

Originalni naučni rad

UDK594.42:616.993(497.113)

NALAZ GENOMA UZROČNIKA ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM U KRPELJIMA SA PODRUČJA VOJVODINE, SRBIJA^{1*}

Aleksandar Potkonjak¹²., Sara Savić², Živoslav Grgić², Branislav Lako¹,
Vuk Vračar¹, Dragana Rajković³, Aleksandar Jurišić³, Aleksandra Petrović³

¹ Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman
za veterinarsku medicinu, Novi Sad, Srbija

² Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad, Srbija

³ Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Departman za fitomedicinu
i zaštitu životne sredine, Novi Sad, Srbija

Kratak sadržaj

Krpelji su vektori za mnoga infektivna oboljenja i predstavljaju stalnu pretnju populaciji ljudi i životinja, naročito kada se radi o zoonozama. Uzročnik granulocitne anaplazmoze *Anaplasma phagocytophilum* je Gram negativna, obligatno intracelularna bakterija koja inficira ljude, kao i različite domaće i divlje životinje. Ovaj uzročnik je rasprostranjen širom sveta, a održava se u prirodi kroz enzootski krug između krpelja i domaćina kičmenjaka. Cilj ovog rada je da se ukaže na rasprostranjenost infekcije krpelja uzročnikom *Anaplasma phagocytophilum* na području Autonomne Pokrajine Vojvodine. Prikupljnje krpelja je obavljeno na 10 lokaliteta u Autonomnoj Pokrajini Vojvodini, Srbija, koji predstavljaju ruralni tip staništa za krpelje. Oni su primenom nested PCR metode pregledani na prisustvo specifične DNK p44/msp2 uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*. Od deset pregledanih pulova krpelja prikupljenih na području Autonomne Pokrajine Vojvodine, primenom PCR metode, u šest pulova dokazano je prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*. U 5 pulova krpelja vrste *Ixodes ricinus* je dokazano je prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*. Ovi krpelji su vodili poreklo sa sledećih lokacija: Institut za topolarstvo (2 lokaliteta), Fruška gora (2 lokaliteta) i Poloj-šuma Bačka

^{1*} Ovo istraživanje je finansirao Pokrajinski sekretarijat za nauku i tehnološki razvoj AP Vojvodine (naziv projekta: Istraživanje lajmske bolesti i drugih vektorski prenosivih zoonoza u Vojvodini, broj projekta: 114-451-1892/2011)

² E-mail: ale@polj.uns.ac.rs

Palanka (1 lokalitet). U jednom pulu krpelja vrste *Dermacentor reticulatus* sa područja Poloj-šuma Bačka Palanka smo dokazali prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*. Kako ova infekcija predstavlja problem u javnom zdravlju, neophodna su šira akarološka i epidemiološko-epizootiološka istraživanja u Autonomnoj Pokrajini Vojvodini.

Ključne reči: krpelji, *Dermacentor reticulatus*, *Ixodes ricinus*, *Anaplasma phagocytophilum*, anaplazmoza, PCR

FINDINGS OF THE *ANAPLASMA PHAGOCYTOPILUM* GENOME IN TICKS FROM VOJVODINA AREA, SERBIA

Aleksandar Potkonjak¹, Sara Savić², Živoslav Grgić², Branislav Lako¹,
Vuk Vračar¹, Dragana Rajković³, Aleksandar Jurišić³, Aleksandra Petrović³

¹ University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department of Veterinary Medicine,
Novi Sad, Serbia

² Scientific Veterinary Institute „Novi Sad“, Novi Sad, Serbia

³ University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Department
of Environmental and Plant Protection

Abstra cts

Ticks are vectors for many infectious diseases and represent a constant threat to human population and other animals, especially with respect to zoonoses. The cause of granulocyte anaplasmosis *Anaplasma phagocytophilum* is a gram-negative, obligate intracellular bacterium that infects people as well as various domestic and wild animals. The agent is spread worldwide, persisting in the natural environment through an enzootic circle between ticks and their hosting vertebrae. The aim of this paper is to demonstrate the distribution of ticks' infection with *Anaplasma phagocytophilum* in the territory of the Autonomous Province of Vojvodina. Ticks were collected at ten locations in the Autonomous Province of Vojvodina, Serbia, which are a rural habitat for ticks. By applying the nested PCR method, the ticks were examined for the presence of specific DNA p44/msp2 *Anaplasma phagocytophilum*. Of the ten examined pools of ticks collected in the area of the Autonomous Province of Vojvodina, the presence of genome of the agent *Anaplasma phagocytophilum* was confirmed in six pools applying the PCR method. In five pools of ticks of the species *Ixodes ricinus*, presence of agent *Anaplasma phagocytophilum* was confirmed. These ticks were found at the

following locations: Poplar Research Institute (2 locations), Fruška gora (2 locations) Poloj-forest Bačka Palanka (1 location). In one pool of ticks of the species *Dermacentor reticulatus* from the location Poloj-forest Bačka Palanka, we confirmed the presence of *Anaplasma phagocytophilum* genome. This infection can be a problem for public health, so further and more comprehensive acharological and epidemiological research is necessary in the Autonomous Province of Vojvodina.

