

**UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA**

**NEKATERE VEKTORSKO PRENOSLJIVE ZOONOZE
PRI PAŠNEM GOVEDU V SLOVENIJI**

**SELECTED VECTOR BORN ZOONOSES IN GRAZING
CATTLE IN SLOVENIA**

Boštjan Ošlak

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK: 636.2.09:579.62:57.083:616-097(043.2)

**NEKATERE VEKTORSKO PRENOSLJIVE ZOONOZE PRI
PAŠNEM GOVEDU V SLOVENIJI**

**SELECTED VECTOR BORN ZOONOSES IN GRAZING
CATTLE IN SLOVENIA**

Boštjan Ošlak

Delo je pripravljeno v skladu s Pravilnikom o podeljevanju Prešernovih nagrad študentom, pod mentorstvom izr. prof. dr. Jožeta Stariča na Kliniki za reprodukcijo in velike živali in somentorstvom znanstvenega sodelavca dr. Igorja Gruntarja na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani.

Ljubljana, 2017

POVZETEK

V raziskavi smo spremljali prisotnost *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia divergens* in *Borrelia burgdorferi* pri pašnem govedu v Sloveniji. Vsi trije povzročitelji se prenašajo s klopi in se pojavljajo v širokem spektru gostiteljev, tudi pri ljudeh. Okužbe z *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi* s.l. potekajo pri govedu asimptomatsko ali nespecifično, zato jih težko diagnosticiramo brez posebnih laboratorijskih testov. *B. divergens* pogosto povzroča klinično bolezen in jo zato lažje prepoznamo. Skupno smo pregledali kri in serum 291 govedi. Zbrali smo tudi 6 vzorcev goveda s klinično sliko, ki se pojavlja pri okužbah z *B. divergens*. Zbrane vzorce smo analizirali na hematološke parametre in testirali na prisotnost specifičnih IgG protiteles z indirektno imunofluorescenco. Rezultate smo obdelali z opisno statistiko, z ANOVA testom in s Hi-kvadrat testom. Statistično značilnost smo pripisali rezultatom, pri katerih je bil $p < 0,05$. Ugotovili smo 158/291 (54,64 %) živali je bilo serološko pozitivnih na *A. phagocytophilum*, 63/291 (21,65 %) živali je bilo serološko pozitivnih na *B. divergens*, 137/291 (47,08 %) živali je bilo serološko pozitivnih na *B. burgdorferi*. 58/291 (19,93 %) živali je bilo hkrati serološko pozitivnih na *A. phagocytophilum* in *B. divergens*, 72/291 (24,74 %) živali je bilo hkrati serološko pozitivnih na *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi*, ter 25/291 (8,59 %) je bilo serološko pozitivnih na vse tri povzročitelje hkrati.

Pri statistični analizi vpliva serološke pozitivnosti na hematološke parametre smo ugotovili značilne vplive na levkocite, eritrocite, hemoglobin, hematokrit, MCHC in trombocite.

Ključne besede: govedo; bolezni – epidemiologija; s klopi prenosljive bolezni – epidemiologija; anaplazmoza – diagnostika – kri; babezioza – diagnostika – kri; Lymska bolezen – diagnostika – kri; hematološki testi; serološki testi; fluorescenčno protitelo, tehnika indirektna; seroepidemiološke študije.

SUMMARAY

The aim of this study was to detect the presence of *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia divergens* and *Borrelia burgdorferi* in grazing cattle in Slovenia. All three agents are transmitted with ticks and appear in a wide range of hosts, including humans. Infections with *A. phagocytophilum* and *B. burgdorferi* s.l. in cattle is asymptomatic or non-specific, so they are difficult to diagnose without special laboratory tests. *B. divergens* often causes a clinical illness and is therefore easier to recognize. In total we examined the blood and serum of 291 cattle. We also collected 6 samples of cattle with a clinical picture that occurs in *B. divergens* infections. The collected samples were analyzed for haematological parameters and tested for the presence of specific IgGs with indirect immunofluorescence. The results were treated with descriptive statistics, ANOVA test, and a Hi-square test. The statistical significance was attributed to the results in which $p < 0.05$. 158/291 (54.64 %) of the animals were seropositive to *A. phagocytophilum*, 63/291 (21.65 %) of the animals were seropositive on *B. divergens*, 137/291 (47.08 %) of the animals were serologically positive for *B. burgdorferi*. 58/291 (19.93 %) of the animals were at the same time seropositive to *A. phagocytophilum* and *B. divergens*, 72/291 (24.74 %) of the animals were simultaneously seropositive to *A. phagocytophilum* and *B. burgdorferi*, and 25/291 (8.59 %) was serologically positive for all three pathogens simultaneously.

In the statistical analysis of the effect of serological positivity on hematologic parameters, we found significant effects on leukocytes, erythrocytes, hemoglobin, hematocrit and MCHC.

Keywords: Cattle diseases – epidemiology; tick borne diseases – epidemiology; anaplasmosis – diagnostics – blood; babesiosis – diagnostics – blood; Lyme disease – diagnostics – blood; hematological tests; serological tests; fluorescent antibody, technique indirect; seroepidemiologic study

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	II
SUMMARAY.....	III
KAZALO VSEBINE.....	IV
KAZALO TABEL.....	VIII
KAZALO SLIK.....	XII
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV.....	XV
1 UVOD.....	1
1.1 Opredelitev problema	1
1.2 Cilj raziskovanja	1
1.3 Delovne hipoteze	2
2 PREGLED LITERATURE	3
2.1 Anaplazmoza	3
2.1.1 Vektorji, taksonomija in nekatere vrste <i>Anaplasma spp.</i>	3
2.1.2 Zgodovina <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	3
2.1.3 Značilnosti <i>A. phagocytophilum</i> in njeni gostitelji.....	4
2.1.3.1 Patogeneza.....	5
2.1.3.2 Klinična slika.....	5
2.1.3.3 Diagnostika <i>A. phagocytophilum</i>	6
2.1.3.4 Zdravljenje okužb z <i>A. phagocytophilum</i>	6
2.1.3.5 Preventiva.....	6
2.1.4 Razvojni krog	7
2.1.5 Govedo in <i>Anaplasma spp.</i>	7
2.1.6 Imunski odziv gostitelja	7
2.1.7 Ekotipi <i>A. phagocytophilum</i>	8
2.1.8 Anaplazmoza kot zoonoza.....	10

2.1.8.1	Klinična slika pri ljudeh	10
2.1.8.2	Diagnostika in zdravljenje.....	11
2.1.8.3	Humana granulocitna anaplazmoza v Sloveniji.....	11
2.1.8.4	Anaplazmoza pri živalih v Sloveniji	12
2.2	Babezioza.....	13
2.2.1	Taksonomija, vektorji in gostitelji.....	13
2.2.2	Zgodovina.....	13
2.2.3	Pomembnejše vrste <i>Babesia spp.</i>	13
2.2.4	Razvojni krog	15
2.2.5	Imunski odziv gostitelja	16
2.2.6	Govedo in <i>Babesia spp.</i>	18
2.2.6.1	Patogeneza.....	18
2.2.6.2	Klinična slika.....	18
2.2.6.3	Postavitev diagnoze.....	18
2.2.7	Ekonomski vpliv <i>Babesia spp.</i>	19
2.2.8	<i>Babesia divergens</i>	20
2.2.9	Zdravljenje <i>Babesia spp.</i>	20
2.2.10	Preventiva	21
2.2.11	<i>Babesia spp.</i> kot zoonoza	21
2.2.11.1	Patogeneza.....	23
2.2.11.2	Klinični znaki pri ljudeh.....	23
2.2.11.3	Diagnostika in zdravljenje.....	23
2.3	Borelioza.....	25
2.3.1	Zgodovina Lymške borelioze	25
2.3.2	Skupina <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	25
2.3.3	Prenos in gostitelji	25

2.3.4	Imunski odziv gostitelja	26
2.3.5	Potek bolezni	27
2.3.6	Diagnostika.....	27
2.3.7	<i>Borrelia burgdorferi</i> pri ljudeh	28
2.3.8	<i>Borrelia burgdorferi</i> pri ljudeh v Sloveniji	29
2.3.9	Stanje pri živalih v Sloveniji	30
2.4	Serološka diagnostika s pomočjo imunofluorescenčne tehnike.....	31
3	MATERIALI IN METODE	32
3.1	Materiali.....	32
3.1.1	Živali, vključene v raziskavo.....	32
3.1.2	Vzorčenje in odvzem vzorcev	32
3.1.3	Priprava vzorcev v laboratoriju	33
3.2	Metode analize vzorcev	34
3.2.1	Krvni razmazi	34
3.2.2	Serologija.....	35
3.2.3	Statistična analiza	37
4	REZULTATI	38
4.1	Dvojno vzorčenje 28 živali pred in po paši	38
4.2	Klinično pozitivni vzorci na <i>B. divergens</i>	40
4.3	Rezultati seroloških preiskav 291 vzorcev	42
4.4	Rezultati hematologije 291 vzorcev.....	45
4.5	Geografska lokacija serološko pozitivnih živali	46
4.6	Vpliv serološke pozitivnosti (<i>Babesia</i> , <i>Anaplasma</i> in <i>Borrelia</i>) na krvno sliko krav	49
4.6.1	Vpliv na levkocite.....	49
4.6.2	Vpliv na eritrocite	51
4.6.3	Vpliv na hemoglobin	53

4.6.4	Vpliv na hematokrit	54
4.6.5	Vpliv na MCV	56
4.6.6	Vpliv na MCH	57
4.6.7	Vpliv na MCHC	58
4.6.8	Vpliv na trombocite	59
5	RAZPRAVA.....	62
6	SKLEPI.....	65
6.1	Delovne hipoteze	65
6.2	Drugi sklepi.....	66
7	POVZETEK	67
8	ZAHVALA.....	69
9	LITERATURA.....	71
10	PRILOGE	75

KAZALO TABEL

Tabela 1: Nekatere vrste <i>Anaplasma spp.</i> in njihovi gostitelji (povzeto po Atif, 2015)	
Table 1: Some species of <i>Anaplasma spp.</i> and their hosts (summarized by Atifu, 2015)	3
Tabela 2: Klinični znaki pri nekaterih živalskih vrstah (povzeto po Stuen in sod., 2013)	
Table 2: Clinical signs in some animal species (summarized by Stuen et al., 2013)	5
Tabela 3: Rezultati analiz študije Jahfarija s sodelavci (2014)	
Table 3: Results of the study of Jahfari and colleagues (2014)	8
Tabela 4: Občutljivost metode dokazovanja <i>A. phagocytophilum</i> glede na čas trajanja bolezni pri ljudeh (Bakken in Dumler, 2006)	
Table 4: Sensitivity of the methods for <i>A. phagocytophilum</i> detection in addition to the duration of human disease (Bakken and Dumler, 2006)	11
Tabela 5: Prisotnost specifičnih protiteles <i>A. phagocytophilum</i> pri divjih živalih v Sloveniji (Žele s sod., 2012)	
Table 5: Presence of specific <i>A. phagocytophilum</i> antibodies in wild animals in Slovenia (Žele et al., 2012)	12
Tabela 6: Nekatere vrste <i>Babesia spp.</i> , njihovi gostitelji in geografska razširjenost (Povzeto po Ulienberga, 2006; Bock in sod., 2004)	
Table 6: Some species of <i>Babesia spp.</i> , their hosts and geographical distribution (Summarized by Ulienberga, 2006; Bock et al., 2004)	14
Tabela 7: Pojavnost dokumentirane babezioze pri ljudeh (povzeto po Gray in sod., 2010)	
Table 7: Occurrence of documented babesiosis in humans (summarized by Gray et al., 2010)	22
Tabela 8: Različne oblike obolenj pri okužbi z <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. v Evropi (Gray in sod., 2002).	
Table 8: Different forms of disease in <i>Borrelia burgdorferi</i> infection in Europe (Gray et al., 2002)	29

Tabela 9: Prijavljeni primeri Lymške borelioze v Sloveniji glede na klinično sliko v letih 2011–2015 (Sočan in sod., 2016)

Table 9: Reported cases of Lyme borelliosis in Slovenia according to the clinical picture in the years 2011–2015 (Sočan et al., 2016)..... 29

Tabela 10: Pojavnost Lymške borelioze v Sloveniji v letih 2014 in 2015 po regijah (Sočan in sod., 2016).

Table 10: Appearance of Lyme borreliosis in Slovenia in 2014 and 2015 by region (Sočan et al., 2016)..... 30

Tabela 11: Število seropozitivnih oz. negativnih živali pred oz. po pašni sezoni posameznega povzročitelja

Table 11: Number of seropositive or Negative animals before or After the grazing season of the individual agent 38

Tabela 12: Število seropozitivnih oz. negativnih živali pred oz. po pašni sezoni za dva oz. vse tri povzročitelje

Table 12: Number of seropositive or Negative animals before or After the grazing season for two or All three agents..... 39

Tabela 13: Diferencialna bela krvna slika klinično bolnih živali s sumom na *B. divergens*

Table 13: Differential white blood count of clinically ill animals with a suspicion of *B. divergens*..... 41

Tabela 14: Referenčne vrednosti parametrov bele krvne slike pri govedu Laboratorija za klinično patologijo (KRVŽ) Veterinarske fakultete

Table 14: Reference values of white blood cell parameters in cattle Laboratory for clinical pathology Veterinary faculty 42

Tabela 15: Število živali, ki so bile serološko pozitivne na različne povzročitelje

Table 15: Number of animals serologically positive for different pathogens 44

Tabela 16: Referenčne vrednoti hematoloških parametrov Laboratorija za klinično patologijo(KRVŽ) Veterinarske fakultete	
Table 16: Reference values of hematological parameters Laboratory for Clinical Pathology Veterinary faculty	46
Tabela 17: Opisna statistika števila levkocitov pri serološko pozitivnih in negativnih živalih	
Table 17: Descriptive statistics on the number of leukocytes in serologically positive and negative animals	50
Tabela 18: Statistično značilne razlike števila levkocitov	
Table 18: Statistically significant differences in the number of leukocytes.....	50
Tabela 19: Opisna statistika števila eritrocitov pri serološko pozitivnih in negativnih živalih	
Table 19: Descriptive statistics on the number of erythrocytes in seropositive and negative animals.....	52
Tabela 20: Statistično značilne razlike števila eritrocitov	
Table 20: Statistically significant differences in the number of erythrocytes	52
Tabela 21: Opisna statistika hemoglobina pri serološko pozitivnih in negativnih živalih	
Table 21: Descriptive statistics of hemoglobin in serologically positive and negative animals	53
Tabela 22: Statistično značilne razlike koncentracije hemoglobina	
Table 22: Statistically significant differences in hemoglobin concentration	54
Tabela 23: Opisna statistika hematokrita pri serološko pozitivnih in negativnih živalih	
Table 23: Descriptive statistics of hematocrit in serologically positive and negative animals	55
Tabela 24: Statistično značilne razlike hematokrita	
Table 24: Statistically significant differences in hematocrit	55
Tabela 25: Opisna statistika MCV pri serološko pozitivnih in negativnih živalih	
Table 25: Descriptive MCV statistics for serologically positive and negative animals.....	56

Tabela 26: Opisna statistika števila MCH pri serološko pozitivnih in negativnih živalih	
Table 26: Descriptive statistics on the number of MCH in serologically positive and negative animals.....	57
Tabela 27: Opisna statistika MCHC pri serološko pozitivnih in negativnih živalih	
Table 27: Descriptive MCHC statistics for serologically positive and negative animals	58
Tabela 28: Statistično značilne razlike števila MCHC	
Table 28: Statistically significant differences in the number of MCHCs.....	59
Tabela 29: Opisna statistika števila trombocitov pri serološko pozitivnih in negativnih živalih	
Table 29: Descriptive statistics on the number of platelets in seropositive and seronegative animals.....	60
Tabela 30: Statistično značilne razlike števila trombocitov	
Table 30: Statistically significant differences in the number of platelets.....	60
Tabela 31: Rezultati vseh preiskav opravljenih pri govedu uporabljenih v Prešernovi nalogi (zeleno obarvane vrstice so klinično bolne živali)	
Table 31: Results of all investigations carried out in cattle used in Prešeren's task (green colored rows are clinically related animals)	75

KAZALO SLIK

Slika 1: <i>Anaplasma phagocytophilum</i> (Morula) v nevtrofilcu (Slika A) in limfocitu (Slika B) pobarvanem po Giemsi, povečava 10 x 100 (Henniger in sod., 2013)	
Figure 1: <i>Anaplasma phagocytophilum</i> (Morulae) in neutrophil (Figure A) and lymphocytes (Fig. B) painted by Giemsa, magnification 10 x 100 (Henniger et al., 2013).....	4
Slika 2: Filogenetsko drevo <i>A. phagocytophilum</i> (Jahfari in sod., 2014)	
Figure 2: Phylogenetic tree of <i>A. phagocytophilum</i> (Jahfari et al., 2014).....	9
Slika 3: Nahajališča posameznih ekotipov <i>A. phagocytophilum</i> (Jahfari in sod., 2014)	
Figure 3: Locations of individual ecotypes of <i>A. phagocytophilum</i> (Jahfari et al., 2014).....	10
Slika 4: Razvojni krog <i>B. bigemina</i> pri govedu in vektorju klopu, vrste <i>Boophilus microplus</i> (Bock in sod., 2004)	
Figure 4: <i>B. bigemine</i> development cycle in cattle and bone vector, <i>Boophilus microplus</i> species (Bock et al., 2004).....	16
Slika 5: Shema imunskega odziva gostitelja (Homer in sod., 2000)	
Figure 5: A host immune response scheme (Homer et al., 2000)	17
Slika 6: Lokacije, kjer so bili pobrani vzorci (vir: https://www.google.si/maps)	
Figure 6: Sampling locations (source: https://www.google.com/maps)	32
Slika 7: Vzorci seruma pred zamrznitvijo (Foto: Ošlak)	
Figure 7: Serum samples befor freezing (Photo: Ošlak)	33
Slika 8: Hematološki števec scil Vet abc Plus+ (Horiba, Nemčija) (Foto: Ošlak)	
Figure 8: Hematology counter Vet abc Plus + (Horiba, Germany) (Photo: Ošlak)	34
Slika 9: Uporabljena stekelca za ugotavljanje protiteles proti <i>A. phagocytophilum</i> (A), <i>B. divergens</i> (B) in <i>B. burgdorferi</i> (C) (Foto: Ošlak)	
Figure 9: Antibody detection slides for <i>A. phagocytophilum</i> (A), <i>B. divergens</i> (B) in <i>B. burgdorferi</i> (C) (Foto: Ošlak).....	35
Slika 10: Priprava redčitev seruma (Foto: Ošlak)	
Figure 10: Preparation of serum dilutions (Photo: Ošlak).....	36

Slika 11: Stekelca pripravljena za inkubacijo (Foto: Ošlak)	
Figure 11: Slides ready for incubation (Photo: Ošlak)	36
Slika 12: Spiranje stekelc s PBS (Foto: Ošlak)	
Figure 12: Washing of slides with PBS (Photo: Ošlak)	37
Slika 13: Shematski prikaz števila serološko pozitivnih živali glede na število različnih povzročiteljev po pašni sezoni (dvakratno vzorčenje 28 živali: pred in po pašni sezoni)	
Figure 13: Schematic representation of the number of serologically positive animals, according to the number of different pathogens after the grazing season (28 animals were sampled before and after the grazing season).....	40
Slika 14: Lokacije gospodarstev s klinično pozitivnimi živalmi na babeziozo (vir: https://www.google.si/maps)	
Figure 14: Locations of clinically positive animals for babesiosis (source: https://www.google.com/maps).....	40
Slika 15: <i>B. divergens</i> (puščice) v eritrocitih (Foto: Ošlak)	
Figure 15: <i>B. divergens</i> (arrows) in erythrocytes (Photo: Ošlak)	41
Slika 16: Shematski prikaz števila serološko pozitivnih živali	
Figure 16: Schematic representation of the number of serologically positive animals.....	43
Slika 17: Odstotek serološko pozitivnih živali na izključno enega oz. dva oz. vse tri povzročitelje	
Figure 17: The percentage of animals serologically positive exclusively on one or two or all three pathogens	45
Slika 18: Lokacije gospodarstev s serološko pozitivnim govedom na <i>A. phagocytophilum</i> (vir: https://www.google.si/maps)	
Figure 18: Locations of seropositive cattle on <i>A. phagocytophilum</i> (source: https://www.google.com/maps).....	47

Slika 19: Lokacije gospodarstev s serološko pozitivnim govedom na *B. divergens* (vir:
<https://www.google.si/maps>)

Figure 19: Locations of serologically positive cattle on *B. divergens* (source:

<https://www.google.com/maps>)..... 48

Slika 20: Lokacije gospodarstev s serološko pozitivnim govedom na *B. burgdorferi* (vir:
<https://www.google.si/maps>)

Figure 20: Locations of holdings with serologically positive cattle on *B. burgdorferi* (source:

<https://www.google.com/maps>)..... 49

Slika 21: Grafični prikaz števila levkocitov

Figure 21: A graphical representation of leukocytes count..... 51

Slika 22: Grafični prikaz števila eritrocitov

Figure 22: A graphical representation of erythrocytes count 53

Slika 23: Grafični prikaz vrednosti hemoglobina

Figure 23: Graphical presentation of hemoglobin values..... 54

Slika 24: Grafični prikaz vrednosti hematokrita

Figure 24: Graphical presentation of hematocrit values..... 56

Slika 25: Grafični prikaz vrednosti MCV

Figure 25: Graphical display of MCV values..... 57

Slika 26: Grafični prikaz vrednosti MCH

Figure 26: Graphical display of the MCH values..... 58

Slika 27: Grafični prikaz vrednosti MCHC

Figure 27: Graphical representation of MCHC values 59

Slika 28: Grafični prikaz števila trombocitov

Table 28: A graphical representation of platelet count..... 61

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

DNK – deoksiribonukleinska kislina
EDTA – etilendiamintetraocetna kislina
ELISA – encimska imunoadsorpcijska preiskava
groEl – bakterijski protein
HGA – humana granulocitna anaplazmoza
HGE – humana granulocitna erlihioza
IFAT – indirektna imunofluoresca
IFN- γ – interferon gama
IgG – protitelesa tipa G
IL-6 – interlevkin 6
IL-8 – interlevkin 8
kg – kilogram
MyD88 – primarni diferenciacijski mieloini odzivni protein
mg – miligram
NF-kB – jedrni faktor kapa B
NIJZ – Nacionalni inštitut za javno zdravje
NO – dušikov oksid
OspA – opsonin A
OspB – opsonin B
PAMPs-s – patogeni povezani molekularni vzorec
PBS – raztopina fosfatnega pufra
PCR – verižna reakcija s polimerazo
PRRs – prepoznavni receptor prirojenega imunskega sistema
ROS – reaktivne kisikove vrste
rRNA – ribosomalna ribonukleinska kislina
Scid – severe combined immunodeficiency
qPCR – kvantitativna verižna reakcija s polimerazo
TBF – klopna vročica "Tick-borne fever"
TNF - tumor nekrotizirajoči faktor
TNF- α – tumor nekrotizirajoči faktor alfa
TLRs – bakterijski membranski protein

TRL2 – vrsta receptorja imunskega sistema

1 UVOD

Anaplazmoza (*Anaplasma phagocytophilum*), babezioza (*Babesia divergens*) in Lymška borelioza (*Borrelia burgdorferi* s.l.) so vektorsko prenosljive bolezni goveda, ki se v Evropi prenašajo s klopi vrste *Ixodes ricinus*. Vse tri okužbe se pojavljajo pri širokem spektru gostiteljev. Vse so zoonoze, ki se lahko prenašajo z goveda na ljudi preko klopov. Kljub temu, da Slovenija predstavlja področje, kjer je Lymška borelioza endemična, kjer je bila granulocitna anaplazmoza pri ljudeh prvič opisana v Evropi in kjer je razširjenost klopov iz roda *Ixodes* vsesplošna, pa je raziskav o klopno prenosljivih boleznih pri živalih izredno malo. Potek okužb goveda z *Anaplasma phagocytophilum* in *Borrelia burgdorferi* s.l. je nespecifičen in jih zato težko diagnosticiramo brez posebnih laboratorijskih testov. Klinične primere babezioze ugotavljamo vsako leto. Okužbe z omenjenimi mikroorganizmi imajo lahko vpliv na dobro počutje in produktivnost goveda, babezioza goveda pa je življenjsko nevarna (Stuen, 2007; Stuen, 2013; Homer in sod., 2000; Borko, 1999)

1.1 Opredelitev problema

Kljub temu, da Slovenija predstavlja področje, kjer je razširjenost klopov iz roda *Ixodes* vsesplošna, kjer je Lymška borelioza pri ljudeh endemična in kjer je bila granulocitna anaplazmoza pri ljudeh opisana prvič v Evropi, pa je raziskav o klopno prenosljivih boleznih pri živalih relativno malo. Do sedaj je bilo objavljenih zelo malo študij, ki so preučevale bolezni, ki se prenašajo s klopi pri živalih v Sloveniji. *A. phagocytophilum* je bila potrjena pri psih (Ravnik, 2012). Klinična poročila o babeziozi (*B. divergens*) pri govedu obstajajo na Veterinarski fakulteti. Okužba z *B. burgdorferi* s. l. je bila serološko potrjena pri psih, konjih in divjadi. V eni študiji so bile spirohete Lymške borelioze potrjene tudi pri govedu (Borko, 1999; Sočan in sod., 2016)

1.2 Cilj raziskovanja

Namen raziskave je bil dokazati prisotnost *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia divergens* in *Borrelia burgdorferi* pri pašnem govedu v Sloveniji in določiti okvirna področja, kjer se ti povzročitelji pojavljajo, pri serološko pozitivnem govedu pa ugotoviti, če serološka pozitivnost na omenjene povzročitelje vpliva na krvne parametre goveda.

1.3 Delovne hipoteze

1. *Anaplasma phagocytophilum* je prisotna pri govedu v Sloveniji.
2. *Babesia divergens* je prisotna pri govedu v Sloveniji.
3. *Borrelia burgdorferi s.l.* je prisotna pri govedu v Sloveniji.
4. Pojavnost povzročiteljev je enakomerna po celotni Sloveniji.
5. Serološka pozitivnost goveda na *Anaplasma phagocytophilum* ali *Babesia divergens* ali *Borrelia burgdorferi s.l.* vpliva na hematološke vrednosti.

2 PREGLED LITERATURE

2.1 Anaplazmoza

2.1.1 Vektorji, taksonomija in nekatere vrste *Anaplasma spp.*

Anaplazmoza je obolenje, ki ga povzročajo bakterije iz rodu *Anaplasma spp.* Med sesalci se prenaša s pomočjo krvosesihih vektorjev, predvsem klopov, ki spadajo v rod *Ixodes*. V Evropi je najpogostejši vektor *A. phagocytophilum* *Ixodes ricinus* (Atif, 2015).

Povzročajo subklinična in klinična obolenja, ki se lahko končajo tudi s poginom. Najdemo jih pri živalih in ljudeh (Stuen, 2007; Stuen, 2013).

Anaplasma spada v rod *Anaplasma*, družino *Anaplasmataceae*, red *Rickettsiales*, razred *Alphaproteobacteria*, deblo *Proteobacteria* in kraljestvo *Bacteria*. V Tabeli 1 so prikazane nekatere vrste *Anaplasma spp.* ter vrste živali, pri katerih povzročajo obolenje (Atif, 2015).

Tabela 1: Nekatere vrste *Anaplasma spp.* in njihovi gostitelji (povzeto po Atif, 2015)

Table 1: Some species of *Anaplasma spp.* and their hosts (summarized by Atifu, 2015)

<i>Anaplasma</i>	Gostitelj
<i>A. marginale</i>	Govedo
<i>A. centrale</i>	Govedo
<i>A. bovis</i>	Govedo
<i>A. ovis</i>	Ovce, koze
<i>A. platys</i>	Psi
<i>Aegyptianella pullorum</i>	Ptice
<i>A. phagocytophilum</i>	Številne živalske vrste: prežvekovalci, mali sesalci, konji, ptice in ljudje

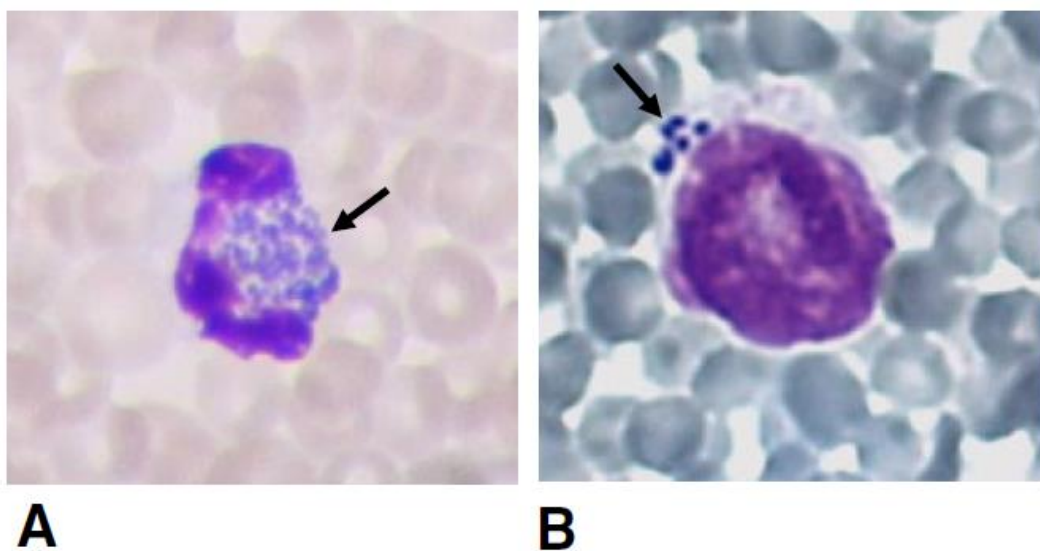
2.1.2 Zgodovina *Anaplasma phagocytophilum*

Prvi zapisi o tako imenovani "Tick-borne fever" (TBF), ki jo povzroča *Anaplasma phagocytophilum*, segajo v leto 1932 (Woldehiwet, 2010). Pri študijah vrtočlovosti ovac je nekaj ovac, ki so se pasle na travnikih, kjer so bili prisotni klopi, imelo povišano telesno temperaturo iz neznanega razloga. Povišana telesna temperatura se je pojavila tudi pri ovcah, ki so prejele transfuzijo kri živali, ki so imele povišano telesno temperaturo. Zaradi pojava povišane telesne temperature so bolezen poimenovali "klopna vročica" (Tick-borne fever (TBF)) (Stuen, 2013).

Podobno obolenje je bilo opisano v Ameriki leta 1969 pri konju in leta 1971 ter leta 1982 pri psih. Do odkritja humane granulocitne anaplazmoze v ZDA leta 1994 so domnevali, da je anaplazmoza bakterijsko obolenje, ki prizadene samo določene domače in divje živali (Woldehiwet, 2010).

