku hibridizacije kada se temperatura vezivanja početnica postepeno snižava za 1°C čime se povećava osjetljivosti i specifičnost PCR reakcije. Prilikom „touchdown“ PCR metode umnaža se dio gena koji kodira za flaB protein bakterija iz roda *Borrelia*. U ovom istraživanju provodila se „touchdown“ PCR metoda uz korištenje dva zasebna para početnica u dvije zasebne PCR reakcije. Jedan par početnica korišten je za veći odsječak flagelina (TADIN i sur., 2016.) na svih 197 uzoraka mokraćnih mjehura te kasnije na uzorcima uške, bubrega, slezene i jetre dvaju pozitivnih glodavaca. Drugi par početnica korišten je za manji odsječak flagelina (TOKARZ i sur., 2009.) na 20 nasumično odabranih uzoraka mokraćnih mjehura te naknadno na uzorcima uške, bubrega, slezene i jetre dvaju glodavaca. Početnice te sljedovi baza početnica (TOKARZ i sur., 2009.; TADIN i sur., 2016.) navedeni su u Tablici 3.

Tablica 3. Početnice korištene za „touchdown“ PCR reakcije

| Ciljni protein | Naziv početnice | Nukleotidni slijed baza početnice | Veličina PCR proizvoda |
|------------------------|-----------------|-------------------------------------|------------------------|
| flaB (mali odsječak) | BF1 | 5'-GCAATGACAAAACATATTGRGGAASTTGA-3' | 110 pb |
| | BR1 | 5'-YACAATGACMGATGAGGTTGTRGC-3' | |
| flaB (veliki odsječak) | BF | 5'-GGGGATGATYATMAATCATAATAC-3' | 966 pb |
| | BR | 5'-TGCAATCATWGCCATTGC-3' | |

Osim izdvojene DNK iz uzorka te početnica, za svaku PCR reakciju potrebno je pripremiti pufer, smjesu deoksinukleotida, vodu i enzim DNK polimerazu. Sve navedene kemikalije i njihov volumen prilikom „touchdown“ PCR reakcije za manji fragment flagelina (TOKARZ i sur., 2009.) prikazan je u Tablici 4, a za veći fragment flagelina (TADIN i sur., 2016.) u Tablici 5.

Tablica 4. Prikaz kemikalija koje čine PCR smjesu za mali odsječak flagelina „touchdown“ PCR reakcije

| | Za 1 uzorak (μl) |
|-----------------------|------------------|
| 10 x PCR pufer | 2,5 |
| dNTP | 2 |
| Početnica BF1 (10 μM) | 0,625 |
| Početnica BR1 (10 μM) | 0,625 |
| dH ₂ O | 17,125 |
| Enzim Taqara Taq HS | 0,125 |
| DNK uzorak | 2 |
| UKUPAN VOLUMEN | 25 |

Tablica 5. Prikaz kemikalija koje čine PCR smjesu za veliki odsječak flagelina „touchdown“ PCR reakcije

| | Za 1 uzorak (μl) |
|-----------------------|-------------------------|
| 10 x PCR pufer | 2,5 |
| dNTP | 2 |
| Počelnica BF (10 μM) | 0,625 |
| Počelnica BR (10 μM) | 0,625 |
| dH ₂ O | 18,125 |
| Enzim Taqara Taq HS | 0,125 |
| DNK uzorak | 1 |
| UKUPAN VOLUMEN | 25 |

Program izmjene temperatura, vremenskog trajanja i ponavljanja broja određenog ciklusa PCR reakcije za „touchdown“ PCR reakciju prikazan je u Tablici 6.

Tablica 6. Prikaz programa za „touchdown“ PCR reakciju (mali i veliki odsječak flagelina)

| TEMPERATURA | TRAJANJE | BROJ CIKLUSA |
|--------------------|-----------------|---------------------|
| 94 °C | 15 minuta | - |
| 94 °C | 30 sekundi | - |
| 65 °C | 30 sekundi | - |
| 72 °C | 30 sekundi | - |
| 94 °C | 30 sekundi | 11 x |
| 65 °C / - 1°C | 30 sekundi | |
| 72 °C | 30 sekundi | |
| 94 °C | 30 sekundi | 38 x |
| 54 °C | 30 sekundi | |
| 72 °C | 30 sekundi | |
| 72 °C | 7 minuta | - |
| 4 °C | ∞ | - |

3.3.2. Dokaz prisutnosti bakterije *B. burgdorferi* metodom ugniježdene lančane reakcije polimerazom

Ugniježdena PCR metoda provodi se u dva djela pri čemu se koriste dva različita para početnica u dvije odvojene reakcije. U vanjskoj PCR reakciji, umnaža se specifični odsječak DNK koji kodira OspA protein bakterije *B. burgdorferi* (GUY i STANEK, 1991.). Dobiveni PCR proizvod služi kao kalup za unutarnju PCR reakciju u kojoj se umnaža manji dio PCR proizvoda vanjske PCR reakcije čime se povećava specifičnost i osjetljivost same PCR metode. 20 nasumično odabranih uzoraka mokraćnih mjehura te uzorci uške, bubrega, slezene i jetre dvaju pozitivnih glodavaca pretraženi su pomoću ugniježdene PCR metode. Početnice i njihovi sljedovi baza (GUY i STANEK, 1991.) navedeni su u Tablici 7.

Tablica 7. Početnice korištene u vanjskoj i unutarnjoj ugniježđenoj PCR reakciji

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

Sve kemikalije koje su korištene u vanjskom dijelu ugniježdene PCR reakcije navedene su u Tablici 8, dok su u Tablici 9. navedene kemikalije koje su korištene u unutarnjem dijelu ugniježdene PCR reakcije.

Tablica 8. Prikaz kemikalija koje čine PCR smjesu za vanjski dio ugniježdene PCR reakcije

| | Za 1 uzorak (µl) |
|----------------------|------------------|
| 10 x PCR pufer | 2,5 |
| dNTP | 2 |
| Početnica N1 (10 µM) | 0,625 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| Početnica C1 (10 μ M) | 0,625 |
| dH ₂ O | 16,625 |
| Enzim Taqara Taq HS | 0,125 |
| DNK uzorak | 2,5 |
| UKUPAN VOLUMEN | 25 |

Tablica 9. Prikaz kemikalija koje čine PCR smjesu za unutarnji dio ugniježdene PCR reakcije

| | Za 1 uzorak (μl) |
|-----------------------------------|--|
| 10 x PCR pufer | 2,5 |
| Dntp | 2 |
| Početnica N2 (10 μ M) | 0,625 |
| Početnica C2 (10 μ M) | 0,625 |
| dH ₂ O | 18,125 |
| Enzim Taqara Taq HS | 0,125 |
| PCR proizvod vanjske PCR reakcije | 1 |
| UKUPAN VOLUMEN | 25 |

Program izmjene temperatura, vremenskog trajanja i ponavljanja broja određenog ciklusa PCR reakcije za vanjsku i unutarnju PCR reakciju prikazan je u Tablici 10.

Tablica 10. Prikaz programa za vanjsku i unutarnju ugniježdenu PCR reakciju

| TEMPERATURA | TRAJANJE | BROJ CIKLUSA |
|--------------------|-----------------|---------------------|
| 94 °C | 5 minuta | - |
| 94 °C | 30 sekundi | 35 x |
| 50 °C | 30 sekundi | |
| 72 °C | 1 minuta | |
| 72 °C | 10 minuta | - |
| 4 °C | ∞ | - |

3.4. Elektroforeza

Nakon PCR metode slijedi postupak elektroforeze kako bi se umnoženi dio DNK vizualizirao. Za elektroforezu je potrebno pripremiti agarozni gel od 0,5 g agaroznog praha koji se otopi u 50 ml TAE pufera (Tris acetatni EDTA pufer) u tikvici koja se zatim zagrije do vrenja. Nakon što se otopina ohladi na sobnoj temperaturi u nju se dodaje 3 μ L fluorescentnog bojila za DNK (*DiamondTM Nucleic Acid Dye*, Promega Corporation, USA). U kalup, u koji se prethodno stavi češljic, izlije se otopina agaroze te se tako formira 1%-tni agarozni gel koji se zatim hladi na sobnoj temperaturi oko 30 minuta. Nakon toga, češljic se izvadi te se tako dobiju jažice, a gel se prebaci u kadicu za elektroforezu u kojoj se nalazi TAE pufer. U svaku jažicu se zatim pipetira 5 μ L PCR proizvoda pomiješanog s 1 μ L bromfenol plavila (DNA Loading Buffer (6x), Lonza, USA) koje ima ulogu spuštanja PCR proizvoda na dno jažice te vizualizaciju u gelu. Nakon svih dodanih ispitivanih uzoraka, u jednu jažicu se dodaje pozitivna kontrola, a u drugu negativna kontrola PCR reakcije. U posljednju jažicu dodaje se 1 μ L DNK biljega (100 pb DNA Ladder, Invitrogen, USA) također pomiješanog s 1 μ L bromfenol plavila. DNK biljezi imaju ulogu pri očitavanju rezultata kada se uspoređuju linije umnoženog dijela DNK s linijama DNK biljega te se time može odrediti približna veličina umnoženih dijelova DNK. Tijekom elektroforeze PCR proizvodi, odnosno DNK putuje kroz električno polje u agaroznom gelu pri uvjetima od 120 V/ 80 mA/ 150 W. Nakon 45 minuta, gel se prebaci u kameru s UV svjetlom povezanu s računalnim software-om za obradu fotografija gela (Gel DocTM XR+Gel Documentation System, BIORAD, Hrvatska) kako bi se PCR proizvodii vizualizirali i fotografirali.