Key words: ticks, *Dermacentor recitulatus*, *Ixodes ricinus*, *Anaplasma phagocitophilum*, anaplasmosis, PCR

UVOD

Krpelji su vektori za mnoga infektivna oboljenja i predstavljaju stalnu pret-nju populaciji ljudi i životinja, naročito kada se radi o zoonozama. Poznato je da krpelji mogu da budi vektori za različite vrste bakterija, poput uzročnika rikecioza (grupa pegavih tifusa Stenovitih planina), lajmske bolesti, Q gro-znice, erlihioza, anaplazmoze, tularemije, povratne groznice i drugih (Parola i Raoult, 2001). Osim navedenih bakterijskih infekcija, krpelji mogu da budu vektori i za virusne infekcije i poznato je da prenose 38 različitih vrsta virusa. Kao najznačajniji virusi koji se prenose krpeljima navode se virus krpeljskog encefalitisa, virus omsk hemoragične groznice, Powassan virus, Nairovirus (uzročnik krimske-kongo hemoragične groznice), Coltivirus (Eyach virus), virus infektivnog encefalomijelitisa ovaca (louping ill virus), virus afričke kuge svinja, virus najrobi bolesti ovaca, Thogoto virus, Dhori virus i drugi (Charrel i sar., 2004; Labuda i Nuttall, 2004). Osim za bakterije i viruse, krpelji mogu biti vektori i za protozoe. Smatra se da su babezioza i tajlerioza dva najznačajnija oboljenja iz ove grupe (Bakheit i sar., 2007).

Uzročnik granulocitne anaplazmoze *Anaplasma phagocytophilum* je Gram negativna, obligatno intracelularna bakterija koja inficira ljude, kao i različite domaće i divlje životinja. Ovaj uzročnik je rasprostranjen širom sveta. Slučaje-vi oboljenja kod ljudi su registrovani u Severnoj Americi, Evropi i Rusiji (Chen i sar.,1994; Dumler i sar.,2001; Sidel'nikov i sar.,2003; Lotric-Furlan i sar.,2006; Thomas i sar.,2009). Uzročnik *Anaplasma phagocytophilum* se održava u priro-di kroz enzootski krug između krpelja iz roda *Ixodes* i domaćina kičmenjaka. Transovarijalna transmisija uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* do sada još nije dokumentovana, što ukazuje na neophodno prisustvo domaćina rezer-voara uzročnika koji su uključeni u razvojni ciklus (Rar i sar, 2011). Baldrige i saradnici navode da registrovana transovarijalna transmisija nekih varijanti uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* kod krpelja iz roda *Dermacentor* uka-

zuje da održavanje uzročnika granulocitne anaplazmoze u prirodi možda nije isključivo zavisno od horizontalne transmisije (Baldrige i sar., 2009).

Različite vrste krpelja iz roda *Ixodes* su uključene u prenošenje uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* na domaćine sisare (Bakken iDumler, 2000). Istraživanjima sprovedenim na severnoistočnom i serenjezapadnom području SAD dokazano je da je krpelj veste *Ixodes scapularis* kompetentni vektor uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* (Des Vignes i Fish, 1997; Telford III i sar., 1996). Burkot i Richter su utvrdili da su krpelji vrsta *I. pacificus* i *I. spinipalpis* kompetentni vektori uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* na zappadu SAD (Burkot i sar., 2001; Richter i sar., 1996).

Primenom metoda molekularne biologije, prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* je dokazano u krpeljima vrste *I. ricinus* na području Evrope (Liz i sar., 2000; Katargina i sar., 2011; Ogden i sar., 1998; von Loewenich i sar., 2003), kao i kod krpelja vrste *I. persulcatus* u Rusiji (Eremeeva i sar., 2006; Rar i sar., 2010; Shpynov i sar., 2006), Kini (Cao i sar., 2003), Japanu (Ohashi i sar., 2005) i Koreji (Kim i sar., 2006). Postoje sopštenja koja ukazuju na nalaz genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* kod krpelja-*Dermacentor silvarum* u Kini (Cao et al., 2006), kao i krpelja *Ixodes ovatus* u Japanu (Ohashi i sar., 2005), *Ixodes trianguliceps* u Engleskoj (Bown i sar., 2003) i *Ixodes ventalloi* u Portugalu (Santos i sar., 2004). Obe vrste krpelja *Ixodes trianguliceps* i *Ixodes ventalloi* podržavaju održavanje uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* u prirodi, ali smatra se da nemaju značajnu ulogu u prenošenju ovog uzročnika na ljude ili životinje, zbog samog načina života ovih endofilnih krpelja (Rar i Golovljova 2011). Yoshimoto i saradnici su utvrdili da je krpelj vrste *Haemaphysalis megaspinosa* dominantni vektor uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* u populaciji goveda na području Japana (Yoshimoto i sar., 2010). Wirtgen i saradnici navode da su dokazali prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* u krpeljima *Dermacentor reticulatus* i predlažu da se ova vrsta doda na listu potencijalnih vektora uzročnika granulocitne anaplazmoze (Wirtgen i sar., 2011.)

