

Proširenost bakterije *Borrelia miyamotoi* u populaciji mišolikh glodavaca

Simić, Anja

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:178:884781>

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

Anja Simić

**PROŠIRENOST BAKTERIJE *BORRELIA*
MIYAMOTOI U POPULACIJI MIŠOLIKIH
GLODAVACA**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Predstojnik: prof. dr. sc. Zoran Milas

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Zrinka Štritof

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

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

Ovim putem zahvaljujem svima koji su pomogli u izradi ovog diplomskog rada, posebno svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Zrinki Štritof na pomoći i savjetima pri izradi diplomskog rada te na korektnom, profesionalnom i ljubaznom odnosu.

Zahvaljujem dr. sc. Vesni Mojčec Perko, dipl.ing.mol.biol. na velikoj pomoći prilikom izvođenja praktičnog dijela rada.

Mojoj obitelji i prijateljima hvala na strpljenju, savjetima i potpori za sve vrijeme studiranja.

Hvala mojem Andreju na neizmjernoj potpori i motivaciji u teškim trenucima.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA	2
2.1. Etiologija	2
2.2. Epizootiologija.....	3
2.3. Patogeneza	5
2.4. Klinička slika	5
2.5. Dijagnostika	6
2.6. Liječenje	8
2.7. Profilaksa	9
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1. Obrada uzoraka	10
3.2. Izdvajanje deoksiribonukleinske kiseline (DNK) iz tkiva slezene	11
3.3. Lančana reakcija polimerazom („Touchdown“ PCR).....	12
3.4. Agarozna elektroforeza	14
4. REZULTATI.....	15
4.1. Istraživana populacija mišolikih glodavaca	15
4.2. Utvrđivanje prisutnosti dijela flaB gena za flagelin bakterije <i>Borrelia miyamotoi</i>	16
5. RASPRAVA	20
6. ZAKLJUČCI.....	22
7. LITERATURA.....	23
8. SAŽETAK	32
9. SUMMARY.....	33
10. ŽIVOTOPIS	34

Popis kratica

Vmps (engl. variable membrane proteins) – promjenjivi membranski proteini

IgM – imunoglobulin M

EM (engl. erythema migrans) – migrirajući eritem

PCR (engl. polymerase chain reaction) – lančana reakcija polimerazom

BSK - Barbour-Stoenner-Kelly hranjiva podloga

MKP – modificirana Kelly-Pettenkofer hranjiva podloga

ELISA (engl. enzyme linked immunosorbent assay) – imunoenzimni test

GlpQ - glicerofosfodiester-fosfodiesteraza

JHR - Jarisch-Herxheimerova reakcija

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

TD-PCR – Touchdown PCR

TAE – Tris Acetatni EDTA (etilen-diamin-tetraoctena kiselina) pufer

Popis slika

Slika 1. Mjesta izlova mišolikih glodavaca.

Slika 2. Vizualizacija pozitivnih PCR uzoraka u 1% agaroznom gelu pomoću UV svjetla.

Popis tablica

Tablica 1. Broj uzorkovanih životinja i datum uzorkovanja prema lokalitetu.

Tablica 2. Nukleotidni sastav početnica korištenih u PCR reakciji.

Tablica 3. Prikaz sastavnica smjese za PCR reakciju.

Tablica 4. Prikaz temperatura i vremenskog trajanja pojedinih koraka PCR reakcije.

Tablica 5. Uzorci kod kojih je utvrđena prisutnost dijela *flaB* gena za flagelin bakterije *Borrelia miyamotoi* iz slezene mišolikih glodavaca.

Popis grafikona

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

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

Grafikon 3. Zastupljenost pozitivnih uzoraka po lokalitetima.

Grafikon 4. Udio pozitivnih životinja u ukupnom broju ulovljenih životinja po pojedinim lokalitetima.

Grafikon 5. Zastupljenost pojedinih vrsta mišolikih glodavaca u ukupnom broju pozitivnih uzoraka.

Grafikon 6. Udio pozitivnih životinja u ukupnom broju ulovljenih životinja po pojedinim vrstama.

1. UVOD

Borrelia miyamotoi emergentni je bakterijski patogen, a pripada skupini spiroheta uzročnika povratnih vrućica u ljudi (WORMSER i sur., 2019.). Unatoč činjenici da najčešće uzrokuje blaže simptome slične gripi, kod imunokompromitiranih pojedinaca može uzrokovati teške neurološke simptome (HOVIUS i sur., 2013., GUGLIOTTA i sur., 2013., BODEN i sur., 2016., HENNINGSSON i sur., 2019.). Na ljude i životinje prenosi se krpeljima iz porodice *Ixodidae*, jednako kao i srodna bakterija *Borrelia burgdorferi*, uzročnik lajmske borelioze (WORMSER i sur., 2019.). Osim horizontalno, ova bakterija prenosi se i vertikalno, odnosno transovarijalno, međutim, vertikalni prijenos je nedovoljno uspješan i omogućuje prijenos bakterije *B. miyamotoi* u samo nekoliko uzastopnih generacija krpelja. Iz tog razloga, infekcija raznih vrsta kralježnjaka važna je u životnom ciklusu ove spirohete te oni predstavljaju kompetentne rezervoare (BARBOUR i sur., 2009.). Glavni rezervoari su mišoliki glodavci (BURRI i sur., 2014., COSSON i sur., 2014., HAMŠÍKOVÁ i sur., 2017., WAGEMAKERS i sur., 2017.). Dosadašnja istraživanja diljem Europe ukazala su na širok raspon prevalencije ove bakterije u mišolikih glodavaca, ovisno o lokaciji i metodama dijagnostike i prikupljanja uzoraka (CERAR i sur., 2015.). Zbog velike biološke raznolikosti šuma i velike populacije glodavaca, Hrvatska se smatra žarištem krpeljima prenosivih zaraznih bolesti (TADIN i sur., 2016.).

Podaci o proširenosti bakterije *B. miyamotoi* u RH i samim time stupnju izloženosti ljudi infekciji su prilično oskudni, stoga je cilj ovog istraživanja odrediti proširenost bakterije *B. miyamotoi* u populaciji glodavaca u različitim područjima Republike Hrvatske.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Etiologija

Bakterija *Borrelia miyamotoi* izolirana je iz krpelja vrste *Ixodes persulcatus* i opisana prvi puta 1995. godine u Japanu (FUKUNAGA i sur., 1995.). Pripada redu *Spirochaetes*, porodici *Spirochaetaceae* i rodu *Borrelia*. Bakterije iz roda *Borrelia* spiralnog su oblika, širine 0,2-3 μm i duljine 3-180 μm , a na krajevima nemaju kukice. Gibanje im omogućuju periplazmatske flagele. Mikroaerofilne su te koriste ugljikohidrate ili aminokiseline kao izvore ugljika i energije (GUPTA i sur., 2013.). Kao i druge vrste iz roda *Borrelia*, vrsta *B. miyamotoi* ima složeni genom koji se sastoji od linearnog kromosoma i linearnih i cirkularnih plazmida (KULESHOV i sur., 2020.).

Rod *Borrelia* čine dvije velike skupine (BARBOUR, 2014.). Prvu skupinu čini *Borrelia burgdorferi* sensu lato kompleks (*B. burgdorferi* s.l.), koji se sastoji od više od 20 vrsta, pet ih je patogeno za ljude (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. bavariensis* i *B. spielmanii*), a prenose ih tvrdi krpelji iz porodice *Ixodidae* (JUNGNICK i sur., 2015.). Drugu skupinu čine borelije uzročnici povratnih vrućica, a većinu vrsta, kao što su *B. hermsii*, *B. turicatae*, *B. parkeri* i *B. duttonii*, prenose meki krpelji iz porodice *Argasidae*. (BARBOUR, 2014.). Posebnu skupinu čine borelije uzročnici povratnih vrućica, prenošene krpeljima iz porodice *Ixodidae* te u nju ubrajamo *B. miyamotoi*, zajedno sa *B. theileri* i *B. lonestari*. (BARBOUR i sur., 2009.).

Donedavno, znanstvenici su smatrali da se *B. miyamotoi* dijeli na tri geografski odvojena genotipa: azijski (sibirski), europski i američki (MUKHACHEVA i sur., 2015.). Međutim, daljnjim istraživanjima ustanovljena je sve veća raznolikost unutar vrste. Uočeno je variranje DNK sekvenci unutar azijskog i američkog genotipa, a opisan je i potencijalni četvrti genotip u Japanu (IWABU-ITOH i sur., 2017., COOK i sur., 2016.). Također je primijećeno i geografsko preklapanje sojeva koji pripadaju različitim genotipovima bakterije *B. miyamotoi*, primjerice azijski i europski genotip uočeni su u Estoniji (GELLER i sur., 2012.).

Bakteriju *B. miyamotoi* nalazimo uzduž sjeverne Zemljine polutke. Smatrana je apatogenom bakterijom do 2011. godine, kada su zabilježeni prvi slučajevi zaraze ljudi u Rusiji (PLATONOV i sur., 2011.). Zapažena je i u Kanadi (DIBERNARDO i sur., 2014.),

Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), raznim državama Europe i Japanu (SINŠKI i sur., 2016.).

2.2. Epizootiologija

Krpelji, osim što su vektori, također su i rezervoari bakterije *B. miyamotoi*. Do te spoznaje došlo se pronalaskom ove bakterije u nehranjenih larvi krpelja, što dokazuje postojanje transovarijalnog, odnosno vertikalnog prijenosa uz uobičajeni horizontalni prijenos. To je u suprotnosti sa širenjem bakterija iz kompleksa *B. burgdorferi* s.l., pri čemu infekcija nastaje uglavnom horizontalnim prijenosom, odnosno hranjenjem. Međutim, vertikalni prijenos je nedovoljno uspješan i omogućuje prijenos bakterije *B. miyamotoi* u samo nekoliko uzastopnih generacija krpelja. Iz tog razloga, infekcija raznih vrsta kralježnjaka važna je u životnom ciklusu ove spirohete te oni predstavljaju kompetentne rezervoare (BARBOUR i sur., 2009.). Glavni rezervoari su mišoliki glodavci, odnosno miševi (*Apodemus* spp. i *Peromyscus* spp.), voluharice (*Myodes* spp. i *Microtus* spp.) i rovke (*Sorex* spp.) (BURRI i sur., 2014., COSSON i sur., 2014., HAMŠÍKOVÁ i sur., 2017., WAGEMAKERS i sur., 2017.). *B. miyamotoi* opisana je u Republici Hrvatskoj u mišolikih glodavaca, tj. u poljskog miša (*Apodemus agrarius*), žutogrlog miša (*Apodemus flavicollis*) i šumske rovke (*Sorex araneus*), s prevalencijom od 3,7% u navedenih vrsta (TADIN i sur., 2016). Dokazana je u središnjem dijelu RH na području Ivanić-Grada, te na krajnjem istoku RH na lokalitetima Mikanovci, Cerna i Ilok (TADIN i sur., 2016.). Osim toga, utvrđeno je da su rezervoari i vjeverice (*Sciurus* spp.) (RUYTS i sur., 2017., SZEKERES i sur., 2019.), europski jež (*Erinaceus europaeus*) (JAHFARI i sur., 2017.) te razne vrste ptica pjevica (*Passeriformes* spp.) (HAMER i sur., 2012., WAGEMAKERS i sur., 2017., HEYLEN i sur., 2017.). Prvi pronalazak bakterije *B. miyamotoi* u ptica opisan je u istraživanju u državi Tennessee (SAD), gdje je ova bakterija izolirana iz velikog broja uzoraka tkiva i krvi divljih purana (*Meleagris gallopavo*), s prevalencijom od 58% unutar ove vrste. Međutim, nije izolirana iz krpelja koji su infestirali purane, tako da su mehanizmi prijenosa bakterije u ovom slučaju nepoznati (SCOTT i sur., 2011.). Mehanizmi prijenosa i epizootiološki značaj nepoznati su i u slučaju velikih kralježnjaka, od kojih su kao vektori za bakteriju *B. miyamotoi* dokazani divlja svinja (*Sus scrofa*) i srna (*Capreolus capreolus*) (WODECKA i sur., 2014.).