3.5. Sekvenciranje pozitivnih uzoraka

Nakon što je PCR metodama dokazano prisustvo bakterije *B. burgdorferi* u dva uzoraka mokraćnog mjehura te u dva uzoraka uški, navedeni PCR proizvodi upućeni su na sekvenciranje u tvrtku Macrogen Europe u Nizozemskoj. Sekvenciranjem se utvrđuje slijed baza u PCR proizvodu te se usporedbom s bazom podataka NCBI Blast potvrđuje pripadnost vrsti bakterije unutar kompleksa *B. burgdorferi* s.l.

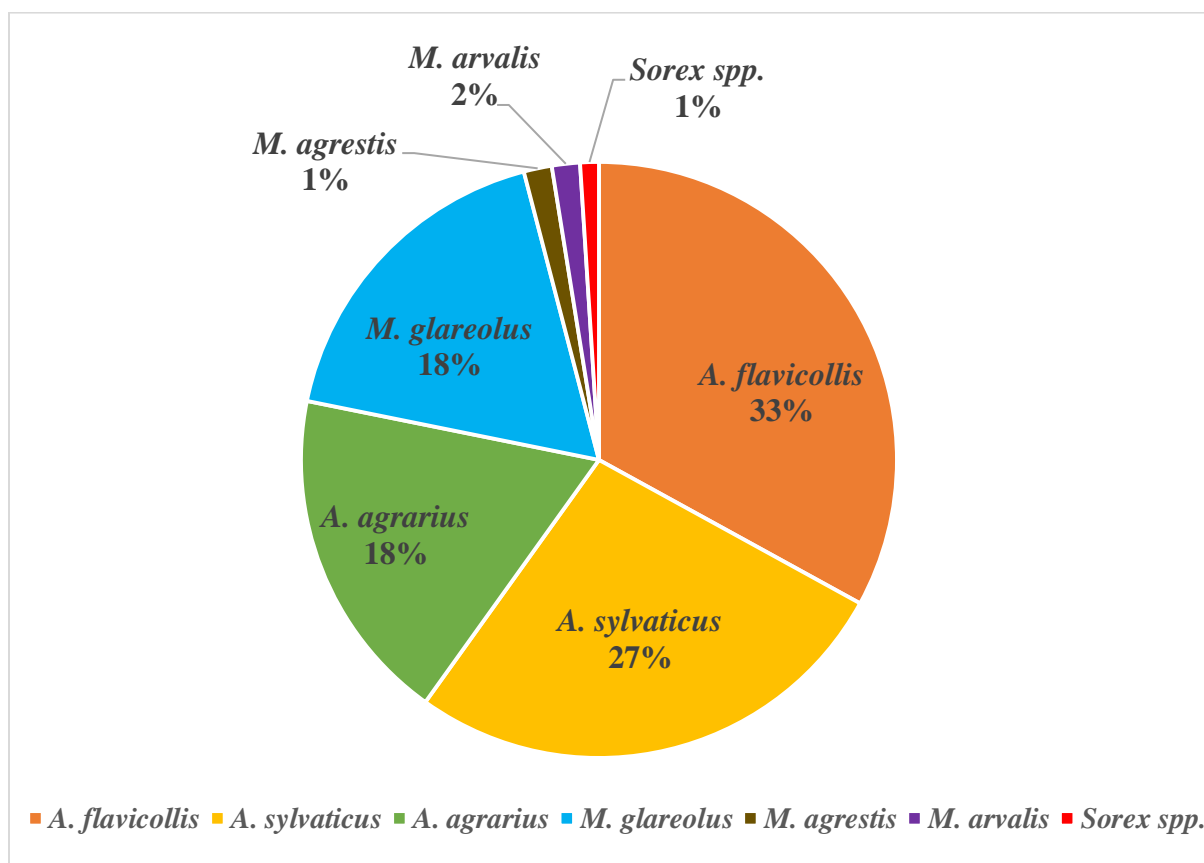
Za obradu nukleotidnih slijedova dobivenih sekvenciranjem odsječka *ospA* gena korišten je računalni program Chromas Lite 2.1. (Technelysium Pty Ltd., South Brisbane, Australija) i BioEdit (Hall, 1999.). Statistička obrada i izrada filogenijskog stabla izrađena je pomoću programa MEGA 6.06 (DNASTAR, Madison, Wisconsin, SAD). U analizi je korištena

statistička metoda *Maximum Likelihood*. U filogenijskoj analizi korišteni su nukleotidni slijedovi opisani u CHAO i sur., 2014. Mali odsječak *flaB* gena nije korišten za filogenijske analize s obzirom da sadrži mali broj nukleotida, nedostatan za takve analize.

4. REZULTATI

4.1. Izlovljena populacija mišolikih glodavaca

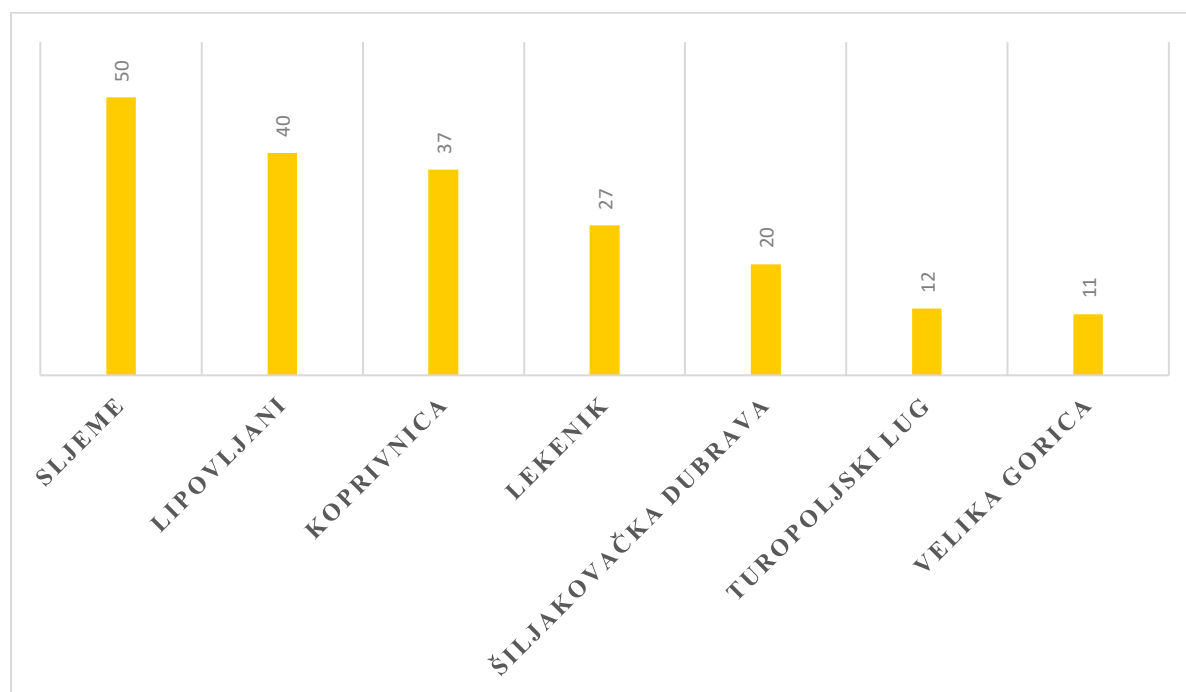
U razdoblju od 2. lipnja 2017. godine do 6. veljače 2018. godine ukupno je izlovljeno 197 mišolikih glodavaca na području sedam različitih lokacija u Republici Hrvatskoj Slika 3. prikazuje zastupljenost svih izlovljenih glodavaca po pojedinoj vrsti. Žutogrli miš (*A. flavicollis*) je bio najbrojniji, a zatim slijede obični šumski miš (*A. sylvaticus*), poljski miš (*A. agrarius*), šumska voluharica (*M. glareolus*), livadna voluharica (*M. agrestis*), poljska voluharica (*M. arvalis*) te rovka (*Sorex spp.*).



Slika 3. Prikaz zastupljenosti vrsta mišolikih glodavaca unutar dostupnog uzorka

Istraživana populacija sastojala se od 98 mužjaka i 98 ženki, dok podatci o spolu jednog glodavca nisu bili dostupni. Ustanovljeno je kako se zastupljenost pojedinih vrsta glodavaca

razlikovala s obzirom na područje izlova, te je tako najviše glodavaca izlovljeno na području Sljemena, a najmanje na području Velike Gorice (Slika 4.)