2.1.3 Značilnosti *A. phagocytophilum* in njeni gostitelji

A. phagocytophilum je alfa pleomorfna gram negativna bakterija velikosti 0,4–2 μm . Je intracelularna bakterija, ki se po barvanju Romanowsky obarva škrlatno v barvi murve. Te obarvane strukture v celici so mikrokolonije, ki jih imenujemo morule. Morule imajo premer od 1,5–6 μm .



Slika 1: *Anaplasma phagocytophilum* (Morula) v nevtrofilcu (Slika A) in limfocitu (Slika B) pobarvanem po Giemsi, povečava 10 x 100 (Henniger in sod., 2013)

Figure 1: *Anaplasma phagocytophilum* (Morulae) in neutrophil (Figure A) and lymphocytes (Fig. B) painted by Giemsa, magnification 10 x 100 (Henniger et al., 2013)

Različni serotipi se pojavljajo kot povzročitelji kliničnih in subkliničnih obolenj pri različnih živalskih vrstah. Glavni gostitelji so govedo in ovce, najdemo jo tudi pri kozah, konjih, oslih, psih, mačkah in divjih prežvekovalcih. Ugotovljena je bila tudi pri malih sesalcih. Obolenja se pojavljajo v Evropi, Severni in Južni Ameriki, Aziji in Afriki. Bolezen je endemična in potencialno endemična v 48 državah sveta (Atif, 2015).

2.1.3.1 Patogeneza

Sama patogeneza *A. phagocytophilum* v začetni fazi okužbe še ni čisto pojasnjena. Eno izmed glavnih vprašanj, ki se postavlja, je, kje se bakterija množi v času vstopa v dermis in do takrat, ko nastopi bakteriemija, saj jo do razvoja bakteriemije ni možno zaznati. Tudi pri poskusu, kjer so živalim vbrizgali okuženo kri, bakteriemije ni bilo mogoče zaznati 72–96 ur. Zato prevladuje mnenje, da število bakterij ostaja zelo majhno, pod ravno detekcije, in da se mora bakterija množiti v drugih celicah do razvoja bakteriemije. Obstajajo različne domneve, po katerih bi se lahko bakterije množile v pljučih, vranici in kostnem mozgu. Prav tako so dokazali, da naj bi v *in vitro* pogojih mikrovaskularne endotelne celice spodbujale rast *A. phagocytophilum*, ki povzroča humano granulocitno anaplazmozo (HGA), vendar pa ostaja odprto vprašanje, če celice v *in vivo* pogojih prav tako pripomorejo k rasti (Woldehiwet, 2010).

V času bakteriemije najdemo *A. phagocytophilum* predvsem v eozinofilcih, bazofilcih in monocitih. V času najvišje stopnje bakteriemije je lahko okuženih tudi do 90 % granulocitov (Woldehiwet, 2010).

2.1.3.2 Klinična slika

Pri živalih, okuženih z *A. phagocytophilum*, zasledimo več različnih kliničnih znakov. Pri vseh sesalcih, ki razvijejo klinično obliko bolezni, zaznamo nenadno povišanje telesne temperature (> 41 °C). Posamezni klinični znaki pri nekaterih živalih so zbrani v Tabeli 2. Pri prežvekovalcih je pojav bolezni bolj značilen za mlade živali in za živali, ki se prvič pasejo na pašnikih, kjer so klopi, okuženi z *A. phagocytophilum* (Stuen in sod., 2013).

Tabela 2: Klinični znaki pri nekaterih živalskih vrstah (povzeto po Stuen in sod., 2013)

Table 2: Clinical signs in some animal species (summarized by Stuen et al., 2013)

Živalska vrsta	Klinični znaki
Domači prežvekovalci	Anoreksija, otopelost, nenadno znižanje prireje mleka, abortusi pri ovcah, zmanjšana plodnost ovnov, zmanjšan prirast.
Konji	Anoreksija, depresija, apatija, distalni edem, odpor do premikanja, petehialne krvavitve.
Psi	Depresija, šepanje, anoreksija.
Mačke	Anoreksija, letargija, konjunktivitis, bolečine v mišicah, šepanje, bolečine v sklepih, nekoordinirano gibanje.

2.1.3.3 Diagnostika *A. phagocytophilum*

Za dokazovanje *A. phagocytophilum* se lahko uporablja več metod. Lahko jo diagnosticiramo z mikroskopiranjem, s pomočjo PCR (verižna reakcija s polimerazo) ali s serološkimi testi.

S svetlobnim mikroskopom lahko na krvnem razmazu, pobarvanem po May-Grünwald Giemsi, v granulocitih in monocitih vidimo modrikaste inkluzije, morule. Prav tako se lahko diagnozo postavi s pomočjo elektronske mikroskopije in z imunohistokemičnim barvanjem tkiv.

Možno je uporabiti tri tehnike PCR, in sicer konvencionalno, nested in real time. Analize se opravijo na osnovi 16S rRNA, groEl in p44 genov (Stuen in sod., 2013).

V primeru, da je organizem že tvoril protitelesa, lahko diagnozo postavimo s pomočjo seroloških preiskav. Za dokazovanje protiteles se lahko uporabljajo reakcija vezave komplementa, indirektni imunofluorescenčni test (IFAT) in ELISA test (Stuen in sod., 2013).

2.1.3.4 Zdravljenje okužb z *A. phagocytophilum*

V večini primerov se za zdravljenje okužb z *A. phagocytophilum* uporabljajo antibiotiki iz skupine tetraciklinov. Najpogosteje se uporabljata oksitettraciklin in doksiciklin. Izbira antibiotika za zdravljenje omenjene bakterije temelji na empiričnih študijah in nekaj poskusih pri ovcah in kozah. Študije, v katerih so prežvekovalce zdravili zaradi TBF, so pokazale, da je bakterija odporna na penicilin, kloramfenikol, streptomycin in ampicilin (Woldehiwet, 2010).

2.1.3.5 Preventiva

Eden od glavnih načinov zaščite živali pred okužbami z *A. phagocytophilum* je zaščita proti samim vektorjem, klopom. Za zaščito se uporabljajo sintetični piretroidi, ki se nanesejo na živali kot različni polivi oz. se živali z njim poškropi. Nanosi se ponavljajo po navodilih proizvajalca v času sezone klopov (Woldehiwet, 2010).

Eden od načinov zaščite je tudi dajanje antibiotikov v profilaktične namene. V Veliki Britaniji so živalim, ki so odšle na pašo, kjer so bili klopi, okuženi z *A. phagocytophilum*, profilaktično aplicirali dolgo delujoč tetraciklin. Vendar pa je takšen način zaščite vprašljiv z vidika zdravja ljudi, visokih stroškov, predvsem pa zaradi nevarnosti razvoja rezistence (Woldehiwet, 2010).

Cepiva proti *A. phagocytophilum* še niso na voljo. Izdelava vakcine bo uspešna šele, ko bodo odkrite vse komponente bakterije, ki so potrebne za razvoj zaščitne imunosti živali (Woldehiwet, 2010).

2.1.4 Razvojni krog

Razvojni krog *Anaplasme phagocytophilum* se prične s parazitiranjem klopa na okuženem sesalcu. *A. phagocytophilum* se pri klopu prenaša transovarialno na naslednjo generacijo in se ob parazitiranju prenese na novega sesalca (Atif, 2015).

2.1.5 Govedo in *Anaplasma* spp.

Večina izbruhov tako imenovane "Tick-borne fever" je posledica okužbe z *Anaplasma marginale*. Govedo okuženo z *A. phagocytophilum*, *A. bovis* in *A. centrale* po navadi ne kaže kliničnih znakov, vendar lahko določen odstotek živali zboli in kaže podobne klinične znake kot pri okužbi z *Anaplasma marginale* (OIE, 2015).

Bolezen se kaže predvsem z anemijo in zlatenico, ki se pojavita v pozni fazi obolenja. Pri *A. phagocytophilum* ne pride do pojava hemoglobinurije, kar nam služi kot pomemben znak za diferencialno diagnozo. Namreč za razliko od anaplazmoze se pri babeziozi pojavi hemoglobinurija (OIE, 2015).

2.1.6 Imunski odziv gostitelja

Različne študije imunosti na *A. phagocytophilum* so pokazale, da gostitelj po prvi okužbi pridobi določeno stopnjo imunosti, ki pa je zelo raznolika. Nekatere živali so bile imune le nekaj mesecev, druge tudi več kot leto dni. Odpornost se je razlikovala predvsem zaradi dejavnikov, kot so sev anaplazme, starost in vrsta živali ter čas, ki je pretekel od primarne infekcije do ponovne okužbe (Woldehiwet, 2006). Zanimivo je tudi to, da se je po umaknitvi živali s pašnikov, kjer so bili okuženi klopi, po nekaj mesecih pri nekaterih živali ponovno pojavilo obolenje (Woldehiwet, 2010).

Vloga protiteles in celične imunosti še ni točno pojasnjena, vendar pa po dosedanjih študijah sklepajo, da sta oba obrambna sistema pomembna. Ena izmed študij je pokazala, da naj bi bil titer protiteles v periferni krvi povezan z odsotnostjo bakteriemije (Woldehiwet, 1982). Druga študija pa je pokazala, da je prišlo do proliferacije limfocitov ob aplikaciji okuženih granulocitov (Gokce in Woldehiwet, 1999).

Težavo dobre imunosti predstavlja predvsem raznolikost antigenov *A. phagocytophilum*. Imunost, pridobljena proti določenemu tipu *A. phagocytophilum*, ne zaščiti gostitelja proti drugemu sevu *A. phagocytophilum*, kar je pokazala ena izmed študij z evropskimi izolati *A. phagocytophilum* pri ovcah in kravah (Woldehiwet, 2006).

2.1.7 Ekotipi *A. phagocytophilum*

Jahfari in sodelavci (2014) so opravili študijo prisotnosti *A. phagocytophilum* pri klopih na Nizozemskem in v Belgiji. Zbrali so 3493 nimf in odraslih klopov vrste *I. ricinus* na različnih geografskih področjih in jih s pomočjo metode PCR testirali na prisotnost *A. phagocytophilum*. 90 od 3493 testiranih klopov je bilo pozitivnih na *A. phagocytophilum*. Prav tako je zanimivo, da so *A. phagocytophilum* našli na 13 območjih. Skupno so bili vzorci pobrani na 17 različnih področjih.

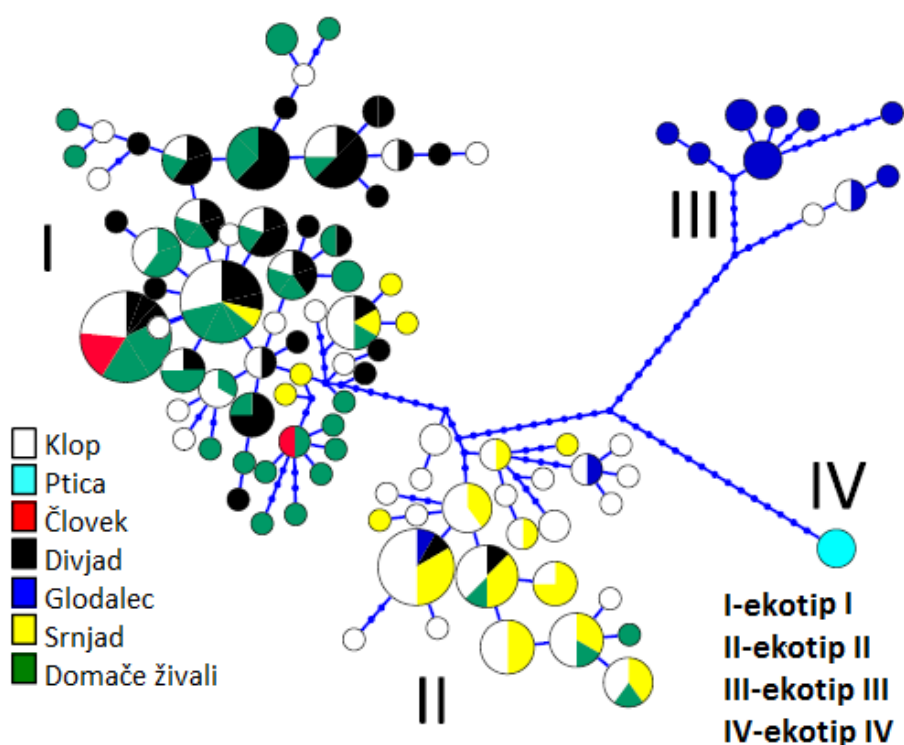
Testirali so tudi različna tkiva živali in jih prav tako analizirali z metodo PCR. V spodnji tabeli so prikazane posamezne živalske vrste, število testiranih in število pozitivnih vzorcev.

Tabela 3: Rezultati analiz študije Jahfarija s sodelavci (2014)

Table 3: Results of the study of Jahfari and colleagues (2014)

Živalska vrsta	Število vzorcev	Število pozitivnih vzorcev na <i>A. phagocytophilum</i>
<i>Apodemus flavicollis</i>	2	0
<i>Apodemus sylvaticus</i>	23	1
<i>Crocidura russula</i>	5	0
<i>Microtus arvalis</i>	8	0
<i>Myodes glareolus</i>	35	0
<i>Sorex araneus</i>	6	0
<i>Carduelis chloris</i>	4	0
<i>Coccothraustes coccothraustes</i>	2	0
<i>Fringilla coelebs</i>	3	0
<i>Parus major</i>	4	0
<i>Phylloscopus trochilus</i>	1	0
<i>Pyrrhula pyrrhula</i>	1	0
<i>Turdus iliacus</i>	5	0
<i>Turdus merula</i>	11	1
<i>Turdus philomelos</i>	6	0
<i>Capreolus capreolus</i>	38	26
<i>Equus ferus caballus</i>	14	14
<i>Vulpes vulpes</i>	81	8
<i>Meles meles</i>	40	0
Skupaj	289	50

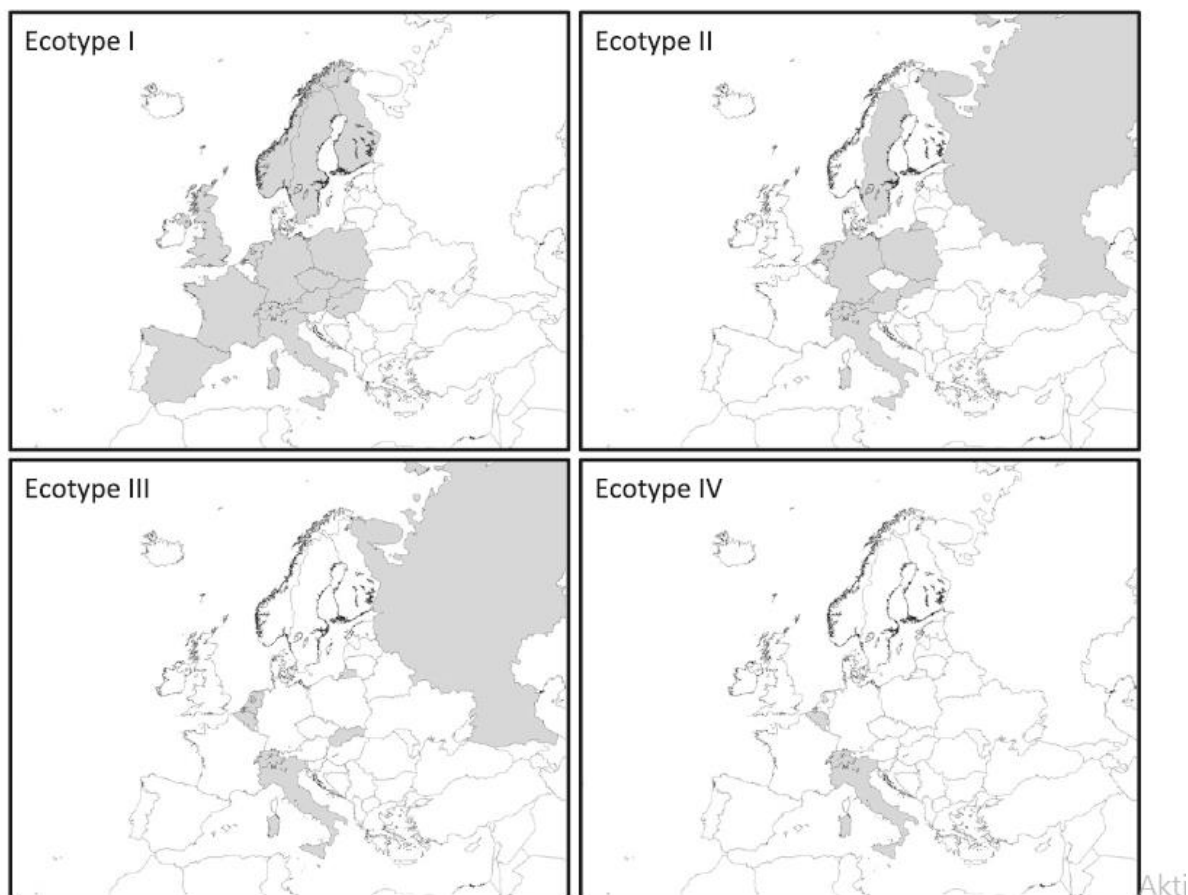
Vsem vzorcem, ki so bili qPCR pozitivni, so dodali fragment groEL in ga pomnožili ter sekvencionirali. Dodali so še groEL sekvence iz genske banke primerov obolenj v Evropi. Vse podatke so statistično obdelali in določili ekotipe *A. phagocytophilum* in njihove glavne gostitelje ter možnost prenosa na ljudi. Filogenetsko drevo zbranih podatkov je prikazano na Sliki 2. Posamezen krog prikazuje en haplotip, v krogih, ki so pobarvani z različnimi barvami, se je isti haplotip pojavil pri različnih živalskih vrstah. Pobarvani so sorazmerno s pojavnostjo pri določeni živali. Modre pike predstavljajo manjkajoče haplotipe, modri vogali pa predstavljajo mutacije (Jahfari in sod., 2014).



Slika 2: Filogenetsko drevo *A. phagocytophilum* (Jahfari in sod., 2014)

Figure 2: Phylogenetic tree of *A. phagocytophilum* (Jahfari et al., 2014)

Na osnovi pridobljenih podatkov so raziskovalci poskušali ugotoviti, ali lahko povežejo raznolikost v ekotipih z geografskim področjem. Ugotovili so, da so vsi ekotipi razpršeni po celi Evropi in da povezave med raznolikostjo ekotipa in geografskim področjem ni. Na Sliki 3 je vidna geografska razpršenost ekotipov v Evropi. Države, v katerih je bil izoliran en (ali več) ekotip, so obarvane sivo. Države, v katerih ni bilo izoliranih ekotipov, so obarvane belo (Jahfari in sod., 2014).



Slika 3: Nahajališča posameznih ekotipov *A. phagocytophilum* (Jahfari in sod., 2014)

Figure 3: Locations of individual ecotypes of *A. phagocytophilum* (Jahfari et al., 2014)

2.1.8 Anaplazmoza kot zoonoza

Prva okužba človeka z *A. phagocytophilum* v Evropi je bila opisana v Sloveniji leta 1997 (Rojko in sod., 2006). Sprva je bila bolezen poimenovana humana granulocitna erlihioza (HGE), ki se je kasneje preimenovala v humano granulocitno anaplazmozo (Bakken in Dumler, 2006).

2.1.8.1 Klinična slika pri ljudeh

Obolenje lahko poteka čisto asimptomatsko, lahko pa pride do hujših kliničnih znakov in smrti pacientov. Večina pacientov s klinično sliko je bila v stiku s klopom 7–14 dni pred pričetkom kliničnih znakov. Najpogostejši klinični znaki so nespecifični, in sicer povišana telesna temperatura, glavoboli, bolečine v mišicah in mrzlica. Redkeje se lahko pojavijo tudi anoreksija, slabost, kašelj, bolečine v trebuhu, zmedenost in izpuščaji (Bakken in Dumler, 2006).

2.1.8.2 Diagnostika in zdravljenje

Diagnozo se pri ljudeh postavi z istimi metodami kot pri živalih. Prav tako se za zdravljenje ljudi, obolelih za HGA, uporabljajo antibiotiki iz skupine tetraciklinov. Tabela 4 prikazuje učinkovitost posameznega diagnostičnega testa glede na čas obolenja (Bakken in Dumler, 2006).

Tabela 4: Občutljivost metode dokazovanja *A. phagocytophilum* glede na čas trajanja bolezni pri ljudeh (Bakken in Dumler, 2006)

Table 4: Sensitivity of the methods for *A. phagocytophilum* detection in addition to the duration of human disease (Bakken and Dumler, 2006)

Trajanje bolezni	Krvni razmaz	HI-60 celične kulture	PCR	Serološki testi (IFA)
0 – 7	Srednja	Srednja	Visoka	Nizka
8 – 14	Nizka	Nizka	Nizka	Srednja
15 – 30	/	/	Nizka	Visoka
31 – 60	/	/	/	Visoka
> 60	/	/	/	Visoka

2.1.8.3 Humana granulocitna anaplazmoza v Sloveniji

Lotrić-Furlan je s sodelavci leta 2006 objavila poročilo o humani granulocitni anaplazmozi v Sloveniji med letoma 1996 in 2004. V tem obdobju je bila *A. phagocytophilum* dokazana pri 24 odraslih ljudeh. Vseh 30 pacientov je pokazalo vročinsko stanje nekje po 30 dneh, odkar so bili v stiku s klopom. Diagnoza je bila postavljena na osnovi serokonverzije pri 18 (75 %), 6 pacientov je imelo vsaj štirikratno povišanje titra protiteles, pri 15 pa so postavili diagnozo s pomočjo molekularne detekcije.

Klinična slika in laboratorijski izvidi so bili podobni kot pri pacientih v drugih evropskih državah. Vsi bolniki so imeli povišano telesno temperaturo in glavobole. Levkopenija je bila prisotna pri 16 pacientih, trombocitopenija pri 20 pacientih, nenormalni testi delovanja jeter pri 23 bolnikih, pospešena sedimentacija eritrocitov pri 18 in povišana koncentracija C-reaktivnega proteina pri 23 bolnikih. Zanimiv je tudi podatek, da je bilo po enem letu od prihoda v bolnico serološko pozitivnih 16/24 bolnikov in po dveh letih 10/18 bolnikov.

2.1.8.4 Anaplazmoza pri živalih v Sloveniji

Petrovec in sod. so leta 2002 spremljali prisotnost *A. phagocytophilum* pri srnjadi (56 vzorcev) in jelenjadi (32 vzorcev). Detekcijo protiteles so izvedli s pomočjo indirektne imunofluorescence. Za detekcijo DNA so živalim odvzeli del tkiva vranice.

Skupno je bilo 74 % živali serološko pozitivnih in 86 % PCR pozitivnih. Tako jelenjad kot srnjad sta imeli PCR pozitivnost okoli 86 %, vendar pa je bilo bistveno več serološko pozitivne srnjadi (94 % srnjadi in 35 % jelenjadi).

Leta 2012 je Ravnik v doktorski disertaciji opisala pojavnost *A. phagocytophilum* pri psih. V raziskavo je bilo vključenih 754 psov, pri 553 je bila dokazana prisotnost specifičnih protiteles proti *A. phagocytophilum*. Kot navaja Ravnik, so dokazali 73,8-odstotno pogostost okužbe *A. phagocytophilum* pri psih in 5,3 % živali je bilo PCR pozitivnih.

Prav tako je Žele s sod. (2012) preiskovala prisotnost *A. phagocytophilum* pri divjih živalih v Sloveniji. Med letoma 2008 in 2010 so zbrali 376 vzorcev seruma različnih divjih živali (vzorci 30 jelenov, 90 srn, 9 gamsov in 224 divjih prašičev). Zbrali so tudi 160 vzorcev vranice divjih prašičev. Med letoma 2004 in 2010 so zbrali tudi 23 vzorcev seruma rjavega medveda. Vse živali so bile odstreljene v sklopu letnega odstrela divjih živali po celotni Sloveniji. Rezultati raziskave so prikazani v Tabeli 5.

Tabela 5: Prisotnost specifičnih protiteles *A. phagocytophilum* pri divjih živalih v Sloveniji (Žele s sod., 2012)

Table 5: Presence of specific *A. phagocytophilum* antibodies in wild animals in Slovenia (Žele et al., 2012)

Vrsta živali	Navadni jelen (<i>Cervus elaphus</i>)	Srna (<i>Capreolus capreolus</i>)	Gams (<i>Rupicapra rupicapra</i>)	Rjavi medved (<i>Ursus arctos</i>)	Divji prašič (<i>Sus scrofa</i>)
Število serološko pozitivnih/število negativnih (%)	18/30 (60,0 %)	76/90 (84,4 %)	7/9 (77,8 %)	15/23 (65,2 %)	156/224 (69,6 %)
Skupaj serološko pozitivnih	272 (72,3 %)				
Skupno pregledanih	376				

2.2 Babezioza

2.2.1 Taksonomija, vektorji in gostitelji

Babezioza je klopno prenosljiva bolezen, ki se pojavlja pri domačih in divjih živalih ter ljudeh (Bock in sod., 2004). Povzročajo jo zajedavec iz debla *Apicomplexa* in rodu *Babesia*. V razvojnem krogu *Babesia spp.* sta dva gostitelja, in sicer vretenčar (sesalci) in nevretenčar (družina *Ixodidae*). Klopi iz družine *Ixodidae* parazitirajo tudi na ljudeh, kar lahko privede do okužbe ljudi z babeziozo. Pri ljudeh povzročata babeziozo dve vrsti *Babesia spp.*, in sicer *Babesia microti* (Severna Amerika) in *Babesia divergens* (Evropa) (Homer in sod., 2000).

2.2.2 Zgodovina

Viktor Babes je leta 1888 v Romuniji odkril mikroorganizem v eritrocitih goveda in ovac ter ga povezal s pojavom hemoglobinurije in vročine. Bolezen je poimenoval vročica rdeče vode "red water fever". V letu 1893 sta Smith in Kilborne dokazala, da se *Babesia spp.* prenaša s klopi, in jo poimenovala *Pyrosoma bigeminum*. To je bil prvi opis prenosa bolezni s členonožci. V istem letu je Starcovici rod *Pyrosoma* preimenoval v *Babesia*. A kljub temu se je ime "piropalsma" obdržalo še do danes, saj pogosto babeziozo in theileriozo skupaj označujejo kot piroplazmoze (Ulienberga, 2006).

2.2.3 Pomembnejše vrste *Babesia spp.*

Rod *Babesia* sodi v deblo *Apicomplexa*, razred *Sporozoasida*, red *Eucoccidiorida*, podred *Piroplasmorina* in družino *Babesiidae* (Bock in sod., 2004).

S pomočjo različnih analiz je bilo opisanih preko 100 različnih vrst *Babesia spp.* (Homer in sod. 2000). V Tabeli 6 so navedene nekatere vrste iz rodu *Babesia spp.*, njihova geografska razširjenost, vrste sesalcev in vektorjev, v katerih zajedajo.

Tabela 6: Nekatere vrste *Babesia* spp., njihovi gostitelji in geografska razširjenost (Povzeto po Ulienberg, 2006; Bock in sod., 2004)

Table 6: Some species of *Babesia* spp., their hosts and geographical distribution (Summarized by Ulienberg, 2006; Bock et al., 2004)

<i>Babesia</i> spp.	Najpogostejši klopni vektor	Geografsko področje	Vretenčar
<i>B. caballi</i>	<i>Dermacentor</i> spp., <i>Hyalomma marginatus</i> , <i>Hyalomma truncatum</i> , <i>Rhipicephalus evertsi evertsi</i>	Afrika, Južna in Centralna Amerika, Evropa in Azija	Konji, osli in mule
<i>B. canis</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Dermacentor</i> spp., <i>Haemaphysalis</i> spp., <i>Hyalomma</i> spp	Južna Evropa, Severna Amerika, Azija, Afrika in Avstralija	Pes
<i>B. divergens</i>	<i>Ixodes ricinus</i> , <i>Ixodes persulcatus</i>	Severovzhodna Evropa, Španija, Velika Britanija in Irska	Govedo
<i>B. gibsoni</i>	<i>Haemaphysalis</i> spp., <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Afrika, Azija, Evropa in Severna Amerika	Pes
<i>B. major</i>	<i>Haemaphysalis punctata</i>	Evropa, Severovzhodna Afrika in Azija	Govedo
<i>B. motasi</i>	<i>Rhipicephalus bursa</i> , <i>Haemaphysalis punctata</i>	Jugovzhoda Evropa, Severna Afrika in Azija	Ovce in koze
<i>B. ovis</i>	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Jugovzhoda Evropa, Severna Afrika in Srednja in Vzhodna Azija	Ovce in koze
<i>B. (canis) presentii</i>	ni poznano	Azija (Izrael)	Mačke
<i>B. beliceri</i>	<i>Hyalomma</i> spp.	Rusija	Govedo
<i>B. bigemina</i>	<i>Boophilus microplus</i> , <i>Boophilus decoloratus</i> , <i>Boophilus annulatus</i> , <i>Boophilus geigyi</i> , <i>Rhipicephalus evertsi</i>	Afrika, Azija, Centralna in Južna Amerika, Južna Evropa	Govedo in bivol
<i>B. bovis</i>	<i>Boophilus microplus</i> , <i>Boophilus annulatus</i> , <i>Boophilus geigyi</i>	Afrika, Azija, Centralna in Južna Amerika, Južna Evropa, Afrika	Govedo in bivol
<i>B. crassa</i>	ni poznano	Azija	Koze, ovce
<i>B. felis</i>	ni poznano	Afrika, Evropa	Mačke
<i>B. jakimovi</i>	<i>Ixodes</i> spp.	Sibirija	Govedo, severni jelen
<i>B. occultans</i>	<i>Hyalomma</i> spp.	Afrika	Govedo
<i>B. orientalis</i>	<i>Rhipicephalus</i> spp.	Azija	Bivol
<i>B. ovata</i>	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Vzhodna Azija	Govedo
<i>B. perroncitoi</i>	ni poznano	Afrika, Evropa	Svinja
<i>B. rossi</i>	<i>Haemaphysalis</i> spp.	Afrika	Pes
<i>B. trautmanni</i>	<i>B. trautmanni</i>	Afrika, Evropa	Svinja

<i>B. vogeli</i>	<i>Rhipicephalus spp.</i>	Afrika, Amerika, Azija, Avstralija, Evropa	Pes
<i>Babesia</i>		Severna Evropa, Afrika in države bivše	
<i>trautmanni</i>	<i>Rhipicephalus spp.</i>	Sovjetske zveze	Svinje

2.2.4 Razvojni krog

Razvojni krog *Babesia spp.* lahko razdelimo na dva dela, in sicer:

1. razvoj v vretenčarju,
2. razvoj v klopu.