Dosadašnjim istraživanjima, *B. miyamotoi* dokazana je u različitim vrsta krpelja iz roda *Ixodes*. U Aziji i istočnom dijelu Europe najčešće je dokazana u krpelja vrste *I. persulcatus*, u Sjevernoj Americi u krpelja vrste *I. pacificus* i *I. scapularis*, a u Europi u krpelja vrste *I. ricinus* (KULESHOV i sur., 2020.). Populacija krpelja vrste *I. ricinus* najgušća je u raznim predjelima kontinentalne Republike Hrvatske (KRČMAR, 2012., KRČMAR, 2019., MULIĆ i sur., 2016.). Primarno stanište su listopadne ili mješovite šume, a ne zauzima otvorena staništa i homogene mlade crnogorične šume (PAUL i sur., 2016., ESTRADA-PEÑA, 2001.). Za razvoj i preživljavanje u okolini, krpeljima je potrebna vlažnost, stoga se ovi krpelji u RH na otocima i obalnom području mogu naći većinom u hladnijoj sezoni s višom razinom oborina. Primorsko područje i otoci sjevernog dijela jadranske obale gušće su prekriveni šumom i ostalom vegetacijom, pa je i gustoća krpelja u sjevernom obalnom dijelu veća nego u južnom (MULIĆ i sur., 2006.). Na gustoću populacije krpelja utjecaj ima i gustoća populacije rezervoara, poglavito mišolikih glodavaca (PAUL i sur., 2016.). Na gustoću populacije mišolikih glodavaca utječu različiti čimbenici, poput gustoće populacije predatora, meteoroloških uvjeta, biljnog pokrova i dostupnosti hrane. Veća dostupnost žira povećava duljinu rasplodne sezone i olakšava preživljavanje mišolikih glodavaca zimi, što rezultira većom gustoćom populacije sljedećeg proljeća (HOFMEESTER i sur., 2017., BOGDZIEWICZ i sur., 2016., CLOTFELTER i sur., 2007.).

Bolest uzrokovana bakterijom *B. miyamotoi* širi se ugrizom krpelja. Dosadašnjim istraživanjima potvrđena je njena prisutnost u žlijezdama slinovnicama krpelja, a u eksperimentalnim uvjetima je dokazano da je postotak prijenosa ove bakterije 10% u prvih 24 sata nakon što je krpelj pričvršćen na životinju, 31% za 48 sati i 63% za 72 sata. Za razliku od infekcije ovom bakterijom, za infekciju bakterijama iz kompleksa *B. burgdorferi* s.l. potrebno je više od jednog dana, koliko traje da bi bakterije migrirale iz srednjeg crijeva u žlijezde slinovnice krpelja (BREUNER i sur., 2017., DES VIGNES i sur., 2001.). U eksperimentalnim uvjetima, istovjetnim onima za skladištenje krvi i krvnih pripravaka za transfuziju, dokazana je sposobnost preživljavanja bakterije *B. miyamotoi*, pa se pretpostavlja da je transfuzija krvi mogući faktor rizika za prijenos ove spirohete (THORP i TONNETTI, 2016.).

U dosadašnjim istraživanjima, *B. miyamotoi* prepoznata je kao ljudski patogen (CUTLER i sur., 2019.). Dokazana je i u mačaka te krpelja pričvršćenih na psima i domaćim preživačima (govedima i kozama), ali klinički značaj u životinja još je nedovoljno istražen (SHANNON i sur., 2017., NAMINA i sur., 2019., RICHTER i MATUSCHKA, 2010.).

2.3. Patogeneza

Tijekom hranjenja krpelja, *B. miyamotoi* dospjeva u krvotok domaćina. Posjeduje različite mehanizme koji omogućuju njezinu postojanost u domaćinu, a samo neki od njih su do danas istraženi. Dokazano je da posjeduje promjenjive membranske proteine (Vmps) koji omogućuju recidiv kliničkih znakova pomoću antigenih varijacija. Ekspresijom određenih polimorfnih gena, određen je imunodominantni antigen (Vmp) na kojeg djeluju specifična protutijela, što rezultira smanjenjem količine spiroheta u krvi. Preostale spirohete imaju eksprimirane druge, nedominantne Vmp antigene, pa dokle god domaćin ne razvije učinkovit imunski odgovor na njih, ponovno raste količina spiroheta u krvi. Ovaj ciklus rezultira karakterističnim simptomima povratne vrućice (STONE i BRISSETTE, 2017.). Ova borelija također posjeduje membranske proteine koji imaju sposobnost vezanja faktora H i srodnih proteina u ljudskom tijelu, čime dolazi do inhibicije komplemantom posredovanog imunskog odgovora domaćina (RÖTTGERDING i sur., 2017.). Mehanizmi preživljavanja ove bakterije u središnjem živčanom sustavu, kod uglavnom imunokompromitiranih ljudi, relativno su neistraženi. Može se djelomično objasniti činjenicom da su svi istraženi imunokompromitirani pacijenti sa simptomima meningoencefalitisa prethodno bili tretirani imunosupresivnim lijekom, koji smanjuje koncentraciju imunoglobulin M (IgM) protutijela uništavajući B-limfocite. Međutim, prisutnost određenih nepoznatih inhibitora komplemента može doprinijeti razvoju infekcije (STONE i BRISSETTE, 2017.).

2.4. Klinička slika

Kako je ranije navedeno, *B. miyamotoi* može uzrokovati kliničke simptome kod ljudi. Kod imunokompetentnih ljudi javljaju se blaži simptomi, slični gripu, kao što su vrućica, tresavica, glavobolja, umor, malaksalost, mialgija, artralgijska, anoreksija, mučnina/povraćanje, a zabilježene su i limfadenopatija te vrtoglavica. Iako *B. miyamotoi* pripada skupini spiroheta uzročnika povratnih vrućica, slučajevi s karakterističnim ponavljajućim febrilnim epizodama koje se izmjenjuju s afebrilnim razdobljima opisani su tek sporadično, no moguće da je to posljedica tretiranja pacijenata antimikrobnim pripravcima u ranoj fazi bolesti (CUTLER i sur., 2019.).

Promjene na koži u obliku osipa (engl. erythema migrans, EM) smatraju se posljedicom istovremene infekcije s nekom od bakterija iz *Borrelia burgdorferi* s.l. kompleksa, koje tipično uzrokuju ovu vrstu kožnih promjena. Ovu pretpostavku znanstvenici objašnjavaju slabom osjetljivošću molekularne metode, lančane reakcije polimerazom (PCR) za otkrivanje lajmske bolesti iz uzoraka krvi, s obzirom na malu količinu navedenih bakterija u krvi, a veću količinu u koži, za vrijeme akutne infekcije (KARAN i sur., 2018.).

Kod imunokompromitiranih pojedinaca javlja se većinom neurološki oblik bolesti. U tim slučajevima tijekom bolesti uglavnom je polagan i progredira kroz nekoliko mjeseci. Mogu se javiti simptomi meningoencefalitisa i meningitisa poput gubitka koncentracije i pamćenja, poremećaja sluha i kretanja, vrtoglavice, glavobolje i ukočenosti vrata, a zabilježen je i jedan slučaj meningitisa kod imunokompetentne osobe (HOVIUS i sur., 2013., GUGLIOTTA i sur., 2013., BODEN i sur., 2016., HENNINGSSON i sur., 2019.).

Unatoč tome što je *Borrelia miyamotoi* dokazana u mačaka te krpelja pričvršćenih na psima i domaćim preživačima (govedima i kozama), do danas nema zabilježenih simptomatskih slučajeva u životinja (SHANNON i sur., 2017., NAMINA i sur., 2019., RICHTER i MATUSCHKA, 2010.).

2.5. Dijagnostika

Za postavljanje sumnje na bolest uzrokovanu bakterijom *B. miyamotoi*, značajni su anamnestički podaci. Tu ubrajamo ugrize krpelja kod ljudi koji imaju nespecifične kliničke simptome, udružene s vrućicom i nepoznate etiologije, a visoko rizične skupine su lovci, šumari i planinari (JAHFARI i sur., 2014., SZEKERES i sur., 2015.). U tim slučajevima moguće je naći leukopeniju i trombocitopeniju u krvi, a u cerebrospinalnom likvoru povećanu količinu proteina. Za postavljanje objektivne dijagnoze potrebno je dokazati uzročnika mikrobiološkim ili molekularnim metodama, a moguće je dokazati i specifična protutijela serološkim metodama dijagnostike (CUTLER i sur., 2019.).

Za uzgoj bakterije *B. miyamotoi* potrebno je koristiti složene tekuće hranjive podloge. Komercijalno dostupna modificirana Barbour-Stoenner-Kelly hranjiva podloga (BSK-H), često korištena za uzgoj bakterija iz kompleksa *B. burgdorferi* s.l., nije pogodna za uzgoj ove bakterije (BORGOKOV i sur., 2011.). Iz tog razloga, u ovu svrhu uspješno je korištena

varijacija Barbour-Stoenner-Kelly hranjive podloge (BSK-M), koja poput BSK-H podloge sadrži kunići serum, no drugačijeg je sastava (TAKANO i sur., 2014.). Moguće je koristiti i modificiranu Kelly-Pettenkofer hranjivu podlogu (MKP), obogaćenu serumom goveđeg fetusa (WAGEMAKERS i sur., 2014.), ili ljudskim serumom (MARGOS i sur., 2015.).