Prevalencija infekcije krpelja uzročnikom *Anaplasma phagocytophilum* je nešto viša u SAD u odnosu na druga geografska područja (Rar i Golovljova, 2011). Telford III i saradnici saopštavaju da se inficiranost adulta vrste *Ixodes scapularis*, na severu SAD, kreće od 7,6 do 53%, dok je ova vrednost kod nimfi krpelja iste vrste nešto niža i kreće se od 1,5 do 20,6% (Telford III i sar., 1996). Kod krpelja vrste *Ixodes ricinus* i *Ixodes persulcatus* prevalencija infekcije uzročnikom *Anaplasma phagocytophilum* se kreće od 1% do 5% (Aleksiev et al., 2001; Liz et al., 2000; Katargina et al., 2011; Ogden et al., 1998; Cao et al., 2003; Ohashi et al., 2005; Rar et al., 2010; Shpynov et al., 2006). Samo u sporadičnim saopštenjima ove vrednosti su nešto više, pa tako Rosef navodi da je 17% krpe-

lja zaraženo uzročnikom *Anaplasma phagocytophilum* na području Norveških ostrva (Rosef i sar., 2009), dok Cinco saopštava da je u Italiji 24% krpelja inficirano istim uzročnikom (Cinco i sar., 1997). Massung navodi da utvrđene vrednosti prevalencije infekcije krpelja uzročnikom *Anaplasma phagocytophilum* na određenom području mogu da variraju u odnosu na vreme prikupljanja krpelja (Massung i sar., 2002) dok Katargina navodi da vrednosti zaraženosti krpelja pokazuju sezonske i godišnje varijacije, kao i zavise od primenjenih metoda prikupljanja i pregleda krpelja (Katargina i sar., 2011).

Milutinović i saradnici su prvi u Srbiji identifikovali prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* kod 40 od 287 ukupno pregledanih krpelja (Milutinović i sar., 2008).

Cilj ovog rada je da ukaže na rasprostranjenost infekcije krpelja uzročnikom *Anaplasma phagocytophilum* na području Autonomne Pokrajine Vojvodine.

MATERIJAL I METODE RADA

Prikupljanje uzoraka krpelja i definisanje lokaliteta

Prikupljanje krpelja u slobodnoj prirodi je obavljeno u periodu njihove sezonske aktivnosti između februara i oktobra meseca 2012. godine, jednom nedeljno, između 10 i 18 časova, kada su bili pogodni vremenski uslovi. Za prikupljanje krpelja korišćen je flag-čas metod, koji podrazumeva prevlačenje dva bela flanelska platna različite površine (1 x 1 m i 2 x 1,6 m) po vegetaciji niskog rasta i zemlji, u okviru izabranih preseka, tokom 60 minuta. Na svakih 20 m, tokom prevlačenja flanelskog platna, vršen je pregled platna sa obe strane i prikupljanje krpelja uz upotrebu pincete. Izbor lokaliteta je učinjen na osnovu poznavanja ekoloških faktora poput pogodnosti staništa za krpelje (flora i fauna), površine staništa, pristupačnosti staništu, gustini populacije krpelja, klimatskih i meteoroloških faktora. Prikupljanje krpelja je obavljeno na 10 lokaliteta u Autonomnoj Pokrajini Vojvodini, Srbija, koji predstavljaju ruralni tip staništa za krpelje. To su bile sledeće lokaliteti: Subić (2 lokaliteta), Institut za topolarstvo (3 lokaliteta), Titel-šuma (1 lokalitet), Poloj-šuma Bačka Palanka (2 lokaliteta) i Fruška gora (2 lokaliteta). Prikupljeni uzorci su organizovani u 10 pulova, nakon određivanja taksonomske pripadnosti vrsti upotrebom ključa po Estrada-Pena (Estrada-Pena i sar., 2004). U 6 pulova su bili prisutni adulti krpelja vrste *Ixodes ricinus* (2 lokaliteta Institut za topolarstvo, 2 lokaliteta Fruška gora, 1 lokalitet Poloj-šuma Bačka Palanka i 1 lokalitet Titel-šuma), u 2 pula su bili prisutni adulti krpelja vrste *Dermacentor marginatus* (2 lokaliteta Subić) i u 2 pula su bili prisutni adulti krpelja vrste *Dermacentor reticulatus* (1

lolitet Institut za topolarstvo i 1 lokalitet Poloj-šuma Bačka Palanka). Prikupljeni krpelji su čuvani u 70% rastvoru alkohola do ekstrakcije DNK.

Ekstrakcija DNK

Ekstrakcija DNK iz tkiva celih krpelja je obavljena primenom QuickGene DNA tissue kit, prema instrukciji proizvođača Fujifilm Co., Tokyo, Japan. Kvalitet ekstrahovane DNK je procenjen primenom PCR za ITS2 region gena ribozomalne DNK krpelja, sa prajmerskim parom 5.8S F3/1 (50-GGG TCG ATG AAG AAC GCA GCC AGC-30) i 28S R1/1 (50-TTC AGG GGG TTG TCT CGC CTG ATG-30), po prethodno saopštenoj metodi (Fukunaga i sar., 2000).