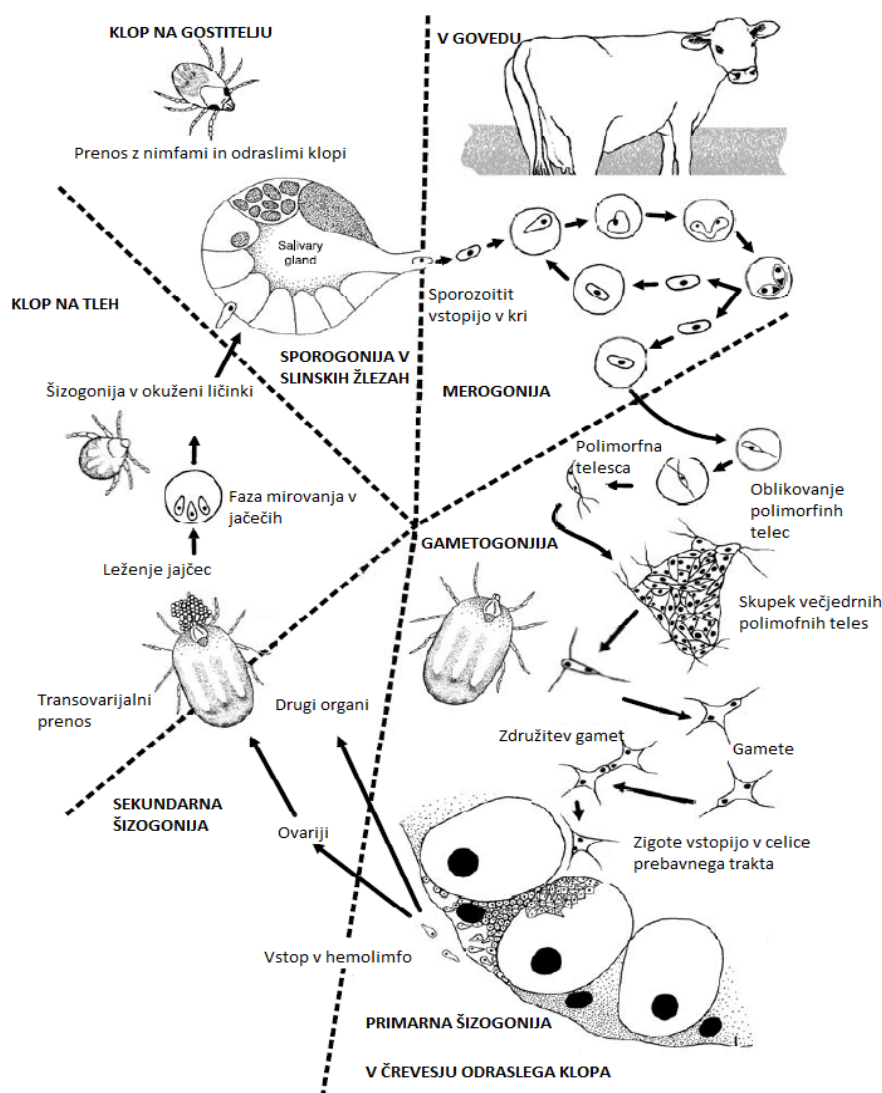
Do okužbe vretenčarja z *Babesia spp.* pride le, če je klop okužen in če je klop dovolj časa parazitiral na vretenčarju, saj verjetnost okužbe s časom parazitiranja klopa narašča. Sporozoit se preko klopove slin izločajo v podkožje vretenčarja. Tam preidejo v eritrocite in se spremenijo v trofozoite. Le-ti se nato spremenijo v merozoite. Merozoiti nato invadirajo nove eritrocite s procesom invaginacije in s tem oblikujejo vakuolo. Večina merozoitov se nato razvije v trofozoite, ki se z nespolnim razmnoževanjem delijo, kar ponovno privede do propada eritrocitov. Nekaj merozoitov se iz neznanega razloga ne deli, temveč rastejo in postanejo gametociti, ki so razvojna stopnja, s katero se okužijo klopi.

Ko klop začne parazitirati na vretenčarju, ki je okužen z *Babesia spp.* se po nekje 10 urah sesanja krvi vanj naselijo gametociti. Le-te po določenem času pričnejo z oblikovanjem novega organa, ki je v obliki konice puščice. Ta organ je verjetno udeležen pri združitvi gamet. Z združitvijo moške in ženske gamete nastane zigota, ki proдре skozi sluznico črevesja in preko hemolimfe potuje do slinskih žlez klopa. V celicah slinskih žlez se iz zigot v treh stopnjah razvijejo sporozoit. Invadirane celice hipertrofirajo in v njih se oblikuje sporoblast, iz katerega brstijo sporozoit. Ko klop začne zajedati na vretenčarju, se prične druga stopnja, v kateri se oblikujejo organeli sporozoita, in nato v tretji fazi sporozoit zapusti sporoblast in s slino klopa preide na novega gostitelja (Homer in sod., 2000).

Criado-Fornelio in sod. (2003) so na osnovi genske analize 18 rRNA razdelili podred *Piroplasmorina* v 5 genotipskih skupin ter jih poimenovali:

1. Skupina Ungulibabesids, ki zajema večinoma *Babesia spp.* pri prežvekovalcih. To so: *B. caballi*, *B. bigemina*, *B. ovis*, *B. bovis* in *Babesia sp.*
2. Skupina Babesids, v katero so uvrščene *B. divergens* in *B. odocoilei* z *B. canis* in *B. gibsoni*, ki ju najdemo pri kanidih.
3. Skupina Archaeopiroplasmids: v to skupino je poleg *B. microti*, *B. rodhaini*, *B. felis*, *B. leo*, *B. microti* uvrščena tudi *Theileria annae*.
4. Skupina Prototheilerids: v njej so razvrščene piroplazme zahodno-ameriškega tipa.

5. Skupina Theilerids, v katero so zajete vse *Theileria spp.*, ki jih najdemo pri bovidih (Bock in sod., 2004).



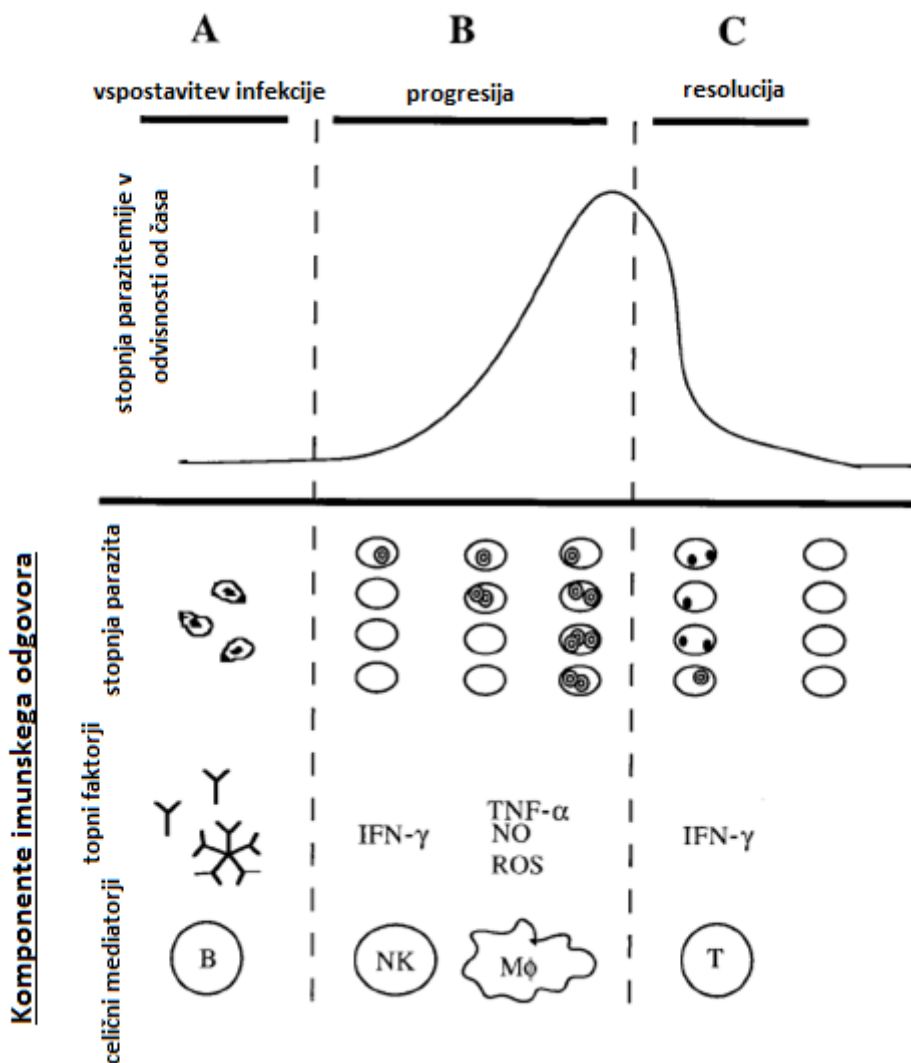
Slika 4: Razvojni krog *B. bigemina* pri govedu in vektorju klopu, vrste *Boophilus microplus* (Bock in sod., 2004)

Figure 4: *B. bigemine* development cycle in cattle and bone vector, *Boophilus microplus* species (Bock et al., 2004)

2.2.5 Imunski odziv gostitelja

Večina sesalcev je sposobna razviti imunost na *Babesia spp.* po invaziji oz. cepljenju. Pri imunskem odzivu sodelujeta tako humoralna kot celična imunost. Humoralna imunost ima manjši pomen, saj so sporozoiti, na katere delujejo protitelesa, le kratek čas izven eritrocitov. Prav tako so miši, ki so bile imune na *B. rodhaini*, kljub aplikaciji zaviralcev razvoja B limfocitov, ostale zdrave po okužbi z *B. rodhaini* (Moro in sod. 1998). Prav tako pri transfuziji imunega seruma miškam, ki so obbolele za *B. microti*, ni prišlo do ozdravitve

(Homer in sod. 2000). Večjo vlogo pri obrambi proti babezijam ima celična imunost. Aktivirani monociti, makrofagi in nevtrofilci izločajo različne protimikrobne faktorje, ki upočasnjujejo razvoj razvojnih oblik oz. jih uničijo (Bock in sod., 2004). Pri odstranjevanju propadlih eritrocitov igra pomembno vlogo vranica (Gray in sod., 2010).



Slika 5: Shema imunskega odziva gostitelja (Homer in sod., 2000)

Figure 5: A host immune response scheme (Homer et al., 2000)

Slika 5 prikazuje teoretično shemo odziva imunskega sistema glede na stadij bolezni in razvojno obliko *Babesia* spp. Med stadijem vzpostavitve invazije (A) protitelesa IgG preprečijo vstop *Babesia* spp. v eritrocite. V fazi B *Babesia* sp. uspe vstopiti v eritrocite, kjer se tvorijo merozoiti, ki povzročijo lizo celice, ti pa nato vstopijo v nove eritrocite. V tej fazi rast merozoitov zavirajo faktorji, ki jih izločajo celice ubijalke (interferon gama (IFN- γ) ter

makrofagi (tumor nekrotizirajoči faktor alfa (TNF- α), dušikov oksid (NO) in reaktivne kisikove zvrsti (ROS)). V končni fazi (C) pride najprej do najvišje stopnje parazitemije. V tej fazi so limfociti T odgovorni za odstranitev *Babesia spp.* (Homer in sod., 2000).

2.2.6 Govedo in *Babesia spp.*

Babesia spp. povzroča akutno in perzistentno subklinično okužbo pri govedu.

2.2.6.1 Patogeneza

Sporozoit v času parazitiranja klopa preidejo v krvni obtok in tam invadirajo eritrocite, v katerih se tvorijo trofozoiti ali oblike priroplazem, iz katerih se nato razvijeta 2 ali 4 hčerinske celice. Te nato invadirajo nove eritrocite. To povzroči intravaskularno ali ekstravaskularno hemolizo. Hitra delitev in ponovno invadiranje eritrocitov povzročita hemoglobinemijo, hemoglobinurijo in povišanje telesne temperature. Zmanjševanje števila eritrocitov privede do anemije ali celo do pogina v nekaj dneh. V času parazitemije je lahko prizadetih od 0,2 % do 45 % eritrocitov (Demessie in Derso, 2015).

2.2.6.2 Klinična slika

Klinični znaki pri okužbi z *Babesia spp.* so naslednji: povišana telesna temperatura (tudi do 41 °C), izguba apetita, neaktivnost vampa, oteženo in pospešeno dihanje, depresija, slabo počutje, hujšanje, progresivna hemolitična anemija, ikterus, hemoglobinurija, pospešen srčni utrip, težave z očmi in zmanjšanje mlečnosti. Sluznice so lahko blede in rumenkaste. Urin je rdeče do kavne barve.

Nevrološke motnje lahko zaznamo pri *B. bovis*. Nastanejo zaradi agregacije prizadetih eritrocitov v kapilarah možganov. Klinično se kažejo kot nistagmus, hoja v krogu, tiščanje glave ob trde predmete, krči, ataksija, škripanje z zobmi in mišični tremor (Demessie in Derso, 2015, Zintl in sod., 2003).

2.2.6.3 Postavitev diagnoze

Hitra in prava postavitev diagnoze je zelo pomembna pri nadzoru, zdravljenju in kontroli infekcije. Zaradi nespecifičnih znakov postavitev diagnoze na osnovi klinični znakov ni mogoča. Najcenejša in najhitrejša postavitev diagnoze je možna s pomočjo mikroskopiranja pobarvanega krvnega razmaza. Metoda je zelo učinkovita pri govedu, ki je razvilo akutno obliko obolenja, saj je pri le-tem število eritrocitov, okuženih z *Babesia spp.*, visoko. Tako lahko vidimo s 1000-kratno povečavo značilna telesca v eritrocitih. Povzročitelja lahko

dokažemo tudi s PCR. Možno je tudi serološko testiranje ELISA ali IFA (Demessie in Derso, 2015).

2.2.7 Ekonomski vpliv *Babesia spp.*

Invazija z *Babesia spp.* ima velik ekonomski pomen v govedoreji. Ekonomske izgube ne nastanejo samo zaradi pogina, abortusov, znižanja mlečnosti, zmanjšanja prirasta, zdravljenja ter vakcinacije, temveč tudi zaradi vpliva na mednarodno trgovanje z govedom. McLeod in Kristjanson sta leta 1999 razvila model "tick cost", na osnovi katerega sta določila ekonomski vpliv klopov in klopno prenosljivih bolezni. Izračunala sta, da babezioza in anaplazmoza avstralsko govedorejo staneta 16,9 milijona ameriških dolarjev. Sama zaščita pred klopi pa 6,4 milijona ameriških dolarjev. Model je kasneje tudi pokazal, da Kenija porabi 5,1, Zimbabve 5,4, Tanzanija 6,8, Južna Afrika 21,6, Kitajska 19,4, Indija 57,2, Indonezija 3,1 in Filipini 0,6 milijona ameriških dolarjev za obvladovanje klopov in klopno prenosljivih bolezni (Bock in sod., 2004).

Poznanih je več vrst *Babesia spp.*, ki jih najdemo pri govedu: *B. bovis*, *B. divergens*, *B. major*, *B. bigemina* in druge (Ulienberga, 2006). *B. bovis* in *B. bigemina* invadirata govedo v tropskem in subtropskem podnebnju. Zanimivo je, da so teleta v večini primerov imuna na okužbo z *B. bigemina* in tako ne razvijejo klinične oblike bolezni. Živali, ki zbolijo, razvijejo zelo hudo obliko klinične bolezni (povišana telesna temperatura, kaheksija, hemoglobinemija, hemoglobinurija), ki nastane v nekaj dneh. Propade lahko tudi več kot 75 % eritrocitov. Pogin živali lahko znaša tudi do 50 %, vendar pa je odstotek pogina ob pravočasnem zdravljenju in izogibanju stresa bistveno manjši.

B. bovis se po navadi pojavlja na področjih, kjer najdemo tudi *B. bigemina*. Njena invazija lahko traja tudi do enega leta ali celo celo življenje. Pri živalih, ki se okužijo z *B. bovis*, zasledimo vrsto značilnih kliničnih zakov, vendar se hemoglobinemija in hemoglobinurija ne pojavita vedno. Lahko se pojavi možganska oblika bolezni ali sindrom dihalne stiske, ki privede do smrti.

B. divergens se pojavlja v Evropi in povzroča podoben znake kot *B. bovis* in *B. bigemina*. Pri njej se redko razvije možganska oblika (Demessie in Derso, 2015).

Prav tako se v Evropi pojavlja *B. major*, ki je sicer ne-patogena, vendar pa lahko pri teličkih, pri katerih je bila opravljena splenektomija, povzroči razvoj bolezni ali celo pogin (Vial in Gorenflot, 2006).

2.2.8 *Babesia divergens*

B. divergens prenašajo klopi *Ixodes ricinus*. Prva sta jo opisala M'Fadyean in Stockman, ki sta jo poimenovala *Piroplasma divergens*. Sprva so domnevali, da *B. divergens* invadira le ozek krog vretenčarjev. Garnham in Bray (1959) sta ovrгла to domnevo, saj sta pri šimpanzih in opicah z odstranjeno vranico in invadiranih z *B. divergens* opazila pojav hemoglobinurije.

Kasnejše raziskave so pokazale, da so šimpanzi razvili bolezen tudi, če so bili invadirani z večjim odmerkom babezij. Prav tako so raziskave pokazale, da so za *B. divergens* občutljivi muflon, srna, severni jelen, damjak, ovce in druge vrste živali.

Za klinično zaznavno invazijo z *B. divergens* je potrebnih približno 10^3 parazitov. Pri razvoju bolezni igrajo pomembno vlogo imunski status živali ter število klopov, ki parazitirajo na gostitelju in so invadirani z *B. divergens*. V primeru dobrega imunskega statusa se pogosto razvije subklinično obolenje z nizko stopnjo parazitemije in ga lastniki živali niti ne opazijo. Živali so lahko anoreksične in lahko imajo blago povišano telesno temperaturo.

Živali s slabim imunskim sistemom po navadi razvijejo akutno obliko bolezni, ki se kaže s kliničnimi znaki, ki so naštetih v poglavju 2.2.6.2.

Če lastnik živali ne opazi klinični znakov, bolezen napreduje. Telesna temperatura se zniža, pride do dehidracije in posledično do prenehanja hemoglobinurije. Živali obležijo in preidejo v toksični šok. Srčni utrip se upočasni, lahko se pojavita zlatenica in zaprtje. Anemija in upočasnjeno bitje srca lahko privedeta do nezadostne možganske oksigenacije in živčnih motenj. Pogin živali nastopi zaradi odpovedi srca, insuficience jeter ali ledvic (Zintl in sod., 2003).

2.2.9 Zdravljenje *Babesia spp.*

Do sedemdesetih let 19. stoletja so se za zdravljenje babezioze v večini evropskih držav uporabljala 3 zdravila, in sicer quinuronium sulphat (Ludobal®, Bayer Ltd.), amicarbalid isothionat (Diampron®, May and Baker Ltd.) in diminazen aceturat (Berenil®, Hoechst Ltd.). V teh letih so kot četrto zdravilo predstavili tudi imidocarb dipropionat (Imizol®; Schering-Plough), ki je s časom postal prva izbira pri zdravljenju *Babesia spp.* in tudi dober profilaktik v primeru aplikacije dvojnega terapevtskega odmerka (Vial in Gorenflot, 2006).

V večini primerov je zdravljenje pri goveji babeziozi uspešno, seveda je uspešnost odvisna od zgodnje ugotovitve bolezni ter takojšnjega zdravljenja. Najpogosteje se uporabljajo diminazen diaceturat (3–5 mg/kg telesne teže), imidocarb (1–3 mg/kg telesne teže), in amicarbalid (5–10 mg/kg telesne teže) oz. po navodilu proizvajalca (Vial in Gorenflot, 2006).

2.2.10 Preventiva

Preventiva pred invazijami z *Babesia spp.* mora zajemati tri glavne dejavnike: obvladovanje vektorjev, kemoprofilakso in imunizacijo (Demessie in Derso 2015).

Najpogostejši način zaščite pred vektorji je zaščita goveda z akaricidi (npr. s flumethrinom ali z deltamethrinom), saj s temi uničimo klope še pred začetkom parazitiranja oz. predno se v slinskih žlezah klopa razvijejo sporozoit. Poleg tega pa sta potrebna redno pregledovanje goveda in ocena uspešnosti zaščite, saj se pojavlja tudi vedno več odpornosti klopov na akaricide (Zintl in sod., 2003).

Drugi izmed načinov zaščite je uporaba kemoprofilakse. Imidocarb in diminazen se uporabljata za večmesečno zaščito pred babeziozo (Demessie in Derso 2015). Pri odmerku imidokarba 3 mg/kg zaščita traja do 4 tedne, obenem pa v primeru, da pride do invazije živali z babeziozo, omogoči razvoj imunosti (Zintl in sod., 2003).

Imunost pa se lahko doseže tudi z vakcinacijo. Žive vaccine so se izkazale za zelo učinkovite in relativno varne, predvsem ko je bilo cepljeno govedo pod starostjo 1 leta. Največjo problematiko pri izdelavi živih vakcin predstavlja kontrola patogenosti živih parazitov (Zintl in sod., 2003). Druga od metod imunizacije živali je uporaba krvi trajno okuženih živali. To metodo uporabljajo predvsem v tropskih področjih in Avstraliji (Demessie in Derso, 2015).

2.2.11 *Babesia spp.* kot zoonoza

Prvi opisan primer obolenja človeka za babeziozo pri nas sega v leto 1957, ko je zbolel jugoslovanski kmet, ki mu je bila odstranjena vranica (Skrabalo in Deanovic, 1957). Nekaj let kasneje je v Ameriki pozornost vzbudilo večje število ljudi, okuženih z *B. microti*. Prav tako je bila večini teh ljudi odstranjena vranica (Vial in Gorenflot, 2006).

Humana babezioza je vse bolj pomembna kot zoonoza, saj je bilo v Evropi (bivša Jugoslavija, Francija, Velika Britanija, Irska, Portugalska, Španija, Avstrija, Švedska in Švica) že več kot 30 primerov okužb z *Babesia spp.*, predvsem govejo babeziozo, ki jo povzroča *B. divergens*. Oboleli so večinoma ljudje, ki jim je bila odstranjena vranica (Zintl in sod., 2003). Prav tako so se v Avstriji, Italiji in Nemčiji pojavile okužbe z *B. venatorum* (EU1). Še bolj pogosto kot v Evropi se obolenja za babeziozo pojavljajo v ZDA, kjer je eden glavnih povzročiteljev *B. microti*, ki jo po navadi najdemo pri glodavcih (Gray in sod., 2010).

Tabela 7: Pojavnost dokumentirane babezioze pri ljudeh (povzeto po Gray in sod., 2010)

Table 7: Occurrence of documented babesiosis in humans (summarized by Gray et al., 2010)

Humana babezioza v Ameriki

Vrsta <i>Babesia</i> spp.	<i>B. microti</i>	<i>B. duncani</i>	CA1–CA4	<i>B. divergens-like</i>	<i>B. divergens-like</i>	<i>B. divergens-like</i>
Tip izolata	AF231348	AF158700	AF158704	AY274114	AY887131	AY048113
Območje	Severovzhod, zgornji srednji zahod	Država Washington, California	Država Washington, California	Država Washington	Kentucky	Missouri
Vektor	<i>Ixodes scapularis</i>	Neznano	Neznano	Neznano	<i>Ixodes dentatus?</i>	<i>Ixodes dentatus?</i>
Prvotni gostitelj	Glodavci, rovke	Neznano	Neznano	Neznano	Zajci?	Zajci?
Humana dovzetnost	Ljudje z vranico, ljudje brez vranice	Ljudje z vranico	Ljudje brez vranice	Ljudje brez vranice	Ljudje brez vranice	Ljudje brez vranice
Število primerov (stopnja)	Več 100 (subklinična do smrtna)	5 (subklinična do resna)	4 (resna – smrtna)	1 (resna)	1 (smrtna)	1 (smrtna)

Humana babezioza v Evropi

Vrsta <i>Babesia</i> spp.	<i>B. microti</i>	<i>B. divergens</i>	<i>B. venatorum</i> (EU1-3)	<i>B. divergens-like</i>
Tip izolata	EF413181	U16370	AY046575	AJ439713
Območje	Nemčija	Evropa	Avstrija, Italija, Nemčija	Portugalska
Vektor	<i>Ixodes ricinus?</i>	<i>Ixodes ricinus</i>	<i>Ixodes ricinus?</i>	Neznano
Prvotni gostitelj	Glodavci	Govedo	Divjad	Neznano
Humana dovzetnost	Ljudje z vranico, imunosupresivni ljudje	Ljudje brez vranice	Ljudje brez vranice	Ljudje brez vranice
Število primerov (stopnja)*	1 (zmerna)	> 30 (resna – smrtna)	3 (zmerno – resna)	1 (smrtna)

Humana babezioza po svetu (brez Evrope in Amerike)*

Vrsta <i>Babesia</i> spp.	<i>B. microti</i>	<i>B. microti</i>	<i>Ovine babesia-like</i> (KO1)	<i>B. divergens-like</i>
Tip izolata	AB032434	Ni podatka sekvence	DQ346955	AF435415 (nepopolni podatki sekvence)
Območje	Japonska	Tajska	Koreja	Kanarski otoki
Vektor	<i>Ixodes ovatus?</i>	Neznano	Neznano	<i>Ixodes ventalloi?</i>
Prvotni gostitelj	Japonska poljska miš?	Podgane?	Prežvekovalci (ovce)?	Neznano
Humana dovzetnost	Ljudje z vranico	Ljudje brez vranice	Ljudje brez vranice	Ljudje brez vranice
Število primerov (stopnja)	2 (subklinična – zmerna)	1 (blaga)	1 (resna)	1 (smrtna)

*Nadaljevanje Tabele 7.

*Continued Table 7.

2.2.11.1 Patogeneza

Patogeneza pri ljudeh je enaka kot pri živalih. Pri resnih invazijah nastopi hemoliza, posledica le-te sta hemolitična anemija z zlatenico. Če babezioze ne zdravimo, anoksija in toksini privedejo do odpovedi organov in posledično smrti. Stopnja parazitizacije ni vedno v korelaciji s kliničnimi znaki. Bolniki lahko kažejo povišano temperaturo, bolečino v mišicah, odpoved ledvic in koagulopatije pri okužbi z *B. microti* tudi, ko je prizadet manj kot 1 % eritrocitov (Gray in sod., 2010).

2.2.11.2 Klinični znaki pri ljudeh

V času inkubacije, ki traja 1–3 tedne, se bolniki počutijo slabotno in nelagodno. Akutna faza nastopi hitro in se kaže s hemoglobinurijo, ki je eden glavnih kliničnih znakov. Bolezen lahko hitro zamenjamo z malarijo. Pojavi se zlatenica z neperiodično povišano telesno temperaturo (40–41°C), mrzlico, močnim potenjem, glavoboli, bolečino v mišicah ter bolečino v področju trebuha in prsnega koša. Lahko se pojavita bruhanje in driska (Zintl in sod., 2003).

2.2.11.3 Diagnostika in zdravljenje

Tudi sama diagnostika babezioze se bistveno ne razlikuje od diagnostike pri živalih. Hemoglobinurija je eden glavnih kliničnih znakov okužbe z babeziozo, vendar jo je treba

potrditi s pregledom krvnega razmaza, pobarvanega po Giemsa metodi. Prav tako se lahko babezioza pri ljudeh potrdi s pomočjo seroloških testov, kot sta ELISA in IFAT, in pa s pomočjo metode PCR.

Ob potrditvi diagnoze je potrebno zdravljenje. Zdravljenje poteka s kombinacijo naslednjih dveh učinkovin: kinina in klindamicina. Čeprav učinek ni tako dober kot pri imidokarbu dipropionatu, se ta kombinacija uporablja, saj imidokrab dipropionat ni dovoljen za splošno uporabo v humani medicini. Do sedaj sta bili opravljene le dve zdravljenji z imidokarbom pri ljudeh. V teh dveh primerih je bilo izdano posebno dovoljenje za uporabo (Zintl in sod., 2003). Pred kratkim razvit hidroksinaftokinon je registriran za uporabo v humani medicini in dobro deluje proti *B. divergens*, vendar se je pri poskusnih živalih, okuženih z *B. mircoti* in zdravljenih z omenjenim zdravilom, pojavilo ponovno obolenje. Kot učinkovito pa se je izkazalo zdravljenje v kombinaciji z azitromicinom ali s klindamicinom. Kombinacija atavokvon/azitromicin se je izkazala učinkovita pri obolenjih ljudi z *B. mircoti* in je priporočena terapija za blažje oblike obolenja (Gray in sod., 2010).

2.3 Borelioza

Je infekcijska bolezen, ki jo povzroča spiroheta *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*), za katero obolevajo ljudje, domače in divje živali. Prizadene več organskih sistemov. Njen glavni vektor so klopi. Bolezen večinoma najdemo na severni polobli (Kybicová, 2010).

2.3.1 Zgodovina Lymske borelioze

Konec 19. stoletja se je v Evropi pojavilo kronično kožno obolenje, ki so ga poimenovali *acrodermatis chronica atropicans*. V začetku 20. stoletja je dr. Afzelius opisal primer pacienta s kožnimi spremembami, ki jih je poimenoval *erythema migrans* (Kybicová, 2010). Leta 1976 se je pri prebivalcih Lyma v Connecticutu in okoliških skupnostih pojavil revmatoidni artritis, ki je trajal 1–2 tedna in povzročal zatekanja in bolečine večjih sklepov. Iz kliničnih, laboratorijskih in epidemioloških preiskav ni bilo mogoče reči, da gre za imunsko pogojeno patogenezo. Sumili so bakterijo, ki se prenaša preko členonožcev, saj so nekateri oboleli imeli okoli vboda insekta rdeče okrogle izpuščaje, ki so se širili. Sum so potrdili z izolacijo *Borrelia burgdorferi* iz okuženega klopa *Ixodes dammini* (danes poimenovan *I. scapularis*) ter iz krvi, cerebrospinalne tekočine in drugih tkiv, ki so jih odvzeli obolelim ljudem. Bolezen so poimenovali Lymska borelioza po kraju, kjer je bila prvič opisana (Fritz in Kjemtrup, 2003).

2.3.2 Skupina *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Ko govorimo o *Borrelia burgdorferi* sensu lato, govorimo o skupini bakterij, ki imajo zelo podobno zgradbo DNK. V tej skupini najdemo naslednjih 18 bakterijskih vrst:

B. afzelii, *B. americana*, *B. andersonii*, *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. burgdorferi*, *B. californiensis*, *B. carolinensis*, *B. garinii*, *B. japonica*, *B. kurtenbachii*, *B. lusitaniae*, *B. sinica*, *B. tanukii*, *B. trudi*, *B. valaisiana*, *B. yangtze* in genomospecies2 (Margos in sod., 2011).