U akutnoj fazi infekcije, uzročnika je moguće dokazati u krvi i cerebrospinalnom likvoru mikroskopijom i pomoću PCR metode. Od četvrtog dana bolesti znatno pada uspješnost ovih metoda, usporedno sa smanjenjem količine uzročnika u krvi (KARAN i sur., 2018.). Za poboljšanje dijagnostičke osjetljivosti vezane uz mikroskopiju, u dosadašnjim istraživanjima navode se korištenje mikroskopa s tamnim vidnim poljem, imunofluorescencija i bojenje preparata specifičnim bojama (akridin-narančasta boja i bojenje po Giemsi) (GUGLIOTTA i sur., 2013., HOVIUS i sur., 2013., BODEN i sur., 2016.). PCR metode temelje se na dokazivanju prisutnosti dijelova gena, najčešće *flaB* gena za flagelin, *glpQ* gena za *glicerofosfodiester*-fosfodiesterazu, 16S rRNK gena, ili dijela 5S-16/23S rRNK intergenske regije (razmaknice) (WAGEMAKERS i sur., 2015.).

Za detekciju protutijela u serumu moguće je koristiti imunoenzimni test (ELISA), a Western blot (imunoblot) kao potvrdu rezultata prethodne metode (SINŠKI i sur., 2016.). Detektiraju se protutijela na *glicerofosfodiester*-fosfodiesterazu (GlpQ), antigen borelija uzročnika povratnih vrućica, a nemaju ga borelije iz kompleksa *B. burgdorferi* s.l., kao i neki drugi uzročnici krpeljima prenosivih bolesti (vrste iz rodova *Anaplasma*, *Babesia* i *Ehrlichia*) (KRAUSE i sur., 2015.). GlpQ homologni proteini pronađeni su i kod bakterija vrste *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Haemophilus influenzae* i *Escherichia coli*, ali se smatra da je unakrižna reakcija s protutijelima na GlpQ protein bakterije *B. miyamotoi* malo vjerojatna jer im se sekvence dovoljno razlikuju. Unakrižna reakcija između protutijela na GlpQ protein bakterije *B. miyamotoi* i drugih vrsta borelija uzročnika povratnih vrućica je moguća, ali potonje bakterije nisu prenošene krpeljima iz roda *Ixodes*, a često se razlikuju i područja na kojima se javljaju enzootski (KRAUSE i sur., 2015., TELFORD i sur., 2015.). U serološkoj dijagnostici moguće je koristiti i Vmps kao antigen, a posebno dobre rezultate daje korištenje prethodno navedenih antigena zajedno (KROETSVELD i sur., 2018.).

Unatoč svakodnevnom napretku po pitanju otkrivanja pogodnih načina dijagnostike bolesti uzrokovane ovom spirohetom, niti jedna od prethodno navedenih metoda još se uvijek ne primjenjuje u rutinskoj dijagnostici (CUTLER i sur., 2019.).

Diferencijalno dijagnostički moraju se isključiti bolesti kod kojih se javljaju nespecifični simptomi poput vrućice, umora i glavobolje. Tu posebno ubrajamo bolesti prvenstveno prenošene krpeljima iz roda *Ixodes* kao što su lajmska boreliozna, babeziona, anaplazmoza i krpeljni encefalitis, a i neke druge krpeljima prenosive bolesti kao što su povratne vrućice prenošene mekim krpeljima, erlihioza i rikecioze te pojedine bolesti koje se ne prenose krpeljima, kao što je bolest Zapadnog Nila (TELFORD i sur., 2015., KRAUSE i sur., 2015., WAGEMAKERS i sur., 2015.).

2.6. Liječenje

Eksperimentalni podaci o osjetljivosti bakterije *B. miyamotoi* na antibiotike *in vitro* još uvijek su oskudni (KOETSVELD i sur., 2017., KOETSVELD i sur., 2018.). Iz tog razloga se optimalni antibiotici izbora, njihovo doziranje i trajanje liječenja još moraju utvrditi, te se preporuke za liječenje temelje na protokolima liječenja bolesti uzrokovanih drugim vrstama borelija (KRAUSE i sur., 2015., CUTLER i sur., 2019.). Tetraciklini i β -laktami pokazali su se kao najučinkovitije skupine antibiotika u liječenju bolesti uzrokovane bakterijom *B. miyamotoi*. Doksiciklin je najčešće korišten antibiotik u pacijenata s blažim oblikom bolesti. S obzirom na to da je doksiciklin kontraindiciran kod djece mlađe od devet godina, trudnica i dojilja, kao alternativa doksiciklinu može poslužiti amoksicilin. Ceftriakson, cefotaksim i penicilin G učinkoviti su u liječenju pacijenata s meningoencefalitisom (KRAUSE i sur., 2015.).

Kao nuspojava primjene antibiotika u pacijenata inficiranih spirohetama, može se javiti Jarisch-Herxheimerova reakcija (JHR), a kod pacijenata oboljelih od bolesti uzrokovane bakterijom *B. miyamotoi* javlja se relativno rijetko (BUTLER, 2017., PLATONOV i sur., 2011.). Ova pojava javlja se unutar dva sata od početka primjene antibiotika, a unutar osam sati dolazi do povlačenja simptoma. Praćena je otpuštanjem citokina, a od simptoma najčešći su naglo povišenje tjelesne temperature, tresavica, znojenje, tahikardija i hipotenzija. Prognoza je povoljna u većine pacijenata, posebno onih kojima je pružena potporna terapija u obliku tekućinske terapije, te ako je potrebno, lijekova s vazopresivnim učinkom (BUTLER, 2017.).

2.7. Profilaksa

Profilaksa se temelji uglavnom na osobnim zaštitnim mjerama kao što su nošenje prikladne odjeće i obuće tijekom boravka u prirodi (dugi rukavi, nogavice uvučene u čarape, zatvorene cipele), primjena repelenata na kožu i odjeću te tuširanje i pregledavanje tijela nakon boravka u prirodi, a u slučaju da se pronađu krpelji, potrebno ih je što prije ukloniti. Na tržištu postoje razni ektoparazitici koji djeluju protiv krpelja, a namijenjeni su kućnim ljubimcima, pa tako razlikujemo ogrlice, pripravke koji se lokalno apliciraju na kožu i tablete. Kultiviranjem pašnjaka i melioracijskim radovima kao što je krčenje šikara, moguće je suzbiti krpelje u velikom broju jer im se umanjuju uvjeti za razmnožavanje. Primjenom akaricida u okolišu, dio krpelja može se suzbiti, no zbog negativnih učinaka na okoliš i mogućnosti razvoja rezistencije na pojedina kemijska sredstva, rijetko se koriste. Entomopatogene gljivice, koje predstavljaju prirodne neprijatelje krpeljima, prihvatljive su za upotrebu, ali osjetljivije su na okolišne uvjete i kraće im je trajanje učinkovitosti od kemijskih sredstava. Cjepivo za bakteriju *B. miyamotoi*, kao i za druge vrste borelija uzročnika povratnih vrućica, još uvijek nije razvijeno (EISEN i STAFFORD, 2020., TELFORD i sur., 2015., KRAUSE i sur., 2015.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Obrada uzoraka

U ovom istraživanju pretražen je 181 uzorak slezene mišolikih glodavaca izlovljenih na različitim lokacijama u Republici Hrvatskoj tijekom 2017. godine, a uzorci su bili pohranjeni u Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Mišoliki glodavci izlovljeni su u razdoblju od 2. lipnja do 27. listopada 2017. godine, na sedam različitih lokaliteta kontinentalnog dijela Republike Hrvatske koji su uključivali tri županije: Zagrebačku, Koprivničko-križevačku i Sisačko-moslavačku (slika 1).



Slika 1. Mjesta izlova mišolikih glodavaca.

Navedena područja smatraju se endemskim za lajmsku boreliozu (MULIĆ i sur., 2006.), a zbog zajedničkog vektora, velika je vjerojatnost prisutnosti bakterije *B. miyamotoi* na tom području. Detaljan prikaz uzorkovanja naveden je u Tablici 1.

Tablica 1. Broj uzorkovanih životinja i datum uzorkovanja prema lokalitetu.

Županija	Lokalitet	Datum izlova	Broj jedinki (n)
Zagrebačka županija	Šiljakovačka Dubrava	27.10.2017.	7
	Sljeme	12.7.2017.	48
	Velika Gorica	2.6.2017.	10
	Turopoljski lug	27.10.2017.	11
Koprivničko-križevačka županija	Koprivnica	12.10.2017.	8
		13.10.2017.	29
Sisačko-moslavačka županija	Lipovljani	7.6.2017.	19
		26.10.2017.	22
	Lekenik	19.10.2017.	24
		20.10.2017.	3

3.2. Izdvajanje deoksiribonukleinske kiseline (DNK) iz tkiva slezene

DNK iz tkiva slezene mišolikih glodavaca izdvojena je korištenjem komercijalnog kompleta NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Germany), prema uputama proizvođača. Stanična liza u uzorcima odvaganim na 25 mg postignuta je dodavanjem 180 µL pufera T1 i 25 µL enzima proteinaza K. Uzorci su inkubirani preko noći u termomiješalici na temperaturi od 56°C i brzini okretaja od 300 rpm. Za postizanje stanične lize dodano je i 200 µL pufera B3, te su uzorci dodatno inkubirani na 10 minuta, na temperaturi od 70°C. Po inkubaciji, u uzorke je dodano 210 µL otopine 96%-tnog etanola, te su prebačeni u epruvete sa silikagelnim membranama koje služe kako bi se DNK iz uzorka zadržala na membrani. Membrane su isprane s 500 µL pufera BW, a zatim sa 600 µL pufera B5. Za otpuštanje DNK dodano je 100 µL pufera BE. Dobiveni uzorci s cjelokupnom DNK pohranjeni su na temperaturi od -20°C.

3.3. Lančana reakcija polimerazom („Touchdown“ PCR)

Za dokazivanje specifičnih odsječaka DNK bakterije *Borrelia miyamotoi*, uzorci s izdvojenom DNK analizirani su metodom lančane reakcije polimerazom, po takozvanom Touchdown protokolu. „Touchdown“ PCR (TD-PCR) omogućuje umnažanje ciljanih odsječaka DNK kada nije moguće izračunati točnu temperaturu vezanja početnica, čime se povećava specifičnost metode, te veći broj željenih odsječaka u odnosu na ostale odsječke DNK. U prvih nekoliko ciklusa, temperatura vezanja početnica povećava se iznad standardne temperature, čime se dobiva veći broj željenih DNK odsječaka, jer je na višim temperaturama vezanje početnica specifičnije. Nakon toga, temperatura vezanja početnica snižava se za 1°C u svakom idućem ciklusu jer je tada veća šansa vezanja početnica na ciljane odsječke DNK, budući da su tad u suvišku u odnosu na druge odsječke DNK (HECKER i ROUX, 1996.).