Slika 4. Prikaz broja izlovljenih mišolikih glodavaca na pojedinim područjima

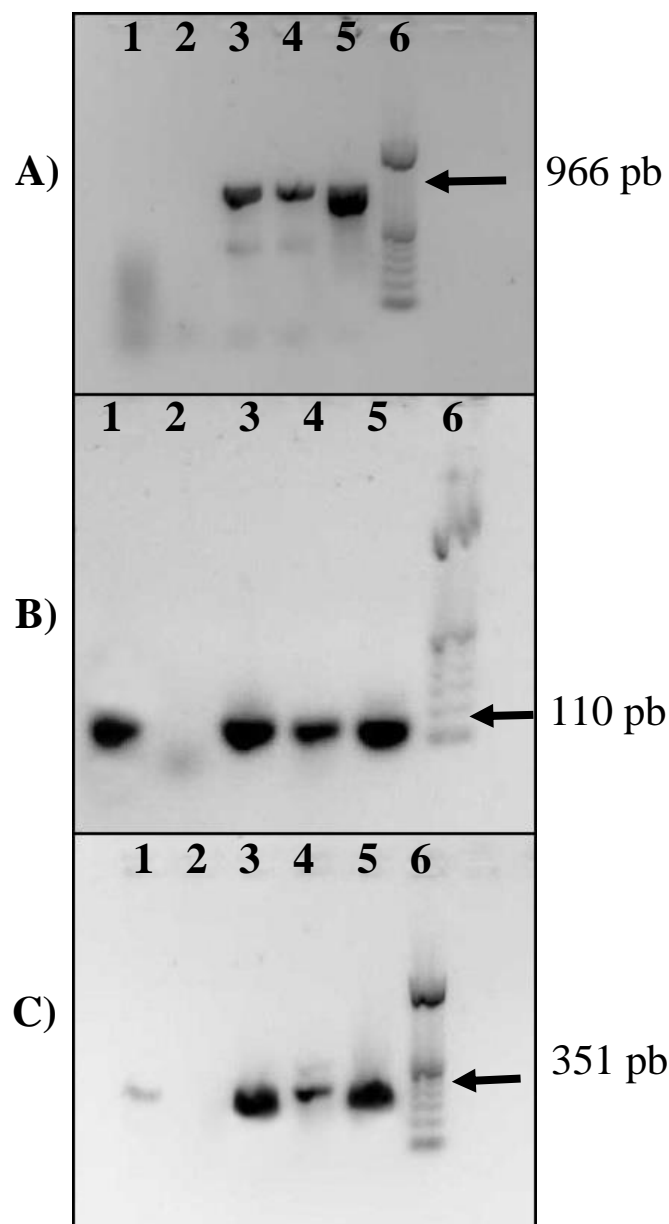
4.2. Dokazivanje prisutnosti bakterije *B. burgdorferi* u mokraćnom mjehuru

Nakon uzorkovanja i izdvajanja DNK iz mokraćnih mjehura svih 197 mišolikih glodavaca, isti uzorci su pretraženi „touchdown“ PCR metodom korištenjem parova početnica BF/BR kojima se umnaža odsječak *flaB* gena veličine 966 pb. Tom metodom u niti jednom od uzoraka mokraćnog mjehura nije dokazano prisustvo bakterije *B. burgdorferi*.

Dodatno, 20 (10 %) nasumično odabranih uzoraka mokraćnih mjehura pretraženo je „touchdown“ PCR metodom uz korištenje parova početnica BF1/BR1 kojima se umnaža odsječak *flaB* gena veličine 110 pb i ugniježđenom PCR metodom uz parove početnica N1/C1 i N2/C2 koji umnažaju odsječak *ospA* gena veličine 560 pb te 351 pb.

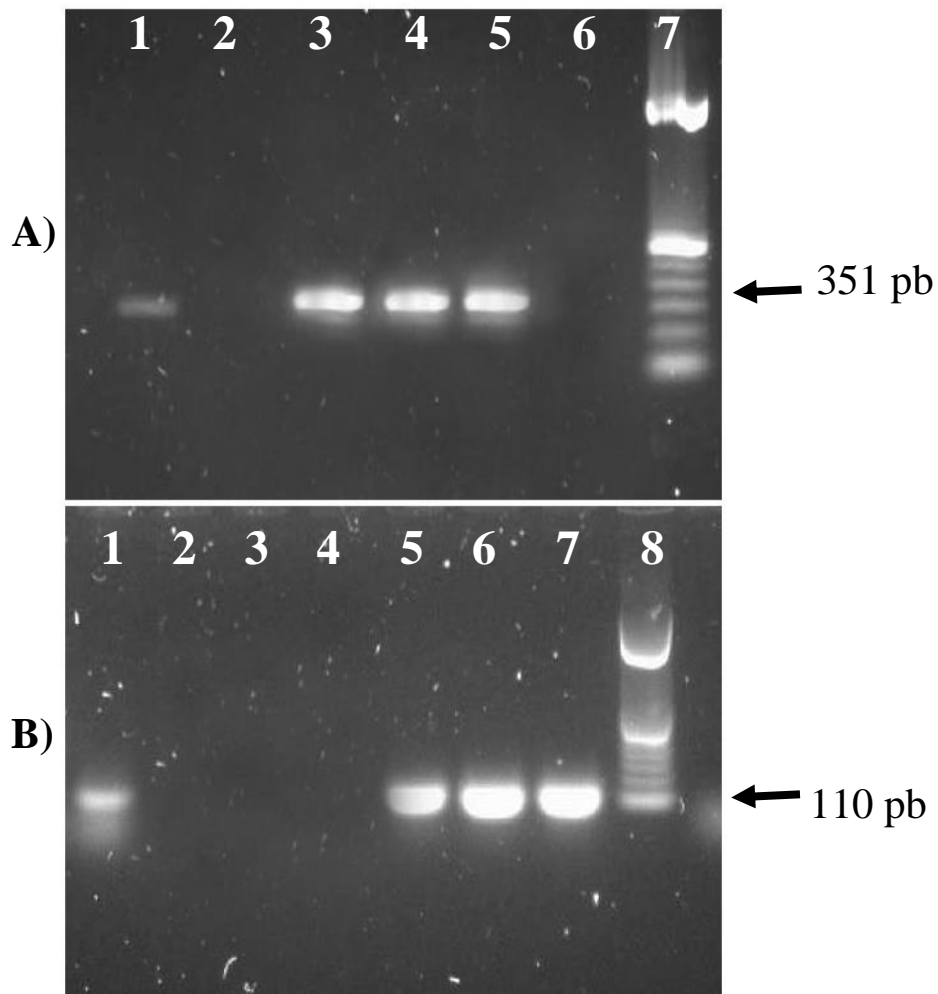
Korištenjem oba protokola, odnosno parova početnica (BF1/BR1; N1/C1 i N2/C2), u dva od ukupno 20 (10 %) nasumično odabranih DNK uzoraka mokraćnih mjehura, dokazano je prisustvo bakterije *B. burgdorferi* (Slika 5., Slika 6.). Oba pozitivna uzorka podrijetlom su od

mišolikih glodavaca izlovljenih na području Zagrebačke županije. Jedan glodavac je ulovljen u Velikoj Gorici, pripada vrsti *Myodes glareolus* te je ženskog spola dok je drugi glodavac ulovljen u Šiljakovačkoj Dubravi, pripadnik je vrste *Apodemus flavicollis* i muškog je spola. Podatci o vrsti pozitivnih glodavaca, njihovom spolu te mjestu njihova ulova prikazani su u Tablici 11.



Slika 5. Gel elektroforeza PCR proizvoda pozitivnog uzorka mokraćnog mjehura voluharice (M2003) u agaroznom gelu: A) dobivenog umnažanjem velikog odsječka *flaB* gena, B) dobivenog umnažanjem malog odsječka *flaB* gena, C) dobivenog umnažanjem odsječka *ospA*

gena. Kolone 1-6: M2003, negativna kontrola, pozitivna kontrola *B. garinii*, pozitivna kontrola *B. afzelii*, pozitivna kontrola *B. burgdorferi* s.s., DNK biljeg (100 pb).



Slika 6. Gel elektroforeza PCR proizvoda pozitivnog uzorka mokraćnog mjehura miša (M2182) u agaroznom gelu: A) dobivenog umnažanjem odsječaka *ospA* gena. Kolone 1-7: M2182, M2175, pozitivna kontrola *B. garinii*, pozitivna kontrola *B. afzelii*, pozitivna kontrola *B. burgdorferi* s.s., negativna kontrola, DNK biljeg. B) dobivenog umnažanjem malog odsječka *flaB* gena. Kolone 1-8: M2182, M2196, M2198, negativna kontrola, pozitivna kontrola *B. garinii*, pozitivna kontrola *B. afzelii*, pozitivna kontrola *B. burgdorferi* s.s., DNK biljeg (100 pb).