2.3.3 Prenos in gostitelji

Borrelia burgdorferi v naravi kroži s členonožci, predvsem klopi iz rodu *Ixodes*. Le-ti zajedajo na različnih malih in velikih sesalcih ter ptičih. Klopi iz rodu *Ixodes* v svojem razvoju potrebujejo 3 gostitelje. V vsaki fazi (ličinka, nimfa in odrasel klop) zajedajo pri drugem gostitelju. V fazi ličinke in nimfe jih najdemo predvsem v odpadlem listju in zgornjem delu humusa. Tam gredo na godalce, kuščarje in ptiče. Po 2–4 dneh se napijejo krvi

in odpadejo. Ko preidejo v odraslo obliko, se povzpnejo na nižje grmičevje in konice trav, kjer počakajo na večje sesalce (Fritz in Kjemtrup, 2003).

Ko ena izmed razvojnih oblik klopa zajeda na okuženi živali, *Borrelia burgdorferi* preide v klopa, do njegovega črevesja in se množi, dokler klop parazitira na gostitelju. Ko klop ponovno preide na novega gostitelja, se *Borrelia burgdorferi* ponovno prične namnoževati, ter migrirati preko hemolimfe do slinskih žlez in preko njih v novega gostitelja. Za migracijo je potrebno 2–3 dni, zato je pomembno, da klope pravočasno odstranjujemo in s tem preprečimo prenos *Borrelia burgdorferi* (Fritz in Kjemtrup, 2003).

2.3.4 Imunski odziv gostitelja

Raziskave imunskega odziva na *Borrelia burgdorferi* so bile v večini raziskane pri ljudeh. Ko se *Borrelia burgdorferi* iz okuženega klopa prenese na človeka, človeški imunski sistem v prvi fazi odgovori s celično imunostjo. Pri odzivu sodelujejo komplement in levkociti. Različne vrste *Borrelia spp.* se razlikujejo po tako imenovanem s patogeni povezanim molekularnim vzorcem "pathogen-associated molecular patterns" (PAMPs), ki ga prepoznajo receptorji (pattern recognition receptors (PRRs)). Te receptorje izrazijo celice celične imunosti (Petzke in Schwartz, 2015).

Pomembno vlogo pri imunosti igrajo na membrano vezani proteini TLRs, ki se nahajajo na površju oz. v endosomih obrambnih celic. Večina proteina TLRs porabi protein MyD88, ki začne s kaskado, katere posledica je izločanje citokinov in kemokinov. Poleg tega proteina *Borrelia burgdorferi* na membrani izraža več kot 100 drugih lipoproteinov, ki delujejo stimulatивно na imunski sistem. Ti lipoproteini vsebujejo tripalmitoyl-S-glyceril-cysteine (Pam3Cys) variacije, ki jih prepozna TLR2 in povzroči spremembe v jedru faktorja NF- κ B ter nato izločanje NF- κ B odvisnih citokinov (TNF, IL-6, IL-8) in adhezijskih faktorjev (E-selectin, vaskularne celične adhezijske molekule 1 in znotrajcelične adhezijske molekule 1) (Petzke in Schwartz, 2015).

Tvorba protiteles je odvisna od več dejavnikov, kot so vrsta gostitelja, starost, mesto okužbe, prejšnje okužbe, razlike med osebki. Pojavi se lahko tudi zakasnel imunski odgovor, saj določeni osebki, kljub klinični sliki, ne tvorijo protiteles tudi do 8 tednov po okužbi (Petzke in Schwartz, 2015).

Pri poskusih na miših, so ugotovili, da je serološki odgovor odvisen predvsem od količine bakterij, ki so prišle v miš, in od mesta, kjer je prišlo do vdora oz. aplikacije *Borrelia burgdorferi*. Organizem tvori protitelesa proti borelijskim antigenom OspA in OspB, a le v

primeru, ko je v organizem vstopilo večje število bakterij. V primeru manjšega vdora bakterij, organizem ne tvori protiteles. Zanimiva je tudi ugotovitev, da pri miših *Scid* (občutljivi sev miši, ki po okužbi z *Borrelia burgdorferi* klinično kažejo obolenje z vnetjem sklepov, jeter in srčne mišice) lahko preprečimo oz. blažimo klinično sliko z aplikacijo monoklonalnih protiteles proti OspA. Prav tako je zanimivo, da so hrčki, ki so bili vakcinirani z *Borrelia burgdorferi* fiksirano s formalinom in nato v krajšem času okuženi z *Borrelia burgdorferi*, zboleli za močnim artritisom, saj niso uspeli razviti protitelesne zaščite. V kolikor čas med vakcino in aplikacijo podaljšamo, hrčki ne zbolijo (Petzke in Schwartz, 2015; Borko, 1999).

2.3.5 Potek bolezni

Potek bolezni pri obolelih živalih je različen. Pri nekaterih se klinična slika sploh ne razvije. Na endemičnih področjih je lahko okuženost psov med 25–95 %, vendar pa vsi psi ne razvijejo klinične slike. Večjo verjetnost razvoja kliničnih znakov pri okužbi z *Borrelia burgdorferi* lahko pričakujemo pri mlajših živalih (Fritz in Kjemtrup, 2003).

Psi, ki razvijejo klinično obolenje, imajo povišano telesno temperaturo, so anoreksični in šepajo. Po navadi artritis prizadene le en sklep, in sicer tarsus ali metatarsus. *Borrelia burgdorferi* lahko pri psih povzroči tudi glomerulonefritis, tubularno nekrozo, živčne motnje in limfoplastično vnetje črevesja, ki je povezano s hitro potekajočo in pogosto smrtno glomerularno boleznijo (Fritz in Kjemtrup, 2003).

Okuženost konj je v endemičnih področjih do 20 %, vendar pa je klinična manifestacija pri konjih zelo redka. Kaže se kot blago povišana telesna temperatura, letargija, togost in oteklost v distalnih delih okončin (Fritz in Kjemtrup, 2003).

Serološko so bile potrjene tudi okužbe pri prežvekovalcih, vendar pa se klinična oblika bolezni pojavlja redko. Po navadi se pojavita šepanje in oteklost sklepov, lahko pa tudi hujšanje, eritem, otekle noge in strma stoja (Fritz in Kjemtrup, 2003; Gray in sod. 2002; Borko, 1999)

2.3.6 Diagnostika

Ugotavljanje okužb z *Borrelia burgdorferi* temelji predvsem na dokazovanju protiteles oz. na dokazovanju antigena. Če najdemo protitelesa proti *Borrelia burgdorferi*, lahko iz tega sklepamo, da je žival bila oz. je okužena z *B. burgdorferi*. Ne moremo pa trditi, da je bil organizem okužen v času, ko so bili odvzeti vzorci za analiziranje (Gray in sod. 2002). *B.*

burgdorferi lahko dokazujemo direktno oz. indirektno. Direktne metode dokazujejo bakterijo oz. njene antigene. Slednje lahko dokazujemo v telesnih tekočinah oz. tkivih. Najpogosteje se za direktno dokazovanje uporabljajo mikroskopiranje in molekularne metode, kot je PCR. Pri indirektnih metodah dokazujemo protitelesa in specifične dele bakterije, kot so zunanja celična membrana, specifični proteini itd. Metode dokazovanja so ELISA, direktna in indirektna imunofluorescenca in western blot test (Kybicová, 2010).

2.3.7 *Borrelia burgdorferi* pri ljudeh

Boreliozo pri ljudeh glede na trajanje obolenja razdelimo v tri faze. Prva je lokalizirana faza, ki se pojavi nekje 10–30 dni po vstopu *B. burgdorferi*. V tej fazi se pojavi *erythema migrans*, kožna sprememba, kolobar rdeče barve, ki se koncentrično širi. S krvjo oz. z mezgo lahko bakterije v nekaj dneh oz. tednih preidejo v organe. To je faza razsejane oblike bolezni. V tej fazi bakterije povzročajo spremembe na koži, živcih, sklepih, srcu, mišicah in očeh. Če se bolezen ne pozdravi, se lahko le-ta po enem oz. več letih razvije v kronično fazo in povzroči spremembe na koži, sklepih in živčnem sistemu (Borko, 1999).

Klinične spremembe pri ljudje se odražajo predvsem na štirih organskih sistemih, to so koža, živčni sistem, sklepi in srce. Eden glavnih kliničnih znakov, ki se pojavi na koži, je *erythema migrans*. Gre za homogeno spremembo svetlo rdeče ali modro rdeče barve. Pojavlja se pri večini pacientov, ki oboliijo pozno spomladi in zgodaj poleti, ne glede na starost ali spol. Pojavi se na mestu, kjer je bil klop pritrjen. Do razvoja *erythema migrans* pride v 10 dneh po ugrizu klopa, vendar lahko pride do pojava že v nekaj dneh ali redko šele po mesecu dni ali celo več (Gray in sod., 2002). Pri okužbi z *Borrelia burgdorferi* se pojavijo tudi nespecifični znaki, kot so povišana telesna temperatura, glavobol, utrujenost in bolečine v mišicah in sklepih (Fritz in Kjemtrup, 2003).

Tabela 8: Različne oblike obolenj pri okužbi z *Borrelia burgdorferi* s.l. v Evropi (Gray in sod., 2002).

Table 8: Different forms of disease in *Borrelia burgdorferi* infection in Europe (Gray et al., 2002).

Organski sistem	Faza obolenja	Oblika obolenja
Koža	Akutna faza	<ul style="list-style-type: none"> • Erythema migrans • Borrelial lymphocytoma
	Kronična faza	<ul style="list-style-type: none"> • Acrodermatitis chronica atrophicans
Živčni sistem	Akutna faza	<ul style="list-style-type: none"> • Meningo-poliradikuloneuritis
	Kronična faza	<ul style="list-style-type: none"> • Subtilna senzorna nevropatija
Srce	Akutna faza	<ul style="list-style-type: none"> • Atrioventrikularni blok • Subtilni miokarditis
	Kronična faza	<ul style="list-style-type: none"> • Diletativna kardiomiopatija
Mišice in sklepi	Akutna faza	<ul style="list-style-type: none"> • Artritis • Poliartritis
	Kronična faza	<ul style="list-style-type: none"> • Perzistenten artritis

2.3.8 *Borrelia burgdorferi* pri ljudeh v Sloveniji

Okužbe z *Borrelia burgdorferi* v Sloveniji po podatkih NIJZ sodijo med najpogostejše nalezljive bolezni, ki jih prenašajo klopi. Pojavljajo se skozi celotno leto, vendar so obolenja pogostejša v poletnih mesecih. V Tabeli 9 in Tabeli 10 vidimo število prijavljenih primerov glede na klinično sliko ter regije v katerih je se Lymška borelioza pojavljala (Sočan in sod., 2016).

Tabela 9: Prijavljeni primeri Lymške borelioze v Sloveniji glede na klinično sliko v letih 2011–2015 (Sočan in sod., 2016)

Table 9: Reported cases of Lyme borelliosis in Slovenia according to the clinical picture in the years 2011–2015 (Sočan et al., 2016)

Leto	2011	2012	2013	2014	2015
ERYTHEMA MIGRANS	5552	4897	6914	3875	3729
MENINGITIS	25	10	11	10	6
POLINEVROPATIJA	31	22	8	4	2
ARTROPATIJA	12	2	5	1	5
SKUPAJ	5620	4931	6938	3890	3742

Tabela 10: Pojavnost Lymške borelioze v Sloveniji v letih 2014 in 2015 po regijah (Sočan in sod., 2016).

Table 10: Appearance of Lyme borreliosis in Slovenia in 2014 and 2015 by region (Sočan et al., 2016).

Regija	Leto 2014 – št. primerov na 100.000	Leto 2015 – št. primerov na 100.000
Celje	648 / 214,9	547 / 181,3
Nova Gorica	278 / 273,4	308 / 303,2
Koper	214 / 144,0	237 / 159,4
Kranj	571 / 280	480 / 235,4
Ljubljana	851 / 130,3	887 / 135,0
Maribor	523 / 161,8	537 / 166,5
Murska Sobota	328 / 280,0	303 / 260,2
Novo mesto	357 / 254,9	325 / 321,9
Ravne	120 / 167,7	118 / 165,7
Skupaj	3890 / 188,7	3742 / 181,4

2.3.9 Stanje pri živalih v Sloveniji

Borko (1999) je v svoji doktorski disertaciji testiral 892 goved na prisotnost protiteles proti *B. burgdorferi*. S pomočjo indirektna imunofluorescence (IIF) je spomladi 1996 ugotovil 36,6-odstotno serološko pozitivnost in 39,7 % pozitivnih živali z ELISA testom. V jeseni pa je bilo 59,6 % živali IIF pozitivnih in 62,2 % živali pozitivnih z ELISA testom. 1997 je pred pašo ugotovil 29,4 % serološko pozitivnih živali s testom IIF in 59,6 odstotno pozitivnost živali s testom ELISA. V jeseni, po paši, je z IIF ugotovil 49,4-odstotno serološko pozitivnost in z ELISA testom 59,3 % pozitivnih goved.

2.4 Serološka diagnostika s pomočjo imunofluorescenčne tehnike

Z imunofluorescenčno tehniko lahko dokazujemo antigen ali protitelesa. V tej metodi so na protitelesa, s katerimi bomo dokazovali antigen oz. druga protitelesa, vezana barvila, ki nam na koncu postopka služijo kot merilo, s katerim določamo, ali so bili antigeni oz. protitelesa prisotna v preiskovanem vzorcu. Poznamo dve metodi imunofluorescenčne tehnike:

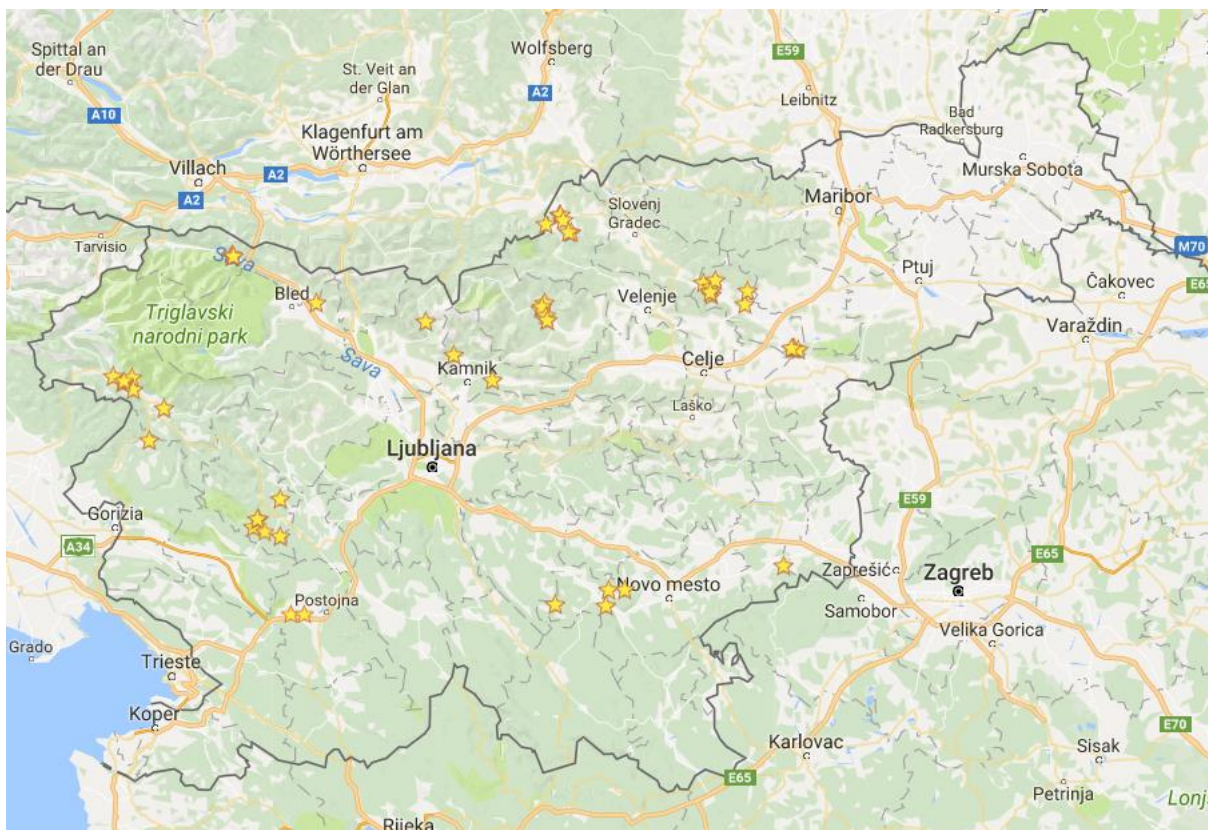
- Neposredna (direktna) metoda. S to metodo v večini primerov dokazujemo antigen. Pri tej metodi se uporabljata samo dve komponenti, in sicer antigen, ki ga želimo dokazati, in specifično konjugirana protitelesa. Vzorec, v katerem iščemo antigen, naneseemo na predmetno stekelce, ga posušimo in fiksiramo. V naslednji fazi ga prelijemo z raztopino specifičnih konjugiranih protiteles. Nato preparat inkubiramo in speremo ter odčitamo rezultate z mikroskopom za opazovanje fluorescence. V primeru prisotnosti fluorescentnih bakterij je rezultat pozitiven (Borko, 1999).
- Posredna (indirektna) metoda. S to metodo v večini primerov dokazujemo protitelesa. V tej metodi potrebujemo znan antigen (povzročitelja, ki ga preiskujemo). Potrebujemo še konjugirana protitelesa za gamaglobuline živalske vrste, katere vzorec bomo preiskovali. Na predmetno stekelce naneseemo suspenzijo preiskovanega antigena, jo osušimo in fiksiramo. Na to na predmetnico naneseemo preiskovano tekočino, npr. krvni serum, v primernem redčenju in inkubiramo 30 minut. Sledita dvakratno spiranje in sušenje. Potem stekelce prelijemo s konjugiranimi protitelesi, specifičnimi za gamaglobuline preiskovane živalske vrste, in inkubiramo 30 minut. Sledita ponovno 2-kratno spiranje in osušitev preparata. Na preparat kanemo kapljico raztopine glicerola in PBS (raztopina fosfatnega pufra), prekrijemo s krovnim stekelcem ter odčitamo rezultate z mikroskopom za opazovanje fluorescence. V primeru prisotnosti fluorescentnih bakterij je rezultat pozitiven (Borko, 1999).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Živali, vključene v raziskavo

V našo raziskavo je bilo vključeno pašno govedo. Večina goveda, pri katerem smo jemali kri, se je pasla že lansko pašno sezono. Vzorce krvi smo jemali pri govedu, ki se pase tako na nižinskih kot višje ležečih in gorskih pašnikih oz. planinah. Del vzorcev smo pobrali v regijah, kjer se vsako leto pojavlja babezioza.



Slika 6: Lokacije, kjer so bili pobrani vzorci (vir: <https://www.google.si/maps>)

Figure 6: Sampling locations (source: <https://www.google.com/maps>)

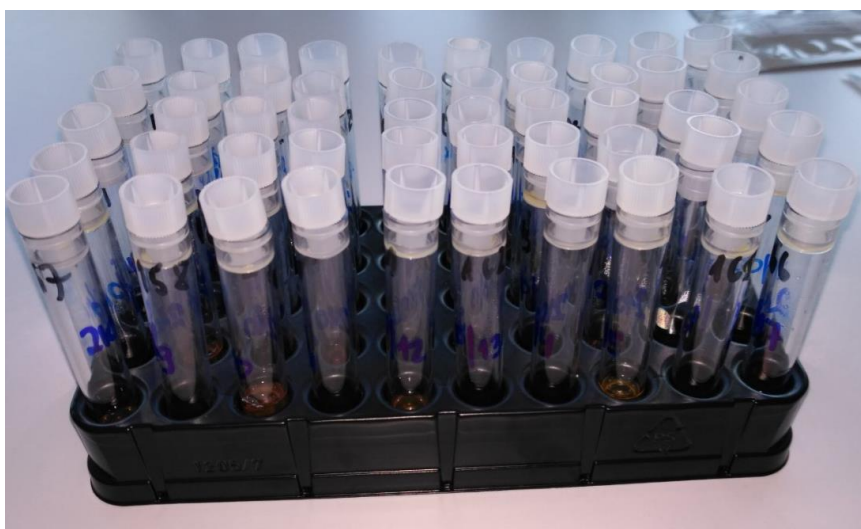
3.1.2 Vzorčenje in odvzem vzorcev

Skupno smo za namen Prešernove naloge vzorčili 291 govedi na 52 različnih kmetijah. Od tega smo 28 živalim odvzeli kri dvakrat, in sicer spomladi pred pašo in nato še v jeseni po končani pašni sezoni. Pregledali smo tudi 6 vzorcev goveda, ki je kazalo klinično sliko babezioze.

Kri se je pri govedu jemala iz *v. caudalis mediana* v vakuumske epruvete (serum clot activator 9 ml, Vacuette, Avstralija) in vakuumske epruvete z dodanim EDTA (K3E K3E EDTA 2 ml, Vacuette, ZDA). Mesto vboda smo očistili in ga nato razkužili s 70 % alkoholom. Epruvete s krvjo smo ustrezno označili in jih shranili v hladilne torbe do prihoda v laboratorij, kjer smo vzorce obdelali.

3.1.3 Priprava vzorcev v laboratoriju

Kri v serumskih epruveh smo pustili koagulirati. Po dvakratnem centrifugiranju (na 3000 obratih na minuto po 10 minut) smo krvni serum razdelili v 4 epruvete in ga shranili na temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do nadaljnjih preiskav.



Slika 7: Vzorci seruma pred zamrznitvijo (Foto: Ošlak)

Figure 7: Serum samples before freezing (Photo: Ošlak)

Epruvete EDTA smo položili na mešalno mizo in jih pustili mešati, da so se krvne celice enakomerno porazdelile. Nato smo naredili hematološko preiskavo s pomočjo hematološkega števca scil Vet abc Plus+ (Horiba, Nemčija), ki je prikazan na Sliki 8.

Pripravili smo tudi krvne razmaze. Vzorce, polne krvi, smo pobarvali in pri klinično pozitivnih vzorcih naredili še diferencialno belo krvno sliko. Preostanek krvi iz epruveh EDTA smo shranili na temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ za morebitne dodatne molekularne preiskave.



Slika 8: Hematološki števec scii Vet abc Plus+ (Horiba, Nemčija) (Foto: Ošlak)

Figure 8: Hematology counter Vet abc Plus + (Horiba, Germany) (Photo: Ošlak)

3.2 Metode analize vzorcev

3.2.1 Krvni razmazi

Iz epruvete z dodanim EDTA smo vzeli kapljico krvi in jo kanili na predmetno stekelce. Z drugim stekelcem smo se pod kotom 30° približali kapljici krvi in počakali, da se je ta razlila ob robu stekelca. Nato smo stekelce potegnili stran od kapljice in tako ustvarili tanek razmaz, ki smo ga posušili na sobni temperaturi.

Posušene razmaze smo pobarvali s Hemacolor® barvilom (Merck, USA). Pri Hemacolor® barvanju se uporabljajo 4 različne raztopine. Raztopina 1 je namenjena fiksaciji preparata, raztopina 2 vsebuje rdeče barvilo, raztopina 3 modro barvilo in 4. raztopina je puferska raztopina, namenjena spiranju.

Posušen krvni razmaz smo potopili 5-krat po 1 s v raztopino ena, nato 3-krat po 1 s v raztopino dve in nato 6-krat po 1 s v raztopino 3. Nato smo preparat potopili v raztopino 4 za 45 s in ga nato posušili. Ko je bil preparat suh, smo na stekelce kanili kapljico imerzijskega olja in začeli mikroskopirati.

V razmazu, pobarvanim s Hemacolor® barvanjem, se jedra celic obarvajo rdeče do vijolično, citoplazma limfocitov in monocitov modro, granule nevtrofilnih granulocitov svetlo modro, granule eozinofilnih granulocitov opečnato rdeče do rdeče-rjavo, granule bazofilnih granulocitov temno vijolično do črno, trombociti vijolično in eritrociti rdečkasto.

3.2.2 Serologija

Za ugotavljanje specifičnih protiteles razreda IgG pri govedu smo uporabili metodo indirektno imunofluorescence. Detekcijo protiteles *A. phagocytophilum* in *B. divergens* smo izvedli s pomočjo komercialno pripravljenih stekelc (Megacor, Avstrija), za detekcijo *B. burgdorferi* pa smo stekelca pripravili sami.



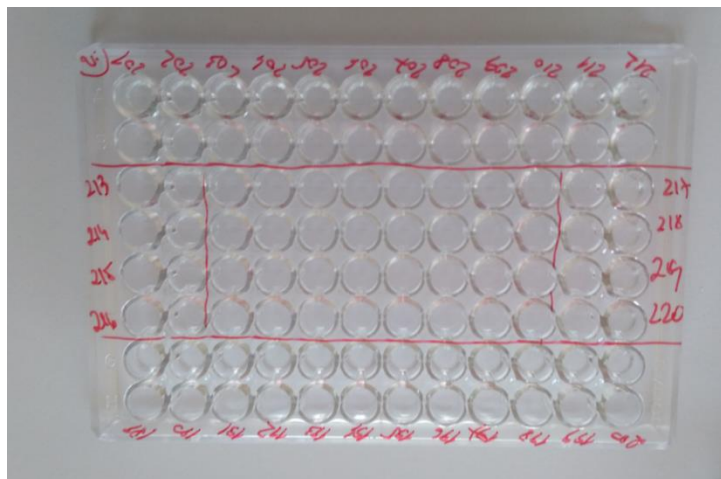
Slika 9: Uporabljena stekelca za ugotavljanje protiteles proti *A. phagocytophilum* (A), *B. divergens* (B) in *B. burgdorferi* (C) (Foto: Ošlak)

Figure 9: Antibody detection slides for *A. phagocytophilum* (A), *B. divergens* (B) in *B. burgdorferi* (C) (Foto: Ošlak)

V metodi smo uporabljali še raztopino fosfatnega pufra, s FITC markirana kunčja protitelesa proti govejim IgG (rabbit anti – cow fluorescein-isothiocyanate (FITC) – conjugated antibodies (Sigma, XXXX) in barvilo Evans blue (BioMérieux, Francija) za lažje odčitavanje rezultatov s fluorescenčnim mikroskopom. Dokaz protiteles s pomočjo indirektno imunofluorescence je potekal v več fazah.

V prvi fazi smo pripravili stekelca za ugotavljanje protiteles IgG proti *B. burgdorferi*. Na prazna stekelca smo nanесли suspenzijo bakterije *B. burgdorferi*, jo posušili in fiksirali.

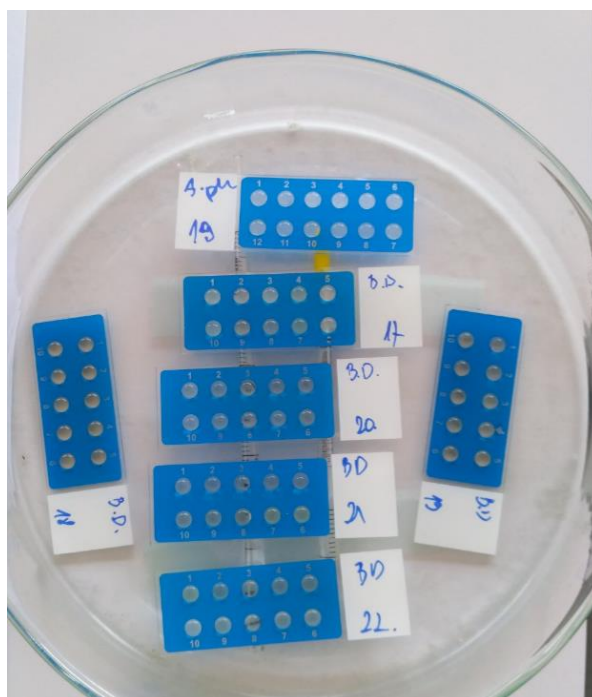
V drugi fazi smo pripravili ustrezno redčenje seruma v fosfatnem pufri, in sicer smo pri *A. phagocytophilum* in *B. divergens* uporabili redčitev 1 : 64, pri *B. burgdorferi* pa 1 : 128.



Slika 10: Priprava redčitev seruma (Foto: Ošlak)

Figure 10: Preparation of serum dilutions (Photo: Ošlak)

V tretji fazi smo pripravljene redčitve nanесли na stekelca in jih inkubirali 30 minut na 37 °C +/- 1 °C.



Slika 11: Stekelca pripravljena za inkubacijo (Foto: Ošlak)

Figure 11: Slides ready for incubation (Photo: Ošlak)

Po tretji fazi je sledilo dvakratno spiranje s PBS (pH 7,2) po 10 minut. Spiranju so sledili nanos konjugiranih kunčjih protiteles proti kravjim IgG protitelesom ter dodatek Evans blue (1 kapljica na 5 ml PBS), inkubacija in spiranje, kot je že opisano zgoraj.



Slika 12: Spiranje stekelc s PBS (Foto: Ošlak)

Figure 12: Washing of slides with PBS (Photo: Ošlak)

Po spiranju smo stekelca posušili in dodali kapljico Fluoprepa in pokrili s krovnim steklom ter s fluorescenčnim mikroskopom odčitavali rezultate, ki smo jih primerjali s pozitivno in z negativno kontrolo, na osnovi česar smo podali končne rezultate. Če so v preiskovanemu serumu bila prisotna protitelesa, smo videli pod fluorescentnim mikroskopom fluorescentno obarvane *A. phagocytophilum*, *B. divergens* in *B. burgdorferi*.

3.2.3 Statistična analiza

S pomočjo programa IBM SPSS Statistic 22 (IBM, ZDA) smo izvedli deskriptivno statistično analizo, ANOVA test z LSD post hoc testi in Hi kvadrat test za linearni trend. Za statistično značilne smo smatrali rezultate, pri katerih je bil $p < 0,05$.

4 REZULTATI

4.1 Dvojno vzorčenje 28 živali pred in po paši

Vseh 28 živali, katerim so bili odvzeti vzorci krvi dvakrat, se v času pašne sezone pasejo na Robnikovi planini, torej bodo rezultati vzorčenja vezani na stanje okuženosti klopov na tem območju.

Skupno 28 živalim je bila kri odvzeta dvakrat, in sicer pred in po pašni sezoni. Pred pašo je bilo serološko negativnih na vse tri povzročitelje 17 živali, po pašni sezoni pa so bile živali serološko pozitivne vsaj na enega povzročitelja. Na *B. burgdorferi* je bila serološko pozitivna 1/28 živali, po paši pa 12/28 živali. Iz tega sledi, da je bilo 12 živali tekom pašne sezone v kontaktu z *B. burgdorferi*, saj je bila žival, ki je bila pred pašno sezono serološko pozitivna, po pašni sezoni serološko negativna. Število serološko pozitivnih živali na *A. phagocytophilum* je bilo pred pašno sezono 10/28, po pašni sezoni 27/28 živali, kar pomeni, da je tekom pašne sezone v kontakt z *A. phagocytophilum* prišlo 17 živali. Število serološko pozitivnih živali na *B. divergens* je bilo pred pašno sezono 9/28, po pašni sezoni 20/28 živali, kar pomeni, da je tekom pašne sezone v kontakt z *B. divergens* prišlo 12 živali, saj je bila ena žival pred pašno sezono serološko pozitivna, po pašni sezoni pa serološko negativna.

