

Humana granulocitna anaplazmoza u Republici Hrvatskoj i nove spoznaje o anaplazmama i erlihijama

Oktavija ĐAKOVIĆ RODE, prim. dr. sc.,
dr. med., znanstveni suradnik, specijalist
mikrobiolog

Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran
Mihaljević", Zagreb

Ključne riječi

Humana granulocitna anaplazmoza (HGA)
Croatia
Anaplasma phagocytophilum
dijagnostika

Key words

Human granulocytic anaplasmosis (HGA)
Croatia
Anaplasma phagocytophilum
diagnostics

Primljeno: 2015-01-22

Received: 2015-01-22

Prihvaćeno: 2015-02-12

Accepted: 2015-02-12

Znanstveni rad

Anaplasma phagocytophilum je emergentni patogen kojeg u Europi prenose krpelji *Ixodes ricinus* koji su vektori i za virus krpeljnog encefalitisa, *Borrelia sensu lato*, *Babesia* i neke vrste *Rickettsia* spp. *A. phagocytophilum* je obvezno unutarstanična Gram-negativna bakterija koja ima tropizam za granulocite i uzrokuje humanu granulocitnu anaplazmozu (HGA). Dijagnoza HGA temelji se na kliničkoj procjeni i mora se potvrditi serološki dokazom serokonverzije ili četverostrukog porasta titra protutijela IgG ili određivanjem DNK. Protutijela su često negativna u početnoj fazi akutne bolesti i obavezno treba testirati parne serume u razmaku od 2–4 tjedna. U ranoj fazi bolesti kada je serologija još negativna značajniji je nalaz DNK iz uzorka krvi s antikoagulansom, ali dostupnost PCR je ograničena. Morule u razmazu periferne krvi obojene po Giemsi značajne su za rano postavljanje dijagnoze, ali se u HGA pronalaze jako rijetko. Od 2009. do 2012. g. u Klinici za infektivne bolesti u Zagreb testirali smo protutijela IgM i IgG protiv *A. phagocytophilum* u 496 seruma od 425 bolesnika. Parne serume imalo je samo 68 bolesnika. Pozitivna protutijela na *A. phagocytophilum* nađena su u 160 (37,6 %) bolesnika. Tri bolesnika su zadovoljila kriterije za akutnu HGA. Prisutnost IgG u titru 256 ili većem, što se definira kao moguća HGA, nađena je u 40 bolesnika. Samo IgM imalo je 17, a IgM i IgG anti-*A. phagocytophilum* 16 bolesnika. Anti-*A. phagocytophilum* IgG u titru 64 ili 128 imalo je u 84 bolesnika. Podaci potvrđuju prisutnost infekcije *A. phagocytophilum* u Hrvatskoj premda većina akutnih infekcija ostaje nedokazana, većinom kao samoizlječive bolesti. HGA se treba uključiti u diferencijalnu dijagnozu bolesnika sa simptomima sličnima gripi u područjima gdje se nalazi *Ixodes ricinus*, posebno u vrijeme aktivnosti krpelja. U životinja i krpelja u Hrvatskoj utvrđena je prisutnost i drugih patogenih članova porodice *Anaplasmataceae* zbog čega dodatno treba misliti o HGA uz veća dijagnostička nastojanja za postavljanje dijagnoze.

Human granulocytic anaplasmosis in Croatia and new insights about anaplasma and ehrlichia species

Scientific paper

Anaplasma phagocytophilum is an emergent tick-borne pathogen in Europe transmitted by *Ixodes ricinus* ticks which may also transmit tick-borne encephalitis virus, *Borrelia sensu lato*, *Babesia* and some *Rickettsia* spp. *A. phagocytophilum* is an obligate intracellular Gram-negative bacteria that has tropism for granulocytes and causes human granulocytic anaplasmosis (HGA). The diagnosis of HGA relies on clinical suspicion and must be confirmed with seroconversion or 4-fold increase in antibody titre or by DNA determination. Antibodies are often negative in the initial phase of acute illness and paired sera taken 2–4 weeks later are obligatory. PCR on anticoagulated blood could be more efficient tool in this phase but it is of limited availability. Morulae in Giemsa-stained peripheral blood smears may provide early diagnosis but could be observed very rarely in HGA. From 2009 till 2012, we tested 496 sera from 425 patients for IgM and IgG anti-*A. phagocytophilum* antibodies at the University Hospital for Infectious Diseases in Zagreb. Paired sera were sent for only 68 patients. Positive antibodies against *A. phagocytophilum* were found in 160 (37.6 %) patients. Three patients fulfilled the criteria for acute HGA. The presence of IgG in titres 256 or higher defined as probable HGA was found in 40 patients. Only IgM, and IgM and IgG anti-*A. phagocytophilum* antibodies were

detected in 17 and 16 patients, respectively. Anti-*A. phagocytophilum* IgG in titres 64 or 128 was found in 84 patients. The data show that *A. phagocytophilum* infections are present in Croatia, although most of the acute infections remain unconfirmed as self-resolved diseases. HGA should be included in the

differential diagnosis of patients with flu-like illness in regions with *Ixodes ricinus*, especially during tick-activity season. Different members of *Anaplasmataceae* family were found in animals and ticks in Croatia, which is why better awareness of HGA and diagnostics effort are needed.

Uvod

Humana granulocitna anaplazmoza je emergentna zoonoza koju prenose krpelji, a uzrokuju bakterije roda *Anaplasmataceae*. Dokazani humani patogeni roda *Anaplasmataceae* su: *Anaplasma (A.) phagocytophilum* – uzročnik humane granulocitne anaplazmoze (HGA), *Ehrlichia (E.) chaffeensis* – uzročnik humane monocitne erlihioze (HME), *E. ewingii* – uzročnik humane ewignii-erlihioze (HEE), *E. canis* – uzročnik asimptomatskih infekcija u Venezueli, *Neorickettsia sennetsu* – uzročnik senettsu-erlihioze u Japanu, Maleziji i Laosu [1]. Proširenost anaplazmi i erlihija ovisi o prisutnosti vektora i o prirodnim domaćinima [2]. U Europi humane infekcije primarno uzrokuje *A. phagocytophilum*, a samo u nekoliko imunokompromitiranih bolesnika iz Češke, Njemačke, Švedske i Švicarske opisane su bolesti koje je uzrokovala *Neoehrlichia mikurensis* [3, 4]. Nedavno su u SAD opisani slučajevi slični erlihiozi u kojih je kao uzročnik dokazan bliski srodnik *E. muris (E. muris-like bacterial agent, EM-LA)* [5] za koji se smatralo da nije humani patogen, a kojeg prenose krpelji *Ixodes scapularis*. Srodnik *E. ruminantium* nazvan Panola Mountain *Ehrlichia* također je mogući uzročnik bolesti [6]. Bolesti povezane s novim anaplazmama i erlihijama pojavljuju se vjerojatno uslijed ekoloških promjena i ekspanzije krpelja koji su glavni prenositelji bolesti.