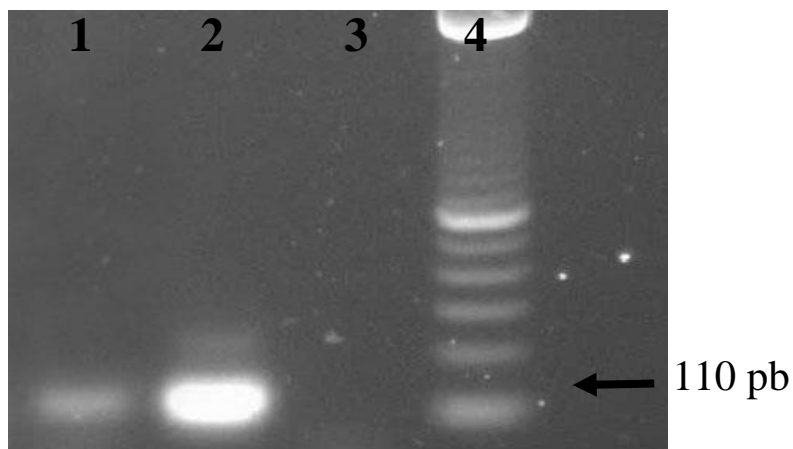
Tablica 11. Prikaz pozitivnih DNK uzoraka mokraćnih mjehura

| OZNAKA | VRSTA | SPOL | MJESTO IZLOVA | PAROVI POČETNICA |
|--------|--|------|-------------------------|--------------------------|
| M2003 | Šumska voluharica (<i>M. glareolus</i>) | Ž | Velika Gorica | BF1/BR1 N1/C1 i N2/C2 |
| M2182 | Žutogrli miš (<i>A. flavicollis</i>) | M | Šiljakovačka Dubrava | BF1/BR1 N1/C1 i N2/C2 |

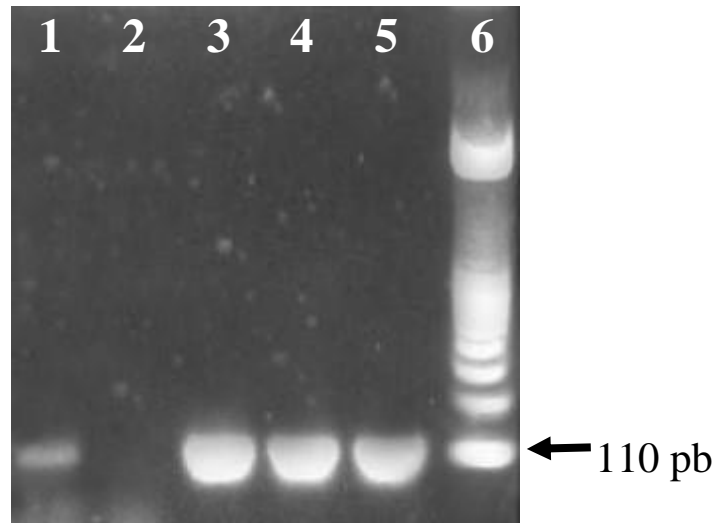
4.3. Dokazivanje prisutnosti bakterije *B. burgdorferi* u ostalim organima

Naknadno je izdvojena DNK iz slezene, jetre, uške te bubrega dvaju mišolikih glodavaca u čijim je mokraćnim mjehurima dokazano prisustvo bakterije *B. burgdorferi*. Svi navedeni organi tih dvaju glodavaca (M2003 i M2182) pretraženi su svim već opisanim početnicama i PCR protokolima. Cilj ovog dodatnog istraživanja bio je odrediti u kojim organima osim mokraćnog mjehura je moguće dokazati prisutnost patogenih bakterija kompleksa *B. burgdorferi* s.l.

Od svih pretraženih organa, jedino je u uški oba prethodno pozitivna uzorka (M2003 i M2182) dokazano prisustvo bakterije *B. burgdorferi* i to samo korištenjem parova početnica BF1/BR1 koji umnažaju odsječak *flaB* gena veličine 110 pb (Slika 7., Slika 8.) Podatci o vrsti pozitivnih glodavaca, njihovom spolu te mjestu njihova izlova prikazani su u Tablici 12.



Slika 7. Gel elektroforeza PCR proizvoda pozitivnog uzorka uške voluharice (M2003) dobivenog umnažanjem malog odsječka *flaB* gena u agaroznom gelu. Kolone 1-4: M2003, pozitivna kontrola *B. garinii*, negativna kontrola, DNK biljeg (100 pb).



Slika 8. Gel elektroforeza PCR proizvoda pozitivnog uzorka uške miša (M2182) dobivenog umnažanjem malog odsječka *flaB* gena u agaroznom gelu. Kolone 1-6: M2182, negativna kontrola, pozitivna kontrola *B. garinii*, pozitivna kontrola *B. afzelii*, pozitivna kontrola *B. burgdorferi* s.s., DNK biljeg (100 pb).

Tablica 12. Prikaz pozitivnih DNK uzoraka uški

| OZNAKA | VRSTA | SPOL | MJESTO IZLOVA | PAROVI POČETNICA |
|--------|---|------|----------------------|------------------|
| M2003 | Šumska voluharica (<i>M. glareolus</i>) | Ž | Velika Gorica | BF1/BR1 |
| M2182 | Žutogrli miš (<i>A. flavicollis</i>) | M | Šiljakovačka Dubrava | BF1/BR1 |

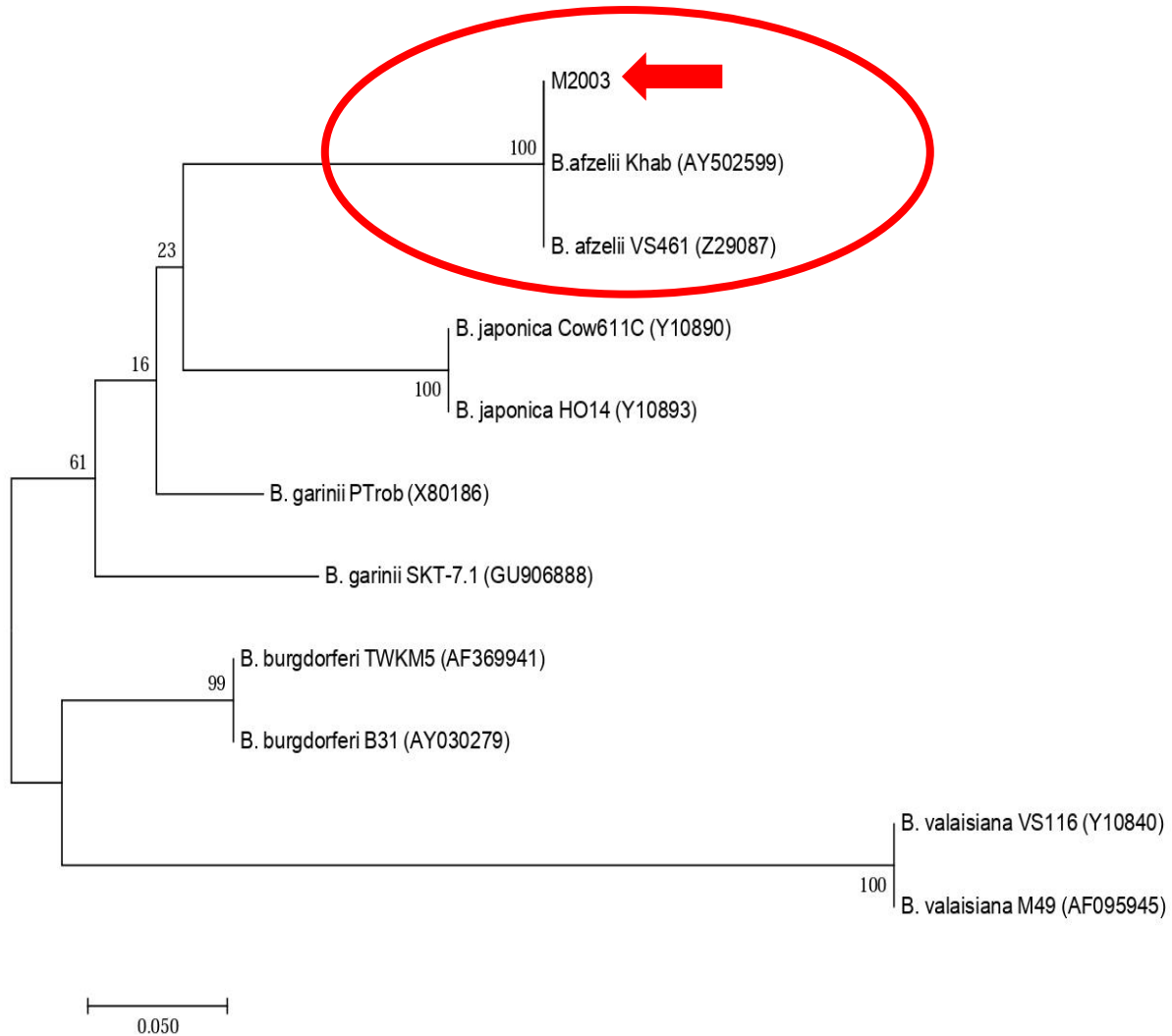
4.4. Sekvenciranje pozitivnih uzoraka

U trenutku pisanja diplomskog rada završeno je sekvenciranje i filogenijska analiza uzorka mokraćnog mjehura M2003, dok su ostali uzorci (uška M2003, mokraćni mjehur M2182, uška M2182) još uvijek u postupku sekvenciranja.

Usporedbom sekvence PCR proizvoda odsječka *ospA* gena mokraćnog mjehura M2003 s bazom podataka NCBI Blast utvrdili smo pripadnost ovog uzorka vrsti *B. afzelii*.

Filogenijskom analizom nukleotidnog slijeda odsječka *ospA* gena mokraćnog mjehura M2003 te usporedbom s dostupnim nukleotidnim slijedovima *ospA* gena opisanim u radu CHAO i sur.,

2014. utvrđeno je da se DNK izdvojena iz mokraćnog mjehura M2003 s potpunom podudarnošću svrstava unutar klastera koji predstavlja genomsku vrstu *B. afzelii* (Slika 9.).