Tabela 11: Število seropozitivnih oz. negativnih živali pred oz. po pašni sezoni posameznega povzročitelja
Table 11: Number of seropositive or Negative animals before or After the grazing season of the individual agent

Povzročitelj	<i>A. phagocytophilum</i>		<i>B. divergens</i> *		<i>B. burgdorferi</i> *	
	+	-	+	-	+	-
Stanje protiteles						
Pred pašno sezono	10	18	9	19	1	27
Po pašni sezoni	27	1	20	8	12	16

*Ena od živali je bila pred pašno sezono serološko pozitivna, po pašni sezoni pa serološko negativna na označenega povzročitelja.

* One of the animals was serologically positive before the grazing season, and after the grazing season it was serologically negative for the identified pathogen.

Kot je razvidno iz Tabele 12, je bilo pred pašo na *A. phagocytophilum* in *B. divergens* serološko pozitivnih 8 živali, po paši pa 20 živali. Na *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi* je

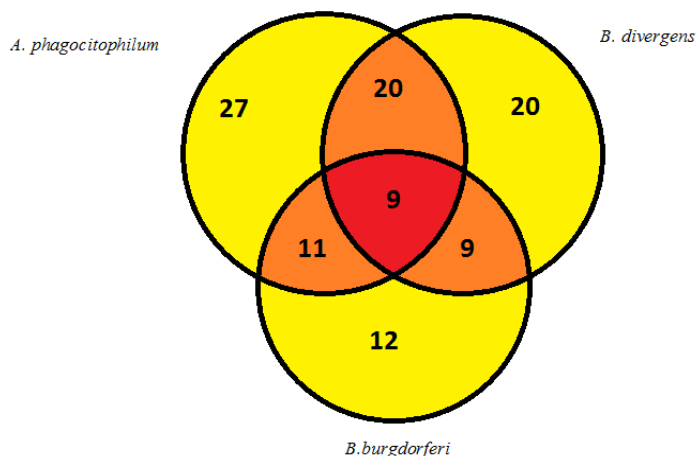
bila serološko pozitivna le ena žival, po paši pa 11 živali. Prav tako je bila na *B. divergens* in *B. burgdorferi* pred pašo pozitivna ena žival, po paši pa 9 živali. Pred pašo je bila na vse tri povzročitelje serološko pozitivna le ena žival, po paši pa je bilo pozitivnih kar 9 živali.

Tabela 12: Število seropozitivnih oz. negativnih živali pred oz. po pašni sezoni za dva oz. vse tri povzročitelje

Table 12: Number of seropositive or Negative animals before or After the grazing season for two or All three agents.

Povzročitelj	A. <i>phagocytophilum</i> + <i>B. divergens</i>		A. <i>phagocytophilum</i> + <i>B. burgdorferi</i>		<i>B. divergens</i> + <i>B. burgdorferi</i>		A. <i>phagocytophilum</i> + <i>B. divergens</i> + <i>B. burgdorferi</i>	
	+	-	+	-	+	-	+	-
Stanje protiteles								
Pred pašno sezono	8	20	1	27	1	27	1	27
Po pašni sezoni	20	8	11	16	9	18	9	18

Slika 13 prikazuje število po paši serološko pozitivnih živali na posameznega povzročitelja oz. dva oz. vse tri povzročitelje. Razvidno je, da so vse živali, ki so bile serološko pozitivne na *A. phagocytophilum*, hkrati tudi serološko pozitivne na *B. divergens*. Prav tako so vse živali, ki so bile serološko pozitivne na *B. divergens* in *B. burgdorferi*, hkrati tudi pozitivne na *A. phagocytophilum*.

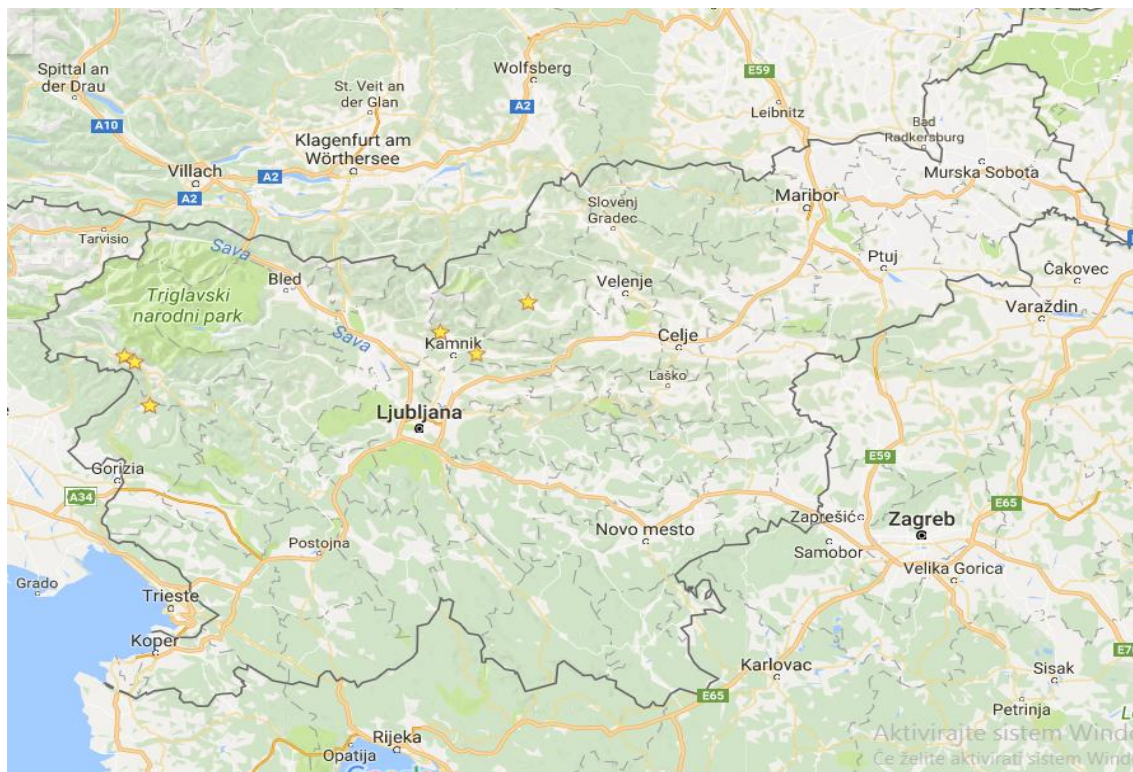


Slika 13: Shematski prikaz števila serološko pozitivnih živali glede na število različnih povzročiteljev po pašni sezoni (dvakratno vzorčenje 28 živali: pred in po pašni sezoni)

Figure 13: Schematic representation of the number of serologically positive animals, according to the number of different pathogens after the grazing season (28 animals were sampled before and after the grazing season)

4.2 Klinično pozitivni vzorci na *B. divergens*

S pomočjo terenskih veterinarjev nam je uspelo dobiti tudi 6 vzorcev krvi živali, ki so kazale klinične znake, značilne za okužbe z *B. divergens*.



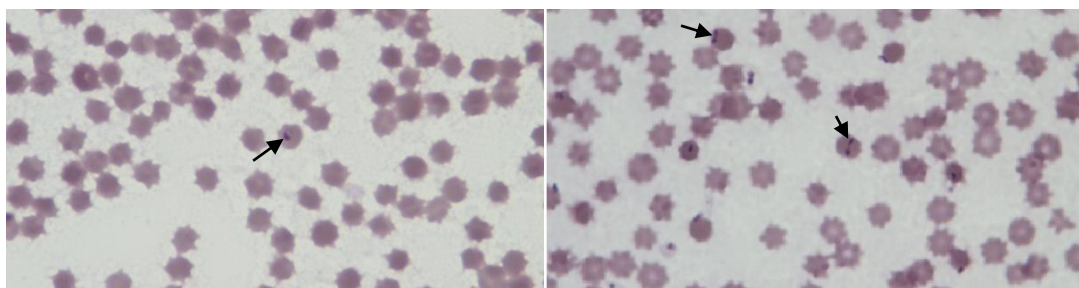
Slika 14: Lokacije gospodarstev s klinično pozitivnimi živalmi na babeziozo (vir: <https://www.google.si/maps>)

Figure 14: Locations of clinically positive animals for babesiosis (source: <https://www.google.com/maps>)

Kar 6/6 vzorcev je bilo serološko pozitivnih na *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi* in 2/6 vzorcev sta bila serološko pozitivna na *B. divergens*.

Nobena od živali ni imela povišanih levkocitov, le ena od živali je imela levkocite pod spodnjo mejo. 2/6 živali sta imeli vrednost eritrocitov pod spodnjo mejo, vendar pa so bile vrednosti eritrocitov ostalih živali v spodnji polovici normalnih vrednosti za govedo, saj je bila najvišja vrednost eritrocitov $6,3 \times 10^{12}/l$. Število trombocitov je bilo pri vseh živalih znotraj normalnih vrednosti, vendar pa so bile vrednosti zelo blizu spodnje meje normalnih vrednosti za govedo.

Na pobarvanih krvnih razmazih smo diagnosticirali *B. divergens*, ki se v eritrocitih vidi kot eozinofilne inkluzije. Inkluzije so prikazane na Sliki 15.



Slika 15: *B. divergens* (puščice) v eritrocitih (Foto: Ošlak)

Figure 15: *B. divergens* (arrows) in erythrocytes (Photo: Ošlak)

Pri petih vzorcih smo pod mikroskopom na krvnem razmazu videli prisotnost *B. divergens*, pri enem od vzorcev pa nismo mogli pripraviti razmaza, saj nam je veterinar poslal le krvni serum. Prav tako smo na razmazih prešteli bele krvne celice (levkocite). Rezultati so vidni v Tabeli 13.

Tabela 13: Diferencialna bela krvna slika klinično bolnih živali s sumom na *B. divergens*

Table 13: Differential white blood count of clinically ill animals with a suspicion of *B. divergens*

Številka vzorca	SEGM.	EOS.	BAZO.	LIMFO.	MONO.	PAL.	Krvni razmaz (<i>B. divergens</i>)
42	27	2	0	67	2	2	poz.
44	63	1	0	33	1	2	poz.
46	35	3	1	60	1	0	poz.
249	26	1	0	73	0	0	poz.
251	37	15	1	46	1	2	poz.

Pri 1/6 vzorcev je vidno povišano število nevtrofilnih granulocitov (SEGM). Število eozinofilnih granulocitov (EOS) je bilo povišano pri 1/6 živalih. Število bazofilnih granulocitov (BAZO) je bilo pri vseh 6 živalih normalno. Pri eni od 6 živali je število limfocitov (LIMFO) znižano, pri dveh živalih pa povišano. Število monocitov (MONO) in paličastih nevtrofilnih granulocitov (PAL) je bilo pri vseh normalno. Za primerjavo prilagam Tabelo 14 z referenčnimi vrednostmi bele krvne slike.

Tabela 14: Referenčne vrednosti parametrov bele krvne slike pri govedu Laboratorija za klinično patologijo (KRVŽ) Veterinarske fakultete

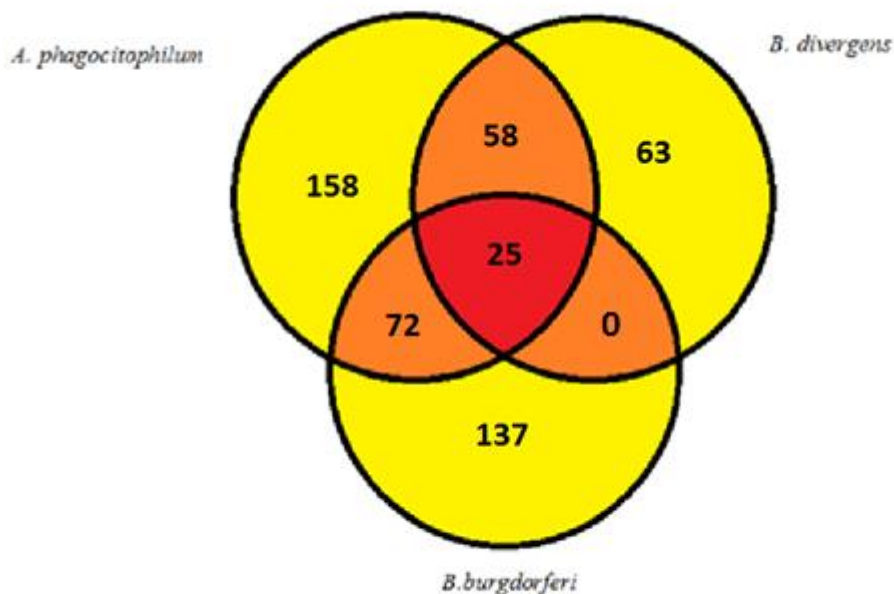
Table 14: Reference values of white blood cell parameters in cattle Laboratory for clinical pathology Veterinary faculty

Parameter	Vrednost (%)
Nevtorfilni granulociti	25–45
Eozinofilni granulociti	1–10
Bazofilni granulociti	0–2
Limfociti	45–65
Paličasti nevtrofilni granulociti	0–2
Monociti	2–8

4.3 Rezultati seroloških preiskav 291 vzorcev

V tem poglavju je narejena analiza rezultatov 291 vzorcev, saj je bila 28 živalim odvzeta kri dvakrat. Vključili pa smo le rezultate drugega odvzema, saj smo se tako izognili podvajanju rezultatov.

Serološko pozitivnih na *A. phagocytophilum* je bilo 158 živali, ena žival je bila sumljiva, na *B. divergens* je bilo serološko pozitivnih 63 živali, na *B. burgdorferi* pa je bilo serološko pozitivnih 137 živali. Hkrati je bilo na *A. phagocytophilum* in *B. divergens* serološko pozitivnih 58 živali, na *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi* pa je bilo serološko pozitivnih 72 živali. Na *B. divergens* in *B. burgdorferi* ni bilo serološko pozitivnih živali. Na vse tri povzročitelje je bilo pozitivnih 25 živali. Slika 16 nam prikazuje shematski prikaz serološko pozitivnih živali.



Slika 16: Shematski prikaz števila serološko pozitivnih živali

Figure 16: Schematic representation of the number of serologically positive animals

Od 291 živali je bilo 54,64 % živali serološko pozitivnih na *A. phagocytophilum*, 21,65 % živali serološko pozitivnih na *B. divergens* in 47,08 % živali serološko pozitivnih na *B. burgdorferi*.

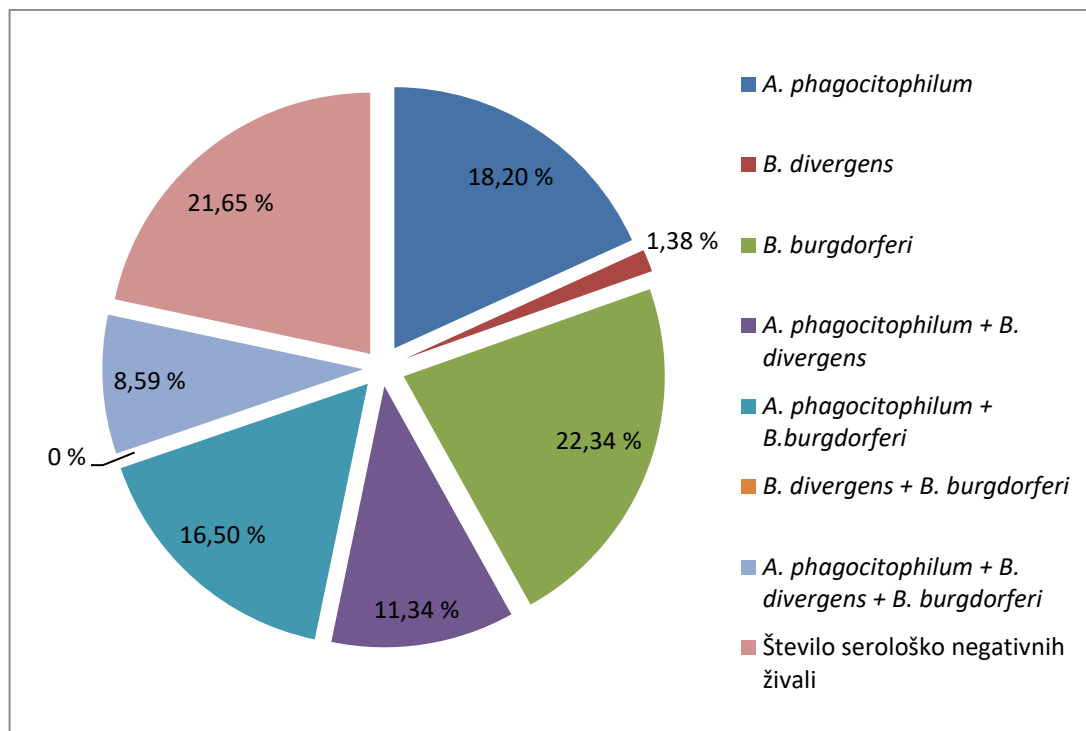
Zanimiva je tudi ugotovitev, da je bilo serološko negativnih na vse povzročitelje 63 živali, samo na *A. phagocytophilum* je bilo serološko pozitivnih 53 živali, samo na *B. divergens* so bile serološko pozitivne 4 živali, samo na *B. burgdorferi* je bilo serološko pozitivnih 65 živali, samo na *A. phagocytophilum* in *B. divergens* je bilo serološko pozitivnih 33 živali, samo na *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi* je bilo serološko pozitivnih 48 živali, samo na *B. divergens* in *B. burgdorferi* ni bilo serološko pozitivnih živali.

Tabela 15: Število živali, ki so bile serološko pozitivne na različne povzročitelje

Table 15: Number of animals serologically positive for different pathogens

Povzročitelj	Število serološko pozitivnih živali na enega povzročitelja oz. na določeno kombinacijo povzročiteljev
<i>A. phagocytophilum</i>	53
<i>B. divergens</i>	4
<i>B. burgdorferi</i>	65
<i>A. phagocytophilum</i> + <i>B. divergens</i>	33
<i>A. phagocytophilum</i> + <i>B. burgdorferi</i>	48
<i>B. divergens</i> + <i>B. burgdorferi</i>	0
<i>A. phagocytophilum</i> + <i>B. divergens</i> + <i>B. burgdorferi</i>	25
Število serološko negativnih živali	63

Na Sliki 17 je viden odstotek živali, ki so bile serološko negativne na vse tri povzročitelje oz. so bile serološko pozitivne le na enega izmed povzročiteljev oz. so bile serološko pozitivne le na dva oz. vse tri povzročitelje. Serološko negativnih je bilo 21,65 % živali, samo na *A. phagocytophilum* je bilo serološko pozitivnih 18,20 % živali, le na *B. divergens* je bilo serološko pozitivnih 1,38 % živali, le na *B. burgdorferi* je bilo serološko pozitivnih 22,34 % živali, le na *A. phagocytophilum* in *B. divergens* je bilo serološko pozitivnih 11,34 % živali, le na *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi* je bilo serološko pozitivnih 16,50 % živali, samo na *B. divergens* in *B. burgdorferi* ni bilo serološko pozitivnih živali in na vse tri povzročitelje je bilo 8,59 % serološko pozitivnih živali.



Slika 17: Odstotek serološko pozitivnih živali na izključno enega oz. dva oz. vse tri povzročitelje

Figure 17: The percentage of animals serologically positive exclusively on one or two or all three pathogens

4.4 Rezultati hematologije 291 vzorcev

Pri vseh vzorcih smo naredili tudi hematološko preiskavo. Pri 16 vzorcih hematološke preiskave nismo mogli narediti, ker je bila krvi v EDTA epruveh koagulirala. Pri 17/291 vzorcev smo ugotovili povišano število levkocitov, pri 3 vzorcih pa znižano število levkocitov. Od 17 vzorcev je bil en vzorec serološko negativen na vse tri povzročitelje, štirje vzorci so bili serološko pozitivni le na *A. phagocytophilum*, prav tako so bili štirje vzorci serološko pozitivni le na *B. burgdorferi*, trije vzorci pa so bili serološko pozitivni na *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi*, dva vzorca sta bila pozitivna na *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi* in trije vzorci so bili pozitivni na vse tri povzročitelje.

Od treh vzorcev, ki so imeli znižano vrednost levkocitov, je bil en vzorec serološko negativen na vse tri povzročitelje, en vzorec je bil serološko pozitiven na *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi* in en vzorec je bil pozitiven na *A. phagocytophilum* in *B. divergens*.

Pri osmih od 291 vzorcev smo ugotovili odstopanje števila eritrocitov od normalnih vrednosti. 3 živali so imele preveliko število eritrocitov, pri petih živalih pa so bile vrednosti eritrocitov prenizke.

Dve od živali s povišanim številom eritrocitov sta bili serološko pozitivni na *A. phagocytophilum*, ena pa je bila serološko pozitivna na *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi*.

Pri živalih z znižanim številom eritrocitov je bila ena žival serološko pozitivna na vse tri povzročitelje, tri so bile serološko pozitivne na *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi* in ena žival je bila serološko pozitivna na *B. burgdorferi*.

Število trombocitov je odstopalo od normalnih vrednosti pri 30 vzorcih. Dve živali sta imeli trombocite pod spodnjo mejo, 28 živali pa je imelo trombocite nad zgornjo mejo.

Za referenčne vrednosti posameznih parametrov smo uporabili vrednosti, ki jih uporabljajo v Laboratoriju za klinično patologijo (KRVŽ) Veterinarske fakultete. Vrednosti so prikazane v Tabeli 16.

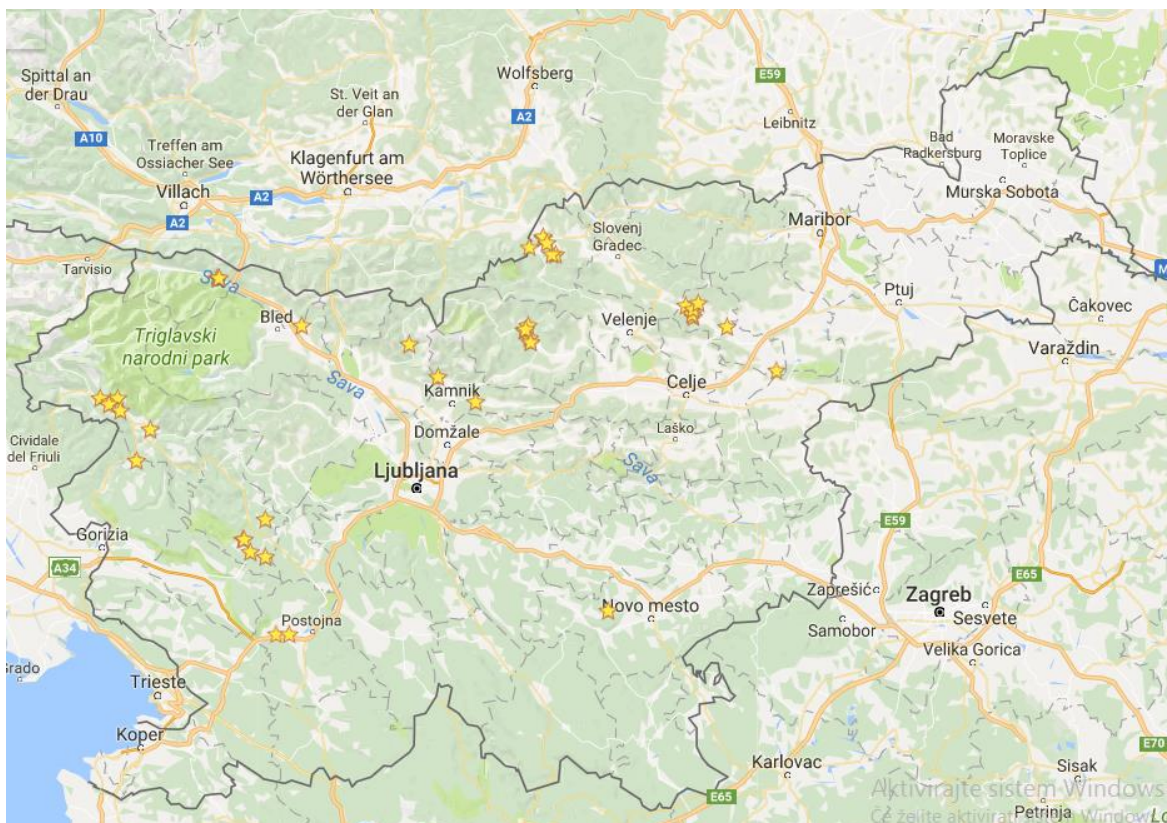
Tabela 16: Referenčne vrednosti hematoloških parametrov Laboratorija za klinično patologijo(KRVŽ) Veterinarske fakultete

Table 16: Reference values of hematological parameters Laboratory for Clinical Pathology Veterinary faculty

Parameter	Enota	Vrednost
Eritrociti	$10^{12}/l$	5,0–8,5
Hemoglobin	g/dl	9,0–14,0
Hematokrit	%	28–38
Levkociti	$10^9/l$	5–10
MCV	fl	40–60
MHC	pg	14–24
MCHC	g/dl (%)	26–35
Trombociti	$10^9/l$	200–800

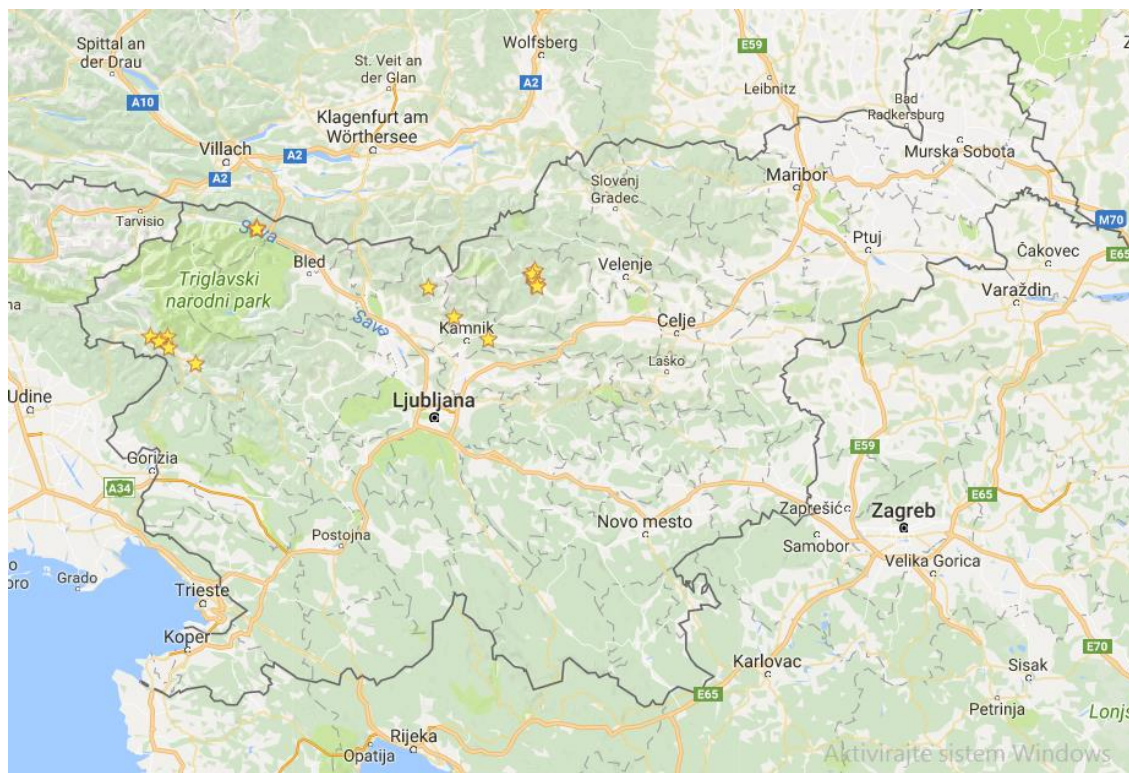
4.5 Geografska lokacija serološko pozitivnih živali

Kot je razvidno na Sliki 18 in Sliki 20, so bila serološko pozitivna goveda na *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi* najdena na vseh področjih, kjer smo pobrali vzorce. Serološko pozitivna goveda na *B. divergens* so bila najdena predvsem na področju severnega in severno zahodnega dela Slovenije (Slika 19), kjer se pojavljajo tudi klinična obolenja.



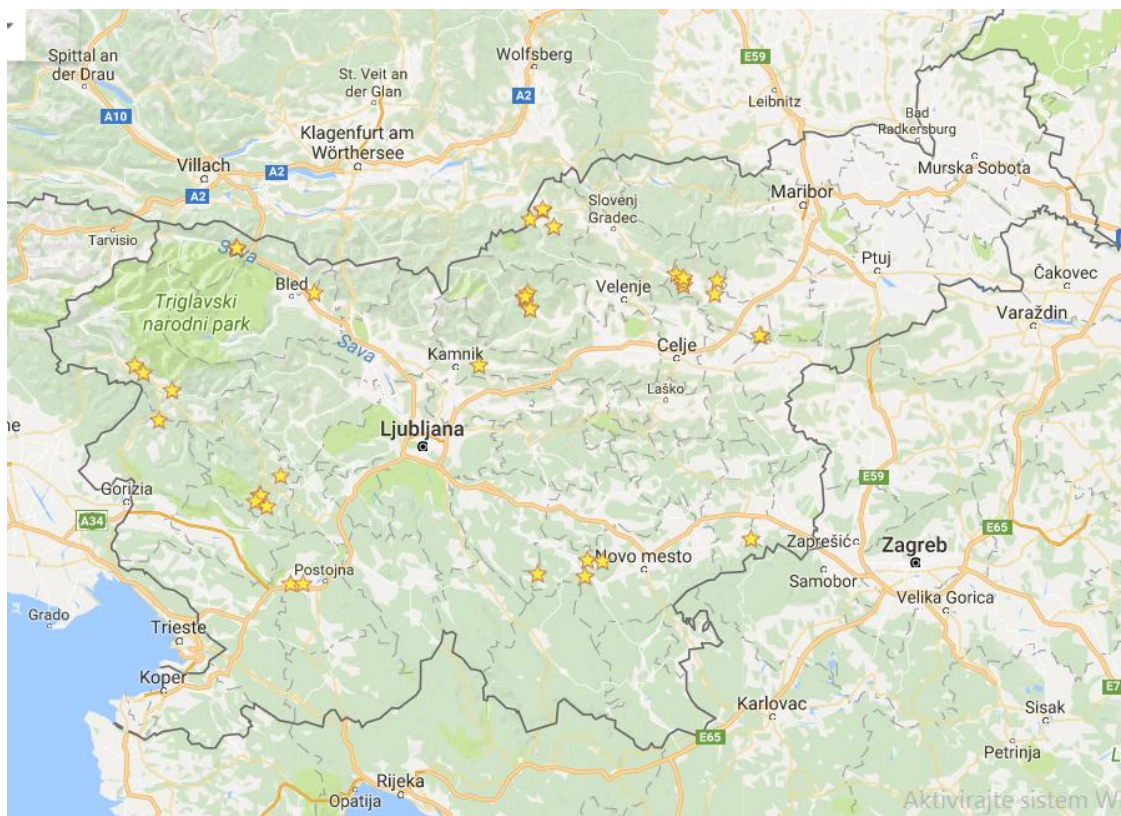
Slika 18: Lokacije gospodarstev s serološko pozitivnim govedom na *A. phagocytophilum* (vir: <https://www.google.si/maps>)

Figure 18: Locations of seropositive cattle on *A. phagocytophilum* (source: <https://www.google.com/maps>)



Slika 19: Lokacije gospodarstev s serološko pozitivnim govedom na *B. divergens* (vir: <https://www.google.si/maps>)

Figure 19: Locations of serologically positive cattle on *B. divergens* (source: <https://www.google.com/maps>)



Slika 20: Lokacije gospodarstev s serološko pozitivnim govedom na *B. burgdorferi* (vir: <https://www.google.si/maps>)

Figure 20: Locations of holdings with serologically positive cattle on *B. burgdorferi* (source: <https://www.google.com/maps>)

4.6 Vpliv serološke pozitivnosti (Babesija, Anaplasma in Borelia) na krvno sliko krav

4.6.1 Vpliv na levkocite

Pri statistični analizi vpliva serološke pozitivnosti na levkocite smo ugotovili statistično značilne razlike števila levkocitov med zdravimi živalmi in živalmi, ki so bile serološko pozitivne na *A. phagocytophilum*, ki so bile hkrati serološko pozitivne na *A. phagocytophilum* in *B. divergens*, ki so bile serološko pozitivne na *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi*, in živalmi, ki so bile serološko pozitivne na vse tri povzročitelje. Opisna statistika je zbrana v Tabeli 17.