Taksonomija ove skupine bakterija se značajno mijenjala. Naziv *Ehrlichia* uveden je 1937.g., a prve humane erlihioze opisane su 1950-tih godina u Japanu kao senettsu-erlihioze. Prema morfologiji, staničnom tropizmu i serologiji prvotno je definiran rod *Ehrlichiae* koji je zajedno s rodovima *Rickettsiae* i *Wolbachia* pripadao porodici *Rickettsiaceae*. Filogenetskom analizom sekvenci 16S rRNK utvrđena je nova klasifikacija prema kojoj je ukinuta obitelj *Rickettsiaceae* i definirana obitelj *Anaplasmataceae* [1] koja prema klasifikaciji iz 2014.g. obuhvaća sedam rodova: *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia*, *Neoehrlichia*, *Wolbachia*, *Aegyptianelae* i *Xenohalictis* [2]. U starijoj su se literaturi sve bolesti iz ove skupine opisivale kao erlihioze, dok je danas potrebno razlikovati humane anaplazmoze od erlihioza i neorickettsioza. Vrste koje su dokazane kao uzročnici bolesti u ljudi iz roda *Ehrlichia* su *Ehrlichia (E.) canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. (ranije Cowdria) ruminantium* i *E. ewingii*. Molekularnim analizama utvrđeno je da su raniji nazivi bakterija *Ehrlichia phagocytophila* i *E. equi* korišteni za istu vrstu koja je na-

zvana *Anaplasma (A.) phagocytophilum*. *A. phagocytophilum* zajedno s *A. platys* i *A. marginale*, koje su se ranije nazivale erlihijama, spadaju u rod *Anaplasma*. Rod *Neorickettsia* obuhvaća vrste *Neorickettsia (N. ranije Ehrlichia) sennetsu* i *N. (E.) risticii* te *N. helminthoeca*. U novodefinirani rod *Neoehrlichia* spada *N. mikurensis* koja je do nedavno označavana *Candidatus N. mikurensis* [7–11] (Tablica 1.).

Premda su erlihije i anaplazme dugo poznati uzročnici bolesti u veterinarskoj medicini, značenje erlihija u ljudi prepoznato je u SAD 1986. g. kada je opisan prvi bolesnik s humanom monocitnom erlihiozom (HME), a 1990. je izoliran uzročnik *E. chaffeensis*. Godine 1994., također u SAD, opisani su novi uzročnici koji su uzrokovali sličnu bolest koja je nazvana humana granulocitna erlihioza (HGE), danas poznata kao humana granulocitna anaplazmoza (HGA) [10, 12–14]. Prvi klinički slučajevi HGA u Europi dokazani su 1996.g. u Sloveniji [15–17], a 1998. godine su opisani prvi slučajevi HGA u Hrvatskoj [18, 19].

Patogeneza

Životni ciklus humanih anaplazmi i erlihija sastoji se od stadija koji se odvijaju u krpeljima i sisavcima. Primarni rezervoari su mali šumski glodavci, jeleni, preživači te psi koji se smatraju sekundarnim rezervoarima za humane infekcije. Čovjek se zarazi slučajno nakon ugriza krpelja. Vrste krpelja su specifične za vrstu uzročnika koju prenose, pa raširenost humanih infekcija ovisi o raširenosti krpelja u određenom području. Tako se *A. phagocytophilum* prenosi krpeljima roda *Ixodes* koji su široko rasprostranjeni, a vrste *E. chaffeensis* i *E. ewingii* prenosi krpelj *Amblyoma americanum* koji nije dokazan u Europi [9, 13, 20–22].

Anaplazme su mali obvezno unutarstanični Gram-negativni polimorfni kokobacili slični rickettsijama. Za razliku od *Rickettsia* spp. i većine Gram-negativnih bakterija anaplazme nemaju gene za sintezu lipopolisaharida i peptidoglikana koji aktiviraju leukocite. Stoga ove bakterije za izgradnju svoje membrane koriste kolesterol koji uzimaju od stanica, što im osigurava izbjegavanje imunskog odgovora domaćina [8].

Nakon ugriza krpelja anaplazme i erlihije diseminiraju do koštane srži i slezene i inficiraju progenitore mijeloidne i monocitne loze [23, 24]. U sisavcima primarna replikacija odvija se u ciljnim stanicama – granulocitima za *A.*

Tablica 1. Osobitosti *Anaplasma phagocytophilum* i *Ehrlichia* spp. koje uzrokuju bolesti u ljudi [7-10]**Table 1.** Characteristics of human pathogen *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia* spp. [7-10]

| Vrsta/Species | Ciljne stanice/ Target cells | Rasprostranjenost/ Distribution | Primarni vektori krpelji/ Primary tick vectors | Glavni domaćini/ Main hosts | Bolesti u ljudi/ Human diseases |
|--|--|------------------------------------|--|---|---|
| <i>Anaplasma phagocytophilum</i> | Granulociti, endotelne stanice (?) | SAD, Europa, Azija | <i>Ixodes scapularis</i> , <i>I. pacificus</i> , <i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i> | Ljudi, jeleni, srne, glodavci, ovce, goveda, konji, psi, mačke | Humana granulocitna anaplazmoza (HGA), vrućica u preživača koja se prenosi krpeljima, anaplazmoza konja, anaplazmoza pasa i mačaka |
| <i>Ehrlichia chaffeensis</i> | Monociti, makrofagi | SAD, Afrika, Južna Amerika, Azija | <i>Amblyomma americanum</i> , <i>Dermacentor variabilis</i> , <i>Ixodes pacificus</i> | Ljudi, jeleni, psi, kojoti | Humana monocitna erlihioza (HME), erlihioza pasa |
| <i>E. muris</i> / srodnik <i>E. muris</i> | Nepoznate | SAD, Japan | <i>I. persulcatus</i> , <i>Haemaphysalis flava</i> / <i>I. scapularis</i> | Ljudi, sitni glodavci (miš, voluharica) | Infekcije u pasa*, ljudi* |
| <i>E. canis</i> | Monociti, makrofagi | Širom svijeta | <i>Rhipicephalus sanguineus</i> | Ljudi, psi, divlji psi (kanidi) | Monocitna erlihioza kanida, erlihioza u ljudi* |
| <i>E. ewingii</i> | Granulociti | SAD, Afrika, Azija | <i>A. americanum</i> , <i>D. variabilis</i> | Ljudi, jeleni, psi (kanidi) | Humana ewingii-erlihioza (HEE), erlihioza kanida |
| <i>E. ruminantium</i> / srodnik <i>E. ruminantium</i> (Panola Mountain <i>Ehrlichia</i>) | Endotelne stanice, neutrofili, makrofagi | Afrika, Karibi | <i>Amblyomma variegatum</i> | Goveda, ovce, divlji preživači/ Ljudi, psi, koze, jeleni, ljudi | <i>Heartwater</i> u preživača, erlihioze u pasa* i ljudi* |
| <i>Neoehrlichia mikurensis</i> | Endotelne stanice, neutrofili? | Euroazija | <i>Ixodes ricinus</i> , <i>I. ovatus</i> , <i>I. persulcatus</i> , <i>Haemaphysalis concinna</i> | Mali glodavci, psi | Infekcije u ljudi* |
| <i>Neorickettsia sennetsu</i> | Monociti, makrofagi | Japan, jugoistočna Azija | Vjerojatno ingestija sirovih riba, trematode (?) | Ljudi | Humana vrućica sennetsu, glandularna vrućica |

