

Certifikovaná metodika

Molekulární detekce *Anaplasma phagocytophilum* ze vzorků obratlovců a klíštěcích vektorů

Metodika byla vypracovaná jako výstup výzkumného projektu QK1920258 „Šíření klíšťat a klíšťaty přenášených onemocnění: nová a opomíjená rizika pro domácí a hospodářská zvířata a člověka“ v rámci Programu aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství na období 2017-2025, ZEMĚ

Autoři:

Mgr. Kristýna Hrazdilová, Ph.D.

Prof. MVDr. David Modrý, Ph.D.

Oponenti:

MVDr. Petr Šatrán, Ph.D. Státní veterinární správa

MVDr. Kamil Sedlák, Ph.D. SVÚ Praha Lysolaje

Brno, září 2020

Obsah

Cíl metodiky	3
Úvod	4
Vlastní popis metodiky	5
Materiál a přístroje.....	5
Odběr vzorků biologického materiálu	6
Vzorky zvířat	6
Příprava buffy coat	6
Vzorky klíšťat	6
Izolace DNA	6
Z krve/buffy coatu	6
Z klíšťat/tkáně.....	7
Detekce cílové sekvence DNA – nested PCR	7
Sekvence primerů pro detekci DNA <i>A. phagocytophilum</i>	7
Kontroly PCR.....	7
Příprava reakční směsi a amplifikace	8
Detekce cílové sekvence DNA – elektroforéza.....	9
Příprava PCR produktů na sekvenaci.....	10
Sekvenace.....	10
Analýza sekvenačního výsledku	10
Ověření identity PCR produktu.....	10
Zařazení izolátu <i>A. phagocytophilum</i> do příslušného ekotypu	11
Srovnání novosti postupů.....	14
Ekonomické aspekty	15
Seznam použité související literatury	15
Seznam publikací předcházející metodice.....	17
Dedikace	17

Cíl metodiky

Bakterie rodu *Anaplasma* jsou původci klíšťaty přenášených onemocnění po celém světě s významným dopadem jak pro zvířata, tak pro člověka (Battilani *et al.*, 2017). Vliv *Anaplasma phagocytophilum* na zdraví a produktivitu domácích zvířat je znám již od 40. let dvacátého století (Gordon *et al.*, 1940) a dodnes je významnou příčinou ekonomických ztrát. Na významu nabývá i jako původce lidské granulocytární anaplazmózy, která ovšem zůstává často nediagnostikována jako akutní nespecifické febrilní onemocnění. S ohledem na změny v dynamice výskytu klíšťat a životního stylu je anaplazmóza v řadě regionů považována za emerging disease.

A. phagocytophilum je gram-negativní bakterie přenášená klíšťaty rodu Ixodes. Typicky napadá neutrofilu a u zvířat může vyvolávat letargii, ataxii, ztrátu apetitu, bolestivost kloubů; nejzávažnějším klinickým projevem je anémie a leukopénie. Zvířecí hostitelé (domácí a volně žijící přežvýkavci, ježci, divočáci apod.) slouží jako rezervoár infekce, ze kterého je nákaza přenášena klíšťaty na hospodářská a domácí (psy, koně) zvířata nebo člověka (Bakken and Dumler, 2015). Ačkoli je *A. phagocytophilum* vnímána jako jeden druh, na základě molekulárně-biologických studií je zřejmá existence několika ekotypů/haplotypů s rozdílnou epidemiologií (Jahfari *et al.*, 2014; Jaarsma *et al.*, 2019) a zřejmě i s odlišným zoonotickým potenciálem.

Vzhledem k ekonomickým dopadům v chovech hospodářských zvířat, zoonotickému potenciálu a riziku přenosu alternativními cestami (transfúze, fomity apod.) je potřeba přesných, rychlých a dostupných diagnostických postupů nezpochybnitelná (Silaghi *et al.*, 2017). V současné době dostupné diagnostické testy jsou založeny na principu nepřímé imunofluorescence detekující IgG/IgM protilátky. V první fázi infekce (první týden akutní fáze onemocnění) nejsou protilátky detekovatelné, test je nutné opakovat v odstupu dvou až čtyř týdnů. Z přímých testů jsou dostupné sady pro real-time PCR (qPCR), umožňující rychlou a sensitivní diagnostiku od prvních příznaků akutní infekce. Žádný z uvedených testů neumožňuje rozlišení genetických variant s rozdílným epidemiologickým a zoonotickým potenciálem.

Cílem předkládané metodiky je umožnit rychlou detekci přítomnosti nukleové kyseliny *A. phagocytophilum* ve vzorcích plné krve/tkáně širokého spektra hostitelů (skot, ovce, kozy, psi, koně aj.) a po sekvenaci PCR produktu i zařazení k příslušnému ekotypu. Metodika může být využita i jako doplněk k čistě diagnostické qPCR, kdy její aplikací u pozitivních vzorků mohou být tyto zařazeny k ekotypům. Díky sensitivitě předkládané metodiky je tato vhodná i k monitoringu efektivnosti léčby, kdy opakovaný screening vzorků několik týdnů po ukončení léčby umožní posoudit eliminaci patogenu z hostitelského organismu. Metodika využívá běžné vybavení molekulárně-diagnostické laboratoře a její využití tak není vázáno na vstupní investice. Předkládaná metodika je v souladu v doporučeními pro přímou detekci *Anaplasma* spp. pro diagnostické a epidemiologické účely z roku 2017 (Silaghi *et al.*, 2017).

Úvod

A. phagocytophilum je obligátní intracelulární parazit s výrazným dopadem na zdraví zvířat i člověka. Hostitelské spektrum je extrémně široké, zahrnující člověka, masožravce, přežvýkavce, hlodavce, hmyzožravce, ptáky i plazy. Jeho rozšíření odpovídá rozšíření klíštěcích vektorů rodu *Ixodes*; *I. ricinus* v Evropě, *I. scapularis*, *I. pacificus* a *I. spinipalis* v USA, *I. persulcatus* v Asii a Rusku (Stuen *et al.*, 2013). Tyto druhy přenášejí infekci *A. phagocytophilum* trans-stadiálně, ale nikoli trans-ovariálně, což vylučuje jejich roli jako rezervoáru infekce (Dugat *et al.*, 2015). V Evropě jsou pravděpodobným rezervoárem různé druhy vysoké zvěře (jelen, daněk, los apod.), která je jedním z hlavních hostitelů *I. ricinus* a drobní savci (hlodavci a hmyzožravci), jakožto hlavní hostitelé vývojových stádií klíštěte. Role dalších druhů divokých (lišky, divoká prasata) i domácích zvířat, u kterých byla *A. phagocytophilum* detekována, v epidemiologii není jasná. Méně častou cestou přenosu je iatrogenní přenos (Fine *et al.*, 2016), u člověka byl zaznamenán i přenos infekce při manipulaci s krví a tkání nakažených zvířat (Bakken *et al.*, 1996).