Tabela 17: Opisna statistika števila levkocitov pri serološko pozitivnih in negativnih živalih

Table 17: Descriptive statistics on the number of leukocytes in serologically positive and negative animals

	<i>Cou nt</i>	<i>Aver age</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Minim um</i>	<i>Maxim um</i>	<i>Ran ge</i>	<i>Std. skewness</i>	<i>Std. kurtosis</i>
WBCHealthy	60	6,99	2,07209	29,6154%	3,1	15,4	12,3	3,58096	5,40862
WBCAn	50	8,77	2,59108	29,5246%	3,1	18,1	15,0	3,28964	4,46482
WBCBo	60	7,77	2,34852	30,2125%	4,5	16,4	11,9	4,1532	4,27081
WBCBa	4	8,43	1,82277	21,6353%	7,0	11,1	4,1	1,41646	1,3466
WBCAnBa	28	8,96	2,22834	24,8778%	3,7	12,2	8,5	-1,20941	-0,0448759
WBCAnBo	44	8,19	2,30155	28,0988%	2,0	14,0	12,0	0,626458	1,87429
WBCAnBaBo	25	8,1	2,57139	31,7299%	4,2	13,4	9,2	0,979732	-0,515148
Total	271	8,02	2,40368	29,9838%	2,0	18,1	16,1	5,2418	5,10089

S pomočjo Hi kvadrat testa za linearni trend smo ugotovili, da se z večanjem vrednosti levkocitov povečuje delež serološko pozitivnih živali na *A. phagocytophilum* glede na serološko negativne. Povezava ni linearna. Prav tako se z večanjem vrednosti levkocitov povečuje delež serološko pozitivnih živali na *A. phagocytophilum* in *B. divergens* glede na serološko negativne. Povezava ni linearna.

Z večanjem vrednosti levkocitov se povečuje delež tudi serološko pozitivnih živali na *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi* glede na serološko negativne. Povezava je linearna.

Prav tako se z večanjem vrednosti levkocitov povečuje delež serološko pozitivnih živali na vse tri povzročitelje glede na serološko negativne. Povezava je linearna.

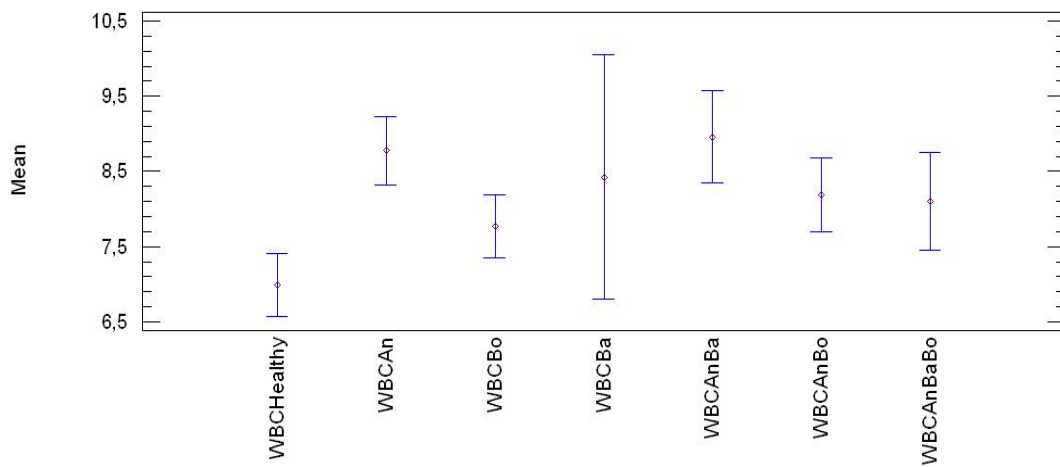
Razlike v številu levkocitov prikazuje Tabela 18.

Tabela 18: Statistično značilne razlike števila levkocitov

Table 18: Statistically significant differences in the number of leukocytes

Contrast	Difference	+/- Limits
WBCHealthy - WBCAn	-1,77933	0,880014
WBCHealthy - WBCAnBa	-1,96048	1,05182
WBCHealthy - WBCAnBo	-1,19424	0,912154
WBCHealthy - WBCAnBaBo	-1,10733	1,094
WBCAn - WBCBo	1,00267	0,880014
WBCBo - WBCAnBa	-1,18381	1,05182

Število levkocitov za posamezno skupino je prikazano na Sliki 21.



Slika 21: Grafični prikaz števila levkocitov

Figure 21: A graphical representation of leukocytes count

4.6.2 Vpliv na eritrocite

Pri statistični analizi vpliva serološke pozitivnosti na eritrocite smo ugotovili statistično značilne razlike števila eritrocitov med zdravimi živalmi in živalmi, ki so bile serološko pozitivne na *A. phagocytophilum*, ter živalmi, ki so bile hkrati serološko pozitivne na *A. phagocytophilum* in *B. divergens*. Opisna statistika je zbrana v Tabeli 19.

Tabela 19: Opisna statistika števila eritrocitov pri serološko pozitivnih in negativnih živalih

Table 19: Descriptive statistics on the number of erythrocytes in seropositive and negative animals

	<i>Count</i>	<i>Average</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Range</i>	<i>Std. skewness</i>	<i>Std. kurtosis</i>
RBCHealthy	60	6,72	0,869704	12,9359%	5,17	9,89	4,72	3,19331	3,51937
RBCAn	50	7,27	1,50816	20,749%	4,68	12,36	7,68	3,23319	2,29483
RBCBo	60	6,79	0,880224	12,9626%	5,2	9,24	4,04	1,45777	-0,181247
RBCBa	4	6,47	0,508658	7,8618%	6,18	7,23	1,05	1,59558	1,56579
RBCAnBa	28	7,51	0,860988	11,4651%	5,62	8,84	3,22	-1,46719	-0,0430698
RBCAnBo	44	6,61	1,1845	17,9266%	3,92	10,66	6,74	1,79821	4,06177
RBCAnBaBo	25	7,06	1,32626	18,7888%	4,94	9,7	4,76	0,535281	-0,728092
Total	271	6,93	1,13829	16,4293%	3,92	12,36	8,44	5,94208	7,22221

S pomočjo Hi kvadrat testa za linearni trend smo ugotovili, da se z večanjem vrednosti eritrocitov povečuje delež serološko pozitivnih živali na *A. phagocytophilum* glede na serološko negativne. Povezava je linearna. Prav tako se z večanjem vrednosti eritrocitov povečuje delež serološko pozitivnih živali na *A. phagocytophilum* in *B. divergens* glede na serološko negativne. Povezava je linearna.

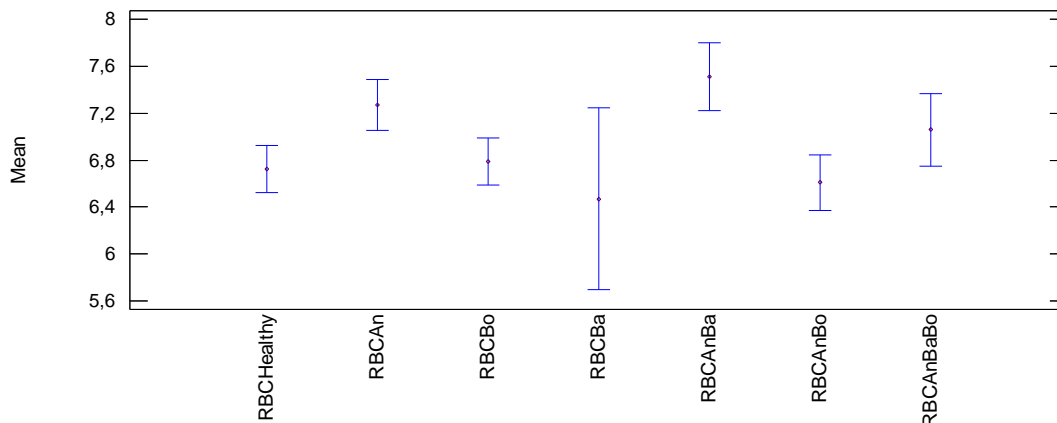
Razlike v številu eritrocitov prikazuje Tabela 20.

Tabela 20: Statistično značilne razlike števila eritrocitov

Table 20: Statistically significant differences in the number of erythrocytes

<i>Contrast</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
RBCHealthy - RBCAn	-0,545433	0,418415
RBCHealthy - RBCAnBa	-0,786476	0,500101
RBCAn - RBCBo	0,4781	0,418415
RBCAn - RBCAnBo	0,6611	0,451673
RBCBo - RBCAnBa	-0,719143	0,500101
RBCAnBa - RBCAnBo	0,902143	0,528241

Število eritrocitov za posamezno skupino je prikazano na Sliki 22.



Slika 22: Grafični prikaz števila eritrocitov

Figure 22: A graphical representation of erythrocytes count

4.6.3 Vpliv na hemoglobin

Pri statistični analizi vpliva serološke pozitivnosti na hemoglobin smo ugotovili statistično značilne razlike hemoglobina med zdravimi živalmi in živalmi, ki so bile serološko pozitivne na *A. phagocytophilum* in *B. divergens*. Opisna statistika je zbrana v Tabeli 21.

Tabela 21: Opisna statistika hemoglobina pri serološko pozitivnih in negativnih živalih

Table 21: Descriptive statistics of hemoglobin in serologically positive and negative animals

	Coun <i>t</i>	Average	Standard deviation	Coeff. of variation	Minim um	Maxi mum	Ra nge	Std. skewness	Std. kurtosis
HGBHealt hy	60	10,2333	1,23737	12,0915%	7,6	13,3	5,7	0,930233	-0,29836
HGBAn	50	10,634	1,30033	12,2281%	7,8	14,0	6,2	0,0730191	0,186662
HGBbo	60	10,3733	1,31753	12,7011%	7,5	14,0	6,5	1,92953	0,775555
HGBBa	4	9,425	0,464579	4,92922%	9,0	10,0	1,0	0,458035	-1,0117
HGBAnBa	28	11,0929	1,47997	13,3417%	8,4	14,2	5,8	0,796121	-0,463908
HGBAnBo	44	10,1818	1,2926	12,6952%	6,5	12,4	5,9	-1,61317	0,34182
HGBAnBa Bo	25	10,704	1,19215	11,1375%	8,6	13,2	4,6	0,481227	-0,775804
Total	271	10,4502	1,31481	12,5817%	6,5	14,2	7,7	1,60919	0,361199

S pomočjo Hi kvadrat testa za linearni trend smo ugotovili, da se z večanjem vrednosti hemoglobina povečuje delež serološko pozitivnih živali na *A. phagocytophilum* in *B. divergen* glede na serološko negativne. Povezava je linearna.

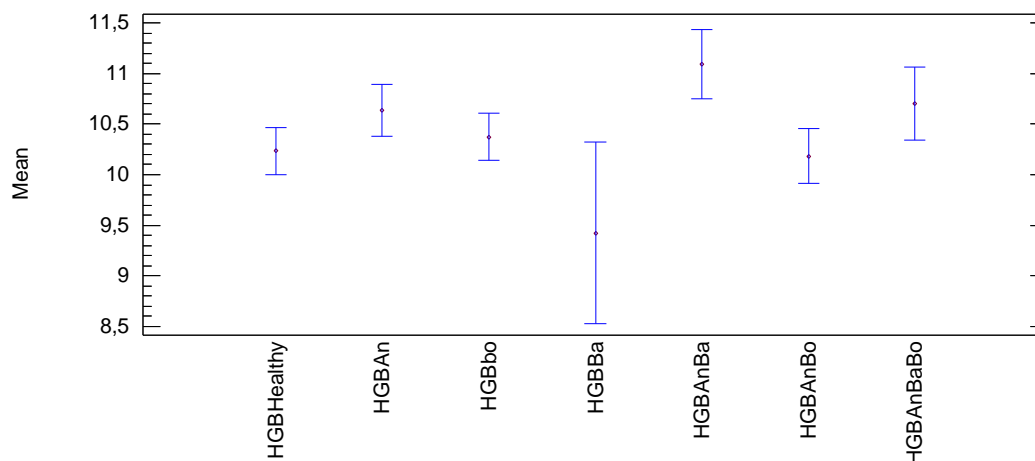
Razlike v količini hemoglobina prikazuje Tabela 22.

Tabela 22: Statistično značilne razlike koncentracije hemoglobina

Table 22: Statistically significant differences in hemoglobin concentration

<i>Contrast</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
HGBHealthy - HGBA nBa	-0,859524	0,582663
HGBbo - HGBA nBa	-0,719524	0,582663
HGBBa - HGBA nBa	-1,66786	1,36081
HGBAnBa - HGBA nBo	0,911039	0,615449

Vrednosti hemoglobina za posamezno skupino so prikazane na Sliki 23.



Slika 23: Grafični prikaz vrednosti hemoglobina

Figure 23: Graphical presentation of hemoglobin values

4.6.4 Vpliv na hematokrit

Pri statistični analizi vpliva serološke pozitivnosti na hematokrit smo ugotovili statistično značilne razlike hematokrita med zdravimi živalmi in živalmi, ki so bile serološko pozitivne na *A. phagocytophilum* in *B. divergens*. Opisna statistika je zbrana v Tabeli 23.

Tabela 23: Opisna statistika hematokrita pri serološko pozitivnih in negativnih živalih
 Table 23: Descriptive statistics of hematocrit in serologically positive and negative animals

	<i>Count</i>	<i>Average</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Range</i>	<i>Std. skewness</i>	<i>Std. kurtosis</i>
HCTHealthy	60	30,865	4,05633	13,1422%	22,7	40,5	17,8	1,08307	-0,435062
HCTAn	50	32,44	4,57634	14,1071%	22,4	44,8	22,4	0,250092	0,178651
HCTBo	60	31,4133	4,61664	14,6964%	22,3	45,4	23,1	2,71777	1,51796
HCTBa	4	28,6	1,90613	6,66479%	26,9	30,3	3,4	0,0	-2,43826
HCTAnBa	28	33,7607	4,32087	12,7985%	25,0	43,2	18,2	0,541054	-0,0220258
HCTAnBo	44	30,6477	4,35172	14,1991%	17,8	37,9	20,1	-2,62662	1,69096
HCTAnBaBo	25	32,808	3,77888	11,5182%	26,1	39,8	13,7	0,239098	-0,888559
Total	271	31,6867	4,40426	13,8994%	17,8	45,4	27,6	1,33032	1,2991

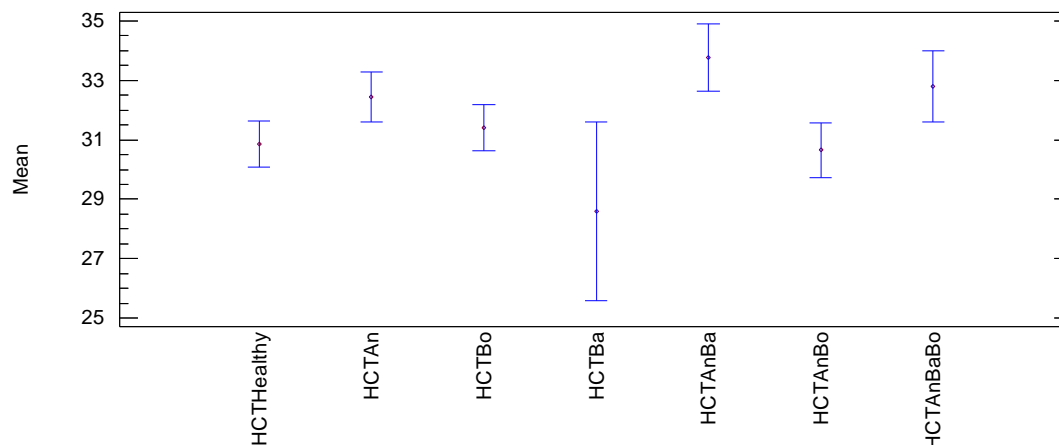
S pomočjo Hi kvadrat testa za linearni trend smo ugotovili, da se z večanjem vrednosti hemoglobina povečuje delež serološko pozitivnih živali na *A. phagocytophilum* in *B. divergens* glede na serološko negativne. Povezava je linearna.

Razlike hematokrita prikazuje Tabela 24.

Tabela 24: Statistično značilne razlike hematokrita
 Table 24: Statistically significant differences in hematocrit

<i>Contrast</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
HCTHealthy - HCTAnBa	-2,89571	1,94669
HCTAn - HCTAnBo	1,79227	1,75818
HCTBo - HCTAnBa	-2,34738	1,94669
HCTBa - HCTAnBa	-5,16071	4,5465
HCTAnBa - HCTAnBo	3,11299	2,05623
HCTAnBo - HCTAnBaBo	-2,16027	2,13029

Vrednosti hematokrita za posamezno skupino so prikazane na Sliki 24.



Slika 24: Grafični prikaz vrednosti hematokrita
 Figure 24: Graphical presentation of hematocrit values

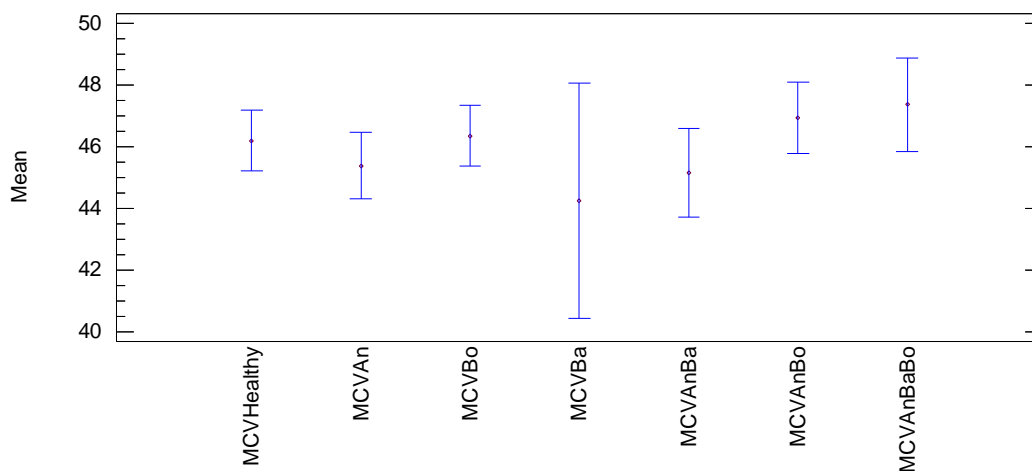
4.6.5 Vpliv na MCV

Pri statistični analizi vpliva serološke pozitivnosti na MCV nismo ugotovili statistično značilne razlike MCV med zdravimi in serološko pozitivnimi živalmi. Opisna statistika je zbrana v Tabeli 25.

Tabela 25: Opisna statistika MCV pri serološko pozitivnih in negativnih živalih
 Table 25: Descriptive MCV statistics for serologically positive and negative animals

	<i>Coun t</i>	<i>Average</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Minimu m</i>	<i>Maxim um</i>	<i>Ran ge</i>	<i>Std. skewness</i>	<i>Std. kurtosis</i>
MCVHealthy	60	46,2	5,34187	11,5625%	34,0	59,0	25,0	0,164905	0,162372
MCVAn	50	45,38	5,95181	13,1155%	35,0	61,0	26,0	0,476614	-0,672283
MCVBo	60	46,35	4,25391	9,1778%	39,0	55,0	16,0	0,727055	-1,33884
MCVBa	4	44,25	3,20156	7,23517%	42,0	49,0	7,0	1,52396	1,47756
MCVAnBa	28	45,1429	5,51573	12,2184%	34,0	55,0	21,0	-0,0863259	-0,629067
MCVAnBo	44	46,9318	5,91961	12,6132%	33,0	62,0	29,0	0,0894451	0,408188
MCVAnBaBo	25	47,36	6,56937	13,8711%	37,0	61,0	24,0	0,263868	-0,999033
Total	271	46,1697	5,45018	11,8046%	33,0	62,0	29,0	0,797169	-0,674159

Vrednosti MCV za posamezno skupino so prikazane na Sliki 25.



Slika 25: Grafični prikaz vrednosti MCV

Figure 25: Graphical display of MCV values

4.6.6 Vpliv na MCH

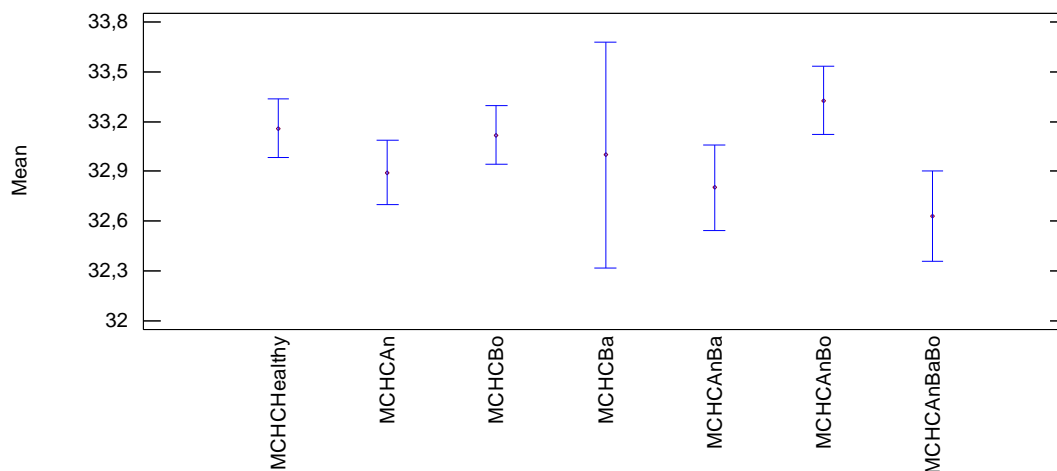
Pri statistični analizi vpliva serološke pozitivnosti na MCH nismo ugotovili statistično značilne razlike MCH med zdravimi in serološko pozitivnimi živalmi. Opisna statistika je zbrana v Tabeli 26.

Tabela 26: Opisna statistika števila MCH pri serološko pozitivnih in negativnih živalih

Table 26: Descriptive statistics on the number of MCH in serologically positive and negative animals

	<i>Count</i>	<i>Average</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>	<i>Range</i>	<i>Std. skewness</i>	<i>Std. kurtosis</i>
MCHHealthy	60	15,305	1,73756	11,3529%	11,3	19,2	7,9	0,400231	-0,276353
MCHAn	50	14,948	2,20401	14,7445%	11,1	21,3	10,2	0,68173	-0,0149271
MCHBo	60	15,3567	1,40246	9,1326%	12,8	18,5	5,7	0,87409	-1,03852
MCHBa	4	14,575	0,699405	4,79866%	13,8	15,5	1,7	0,517283	0,704103
MCHAnBa	28	14,8179	1,95941	13,2233%	11,2	18,3	7,1	0,028469	-0,690445
MCHAnBo	44	15,6341	1,98821	12,7172%	10,9	20,5	9,6	-0,101901	0,339611
MCHAnBaBo	25	15,488	2,26887	14,6492%	11,5	20,0	8,5	0,0714649	-1,07898
Total	271	15,2598	1,87697	12,3001%	10,9	21,3	10,4	0,636029	-0,346429

Vrednost MCH za posamezno skupino so prikazana na Sliki 26.



Slika 26: Grafični prikaz vrednosti MCH

Figure 26: Graphical display of the MCH values

4.6.7 Vpliv na MCHC

Pri statistični analizi vpliva serološke pozitivnosti na MCHC smo ugotovili statistično značilne razlike MCHC med zdravimi živalmi in živalmi, ki so bile serološko pozitivne na vse tri povzročitelje. Opisna statistika je zbrana v Tabeli 27.

Tabela 27: Opisna statistika MCHC pri serološko pozitivnih in negativnih živalih

Table 27: Descriptive MCHC statistics for serologically positive and negative animals

	<i>Cou nt</i>	<i>Average</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Minim um</i>	<i>Maxim um</i>	<i>Ran ge</i>	<i>Std. skewness</i>	<i>Std. kurtosis</i>
MCHCHealthy	60	33,16	0,733508	2,21203%	31,7	35,2	3,5	1,31462	0,681439
MCHCAn	50	32,894	1,07578	3,27046%	30,5	35,7	5,2	-0,540142	0,4678
MCHCBo	60	33,1183	0,892434	2,69468%	30,5	34,8	4,3	-2,33931	1,07635
MCHCBa	4	33,0	0,83666	2,53533%	31,8	33,7	1,9	-1,22685	0,985628
MCHCAnBa	28	32,8036	0,849611	2,59%	31,0	34,8	3,8	1,02284	0,644369
MCHCAnBo	44	33,3273	1,35155	4,05538%	31,5	39,5	8,0	7,12148	13,1686
MCHCAnBaBo	25	32,632	0,838511	2,5696%	31,0	34,3	3,3	-0,272653	-0,165665
Total	271	33,041	0,989042	2,99338%	30,5	39,5	9,0	6,9439	22,5199

S pomočjo Hi kvadrat testa za linearni trend smo ugotovili, da se z večanjem vrednosti hemoglobina povečuje delež serološko pozitivnih živali na vse tri povzročitelje glede na serološko negativne. Povezava je linearna.

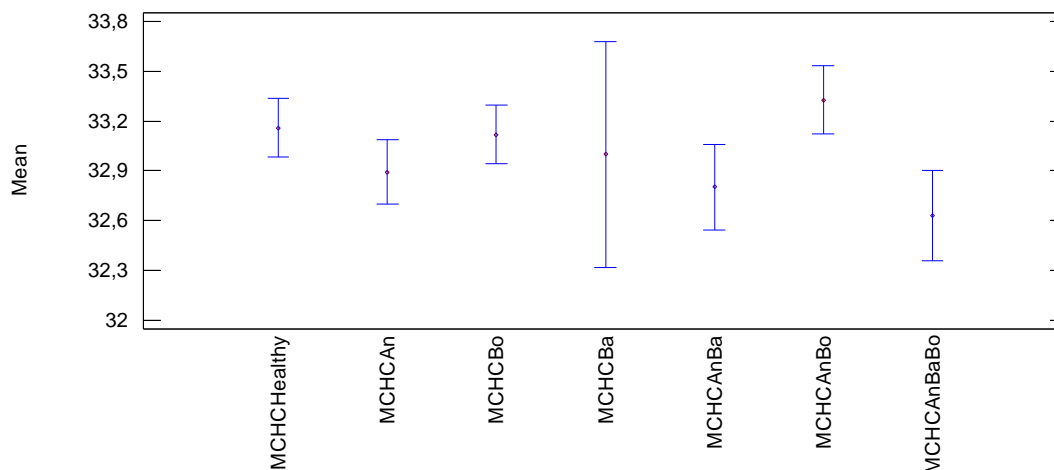
Razlike količine hemoglobina prikazuje Tabela 28.

Tabela 28: Statistično značilne razlike števila MCHC

Table 28: Statistically significant differences in the number of MCHCs

<i>Contrast</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
MCHCHealthy - MCHCAnBaBo	0,528	0,45835
MCHCAn - MCHCAnBo	-0,433273	0,398002
MCHCBo - MCHCAnBaBo	0,486333	0,45835
MCHCAnBa - MCHCAnBo	-0,523701	0,465472
MCHCAnBo - MCHCAnBaBo	0,695273	0,482238

Vrednost hemoglobina za posamezno skupino je prikazano na Sliki 27.



Slika 27: Grafični prikaz vrednosti MCHC

Figure 27: Graphical representation of MCHC values

4.6.8 Vpliv na trombocite

Pri statistični analizi vpliva serološke pozitivnosti na število trombocitov smo ugotovili statistično značilne razlike števila trombocitov med zdravimi živalmi in živalmi, ki so bile serološko pozitivne na *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi*, in živalmi, ki so bile pozitivne na vse tri povzročitelje. Opisna statistika je zbrana v Tabeli 29.

Tabela 29: Opisna statistika števila trombocitov pri serološko pozitivnih in negativnih živalih

Table 29: Descriptive statistics on the number of platelets in seropositive and seronegative animals

	<i>Cou nt</i>	<i>Average</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Coeff. of variation</i>	<i>Minim um</i>	<i>Maxim um</i>	<i>Range</i>	<i>Std. skewness</i>	<i>Std. kurtosis</i>
PLTHealthy	60	549,083	230,623	42,0014%	99,0	1151,0	1052,0	-0,458259	-0,15967
PLTAn	50	569,64	323,574	56,8033%	92,0	1703,0	1611,0	3,41767	3,6623
PLTBo	60	485,883	192,481	39,6146%	93,0	1115,0	1022,0	0,877926	1,56513
PLTBa	4	449,0	225,281	50,1738%	132,0	664,0	532,0	-1,02834	0,962664
PLTAna	28	467,75	215,806	46,137%	101,0	861,0	760,0	0,288943	-0,733883
PLTAnBo	44	441,045	229,283	51,9863%	113,0	956,0	843,0	1,28474	-0,681288
PLTAnBaBo	25	389,36	301,354	77,3973%	99,0	1577,0	1478,0	5,47998	9,96998
Total	271	496,727	252,385	50,8097%	92,0	1703,0	1611,0	6,37773	9,05317

S pomočjo Hi kvadrat testa za linearni trend smo ugotovili, da se z večanjem vrednosti hemoglobina povečuje delež serološko pozitivnih živali na *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi* glede na serološko negativne. Povezava ni linearna. Prav tako se z večanjem vrednosti eritrocitov povečuje delež serološko pozitivnih živali na vse tri povzročitelje glede na serološko negativne. Povezava je linearna.