* rijetki uzročnici bolesti

phagocytophilum; monocitima i makrofazima za *E. chaffeensis*. Monociti su rezistentni na infekciju *A. phagocytophilum*. *A. phagocytophilum* ima složeni negativni utjecaj na neutrofile u kojima se nalazi: slabi prijanjanje na epitelne receptore, smanjuje transendotelnu pokretljivost i oštećuje fagocitozu [25]. Uloga infekcije endotelnih stanica je moguća, ali nije definirana. *A. phagocytophilum* se prihvaća za ciljne stanice preko glikoproteinskog liganda-1 za P-selektin (PSGL-1) uz pomoć $\alpha(1,3)$ -fukoziltransferaze. Molekule koje sudjeluju u vezanju *E. chaffeensis* i *E. canis* za ciljne stanice nisu jasno definirane. Poznato je da značajnu ulogu imaju proteini TRP120 koji djeluju zajedno s proteinima domaćina koji su uključeni u prepisivanje i regulaciju te signalizaciju stanice, protok proteina i organizaciju citoskeleta; premještaju se u jezgru inficirane stanice gdje vežu DNK na mjestima koja su uslijed infekcije prepisana izmijenjeno, što omogućava reprogramiranje funkcija stanice domaćina. U stanice ulaze endocitozom

preko kaveola, udubljenja na površini stanice koja sadrže kaveolin – protein koji veže kolesterol. Kaveole imaju dvoslojnu ovojnica bogatu kolesterolom i glikolipidima. Nakon ulaska u stanicu stvaraju se unutarstanične vakuole ovijene membranom ili endosomi u kojima započinju procesi preživljavanja, što ih razlikuje od rikicija. Anaplazme su razvile mehanizme upravljanja endosomima i izbjegavanja spajanja s lizosomom [8, 26]. U endosomima anaplazme rastu i razmnožavaju se i u citoplazmi nastaju inkluzije ili mikrokolonije, koje se nazivaju morule (lat. *morus* = dud). Morule se mogu naći u preparatu razmaza krvi bojanjem po Romanovskom. Pojedinačne bakterije izlaze iz inficiranih stanica nakon citolize ili spajanja morula sa staničnom membranom.

Održavanje anaplazmi u stanici te izbjegavanje i preusmjeravanje staničnih procesa osigurava sekretorni sustav tipa IV koji ovisi o ATP i koji može dostaviti proteine ili DNK bakterije u eukariotsku stanicu [26–28]. Kompo-

nente sekretornog sustava utječu na aktivnost stanice domaćina te olakšavaju unutarstanično preživljavanje i rast bakterija, a vjerojatno i virulenciju. Poznati mehanizmi kojima *A. phagocytophilum* izbjegava unutarstaničnu obranu su izravna detoksifikacija superoksidnih aniona te sprečavanje ili inhibicija normalne apoptoze neutrofila djelovanjem na ekspresiju pro- i anti-apoptotičkih gena. U vakuolama *A. phagocytophilum* inhibira fagocitozu i sprečava spajanje neutrofilnih granula koje nose citokrom b sa sekretornim vezikulama. Vakuole izbjegavaju autofagiju i oponašaju reciklirane endosome. U osnovi, *A. phagocytophilum* preotima neutrofile reguliranjem ekspresije njihovih gena, uklanjanjem kisika i modifikacijom ključnih komponenata sustava nikotinamid-dinukleotid-fosfat (NADPH) oksidaze [8].

Paradoksalno, infekcija stimulira upalni odgovor uz aktivnost neutrofila, sekreciju kemokina i degranulaciju. Povećana proupalna aktivnost omogućava regrutiranje novih neutrofila i lokalizirano oštećenje tkiva što može egzacerbirati upalnu reakciju. Infekciju *A. phagocytophilum* u početku kontrolira interferon gama (IFN- γ), što potiče aktivaciju makrofaga te IL-12. Tijekom infekcije nastaje mnogo transkripcijskih i antigenskih varijanti koje potiču specifični imunosni odgovor i vjerojatno osiguravaju perzistenciju u rezervoarima, a moguće je i da imaju ulogu kod različitih kliničkih prezentacija kao i reinfekcija povezano s virulencijom. Genom *A. phagocytophilum* sadrži najmanje 100 gena koji kodiraju glavne površinske proteine koji su odgovorni za antigenske varijacije i adheziju za stanice domaćina [25].

Anaplazmoza i erlihioze su zoonoze koje imaju sezonsku pojavnost od proljeća do jeseni koja je povezana s aktivnostima krpelja [10, 23]. Anaplazme se pojavljuju u područjima koja su poznata kao endemska za lajmsku boreliozu i krpeljni meningoencefalitis budući da dijele istog prenositelja iz roda *Ixodes* spp. [29–32]. Krpelji se anaplazmama zaraze transstadijski, tj. tijekom prijelaza iz stadija larve u nimfu te nimfe u odrasli oblik, ali nema transovarijskog prijenosa, za razliku od borelija i virusa KME. Larve nisu inficirane već se zaraze tijekom hranjenja na zaraženoj životinji. Glavni poznati rezervoari za *A. phagocytophilum* su divlji glodavci, a za *E. chaffeensis* jeleni i srne. Bakterijemija ne traje dugo, tako da je upitna prisutnost perzistentnih infekcija u prirodnih domaćina kao izvora zaraze [24]. Tijekom bakterijemije moguć je prijenos krvlju, pa tako i transfuzijom ili transplantacijom [33]. Laboratorijski je dokazano da anaplazme mogu u preparatima transfuzijske krvi u hladnjaku preživjeti oko tjedan dana.

Klinička slika

Simptomi anaplazmoze i erlihioza su gotovo isti i bolesti se prema kliničkoj slici ne mogu razlikovati.

Većina bolesnika u Europi ima blagu kliničku sliku i spontano ozdravi i bez specifične terapije. Prevalencija prisutnih protutijela ukazuje na veću učestalost supkliničkih i asimptomatskih prezentacija bolesti. Kliničke manifestacije u većine bolesnika obično započinju oko 1–2 tjedna (7–30 dana) nakon ugriza krpelja kao bolest slična gripi s povišenom temperaturom, glavoboljom, malaksalosti i mijalgijom. Mučnina, povraćanje, proljev, kašalj, artralgijske i smetenost prisutni su u manje od polovice bolesnika. Osip se pojavljuje rijetko kao makulozni, makulopapulozni ili petehijalni češće u HME nego u HGA. Kada se osip pojavi u bolesnika s HGA posebna pozornost treba biti usmjerena na otkrivanje moguće koinfekcije s *B. burgdorferi* [9, 11, 16, 17, 21, 34–37].

Dijagnoza HGA ne može se postaviti klinički. Laboratorijski nalazi koji upućuju na moguću HGA su dominirajuća bicitopenija, tj. leukopenija (često sa skretanjem ulijevo) i trombocitopenija, uz povišene vrijednosti transaminaza, LDH, CPK i CRP (tablica 2.). Može se naći blaža anemija, češće u HME. Leukopenija je kod HGA uzrokovana limfopenijom ili neutropenijom. Limfopenija se pojavljuje u ranim fazama infekcije nakon čega se razvija limfocitoza s atipičnim limfocitima. Broj neutrofila u bolesnika s HGA u obrnutoj je korelaciji s duljinom trajanja bolesti, tako da se nakon četvrtog dana bolesti vidi manji broj neutrofila nego neposredno nakon infekcije. Kod sumnje na HGA/HME diferencijalnu krvnu sliku je potrebno odrediti manualno, jer diferencijacija na aparatu ne može razlikovati nezrele granularne od segmentiranih leukocita ili detektirati morule [11, 34].

Neurološki simptomi su iznimno rijetki i u HME se opisuju sporadično poremećaji svijesti, ukočenost vrata i klonusi. Likvorski nalaz u HGA s neurološkim simptomima je uredan dok se u infekcijama *E. chaffeensis* nalazi limfocitna pleocitoza i povišeni proteini. U bolesnika u SAD gdje se opisuju teži oblici bolesti, u 9 do 17 % opisuju se i komplikacije: sindrom respiratornog distresa, diseminirane intravaskularne koagulopatije, gastrointestinalna krvarenja, akutna renalna insuficijencija, meningoencefalitis te smrtni ishod. Nakon infekcije *E. chaffeensis* može se razviti hemofagocitna limfohistiocitoza [9, 11, 38].