Po infekci vnímavého hostitele dochází k napadení neutrofilů a eozinofilů a tvorbě tzv. moruly v jejich cytoplazmě. Procento infikovaných fagocytických buněk je závislé na fázi infekce, citlivosti hostitele a konkrétním bakteriálním kmeni. Dochází k rozvoji leukopenie, neutropenie a tím až k imunodeficienci, která může vést k výskytu komplikací a oportunních infekcí (Woldehiwet, 2010). U lidí je *A. phagocytophilum* původcem lidské granulocytární anaplazmózy s velmi širokým spektrem klinických projevů od asymptomatických infekcí po těžké infekce vyžadující hospitalizaci. Klinickým projevem je obvykle akutní nespecifické febrilní onemocnění trvající 2–11 dní. U většiny pacientů se vyskytuje horečka, malátnost, myalgie, bolesti hlavy, méně často artralgie, postižení jater, poruchy centrálního nervového systému, nevolnost a zvracení nebo dýchací obtíže. Vzácně může dojít k život ohrožujícím komplikacím (Bakken and Dumler, 2015).

U ovcí a koz je *A. phagocytophilum* původcem klíštěcí horečky („tick-born fever“), u skotu pak „pasture fever“ projevující se horečkou doprovázenou ztrátou chuti, poklesem produkce mléka, neochotou k pohybu. Oslabená imunita predisponuje zvířata k rozvoji druhotných bakteriálních infekcí, jako je pasteurelóza a různé hnisavé infekce (Woldehiwet, 2006, 2010). V těchto případech je ekonomický dopad neoddiskutovatelný a včasná diagnostika umožní zahájit léčbu a snížit tak ztráty na minimum.

Anaplazmóza psů nabývá na významu s počtem aktivních, sportujících a cestujících chovatelů, jejichž psi přichází do styku s potenciálně infikovanými klíšťaty ve zvýšené míře. Projevy infekce *A. phagocytophilum* se různí od asymptomatického průběhu po klinicky evidentní infekce s příznaky horečky, letargie, nechutenství, anorexie, zvracení, průjem, ztuhlost a bolestivost kloubů. Zvýšená predispozice nebyla prokázána u žádného plemene (Sainz *et al.*, 2015).

U koní je *A. phagocytophilum* původcem equinní granulocytární ehrlichiozy, která dle serologického screeningu probíhá často subklinicky, v ojedinělých případech se manifestuje horečkou, depresí, anorexií, otoky kloubů, petechiemi, ikterem a během dvou týdnů většinou samovolně odezní (Jahn *et al.*, 2010; Praskova *et al.*, 2011). V těchto případech je přesná identifikace významná jako součást diferenciální diagnostiky jiných febrilních stavů.

Ačkoli je v současné době *A. phagocytophilum* považována taxonomicky za jeden druh, v literatuře vzrůstá počet vědeckých prací svědčících o existenci značných rozdílů mezi izoláty na úrovni epidemiologie, geografie, hostitelské specifity i genetické variability. Experimentální infekce izoláty z odlišných hostitelských druhů poukazují na možnost hostitelské specializace. Geneticky se jednotlivé izoláty, případně jejich klastry, liší v závislosti na studovaném markeru (16S rRNA, hlavní povrchový

protein *msp2*, sekreční protein *ankA*, heat shock protein *groEL*), tyto klastry korespondují s tzv. ekotypy, tedy populacemi z jedné ekologické niky (Jahfari *et al.*, 2014). Metody typizace izolátů založené na analýze více lokusů (tzv. „multilocus sequence typing“) rovněž poukazují na rozdílnou hostitelskou specifitu, geografickou distribuci a zoonotický potenciál jednotlivých klastřů (Huhn *et al.*, 2014). Nedávná komplexní práce vycházející z analýzy sekvence *groEL* genu vzorků *A. phagocytophilum* napříč Evropou a Asií potvrdila a rozšířila rozdělení jednotlivých izolátů z původních čtyř (Jahfari *et al.*, 2014) do osmi klastřů (Jaarsma *et al.*, 2019).

Současná diagnostika *A. phagocytophilum* je založena zejména na nepřímém průkazu IgG/IgM protilátek metodami nepřímé fluorescence či ELISA. Nevýhody nepřímého průkazu jsou zejména nepřítomnost protilátek v prvním týdnu (v akutní fázi) infekce, což znemožňuje včasnou diagnostiku a zahájení léčby, možná zkřížená reaktivita protilátek poskytující falešně pozitivní výsledek a v neposlední řadě i detekce protilátek, které mohou v organismu přetrvávat několik měsíců až let po prodělané infekci bez souvislosti s aktuálně probíhající infekcí. Přímé testy detekující přítomnost samotných bakterií nebo jejich DNA mají vyšší sensitivitu i specifitu zejména v počáteční, akutní fázi infekce. Mikroskopie krevního nátěru, kdy mohou být přímo pozorovány moruly *Anaplasma* spp. v infikovaných buňkách je levná a rychlá, nicméně z přímých testů nejméně sensitivní a závislá na zkušenostech vyšetřujícího personálu. Izolace a kultivace *in vitro* je vhodnější pro studium biologie *Anaplasma* spp. než pro diagnostické účely, vzhledem k časové a technické náročnosti metody a možnosti kontaminace jinými bakteriálními kmeny přítomnými ve vzorku.

Detekce přítomnosti nukleové kyseliny *A. phagocytophilum* ve vzorku je rychlou a citlivou metodou umožňující včasnou diagnostiku včetně možností automatizace. Komerčně dostupné kity využívají metody real-time PCR umožňující detekci přítomnosti DNA rychle a sensitivně, nicméně amplifikovaný úsek je krátký, nesequenovatelný a vzorky jsou charakterizovány pouze jako pozitivní/negativní. Konvenční PCR využívající nested protokolu dosahují srovnatelné sensitivity jako real-time PCR s možností následné sekvenace produktu a bližší charakterizace konkrétního izolátu (např. určení zoonotického potenciálu) (Silaghi *et al.*, 2017).

Vlastní popis metodiky

Materiál a přístroje

10 ml odběrové zkumavky s antikoagulantem K3EDTA

Zkumavky typu eppendorf 1,5 ml

0,2 ml tenkostěnné PCR zkumavky, případně 8-mi zkumavkové PCR-stripy s jednotlivými víčky

Sterilní skalpel/čepele

Sterilní petriho misky

PCR cycler s vyhříváním víkem

Aparatura pro horizontální gelovou elektroforézu

Centrifuga na 10 ml zkumavky

Centrifuga na 1,5 ml zkumavky

Centrifuga na 0,2 ml zkumavky/stripy

Lednice (+4°C), mrazák (-20°C)

Odběr vzorků biologického materiálu

Vzorky zvířat

Pro diagnostické účely je odebírána periferní krev do plastových 10 ml zkumavek s antikoagulantem K3EDTA. Je třeba dodržet maximální hladinu krve označenou ryskou na zkumavce. Ihned po odběru je krev ve zkumavce nutné důkladně promíchat s antikoagulantem, uchovávat při +4°C a zpracovat bezprostředně po doručení do laboratoře nebo skladovat při -20°C do izolace DNA (je třeba minimalizovat počet cyklů zmražení/rozmražení).