Za PCR reakciju u ovom istraživanju korištene su uzvodna i nizvodna početnica koje su specifične za umnažanje dijela gena za flagelin, flaB. Sljedovi baza uzvodne i nizvodne početnice (TOKARZ i sur., 2010.) navedeni su u Tablici 2.

Tablica 2. Nukleotidni sastav početnica korištenih u PCR reakciji.

Specifičnost	Opis početnice	Sljed baza početnice 5'-3'	Veličina PCR proizvoda
flaB gen za flagelin bakterije <i>Borrelia miyamotoi</i>	uzvodna početnica	GCTGAAGAGCTTGGAATGCAAC	114 pb
	nizvodna početnica	GCAATTGCYTCATCCTGATTTG	

Za izvođenje PCR reakcije korišten je komercijalni komplet TaKaRa Taq™ Hot Start Version (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan). Ukupni volumen PCR smjese iznosio je 25 µL, a sastavnice smjese prikazane su u Tablici 3. U PCR reakcijama korištene su pozitivne i negativne kontrole reakcija. Kao pozitivna kontrola korištena je DNK bakterije *B. miyamotoi*, ustupljena u istraživačke svrhe ljubaznošću prof.dr.sc. Alemke Markotić, Klinika za

infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb. Kao negativna kontrola korištena je sterilna voda.

Tablica 3. Prikaz sastavnica smjese za PCR reakciju.

	Volumen (µL) za 1 uzorak
Enzim TaKaRa Taq HC	0,125
10x PCR pufer	2,5
dNTP smjesa	2
Početnica BF2 (10 µM)	0,625
Početnica BR2 (10 µM)	0,625
H2O	18,125
Uzorak DNK	1

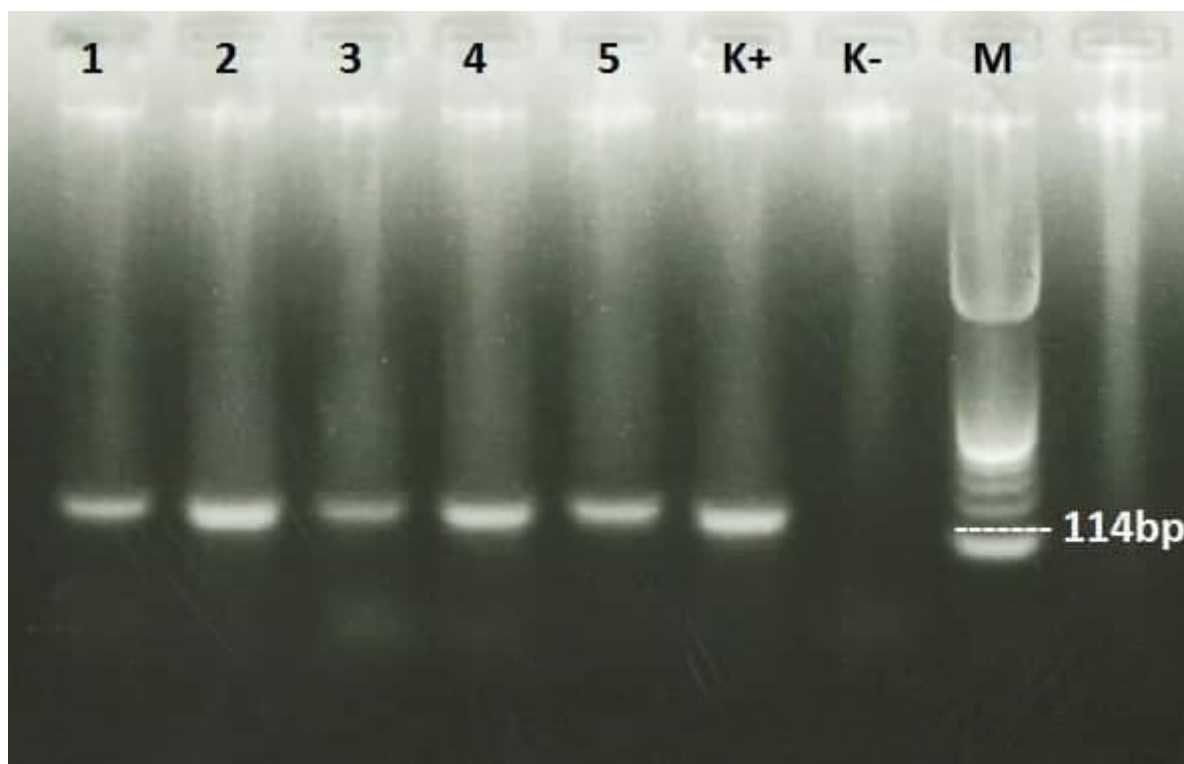
U Tablici 4. su prikazani uvjeti izmjena temperatura i vremensko trajanje pojedinih koraka PCR reakcije (TADIN i sur., 2016.).

Tablica 4. Prikaz temperatura i vremenskog trajanja pojedinih koraka PCR reakcije.

Temperatura (°C)	Vrijeme	Broj ciklusa
94	15 min	1
94	30 s	1
65	30 s	1
72	30 s	1
94	30 s	11 (u svakom ciklusu temperatura vezanja početnica snižava se za 1°C)
65/-1°C	30 s	
72	30 s	
94	30 s	38
54	30 s	
72	30 s	
72	7 min	1
4	∞	1

3.4. Agarozna elektroforeza

Za izvođenje ove metode pripremljen je 1% agarozni gel otapanjem 0,5 g agaroznog praha u 50 ml Tris Acetatnog EDTA (TAE) pufera. U agarozni gel dodano je 3 μ L boje za DNK, Diamond™ Nucleic Acid Dye (Promega, Madison, WI, USA). Gel je izliven u kalup s češljem pomoću kojeg su formirane jažice nakon što se gel hladio 30 minuta. U jažice je otpipetirano po 5 μ L uzorka pomiješanog s 1 μ L bromfenol-plave boje, DNA Loading Buffer, 6x (Lonza, Basel, Switzerland) kako bi se DNK uzorka spustila na dno jažice i omogućila njena vidljivost. Uz ispitivane uzorke, u jažice su dodane pozitivna i negativna kontrola reakcije, te DNK marker, 100 bp DNA Ladder (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). Elektroforeza se provodila u trajanju od 45 minuta, pod 120 V/80 mA, a za vizualizaciju DNK koristila se UV kamera, Gel Doc™ XR+Gel Documentation System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). (Slika 2).



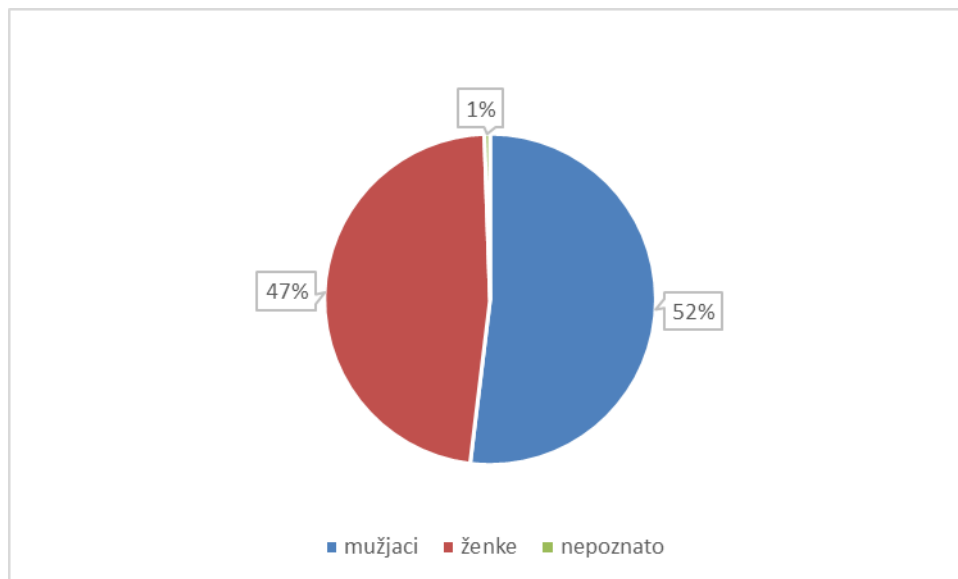
Slika 2. Vizualizacija pozitivnih PCR uzoraka u 1% agaroznom gelu pomoću UV svjetla. Pozitivni uzorci: 1. M-2092, 2. M-2102, 3. M-2103, 4. M-2010, 5. M-2037; K+ je pozitivna kontrola; K- je negativna kontrola; M predstavlja DNK marker, 100 bp.

4. REZULTATI

4.1. Istraživana populacija mišolikih glodavaca

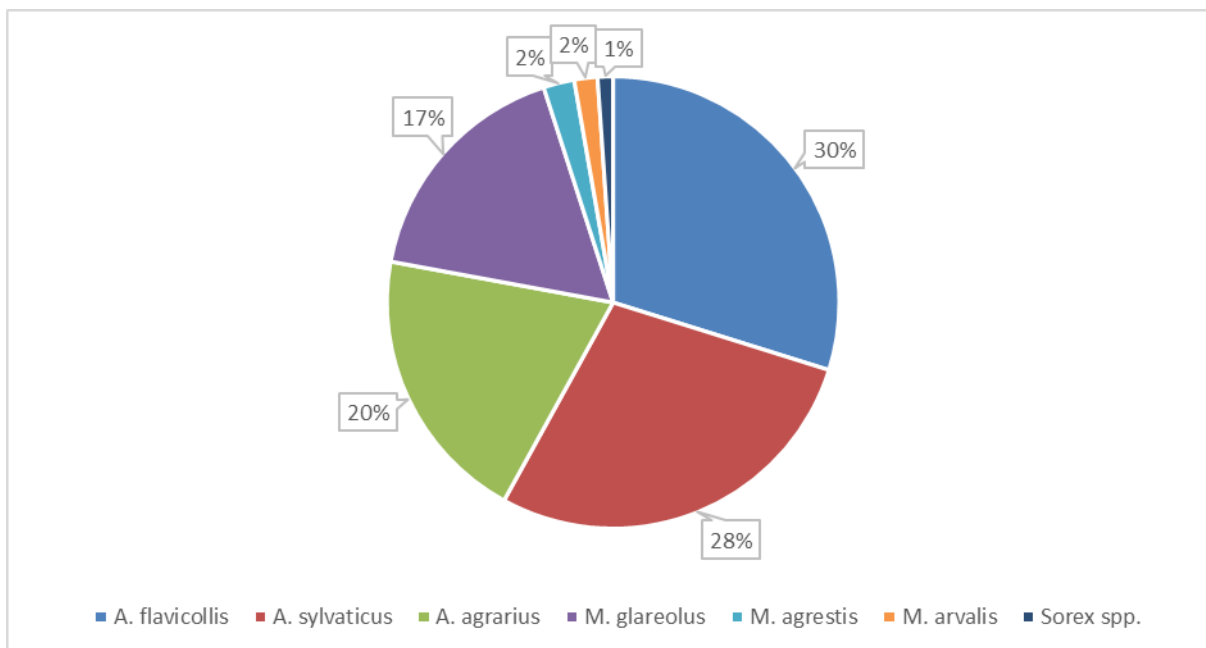
U ovom istraživanju pretražena je 181 genomska DNK izdvojena iz slezene mišolikih glodavaca prikupljenih tijekom petomjesečnog razdoblja (od 2. lipnja do 27. listopada 2017. godine). Mišoliki glodavci su potjecali sa sedam različitih lokacija rasprostranjenih na tri županije kontinentalnog dijela Republike Hrvatske.