Dijagnoza se postavlja prema kliničkim simptomima koje treba etiološki potvrditi, no terapija se ne smije odlagati zbog čekanja laboratorijskih nalaza ili zbog inicijalno negativnih rezultata. Diferencijalno dijagnostički treba isključiti krpeljni meningoencefalitis, lajmsku boreliozu, virusni meningitis, leptospirozu, sepsu, tularemiju i babezozu kao i virusne infekcije s osipom. Osip u HGA u Europi je rijedak. Isključiti treba rikecioze i hemoragijske vrućice s bubrežnim sindromom [34, 36].

Za postavljanje dijagnoze potrebno je sagledati sve podatke iz anamneze, a posebno podatak o ugrizu krpelja u endemskom području za lajmsku boreliozu i KME budući da je prenosilac isti. Postavljanje dijagnoze nije jedno-

Tablica 2. Klinički i laboratorijski nalazi u bolesnika s humanom granulocitnom anaplazmozom (HGA) i humanom monocitnom erlihiozom (HME) prema Dumleru (2005.) [9], Lotrič-Furlan (2006.) [34] i Benettu (2014.) [11]

Table 2. Clinical and laboratory findings in patients with human granulocytic anaplasmosis (HGA) and human monocytic ehrlichiosis (HME) according to Dumler (2005) [9], Lotrič-Furlan (2006) [34] and Bennett (2014) [11]

| Klinički i laboratorijski nalazi/ Clinical and laboratory findings | HGA | | | | HME |
|---|--|-------------------|-------------------------|----------------|----------------|
| | Sjeverna Amerika/ North America [9] | Europa/Europe [9] | Slovenija/Slovenia [34] | Bennett [11] | Bennett [11] |
| | % Mean | % Mean | % | Median % (IQR) | Median % (IQR) |
| Vrućica/Fever | 92 | 98 | 100 | 100 (92–100) | 96 (95–99) |
| Mijalgija/Myalgia | 79 | 65 | 79,2 | 77 (66–90) | 72 (69–72) |
| Glavobolja/Headache | 73 | 89 | 95,8 | 82 (62–93) | 68 (63–75) |
| Slabost/Malaise | 96 | 47 | 95,8 | 97 (90–98) | 77(73–80) |
| Mučnina/Nausea | 36 | 47 | 54,2 | 39 (35–50) | 57 (56–59) |
| Povraćanje/Vomiting | 34 | 19 | 29,2 | 22 (20–32) | 47 (37–56) |
| Proljev/Diarrhea | 22 | 10 | 20,8 | 22 (17–28) | 25 (20–31) |
| Kašalj/Cough | 22 | 10 | 25 | 27 (20–30) | 28 (26–31) |
| Artralgijske/Arthralgiae | 47 | 37 | 58,3 | | |
| Osip/Rash | 6 | 4 | 4,2 | 6 (3–10) | 26 (21–34) |
| Smetenost/Confusion | 17 | 0 | 33,3 | 17 (16–17) | 20 (19–22) |
| Leukopenija/Leukopenia | 50 | 47 | 66,7 | 55 (44–73) | 60 (60–71) |
| Trombocitopenija/ Thrombocytopenia | 72 | 64 | 83,3 | 75 (61–91) | 79(68–88) |
| Povišene AST/ALT* Elevated AST/ALT | 79 | 51 | 70,8 / 50,0 | 83 (69–100) | 88 (86–91) |
| Povišen kreatinin/ Elevated creatinine | 49 | 0 | 33,3 | 49 (25– 71) | 29 |

* ALT, alanin aminotransferaza; AST, aspartat aminotransferaza; IQR, interkvartilni raspon/interquartile range

stavno. Ključni su inicijalni simptomi i specifična dijagnostika, pa ako bolesnik ima vrućicu i simptome slične gripi do 30 dana nakon ugriza krpelja te ima nalaz bicitopenije, povišene jetrene enzime i CRP posumnjati treba na HGA i odmah započeti liječenje [11, 16, 17, 34, 39].

Liječenje

Liječenje treba započeti u svih bolesnika s anaplazmozom ili erlihiozama. Terapija izbora je doksiciklin 100 mg dva puta dnevno u trajanju od 7–10 dana, ovisno o težini bolesti, odnosno dok pacijent ne bude 3–5 dana afebrilan. Djeca teža od 45 kg liječe se također doksiciklinom, a manja djeca primaju 4 mg/kg na dan u dvije odvojene doze (do maksimalno 100 mg po dozi). Djeca od 8 godina i starija mogu se liječiti doksiciklinom kroz 10 dana. Prema preporukama američkog društva za infektivne bolesti (*Infectious Disease Society of America*) djeca mlađa od 8 godina s teškom kliničkom slikom, ali bez koinfekcije s borelijama mogu se liječiti doksiciklinom 4–5 dana ili do 3 dana nakon prestanka temperature. Učinak terapije vidi se

nakon 48 sati. Većina bolesnika ozdravi nakon terapije od 7 dana. Ako se dokaže koinfekcija s lajmskom boreliozom nakon završenog davanja doksiciklina liječenje treba nastaviti amoksicilinom (50 mg/kg na dan podijeljeno u 3 doze (maksimalno 500 mg po dozi) ili cefuroksim aksetilom (30 mg/kg na dan podijeljeno u 2 doze (maksimalno 500 mg po dozi)).

Alternativa doksiciklinu, u bolesnika s alergijom na tetracikline je rifampin (10 mg/kg dva puta dnevno, maksimalno 300 mg po dozi) kroz 7–10 dana premda su klinička iskustva skromna. Rifampin nije učinkovit u liječenju lajmske borelioze tako da je u slučajevima koinfekcije potrebno provesti adekvatno liječenje erythema migrans.

Trenutno ne postoje jasne preporuke za liječenje trudnica i iskustva s liječenjem su skromna. Iako se doksiciklin ne preporuča u trudnoći, procijeniti treba težinu bolesti i odluka o terapiji doksiciklinom ovisi je li bolest životno ugrožavajuća. Alternativa je rifampin. U neliječenih bolesnika trajanje bolesti je prosječno 9 dana (od 1–60 dana).

Prevenција anaplazmoze i erlihoze temelji se na izbjegavanju izlaganja krpeljima, korištenju repelenata protiv

krpelja na koži i odjeći te detaljnom pregledu cijelog tijela nakon boravka u prirodi u endemskim područjima i što ranijeg uklanjanja krpelja s tijela budući da se pokazalo da se *A. phagocytophilum* može prenijeti 4–48 sati nakon ugriza krpelja [24]. Profilaksa antibioticima se ne preporuča [9, 11, 13, 34, 35].

Mikrobiološka dijagnostika

Humana granulocitna anaplazmoza (HGA) i humana monocitna erlihioza (HME) klinički se ne mogu razlikovati, a uzrokuju ih različiti uzročnici koji se mogu dokazati samo specifičnim testovima prema definiranim dijagnostičkim kriterijima [36]. Etiološka dijagnostika za potvrdu dijagnoze HGA/HME temelji se na određivanju specifičnih protutijela u serumu, dokazu DNK metodama PCR, traženjem morula u mikroskopskom preparatu razmaza krvi, a postoje pokušaji kultivacije na staničnim kulturama [36, 39].