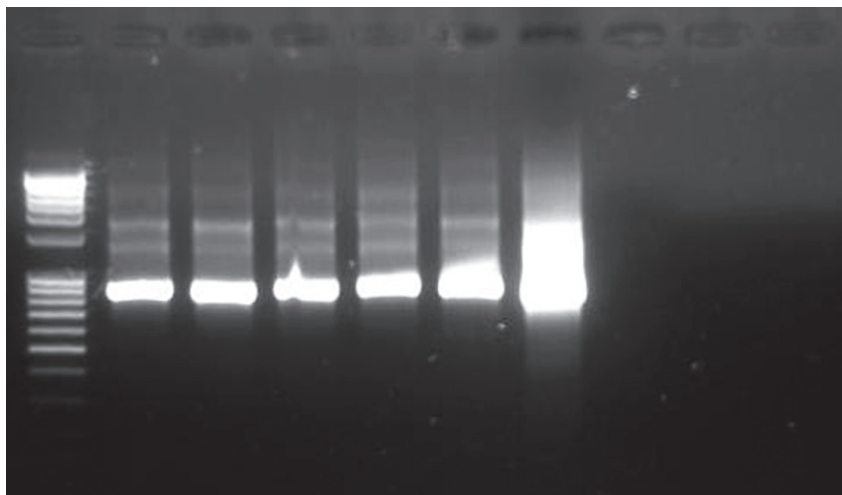
Dokazivanje specifične DNK p44/msp2 uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*

Za dokazivanje DNK *Anaplasma phagocytophilum* korišćena je nested PCR metoda sa prajmerima dizajniranim za visoko konzervirani deo genoma p44/msp2 paraloga p3726F [50-GCT AAGGAG TTA GCT TAT GA-30], p3761F [50-CTG CTC T(T/G)G CCA A(A/G)A CCT

C-30], p4183R [50-CAA TAG T(C/T)T TAG CTA GTA ACC-30] i p4257R [50-AGAAGA TCA TAA CAA GCA TTG-30] prema prethodno saopštenoj metodologiji (Ohashi i sar., 2005; Milutinović i sar. 2008).

REZULTATI I DISKUSIJA

Od deset pregledanih pulova krpelja prikupljenih na području Autonomne Pokrajine Vojvodine, primenom PCR metode, u šest pulova dokazano je prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*. U tabeli 1. su prikazani podaci o nalazu genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*, lokalitetu, kao i vrsti, broju i polu krpelja. Na slici 1. je prikazana gel elektroforeza produkata PCR reakcije za dokazivanje genoma *Anaplasma phagocytophilum*. Na slici 2. je prikazana karta sa označenim lokalitetima sa kojih su prikupljeni pozitivni i negativni pulovi krpelja na prisustvo genoma *Anaplasma phagocytophilum*.



Slika 1. Gel elektroforeza produkata PCR reakcije za dokazivanje genoma *Anaplasma phagocytophilum* (Molekularni marker se vidi skroz levo, kao i PCR pozitivni uzorci sa oko 300 do 400 baznih parova).



Slika 2. Mapa sa označenim lokalitetima sa kojih su prikupljeni pozitivni i negativni pulovi krpelja na prisustvo genoma *Anaplasma phagocytophilum* (Crvane tačke – Lokaliteti na kojima je dokazano prisustvo genoma *Anaplasma phagocytophilum* u krpeljima vrste *Ixodes ricinus*, Žuta tačka – Lokalitet na kome je dokazano prisustvo genoma *Anaplasma phagocytophilum* u krpeljima vrste *Dermacentor reticulatus*, Zelene tačke – Lokaliteti na kojima nije dokazano prisustvo genoma *Anaplasma phagocytophilum* u krpeljima)

Tabela 1. Podaci o nalazu genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*, lokalitetu, kao i vrsti, broju i polu krpelja

Broj	Vrsta krpelja	Broj i pol krpelja	Lokalitet	Nalaz genoma <i>A. phagocytophilum</i>
1	<i>D. marginatus</i>	5 mužjaka	Subić	Negativan
2	<i>D. marginatus</i>	6 ženki	Subić	Negativan
3	<i>I. ricinus</i>	5 ženki	Institut za topolarstvo	Pozitivan
4	<i>D. reticulatus</i>	6 ženki	Institut za topolarstvo	Negativan
5	<i>I. ricinus</i>	4 mužjaka	Institut za topolarstvo	Pozitivan
6	<i>I. ricinus</i>	4 ženke	Titel-šuma	Pozitivan
7	<i>I. ricinus</i>	10 ženki	Poloj-šuma Bačka Palanka	Negativan
8	<i>D. reticulatus</i>	3 ženke, 2 mužjaka	Poloj-šuma Bačka Palanka	Pozitivan
9	<i>I. ricinus</i>	4 ženke	Fruška gora	Pozitivan
10	<i>I. ricinus</i>	7 mužjaka	Fruška gora	Pozitivan