Slika 9. Filogenijsko stablo dobiveno Maximum Likelihood algoritmom i Tamura-Nei modelom s 1000 „Bootstrap“ poduzorkovanja; skala na dnu slike označava evolucijsku udaljenost

5. RASPRAVA

Kontinentalni dio RH, odnosno područja središnje, sjeverne te istočne Hrvatske, smatraju se endemskim područjem Lymške borelioze (LIPOZENČIĆ i MARINOVIĆ, 2005.). Obzirom da je naša namjera i bila istražiti rizična područja te bolesti, mišoliki glodavci izlovljeni za potrebe ovog istraživanja potjecali su upravo iz tih dijelova Hrvatske, odnosno sa sedam različitih lokacija unutar triju županija– Zagrebačke, Koprivničko-križevačke te Sisačko-moslavačke.

Mišoliki glodavci značajni su rezervoari bakterije *B. burgdorferi* s.l. (LANE i sur., 1991.). Istraživanja provedena na području Europe bilježe različite prevalencije patogenih bakterija iz kompleksa *B. burgdorferi* s.l. unutar populacije mišolikih glodavaca; u Mađarskoj od 2,2 do 6,6 % (SZEKERES i sur., 2015), u Poljskoj 6,8 % (GRYCZYŃSKA i sur., 2018.), u Češkoj 16,4 % (KYBICOVÁ i sur., 2008.), u Austriji 24 % (KHANAKAH i sur., 2006.) te u Sloveniji 29,9 do 39,1 % (CERAR i sur., 2015.). Te zemlje spadaju u područje srednje Europe, a STRNAD i sur., 2017. dokazuje kako je prevalencija bakterija iz kompleksa *B. burgdorferi* s.l. u krpeljima *I. ricinus*, glavnim vektorima bakterije *B. burgdorferi* u Europi, u tom djelu Europe veća nego u ostalim dijelovima. Dosadašnja istraživanja provedena na mišolikim glodavcima na području RH bilježe prevalenciju bakterija iz kompleksa *B. burgdorferi* s.l. od 2,06 % (TADIN i sur., 2016.) do 8,88 % (TURK i sur., 2008.).

Prilikom razmatranja rezultata navedenih studija, treba uzeti u obzir da su navedena istraživanja provedena na različitim vrstama mišolikih glodavaca, odnosno da su pretraživani različiti organi. Iako su sva istraživanja provedena uz pomoć PCR metoda, nisu uvijek korištene jednake PCR metode niti isti parovi početnica.

Za dokazivanje bakterije *B. burgdorferi* iz raznih organa mišolikih glodavaca postoje različiti PCR protokoli koji, iako slično specifični, nemaju jednaku osjetljivost. Svaki PCR protokol koristi svoje parove početnica koje umnažaju različite dijelove genoma unutar bakterije *B. burgdorferi*. Primjerice, uz korištenje MassTag PCR metode, TADIN i sur., 2016. dokazuje prisustvo bakterije *B. burgdorferi* u organima pluća i bubrega mišolikih glodavaca uz korištenje parova početnica BF1 i BR1 koje umnažaju mali odsječak *flaB* gena (TOKARZ i sur., 2009.). Nakon toga, ponovno uz pomoć MassTag PCR metode, pozitivne uzorke pretražuje još jednom korištenjem parova početnica BF/BR, koje umnažaju veliki odsječak *flaB* gena. Tim parovima

početnica, u već pozitivnim uzorcima, potvrđuje prisustvo bakterije *B. burgdorferi* u 5/242 glodavaca.

S obzirom da je to istraživanje provedeno u RH na istim vrstama mišolikih glodavaca kao i u ovom istraživanju, odabrali smo upravo parove početnica BF/BR za dokazivanje velikog odsječka *flaB* gena, ali uz korištenje „touchdown“ PCR metode. Međutim, u našem istraživanju koristeći konveccioncionalnu PCR metodu i koristeći ove početnice nismo uspjeli dokazati prisustvo bakterije *B. burgdorferi* u niti jednom od 197 uzoraka mokraćnih mjehura. Razlog tome može biti korištenje različite PCR metode od one koja je korištena u TADIN i sur., 2016.

Obzirom da u prvom dijelu istraživanja nismo uspjeli dokazati borelije u niti jednom pretraživanom uzorku, što je bilo vrlo neobično i u suprotnosti s dosadašnjim istraživanjima prevalencije, nasumično smo odabrali 20/197 (10 %) uzoraka mokraćnih mjehura te smo ih ponovno pretražili „touchdown“ PCR metodom, ali ovaj put uz korištenje parova početnica BF1 i BR1 koje umnažaju mali odsječak *flaB* gena (TOKARZ i sur., 2009.). Dodatno smo tih istih 20 uzoraka mokraćnih mjehura pretražili ugniježđenom PCR metodom i to korištenjem parova početnica N1 i C1 te N2 i C2 koje umnažaju dio *ospA* gena (GUY i STANEK, 1991.). Korištenjem oba navedena protokola dokazali smo prisustvo bakterije *B. burgdorferi* u dva uzorka mokraćnih mjehura od njih ukupno 20. Dobivena prevalencija od 10 % viša je od one dobivene u prijašnjim istraživanjima na glodavcima unutar RH (TURK i sur., 2008.; TADIN i sur., 2016.), no taj se podatak treba razmatrati sa zadržkom jer još ostaje za istražiti kolika bi bila prevalencija unutar ukupnog uzorka (N=197) glodavaca izlovljenih za potrebe ovog istraživanja.

Različita istraživanja pokazuju kako različiti organi mišolikih glodavaca mogu poslužiti za dokazivanje bakterije *B. burgdorferi*. Prethodno je dokazano prisustvo bakterija iz kompleksa *B. burgdorferi* s.l. u uzorcima slezene (SZEKERES i sur., 2015.) te u uzorcima jetre (KALMÁR i sur., 2019.) mišolikih glodavaca. Uzorak uške pokazao se kao dobar odabir prilikom dokazivanja bakterije *B. burgdorferi* u populaciji mišolikih glodavaca u nekoliko istraživanja (MYSTERUD i sur., 2019.; ZAWADA i sur., 2020.; PETNEY i sur., 1996.). Međutim, PETNEY i sur., 1996. utvrđuje kako uzorci mokraćnih mjehura pokazuju veću osjetljivost nego uzorci uške prilikom dokazivanja prisutnosti bakterije *B. burgdorferi* unutar iste populacije glodavaca. Također, jedan od nedostataka prilikom odabira uške za dokaz bakterije *B. burgdorferi* svakako je otežani

proces usitnjavanja uške za uspješno izdvajanje DNK te je to jedan od razloga zbog kojeg uška nije bila naš glavni izbor prilikom odabira uzorka.

Odabir mokraćnog mjehura kao ciljnog organa za dokazivanje prisutnosti bakterije *B. burgdorferi* u ovom istraživanju temelji se na prijašnjim istraživanjima (SCHWAN i sur. 1988.; PETNEY i sur., 1996.) prilikom kojih je uspješno izdvojena *B. burgdorferi* upravo iz mokraćnog mjehura različitih vrsta mišolikih glodavaca. Osim toga, u RH na području Primorsko-goranske županije, TURK i sur., 2008. dokazuje prisustvo borelije unutar istraživane populacije sivog puha (*Glis glis*) također iz uzoraka mokraćnih mjehura.

Kako bi dodatno istražili možemo li i u ostalim organima, osim u mokraćnom mjehuru, dokazati prisutnost bakterije *B. burgdorferi*, dostupne smo organe dvaju pozitivnih mišolikih glodavaca dodatno pretražili „touchdown“ PCR metodom korištenjem parova početnica koje umnažaju veliki odsječak *flaB* gena (BF/BR) i parova početnica koje umnažaju mali odsječak *flaB* gena (BF1/BR1) te ugniježđenom PCR metodom korištenjem parova početnica koje umnažaju dio *ospA* gena (N1/C1 i N2 /C2). Od svih dostupnih uzoraka organa, jedino je u uški oba prethodno pozitivna glodavca dokazano prisustvo bakterije *B. burgdorferi*, ali samo korištenjem parova početnica BF1/BR1.

Uzimajući u obzir taj rezultat i rezultat iz prvog dijela istraživanja, pokazalo se kako je konvencionalna „touchdown“ PCR metoda uz korištenje početnica koje umnažaju mali odsječak *flaB* gena najosjetljivija metoda prilikom dokazivanja bakterije *B. burgdorferi* iz više različitih organa mišolikih glodavaca. Međutim, nedostatak navedenih protokola je taj što mali odsječak *flaB* gena sadrži premali broj nukleotida za daljnju filogenijsku analizu. Iz tog razloga, svi pozitivni uzorci dokazani uz korištenje početnica koje umnažaju mali odsječak *flaB* gena moraju ponovno biti pretraženi početnicama koje umnažaju dio *ospA* gena kako bi se mogla provesti filogenijska analiza odnosno utvrditi pripadnost određenoj genomskoj vrsti. Bez obzira na ponavljanje pretraživanja, ugniježđena PCR metoda, koju smo koristili za umnažanje dijela *ospA* gena, iziskuje više vremena jer se mora provoditi u dva odvojena dijela. Također, ovaj se protokol pokazao dobrim odabirom samo prilikom dokazivanja bakterije *B. burgdorferi* iz uzoraka mokraćnih mjehura.