Rutinska dijagnostiku HGA ili HME je određivanje specifičnih protutijela u serumu metodom neizravne imunofluorescencije (*indirect immunofluorescent assay*, IFA). Imunoenzimski testovi postoje, ali daju samo kvalitativne rezultate. Većina bolesnika razvije jasni imunostni odgovor. Oko 24 sata nakon početka vrućice, odnosno treći do peti dan bolesti počinju se pojavljivati protutijela IgM i mogu se naći tijekom daljnjih 6–7 tjedana. Protutijela IgG pojavljuju se oko 7–10 dana nakon infekcije, dosežu vrh 14–21 dana kasnije i mogu perzistirati i u visokom titru [40, 41]. Pojava specifičnih protutijela ne korelira s nestankom uzročnika iz organizma ili sa stvaranjem trajne imunosti. Imunost nakon infekcije nije dugotrajna što ukazuje na mogućnost reinfekcija [42], a sigurnih podataka o mogućim perzistentnim ili kroničnim infekcijama u ljudi nema.

Za serološko testiranje neophodno je uzeti najmanje dva uzorka seruma. Prvi ili serum akutne faze treba uzeti na početku bolesti, a drugi ili rekonvalescentni, 2 do 3 ili 4 tjedna kasnije. Serološki kriteriji za potvrdu dijagnoze su serokonverzija i najmanje četverostruki porast titra protutijela IgG. Nalaz samo protutijela IgM nije dovoljan za postavljanje dijagnoze. Najčešći kriterij za pozitivni nalaz

IgG je titar 64. Nalaz protutijela IgG u titru 64 ili većem u samo jednom uzorku seruma smatra se pokazateljem infekcije nepoznate duljine trajanja budući da protutijela mogu biti detektabilna dvije do tri godine nakon infekcije. Nalaz protutijela u prvom serumu tijekom akutne infekcije obično je negativan u 90 % bolesnika. Serokonverzije u parnom serumu bilježi se u 27–37 % bolesnika za IgM i u 88–90 % za IgG. U Europi gotovo svi bolesnici imaju jasnu serološku potvrdu dijagnoze [34, 36]. Križne reakcije između protutijela na *A. phagocytophilum* i *E. chaffeensis* mogu dati lažno pozitivne serološke rezultate koji se mogu naći i u infekcijama *C. burnetii*, *R. rickettsii* i *R. typhi*. Sve serološke nalaze potrebno je interpretirati u skladu s kliničkom slikom, anamnestičkim i epidemiološkim kriterijima te prema rezultatima ostalih laboratorijskih pretraga.

Molekularne metode određivanja DNK metodama PCR iz krvi korisne su u akutnoj fazi bolesti, prva 2 tjedna nakon početka simptoma. Procjenjuje se da im je specifičnost i osjetljivost 67–90 % [13]. Rano uvođenje terapije može smanjiti osjetljivost tako da negativan nalaz PCR ne može sa sigurnošću isključiti dijagnozu. Potrebno je kombinirati metode PCR i serologije. Metode nisu standardizirane što predstavlja dodatni problem u interpretaciji rezultata [13, 36, 39, 43].

Dokazivanje antigena imunohistokemijskim metodama u uzorcima bioptata ili koštane srži te izolacija na staničnim kulturama koriste se iznimno rijetko, većinom u istraživačke svrhe. *A. phagocytophilum* uspjelo se kultivirati u kulturama stanica humane promijelocitne leukemije (HL-60) i na staničnim linijama krpeljnih embrija premda je metoda izrazito zahtjevna. U Europi nije opisana uspješna kultivacija *A. phagocytophilum*. Kultiviranje *E. chaffeensis* je još složenije. Rast *in vitro* traje 1(2) do 6 tjedana [44].

Za dokazivanje anaplazmi i erlihija u akutnoj ranoj febrilnoj fazi bolesti treba pokušati pronaći morule, tj. tipične nakupine u citoplazmi granulocita odnosno monocita, u preparatu krvi, koštane srži ili likvora obojanom po Wrightu, Giemsi ili Romanovskom. Nalaz ima visoku specifičnost, ali nisku osjetljivost koja je najveća tijekom prvog tjedna infekcije. Morule nisu specifične za vrstu anaplazmi. U Europi je prisutnost morula nađena u svega

Tablica 3. Kriteriji za dijagnozu humane granulocitne anaplazmoze

Table 3. Diagnostic criteria for human granulocytic anaplasmosis

| Dijagnoza humane granulocitne anaplazmoze/Diagnosis of human granulocytic anaplasmosis [36] | | |
|--|--|---|
| Potvrđena/Confirmed | Vjerojatna/Possible | Suspektna/Probable |
| Klinički simptomi + potvrđeni serološki rezultati: Serokonverzija ili najmanje četverostruki porast titra IgG između akutnog i rekonvalescentnog seruma koji su uzeti u razmaku od 2-3 tjedna | Klinički simptomi + moguće značajni serološki rezultat: Pozitivan titar IgG u jednom serumu | Pozitivan laboratorijski nalaz bez jasnih kliničkih pokazatelja |

nekoliko bolesnika od kojih je posebno zanimljiv prikaz bolesnice koja je dobila HGA transfuzijom krvi [33]. U pacijenata s HGA u SAD morule su nađene u 25–68 % slučajeva. Mogući su i lažno pozitivni nalazi mikroskopskog preparata zbog prisutnosti toksičnih granula ili Döhleovih tjelešaca koja se mogu zamijeniti za morule [43]. Stoga nalaz morula u mikroskopskom preparatu, bez dokaza specifičnih protutijela ili DNK, nije dovoljan kriterij za postavljanje dijagnoze.

Prema Europskim preporukama [36, 39] postavljanje dijagnoze HGA i započinjanje terapije primarno se temelji na kliničkoj prosudbi zbog ograničenja brze dijagnostike samog uzročnika (PCR) i negativnih specifičnih protutijela u akutnoj fazi bolesti. Stoga su utvrđeni kriteriji koji definiraju potvrđenu, vjerojatnu ili suspektu dijagnozu bolesti prikazani u tablici 3.

Epidemiologija

Anaplazmoza i erlihioze su zoonoze koje imaju sezonsku pojavnost od proljeća do jeseni koja je povezana s aktivnostima krpelja [10, 23]. Anaplazme se pojavljuju u područjima koja su poznata kao endemska za lajmsku boreliozu i krpeljni meningoencefalitis budući da dijele istog prenositelja iz roda *Ixodes* spp. [29–32, 45]. Krpelji se anaplazmama zaraze transstadijski, tj. tijekom prijelaza iz stadija larve u nimfu te nimfe u odrasli oblik, ali nema transovarijskog prijenosa, za razliku od borelija i virusa KME. Larve nisu inficirane već se zaraze tijekom hranjenja na zaraženoj životinji. Glavni poznati rezervoari za *A. phagocytophilum* su divlji glodavci, a za *E. chaffeensis* jeleni i srne. Bakterijemija ne traje dugo, tako da je upitna prisutnost perzistentnih infekcija u prirodnih domaćina kao izvora zaraze [24]. Tijekom bakterijemije moguć je prijenos krvlju, pa tako i transfuzijom ili transplantacijom [33]. Laboratorijski je dokazano da anaplazme mogu u preparatima transfuzijske krvi u hladnjaku preživjeti oko tjedan dana.