Od sveukupnog broja pretraženih životinja, njih 51,9% (94/181) je potjecalo od mužjaka, 47,5% (86/181) od ženki, dok podaci o spolu za jednu životinju nisu poznati (Grafikon 1).



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

Detaljna analiza ispitivanih vrsta mišolikih glodavaca ukazala je na najveću zastupljenost žutogrlog miša (*Apodemus flavicollis*) (29,8% odnosno 54/181), a raspodjela ostalih vrsta je kako slijedi: obični šumski miš (*Apodemus sylvaticus*) (28,2% odnosno 51/181), poljski miš (*Apodemus agrarius*) (19,9% odnosno 36/181), šumska voluharica (*Myodes glareolus*) (17,1% odnosno 31/181), livadna voluharica (*Microtus agrestis*) (2,2% odnosno 4/181), poljska voluharica (*Microtus arvalis*) (1,7% odnosno 3/181) te rovka (*Sorex spp.*) (1,1% odnosno 2/181) (Grafikon 2).



Grafikon 2. Zastupljenost vrsta mišolikih glodavaca unutar sveukupnog broja pretražvanih uzoraka.

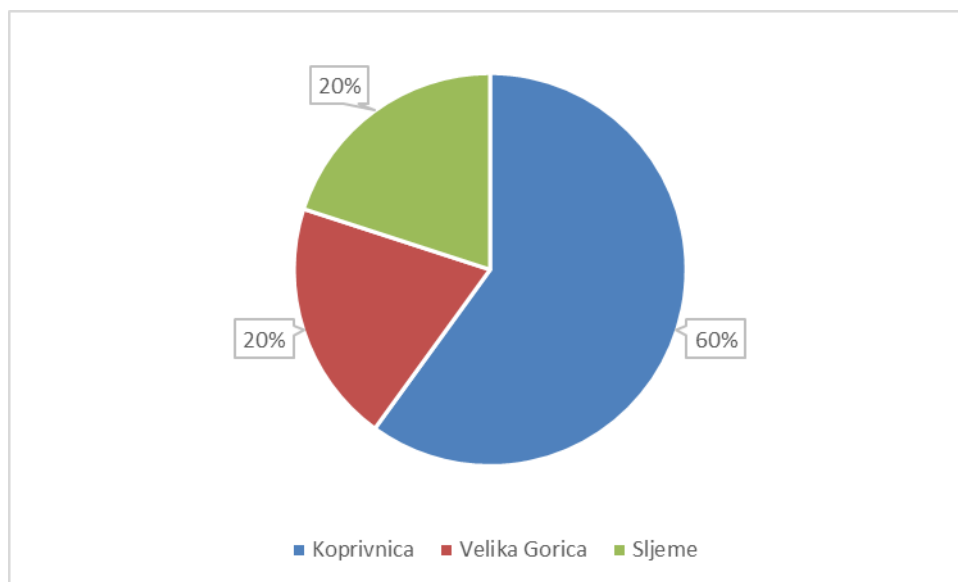
4.2. Utvrđivanje prisutnosti dijela flaB gena za flagelin bakterije *Borrelia miyamotoi*

Prisustvo dijela flaB gena za flagelin bakterije *Borrelia miyamotoi* dokazano je u 2,8% uzoraka (5/181) (Tablica 5).

Tablica 5. Uzorci kod kojih je utvrđena prisutnost dijela flaB gena za flagelin bakterije *Borrelia miyamotoi* iz slezene mišolikih glodavaca.

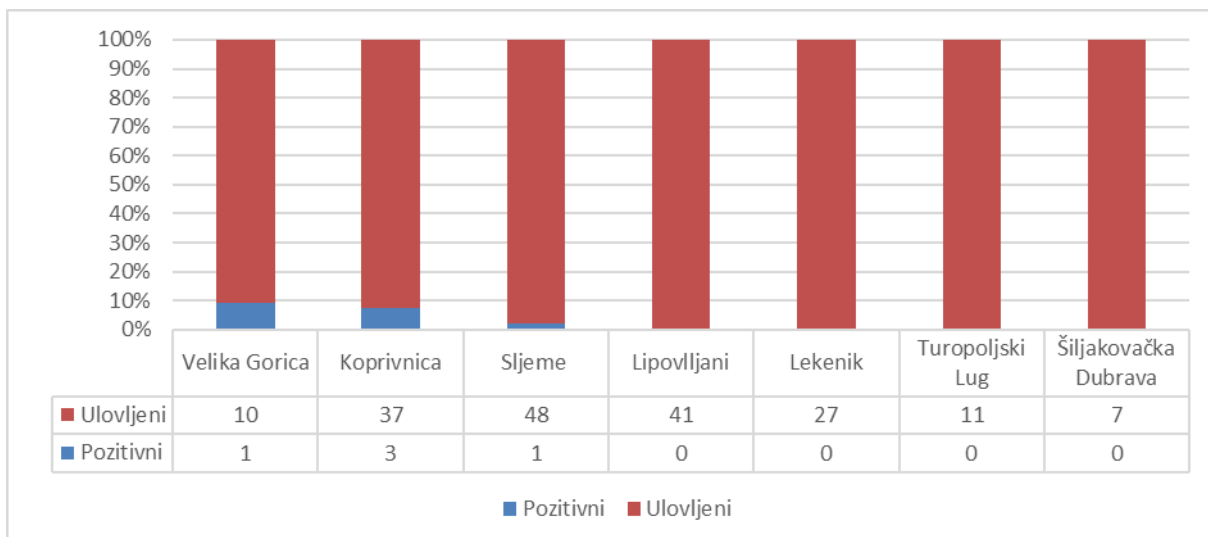
Redni broj	Oznaka uzorka	Vrsta mišolikog glodavca	Mjesto ulova	Spol
1.	M-2010	<i>Apodemus sylvaticus</i>	Velika Gorica	Ž
2.	M-2037	<i>Apodemus sylvaticus</i>	Sljeme	M
3.	M-2092	<i>Apodemus flavicollis</i>	Koprivnica	Ž
4.	M-2102	<i>Apodemus flavicollis</i>	Koprivnica	Ž
5.	M-2103	<i>Apodemus agrarius</i>	Koprivnica	Ž

Od ukupno pet životinja pozitivnih na bakteriju *B. miyamotoi*, tri (60%) su bile iz područja Koprivnice, dok je jedna (20%) bila iz područja Velike Gorice te jedna (20%) iz sljemenskog područja (Grafikon 3).



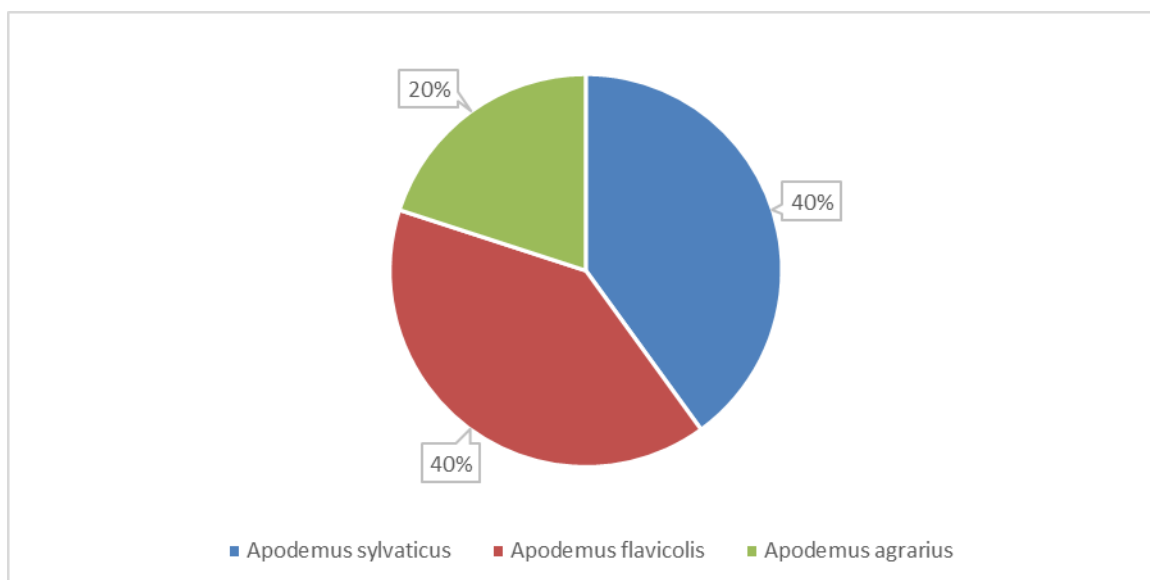
Grafikon 3. Zastupljenost pozitivnih uzoraka po lokalitetima.

Usporedbom broja pozitivnih i ulovljenih životinja, utvrđeno je 10% (1/10) pozitivnih uzoraka u Velikoj Gorici, zatim 8,1% (3/37) u Koprivnici te 2,1% (1/48) na Sljemenu (Grafikon 4).