Oba mišolika glodavca u kojima je dokazano prisustvo bakterije *B. burgdorferi* ulovljena su na području Zagrebačke županije, koja nakon grada Zagreba bilježi i najveći broj oboljelih ljudi, što

pokazuju podatci o učestalosti Lymške borelioze u RH (DŽELALIJA i sur., 2015). Ipak, ovo istraživanje provedeno je na malom i na neujednačenom broju uzoraka dobivenih nasumičnim odabirom, prilikom čega se nije vodilo računa o kojoj se vrsti glodavaca radi niti o zastupljenosti glodavaca na određenim istraživanim geografskim područjima.

Jedan glodavac pripada vrsti *A. flavicollis*, dok drugi pripada vrsti *M. glareolus*, a obje su vrste poznate kao jedne od glavnih rezervoara bakterija unutar kompleksa *B. burgdorferi* s.l. u Europi (KURTENBACH i sur., 1994.; GOMEZ-CHAMORRO i sur., 2019.).

Kako bi utvrdili genomsku vrstu borelije, pozitivan uzorak mokraćnog mjehura šumske voluharice (M2003) dobiven umnažanjem odsječka *ospA* gena poslan je na sekvencioniranje. Filogenijskom analizom dobivene sekvence utvrđeno je kako pozitivan uzorak pripada genomskoj vrsti *B. afzelii*. Dobiveni rezultat u skladu je s prethodnim istraživanjima koji dokazuju da se *B. afzelii* održava unutar populacije europskih mišolikih glodavaca (HANINCOVÁ i sur, 2003.), među kojima je i vrsta *M. glareolus*.

O prisutnosti i važnosti ove bakterijske vrste u RH piše u svom istraživanju i ŠITUM i sur., 2000. gdje se bakterijska vrsta *B. afzelii* izdvaja iz seruma 10 pacijenata s područja sjeverozapadne Hrvatske. Pritom, autori zaključuju da je upravo ta vrsta glavni uzročnik *Erythema chronicum migrans* u istraživane populacije u navedenom području.

6. ZAKLJUČCI

1. Konvencionalna „touchdown“ PCR metoda za dokazivanje velikog odsječka *flaB* gena nije pogodna za istraživanje prevalencije bakterije *B. burgdorferi* unutar populacije mišolikih glodavaca.
2. Od svih korištenih PCR metoda, u ovom istraživanju najosjetljivijom se pokazala „touchdown“ PCR metoda uz korištenje početnica koje dokazuju mali odsječak *flaB* gena.
3. Za utvrđivanje genomske vrste iz uzoraka u kojima je dokazano prisustvo bakterije *B. burgdorferi* korištenjem početnica koje dokazuju mali odsječak *flaB* gena, potrebno je dodatno na istim uzorcima provesti postupak umnažanja djela *ospA* gena kako bi se mogle provesti daljnje filogenijske analize.
4. Prevalencija bakterije *B. burgdorferi* s.l. u mišolikih glodavaca iznosi 10% (2/20) kada su uzorci mokraćnih mjehura pretraženi pomoću početnica koje umnažaju mali odsječak *flaB* gena ili dio *ospA* gena. Ostaje za istražiti stvarni prikaz prevalencije unutar ukupnog uzorka (N=197) glodavaca izlovljenih za potrebe ovog istraživanja.
5. Pozitivni uzorci dokazani su u vrsta *A. flavicollis* i *M. glareolus*. Obje vrste glodavaca poznate su kao jedne od najčešćih rezervoara bakterije *B. burgdorferi* u Europi.
6. Mokraćni mjehur pokazao se kao najbolji izbor prilikom odabira organa za pretraživanje i dokazivanje prisustva bakterija iz kompleksa *B. burgdorferi* s.l. u mišolikih glodavaca.
7. Sekvenciranjem je utvrđeno kako jedan pozitivan uzorak mokraćnog mjehura pripada bakterijskoj vrsti *B. afzelii* čiji su rezervoari u Europi mišoliki glodavci, a koja se smatra glavnim uzročnikom *Erythema chronicum migrans* u pacijenata s područja sjeverozapadne Hrvatske.
8. S obzirom na broj zabilježenih slučajeva oboljenja ljudi u Hrvatskoj te zbog podatka da je Lymska boreliozna druga najčešća zoonoza u Hrvatskoj, potrebna su daljnja istraživanja na rezervoarima i vektorima bakterije *B. burgdorferi* kako bi se utvrdila stvarna prevalencija bakterija iz kompleksa *B. burgdorferi* s.l. u tih životinja koje su bitne za održavanje enzootskog ciklusa Lymske borelioze unutar RH.

7. LITERATURA

1. AGUERO-ROSENFELD M.E., WANG G., SCHWART I., WORMSER G.P. (2005): Diagnosis of Lyme Borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 484–509.
2. ARVIKAR S.L., STEERE A.C. (2015): Diagnosis and Treatment of Lyme Arthritis. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 29, 269–280.
3. BARBOUR A.G. (1984): Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale. J. Biol. Med.* 57, 521-525.
4. BARBOUR A.G., HEILAND R.A., HOWE T.R. (1985): Heterogeneity of major proteins in Lyme disease borreliae: a molecular analysis of North American and European isolates. *J. Infect. Dis.* 152, 478-484.
5. BARBOUR A.G., HAYES S.F. (1986): Biology of *Borrelia* species. *Microbiolog. Rev.* 50, 381-400.
6. BARBOUR A.G. (1988): Laboratory aspects of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1, 399-414.
7. BELLET-EDIMO R., BETSCHART B., GERN L. (2005): Frequency and efficiency of transovarial and subsequent transstadial transmissions of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks. *Bull. Soc. Neuch. Sci. Nat.* 128, 117 – 125.
8. BENACH J.L., BOSLER E.M., HANRAHAN J.P., COLEMAN J.L., HABICHT G.S., BAST T.F., CAMERON D.J., ZIEGLER J.L., BARBOUR A.G., BURGENDORFER W., EDELMAN R., KASLOW R.A. (1983): Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 308, 740-742.
9. BEUGNET F., MARIÉ J.L. (2009): Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet. Parasitol.* 26, 298-305.
10. BRATTON R.L., WHITESIDE J.W., HOVAN M.J., ENGLE R.L., EDWARDS F.D. (2008): Diagnosis and treatment of Lyme disease. *Mayo Clin. Proc.* 83, 566-571.

11. BREITSCHWERDT E.B., NICHOLSON W.L., KIEHL A.R., STEERS C., MEUTEN D.J., LEVINE J.F. (1994): Natural infections with *Borrelia* spirochetes in two dogs from Florida. J. Clin. Microbiol. 32, 352–357.
12. BURGDORFER W., BARBOUR A.G., HAYES S.F., BENACH J.L., GRUNWALDT E., DAVIS J.P. (1982): Lyme disease—a tick-borne spirochetosis?. Science 216, 1317-1319.
13. CERAR T., KORVA M., AVŠIČ-ŽUPANC T., RUŽIĆ-SABLJIĆ E. (2015). Detection, identification and genotyping of *Borrellia* spp. in rodents in Slovenia by PCR and culture. BMC Vet. Res. 11.
14. CHAO L. L., LIU L. L., HO T. Y., SHIH C. M. (2014): First detection and molecular identification of *Borrelia garinii* spirochete from *Ixodes ovatus* tick ectoparasitized on stray cat in Taiwan. PLoS One 9.
15. DIVERS T.J., GARDNER R.B., MADIGAN J.E., WITONSKY S.G., BERTONE J.J., SWINEBROAD E.L., SCHUTZER S.E., JOHNSON A.L. (2018): *Borrelia burgdorferi* Infection and Lyme Disease in North American Horses: A Consensus Statement. J. Vet. Intern. Med. 32, 617–632.
16. DŽELALIJA B., MEDIĆ A., PEM NOVOSEL I., SABLJIĆ S. (2015): Zoonoze u Republici Hrvatskoj. Infektološki glasnik 35, 45-51.
17. ESTRADA-PEÑA A. (2015): Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. Rev. Sci. Tech. 34, 53-65.
18. FANG L.Q., LIU K., LI X.L., LIANG S., YANG Y., YAO H.W., SUN R.X., SUN Y., CHEN W.J., ZUO S.Q., MA M.J., LI H., JIANG J.F., LIU W., YANG X.F., GRAY G.C., KRAUSE P.J., CAO W.C. (2015): Emerging tick-borne infections in mainland China: an increasing public health threat. Lancet Infect. Dis. 15, 1467–1479.
19. GE Y., LI C., CORUM L., SLAUGHTER C.A., CHARON N.W. (1998): Structure and expression of the FlaA periplasmic flagellar protein of *Borrelia burgdorferi*. J. Bacteriol. 180, 2418-2425.
20. GOMEZ-CHAMORRO A., BATTILOTTI F., CAYOL C., MAPPE T., KOSKELA E., BOULANGER N., GENNÉ D., SARR A., VOORDOUW M.J. (2019): Susceptibility to

infection with *Borrelia afzelii* and TLR2 polymorphism in a wild reservoir host. *Sci. Rep.* 9, 6711.

21. GRAUER G.F., BURGESS E.C., COOLEY A.J., HAGEE J.H. (1988): Renal lesions associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193, 237-239.

22. GREENE C.E., STRAUBINGER R.K., LEVY S.A. (2012): *Borreliosis. U: Infectious diseases of the dog and cat; fourth edition.* (Greene C.E.). Elsevier Saunders. St.Louis, Missouri. str. 447-465.