Materijali i metode

U razdoblju od 2009. do 2012. godine u Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević" u Zagrebu obrađeno je 496 seruma od 425 bolesnika upućenih na dijagnostiku humane granulocitne anaplazmoze. Parne uzorke seruma nužne za postavljanje dijagnoze imalo je samo 68 bolesnika. U svim serumima određena su protutijela IgM i IgG na *A. phagocytophilum* imunofluorescentnim testom (IFA) (*Anaplasma phagocytophilum* IFA IgM and IgG, Focus Diagnostics, SAD). U interpretaciji seroloških rezultata samo u jednom serumu bez testiranja parnog seruma, pozitivan nalaz IgM bez ili uz prisutnost IgG te titar protutijela IgG 256 ili veći uz negativan IgM interpretirao se kao moguće akutna HGA. Nalaz protutijela 64 ili veći ukazivao je na infekciju neodređenog trajanja – prošlu infekciju ili rani odgovor tijekom nedavne infekcije. Akutna HGA bila je dokazana ako je rezultat testiranja parnih seruma pokazao serokonveziju ili četverostruki ili veći porast titra protutijela.

Rezultati

Od 425 ispitanika u četverogodišnjem razdoblju od 2009. – 2012. godine, pozitivna protutijela na *A. phagocytophilum* imalo je 160 (37,6 %) bolesnika (tablica 4.). Tijekom godina zabilježen je porast broja ispitanika za koje se diferencijalno dijagnostički određivao serološki status za infekciju *A. phagocytophilum* što je vjerojatno rezultat porasta svijesti o značenju humane granulocitne anaplazmoze. Od 160 bolesnika s pozitivnim protutijelima, serološki potvrđenu akutnu HGA u parnim serumima imalo je troje (1,9 %) bolesnika. Nalaz IgM odnosno povišeni titar IgG samo u jednom serumu, što se može smatrati mogućom akutnom HGA imalo je 73 (17,2 %) ispitanika. Prema spolu veće razlike nisu nađene (tablica 5.). Najveći broj (88/160) ispitanika s pozitivnim protutijelima bio je u dobi od 31–60 godine (slika 1). Parni serum testiran je u 68

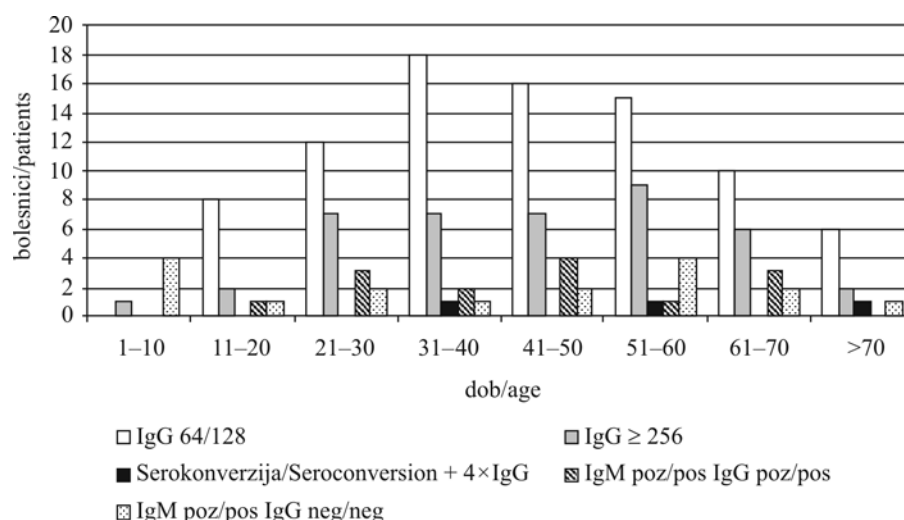
Tablica 4. Dijagnostika *A. phagocytophilum* u Republici Hrvatskoj od 2009. – 2012. godine

Table 4. *A. phagocytophilum* diagnostics in Croatia in the period from 2009 to 2012

| Godina/Year | IgG 64/128 | IgG ≥256 | Serokonverzija ili 4× IgG↑ / Seroconversion or 4× IgG↑ | IgM pozitivno/positive IgG pozitivno/positive | IgM pozitivno/positive IgG negativno/negative | Ukupno/ Total % |
|---------------|---------------|-------------|---|--|--|--------------------|
| 2009 | 3 | 1 | 1 | 1 | 0 | 6 / 38 15,8 % |
| 2010 | 15 | 6 | 0 | 6 | 12 | 39 / 116 33,6 % |
| 2011 | 23 | 8 | 1 | 2 | 4 | 38 / 95 40 % |
| 2012 | 43 | 25 | 1 | 7 | 1 | 77 / 176 43,8 % |
| Ukupno/ Total | 84 | 40 | 3 | 16 | 17 | 160/ 425 37,6 % |

Tablica 5. Rezultati serološkog testiranja *A. phagocytophilum* u Republici Hrvatskoj od 2009. – 2012. godine**Table 5.** *A. phagocytophilum* serological test results in Croatia in the period from 2009 to 2012

| Serološki rezultati/Serological results | Muškarci/Male | Žene/Female | Bolesnici/Patients (%) |
|---|---------------|-------------|------------------------|
| IgG 64/128 | 47 | 37 | 84 (19,8 %) |
| IgG ≥256 | 18 | 22 | 40 (9,4 %) |
| IgM + IgG pozitivno/positive | 7 | 9 | 16 (3,8 %) |
| IgM ≥20 / IgG negativno/negative | 8 | 9 | 17 (4 %) |
| Serokonverzija ili 4× ↑ IgG / Seroconversion or 4× ↑ IgG | 2 | 1 | 3 (0,7 %) |
| Pozitivno – ukupno/Positive – total | 82 | 78 | 160 (37,6 %) |
| Negativno/Negative | 138 | 127 | 265 (62,4 %) |
| Ukupno/Total | 220 | 205 | 425 |

**Slika 1.** Serološki status 160 bolesnika s pozitivnim protutijelima na *A. phagocytophilum* prema dobi**Figure 1.** Serological status in 160 patients with positive anti-*A. phagocytophilum* antibodies according to age

(16,0 %) bolesnika, a njih 30 je imalo pozitivan nalaz protutijela.

Rasprava

U radu su prikazani rezultati humane dijagnostike HGA u Hrvatskoj koja je u Klinici za infektivne bolesti u Zagrebu uvedena 2000. godine. U endemskim područjima za *I. ricinus* dokazana je prisutnost *A. phagocytophilum* u krpelja, malih glodavaca i divljih životinja, a nađena je i *N. mikurensis* [46] koja može biti uzročnik bolesti u ljudi [3, 4]. Rasprostranjenost krpelja u Hrvatskoj je različita, no prema raširenosti krpeljnog meningoencefalitisa i lajmske boreliozе koji se šire istim vektorom, mogu se pretpostaviti područja u kojima se može očekivati veći broj bolesnika s HGA [10, 45].