Pro izolaci DNA z plné krve je třeba cca 200 µl krve (v závislosti na konkrétním použitém izolačním postupu; viz níže) nebo je možné separovat buffy coat (obsahující bílé krvinky a krevní destičky) a ten následně použít k izolaci.

Příprava buffy coat

Vzorek plné krve s antikoagulantem se centrifuguje (200 g, 15-20 min), vrchní vrstva tvořená krevní plasmou se opatrně odstraní a střední vrstva (tenký prstenec nad vrstvou erytrocytů), buffy coat, se odebere do čisté zkumavky typu eppendorf a následně použije k izolaci DNA. Krátkodobě (hodiny) jej lze skladovat v +4°C, dlouhodobě (týdny) při -20°C do izolace DNA (je třeba minimalizovat počet cyklů zmražení/rozmražení, pro možnost opakovaného vyšetření doporučujeme vzorky alikvotovat).

V případě, že není možné odebrat periferní krev (zejména u kadaverních vzorků), lze jako alternativní materiál použít vzorek sleziny, případně jater. Sterilně odebranou tkáň lze před izolací DNA uchovávat v -20°C.

Vzorky klíšťat

Vzorky klíšťat lze krátkodobě (do 48 hodin) skladovat v +4°C, jinak je vložíme do ≥70% etanolu a skladujeme v -20°C. S klíšťaty manipulujeme sterilní pinzetou. Před izolací DNA provedeme oplach:

- 5 minut/destilovaná voda (nebo sterilní PBS)
- 5 minut/70-80% etanol
- 5 minut/ destilovaná voda (nebo sterilní PBS)
- Oschnutí na sterilním podkladu (filtrační papír, petriho miska apod.) následované izolací DNA

Izolace DNA

Z krve/buffy coatu

Izolaci celkové DNA z krve či její frakce bílých krvinek (buffy coat) lze provádět komerčně dostupnými kity jak manuálně tak automaticky. Při izolaci je potřeba dodržet návod výrobce konkrétního kitu. Lze použít kterýkoli z níže doporučených kitů, případně adekvátní alternativu (kvalitu extrakce je nutné ověřit na paralelní izolaci a následné detekci *A. phagocytophilum* 20 pozitivních a 10 negativních vzorků a výsledky porovnat s jedním z níže doporučených kitů).

Doporučené kity pro izolaci:

1. QIAamp DNA Blood mini kit, Qiagen, Germany
2. DNeasy Blood & Tissue Kits, Qiagen, Germany
3. Exgene Tissue SV (Plus!), GeneAll, Korea
4. Exgene Clinic SV, GeneAll, Korea
5. Exgene Cell SV, GeneAll, Korea
6. High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche, Switzerland
7. MagCore Genomic DNA Whole Blood Kit, RBCBioscience, Taiwan
8. Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit, Promega, USA

Z klíšťat/tkáně

Izolaci celkové DNA z klíšťat či tkáně lze provádět níže doporučenými komerčně dostupnými kity jak manuálně tak automaticky. Při izolaci je potřeba dodržet návod výrobce konkrétního kitu. Lze použít kterýkoli z níže doporučených kitů, případně adekvátní alternativu (kvalitu extrakce je nutné ověřit na paralelní izolaci a následné detekci *A. phagocytophilum* 20 pozitivních a 10 negativních vzorků a výsledky porovnat s jedním z níže doporučených kitů). Je nutné zajistit adekvátní mechanické narušení vzorku pro usnadnění lyzačního kroku. V případě vzorků jedinců nedospělých stádií klíšťat (nymf) se pro izolaci použije celý vzorek; za použití sterilního skalpelu a sterilní petriho misky (či adekvátní alternativy) je potřeba vzorek před prvním, lyzačním krokem mechanicky rozmělnit. V případě dospělců klíšťat se vzorek sterilním skalpelem rozřízne podélně na poloviny, z nichž se pro izolaci DNA použije jedna, kterou je taktéž nutné mechanicky rozmělnit (viz. výše). Takto připravený vzorek je vstupním materiálem pro izolaci kitem. U tkání postupujte dle doporučení konkrétního výrobce.

Doporučené kity pro izolaci:

1. DNeasy Blood & Tissue Kits, Qiagen, Germany
2. Exgene Tissue SV (Plus!), GeneAll, Korea
3. Exgene Clinic SV, GeneAll, Korea
4. Exgene Cell SV, GeneAll, Korea
5. High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche, Switzerland

Detekce cílové sekvence DNA – nested PCR

Pro detekci bakteriální DNA *A. phagocytophilum* byl vybrán úsek operonu GroESL, který kóduje chaperony GroES a GroEL. Jedná se o dostatečně konzervovaný gen, umožňující navržení dvou sad primerů pro nested PCR obklopující variabilní úsek pro bližší charakterizaci izolátu. Amplifikovaný úsek 407 bp (366 bp bez sekvencí primerů) je přijatelně krátký, aby byl snadno amplifikovatelný a tím vhodný pro diagnostické účely, ale zároveň variabilní, aby umožnil zařazení do příslušného ekotypu. V současné době je dostupný dostatečný počet (>1500) sekvencí GroEL genu *A. phagocytophilum* umožňující detailní analýzu a sestavení referenčních sekvencí pro jednotlivé ekotypy (Jaarsma *et al.*, 2019).

Varianta nested PCR (tedy dvoukrokové amplifikace pomocí dvou setů primerů) je zvolena z důvodu vysoké sensitivity i specificity.

Sekvence primerů pro detekci DNA *A. phagocytophilum*

Název	Sekvence 5' → 3'	Délka produktu	Reference
EphplgroEL(569)F	ATGGTATGCAGTTTGATCGC	574 nt	(Alberti <i>et al.</i> , 2005)
EphgroEL(1142)R	TTGAGTACAGCAACACCACCGGAA		
ApNest-F	GTGGAATTTGAAAATCCATAC	407 nt	(Jaarsma <i>et al.</i> , 2019)
ApNest-R	GTCCTGCTAGCTATGCTTTC		

Kontroly PCR

Pro každou sadu testovaných DNA se používají dvě negativní kontroly. První slouží ke kontrole čistoty použitých reagentů, druhá ke kontrole pracovního postupu. Pro každou sadu testovaných vzorků se používá jedna pozitivní kontrola obsahující sekvenačně potvrzenou DNA *A. phagocytophilum*.

Příprava reakční směsi a amplifikace

1. Reakční směs se připravuje vždy čerstvá v boxu dekontaminovaném UV zářením po dobu 10 minut; templát (vzorek či reakce prvního kola) se přidává mimo prostory pro přípravu mastermixu.

2. Roztoky, reagentie i vzorky necháme rozmrazit při +4°C, poté jemným poklepem na zkumavku promícháme (nevortexujeme) a centrifugujeme při maximálních otáčkách pět sekund.