Prisusto genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* u Republici Srbiji su prvi dokazali Milutinović i saradnici. Oni su pregledali ukupno 287 krpelja sa područja Republike Srbije. Od 40 krpelja kod kojih je dokazano prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* samo 3 krpelja su vodila poreklo sa područja Autonomne Pokrajine Vojvodine (Batrovci i Kljajićevo). Isti autori su iako su registrovali istovremenu infekciju uzročnikom *Borrelia burgdorferi* kod 18 pregledanih krpelja, to nije bio slučaj sa krpeljima prikupljenim sa područja Autonomne Pokrajine Vojvodine (Milutinović i sar., 2008).

U 5 pulova krpelja vrste *Ixodes ricinus* je dokazano je prisusto genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*. Ovi krpelji su vodili poreklo sa sledećih lokacija Institut za topolarstvo (2 lokaliteta), Fruška gora (2 lokaliteta) i Poloj-šuma Bačka Palanka (1 lokalitet). Brojni drugi autori su dokazali pri-

susto genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* kod krpelja vrste *Ixodes ricinus*na području Evrope. Milutinović i saradnici navode da postoji značajna regionalna variabilnost u vrednostima prevalencije infekcije krpelja vrste *Ixodes ricinus* uzročnikom *Anaplasma phagocytophilum* (Milutinović i sar, 2008). Liz i saradnici su ustanovili 6 pozitivnih krpelja vrste *Ixodes ricinus* na prisustvo DNA uzročnika granulocitne anaplazmoze od 417 pregledanih krpelja sa područja Švajcarske (Liz i sar., 2000). Katargina i saradnici su dokazali prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* kod 13,4% krpelja vrste *Ixodes ricinus* u Evropskom delu Rusije, kod 4,2% krpelja vrste *Ixodes ricinus* u Belorusiji, kod 2,6% kod krpelja vrste *Ixodes ricinus* sa Sarema ostrva u Estoniji, kao i 1,7% krpelja vrste *Ixodes ricinusa* kopnenog dela Estonije. Isti istraživači nisu dokazali prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* kod krpelja vrste *Ixodes persulcatus* (Katargina i sar., 2011). Nalaz genoma u krpeljima vrsta *Ixodes ricinus* i *Ixodes trianguliceps*na području Velike Britanije su ustanovili Ogden i saradnici 1998. godine. Kod 4,1% krpelja vrste *Ixodes ricinus* od ukupno pregledanih 1022 krpelja na području Nemačke je dokazan genom uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*. Kachrimanidou i saradnici su dokazali prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* u 4 pula od pregledanih 45 pulova krpelja vrste *Ixodes ricinus* sa područja Grčke (Kachrimanidou i sar., 2011). Na području Austrije su Polin i saradnici, 2004. godine dokazali prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* kod krpelja vrste *Ixodes ricinus* (Polin i sar., 2004). Severinsson i saradnici su u Švedskoj pregledali 139 pulova sa 1245 krpelja na prisustvo uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* i dokazali da se zaraženost krpelja ovim uzročnikom kretala od 1,3% do 15% (Severinsson i sar., 2010). Strašek Smrdel i saradnici su ustanovili nisku vrednost prevalencije infekcije krpelja vrste *Ixodes ricinus* uzročnikom *Anaplasma phagocytophilum* u Sloveniji koja je za 2005. godinu iznosila 0,31%, a za 2006. godinu 0,63% (Smrdel i sar., 2010). Sofia Santos i saradnici su primenom PCR metode dokazali prisustvo uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* kod krpelja *Ixodes ricinus* sa kopnenog dela Portugala (Sofia Santos i sar., 2004). Koči i saradnici su dokazali genom uzročnika granulocitne anaplazmoze kod 9% krpelja *Ixodes ricinus*u Moldaviji (Koči i sar., 2007). Sanogo i saradnici saopštavaju da je samo 0,3% krpelja *Ixodes ricinus* uklonjenih sa tela ljudi bez znakova infekcije bilo pozitivno na uzročnika granulocitne anaplazmoze na području severnoistočne Italije (Sanogo i sar., 2004). Grzeszczuk i Stanczak su ustanovile da je 23,7% krpelja vrste *Ixodes ricinus*, uklonjenih sa kože ljudi u Poljskoj, bilo inficirano uzročnikom granulocitne anaplazmoze (Grzeszczuk i Stanczak, 2006). Halos i saradnici su ustanovili prevalenciju infekcije krpelja *Ixodes ricinus* uzročnikom *Anaplasma phagocytophilum*na području Italije od

10%, dok su Mantelli i saradnici registrovali 15% zaraženih krpelja u Francuskoj (Halos i sar., 2006; Mantelli i sar., 2006).