Prvi slučajevi bolesti HGA dokazani su u Koprivničko-križevačkoj županiji 1998.g [18, 19]. Broj bolesnika s dokazanom HGA je sporadičan [37]. Jedan od razloga je

vjerojatno blaga klinička slika i bolest koja prolazi spontano i bez ciljane terapije, a etiološka dijagnostika se ne napravi. Drugi mogući razlog je nedosljednost u dijagnostičkom postupku budući da je za potvrdu dijagnoze potrebno testirati parne serume oduzete u razmaku od najmanje dva tjedna, a po potrebi i duljem vremenskom intervalu. U dobrovoljnih davatelja krvi kao i u nekih bolesnika u Hrvatskoj pronađena su specifična protutijela, ponekad uz istovremeno prisutna protutijela na KME i *B. burgdorferi*. Prva analiza 20 bolesnika (13 s uputnom dijagnozom meningitisa; 5 s febrilnim stanjem i 2 upućena kao anaplazmoza) koji su bili liječeni u Klinici za infektivne bolesti, a u kojih se diferencijalno dijagnostički moglo raditi o HGA, rađena je 2000.g. Rezultati IFA testa za HGA pokazali su da je pet bolesnika imalo prisutna protutijela na *A. phagocytophilum*. Prema važećim dijagnostičkim kriterijima akutna anaplazmoza nije dokazana. U isto vrijeme testirali smo 51 dobrovoljnog davatelja krvi (DDK) iz Zagreba i 50 DDK iz Čakovca kao endemskog područja za KME i lajmsku bolest. Protutijela IgG na *A. phagocy-*

tophilum nađena su u 5 (9,8 %) DDK iz Zagreba i u dvoje (4,0 %) iz Čakovca [47, 48]. Spomenuti treba moguće lažno pozitivne rezultate IgM koji su nađeni u 3 DDK iz Zagreba. Kao mogući razlozi za lažno pozitivne rezultate navode se riketioze, Q-vrućica, EBV, borelijoza (no moguća je i dvojna infekcija) kao i autoimune bolesti. Opisuju se i mogući lažno negativni rezultati koji se mogu naći u nereaktora, ali i zbog antigeno različitih sojeva koji nisu pokriveni testovima, supresije stvaranja protutijela zbog rane terapije, za što nema jasnih dokaza, ili zbog neadekvatnog vremena uzimanja seruma (akutni, rekonvalescentni). Broj uzoraka koji se šalju na testiranje za HGA tijekom godina se blago povećava, premda je HGA još uvijek zanemarena bolest zbog očito blagog kliničkog tijeka [37], pa slijedom toga i nedostatnosti parnih seruma nužnih za postavljanje dijagnoze.

Seroprevalencija HGA u DDK u Europi iznosi 0–9 %, a u osoba izloženih krpeljima 1,5–21 % [9, 39, 40, 49–52] što se može povezati i s našim podacima. Seroprevalencija HGA u Sloveniji je 15,4 %. Istovremeno prevalencija *A. phagocytophilum* u krpelja kreće se od 0–66,7 %. Brojna istraživanja pokazala su da je *A. phagocytophilum* uobičajeni patogen koji se nalazi u glodavaca, malih sisavaca, divljih životinja, posebno srna i jelena, ali i domaćih goveda i ovaca, a glavni je prijenosnik krpelj [21]. Široka rasprostranjenost prirodnih domaćina i visoka prokuženost nije u korelaciji s relativno malim brojem registriranih oboljelih ljudi što upućuje da humane infekcije većinom prolaze neprepoznato. Čini se da je tijek bolesti u Europi značajno blaži nego u bolesnika u SAD [37]. Dokazane su različite varijante *A. phagocytophilum*. Njihova uloga nije sasvim jasna, a mogla bi biti značajna za reinfekcije [42], ali i kao moguće objašnjenje blagih kliničkih slika zbog slabije virulentnosti ili nepatogenog potencijala [20, 42, 53–57]. Između 4 % i 36 % bolesnika sa serološkim odgovorom na *A. phagocytophilum* imalo je istovremeno pokazatelje infekcije *Borrelia burgdorferi* te krpeljnog meningoencefalitisa (KME), a moguće su i koinfekcije s *Babesia microti*. [29–32]

Zaključak

Infekcije s *A. phagocytophilum* u Hrvatskoj većinom vjerojatno prolaze kao samoograničavajuće i nedokazane. Ako se radi o bolesniku u febrilnom stanju s bicitopenijom, povišenim transaminazama i CRP u vrijeme aktivnosti krpelja u diferencijalno-dijagnostičku analizu treba uključiti i HGA posebno u endemskim područjima za lajmsku boreliozu i KME. Značenje HGA kao emergentne infekcije u Hrvatskoj treba dalje pratiti.

Literatura

- [1] Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, et al. 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 phagocytophila. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 2145–65.

- [2] Ehrlichiosis and anaplasmosis: zoonotic species : Institute for International Cooperation in Animal Biologics, Iowa State University, College of Veterinary Medicine, 2013: www.cfsph.iastate.edu
- [3] Fertner ME, Molbak L, Boye Pihl TP, Fomsgaard A and Bodker R. First detection of tick-borne "Candidatus Neoehrlichia mikurensis" in Denmark 2011. *Euro Surveill* 2012; 17.
- [4] Fehr JS, Bloemberg GV, Ritter C, et al. Septicemia caused by tick-borne bacterial pathogen Candidatus Neoehrlichia mikurensis. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 1127–9.
- [5] Pritt B, Sloan LM, Hoang Johnson DK, Munderloh UG, Paskewitz SM, McElroy KM, McFadden JD, Binnicker MJ, Neitzel DF, Liu G, Nicholson WL, Nelson CM, Franson JJ, Martin SA, Cunningham SA, Steward CR, Bogumil K, Bjorgaard ME, Davis JP, McQuiston JH, Warshauer DM, Wilhelm MP, Patel R, Trivedi VA, Ereemeeva ME. Emergence of a new pathogenic Ehrlichia species, Wisconsin and Minnesota, 2009. *N Engl J Med* 2011; 365(5): 422–429.
- [6] Reeves W, Loftis AD, Nicholson WL, Czarkowski A. The first report of human illness associated with the Panola Mountain *Ehrlichia* species: a case report. *J Medical Care Reports* 2008; 2: 139–141.
- [7] Rar V, Golovljova I. Anaplasma, Ehrlichia, and "Candidatus Neoehrlichia" bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. *Infect Genet Evol* 2011; 11: 1842–61.
- [8] Rikihisa Y. Mechanisms of obligatory intracellular infection with Anaplasma phagocytophilum. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24: 469–89.
- [9] Dumler JS, Choi KS, Garcia-Garcia JC, et al. Human granulocytic anaplasmosis and Anaplasma phagocytophilum. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 1828–34.
- [10] Stuenkel S. Anaplasma phagocytophilum – the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Vet Res Commun* 2007; 31 Suppl 1: 79–84.
- [11] Dumler J, Walker DH. Ehrlichia chaffensis (Human Monocytotropic Ehrlichiosis), Anaplasma phagocytophilum (Human Granulocytotropic Anaplasmosis), and Other Anaplasmataceae. U: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, ur. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 8. izd. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2015, str. 2227-33.
- [12] Ismail N, Bloch KC and McBride JW. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clin Lab Med* 2011; 30: 261–92.
- [13] St Clair K, Decker CF. Ehrlichioses: anaplasmosis and human ehrlichiosis. *Dis Mon* 2012; 58: 346–54.
- [14] Olano JP, Walker DH. Human ehrlichioses. *Med Clin North Am* 2002; 86: 375–92.
- [15] Petrovec M, Lotric Furlan S, Avsic Zupanc T, Strle F, Brouqui P, Roux V, Dumler JS. Human disease in Europe caused by granulocytic Ehrlichia species. *J Clin Microbiol* 1997; 35(6): 1556–59.
- [16] Lotric-Furlan S, Petrovec M, Avsic-Zupanc T and Strle F. Human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. *Ann NY Acad Sci* 2003; 990: 279–84.
- [17] Lotric-Furlan S, Petrovec M, Avsic-Zupanc T and Strle F. Comparison of patients fulfilling criteria for confirmed and probable