4. Dle počtu analyzovaných vzorků (počet vzorků + 4) připravíme mastermix napipetováním jednotlivých komponent v pořadí a poměru uvedeném níže, vortexujeme 5 s, při maximálních otáčkách centrifugujeme 5 s a rozdělíme do jednotlivých PCR zkumavek či stripů s jednotlivými víčky (typ odpovídající použitému cykleru), které ihned uzavřeme.

	Objem na 1 reakci v μ l	
PCR H ₂ O	4	
Primer EphplgroEL(569)F 10 μ M	0,75	
Primer EphgroEL(1142)R 10 μ M	0,75	
2x PCR BIO Taq Mix Red (PCR Biosystems, UK)	7,5	
Objem mastermixu na 1 reakci	13	
vzorek		2 μ l
Celkový objem		15 μl

5. Do první negativní kontroly přidáme PCR vodu odpovídající objemu vzorku a uzavřeme.

6. Mimo box na přípravu mastermixu přidáme do jednotlivých PCR zkumavek/stripů odpovídající množství vzorků, pozitivní kontroly a PCR vodu do druhé negativní kontroly (v tomto pořadí). Nikdy nesmí být otevřeny dvě PCR zkumavky zároveň – po přidání vzorku je nutné jednotlivé zkumavky pečlivě uzavřít. Před amplifikací všechny PCR zkumavky/stripy centrifugujeme při maximálních otáčkách 5 s.

7. Amplifikace probíhá dle níže uvedeného teplotního profilu v cykleru s vyhřívaným víčkem (např. Biometra TRIO, Analytik Jena; T100/C1000 Thermal Cycler, BioRad).

	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	95°C	1'	
Denaturace	95°C	15''	x 35
Annealing	57°C	15''	
Elongace	72°C	15''	
Finální elongace	72°C	5'	
	12°C	∞	

Po skončení amplifikace a vychlazení cykleru na 12°C lze vzorky vyjmout a pokračovat dle bodu 8., případně je v tomto bodě možné postup přerušit a PCR zkumavky skladovat v +4°C (do 24 hodin), nebo -20°C (v řádu týdnů).

8. Mastermix pro druhé kolo PCR připravíme analogicky bodu 4. dle níže uvedeného rozpisu:

	Objem na 1 reakci v μ l	
PCR H ₂ O	9,5	
Primer ApNest-F 10 μ M	1	

Primer ApNest-R 10 μ M	1	
2 \times PCR BIO Taq Mix Red (PCR Biosystems, UK)	12,5	
Objem mastermixu na 1 reakci	24	
Reakce prvního kola		1 μ l
Celkový objem		25 μl

9. Mimo box na přípravu mastermixu přidáme do jednotlivých PCR zkumavek/stripů odpovídající množství reakce prvního kola - první negativní kontrolu, poté vzorky, pozitivní kontrolu a druhou negativní kontrolu (v tomto pořadí). Nikdy nesmí být otevřeny dvě PCR zkumavky zároveň – po přidání vzorku je nutné jednotlivé zkumavky pečlivě uzavřít. Před amplifikací všechny PCR zkumavky/stripy centrifugujeme při maximálních otáčkách 5 s.

10. Amplifikace probíhá dle níže uvedeného teplotního profilu v cyklu s vyhřívaným víčkem (např. Biometra TRIO, Analytik Jena; T100/C1000 Thermal Cycler, BioRad).

	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	95°C	1'	
Denaturace	95°C	15''	x 35
Annealing	55°C	15''	
Elongace	72°C	15''	
Finální elongace	72°C	5'	
	12°C	∞	

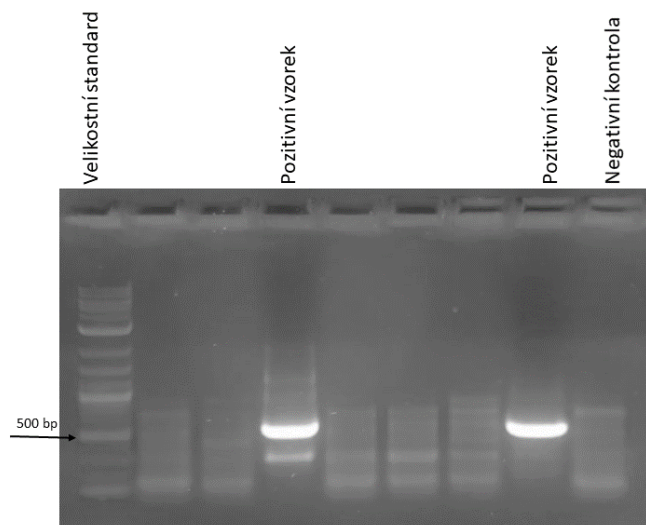
Po skončení amplifikace a vychlazení cyklu na 12°C lze vzorky vyjmout a pokračovat ve vizualizaci PCR produktu, případně je v tomto bodě možné postup přerušit a PCR zkumavky skladovat v +4°C (do 24 hodin), nebo -20°C (v řádu týdnů).

Detekce cílové sekvence DNA – elektroforéza

Produkty amplifikace jsou separovány a vizualizovány na 1,5 – 2% agarózovém gelu v 1 \times TAE pufru v aparatuře určené pro horizontální elektroforézu (Lee *et al.*, 2012):

1. odpovídající množství agarózy (1,5 – 2,0 g/100 ml) v kvalitě pro molekulární biologii rozvaříme v 1 \times TAE pufru (40 mM Tris base, 20mM kyselina octová, 1mM EDTA) v mikrovlnné troubě a po vychladnutí doplníme destilovanou vodou na původní objem
2. po vychladnutí na cca 50 °C přidáme 4 μ l/100 ml MIDORIGreen Advance (Nippon Genetics, Germany) a po důkladném promíchání nalijeme do formičky, vložíme hřeben odpovídající počtu a objemu analyzovaných vzorků a necháme zchladnout a ztuhnout (cca 30 minut)
3. Gel vložíme do aparatury a přelijeme 1 \times TAE puftrem tak, aby hladina dosahovala 1-2 mm nad gel, vyjmeme hřeben
4. Do jednotlivých jamek pipetujeme 18 μ l od každého vzorku, v pořadí: první negativní kontrola, velikostní standard, vzorky, volná jamka, pozitivní kontrola, velikostní standard, druhá negativní kontrola; zavřeme aparaturu a necháme proběhnout elektroforézu při 1-5 V/cm mezi elektrodami po dobu nutnou k dostatečné separaci produktů; velikostní standard volíme adekvátně délce PCR produktu (407 nt), např. 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs, USA/ThermoFisher Scientific, USA)
5. Po skončení elektroforézy jsou produkty vizualizovány prosvícením gelu na UV transluminátoru, obrazový výsledek zdokumentován a uložen do databáze pro dodatečné vyhodnocení nebo ověření.

6. V případě následné sekvenace PCR produktů vyřízneme jednotlivé bandy sterilním skalpelem tak, abychom minimalizovali množství nadbytečné agarózy a přemístíme je do sterilních 1,5 ml zkumavek. Produkty lze skladovat v +4°C (do 24 hodin), nebo -20°C (v řádu týdnů).