U ovom istraživanju u jednom pulu krpelja vrste *Dermacentor reticulatus* sa područja Poloj-šuma Bačka Palanka smo dokazali prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* (tabela 1., slika 1. i slika 2). Značaj ove vrste krpelja u održavanju i prenošenju uzročnika granulocitne anaplazmoze krpelja još uvek nije pouzdano utvrđen. Sixl i saradnici nisu dokazali prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* kod 178 pregledanih krpelja vrste *Dermacentor reticulatus* prikupljenih sa područja Austrije (Sixl i sar., 2003). U svom istraživanju inficiranosti krpelja vrste *Dermacentor reticulatus* sa područja Nemačke uzročnicima *Borrelia* spp., *Candidatus Neorhlichia mikurensis* i *Anaplasma phagocytophilum*, Richter i saradnici nisu dokazali prisustvo genoma ovih uzročnika u pregledanim krpeljima. Oni smatraju da su krpelji vrste *Dermacentor reticulatus* retko inficirani ovim uzročnicima, kao i da nemaju značajnu ulogu vektora i prenošenju i održavanju ovih infekcija (Richter i sar., 2013). Suprotno ovoj grupi istraživača, Wirtgen i saradnici saopštavaju da su u toku sprovođenja monitoringa u Velikoj Britaniji (WIL-DSCREEN network) dokazali prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum* kod 5 krpelja *Dermacentor reticulatus*, od ukupno 35 pregledanih. Ovi istraživači su predložili da se vrsta *Dermacentor reticulatus* doda na listu potencijalnih krpelja vektora uzročnika granulocitne anaplazmoze (Wirtgen i sar., 2011.) Ne treba izgubiti iz vida da kod krpelja iz roda *Ixodes* još uvek nije dokazano transovarialno prenošenje uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*; kao što su to dokazali Baldridge i saradnici kod krpelja vrste *Dermacentor albipictus* (Baldridge i sar., 2009). Na osnovu navedenih istraživanja moguće je da krpelji iz roda *Dermacentor* imaju značajniju epidemiološku ulogu u prenošenju i održavanju uzročnika granulocitne anaplazmoze.

ZAKLJUČAK

U 6 pulova krpelja sa područja Autonomne Pokrajine Vojvodine je dokazano prisustvo genoma uzročnika *Anaplasma phagocytophilum*. Utvrđeno je prisustvo *Anaplasma phagocytophilum* kod krpelja vrste *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*. Neophodna su dalja istraživanja da bi se dokazao vektorski potencijal *Dermacentor reticulatus*, kao i utvrdila genetska sličnost patotipova *Anaplasma phagocytophilum* dokazanih u krpeljima vrsta *Dermacentor reticulatus* i *Ixodes ricinus*. Kako ova infekcija predstavlja problem u javnom zdravlju, neophodna su šira akarološka i epidemiološko-epizootička istraživanja u Autonomnoj Pokrajini Vojvodini.

LITERATURA

1. Alekseev A.N., Dubinina H.V., Van De Pol I., Schouls L.M.: Identification of Ehrlichia spp. and Borrelia burgdorferi in Ixodes ticks in the Baltic regions of Russia., *J. Clin. Microbiol.* 39, 2237–2342, 2001
2. Bakken J.S., Dumler J.S.: Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin. Infect. Dis.*, 31, 554–560, 2000
3. Baldridge G.D., Scoles G.A., Burkhardt N.Y., Schloeder B., Kurtti T.J., Munderloh U.G.: Transovarial transmission of Francisella-like endosymbionts and Anaplasma phagocytophilum variants in Dermacentor albipictus (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, 46, 3, 625, 2009
4. Bown K.J., Begon M., Bennett M., Woldehiwet Z., Ogden N.H.: Seasonal dynamics of Anaplasma phagocytophila in a rodent-tick (Ixodes trianguliceps) system, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.*, 9, 63–70, 2003
5. Burkot T.R., Maupin G.O., Schneider B.S., Denatale C., Happ C.M., Rutherford J.S., Zeidner N.S.: Use of a sentinel host system to study the questing behavior of Ixodes spinipalpis and its role in the transmission of Borrelia bissettii, human granulocytic ehrlichiosis, and Babesia microti., *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65, 293–299, 2001
6. Cao W.C., Zhan L., He J., Foley J.E., De Vlas S.J., Wu X.M., Yang H., Richardus J.H., Habbema J.D.: Natural Anaplasma phagocytophilum infection of ticks and rodents from a forest area of Jilin Province, China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 75, 664–668, 2006
7. Cao W.C., Zhao Q.M., Zhang P.H., Yang H., Wu X.M., Wen B.H., Zhang X.T., Habbema J.D.: Prevalence of Anaplasma phagocytophila and Borrelia burgdorferi in Ixodes persulcatus ticks from northeastern China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 68, 547–550, 2003
8. Charrel R.N., Attoui H., Butenko A.M., Clegg J.C., Deubel V., Frolova T.V., Gould E.A., Gritsun T.S., Heinz F.X., Labuda M., Lashkevich V.A., Loktev V., Lundkvist A., Lvov D.V., Mandl C.W., Niedrig M., Papa A., Petrov, V.S., Plyusnin A., Randolph S., Süß J., Zlobin V.I., De Lamballerie X.: Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.*, 10, 1040–55., 2004
9. Chen S.M., Dumler J.S., Bakken J.S., Walker D.H.: Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. *J. Clin. Microbiol.*, 32, 589–595, 1994
10. Cinco M., Padovan D., Murgia R., Maroli M., Frusteri L., Heldtander M., Johansson K.E., Engvall E.O.: Coexistence of Ehrlichia phagocytophila and Borrelia burgdorferi sensu lato in Ixodes ricinus ticks from Italy as determined by 16S rRNA gene sequencing. *J. Clin. Microbiol.*, 35, 3365–3366, 1997