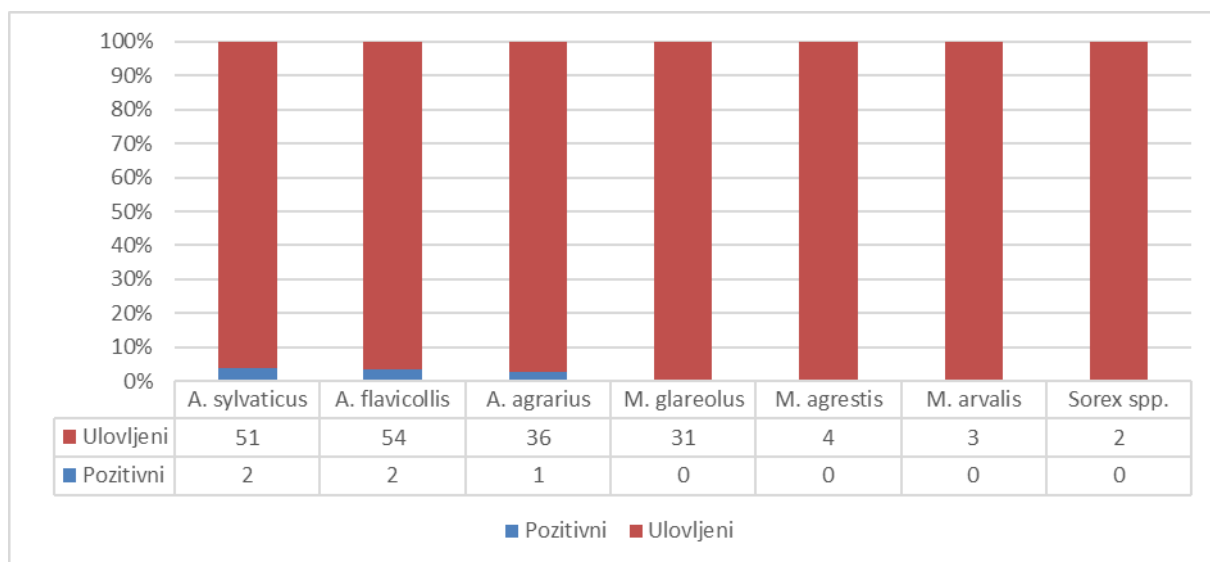
Grafikon 4. Udio pozitivnih životinja u ukupnom broju ulovljenih životinja po pojedinim lokalitetima.

U ovom istraživanju ustanovljen je jednaki broj pozitivnih uzoraka kod običnog šumskog (*A. sylvaticus*) i žutogrlog miša (*A. flavicollis*) i to u 40% slučajeva (2/5), a jedan pozitivan uzorak (20%) ustanovljen je kod poljskog miša (*A. agrarius*) (Grafikon 5).



Grafikon 5. Zastupljenost pojedinih vrsta mišolikih glodavaca u ukupnom broju pozitivnih uzoraka.

Gledajući udio pozitivnih u ukupnom broju ulovljenih životinja, utvrđeno je 3,9% (2/51) pozitivnih uzoraka kod običnog šumskog miša (*A. sylvaticus*), zatim 3,7% (2/54) kod žutogrlog miša (*A. flavicollis*) te 2,8% (1/36) kod poljskog miša (*A. agrarius*) (Grafikon 6).



Grafikon 6. Udio pozitivnih životinja u ukupnom broju ulovljenih životinja po pojedinim vrstama.

5. RASPRAVA

Mišoliki glodavci predstavljaju jedan od najvažnijih izvora krvnog obroka za krpelje. Imaju brzi metabolizam, visoku stopu reprodukcije, relativno veliku tjelesnu površinu u odnosu na tjelesnu težinu i veliku brojnost populacije u prirodnim staništima. Prethodno navedene značajke čine glodavce prikladnim domaćinima za krpelje i također prikladnim rezervoarima za mnoge patogene (SZEKERES i sur., 2015.). Ksenodijagnostikom su pojedini mišoliki glodavci potvrđeni kao kompetentni rezervoari bakterije *B. miyamotoi* (BURRI i sur., 2014.).

U ovom radu prikazana je proširenost bakterije *B. miyamotoi* u populaciji mišolikih glodavaca, izlovljenih na sedam različitih lokaliteta u Republici Hrvatskoj u razdoblju od pet mjeseci. Koristeći se metodom lančane reakcije polimerazom po „Touchdown“ protokolu, 2,8% uzoraka genomske DNK, porijeklom s tri uzorkovana lokaliteta, bilo je pozitivno na bakteriju *B. miyamotoi*. Najviše pozitivnih glodavaca (1,7%) utvrđeno je na području Koprivnice, a od vrsta kod kojih je utvrđeno prisustvo bakterije *B. miyamotoi*, najzastupljenije su bile žutogrli miš (*Apodemus flavicollis*) i obični šumski miš (*Apodemus sylvaticus*) sa prevalencijama od 1,1%. Ovime je prvi puta u Republici Hrvatskoj dokazano prisustvo bakterije *B. miyamotoi* u običnog šumskog miša (*Apodemus sylvaticus*). U Nizozemskoj je u populaciji običnog šumskog miša (*Apodemus sylvaticus*) utvrđena prevalencija od 14% (WAGEMAKERS i sur., 2017.). Prisustvo ove bakterije utvrđeno je i kod poljskog miša (*Apodemus agrarius*) s prevalencijom od 0,6%. TADIN i sur., 2016. su u poljskog miša zabilježili prevalenciju od 13,2%. Dosadašnjim istraživanjima na području Europe utvrđeno je prisustvo bakterije *B. miyamotoi* u rasponu od 0,8 do 9,3% ispitivane populacije žutogrlog miša (*Apodemus flavicollis*). Primjerice, istraživanjem u RH, TADIN i sur., 2016. ustanovili su prisustvo ove bakterije u 0,8% ispitivane populacije žutogrlog miša (*Apodemus flavicollis*), što je slično rezultatima dobivenim ovim istraživanjem. Slični rezultati dobiveni su i istraživanjem u Sloveniji i Mađarskoj gdje su prevalencije iznosile 1,2% i 1,5% (CERAR i sur., 2015., SZEKERES i sur., 2015.). Veća prevalencija u populaciji žutogrlog miša (*Apodemus flavicollis*) utvrđena je u Rumunjskoj i iznosila je 4% (KALMÁR i sur., 2019.), te u Slovačkoj gdje je iznosila 9,3% (HAMIŠÍKOVÁ i sur., 2017.). Za razliku od ovog istraživanja, pojedinim istraživanjima u Europi dokazana je prisutnost bakterije *B. miyamotoi* i u drugih vrsta mišolikih glodavaca kao što su šumska voluharica (*Myodes glareolus*) i to s prevalencijama od 3,1 do 9% (KALMÁR i sur., 2019., HAMIŠÍKOVÁ i sur., 2017.,

COSSON i sur., 2014., WAGEMAKERS i sur., 2017.) te poljska voluharica (*Microtus arvalis*) i rovka (*Sorex spp.*) kod kojih je prisustvo bakterije *B. miyamotoi* utvrđeno u samo jednom uzorku, odnosno u 13% i 16,7% pretražene populacije navedenih vrsta (WAGEMAKERS i sur., 2017., TADIN i sur., 2016.). Razlike u prevalencijama dobivenim ovim i drugim istraživanjima mogu se objasniti različitim metodama prikupljanja uzoraka, količinama uzoraka, lokalitetima i razdobljima u kojima su uzorci prikupljeni te metodama dijagnostike korištenim u svrhu otkrivanja prisustva ove spirohete (CERAR i sur., 2015.), a u nekim slučajevima i razlikama u strukturi vrsta glodavaca obuhvaćenih različitim istraživanjima.

Interakcija patogena, vektora i rezervoara ima ključnu ulogu u pojavi krpeljima prenosivih bolesti. Dokazom bakterije *B. miyamotoi* u mišolikih glodavaca, ovim istraživanjem potvrđena je njihova uloga kao rezervoara ove bakterije u RH. Time se može zaključiti da postoji mogućnost infekcije ljudi bakterijom *B. miyamotoi* na području Republike Hrvatske. Nadalje, krpelji predstavljaju vektore i rezervoare bakterije *B. miyamotoi* (BARBOUR i sur., 2009.). Podaci iz dosadašnjih istraživanja kao što su prevalencija ove bakterije najčešće u rasponu od 0,6 do 5% istraživanih populacija krpelja (CUTLER i sur., 2019.) te učinkovitost prijenosa ove bakterije s krpelja na čovjeka od 8,3% (SARKSYAN i sur., 2015.), mogu doprinijeti procjeni rizika od pojave navedene bolesti. Daljnja istraživanja su neophodna kako bismo u potpunosti razumjeli epizootiološko/epidemiološki ciklus ove bakterije u Republici Hrvatskoj.

6. ZAKLJUČCI

1. Prisustvo bakterije *B. miyamotoi* utvrđeno je u pet jedinki (2,8%) mišolikih glodavaca, izlovljenih na području kontinentalne Hrvatske, što potvrđuje njihovu ulogu kao rezervoara ove bakterije u RH.
2. Po prvi puta u Republici Hrvatskoj, dokazano je prisustvo bakterije *B. miyamotoi* u običnog šumskog miša (*Apodemus sylvaticus*).
3. S obzirom na rezultate dobivene ovim istraživanjem, može se zaključiti da postoji mogućnost infekcije ljudi bakterijom *B. miyamotoi* na području Republike Hrvatske.

7. LITERATURA

BARBOUR, A. G., J. BUNIKIS, B. TRAVINSKY, A. G. HOEN, M. A. DIUK-WASSER, D. FISH, J. I. TSAO (2009): Niche partitioning of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia miyamotoi* in the same tick vector and mammalian reservoir species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81, 1120-1131.

BARBOUR, A. G. (2014): Phylogeny of a relapsing fever *Borrelia* species transmitted by the hard tick *Ixodes scapularis*. *Infect. Genet. Evol.* 27, 551-558.

BODEN, K., S. LOBENSTEIN, B. HERMANN, G. MARGOS, V. FINGERLE (2016): *Borrelia miyamotoi*-Associated Neuroborreliosis in Immunocompromised Person. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 1617-1620.

BOGDZIEWICZ, M., R. ZWOLAK, E. E. CRONE (2016): How do vertebrates respond to mast seeding? *Oikos.* 125, 300–307.

BORGOYAKOV, V.Y., N. V. FOMENKO, V. V. PANOV, E. D. CHIKOVA (2011): Infestation of taiga ticks with borrelias in the territory of Novosibirsk Scientific Center. *Entmol. Rev.* 91, 396–404.

BREUNER, N. E., M. C. DOLAN, A. J. REPLOGLE, C. SEXTON, A. HOJGAARD, K. A. BOEGLER, R. J. CLARK, L. EISEN (2017): Transmission of *Borrelia miyamotoi* sensu lato relapsing fever group spirochetes in relation to duration of attachment by *Ixodes scapularis* nymphs. *Ticks Tick Borne Dis.* 8, 677-681.

BURRI, C., O. SCHUMANN, C. SCHUMANN, L. GERN (2014): Are *Apodemus* spp. mice and *Myodes glareolus* reservoirs for *Borrelia miyamotoi*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, *Rickettsia helvetica*, *R. monacensis* and *Anaplasma phagocytophilum*? *Ticks Tick Borne Dis.* 5, 245-251.

BUTLER, T. (2017): The Jarisch-Herxheimer Reaction After Antibiotic Treatment of Spirochetal Infections: A Review of Recent Cases and Our Understanding of Pathogenesis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 96, 46-52.