- human granulocytic ehrlichiosis. *Scand J Infect Dis* 2004; 36: 817–22.
- [18] Mišić Majerus L, Bujčić N, Mađarić V, Avšič-Županc T, et al. Prvi opis humane erlichioze u Hrvatskoj. (First description of human ehrlichiosis in Croatia.). *Infektološki glasnik (Croatian Journal of Infection)* 1999; 19(3): 85–90.
- [19] Mišić Majerus L, Bujčić N, Mađarić V, Avšič-Županc T, Milinković S. Humana anaplazmoza (erlichioza) – prikaz bolesnika. *Acta Med Croatica* 2006; 60(5): 411–419.
- [20] Barakova I, Derdakova M, Carpi G, et al. Genetic and ecologic variability among *Anaplasma phagocytophilum* strains, northern Italy. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 1082–5.
- [21] Blanco JR, Oteo JA. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 763–72.
- [22] Parola P, Raoult D. Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 80–3.
- [23] Silaghi C, Woll D, Hamel D, Pfister K, Mahling M and Pfeiffer M. *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in questing ticks, ticks parasitizing rodents and the parasitized rodents—analyzing the host-pathogen-vector interface in a metropolitan area. *Parasit Vectors* 2012; 5: 191.
- [24] Katavolos P, Armstrong PM, Dawson JE and Telford SR, 3rd. Duration of tick attachment required for transmission of granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis* 1998; 177: 1422–5.
- [25] Yoshiie K, Kim HY, Mott J and Rikihisa Y. Intracellular infection by the human granulocytic ehrlichiosis agent inhibits human neutrophil apoptosis. *Infect Immun* 2000; 68: 1125–33.
- [26] Rikihisa Y, Lin M and Niu H. Type IV secretion in the obligatory intracellular bacterium *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell Microbiol* 2010; 12: 1213–21.
- [27] Al-Khedery B, Lundgren AM, Stuen S, et al. Structure of the type IV secretion system in different strains of *Anaplasma phagocytophilum*. *BMC Genomics* 2012; 13: 678.
- [28] Wallden K, Rivera-Calzada A and Waksman G. Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cell Microbiol* 2010; 12: 1203–12.
- [29] Koci J, Movila A, Taragel'ova V, et al. 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* 2007; 41: 147–52.
- [30] Majlathova V, Majlath I, Vichova B, et al. Polymerase chain reaction confirmation of *Babesia canis canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs suspected of babesiosis in Slovakia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11: 1447–51.
- [31] Moniuszko A, Dunaj J, Swiecicka I, et al. Co-infections with *Borrelia* species, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* spp. in patients with tick-borne encephalitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33: 1835–41.
- [32] Nadelman RB, Horowitz HW, Hsieh TC, et al. Simultaneous human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis. *N Engl J Med* 1997; 337: 27–30.
- [33] Jereb M, Pecaver B, Tomazic J, et al. Severe human granulocytic anaplasmosis transmitted by blood transfusion. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 1354–7.
- [34] Lotric-Furlan S, Rojko T, Petrovec M, Avsic-Zupanc T and Strle F. Epidemiological, clinical and laboratory characteristics of patients with human granulocytic anaplasmosis in Slovenia. *Wien Klin Wochenschr* 2006; 118: 708–13.
- [35] Strle F. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Int J Med Microbiol* 2004; 293 Suppl 37: 27–35.
- [36] Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 1108–32.
- [37] Kotarski V, Markotić A, Đaković Rode O, Andrašević S, Škerk V. Blagi klinički oblik humane granulocitne anaplazmoze. *Infektološki glasnik (Croatian Journal of Infection)* 2012; 32(1): 31–34.
- [38] Walker DH. Tick-transmitted infectious diseases in the United States. *Annu Rev Public Health* 1998; 19: 237–69.
- [39] Koebel C, Kern A, Edouard S, et al. Human granulocytic anaplasmosis in eastern France: clinical presentation and laboratory diagnosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 72: 214–8.
- [40] Wittesjö B, Bjoersdorff A, Eliasson I and Berglund J. First long-term study of the seroresponse to the agent of human granulocytic ehrlichiosis among residents of a tick-endemic area of Sweden. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 173–8.
- [41] Dawson JE, Fishbein DB, Eng TR, Redus MA and Green NR. Diagnosis of human ehrlichiosis with the indirect fluorescent antibody test: kinetics and specificity. *J Infect Dis* 1990; 162: 91–5.
- [42] Horowitz HW, Aguero-Rosenfeld M, Dumler JS, et al. Reinfection with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Ann Intern Med* 1998; 129: 461–3.
- [43] Dumler JS, Brouqui P. Molecular diagnosis of human granulocytic anaplasmosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4: 559–69.
- [44] Rikihisa Y. *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*: subversive manipulators of host cells. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8: 328–39.
- [45] Oteo JA, Blanco JR. Epidemiological importance of human ehrlichiosis in Europe. *Infektološki glasnik (Croatian Journal of Infection)* 2004; 24; 1: 5–10.
- [46] Beck R, Čubrić Ćurik V, Račić I, Šprem I, Vujnović A. Identification of "*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis" and *Anaplasma* species in wildlife from Croatia. *Parasit Vectors* 2014; 7 (suppl 1): O28.
- [47] Đaković Rode O, Golubić D. Humane erlichioze – mogućnosti laboratorijske dijagnostike. 64. znanstveno-stručni sastanak s međunarodnim sudjelovanjem. *Knjiga sažetaka. Varaždin, 2001: 10.*
- [48] Đaković Rode O, Golubić D, Boras A. Dijagnostika humane granulocitne erlichioze u Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihajević" u Zagrebu. 6. hrvatski kongres kliničke mikrobiologije s međunarodnim sudjelovanjem. *Zagreb: Program i knjiga sažetaka: 148–150, 2002.*
- [49] Chochlakis D, Papaeustathiou A, Minadakis G, Psaroulaki A and Tselentis Y. A serosurvey of *Anaplasma phagocytophilum* in blood donors in Crete, Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27: 473–5.
- [50] Cochez C, Ducoffre G, Vandenvelde C, Luyasu V and Heyman P. Human anaplasmosis in Belgium: a 10-year seroepidemiological study. *Ticks Tick Borne Dis* 2011; 2: 156–9.
- [51] Woessner R, Gaertner BC, Grauer MT, et al. Incidence and prevalence of infection with human granulocytic ehrlichiosis agent in Germany. A prospective study in young healthy subjects. *Infection* 2001; 29: 271–3.
- [52] Kowalski J, Hopfenmuller W, Fingerle V, et al. Seroprevalence of human granulocytic anaplasmosis in Berlin/Brandenburg, Germany: an 8-year survey. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 924–7.

- [53] Jahfari S, Coipan EC, Fonville M, et al. Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. *Parasit Vectors* 2014; 7: 365.
- [54] Smrdel KS, Petrovec M, Furlan SL and Zupan TA. The sequences of *groESL* operon of *Anaplasma phagocytophilum* among human patients in Slovenia. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; 64: 123–5.
- [55] Carpi G, Bertolotti L, Pecchioli E, Cagnacci F and Rizzoli A. *Anaplasma phagocytophilum groEL* gene heterogeneity in *Ixodes ricinus* larvae feeding on roe deer in Northeastern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009; 9: 179–84.
- [56] Derdakova M, Stefancikova A, Spitalska E, et al. Emergence and genetic variability of *Anaplasma* species in small ruminants and ticks from Central Europe. *Vet Microbiol* 2012; 153: 293–8.
- [57] Rar VA, Epikhina TI, Livanova NN, et al. Genetic variability of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes persulcatus* ticks and small mammals in the Asian part of Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11: 1013–21.