23. GRYCZYŃSKA A., GORTAT T., KOWALEC M. (2018): Urban rodent reservoirs of *Borrelia* spp. in Warsaw, Poland. *Epidemiol. Infect.* 146, 589-593.

24. GUY E.C., STANEK G. (1991): Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Pathol.* 44, 610-611.

25. HANINCOVÁ K., SCHÄFER S.M., ETTI S., SEWELL H.S., TARAGELOVÁ V., ZIAK D., LABUDA M., KURTENBACH K. (2003): Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. *Parasitology* 126, 11-20.

26. HOFMANN H., FINGERLE V., HUNFELD K.P., HUPPERTZ H.I., KRAUSE A., RAUER S., RUF B., CONSENSUS GROUP (2017): Cutaneous Lyme borreliosis: Guideline of the German Dermatology Society. *Ger. Med. Sci.* 15: Doc 14.

27. HUNFELD K.P., RUŽIĆ-SABLJIĆ E., NORRIS D.E., KRAICZY P., STRLE F. (2005): In vitro susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates cultured from patients with erythema migrans before and after antimicrobial chemotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1294-1301.

28. JOHNSTONE L.K., ENGILES J.B., ACETO H., BUECHNER-MAXWELL V., DIVERS T., GARDNER R., LEVINE R., SCHERRER N., TEWARI D., TOMLINSON J., JOHNSON A.L. (2016): Retrospective Evaluation of Horses Diagnosed with Neuroborreliosis on Postmortem Examination: 16 Cases (2004–2015). *J. Vet. Intern. Med.* 30, 1305–1312.

29. KALISH R.A., MCHUGH G., GRANQUIST J., SHEA B., RUTHAZER R., STEERE A.C. (2001): Persistence of immunoglobulin M or immunoglobulin G antibody responses to *Borrelia burgdorferi* 10-20 years after active Lyme disease. *Clin. Infect. Dis.* 33, 780-785.

30. KALMÁR Z., SÁNDOR A.D., MATEI I.A., IONICĂ A., D'AMICO G., GHERMAN C.M., MIHALCA A.D. (2019): *Borrelia* spp. in small mammals in Romania. *Parasit Vectors* 12.
31. KASUMBA I.N., BESTOR A., TILLY K., ROSA P.A. (2016): Virulence of the Lyme disease spirochete before and after the tick bloodmeal: a quantitative assessment. *Parasit. Vectors* 9, 129.
32. KENEDY M.R., LENHART T.R., AKINS D.R. (2012): The Role of *Borrelia burgdorferi* Outer Surface Proteins. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 66, 1-19.
33. KHANAKAH G., KOCIANOVÁ E., VYROSTEKOVÁ V., REHÁČEK J., KUNDI M., STANEK G. (2006): Seasonal variations in detecting *Borrelia burgdorferi* sensu lato in rodents from north eastern Austria. *Wien. Klin. Wochenschr.* 118, 754-758.
34. KILPATRICK A.M., DOBSON A.D.M., LEVI T., SALKELD D.J., SWEI A., GINSBERG H.S., KJEMTRUP A., PADGETT K.A., JENSEN P.M., FISH D., OGDEN N.H., DIUK-WASSER M.A. (2017): Lyme disease ecology in a changing world: consensus, uncertainty and critical gaps for improving control. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 372.
35. KIMSEY R.B., SPIELMAN A. (1990): Motility of Lyme disease spirochetes in fluids as viscous as the extracellular matrix. *J. Infect. Dis.* 162, 1205-1208.
36. KRAJINOVIĆ V., CVETKO KRAJINOVIĆ L. (2018): Krpeljima prenosive bolesti-globalna prijetnja zdravlju. *Medix* 130/131, 332-340.
37. KURTENBACH K., DIZIJ A., SEITZ H.M., MARGOS G., MOTER S.E., KRAMER M.D., WALLICH R., SCHAIBLE U.E., SIMON M.M. (1994): Differential immune responses to *Borrelia burgdorferi* in European wild rodent species influence spirochete transmission to *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae). *Infect. Immun.* 62, 5344-5352.
38. KYBICOVÁ K., KURZOVÁ Z., HULÍNSKÁ D. (2008): Molecular and serological evidence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in wild rodents in the Czech Republic. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8, 645-652.
39. LANE R.S., PIESMAN J., BURGDORFER W. (1991): Lyme borreliosis: relation of its causative agent to its vectors and hosts in North America and Europe. *Annu. Rev. Entomol.* 36, 587-609.

40. LIPOZENČIĆ J., ŠITUM M. (2001): Epidemiology of Lyme disease. *Acta Dermatovenerol. APA.* 10, 125-130.
41. LIPOZENČIĆ J., MARINOVIĆ B. (2005): What should be known about the activity of the Reference Center of the Ministry of Health and Social Welfare of the Republic of Croatia for Diagnosis of Lyme Disease. *Acta Dermatovenerol. Croat.* 13, 81-84.
42. LITTLE S.E., HEISE S.R., BLAGBURN B.L., CALLISTER S.M., MEAD P.S. (2010): Lyme borreliosis in dogs and humans in the USA. *Trends Parasitol.* 26, 213-218.
43. LITTMAN M.P., GOLDSTEIN R.E., LABATO M.A., LAPPIN M.R., MOORE G.E. (2006): ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis, treatment, and prevention. *J. Vet. Intern. Med.* 20, 422-434.
44. LITTMAN M.P., GERBER B., GOLDSTEIN R.E., LABATO M.A., LAPPIN M.R., MOORE G.E. (2018): ACVIM consensus update on Lyme borreliosis in dogs and cats. *J. Vet. Intern. Med.* 32, 887–903.
45. MANNELLI A., BERTOLOTTI L., GERN L., GRAY J. (2012): Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe: transmission dynamics in multi-host systems, influence of molecular processes and effects of climate change. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 837-861.
46. MARETIĆ T. (2008): Erythema Migrans. *Medicus* 17 (2_Sumamed), 71-83.
47. MARQUES A.R. (2015): Laboratory Diagnosis of Lyme Disease - Advances and Challenges. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 29, 295–307.
48. MONIUSZKO-MALINOWSKA A., CZUPRYNA P., DUNAJ J., PANCEWICZ S., GARKOWSKI A., KONDRUSIK M., GRYGORCZUK S., ZAJKOWSKA J. (2018): Acrodermatitis chronica atrophicans: various faces of the late form of Lyme borreliosis. *Postepy Dermatol. Alergol.* 35, 490–494.
49. MYSTERUD A., STIGUM V.M., JAARSMA R.I., SPRONG H. (2019): Genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato detected in 16 mammal species and questing ticks from northern Europe. *Sci. Rep.* 9.

50. NADELMAN R.B., HANINCOVÁ K., MUHKERJEE P., LIVERIS D., NOWAKOWSKI J., MCKENNA D., BRISSON D., COOPER D., BITTKER S., MADISON G., HOLMGREN D., SCHWARTZ I., WORMSER G.P. (2012): Differentiation of Reinfection from Relapse in Recurrent Lyme Disease. *N. Engl. J. Med.* 367, 1883-1890.
51. NORRIS S.J. (2006): Antigenic variation with a twist – the *Borrelia* story. *Mol. Microbiol.* 60, 1319-1322.
52. OSTFELD R.S., BRUNNER J.L. (2015): Climate change and *Ixodes* tick-borne diseases of humans. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 370.
53. PETNEY T.N., HASSLER D., BRÜCKNER M., MAIWALD M. (1996): Comparison of urinary bladder and ear biopsy samples for determining prevalence of *Borrelia burgdorferi* in rodents in central Europe. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1310-1312.
54. RADOLF J.D., CAIMANO M.J., STEVENSON B., HU L.T. (2012): Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 87–99.
55. RIZZOLI A., HAUFFE H.C., CARPI G., VOUREC'H G.I., NETELER M., ROSÀ R. (2011): Lyme borreliosis in Europe. *Euro Surveill.* 16.
56. SCHOTTHOEFER A.M., FROST H.M. (2015): Ecology and Epidemiology of Lyme Borreliosis. *Clin. Lab. Med.* 35, 723-743.
57. SCHWAN T.G., BURGDORFER W., SCHRUMPF M.E., KARSTENS R.H. (1988): The urinary bladder, a consistent source of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). *J. Clin. Microbiol.* 26, 893-895.
58. SCHWAN T.G., PIESMAN J., GOLDE W.T., DOLAN M.C., ROSA P.A. (1995): Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 2909–2913.
59. SEARS K.P., DIVERS T.J., NEFF R.T., MILLER W.H. JR., MCDONOUGH S.P. (2012): A case of *Borrelia*-associated cutaneous pseudolymphoma in a horse. *Vet. Dermatol.* 23, 153-156.