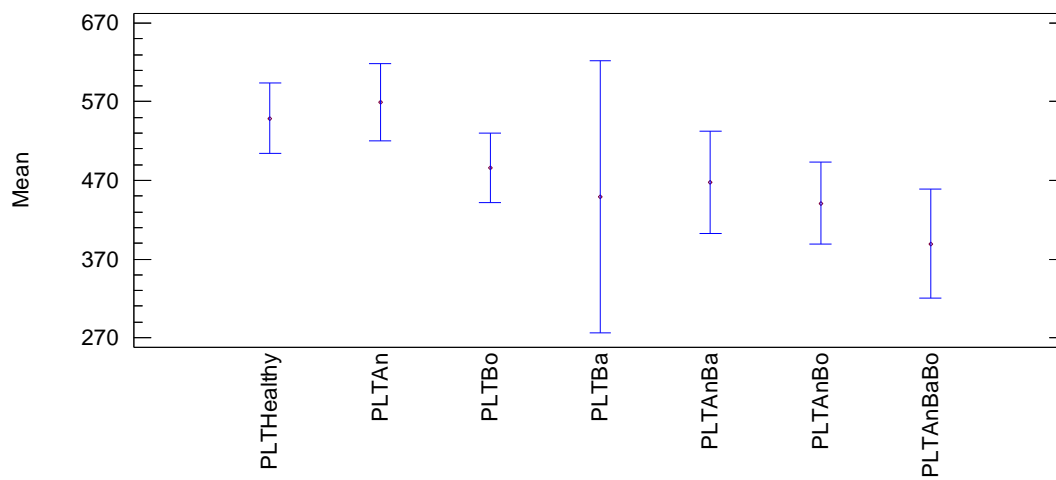
Razlike števila trombocitov prikazuje Tabela 30.

Tabela 30: Statistično značilne razlike števila trombocitov

Table 30: Statistically significant differences in the number of platelets

<i>Contrast</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
PLTHealthy - PLTAnBo	108,038	97,119
PLTHealthy - PLTAnBaBo	159,723	116,481
PLTAn - PLTAnBo	128,595	101,144
PLTAn - PLTAnBaBo	180,28	119,858

Vrednost hemoglobina za posamezno skupino je prikazano na Sliki 28.



Slika 28: Grafični prikaz števila trombocitov

Table 28: A graphical representation of platelet count

5 RAZPRAVA

V tej raziskovalni nalogi smo dokazali prisotnost *A. phagocytophilum* pri pašnem govedu v Sloveniji. Na *A. phagocytophilum* je bilo serološko pozitivnih 158 živali, kar predstavlja 54,64 % vzorčenih živali. Samo na *A. phagocytophilum* je bilo pozitivnih 53 živali, kar predstavlja 18,2 % vzorčenih živali.

Odstotek serološko pozitivnega goveda je v primerjavi s serološko pozitivnostjo psov, ki jo je preiskovala Ravnik (2012) (73,8 %) v svoji doktorski disertaciji, nižji. Prav tako je odstotek serološko pozitivne divjadi, ki so ga v svoji raziskavi ugotovili Petrovec s sodelavci (2002) (74 %) ter Žele s sodelavci 2012 (72 %), višji.

Razlika med deležem serološko pozitivnih psov in serološko pozitivnih goved je lahko posledica manjšega števila vzorčenih goved. Možnost razlike v deležu lahko izvira tudi iz tega, da so v disertaciji bili zajeti pacienti Klinike za male živali VF, ki so bili testirani na *A. phagocytophilum*. Ti pacienti so verjetno na Kliniko za male živali VF prišli zaradi nekega razloga, ki je lahko tudi bolezen, mi pa smo vzorčili naključno govedo.

Razlika med deležem serološko pozitivnih goved in divjadi najverjetneje izhaja iz tega, da divjad živi v gozdovih in na obrobju gozdov, kjer je več podrastja, na katerem najdemo klope. Prav tako je divjad ves čas svojega življenja v naravi, kar pomeni daljšo izpostavljenost klopom. Večina goveda se pase od pozne pomladi do jeseni. Nekatere kmetije govedo čez noč vhljevijo, kar zmanjša čas možnega kontakta s klopi.

Serološka pozitivnost goveda nam nakazuje, da so na področjih, kjer se pase govedo, prisotni okuženi klopi, ki predstavljajo nevarnost okužbe tudi za ljudi. Prisotnost protiteles proti *A. phagocytophilum* nam dokazuje, da je govedo v nekem obdobju bilo v kontaktu s klopom, ki je bil okužen s *A. phagocytophilum*, vendar točnega časovnega obdobja ne moremo določiti (Kybicova, 2010). Trdimo lahko, da je večja nevarnost ponovne okužbe goveda oz. okužbe ljudi s *A. phagocytophilum* na Robnikovi planini, saj je tekom paše 17 živali razvilo protitelesa proti *A. phagocytophilum*, 10 živali pa je bilo pozitivnih že pred začetkom paše.

Večina kmetov ne izvaja vsakodnevnih kontrole na invadiranost živali s klopi, prav tako je zelo težko na odlakani koži videti klope ob začetku parazitiranja. Klopi postanejo opazni šele, ko se napijejo krvi. Ta čas zadošča, da se iz klopov, okuženih z *A. phagocytophilum*, le-ta prenese na govedo. Iz tega lahko sklenemo, da se obolenja za HGA pri ljudeh pojavljajo redkeje, saj smo ljudje veliko bolj pozorni na morebitni ugriz klopa in ga po navadi

odstranimo hitro, kar zmanjša možnost vstopa *A. phagocytophilum* v človeka (Fritz in Kjemtrup, 2003).

Prav tako smo dokazali prisotnost *B. divergens* pri pašnem govedu v Sloveniji. Serološko je bilo pozitivnih 63 živali, od katerih sta dve kravi kazali klinično sliko. Ker je za razvoj klinične slike potrebnih vsaj 10^3 parazitov, do pojava obolenja ne pride tako pogosto (Zintl in sod., 2003). Živali so kazale klinična znamenja babezioze, kot jih navaja tudi literatura (Demessie in Derso, 2015; Zintl in sod., 2003).

Na pojav obolenja z *B. divergens* vplivata tudi sam imunski status in splošno stanje živali. Pri vseh 6 živali, ki so kazale klinično obliko obolenja, smo ugotovili istočasno serološko pozitivnost na *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi*. Ta fenomen opisujejo tudi avtorji (Ravnik, 2012; Stuen, 2013). Sicer nam serološka pozitivnost ne pomaga pri določitvi časovnega okvira, v katerem je bila žival v kontaktu s povzročiteljem, vendar bi lahko hkratna okužba z drugimi povzročitelji, kot sta *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi*, dodatno obremenila imunski sistem in pripomogla nastanku klinične slike. Na drugi strani pa nam dvakratno vzorčenje 28 živali kaže, da kljub temu, da je kar 8 živali v pašni sezoni pridobilo protitelesa proti vsem trem povzročiteljem, ni nobena od živali kazala klinične slike (Demessie in Derso, 2015).

V raziskavi smo tudi potrdili uporabnost postavitve diagnoze s pomočjo krvnega razmaza. S svetlobnim mikroskopom smo na pripravljenih razmazih klinično pozitivnih živali lahko videli številne babezije v eritrocitih. Pri nekaterih vzorcih smo videli več babezij v vsakem vidnem polju, pri drugih manj. V primeru nejasnosti pojava "krvavega" urina je pregled krvnega razmaza ena izmed zelo uporabnih metod izključevanja oz. potrditve diferencialnih diagnoz.

S to raziskavo smo potrdili tudi prisotnost *B. burgdorferi* pri govedu v Sloveniji. Prisotnost *B. burgdorferi* pri govedu v Sloveniji je že potrdil Borko v svoji doktorski disertaciji leta 1999. V svoji raziskavi je po zaključku pašne sezone s pomočjo IIF leta 1996 ugotovil 59,6-odstotno serološko pozitivnost goveda in leta 1997 49,4-odstotno pozitivnost goveda. V naši raziskavi je bilo 47,08 % serološko pozitivnih goved, kar je zelo blizu odstotku iz leta 1997 (Borko, 1999). Naši rezultati pri dvakratnem vzorčenju 28 živali kažejo velik porast seropozitivnosti. Pred pašo je bilo v naši raziskavi serološko pozitivno na *B. burgdorferi* 1/28 goved (3,57 %), po paši pa 12/28 goved (42,86 %). Pri Borku (1999) so bili rezultati naslednji: spomladi 1996 je ugotovil 36,6-odstotno serološko pozitivnost, jeseni 59,6 %

pozitivnih, leta 1997 pred pašo 29,4 % serološko pozitivnih, v jeseni pa 49,4-odstotno serološko pozitivnost. Serološka pozitivnost pred pašo se med našo in Borkovo (1999) raziskavo močno razlikuje, vendar je število vzorcev naše raziskave bistveno manjše. Rezultati serološke pozitivnosti v jeseni pa se razlikujejo bistveno manj. Na osnovi pobranih 291 vzorcev in na osnovi rezultatov doktorske disertacije Borka lahko rečemo, da je v Sloveniji serološka pozitivnost goveda na *B. burgdorferi* nekje okoli 50 %, iz česar lahko sklepamo, da je stopnja okuženosti klopov z *B. burgdorferi* po Sloveniji visoka. Iz podatkov NIJZ je razvidno, da obstaja visoka verjetnost okužbe tudi pri ljudeh. Podatki iz leta 2015 kažejo, da je za boreliozo obolelo 3742 ljudi, leto pred tem 3890 in leta 2013 6938 (Sočan in sod., 2016).

V raziskavi smo tudi ugotovili statistično značilen vpliv serološke pozitivnosti na vrednosti hematoloških parametrov. Serološka pozitivnost ima največji vpliv na število levkocitov. Prav tako je serološka pozitivnost vplivala na vrednosti eritrocitov, hematokrita, hemoglobina, MCHC in trombocitov. Na vrednosti so lahko vplivali tudi drugi dejavniki, kot so okužbe z drugimi povzročitelji, poškodbe, stres, nadmorska višina. V raziskavi teh možnosti nismo upoštevali. Študij, ki bi povezoval vpliv serološke pozitivnosti omenjenih povzročiteljev na hematološke vrednosti, v svetovni literaturi nismo našli.

Zelo zanimive bi lahko bile ugotovitve serološke pozitivnosti goveda glede na nadmorsko višino pašnikov, kjer se je govedo paslo. Tako bi lahko postavili okvirno nadmorsko višino, na kateri se pojavljajo določeni povzročitelji. Prav tako bi bil zanimiv podatek, koliko od 291 živali je bilo pozitivnih na antigen oz. ali so bile vse živali, ki so bile serološko negativne, tudi antigensko negativne, in koliko živali, ki so bile serološko pozitivne je bilo tudi antigensko pozitivnih, kar je cilj naših nadaljnjih raziskav.

6 SKLEPI

6.1 Delovne hipoteze

Hipoteza 1: Okužbe z *Anaplasma phagocytophilum* so prisotne pri govedu v Sloveniji.

V raziskovalni nalogi smo potrdili hipotezo, da so okužbe z *Anaplasma phagocytophilum* pri pašnem govedu v Sloveniji prisotne, saj je bilo 158 živali serološko pozitivnih, ena žival pa je bila sumljiva.

Hipoteza 2: Okužbe z *Babesia divergens* so prisotne pri govedu v Sloveniji.

Prav tako smo v raziskovalni nalogi potrdili hipotezo, da so okužbe z *Babesia divergens* pri pašnem govedu v Sloveniji prisotne, saj je bilo 63 živali serološko pozitivnih.

Hipoteza 3: Okužbe z *Borrelia burgdorferi s.l.* so prisotne pri govedu v Sloveniji.

S to raziskavo smo potrdili tudi hipotezo, da so okužbe z *Borrelia burgdorferi s.l.* pri pašnem govedu v Sloveniji prisotne, saj je bilo 137 živali serološko pozitivnih.

Hipoteza 4: Pojavnost povzročiteljev je enakomerna po celotni Sloveniji.

V raziskovalni nalogi smo ugotovili, da je serološko pozitivno govedo na *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi* najdeno po celotni Sloveniji, za razliko od *Babesia divergens*, ki se pojavlja na področju severne in severozahodne Slovenije.

Hipoteza 5: Serološka pozitivnost goveda na *Anaplasma phagocytophilum* ali *Babesia divergens* ali *Borrelia burgdorferi s.l.* vpliva na hematološke vrednosti živali.

V raziskavi smo ugotovili, da serološka pozitivnost goveda na preiskovane povzročitelje statistično značilno vpliva na levkocite, eritrocite, hematokrit, hemoglobin, MCHC in trombocite.

6.2 Drugi sklepi

- V Sloveniji se pojavljajo klinična obolenja, ki jih povzroča *Babesia divergens*.
- Krvni razmaz služi kot dobra diagnostična metoda za potrditev invazije z *Babesia divergens* pri klinično obolelih živalih.
- Na Robnikovi planini je visoka stopnja okuženosti klopov z *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia divergens* in *Borrelia burgdorferi*.
- V Sloveniji so klopi okuženi z *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia divergens* in *Borrelia burgdorferi* in predstavljajo potencialno nevarnost za ljudi in živali.

7 POVZETEK

Anaplazmoza (povzročitelj: *Anaplasma phagocytophilum*), babezioza (povzročitelj: *Babesia divergens*) in borelioza (povzročitelj: *Borrelia burgdorferi* s.l.) so s klopi prenosljive vektorske bolezni goveda. Vse tri okužbe se pojavljajo v širokem spektru gostiteljev, tudi pri ljudeh. Okužbe z *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi* s.l. potekajo pri govedu asimptomatsko ali nespecifično, zato jih težko diagnosticiramo brez posebnih laboratorijskih testov. Pri živalih, okuženih z *A. phagocytophilum*, zasledimo več različnih kliničnih znakov. Pri vseh sesalcih, ki razvijejo klinično obliko bolezni, zaznamo nenadno povišanje telesne temperature (> 41 °C). Drugi klinični znaki domačih prežvekovalcev, ki so okuženi z *A. phagocytophilum*, so: anoreksija, otopelost, nenadno znižanje prireje mleka, abortusi pri ovcah, zmanjšana plodnost ovnov in zmanjšan prirast. Pri živalih, okuženih z *B. burgdorferi* s.l., se po navadi pojavita šepanje in oteklost sklepov, lahko pa tudi hujšanje, eritem, otekle noge in strma stoja. *B. divergens* pogosto povzroča klinično bolezen in jo zato lažje prepoznamo. Klinični znaki pri okužbi z *Babesia* spp. so naslednji: povišana telesna temperatura (tudi do 41 °C), izguba apetita, neaktivnost vampa, oteženo in pospešeno dihanje, depresija, slabo počutje, hujšanje, progresivna hemolitična anemija, ikterus, hemoglobinurija, pospešen srčni utrip, težave z očmi in zmanjšanje mlečnosti. Sluznice so lahko blede in rumenkaste. Urin je rdeče do kavne barve.

V raziskavi smo ugotavljali prisotnost protiteles proti *A. phagocytophilum*, *B. divergens* in *B. burgdorferi* pri pašnem govedu. Naša glavna cilja sta bila potrditev okužb pašnega goveda z različnih koncev Slovenije z omenjenimi povzročitelji s pomočjo serološke diagnostike in preučevanje povezave med rezultati seroloških preiskav ter hematološkimi vrednostmi pri živalih v raziskavi.

Skupno smo pregledali kri in serum 291 govedi. Zbrali smo tudi 6 vzorcev goveda s klinično sliko, ki se pojavlja pri okužbah z *B. divergens*. Zbrane vzorce smo analizirali na hematološke parametre in testirali na prisotnost specifičnih IgG z indirektno imunofluorescenco. Rezultate smo obdelali z opisno statistiko, z ANOVA testom in s Hi-kvadrat testom. Statistično značilnost smo pripisali rezultatom, pri katerih je bil $p < 0,05$.

158/291 (54,64 %) živali je bilo serološko pozitivnih na *A. phagocytophilum*, 63/291 (21,65 %) živali je bilo serološko pozitivnih na *B. divergens*, 137/291 (47,08 %) živali pa je bilo serološko pozitivnih na *B. burgdorferi*. 58/291 (19,93 %) živali je bilo hkrati serološko

pozitivnih na *A. phagocytophilum* in *B. divergens*, 72/291 (24,74 %) živali je bilo hkrati serološko pozitivnih na *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi* ter 25/291 (8,59 %) je bilo serološko pozitivnih na vse tri povzročitelje hkrati. Pri statistični analizi vpliva serološke pozitivnosti na hematološke parametre smo ugotovili značilne vplive na: **levkocite:** z večanjem vrednosti levkocitov se povečuje delež serološko pozitivnih živali) med zdravimi živalmi in živalmi, ki so bile serološko pozitivne na *A. phagocytophilum*, vključno s tistimi, ki so bile hkrati seropozitivne tudi na druga dva povzročitelja; **eritrocite:** z večanjem vrednosti eritrocitov se povečuje delež serološko pozitivnih živali med zdravimi živalmi in živalmi, ki so bile serološko pozitivne na *A. phagocytophilum*, ter tistimi, ki so bile hkrati serološko pozitivne na *A. phagocytophilum* in *B. divergens*; **hemoglobin:** z večanjem vrednosti hemoglobina se povečuje delež serološko pozitivnih živali med zdravimi živalmi in živalmi, ki so bile serološko pozitivne na *A. phagocytophilum* in *B. divergens*; **hematokrit:** z večanjem vrednosti hemoglobina se povečuje delež serološko pozitivnih živali med zdravimi živalmi in živalmi, ki so bile serološko pozitivne na *A. phagocytophilum* in *B. divergens*; **MCHC:** z večanjem vrednosti hemoglobina se povečuje delež serološko pozitivnih živali med zdravimi živalmi in živalmi, ki so bile serološko pozitivne na vse tri povzročitelje; **trombocite:** z večanjem vrednosti trombocitov se povečuje delež serološko pozitivnih živali med zdravimi živalmi in živalmi, ki so bile serološko pozitivne na *A. phagocytophilum* in *B. burgdorferi*, ter živalmi, ki so bile pozitivne na vse tri povzročitelje.

8 ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Jožetu Stariču in somentorju dr. Igorju Gruntarju za vse strokovne nasvete, pomoč, prijaznost in potrpežljivost.

Doc. dr. Marku Cincoviću iz Univerze v Novem Sadu za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Mag. Giti Grecs Smole za ponovni pregled literature in popravke.

Zahvaljujem se zaposlenim v Laboratoriju za klinično patologijo (KRVŽ) Veterinarske fakultete v Ljubljani za pomoč pri izvedbi hematoloških preiskav krvnih vzorcev, še posebno Bernardi Oblak za pripravo evidenc pobranih vzorcev in organizacijo.

Zahvaljujem se Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani za izvedena serološka testiranja, še posebno Alenki Magdaleni Usenik, za prijaznost in pomoč.

Zahvaljujem se vsem veterinarskim postajam, ki so sodelovale pri organizaciji zbiranja vzorcev in tako pripomogle k uspešni izvedbi raziskave. To so:

- *Šekli & Kukovica veterinarska ambulanta, d. o. o.*
- *Veterina Kamnik, d. o. o.,*
- *Veterina Mozirje, d. o. o.,*
- *Veterina Novo Mesto, d.o.o.,*
- *Veterinarska ambulanta Žužemberk,*
- *Veterinarska ambulanta Idrija, d. o. o.,*
- *Veterinarska ambulanta Tolmin, d. o. o.,*
- *Veterinarska ambulanta Vinko Pristov, s. p.,*
- *Veterinarska postaja Konjice, d. o. o.,*
- *Veterinarska postaja Postojna,*
- *Veterinarska praksa Tenetiše, d. o. o.,*
- *ZVC Lipej – Šerbec, d. o. o.*

Zahvaljujem se tudi vsem kmetom, ki so dovoli odvzem krvi njihovim živalim in tako omogočili izvedbo raziskave.

Zahvaljujem se družini in prijateljem za razumevanje, potrpežljivost, dobro voljo in nesebično podporo.

9 LITERATURA

Atif FA. *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. *Parasitol Res* 2015; 114(11): 3941–57.

Bakken JS, Dumler JS. Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1078: 236–47.

Bock R, Jackson L, De Vos A, Jorgensen W. Babesiosis of cattle. *Parasitology* 2004; 129: S247–69.

Borko Č. Humoralni imunski odziv goveda po naravnem in poskusnem stiku z bakterijo *Borrelia burgdorferi* s.l. Ljubljana: *Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta*, 1999. Doktorska disertacija

Criado-Fornelio A, Martinez-Marcos A, Buling-Sarana A, Barba-Carretero JC. Molecular studies on Babesia, Theileria and Hepatozoon in southern Europe Part II Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Vet Parasitol* 2003; 114: 173–94.

Demessie Y, Derso S. Tick borne hemoparasitic diseases of ruminants: a review. *Adv Biol Res* 2015; 9(4): 210–24.

Fritz LC, Kjemtrup AM. Zoonosis update: Lyme borreliosis. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 223: 1261–70.

Garnham PCC, Bray RS. The susceptibility of the higher primates to piroplasms. *J Protozool* 1959; 6: 352–5.

Gocke HI, Woldehiwet Z. Lymphocyte responses to mitogens and rickettsial antigens in sheep experimentally infected with *Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila*. *Vet Parasitol* 1999; 83: 55–64.

Gray JS, Khal O, Lane RS, Stanek G. Lyme borreliosis biology, epidemiology, and control: history and characteristic of Lyme borreliosis.

Wallingford: CABI International, 2002: 1–28

Gray JS, Zintl A, Hildebrandt A, Hunfeld KP, Weiss L. Zoonotic babesiosis: overview of the disease and novel aspects of pathogen identity. *Ticks Tick Borne Dis* 2010; 1(1): 3–10.

Henniger T, Henniger P, Grossmann T, Distl O, Ganter M, Von Loewenich FD. Congenital infection with *Anaplasma phagocytophilum* in a calf in northern Germany.

Acta Vet Scand 2013; 55: e38 (4 str.)

<https://actavetscand.biomedcentral.com/articles/10.1186/1751-0147-55-38> (22. 6. 2017)

Homer MJ, Aguilar Delfin I, Telford SR, Krause PJ, Persing DH. Babesiosis.

Clin Microbiol Re 2000; 13: 451–69.

Jahfari S, Coipan EC, Fonville M at al. Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. *Parasit Vectors* 2014; 7: e365 (11str.)

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-7-365> (13. 7. 2017)

Kybicová K. *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in the Czech Republic. Prague: Charles University, Faculty of Science, 2010. Doktorska disertacija

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 2006; 118(21/22): 708–13.

Margos G, Vollmer SA, Ogden SH, Fish D. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infect Genet Evol* 2011; 11(7): 1545–63.

Moro MH, David CS, Magera JM, Wettstein PJ, Barthold SW, Persing DH. Differential effects of infection with a Babesia-like piroplasm, WA1 in inbred mice.

Infect Immun 1998; 66: 492–8.

OIE. Bovine anaplasmosis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris: Office International des Epizooties, 2015: Chapter 2.4.1. (15 str.)

http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.04.01_BOVINE_ANAPLASMOYSIS.pdf (23. 6. 2017)

Petrovec M, Bidovec A, Sumer JW, Avsic Zupanc T. Infection with *Anaplasma phagocytophila* in cervids from Slovenia: evidence of two genotypic lineages. Wien Klin Wochenschr 2002; 114(13/14): 641–7.

Petzke M, Schwartz I. *Borrelia burgdorferi* pathogenesis and the immune response. Clin Lab Med 2015; 35: 745–64.

Ravnik U. Patogeneza in imunski odziv pri naravni okužbi psov z bakterijo *Anaplasma phagocytophilum*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Veterinarska fakulteta, 2012. Doktorska disertacija

Rojko T, Ursic T, Avsic Zupanc T, Petrovec M, Strle F, Lotric Furan S. Seroprevalence of human anaplasmosis in Slovene forestry workers. Ann NY Acad Sci 2006; 1078: 92–4.

Skrabalo Z, Deanovic Z. Piroplasmosis in man: report of a case.

Doc Med Geogr Trop 1957; 9: 11–6.

Sočan M, Blaško Markič M, Grgič Vitek M. Bolezni, ki jih prenašajo členonožci in hemoragične mrzlice. Lymenska boreliozna. In: Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2015. Ljubljana: Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2016: e79–81, pogl. 2.4.

http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/datoteke/epidemiolosko_spremljanje_nb_v_letu_2015.pdf (23. 6. 2017)

Stuen S, Granquist EG, Silaghi C. *Anaplasma phagocytophilum*: a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. Front Cell Infect Microbiol 2013; 3: e31 (39 str.)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3717505/> (23. 6. 2017)

Stuen S. *Anaplasma phagocytophilum* - the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Vet Res Commun* 2007; 31 (Suppl 1): 79–84.

UlienberG. Babesia a historical overview. *Vet Parasitol* 2006; 138: 3–10.

Vial HJ, Gorenfolt A. Chemotherapy against babesiosis. *Vet Parasitol* 2006; 138: 147–60.

Woldehiwet Z, Scott GR. Immunological studies on tick-borne fever in sheep. *J Comp Pathol* 1982; 92: 457–67.

Woldehiwet Z. *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants in Europe. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1078: 446–60.

Woldehiwet Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Parasitol* 2010; 167: 108–22.

Zintl A, Mulcahy G, Skerrett HE, Taylor SM, Gray JS. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. *Clin Microbiol Revi* 2003; 16: 622–36.

Žele D, Avberšek J, Gruntar I, Ocepek M, Vengušt G. Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in game animals from Slovenia. *Acta Vet Hung* 2012; 60(4): 441–8.

10 PRILOGE

Tabela 31: Rezultati vseh preiskav opravljenih pri govedu uporabljenih v Prešernovi nalogi (zeleno obarvane vrstice so klinično bolne živali)

Table 31: Results of all investigations carried out in cattle used in Prešeren's task (green colored rows are clinically related animals)

Zaporedna številka	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	<i>Borrelia burgdorferi</i> (1 : 128)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (1 : 64)	<i>Babesia divergens</i> (1 : 64)
1	4,7	5,87	9,2	27,6	47	15,6	33,2	510	neg.	sum(+/-)	poz(+++)
2	5,5	6,79	11	31,4	46	15,7	34	421	neg.	poz(+++)	poz(++)
3	9,4	8,12	12	34,4	42	14,7	34,6	469	neg.	poz(+++)	poz(+)
4	5,5	6,48	9,6	28,4	41	14	33,9	453	neg.	poz(+++)	neg.
5	KOAG.								neg.	poz(+++)	neg.
6	9,7	6,16	9,8	28,7	47	16	34,3	548	neg.	poz(+)	neg.
7	7,9	8,05	12	36	45	14,7	33	616	neg.	poz(+++)	poz(++)
8	7,6	5,32	8,6	25	47	16,1	34,3	800	neg.	poz(+++)	neg.
9	6	5,76	9,8	29,7	52	17	33	384	neg.	poz(++)	poz(++)
10	7,4	5,27	8,9	26,1	49	16,9	34,2	971	neg.	poz(++)	neg.
11	5,6	6,14	10	30,6	50	16,3	32,8	335	neg.	poz(++)	neg.
12	KOAG.								neg.	poz(+++)	neg.
13	10,4	7,35	12	35,7	49	16,3	33,5	828	neg.	poz(+++)	poz(++)
14	9,8	7,41	11	35,3	48	15,4	32,3	371	neg.	poz(+++)	poz(+)
15	11,7	8,21	14	41,5	51	16,4	32,5	273	neg.	poz(++)	poz(+)

Zaporedna številka	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	<i>Borrelia burgdorferi</i> (1 : 128)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (1 : 64)	<i>Babesia divergens</i> (1 : 64)
16	10,4	9,89	11	33,1	34	11,3	33,6	911	neg.	neg.	neg.
17	12,7	12,4	14	44,8	36	11,3	31,3	600	neg.	poz.(++)	neg.
18	8,9	8,22	9,9	30,8	37	12,1	32,3	792	neg.	poz.(++)	neg.
19	7,6	7,57	11	36,3	48	15	31,4	176	neg.	poz.(+++)	neg.
20	18,1	8,41	10	33,6	40	12,2	30,5	433	neg.	poz.(+++)	neg.
21	11,3	9,55	11	35,3	37	11,8	32	644	neg.	poz.(+++)	neg.
22	8,9	8,94	12	35,8	40	12,8	32,1	668	neg.	poz.(+++)	neg.
23	15,7	8,55	11	34,4	40	12,8	31,9	1703	neg.	poz.(++)	neg.
24	8,8	6,46	10	31,5	49	15,8	32,5	861	neg.	poz.(+)	poz.(+)
25	10,4	7,3	10	31,6	43	14	32,4	751	neg.	poz.(+++)	poz.(+)
26	7,5	6,14	9	27,9	45	14,7	32,4	512	poz.(+)	poz.(++)	neg.
27	12,2	7,63	11	34,6	45	14,5	31,9	142	neg.	poz.(++)	poz.(+)
28	7,8	7,16	8,9	27,4	38	12,4	32,4	732	neg.	poz.(++)	poz.(++)
29	10,6	6,42	7,8	23,8	37	12,1	32,7	543	neg.	poz.(++)	neg.
30	8	6,2	8,8	26,4	43	14,1	33,2	517	neg.	poz.(+)	neg.
31	6,3	7,02	12	38,5	55	17,7	32,3	124	Poz.(++)	poz.(+++)	poz.(+++)
32	5,2	5,92	12	36,3	61	20	32,6	175	poz.(+)	poz.(++)	poz.(++)
33	4,3	4,94	8,6	26,1	53	17,3	32,9	593	poz.(+)	poz.(++)	poz.(+)
34	KOAG.								poz.(++)	poz.(+)	neg.