Příprava PCR produktů na sekvenaci

PCR produkty izolujeme z gelu komerčními kity dle doporučení výrobce (např. QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Germany; Gel / PCR DNA Fragments Extraction Kit, GenaAid Biotech, Taiwan).

Sekvenace

Sekvenace PCR produktů Sangerovým sekvenováním za použití apmifikačních primerů (ApNest-F a ApNest-R) může být řešena formou komerčně dostupné služby (např. Seqme, MacroGen Europe) nebo na pracovišti.

Analýza sekvenačního výsledku

Ověření identity PCR produktu

Chromatogramy (ve formátu .ab1) získané sekvenací obou řetězců složíme do tzv. contigu pomocí funkce assembly (např. volně dostupný software BioEdit, případně licencované softwary Geneious, CLCWorkBench apod.) a editujeme sekvenci tak, abychom získali výslednou sekvenci s vysokou kvalitou chromatogramů (zejména zkrátíme začátek a konec sekvenační reakce, tzv. trim ends).

Výslednou sekvenci porovnáme se sekvencemi dostupnými v databázi GenBank za využití algoritmu megaBLAST:

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

S následujícími parametry (ostatní nastavení zůstává defaultní):

Job Title: kód/název vzorku

Database: standard databases -> nucleotide collection (nr/nt)

Organisms: nevyplňujeme

Pokud je alespoň prvních pět výsledků uvedeno jako *Anaplasma phagocytophilum* s hodnotou „Per Ident“ (procentuální identita analyzované sekvence s uvedenými sekvencemi z databáze GenBank) nad 95 %, považujeme vzorek za pozitivní na přítomnost *A. phagocytophilum*.

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy			
Sequences producing significant alignments							
Download Manage Columns Show 100							
select all 100 sequences selected							
GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Anaplasma phagocytophilum strain ItalyIRH017411 heat shock protein (groEL) gene, partial cds	752	752	100%	0.0	100.00%	KF031393.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Anaplasma phagocytophilum isolate turmer heat-shock protein (groEL) gene, partial cds	752	752	100%	0.0	100.00%	JX082323.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Anaplasma phagocytophilum isolate 13TM heat shock protein (groEL) gene, partial cds	676	676	89%	0.0	100.00%	MN093161.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Anaplasma phagocytophilum isolate MuisZw246 heat shock protein (groEL) gene, partial cds	665	665	89%	0.0	99.45%	MN093206.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Anaplasma phagocytophilum isolate ZH125TIII68 heat shock protein (groEL) gene, partial cds	647	647	100%	0.0	95.33%	MN093275.1

Zařazení izolátu *A. phagocytophilum* do příslušného ekotypu

Určení ekotypu konkrétního izolátu probíhá na základě procentuální shody analyzovaného úseku genu GroEL s referenčními sekvencemi (viz níže). Prvním krokem jen vytvoření alignmentu analyzované sekvence se všemi níže uvedenými referenčními sekvencemi. Pro ekotypy jedna až tři jsou stanoveny vždy čtyři referenční sekvence, pro ekotyp 4 pouze dvě z důvodu omezeného počtu sekvencí tohoto ekotypu dostupného v databázích. Lze využít libovolného volně dostupného online serveru využívající algoritmus ClustalW (k dispozici např. https://www.expasy.org/genomics/sequence_alignment).

Referenční sekvence ve formátu fasta, uvedené „accession number“ odkazuje na podrobné informace o dané sekvenci v databázi GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a je doplněné o příslušnost k danému ekotypu:

>AF478562_1

```
GTGGAATTTGAAAATCCATACATATTCCTTACTGAAAAGAAGATTAATCTTGTACAAAGCATTCTACCAATCTTAGAAAA
CGTTGCACGGTCTGGAAGACCATTGCTCATCATAGCTGAAGACGTTGAAGGTGAAGCTCTTAGCACGCTTGTACTCAATA
AGCTCCGTGGTGGCCTTCAAGTTGCTGCTGTAAAGGCGCCTGGTTTCGGTGACAGGAGAAAAGACATGCTTGGCGATATT
GCTGTAATAGTAGGCGCTAAGTATGTAGTAAATGACGAGCTTGCTGTTAAGATGGAAGACATCGCTCTAAGCGATCTTGG
TACTGCTAAGAGCGTACGCATCACAAAAGACGCAACTACTATCATAGGTAGTGTGATAGCAGTTCTGAAAGCATAGCTA
GCAGGAC
```

>EU982549_1

```
GTGGAATTTGAAAATCCATACATATTTCTTACTGAAAAGAAGATTAATCTTGTACAAAGCATTCTACCAATCTTAGAAAA
CGTTGCACGGTCTGGAAGACCATTGCTCATCATAGCTGAAGACGTTGAAGGTGAAGCTCTGAGCACGCTTGTACTCAATA
AGCTCCGTGGTGGCCTTCAAGTTGCTGCTGTAAAGGCGCCTGGTTTCGGTGACAGGAGAAAAGACATGCTTGGCGATATT
GCTGTAATAGTAGGCGCTAAGTATGTAGTAAATGACGAGCTTGCTGTTAAGATGGAAGACATCGCTCTAAGCGATCTTGG
TACTGCTAAGAGCGTACGCATCACAAAAGACGCAACTACTATCATAGGTAGTGTGATAGCAGTTCTGAAAGCATAGCTA
GCAGGAC
```

>KJ832480_1

GTGGAATTTGAAAATCCATACATATTCCTTACTGAAAAGAAGATTAATCTTGTACAAAGCATTCTACCAATCTTAGAAAA
CGTTGCACGGTCTGGAAGACCATTGCTCATCATAGCTGAAGACGTTGAAGGTGAAGCTCTGAGCACACTTGTACTCAATA
AGCTCCGTGGTGGCCTTCAAGTTGCTGCTGTAAAGGCGCCTGGTTTTGGTGACAGGAGAAAAGACATGCTTGGCGATATT
GCTGTAATAGTAGGCGCTAAGTATGTAGTAAATGACGAGCTTGTGTTAAGATGGAAGACATCGCTCTAAGCGATCTTGG
TACTGCTAAGAGCGTACGCATCACAAAAGACGCAACTACTATCATAGGCAGTGTGATAGCAGTTCTGAAAGCATAGCTA
GCAGGAC

>KJ832472_1

GTGGAATTTGAAAATCCATACATATTCCTTACTGAAAAGAAGATTAATCTTGTACAAAGCATTCTACCAATCTTAGAAAA
CGTTGCACGGTCTGGAAGACCATTGCTCATCATAGCTGAAGACGTTGAAGGTGAAGCTCTGAGCACGCTTGTACTCAATA
AGCTCCGTGGTGGCCTTCAAGTTGCTGCTGTAAAGGCGCCTGGTTTTGGTGACAGGAGAAAAGACATGCTTGGCGATATT
GCTGTAATAGTAGGCGCTAAGTATGTAGTAAATGACGAGCTTGTGTTAAGATGGAAGATATCGCTCTAAGCGATCTTGG
TACTGCTAAGAGCGTACGCATCACAAAAGACGCAACTACTATCATAGGTAGTGTGATAGCAGTTCTGAAAGCATAGCTA
GCAGGAC