CERAR, T., M. KORVA, T. AVŠIČ-ŽUPANC, E. RUŽIĆ-SABLJIĆ (2015): Detection, identification and genotyping of *Borrellia* spp. in rodents in Slovenia by PCR and culture. *BMC Vet. Res.* 11, 188.

CLOTFELTER, E. D., A. B. PEDERSEN, J. A. CRANFORD, N. RAM, E. A. SNAJDR, V. JR NOLAN, E. D. KETTERSON (2007): Acorn mast drives long-term dynamics of rodent and songbird populations. *Oecologia.* 154, 493-503.

COOK, V. J., N. FEDOROVA, W. P. MACDONALD, R. S. LANE, A. G. BARBOUR (2016): Unique Strain of *Borrelia miyamotoi* in *Ixodes pacificus* Ticks, California, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 2205-2207.

COSSON, J. F., L. MICHELET, J. CHOTTE, E. LE NAOUR, M. COTE, E. DEVILLERS, M. L. POULLE, D. HUET, M. GALAN, J. GELLER, S. MOUTAILLER, M. VAYSSIER-TAUSSAT (2014): Genetic characterization of the human relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in vectors and animal reservoirs of Lyme disease spirochetes in France. *Parasit. Vectors.* 7, 233.

CUTLER, S., M. VAYSSIER-TAUSSAT, A. ESTRADA-PEÑA, A. POTKONJAK, A. D. MIHALCA, H. ZELLER (2019): A new *Borrelia* on the block: *Borrelia miyamotoi* - a human health risk? *Euro. Surveill.* 24(18).

DES VIGNES, F., J. PIESMAN, R. HEFFERNAN, T. L. SCHULZE, K. C. III STAFFORD, D. FISH (2001): Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. *J. Infect. Dis.* 183, 773-778.

DIBERNARDO, A., T. COTE, N. H. OGDEN, L. R. LINDSAY (2014): The prevalence of *Borrelia miyamotoi* infection, and co-infections with other *Borrelia* spp. in *Ixodes scapularis* ticks collected in Canada. *Parasit. Vectors.* 7, 183.

EISEN, L., K. C. STAFFORD (2020): Barriers to Effective Tick Management and Tick-Bite Prevention in the United States (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 10, 1-13.

ESTRADA-PEÑA, A. (2001): Distribution, abundance, and habitat preferences of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in northern Spain. *J. Med. Entomol.* 38, 361-370.

FUKUNAGA, M., Y. TAKAHASHI, Y. TSURUTA, O. MATSUSHITA, D. RALPH, M. MCCLELLAND, M. NAKAO (1995): Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 804-810.

GELLER, J., L. NAZAROVA, O. KATARGINA, L. JÄRVEKÜLG, N. FOMENKO, I. GOLOVLJOVA (2012): Detection and genetic characterization of relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in Estonian ticks. *PloS. One.* 7(12).

GUGLIOTTA, J. L., H. K. GOETHERT, V. P. BERARDI, S. R. III TELFORD (2013): Meningoencephalitis from *Borrelia miyamotoi* in an immunocompromised patient. *N. Engl. J. Med.* 368, 240-245.

GUPTA, R. S., S. MAHMOOD, M. ADEOLU (2013): A phylogenomic and molecular signature based approach for characterization of the phylum Spirochaetes and its major clades: proposal for a taxonomic revision of the phylum. *Front. Microbiol.* 4, 217.

HAMER, S. A., G. J. HICKLING, R. KEITH, J. L. SIDGE, E. D. WALKER, J. I. TSAO (2012): Associations of passerine birds, rabbits, and ticks with *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia andersonii* in Michigan, U.S.A. *Parasit. Vectors.* 5, 231.

HAMŠÍKOVÁ, Z., C. COIPAN, L. MAHRÍKOVÁ, L. MINICHOVÁ, H. SPRONG, M. KAZIMÍROVÁ (2017): *Borrelia miyamotoi* and Co-Infection with *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* Ticks and Rodents from Slovakia. *Microb. Ecol.* 73, 1000-1008.

HECKER, K. H., K. H. ROUX (1996): High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques.* 20, 478-485.

HENNINGSSON, A. J., H. ASGEIRSSON, B. HAMMAS, E. KARLSSON, Å. PARKE, D. HOORNSTRA, P. WILHELMSSON, J. W. HOVIUS (2019): Two Cases of *Borrelia miyamotoi* Meningitis, Sweden, 2018. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 1965-1968.

HEYLEN, D., M. FONVILLE, A. DOCTERS VAN LEEUWEN, A. STROO, M. DUISTERWINKEL, S. VAN WIEREN, M. DIUK-WASSER, A. DE BRUIN, H. SPRONG (2017): Pathogen communities of songbird-derived ticks in Europe's low countries. *Parasit. Vectors.* 10, 497.

HOFMEESTER, T. R., P.A. JANSEN, H. J. WIJNEN, E. C. COIPAN, M. FONVILLE, H. H. T. PRINS, H. SPRONG, S. E. VAN WIEREN (2017): Cascading effects of predator activity on tick-borne disease risk. *Proc. Biol. Sci.* 284(1859).

HOVIUS, J. W., B. DE WEVER, M. SOHNE, M. C. BROUWER, J. COUMOU, A. WAGEMAKERS, A. OEI, H. KNOL, S. NARASIMHAN, C. J. HODIAMONT, S. JAHFARI, S. T. PALS, H. M. HORLINGS, E. FIKRIG, H. SPRONG, M. H. J. VAN OERS (2013): A case of meningoencephalitis by the relapsing fever spirochaete *Borrelia miyamotoi* in Europe. *Lancet.* 382, 658.

IWABU-ITOH, Y., B. BAZARTSEREN, O. NARANBAATAR, E. YONDONJAMTS, K. FURUNO, K. LEE, K. SATO, H. KAWABATA, N. TAKADA, M. ANDOH, H. KAJITA, Y. OIKAWA, M. NAKAO, M. OHNISHI, M. WATARAI, H. SHIMODA, K. MAEDA, A. TAKANO (2017): Tick surveillance for *Borrelia miyamotoi* and phylogenetic analysis of isolates in Mongolia and Japan. *Ticks Tick Borne Dis.* 8, 850-857.

JAHFARI, S., T. HERREMANS, A. E. PLATONOV, H. KUIPER, L. S. KARAN, O. VASILIEVA, M. P. G. KOOPMANS, J. W. R. HOVIUS, H. SPRONG (2014): High seroprevalence of *Borrelia miyamotoi* antibodies in forestry workers and individuals suspected of human granulocytic anaplasmosis in the Netherlands. *New Microbes New Infect.* 2, 144-149.

- JAHFARI, S, S. C. RUYTS, E. FRAZER-MENDELEWSKA, R. JAARSMA, K. VERHEYEN, H. SPRONG (2017): Melting pot of tick-borne zoonoses: the European hedgehog contributes to the maintenance of various tick-borne diseases in natural cycles urban and suburban areas. *Parasit. Vectors.* 10, 134.
- JUNGNICK, S., G. MARGOS, M. RIEGER, E. DZAFEROVIC, S. J. BENT, E. OVERZIER, C. SILAGHI, G. WALDER, F. WEX, J. KOLOCZEK, A. SING, V. FINGERLE (2015): *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and *Borrelia afzelii*: Population structure and differential pathogenicity. *Int. J. Med. Microbiol.* 305, 673-681.
- KALMÁR, Z., A. D. SÁNDOR, I. A. MATEI, A. IONICĂ, G. D'AMICO, C. M. GHERMAN, A. D. MIHALCA (2019): *Borrelia* spp. in small mammals in Romania. *Parasit. Vectors.* 12, 461.
- KARAN, L., M. MAKENOV, N. KOLYASNIKOVA, O. STUKOLOVA, M. TOPORKOVA, O. OLENKOVA (2018): Dynamics of Spirochetemia and Early PCR Detection of *Borrelia miyamotoi*. *Emerg. Infect. Dis.* 24, 860-867.
- KOETSVELD, J., R. O. P. DRAGA, A. WAGEMAKERS, A. MANGER, A. OEI, C. E. VISSER, J. W. HOVIUS (2017): *In Vitro* Susceptibility of the Relapsing-Fever Spirochete *Borrelia miyamotoi* to Antimicrobial Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61(9).
- KOETSVELD, J., N. M. KOLYASNIKOVA, A. WAGEMAKERS, O. A. STUKOLOVA, D. HOORNSTRA, D. S. SARKSYAN, M. G. TOPORKOVA, A. J. HENNINGSSON, D. HVIDSTEN, W. ANG, R. DESSAU, A. E. PLATONOV, J. W. HOVIUS (2018): Serodiagnosis of *Borrelia miyamotoi* disease by measuring antibodies against GlpQ and variable major proteins. *Clin. Microbiol. Infect.* 24(12).
- KOETSVELD, J., A. MANGER, D. HOORNSTRA, R. O. DRAGA, A. OEI, N. M. KOLYASNIKOVA, M. G. TOPORKOVA, D. S. SARKSYAN, A. WAGEMAKERS, A. E. PLATONOV, J. W. HOVIUS (2018): *In Vitro* Antimicrobial Susceptibility of Clinical Isolates of *Borrelia miyamotoi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62(7).

KRAUSE, P. J., D. FISH, S. NARASIMHAN, A. G. BARBOUR (2015): *Borrelia miyamotoi* infection in nature and in humans. *Clin. Microbiol. Infect.* 21, 631-639.

KRČMAR, S. (2019): Diversity, ecology, and seasonality of hard ticks (Acari: Ixodidae) in eastern Croatia. *J. Vector Ecol.* 44, 18-29.

KRČMAR, S. (2012): Hard ticks (Acari, Ixodidae) of Croatia. *Zookeys.* 234, 19-57.

KULESHOV, K. V., G. MARGOS, V. FINGERLE, J. KOETSVELD, I. A. GOPTAR, M. L. MARKELOV, N. M. KOLYASNIKOVA, D. S. SARKSYAN, N. P. KIRDYASHKINA, G. A. SHIPULIN, J. V. HOVIUS, A. E. PLATONOV (2020): Whole genome sequencing of *Borrelia miyamotoi* isolate Izh-4: reference for a complex bacterial genome. *BMC Genomics.* 21, 16.

MARGOS, G., S. STOCKMEIER, C. HIZO-TEUFEL, S. HEPNER, D. FISH, H. DAUTEL, A. SING, E. DZAFEROVIC, M. RIEGER, S. JUNGNICK, K. BINDER, R. K. STRAUBINGER, V. FINGERLE (2015): Long-term in vitro cultivation of *Borrelia miyamotoi*. *Ticks Tick Borne Dis.* 6, 181-184.