60. STANEK G., FINGERLE V., HUNFELD K.P., JAULHAC B., KAISER R., KRAUSE A., KRISTOFERITSCH W., O'CONNELL S., ORNSTEIN K., STRLE F., GRAY J. (2010): Lyme borreliosis: clinical case definitions for diagnosis and management in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 69-79.
61. STANEK G., WORMSER G.P., GRAY J., STRLE F. (2012): Lyme borreliosis. *Lancet* 379, 461-473.
62. STANEK G. (2018): Lyme borreliosis, ticks and *Borrelia* species. *Wien. Klin. Wochenschr.* 130, 459-462.
63. STANEK G., STRLE F. (2018): Lyme borreliosis-from tick bite to diagnosis and treatment. *FEMS Microbiol. Rev.* 42, 233-258.
64. STEERE A.C., MALAWISTA S.E., SNYDMAN D.R., SHOPE R.E., ANDIMAN W.A., ROSS M.R., STEELE F.M. (1977): Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum.* 20, 7-17.
65. STEERE A.C., BRODERICK T.F., MALAWISTA S.E. (1978): Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: epidemiologic evidence for a tick vector. *Am. J. Epidemiol.* 108, 312-321.
66. STEERE A.C., SIKAND V.K., MEURICE F., PARENTI D.L., FIKRIG E., SCHOEN R.T., NOWAKOWSKI J., SCHMID C.H., LAUKAMP S., BUSCARINO C., KRAUSE D.S. (1998): Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group. *N. Engl. J. Med.* 339, 209-215.
67. STEERE A.C., STRLE F., WORMSER G.P., HU L.T., BRANDA J.A., HOVIUS J.W., LI X., MEAD P.S. (2016): Lyme borreliosis. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2.
68. STONE B.L., TOURAND Y., BRISSETTE C.A. (2017): Brave New Worlds: The Expanding Universe of Lyme Disease. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 17, 619-629.
69. STRLE F., PLETESKI-RIGLER D., STANEK G., PEJOVNIK-PUSTINEK A., RUŽIĆ E., CIMPERMAN J. (1992): Solitary borrelial lymphocytoma: report of 36 cases. *Infection* 20, 201-206.

70. STRNAD M., HÖNIG V., RŮŽEK D., GRUBHOFFER L., REGO R.O.M. (2017): Europe-wide meta-analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato prevalence in questing *Ixodes ricinus* ticks. *Appl Environ Microbiol.* 83.
71. SZEKERES S., COIPAN E. C., RIGÓ K., MAJOROS G., JAHFARI S., SPRONG H., FÖLDVÁRI G. (2015): Eco-epidemiology of *Borrelia miyamotoi* and Lyme borreliosis spirochetes in a popular hunting and recreational forest area in Hungary. *Parasit. Vectors.* 8.
72. ŠITUM M., GRAHOVAC B., MARKOVIĆ S., LIPOZENČIĆ J., POJE G., DOBRIĆ I., MARINOVIĆ B., BOLANCA-BUMBER S., MIŠIĆ-MAJERUS LJ. (2000): Detection and genotyping of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by polymerase chain reaction. *Croat. Med. J.* 41, 47-53.
73. TADIN A., TOKARZ R., MARKOVIĆ A., MARGALETIĆ J., TURK N., HABUŠ J., SVOBODA P., VUCELJA M., DESAI A., JAIN K., LIPKIN W.I. (2016): Molecular Survey of Zoonotic Agents in Rodents and Other Small Mammals in Croatia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94, 466-473.
74. TOKARZ R., KAPOOR V., SAMUEL J.E., BOUYER D.H., BRIESE T., LIPKIN W.I. (2009): Detection of Tick-Borne Pathogens by MassTag Polymerase Chain Reaction. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9, 147-151.
75. TRACY K.E., BAUMGARTH N. (2017): *Borrelia burgdorferi* Manipulates Innate and Adaptive Immunity to Establish Persistence in Rodent Reservoir Hosts. *Front. Immunol.* 8, 116.
76. TURK N., MILAS Z., MARGALETIĆ J., TURK R., BARBIĆ LJ., KONJEVIĆ D., PERIĆ S., ŠTRITOF Z., STAREŠINA V. (2008): The role of fat dormouse (*Glis glis* L.) as reservoir host for spirochete *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the region of Gorski Kotar, Croatia. *Eur. J. Wildl. Res.* 54, 117-121.
77. VASUDEVAN B., CHATTERJEE M. (2013): Lyme Borreliosis and Skin. *Indian J. Dermatol.* 58, 167–174.
78. WANG G., VAN DAM A.P., SCHWARTZ I., DANKERT J. (1999): Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato: Taxonomic, Epidemiological, and Clinical Implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 633-653.

79. ZAWADA S.G., VON FRICKEN M.E., WEPPELMANN T.A., SIKAROODI M., GILLEVET P.M. (2020): Optimization of tissue sampling for *Borrelia burgdorferi* in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). PLoS One 15
80. ZHANG J.R., HARDHAM J.M., BARBOUR A.G., NORRIS S.J. (1997): Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. Cell 89, 275-285.

8. SAŽETAK

Lymska borelioza je bolest endemskih žarišta koja se javlja u ljudi i životinja, a uzrokuju je različite vrste patogenih bakterija unutar kompleksa *B. burgdorferi* s.l. Epizootiološki ciklus Lymske borelioze u prirodi uključuje horizontalni prijenos između vektora i rezervoara. U Europi, glavni vektor je krpelj *Ixodes ricinus*, dok su mišoliki glodavci poznati kao glavni rezervoari ove bakterije. Ciljevi ovog istraživanja bili su utvrditi učestalost infekcije u mišolikih glodavaca u nekoliko endemskih područja Lymske borelioze u RH te utvrditi eventualnu povezanost pojedinih vrsta glodavaca sa određenim vrstama bakterija unutar kompleksa *Borrelia burgdorferi* s.l. Lančanom reakcijom polimerazom pretraženo je 197 uzoraka mokraćnih mjehura mišolikih glodavaca. Korištenjem „touchdown“ PCR metode uz parove početnica koje umnažaju veliki odsječak *flaB* gena nismo uspjeli dokazati prisustvo bakterije *B. burgdorferi* u niti jednom uzorku. Nasumično smo odabrali 20/197 (10 %) uzoraka mokraćnih mjehura te ih ponovno pretražili „touchdown“ PCR metodom korištenjem početnica koje umnažaju mali odsječak *flaB* gena te ugniježđenom PCR metodom korištenjem početnica koje umnažaju odsječak *ospA* gena. Korištenjem oba protokola u dva (10 %) uzoraka mokraćnih mjehura, dokazano je prisustvo bakterije *B. burgdorferi*. Dodatno, pretraženi su i drugi organi pozitivnih glodavaca, a DNK borelije dokazali smo još samo u uškama. S obzirom na broj zabilježenih slučajeva oboljenja ljudi u Hrvatskoj i činjenice da je Lymska borelioza druga najčešća zoonoza u Hrvatskoj, potrebna su daljnja istraživanja na rezervoarima i vektorima bakterije *B. burgdorferi* kako bi se utvrdila stvarna prevalencija bakterija iz kompleksa *B. burgdorferi* s.l. u tih životinja koje su bitne za održavanje enzootskog ciklusa Lymske borelioze unutar RH.

Ključne riječi: Lymska borelioza, mišoliki glodavci, PCR

9. SUMMARY

Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex in small rodents

Lyme borreliosis is an endemic foci disease which occurs in humans and animals and it is caused by various species of pathogenic bacteria within *B. burgdorferi* s.l. complex. The epizootiological cycle of Lyme borreliosis in nature involves horizontal transmission between vectors and reservoirs. In Europe, the major vector is tick *Ixodes ricinus*, while small rodents are known as the major reservoirs of *B. burgdorferi*. The aim of this study was to determine the frequency of infection in small rodents in several endemic areas of Lyme borreliosis in the Republic of Croatia and to determine the possible association of certain rodent species with the particular bacterial species within the *Borrelia burgdorferi* s.l. complex. Polymerase chain reaction was used to test 197 urinary bladder samples of small rodents. All the samples tested negative for the presence of *B. burgdorferi* when using touchdown PCR method and primer pairs targeting the large part of *flaB* gene. We randomly selected 20/197 (10%) urinary bladder samples and tested them again by using touchdown PCR method and primer pairs targeting the small part of *flaB* gene and also by using nested PCR method and primer pairs targeting the *ospA* gene. Two (10%) samples of urinary bladder tested positive for the presence of *B. burgdorferi* when using both protocols. Additionally, other organ samples from both positive rodents were tested and only the samples of ear tissues tested positive for borrelial DNA. Given the number of reported human cases in Croatia and the fact that Lyme borreliosis is the second most common zoonosis in Croatia, further studies on *B. burgdorferi* reservoirs and vectors are needed to determine the real prevalence of bacterial species within *B. burgdorferi* s.l. complex in these animals that are essential for maintaining the enzootic cycle of Lyme borreliosis in the Republic of Croatia.

Key words: Lyme borreliosis, small rodents, PCR

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 13.03.1992. godine u Rijeci. Nakon završetka Osnovne škole Rikard Katalinić Jeretov u Opatiji, 2006. godine upisujem Medicinsku školu u Rijeci, smjer fizioterapeutske tehničar. 2011. godine upisujem Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Za vrijeme studiranja provela sam dvije godine volontirajući na Klinici za zarazne bolesti Veterinarskog fakulteta gdje sam jedan semestar bila demonstrator. Stručno klinički i terenski stručni rad u trajanju od dva mjeseca obavila sam preko programa Erasmus+ u gradu Liegeu u Belgiji na Klinici za konje Veterinarskog fakulteta. Tijekom boravka u New Jerseyu u SAD-u volontirala sam u Veterinarskoj bolnici u Stocktonu. Sudjelovala sam na raznim kongresima i seminarima unutar RH te u inozemstvu.