11. Des Vignes F., Fish D.: Transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by host-seeking *Ixodus scapularis* (Acari:Ixodidae) in southern New York state. *J. Med. Entomol.*, 34, 379–382, 1997
12. Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y., Rurangirwaet F.R.: Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “HGE agent” as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophilum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 2145–2165, 2001
13. Ereemeeva M.E., Oliveira A., Robinson J.B., Ribakova N., Tokarevich N.K., Dasch G.A.: Prevalence of bacterial agents in *Ixodes persulcatus* ticks from the Vologda Province of Russia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1078, 291–298, 2006
14. Estrada-Pena A., Bouattour A., Camica J.L., Walzer A.R.: Ticks of domestic animals in the Mediterranean region: a guide to identification of species. University of Zaragoza, Spain; Atalanta, Houten, The Netherlands, 2004.
15. Fukunaga M., Yabuki M., Hamase A., Oliver J.H. Jr, Nakao M.: Molecular phylogenetic analysis of ixodid ticks based on the ribosomal DNA spacer, internal transcribed spacer 2, sequences. *J. Parasitol.*, 86, 38–43, 2000
16. Grzeszczuk A., Stanczak J.: High prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in ticks removed from human skin in north-eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 13, 1, 45-48, 2006
17. Halos L., Vourc’h G., Cotte V., Gasqui P., Barnouin J., Boulous H.J., Vayssier-Taussat M.: Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* sp and *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in questing *Ixodes ricinus* ticks from France. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1078, 316–319, 2006
18. Kachrimanidou M., Papa A., Chochlakis D., Pavlidou V., Psaroulaki A.: Molecular Evidence for *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* Ticks from Greece. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 11, 10, 1391-1393, 2011
19. Katargina O., Geller J., Alekseev A., Dubinina H., Efremova G., Mishaeva N., Vasilenko V., Kuznetsova T., Järvekülg L., Vene S., Lundkvist Å, Golovljova I.: Identification of *Anaplasma phagocytophilum* in tick populations in Estonia, the European part of Russia and Belarus. *Clin. Microbiol. Infect.*, 18, 1, 40-46., 2012
20. Kim C.M., Yi Y.H., Yu D.H., Lee M.J., Cho M.R., Desai A.R., Shringi S., Klein T.A., Kim H.C., Song J.W., Baek L.J., Chong S.T., O’guinn M.L., Lee J.S., Lee I.Y., Park J.H., Foley J., Chae J.S.: Tick-borne rickettsial pathogens in ticks and small mammals in Korea. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 5766–5776, 2006

21. Koči J., Movila A., Taragel'ová V., Toderas I., Uspenskaia I., Derdákova M., Labuda M.: First report of *Anaplasma phagocytophilum* and its co-infections with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) from Republic of Moldova. *Exp. Appl. Acarol.*, 41, 1-2, 147-152, 2007
22. Labuda M., Nuttall P.A. Tick-borne viruses. *Parasitology*, 129, Suppl: S221-45, 2004
23. Liz J.S., Anderes L., Sumner J.W., Massung R.F., Gern L., Rutti B., Brossard M.: PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 1002-1007, 2000
24. Lotric-Furlan S., Rojko T., Petrovec M., Avsic-Zupanc T., Strle F.: Epidemiological, clinical and laboratory characteristics of patients with human granulocytic anaplasmosis in Slovenia. *Wien. Klin. Wochenschr.*, 118, 708-713, 2006
25. Mantelli B., Pecchioli E., Hauffe H.C., Rosà R., Rizzoli A.: Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. and *Anaplasma phagocytophilum* in the wood tick *Ixodes ricinus* in the Province of Trento, Italy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 25, 737-739, 2006
26. Massung R.F., Mauel M.J., Owens J.H., Allan N., Courtney J.W., Stafford 3rd K.C., Mather T.N.: Genetic variants of *Ehrlichia phagocytophila*, Rhode Island and Connecticut. *Emerg. Infect. Dis.*, 8, 467-472, 2002
27. Milutinović M., Masuzawa T., Tomanović S., Radulović Ž., Fukui T., Okamoto Y.: *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis* and their co-infections in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks collected in Serbia. *Exp. Appl. Acarol.*, 45, 3-4, 171-183, 2008
28. Ogden N.H., Bown K., Horrocks B.K., Woldehiwet Z., Bennett M.: Granulocytic *Ehrlichia* infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K.. *Med. Vet. Entomol.*, 12, 423-429, 1998
29. Ohashi N., Inayoshi M., Kitamura K., Kawamori F., Kawaguchi D., Nishimura Y., Naitou H., Hiroi M., Masuzawa T.: *Anaplasma phagocytophilum*-infected ticks, Japan. *Emerg. Infect. Dis.*, 11, 1780-1783, 2005
30. Parola P., Raoult D., Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin. Infect. Dis.*, 32, 897-928, 2001
31. Polin H., Hufnagl P., Hauns Schmid R., Gruber F., Ladurner G.: Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and wild animals in Austria. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 5, 2285-2286, 2004
32. Rar V., Golovljova I.: *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and "Candidatus *Neoehrlichia*" bacteria: Pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infect. Genet. Evol.*, 11, 8, 1842-1861, 2011