Zaporedna številka	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	<i>Borrelia burgdorferi</i> (1 : 128)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (1 : 64)	<i>Babesia divergens</i> (1 : 64)
35	5,3	5,81	9,6	29,3	50	16,5	32,7	556	poz.(+)	poz.(+++)	poz.(+)
36	4,9	5,1	11	31,6	62	20,5	33,1	295	poz.(+)	poz.(++)	neg.
37	8,6	5,27	9,7	29,5	56	18,3	32,8	371	poz.(++)	poz.(++)	poz.(++)
38	7,1	5,14	8,7	25,3	49	17	34,5	1867	poz.(+)	poz.(++)	neg.
39	5,9	8,62	12	37,3	43	13,5	31,2	245	poz.(++)	neg.	neg.
40	4,3	7,39	8,9	27,2	37	12,1	32,8	486	neg.	neg.	neg.
41	3,1	8,27	11	31,6	38	12,8	33,4	547	neg.	neg.	neg.
42	7	5,79	9,4	28,2	49	16,2	33,2	175	poz.(++)	poz.(+++)	poz.(+++)
43	8,5	6,69	12	36,7	55	17,8	32,4	332	poz.(++)	poz.(++)	neg.
32	5,1	6,3	11	33,2	53	17,5	33,2	239	poz.(++)	poz.(+++)	neg.
45	5,5	3,92	7,5	18,9	48	19	39,5	113	poz.(+)	poz.(+++)	neg.
46	7,9	5,84	8,5	24,4	42	14,6	34,8	195	poz.(++)	poz.(+++)	neg.
47	10,2	6,91	11	33	48	15,2	31,9	601	poz.(+)	neg.	neg.
48	9	5,98	9,1	27,7	46	15,2	32,7	894	neg.	neg.	neg.
49	7,8	6,19	9,6	30,3	49	15,5	31,8	664	neg.	neg.	poz.(+++)
50	5,1	6,23	9,8	29,7	48	15,7	32,9	468	neg.	neg.	neg.
51	4,5	7,44	11	33,4	45	15	33,4	447	poz.(+)	neg.	neg.
52	6,9	6,85	9,5	28,6	42	13,9	33,3	528	neg.	neg.	neg.
53	15,4	6,05	9,9	28,2	47	16,4	35,2	636	neg.	neg.	neg.

Zaporedna številka	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	<i>Borrelia burgdorferi</i> (1 : 128)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (1 : 64)	<i>Babesia divergens</i> (1 : 64)
54	KOAG.								neg.	neg.	neg.
55	16,4	7,25	12	33,6	46	16	34,6	378	poz.(++)	neg.	neg.
56	6,4	7,22	12	35	49	16,4	33,7	515	poz.(+)	neg.	neg.
57	11,1	7,23	10	30,2	42	13,8	33,1	513	neg.	neg.	poz.(++)
58	7,8	6,18	9	26,9	43	14,5	33,4	132	neg.	neg.	poz.(++)
59	7	6,28	9,1	27	43	14,5	33,7	487	neg.	neg.	poz.(++)
60	7,4	6,89	10	31,1	45	15	33,1	625	poz.(+)	neg.	neg.
61	11	6,13	9,4	28,5	46	15,3	32,9	640	neg.	neg.	neg.
62	7,6	6,92	11	32,7	47	15,7	33,3	297	poz.(+)	neg.	neg.
63	6,8	6,42	9	26,2	41	14	34,3	644	poz.(+++)	poz.(+)	neg.
64	4,7	7,017	9,2	28,1	39	12,8	32,6	570	neg.	neg.	neg.
65	6,9	6,61	10	30,9	47	15,5	33,1	678	neg.	neg.	neg.
66	KOAG.								neg.	neg.	neg.
67	4,2	7,54	12	36,9	49	15,6	31,8	138	neg.	neg.	neg.
68	5,2	7,47	10	30,3	41	13,5	33,3	552	poz.(++)	neg.	neg.
69	KOAG.								poz.(+)	neg.	neg.
70	7,3	6,45	8,9	26,4	41	13,9	33,9	595	poz.(++)	neg.	neg.
71	5,7	6,84	8,9	26,1	38	13	33,9	879	neg.	neg.	neg.
72	7,9	6,04	83	24,8	41	13,7	33,4	699	neg.	neg.	neg.

Zaporedna številka	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	<i>Borrelia burgdorferi</i> (1 : 128)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (1 : 64)	<i>Babesia divergens</i> (1 : 64)
73	5,9	6,28	8,9	26,4	42	14,1	33,6	373	poz.(+)	neg.	neg.
74	7,8	7,12	9,1	28,2	40	12,8	32,5	459	poz.(++)	neg.	neg.
75	4,7	6,22	8,4	24,3	39	13,6	34,7	604	poz.(+)	neg.	neg.
76	6,8	6,94	9,7	28,9	42	13,9	33,5	492	neg.	neg.	neg.
77	7	6,58	8,7	25,4	39	13,3	34,4	714	neg.	neg.	neg.
78	8,3	7,75	13	38,8	50	16,1	32,3	99	neg.	neg.	neg.
79	6,8	8,12	12	37,8	47	14,9	32,1	737	neg.	neg.	neg.
80	4	7,07	11	33,9	48	15,6	32,5	116	neg.	neg.	neg.
81	7,9	6,32	8,6	25,6	41	13,6	33,5	483	neg.	neg.	neg.
82	KOAG.								neg.	neg.	neg.
83	8,7	6,53	8,6	26	40	13,2	33,1	448	poz.(++)	neg.	neg.
84	7,2	7,53	11	34,1	45	14,7	32,4	135	neg.	neg.	neg.
85	7,2	6,56	9,8	28,9	44	15	34,1	1115	poz.(++)	neg.	neg.
86	14	5,83	8,6	24,7	42	14,8	34,8	320	poz.(++)	neg.	neg.
87	5,1	6,84	8,9	26,3	38	13	33,7	733	neg.	poz.(+)	neg.
88	14	6,79	8,8	26,7	39	13	33,1	181	poz.(++)	poz.(+)	neg.
89	KOAG.								poz.(+)	neg.	neg.
90	9,1	7,86	11	32,7	43	13,8	32,4	421	poz.(+)	neg.	neg.
91	6,2	7,5	10	30,8	41	13,5	32,9	947	poz.(+++)	poz.(++)	neg.

Zaporedna številka	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	<i>Borrelia burgdorferi</i> (1 : 128)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (1 : 64)	<i>Babesia divergens</i> (1 : 64)
92	4,5	7,03	8,7	25,3	36	12,4	34,6	250	neg.	neg.	neg.
93	KOAG.								poz.(+)	neg.	neg.
94	7,4	7,91	14	43,2	55	18	32,9	122	neg.	poz.(+)	poz.(+)
95	6	5,79	10	29,8	52	17,4	33,8	357	neg.	poz.(++)	neg.
96	6,3	6,88	12	36,2	53	17,8	33,7	477	poz.(++)	poz.(++)	poz.(+++)
97	6,3	8,06	13	39,8	49	16,4	33,1	240	poz.(++)	poz.(+)	poz.(+)
98	8,9	7,06	13	38,6	55	18,3	33,5	366	neg.	poz.(++)	poz.(+)
99	9,9	7076	12	36	46	15,6	33,6	757	neg.	poz.(+)	poz.(+++)
100	KOAG.								neg.	poz.(+++)	poz.(+)
101	12	8,23	14	40,9	50	16,8	33,8	426	neg.	poz.(++)	poz.(+)
102	10,3	7,74	13	39,3	51	17	33,4	958	neg.	poz.(++)	poz.(+++)
103	8,3	8,54	12	36,7	43	14,5	33,7	516	poz.(+)	poz.(+++)	neg.
104	11,8	9,83	13	39,6	40	13	32,2	757	neg.	poz.(+)	neg.
105	8,3	8,01	11	34,3	43	14	32,7	486	neg.	poz.(++)	poz.(+)
106	7,8	7,59	11	32,9	43	14,4	33,1	105	neg.	poz.(++)	neg.
107	8,9	8,45	11	32,7	39	12,5	32,4	101	neg.	poz.(++)	poz.(+)
108	7,2	4,68	9,9	28,7	61	21,3	34,7	783	neg.	poz.(+++)	neg.
109	11,7	6,85	13	35,8	52	18,2	34,8	598	neg.	poz.(+)	poz.(+)
110	10	7,69	13	38,2	50	16,4	33	396	neg.	poz.(+++)	neg.

Zaporedna številka	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	<i>Borrelia burgdorferi</i> (1 : 128)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (1 : 64)	<i>Babesia divergens</i> (1 : 64)
111	10,8	7,65	13	38,2	50	16,4	32,9	301	neg.	poz.(+)	poz.(+)
112	8,6	5,84	11	32	55	18,4	33,6	632	neg.	poz.(++)	neg.
113	7,8	7,67	13	38,4	50	16,5	33	103	neg.	poz.(++)	neg.
114	8,4	7,01	11	31,6	45	15,5	34,4	568	poz.(+)	poz.(+++)	neg.
115	6,9	6,1	11	31,8	52	17,07	34	1467	neg.	poz.(+)	neg.
116	8	8,99	12	37,9	42	13,8	32,7	341	poz.(+)	poz.(+)	neg.
117	8,5	8,99	13	37,6	42	14	33,6	598	neg.	neg.	neg.
118	4,9	5,64	9,6	29	51	17	33,1	289	poz.(+)	neg.	neg.
119	5,3	7,35	13	40,5	55	18,1	32,9	310	neg.	neg.	neg.
120	7,2	6,64	13	39,4	59	19,1	32,3	1968	neg.	neg.	neg.
121	8,1	7,77	12	36,1	46	15,2	32,8	417	poz.(++)	poz.(+++)	poz.(+)
122	8	7,57	12	35,9	47	15,7	33,2	764	neg.	poz.(++)	neg.
123	9,6	7,03	11	32,4	46	15,4	33,4	684	poz.(+)	neg.	neg.
124	8,7	6,3	11	33,8	54	17,7	32,9	223	neg.	poz.(+)	neg.
125	7	8,12	12	37,3	46	15	32,6	92	neg.	poz.(+++)	neg.
126	KOAG.								poz.(+)	poz.(++)	neg.
127	7,6	8,56	13	40	47	15	32	238	neg.	poz.(+)	neg.
128	7,5	7,4	11	32,2	44	14,2	32,7	257	poz.(++)	poz.(++)	neg.
129	7,6	7,82	11	34,1	44	13,9	31,9	129	neg.	neg.	neg.

Zaporedna številka	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	<i>Borrelia burgdorferi</i> (1 : 128)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (1 : 64)	<i>Babesia divergens</i> (1 : 64)
130	6,9	7,77	12	37	48	15,3	32,2	524	neg.	poz.(++)	neg.
131	9,6	8,06	11	34,5	43	14	32,7	805	neg.	poz.(++)	poz.(+)
132	6,6	7,52	11	32,4	43	14,6	33,8	307	poz.(+)	poz.(+)	neg.
133	4,5	5,2	8,9	25,9	50	17,1	34,3	218	neg.	neg.	neg.
134	8,7	7,84	10	30,2	39	12,9	33,4	450	neg.	poz.(+)	neg.
135	8,7	6,73	11	33,4	50	16,7	33,7	887	neg.	poz.(+)	neg.
136	8,4	5,83	8	22,4	38	13,7	35,7	665	neg.	poz.(+)	neg.
137	7,1	6,26	9,1	26,5	42	14,5	34,1	483	neg.	neg.	neg.
138	9,7	6,18	10	30,1	49	16,3	33,3	430	poz.(+)	poz.(+)	neg.
139	6,2	6,39	9,1	27,,5	43	14,3	33,3	551	poz.(++)	neg.	neg.
140	7,4	6,65	10	30,7	46	15,4	33,3	891	poz.(++)	poz.(+)	neg.
141	10,3	6,33	10	30,9	49	16,3	33,3	274	neg.	poz.(+)	neg.
142	9,4	6,19	9,8	28,7	46	15,9	34,3	1041	neg.	poz.(+)	neg.
143	5,3	6,93	11	31,8	46	15,5	33,7	498	poz.(+)	neg.	neg.
144	9,8	6,5	10	31,5	48	16	33	660	poz.(+)	poz.(++)	neg.
145	6,4	6,64	11	32,8	49	16,5	33,5	793	neg.	neg.	neg.
146	5,7	5,91	11	34,2	58	18,9	32,6	811	neg.	neg.	neg.
147	9,7	7,18	11	32,3	45	14,9	33	505	neg.	poz.(++)	neg.
148	5,6	6,62	9,8	29,5	45	14,7	33,1	554	neg.	neg.	neg.

Zaporedna številka	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	<i>Borrelia burgdorferi</i> (1 : 128)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (1 : 64)	<i>Babesia divergens</i> (1 : 64)
149	52	6,29	11	33,1	53	17,2	32,7	396	neg.	poz.(+)	neg.
150	6,8	7,43	12	35,6	48	15,5	32,3	497	neg.	neg.	neg.
151	4,3	5,64	7,6	22,7	40	13,6	33,7	632	neg.	neg.	neg.
152	8,5	6,53	9,2	28,2	43	14	32,4	642	poz.(++)	poz.(++)	neg.
154	10,8	7,36	11	33	45	15,2	33,9	559	poz.(++)	neg.	neg.
155	5,4	7,16	9,8	29,5	41	13,6	33,1	225	poz.(++)	neg.	neg.
156	8,3	7,42	11	31,5	42	14,2	33,4	696	poz.(+)	neg.	neg.
157	8,8	7,41	9,9	29,3	39	13,4	33,9	471	poz.(+)	neg.	neg.
158	10,1	6,97	11	32,7	47	15,6	33,2	130	poz.(++)	poz.(+)	neg.
159	6,1	6,77	11	32,3	48	15,8	33,2	94	poz.(+)	neg.	neg.
160	7,5	7,02	10	30,7	44	14,4	32,9	362	neg.	neg.	neg.
161	6	6,3	10	30,2	48	16,1	33,5	126	poz.(+)	neg.	neg.
162	7,2	6,96	9,6	29,3	42	13,7	32,6	519	poz.(+)	neg.	neg.
163	8,8	6,37	9,8	29,5	46	15,4	33,3	714	neg.	neg.	neg.
164	8,8	6,82	11	32,6	48	15,6	32,7	550	poz.(+)	poz.(+)	neg.
165	9,7	5,63	10	30	53	18,2	34,1	350	poz.(++)	neg.	neg.
166	7	7,26	11	32,4	45	14,7	32,9	377	neg.	neg.	neg.
167	13,4	6,38	9,6	29	45	15,1	33,1	677	poz.(+)	neg.	neg.
168	6,2	6,49	11	32	49	16,4	33,2	661	poz.(+)	neg.	neg.

Zaporedna številka	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	<i>Borrelia burgdorferi</i> (1 : 128)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (1 : 64)	<i>Babesia divergens</i> (1 : 64)
169	7,8	7,48	11	34,9	47	15	32,2	313	poz.(+)	neg.	neg.
170	9,2	6,44	11	31,7	49	16,2	33	655	poz.(++)	neg.	neg.
171	4,5	6,05	8,8	25,8	43	14,5	34	287	poz.(+)	neg.	neg.
172	6,7	6,38	10	31,6	49	16,2	32,8	304	neg.	neg.	neg.
173	7,8	6,22	9,8	30,2	49	15,8	32,4	534	neg.	neg.	neg.
174	6	5,9	10	31,2	53	17,3	32,7	560	poz.(++)	neg.	neg.
175	8,6	6,74	9,8	29,2	43	14,5	33,6	128	neg.	neg.	neg.
176	7,6	7,81	11	34,3	44	14,2	32,3	230	poz.(+)	neg.	neg.
177	7,2	6,51	11	32,1	49	16,5	33,5	563	neg.	neg.	neg.
178	6,8	6,05	9,1	26,8	44	15	33,9	595	poz.(+)	neg.	neg.
179	7,8	7,67	11	35,4	46	14,9	32,2	847	poz.(++)	neg.	neg.
180	6,8	6,38	9,8	30,5	48	15,4	32,1	778	neg.	neg.	neg.
181	8	6,39	10	30	47	15,7	33,5	535	poz.(+)	neg.	neg.
182	KOAG.								poz.(+)	neg.	neg.
183	9	5,95	110	29,6	50	17,4	35	859	neg.	neg.	neg.
184	9,1	5,71	11	31,6	55	18,5	33,5	560	poz.(++)	neg.	neg.
185	12,5	5,72	9,5	28,6	50	16,7	33,3	261	poz.(+)	neg.	neg.
186	6,2	5,64	10	29,5	52	17,6	33,7	456	neg.	neg.	neg.
187	9,6	7,03	11	31,9	45	15	33	381	neg.	neg.	neg.

Zaporedna številka	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	<i>Borrelia burgdorferi</i> (1 : 128)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (1 : 64)	<i>Babesia divergens</i> (1 : 64)
188	7,1	6,45	12	37,7	58	19,2	32,9	686	neg.	neg.	neg.
189	5,4	6,29	11	34,4	55	17,5	31,8	144	poz.(+)	poz.(+)	neg.
190	KOAG.								neg.	poz.(++)	neg.
191	6,1	5,44	9,6	28,7	53	17,7	33,5	458	neg.	neg.	neg.
192	12,1	6,44	12	34,8	54	17,9	333,1	287	neg.	poz.(+)	neg.
193	9,9	6,32	11	34,6	55	18	32,9	429	poz.(+)	poz.(+)	neg.
194	6,6	5,53	9,7	30,1	54	17,5	32,3	550	poz.(+)	poz.(++)	neg.
195	9	6,63	10	31,3	47	15,7	33,3	712	neg.	poz.(+++)	neg.
196	8,5	7,21	12	35,7	49	16,4	33,1	343	neg.	poz.(+++)	neg.
197	8,5	5,49	7,5	22,3	41	13,7	33,6	594	poz.(++)	neg.	neg.
198	10,9	8,05	11	32,7	41	13,1	32,2	432	neg.	poz.(+++)	neg.
199	9,5	7,39	11	34,1	46	15,1	32,8	725	neg.	neg.	neg.
200	8,3	6	8,5	24,6	41	14,2	34,7	492	poz.(+)	poz.(+)	neg.
201	4,9	5,2	9,1	26,8	51	17,5	34	597	poz.(+)	neg.	neg.
202	9	6,07	10	30,5	50	16,9	33,6	419	poz.(++)	neg.	neg.
203	5,8	5,17	7,9	23,5	46	15,4	33,8	534	neg.	neg.	neg.
204	6,3	6,16	9,9	29,5	48	16,1	33,7	340	neg.	poz.(+)	neg.
205	10,8	7,57	10	30,4	40	13,5	33,5	777	neg.	neg.	neg.
206	3,1	6,01	11	32,6	54	18,2	33,6	191	neg.	poz.(+)	neg.

Zaporedna številka	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	<i>Borrelia burgdorferi</i> (1 : 128)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (1 : 64)	<i>Babesia divergens</i> (1 : 64)
207	6,2	6,12	11	31,5	51	17,2	33,5	885	neg.	neg.	neg.
208	7,7	6,8	12	34	50	16,9	33,8	633	neg.	neg.	neg.
209	8,9	6,25	12	32,5	52	18,3	35,5	2019	poz.(+)	poz.(++)	neg.
210	7,9	6,28	11	32,6	52	17,2	33	756	poz.(+)	poz.(++)	neg.
211	7,9	6,75	11	32	47	15,8	33,3	367	neg.	poz.(++)	neg.
212	7,7	6,82	10	30,4	45	14,7	32,9	439	neg.	poz.(++)	neg.
213	8,3	5,92	9,5	28,9	49	16,1	33	460	neg.	neg.	neg.
214	9,8	7,1	11	32,7	46	15,7,	34,1	418	poz.(+)	neg.	neg.
215	8,4	6,19	9,5	29,2	47	15,4	32,6	807	neg.	poz.(+++)	neg.
216	7,5	7,37	11	34,6	47	15,4	32,9	581	poz.(+)	poz.(+)	neg.
217	4,9	5,87	9,1	27,8	47	15,6	32,8	798	neg.	neg.	neg.
218	7	7,64	11	34,5	45	14,3	31,7	542	neg.	neg.	neg.
219	7	6,55	11	32,7	50	16,2	32,5	586	neg.	neg.	neg.
220	4,3	5,52	9,4	28,3	51	17	33,2	1151	neg.	neg.	neg.
221	8,6	6,23	9,7	29,1	47	15,5	33,2	605	neg.	neg.	neg.
222	6,4	6	9,5	27,9	47	15,9	34,1	540	poz.(+++)	neg.	neg.
223	5,7	6,65	9,9	29,9	45	14,8	33	434	poz.(+++)	neg.	neg.
224	4,8	6,18	11	33,2	54	17,7	33	619	poz.(++)	neg.	neg.
225	5,1	6,84	12	34,8	51	17	33,4	634	neg.	neg.	neg.

Zaporedna številka	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	<i>Borrelia burgdorferi</i> (1 : 128)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (1 : 64)	<i>Babesia divergens</i> (1 : 64)
226	8,6	6	10	30,6	51	17,2	33,6	590	neg.	neg.	neg.
227	9,3	6,79	9,7	29,4	43	14,3	33	793	poz.(++)	neg.	neg.
228	5,6	5,79	10	30,5	53	17,6	33,3	637	poz.(++)	neg.	neg.
229	11,6	8,47	11	33,5	40	13,1	33,2	732	poz.(++)	poz.(+)	neg.
230	7,4	7,41	13	39,1	53	17,1	32,3	817	poz.(+++)	neg.	neg.
231	9	7,92	13	39,8	50	16,1	32,2	532	poz.(+)	neg.	neg.
232	7,9	8,55	14	45,4	53	16,4	30,9	453	poz.(++)	neg.	neg.
233	13,3	6,25	11	34,1	54	18,3	33,5	956	poz.(++)	poz.(+++)	neg.
234	7,6	6,46	12	35,3	55	18,1	33,1	275	poz.(+++)	poz.(+++)	poz.(+)
235	8,6	6,41	11	31,5	49	16,4	33,4	522	poz.(++)	poz.(+++)	neg.
236	7,4	6,49	9,8	29,5	46	15	33,1	236	poz.(+++)	poz.(+++)	neg.
237	7,4	6,49	9,8	29,5	46	15	33,1	236	poz.(+)	poz.(+++)	neg.
238	6	5,8	10	30,9	53	17,7	33,3	200	poz.(+++)	poz.(+++)	poz.(+)
239	8,5	5,37	9	26,8	50	16,7	33,5	465	poz.(+++)	poz.(+++)	poz.(+)
240	8,8	7	11	33,4	48	15,8	32,7	475	poz.(++)	poz.(+++)	neg.
241	8,4	7,17	10	32,6	45	14,6	32	189	poz.(+++)	poz.(+++)	poz.(++)
242	7,6	5,82	10	31	53	17,5	32,9	99	poz.(+)	poz.(+++)	poz.(+)
243	7,8	6,52	9,3	27,8	43	14,3	33,6	201	poz.(++)	poz.(+++)	neg.
244	8	5,92	9,7	30,1	51	16,3	32,1	337	poz.(++)	poz.(+)	neg.

Zaporedna številka	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	<i>Borrelia burgdorferi</i> (1 : 128)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (1 : 64)	<i>Babesia divergens</i> (1 : 64)
245	9,5	5,44	9,1	26,9	49	16,8	34	346	poz.(+)	neg.	neg.
246	KOAG.								poz.(++)	neg.	neg.
247	8,9	7,75	12	37,2	48	15,1	31,4	677	poz.(++)	neg.	neg.
248	6,5	9,24	13	41,9	45	14,6	32,1	498	poz.(+)	neg.	neg.
249	2	3,92	6,5	17,8	45	16,6	36,5	119	poz.(+++)	poz.(+++)	neg.
250	5,7	7,76	10	31,7	41	13,2	32,2	379	poz.(+)	poz.(+++)	poz.(++)
251	4,2	5,85	9,3	28,8	49	15,8	32,2	113	poz.(+++)	poz.(+++)	poz.(+)
252	4,1	4,88	9	28	57	18,5	32,3	176	poz.(+++)	poz.(+++)	neg.
253	8,5	7,02	11	34,7	49	15,8	32	422	poz.(++)	poz.(+)	neg.
254	7,8	6,33	10	30,3	48	15,7	32,9	322	poz.(++)	poz.(+)	neg.
255	6,4	6,63	8,6	25,7	39	13	33,6	444	neg.	neg.	neg.
256	7,5	8,04	13	41,9	52	16,6	31,9	93	poz.(+)	neg.	neg.
257	9,3	6,44	8,6	26,2	41	13,3	32,8	652	poz.(+)	poz.(++)	neg.
258	7,3	7,21	9,4	29,3	41	13,1	32,2	156	poz.(+)	neg.	neg.
259	7,8	5,65	8,6	25,8	46	15,2	33,3	490	poz.(++)	neg.	neg.
260	8,4	5,93	11	32,3	54	17,9	32,9	321	poz.(++)	neg.	neg.
261	KOAG.								poz.(++)	poz.(+++)	neg.
262	5,1	7,08	11	32,4	46	14,8	32,4	656	neg.	neg.	neg.
263	7	5,82	8,3	25	43	14,3	33,2	623	neg.	poz.(+)	neg.

Dvojno vzorčenje(v belem polju so rezultati prvega vzorca, v sivem polju so rezultati drugega vzorca iste živali) Double sampling (in the white field are results of the first sample in the gray field are the results of the second sample of the same animal)											
Zaporedna številka	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	<i>Borrelia burgdorferi</i> (1 : 128)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (1 : 64)	<i>Babesia divergens</i> (1 : 64)
264	9,4	8,84	12	37,2	42	13,6	32,4	205	neg.	neg.	neg.
265	7	8,21	10	31,8	39	12,3	31,7	713	neg.	poz.(++)	poz.(+)
266	10,3	9,32	12	35,3	38	12,6	33,2	550	neg.	neg.	neg.
267	9,9	8,84	9,9	30,5	34	11,2	32,5	582	neg.	poz.(+++)	poz.(+)
268	8,5	8,08	12	36	45	14,9	33,6	672	neg.	neg.	neg.
269	11,9	8,39	11	32,8	39	13,4	34,3	272	poz.(++)	poz.(+++)	poz.(+++)
270	11,5	8,85	12	36,6	41	13,7	33,2	734	neg.	neg.	neg.
271	8,8	8	10	31,9	40	12,8	32	677	poz.(+)	poz.(+++)	poz.(+++)
272	4,2	7,32	9,3	27,2	37	12,7	34,3	532	neg.	neg.	neg.
273	9,5	9,7	12	37,5	39	12,3	31,9	572	poz.(++)	poz.(+++)	poz.(+++)
274	10,5	10,9	13	37,4	34	11,6	33,8	695	neg.	neg.	neg.
275	10,3	8,8	10	31,7	36	11,4	31,7	391	neg.	poz.(+++)	poz.(++)
276	10,1	6,18	9,4	28,1	45	15,3	33,6	444	neg.	poz(+++)	poz.(++)
277	10,9	8,16	11	31,8	39	13,2	34	256	poz.(+)	poz.(++)	poz.(++)
278	6,9	6,68	10	30	45	15,6	34,7	561	poz.(+)	poz.(+)	poz.(+)
279	3,7	5,62	8,4	25	44	14,9	33,4	155	neg.	poz.(+++)	poz.(+)

Zaporedna številka	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	<i>Borrelia burgdorferi</i> (1 : 128)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (1 : 64)	<i>Babesia divergens</i> (1 : 64)
280	12,2	8,37	12	35,4	42	13,7	32,5	743	neg.	neg.	poz.(+)
281	7,7	6,59	9,9	30,3	46	15,1	32,7	482	neg.	poz.(+++)	poz.(+++)
282	12	9,31	13	41,5	45	14,1	31,7	524	neg.	poz.(++)	poz.(+++)
283	12,5	8,27	12	38,2	46	14,5	31,3	298	poz.(+)	poz.(++)	poz.(+++)
284	9,4	8,26	12	36,8	45	14,2	31,9	707	neg.	neg.	neg.
285	8,8	7,52	10	32,2	43	13,3	31,1	1577	poz.(+)	poz.(+)	poz.(+++)
286	8,7	8,7	12	38,5	44	13,8	31,2	719	neg.	neg.	neg.
287	7,6	7,049	10	31,6	42	13,6	32,2	515	neg.	poz.(+++)	poz.(++)
288	7,3	9,18	12	36,4	40	12,5	31,6	939	neg.	neg.	neg.
289	12,2	9,65	111	35,7	37	11,5	31	217	poz.(+)	poz.(++)	poz.(+)
290	9,3	7,58	11	34	45	14,6	32,5	343	neg.	poz.(+++)	poz.(+++)
291	9,2	7,04	9,8	29,8	42	13,9	32,8	644	poz.(+)	poz.(+++)	poz.(+++)
292	11,5	8,7	12	35,8	41	13,3	32,2	513	neg.	poz.(+++)	poz.(+++)
293	13,4	8,05	11	33,2	41	13,3	32,1	373	poz.(++)	poz.(++)	poz.(+++)
294	9,8	7,05	11	33,1	47	15,2	32,3	578	neg.	poz.(+++)	poz.(+++)
295	10,2	6,42	10	30,7	48	15,5	32,5	928	neg.	poz.(++)	poz.(+++)
296	8,3	8,11	11	35,2	43	14	32,2	606	neg.	poz.(++)	neg.
297	9	7,4	9,9	30,8	42	13,4	32,3	724	neg.	poz.(+++)	neg.
298	9,8	8,72	11	33,5	38	12,5	32,5	911	neg.	poz.(++)	neg.

Zaporedna številka	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	<i>Borrelia burgdorferi</i> (1 : 128)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (1 : 64)	<i>Babesia divergens</i> (1 : 64)
299	9,6	8,84	11	33	37	12	32,3	660	neg.	poz.(+++)	poz.(+++)
300	8,1	7,93	11	34,4	43	14	32,4	1319	neg.	neg.	neg.
301	8,6	7,69	11	33,7	44	13,6	31	490	neg.	poz.(+++)	poz.(++)
302	7,9	8,16	9,9	29	35	12,1	34,2	909	neg.	neg.	neg.
303	11,4	10,7	12	36,7	34	11,2	32,6	745	poz.(+)	poz.(+++)	neg.
304	12,1	6,35	11	31,6	50	16,7	33,7	707	neg.	poz.(+++)	poz.(+++)
305	12,1	8,35	12	37	44	14,3	32,2	2318	neg.	poz.(++)	poz.(+)
306	9,6	7,9	9,9	30,2	38	12,5	32,7	747	neg.	neg.	neg.
307	11,8	9,72	12	36,7	38	11,8	31,3	746	neg.	poz.(++)	neg.
308	8,6	8,43	9,9	30,2	36	11,8	32,8	1303	neg.	neg.	neg.
309	9,8	9,8	11	34,5	35	11,1	31,7	1053	neg.	poz.(+)	neg.
310	10,3	9,36	12	38,2	41	13	31,7	833	neg.	neg.	neg.
311	11,5	10,6	12	39,1	37	11,3	30,6	185	neg.	poz.(+++)	neg.
312	10	12,6	14	41,5	33	11	33,6	937	neg.	neg.	neg.
313	8,7	7,88	8,6	26,1	33	10,9	33	584	poz.(+)	poz.(+++)	neg.
314	8,2	9,4	11	36,1	38	11,8	30,9	505	neg.	neg.	neg.
315	9,4	7,43	9,6	29,1	39	12,9	32,8	370	neg.	poz.(+++)	poz.(+)
316	8,3	4,43	7,4	20,3	46	16,7	36,4	879	neg.	poz.(+)	poz.(++)
317	8,4	7,48	11	35	47	14,3	30,6	658	neg.	poz.(+)	neg.

Zaporedna številka	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	<i>Borrelia burgdorferi</i> (1 : 128)	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (1 : 64)	<i>Babesia divergens</i> (1 : 64)
318	10,7	6,4	10	29,2	46	15,7	34,3	358	neg.	neg.	neg.
319	6,7	8,36	13	40,9	49	15	30,5	481	poz.(+)	neg.	neg.