>AF478559_2

GTGGAATTTGAAAATCCATACATATTCCTTACTGAAAAGAAGATTAATCTTGTACAAAGCATTCTACCAATATTAGAAAA
CGTTGCGAGAGCTGGTAGACCATTGCTTATCATAGCTGAAGATGTTGAAGGTGAAGCTCTGAGCACGCTTGTACTCAATA
AGCTCCGTGGTGGCCTTCAAGTTGCTGCTGTAAAGGCGCCTGGTTTCGGTGACAGAAGAAAAGACATGCTAGGCGATATT
GCCGTAATAGTAGGCGCTAAGTATGTAGTAAATGACGAGCTTGTGTTAAGATGGAAGATATCGCTCTAAGCGATCTTGG
TACTGCTAAGAGCGTGCGCATCACAAAAGACGCAACTACTATTATAGGTAGTGTGATAGCAGTTCTGAAAGCATAGCTA
GCAGGAC

>AF478560_2

GTGGAATTTGAAAATCCATACATATTCCTTACTGAAAAGAAGATTAATCTTGTACAAAGCATTCTTACCAATATTAGAAAA
CGTTGCGAGAGCTGGTAGACCATTGCTTATCATAGCTGAAGATGTTGAAGGTGAAGCTCTGAGCACGCTTGTACTCAATA
AGCTCCGTGGTGGCCTTCAAGTTGCTGCTGTAAAGGCGCCTGGTTTCGGTGACAGAAGAAAAGACATGCTAGGCGATATT
GCCGTAATAGTAGGCGCTAAGTATGTAGTAAATGACGAGCTTGTGTTAAGATGGAAGATATCGCTCTAAGCGATCTTGG
TACTGCTAAGAGCGTGCGCATCACAAAAGACGCAACTACTATTATAGGTAGTGTGATAGCAGTTCTGAAAGCATAGCTA
GCAGGAC

>KM215259_2

GTGGAATTTGAAAATCCATACATATTCCTTACTGAAAAGAAGATTAATCTTGTACAAAGCATTCTACCAATATTAGAAAA
CGTTGCGAGAGCTGGTAGACCATTGCTTATCATAGCTGAAGATGTTGAAGGTGAAGCTCTGAGCACGCTTGTACTCAATA
AGCTCCGTGGTGGCCTTCAAGTTGCTGCTGTAAAGGCGCCTGGTTTCGGTGACAGAAGAAAAGACATGCTAGGCGATATT
GCCGTAATAGTAGGCGCTAAGTATGTAGTAAATGACGAGCTTGTGTTAAGATGGAAGATATCGCTCTAAGCGATCTTGG
TACTGCTAAGAGCGTGCGCATCACAAAAGACGCAACTACTATCATAGGTAGTGTGATAGCAGTTCTGAAAGCATAGCTA

GCAGGAC

>JN005744_2

GTGGAATTTGAAAATCCATACATATTCCTTACTGAAAAGAAGATTAATCTTGTACAAAGCATTCTACCAATATTAGAAAA
CGTTGCGAGAGCTGGCAGACCATTGCTCATCATAGCTGAAGATGTTGAAGGTGAAGCTCTGAGCACGCTTGTACTCAATA
AGCTCCGTGGTGGCCTTCAAGTTGCTGCTGTAAAGGCGCCTGGTTTCGGTGACAGAAGAAAAGACATGCTAGGCGATATT
GCCGTAATAGTAGGCGCTAAGTATGTAGTAAATGACGAGCTTGTGTTAAGATGGAAGATATCGCTCTAAGCGATCTTGG
TACTGCTAAGAGCGTGCGCATCACAAAAGACGCAACTACTATCATAGGTAGTGTTGATAGCAGTTCTGAAAGCATAGCTA
GCAGGAC

>KF383235_3

GTGGAATTTGAAAATCCATACATATTCCTCACTGAAAAGAAGATTAATCTTGTACAAAGCATTCTACCAATATTAGAAAA
CGTTGCGAGAGCTGGGAGACCATTGCTCATTATAGCTGAAGACGTTGAAGGTGAAGCTCTGAGTACGCTTGTACTTAATA
AGCTCCGTGGTGGCCTTCAAGTTGCTGCTATAAAGGCACCTGGTTTCGGTGATAGAAGAAAGGACATGCTAGGCGATATT
GCTGTAATAGTGGGCGCTAAGTATGTAGTAAATGATGAGCTTGTGTTAAGATGGAAGATATCGCTCTAAGCGATTTGGG
TACTGCTAAGAGCGTTTCGATTACAAAAGACGCGACTACTATTATCGGTAGTGTTGATAGCAGTTCCGAAAGCATAGCTA
GCAGGAC

>KF031385_3

GTGGAATTTGAAAATCCATACATATTCCTCACTGAAAAGAAGATTAATCTTGTACAAAGCATTCTACCAATATTAGAAAA
CGTTGCGAGAGCTGGGAGACCATTGCTCATTATAGCGGAAGACGTTGAAGGTGAAGCTCTGAGTACGCTTGTACTTAATA
AGCTCCGTGGTGGGCTTCAAGTTGCTGCTGTAAAGGCACCTGGTTTCGGTGATAGAAGAAAGGACATGCTAGGCGATATT
GCTGTAATAGTGGGCGCTAAGTATGTAGTAAATGATGAGCTTGTGTTAAGATGGAAGATATCGCTCTAAGCGATTTGGG
TACTGCTAAGAGCGTTTCGATTACAAAAGACGCGACTACTATTATCGGTAGTGTTGATAGCAGTTCCGAAAGCATAGCTA
GCAGGAC

>KC753762_3

GTGGAATTTGAAAATCCATACATATTCCTCACTGAAAAGAAGATTAATCTTGTGCAAAGCATTCTACCAATATTAGAAAA
CGTTGCGAGAGCTGGGAGACCATTGCTCATTATAGCTGAAGACGTTGAAGGTGAAGCTCTGAGTACGCTTGTACTTAATA
AGCTCCGTGGTGGGCTTCAAGTTGCTGCTGTAAAGGCACCTGGTTTCGGTGATAGAAGGAAGGACATGCTAGGCGATATT
GCTGTAATAGTGGGCGCTAAGTATGTAGTAAATGATGAGCTTGTGTTAAGATGGAAGATATCGCTCTAAGCGATTTAGG
TACTGCTAAGAGCGTTTCGATTACAAAAGACGCGACTACTATTATCGGTAGTGTTGATAGCAGTTCCGAAAGCATAGCTA
GCAGGAC