33. Rar V.A., Livanova N.N., Panov V.V. Doroschenko E.K., Pukhovskaia N.M., Vysochina N.P., Ivanov L.I.: Genetic diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia* in Asian part of Russia. *Ticks Tick Borne Dis.*, 1, 57–65, 2010
34. Rar V.A., Epikhina Z.I., Livanova N.N., Panov V.V., Doroschenko E.K., Pukhovskaya N.M., Vysochina N.P., Ivanov L.I.: Genetic variability of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes persulcatus* ticks and small mammals in the Asian part of Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 11, 8, 1013–1021, 2011
35. Richter Jr. P.J., Kimsey R.B., Madigan J.E., Barlough J.E., Dumler J.S., Brooks D.L.: *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) as a vector of *Ehrlichia equi* (Rickettsiales: Ehrlichieae). *J. Med. Entomol.*, 33, 1–5, 1996
36. Richter D., Kohn C., Matuschka F.R.: Absence of *Borrelia* spp., *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in questing adult *Dermacentor reticulatus* ticks. *Parasitol. Res.*, 112, 1, 107–111, 2013
37. Rosef O., Paulauskas A., Radzijeuskaja J.: Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks in relation to the density of wild cervids. *Acta. Vet. Scand.*, 51, 47, 2009
38. Sanogo Y.O., Parola P., Shpynov S., Camicas J.L., Brouqui P., Caruso G., Raoult D.: Genetic diversity of bacterial agents detected in ticks removed from asymptomatic patients in northeastern Italy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 990, 182–190, 2003
39. Santos A.S., Santos-Silva M.M., Almeida V.C., Bacellar F., Dumler J.S.: Detection of *Anaplasma phagocytophilum* DNA in *Ixodes* ticks (Acari: Ixodidae) from Madeira Island and Setubal District, mainland Portugal. *Emerg. Infect. Dis.*, 10, 1643–1648, 2004
40. Severinsson K., Jaenson T.G., Pettersson J., Falk K., Nilsson K.: Detection and prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in seven study areas in Sweden. *Parasit. Vectors*, 3, 66, 2010
41. Shpynov S., Fournier P.E., Rudakov N., Tarasevich I., Raoult D.: Detection of members of the genera *Rickettsia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* in ticks collected in the Asiatic part of Russia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1078, 378–383, 2006
42. Sidel'nikov J.N., Mediannikov O.J., Ivanov L.I., Zdanovskaya N.I.: The first case of granulocytic ehrlichioses in Far East of Russia. *Clin. Med.*, 2, 67–68, 2003
43. Sixl W., Petrovec M., Marth E., Wüst G., Stünzner D., Schweiger R., Avšič-Županc T.: Investigation of *Anaplasma phagocytophila* infections in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks in Austria. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 990, 1, 94–97, 2003

44. Smrdel K., Serdt M., Duh D., Knap N., Županc-Avšič T.: *Anaplasma phagocytophilum* in ticks in Slovenia. *Parasit Vectors*, 3, 102, 2010
45. Telford III S.R., Dawson J.E., Katavolos P., Warner C.K., Kolbert C.P., Persing D.H.: Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 11, 6209–6214, 1996
46. Thomas R.J., Dumler J.S., Carlyon J.A.: Current management of human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis and *Ehrlichia ewingii* ehrlichiosis. *Expert. Rev. Antiinfect. Ther.*, 7, 709–722, 2009
47. von Loewenich F.D., Baumgarten B.U., Schröppel K., Geissdörfer W., Röllinghoff M., Bogdan C.: High diversity of *ankA* sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among *Ixodes ricinus* ticks in Germany. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 5033–5040, 2003
48. Wirtgen M., Nahayo A., Linden A., Losson B., Garigliany M.M., Desmecht D.: Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in *Dermacentor reticulatus* ticks. *Vet. Rec.*, 168, 9, 2011
49. Yoshimoto K., Matsuyama Y., Matsuda H., Sakamoto L., Matsumoto K., Yokoyama N., Inokuma H.: Detection of *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* DNA from *Haemaphysalis megaspinosa* in Hokkaido, Japan. *Vet. Parasitol.*, 168, 1, 170-172, 2010

Primljeno: 06.11.2012.
Odobreno: 08.05.2013.