MUKHACHEVA, T. A., I. I. SALIKHOVA, S. Y. KOVALEV (2015): Multilocus spacer analysis revealed highly homogeneous genetic background of Asian type of *Borrelia miyamotoi*. *Infect. Genet. Evol.* 31, 257-262.

MULIĆ, R., S. ANTONIJEVIĆ, Z. KLISMANIĆ, D. ROPAC, O. LUCEV (2006): Epidemiological characteristics and clinical manifestations of Lyme borreliosis in Croatia. *Mil. Med.* 171, 1105-1109.

NAMINA, A., V. CAPLIGINA, M. SELEZNOVA, R. KRUMINS, D. ALENIKOVA, A. KIVRANE, S. AKOPJANA, M. LAZOVSKA, I. BERZINA, R. RANKA (2019): Tick-borne pathogens in ticks collected from dogs, Latvia, 2011-2016. *BMC Vet. Res.* 15, 398.

PAUL, R. E., M. COTE, E. LE NAOUR, S. I. BONNET (2016): Environmental factors influencing tick densities over seven years in a French suburban forest. *Parasit. Vectors.* 9, 309.

PLATONOV, A. E., L. S. KARAN, N. M. KOLYASNIKOVA, N. A. MAKHNEVA, M. G. TOPORKOVA, V. V. MALEEV, D. FISH, P. J. KRAUSE (2011): Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1816-1823.

RICHTER, D., F. R. MATUSCHKA (2010): Elimination of lyme disease spirochetes from ticks feeding on domestic ruminants. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7650-7652.

RÖTTGERDING, F., A. WAGEMAKERS, J. KOETSVELD, V. FINGERLE, M. KIRSCHFINK, J. W. HOVIUS, P. F. ZIPFEL, R. WALLICH, P. KRAICZY (2017): Immune evasion of *Borrelia miyamotoi*: CbiA, a novel outer surface protein exhibiting complement binding and inactivating properties. *Sci. Rep.* 7, 303.

RUYTS, S.C., E. FRAZER-MENDELEWSKA, K. VAN DEN BERGE, K. VERHEYEN, H. SPRONG (2017): Molecular detection of tick-borne pathogens *Borrelia afzelii*, *Borrelia miyamotoi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*). *Eur. J. Wildl. Res.* 63, 43.

SARKSYAN, D. S., A. E. PLATONOV, L. S. KARAN, G. A. SHIPULIN, H. SPRONG, J. W. HOVIUS (2015): Probability of Spirochete *Borrelia miyamotoi* Transmission from Ticks to Humans. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 2273-2274.

SCOTT, M. C., M. E. ROSEN, S. A. HAMER, E. BAKER, H. EDWARDS, C. CROWDER, J. I. TSAO, G. J. HICKLING (2010): High-prevalence *Borrelia miyamotoi* infection among [corrected] wild turkeys (*Meleagris gallopavo*) in Tennessee. *J. Med. Entomol.* 47, 1238-1242.

SHANNON, A. B., R. RUCINSKY, H. D. GAFF, R. J. BRINKERHOFF (2017): *Borrelia miyamotoi*, Other Vector-Borne Agents in Cat Blood and Ticks in Eastern Maryland. *Ecohealth.* 14, 816-820.

SIŃSKI, E., R. WELC-FAŁĘCIAK, J. ZAJKOWSKA (2016): *Borrelia miyamotoi*: A human tick-borne relapsing fever spirochete in Europe and its potential impact on public health. *Adv. Med. Sci.* 61, 255-260.

STONE, B. L., C. A. BRISSETTE (2017): Host Immune Evasion by Lyme and Relapsing Fever Borreliae: Findings to Lead Future Studies for *Borrelia miyamotoi*. *Front. Immunol.* 8, 12.

SZEKERES, S., E. C. COIPAN, K. RIGÓ, G. MAJOROS, S. JAHFARI, H. SPRONG, G. FÖLDVÁRI (2015): Eco-epidemiology of *Borrelia miyamotoi* and Lyme borreliosis spirochetes in a popular hunting and recreational forest area in Hungary. *Parasit. Vectors.* 8, 309.

SZEKERES, S., A. DOCTERS VAN LEEUWEN, E. TÓTH, G. MAJOROS, H. SPRONG, G. FÖLDVÁRI (2019): Road-killed mammals provide insight into tick-borne bacterial pathogen communities within urban habitats. *Transbound. Emerg. Dis.* 66, 277-286.

TADIN, A., R. TOKARZ, A. MARKOTIĆ, J. MARGALETIĆ, N. TURK, J. HABUŠ, P. SVOBODA, M. VUCELJA, A. DESAI, K. JAIN, W. I. LIPKIN (2016): Molecular Survey of Zoonotic Agents in Rodents and Other Small Mammals in Croatia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94, 466-473.

TAKANO, A., K. TOYOMANE, S. KONNAI, K. OHASHI, M. NAKAO, T. ITO, M. ANDOH, K. MAEDA, M. WATARAI, K. SATO, H. KAWABATA (2014): Tick surveillance for relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* in Hokkaido, Japan. *PLoS One.* 9.

TELFORD, S. R. III, H. K. GOETHERT, P. J. MOLLOY, V. P. BERARDI, H. R. CHOWDRI, J. L. GUGLIOTTA, T. J. LEPORE (2015): *Borrelia miyamotoi* Disease: Neither Lyme Disease Nor Relapsing Fever. *Clin. Lab. Med.* 35, 867-882.

THORP, A. M., L. TONNETTI (2016): Distribution and survival of *Borrelia miyamotoi* in human blood components. *Transfusion.* 56, 705-711.

TOKARZ, R., K. JAIN, A. BENNETT, T. BRIESE, W. I. LIPKIN (2010): Assessment of polymicrobial infections in ticks in New York state. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10, 217-221.

WAGEMAKERS, A., S. JAHFARI, B. DE WEVER, L. SPANJAARD, M. V. STARINK, H. J. C. DE VRIES, H. SPRONG, J. W. HOVIUS (2017): *Borrelia miyamotoi* in vectors and hosts in The Netherlands. *Ticks Tick Borne Dis.* 8, 370-374.

WAGEMAKERS, A., A. OEI, M. M. FIKRIG, W. R. MIELLET, J. W. HOVIUS (2014): The relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi* is cultivable in a modified Kelly-Pettenkofer medium, and is resistant to human complement. *Parasit. Vectors.* 7, 418.

WAGEMAKERS, A., P. J. STAARINK, H. SPRONG, J. W. HOVIUS (2015): *Borrelia miyamotoi*: a widespread tick-borne relapsing fever spirochete. *Trends Parasitol.* 31, 260-269.

WODECKA, B., A. RYMASZEWSKA, B. SKOTARCZAK (2014): Host and pathogen DNA identification in blood meals of nymphal *Ixodes ricinus* ticks from forest parks and rural forests of Poland. *Exp. Appl. Acarol.* 62, 543-555.

WORMSER, G. P., E. D. SHAPIRO, D. FISH (2019): *Borrelia miyamotoi*: An Emerging Tick-Borne Pathogen. *Am. J. Med.* 132, 136-137.

8. SAŽETAK

Proširenost bakterije *Borrelia miyamotoi* u populaciji mišolikih glodavaca

Borrelia miyamotoi emergentni je bakterijski patogen, a pripada skupini spiroheta uzročnika povratnih vrućica u ljudi. Unatoč činjenici da najčešće uzrokuje blaže simptome slične gripi, kod imunokompromitiranih pojedinaca može uzrokovati teške neurološke simptome. Na ljude i životinje prenosi se krpeljima iz porodice *Ixodidae*, a glavne rezervoare ove bakterije predstavljaju mišoliki glodavci. Podaci o proširenosti bakterije *B. miyamotoi* u RH i samim time stupnju izloženosti ljudi infekciji su prilično oskudni, stoga je cilj ovog istraživanja bio odrediti proširenost bakterije *B. miyamotoi* u populaciji glodavaca u različitim područjima Republike Hrvatske. Uzorci tkiva slezene mišolikih glodavaca izlovljenih na sedam lokaliteta u RH, pretraženi su metodom lančane reakcije polimerazom po „Touchdown“ protokolu, a pozitivni rezultati utvrđeni su u 2,8% uzoraka. Ovime je prvi puta u Republici Hrvatskoj dokazano prisustvo bakterije *B. miyamotoi* u običnog šumskog miša (*Apodemus sylvaticus*). Nadalje, prisustvo ove bakterije dokazano je i u žutogrlog (*Apodemus flavicollis*), te poljskog miša (*Apodemus agrarius*), što potvrđuje ulogu miševa kao rezervoara ove spirohete, stoga se može zaključiti da postoji mogućnost infekcije ljudi bakterijom *B. miyamotoi* na području Republike Hrvatske. Daljnja istraživanja su neophodna kako bismo u potpunosti razumjeli epizootiološko/epidemiološki ciklus ove bakterije.

KLJUČNE RIJEČI: *Borrelia miyamotoi*, mišoliki glodavci, krpelji, Hrvatska

9. SUMMARY

Prevalence of *Borrelia miyamotoi* in small rodents

Borrelia miyamotoi, an emergent bacterial pathogen, is a spirochete which causes relapsing fever in humans. Although it most commonly causes mild flu-like symptoms, it can lead to severe neurological symptoms in immunocompromised individuals. It is transmitted to humans and animals by *Ixodes* tick species, whereas its main reservoir is small rodents. Data on the prevalence of *B. miyamotoi* as well as human exposure to infection in the Republic of Croatia are rather scarce, so the aim of this study was to determine the prevalence of *B. miyamotoi* in the rodent population in different parts of Croatia. Samples of spleen obtained from small rodents caught at seven localities in Croatia were examined by using the Touchdown polymerase chain reaction protocol, and positive results were found in 2.8% of the samples. This is the first time that the presence of *B. miyamotoi* was proven in the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) in Croatia. Furthermore, the presence of *B. miyamotoi* was found in the yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*) and the striped field mouse (*Apodemus agrarius*), confirming the role of mice as a reservoir of this spirochete, highlighting the potential for human infection with *B. miyamotoi* in Croatia. Further research is needed to fully understand the epizootiological and the epidemiological cycle of *B. miyamotoi*.

KEY WORDS: *Borrelia miyamotoi*, small rodents, ticks, Croatia

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 5. svibnja 1988. godine u Zagrebu. Srednjoškolsko zvanje stekla sam 2007. godine u Školi za medicinske sestre Mlinarska u Zagrebu. Iste godine upisala sam Studij organizacije, planiranja i upravljanja u zdravstvu na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, a od 2009. godine pohađam Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zbog zanimanja za bolesti kućnih ljubimaca, na petoj godini studija opredijelila sam se za usmjerenje „Kućni ljubimci“ te sam prisustvovala na edukativno-stručnim skupovima i kongresima vezanim uz struku.