>HQ630614_3

GTGGAATTTGAAAATCCATACATATTCCTCACTGAAAAGAAGATTAATCTTGTGCAAAGCATTCTACCAATATTAGAAAA
CGTTGCGAGGTCTGGGAGACCATTACTCATTATAGCTGAAGATGTTGAAGGTGAAGCTCTGAGTACGCTTGTACTTAATA
AGCTCCGTGGTGGGCTTCAAGTTGCTGCTGTAAAGGCACCTGGTTTCGGTGATAGAAGAAAGGACATGCTAGGCGATATT

GCTGTAATAGTGGGCGCTAAGTATGTAGTAAATGATGAGCTTGCTGTTAAGATGGAAGATATCGCTCTAAGCGATTTGGG
TACTGCTAAGAGCGTTTCGCATTACAAAAGACGCAACTACAATTATCGGTAGTGTGATAGCAGTTCCGAAAGCATAGCTA
GCAGGAC

>JX082323_4

GTGGAATTTGAAAATCCATACATATTCCTTACTGAAAAGAAGATTAATCTTGTACAGAGCATTTTACCAATATTAGAAAA
CGTTGCGAGAGCTGGTAGGCCATTGCTCATTATAGCTGAAGATGTTGAAGGTGAGGCTCTGAGCACACTTGTTCTAAATA
AGCTACGTGGTGGGCTTCAAGTTGCTGCTGTGAAGGCGCCTGGTTTCGGTGATAGAAGGAAAGACATGCTAGGCGATATT
GCTGTAATAGTAGGCGCTAAGTATGTAGTAAATGATGAGCTTGCTGTTAAGATGGAAGATATCGCTCTAAGCGATTTGGG
TACTGCCAAGAGCGTGCGCATCACTAAAGACGCAACAACACTATCATAGGTAGTGTGATAGCAGTTCTGAGAGCATAGCTA
GCAGGAC

>KF031393_4

GTGGAATTTGAAAATCCATACATATTCCTTACTGAAAAGAAGATTAATCTTGTACAGAGCATTTTACCAATATTAGAAAA
CGTTGCGAGAGCTGGTAGGCCATTGCTCATTATAGCTGAAGATGTTGAAGGTGAGGCTCTGAGCACACTTGTTCTAAATA
AGCTACGTGGTGGGCTTCAAGTTGCTGCTGTGAAGGCGCCTGGTTTCGGTGATAGAAGGAAAGACATGCTAGGCGATATT
GCTGTAATAGTAGGCGCTAAGTATGTAGTAAATGATGAGCTTGCTGTTAAGATGGAAGATATCGCTCTAAGCGATTTGGG
TACTGCCAAGAGCGTGCGCATCACTAAAGACGCAACAACACTATCATAGGTAGTGTGATAGCAGTTCTGAGAGCATAGCTA
GCAGGAC

Ze získaného alignmentu určíme evoluční vzdálenost studovaného izolátu od všech referenčních sekvencí. Tzv. p-distance je podíl počtu rozdílných nukleotidů (n_d) mezi dvěma sekvencemi a celkového počtu porovnávaných nukleotidů (n); tedy $p = (n_d/n) \cdot 100$ udává procentuální odlišnost svou sekvencí. Kromě manuálního výpočtu lze využít volně dostupných softwarů, např. MEGA ("Distance" - "Compute Pairwise" - model "Nucleotide" vybrat "jukes-kantor" – "Compute").

Izolát považujeme za spolehlivě přiřazený k určitému ekotypu, pokud je jeho příbuznost (tedy $100 - p$) alespoň ke třem (dvěma u ekotypu 4) referenčním sekvencím vyšší než 98%.

	AF478562_1	EU982549_1	KJ832480_1	KJ832472_1	AF478559_2	AF478560_2	KM215259_2	JN005744_2	JX082323_4	KF031393_4	KF383235_3	KF031385_3	KC753762_3	HQ630614_3
AF478562_1		99,51	99,02	99,26	96,07	95,82	96,31	96,56	92,14	92,14	92,87	92,87	92,63	92,87
EU982549_1	99,51		99,02	99,26	96,07	95,82	96,31	96,56	92,14	92,14	92,87	92,87	92,63	92,87
KJ832480_1	99,02	99,02		99,26	95,58	95,33	95,82	96,07	92,14	92,14	92,38	92,38	92,14	92,38
KJ832472_1	99,26	99,26	99,26		96,31	96,07	96,56	96,81	92,38	92,38	93,12	93,12	92,87	93,12
AF478559_2	96,07	96,07	95,58	96,31		99,75	99,75	98,77	94,59	94,59	94,84	94,84	94,59	94,35
AF478560_2	95,82	95,82	95,33	96,07	99,75		99,51	99,02	94,84	94,84	94,59	94,59	94,35	94,1
KM215259_2	96,31	96,31	95,82	96,56	99,75	99,51		99,02	94,84	94,84	94,59	94,59	94,35	94,1
JN005744_2	96,56	96,56	96,07	96,81	98,77	99,02	99,02		94,84	94,84	94,35	94,35	94,1	93,86
JX082323_4	92,14	92,14	92,14	92,38	94,59	94,84	94,84	94,84		100	93,12	93,12	93,12	92,63
KF031393_4	92,14	92,14	92,14	92,38	94,59	94,84	94,84	94,84	100		93,12	93,12	93,12	92,63
KF383235_3	92,87	92,87	92,38	93,12	94,84	94,59	94,59	94,35	93,12	93,12		99,51	99,02	98,03
KF031385_3	92,87	92,87	92,38	93,12	94,84	94,59	94,59	94,35	93,12	93,12	99,51		99,02	98,03
KC753762_3	92,63	92,63	92,14	92,87	94,59	94,35	94,35	94,1	93,12	93,12	99,02	99,02		98,03
HQ630614_3	92,87	92,87	92,38	93,12	94,35	94,1	94,1	93,86	92,63	92,63	98,03	98,03	98,03	

Srovnání novosti postupů

V současné době není v ČR k dispozici dostupná metodika zabývající se detekcí *Anaplasma* spp. průkazem přítomnosti DNA umožňující zařazení do jednotlivých ekotypů. Dostupné diagnostické testy

jsou založeny na principu nepřímé imunofluorescence detekující IgG/IgM protilátky. V první fázi infekce (první týden akutní fáze onemocnění) nejsou protilátky detekovatelné, test je nutné opakovat v odstupu dvou až čtyř týdnů. Z přímých testů jsou dostupné sady pro real-time PCR (qPCR), umožňující rychlou a sensitivní diagnostiku od prvních příznaků akutní infekce, nicméně neumožňují rozlišení genetických variant s rozdílným epidemiologickým a zoonotickým potenciálem.

Zásadní novost postupu je v sestavení referenčních setů sekvencí a jejich využití pro užší specifikaci jednotlivých izolátů na základě parciální sekvence genu GroEL. Dosavadní molekulárně biologické metody cílí na velmi krátké fragmenty (<100 bp) genů 16S nebo msp2 umožňující pouze detekci pozitivních vzorků. Předložená metodika byla ověřena na širokém spektru hostitelských druhů i vektorů v ČR.

Ekonomické aspekty

Zavedení metodiky v diagnostické laboratoři s již zavedenou molekulární diagnostikou (PCR) nevyžaduje investice na implementaci výše popsanych postupů metodiky „Molekulární detekce *Anaplasma phagocytophilum* ze vzorků obratlovců a klíštěcích vektorů“.

Základní finanční náročnost materiálu pro zpracování jednoho vzorku (na základě cen platných v roce 2020) byla stanovena následovně:

	Cena v Kč
Izolace DNA	100,-
PCR (mastermix)	10,-
Izolace amplikonu z gelu*	20,-
Sekvenace*	180,-
Spotřební materiál (plastik, agaróza aj.)	50,-
Celkem za 1 vzorek: pozitivní*/negativní	360,-/160,-

Ekonomický přínos pro uživatele metodiky závisí na vybavení daného pracoviště, již zavedených postupech, personální kapacitě a v neposlední řadě na stanovené ceně vyšetření vzorků. Významnou roli bude hrát dostupnost a využití automatizace (izolátory DNA, pipetovací roboty apod.) a počet vzorků v jednotlivých krocích zpracovávaných paralelně.

Seznam použité související literatury

- Alberti, A., Zobba, R., Chessa, B., Addis, M. F., Sparagano, O., Parpaglia, M. L. P., Cubeddu, T., Pintori, G. and Pittau, M.** (2005). Equine and canine *Anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 6418–6422. doi: 10.1128/AEM.71.10.6418-6422.2005.
- Bakken, J. S. and Dumler, J. S.** (2015). Human Granulocytic Anaplasmosis. *Infect Dis Clin North Am.* **29**, 341–355. doi: 10.1016/j.idc.2015.02.007.
- Bakken, J. S., Krueth, J. K., Lund, T., Malkovitch, D., Asanovich, K. and Dumler, J. S.** (1996). Exposure to deer blood may be a cause of human granulocytic ehrlichiosis. *Clinical Infectious Diseases* **23**, 198. doi: 10.1093/clinids/23.1.198.
- Battilani, M., De Arcangeli, S., Balboni, A. and Dondi, F.** (2017). Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. *Infection, Genetics and Evolution* **49**, 195–211. doi: 10.1016/j.meegid.2017.01.021.

- Dugat, T., Lagrée, A. C., Maillard, R., Boulouis, H. J. and Haddad, N.** (2015). Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: Current situation and future perspectives. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **5**, 1–18. doi: 10.3389/fcimb.2015.00061.
- Fine, A. B., Sweeney, J. D., Nixon, C. P. and Knoll, B. M.** (2016). Transfusion-transmitted anaplasmosis from a leukoreduced platelet pool. *Transfusion* **56**, 699–704. doi: 10.1111/trf.13392.
- Gordon, W. S., Brownlee, A. and Wilson, D. R.** (1940). Studies in louping-ill, tick-borne fever and scrapie. Proceedings: 3rd International Congress of Microbiology, (New York, NY), pp. 362–363.
- Huhn, C., Winter, C., Wolfspurger, T., Wüppenhorst, N., Strašek Smrdel, K., Skuballa, J., Pfäffle, M., Petney, T., Silaghi, C., Dyachenko, V., Pantchev, N., Straubinger, R. K., Schaarschmidt-Kiener, D., Ganter, M., Aardema, M. L. and Von Loewenich, F. D.** (2014). Analysis of the population structure of *Anaplasma phagocytophilum* using multilocus sequence typing. *PLoS ONE* **9**. doi: 10.1371/journal.pone.0093725.
- Jaarsma, R. I., Sprong, H., Takumi, K., Kazimirova, M., Silaghi, C., Mysterud, A., Rudolf, I., Beck, R., Földvári, G., Tomassone, L., Groenevelt, M., Everts, R. R., Rijks, J. M., Ecke, F., Hörnfeldt, B., Modrý, D., Majerová, K., Votýpka, J. and Estrada-Peña, A.** (2019). *Anaplasma phagocytophilum* evolves in geographical and biotic niches of vertebrates and ticks. *Parasites and Vectors* **12**, 1–17. doi: 10.1186/s13071-019-3583-8.
- Jahfari, S., Coipan, E. C., Fonville, M., Van Leeuwen, A. D., Hengeveld, P., Heylen, D., Heyman, P., Van Maanen, C., Butler, C. M., Földvári, G., Szekeres, S., Van Duijvendijk, G., Tack, W., Rijks, J. M., Van Der Giessen, J., Takken, W., Van Wieren, S. E., Takumi, K. and Sprong, H.** (2014). Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. *Parasites and Vectors* **7**, 1–11. doi: 10.1186/1756-3305-7-365.
- Jahn, P., Zeman, P., Bezdekova, B. and Praskova, I.** (2010). Equine granulocytic anaplasmosis in the Czech Republic. *Veterinary Record* **166**, 646–649. doi: 10.1136/vr.4852.
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y. and Kim, Y. H.** (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments* 1–5. doi: 10.3791/3923.
- Praskova, I., Bezdekova, B., Zeman, P. and Jahn, P.** (2011). Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in horses in the Czech Republic. *Ticks and Tick-borne Diseases* **2**, 111–115. doi: 10.1016/j.ttbdis.2011.01.002.
- Sainz, Á., Roura, X., Miró, G., Estrada-Peña, A., Kohn, B., Harrus, S. and Solano-Gallego, L.** (2015). Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites and Vectors* **8**, 1–20. doi: 10.1186/s13071-015-0649-0.
- Silaghi, C., Santos, A. S., Gomes, J., Christova, I., Matei, I. A., Walder, G., Domingos, A., Bell-Sakyi, L., Sprong, H., Von Loewenich, F. D., Oteo, J. A., De La Fuente, J. and Dumler, J. S.** (2017). Guidelines for the Direct Detection of *Anaplasma* spp. in Diagnosis and Epidemiological Studies. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **17**, 12–22. doi: 10.1089/vbz.2016.1960.
- Stuen, S., Granquist, E. G. and Silaghi, C.** (2013). *Anaplasma phagocytophilum*-a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **4**, 1–33. doi: 10.3389/fcimb.2013.00031.
- Woldehiwet, Z.** (2006). *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants in Europe. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1078**, 446–460. doi: 10.1196/annals.1374.084.
- Woldehiwet, Z.** (2010). The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Veterinary Parasitology* **167**, 108–122. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.09.013.

Seznam publikací předcházející metodice

Hrazdilová, K., Lesiczka, P. L., Bardoň, J., Vyroubalvá, Š., Šimek, B., Zurek, L., Modrý, D. (2020) Wild boar as a potential reservoir of zoonotic tick-borne pathogens. *Ticks and Tick-borne Diseases*. Accepted to publication

Dedikace

Vypracování metodiky bylo financováno projektem QK1920258 „Šíření klíšťat a klíšťaty přenášených onemocnění: nová a opomíjená rizika pro domácí a hospodářská zvířata a člověka“ v rámci Programu aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství na období 2017-2025, ZEMĚ.