

Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego
Polskiej Akademii Nauk

Rozprawa doktorska

mgr Anna Weronika Myczka

**Prewalencja i genotypowanie szczepów *Anaplasma
phagocytophilum* wśród zwierząt kopytnych w Polsce**

Promotor:

dr hab. Zdzisław Laskowski, prof. IP PAN

Promotor pomocniczy:

dr Witold Jeżewski

Warszawa, 2022

Podziękowania

Chciałabym podziękować wszystkim osobom zaangażowanym w tworzenie rozprawy doktorskiej i kształtowaniu mnie jako naukowca.

Przede wszystkim dziękuję panu Promotorowi – **dr hab. Zdzisławowi Laskowskiemu**, za możliwość obrania własnej ścieżki badawczej i wspieranie tej drogi mimo wzlotów i upadków. Dziękuję również **dr Witoldowi Jeżewskiemu** za dobre rady i życzliwość w trakcie mojej pracy.

Dziękuję osobom zaangażowanym w zbiór materiału biologicznego, w szczególności: **Katarzynie Filip-Hutsch, Żanecie Steiner-Bogdaszewskiej** oraz **Członkom Koła Łowieckiego nr 9 „Knieja” z Warszawy**.

Pragnę podziękować koleżankom i kolegom, a także Pracownikom Instytutu Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN, którzy wspierali mnie podczas pracy badawczej.

Pracę doktorską dedykuję mamom:

Teresie, Mariannie i Helenie

When You believe, I can really fly

Spis treści

Wykaz skrótów.....	6
Cele pracy i hipotezy badawcze.....	7
Cykl publikacji będący podstawą rozprawy doktorskiej	8
Streszczenie	9
Summary	11
Wstęp.....	13
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	13
Występowanie oraz żywiciele	17
Wektory	21
HGA i projekt „One Health”	21
Materiały	24
Metody	27
Izolacja DNA.....	27
Reakcja Łańcuchowa Polimerazy (Polymerase Chain Reaction – PCR)	27
Analiza sekwencji	30
Analiza statystyczna.....	30
Publikacja numer 1.....	32
Oświadczenia współautorów publikacji	37
Publikacja numer 2.....	39
Oświadczenia współautorów publikacji	51
Publikacja numer 3.....	56
Oświadczenia współautorów publikacji	68
Najważniejsze wyniki i wnioski	73
Publikacja numer 1.....	73
Publikacja numer 2.....	75
Publikacja numer 3.....	77
Genotypowanie szczepów <i>Anaplasma phagocytophilum</i> izolowanych od saren europejskich (<i>Capreolus capreolus</i>) i jeleni szlachetnych (<i>Cervus elaphus</i>)	79

Wyniki	79
Dyskusja	83
Podsumowanie	88
Wnioski	90
Piśmiennictwo	91

Wykaz skrótów

ankA – ankyrin-repeat protein gene

ASF – African Swine Fever (Afrykański Pomór Świń)

DC – dense-core

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

GA – Granulocytic Anaplasmosis (Anaplazmoza Granulocytarna)

groEL – heat-shock operon gene

HGA – Human Granulocytic Anaplasmosis (Ludzka Anaplazmoza Granulocytarna)

Mb – megabase (mega par zasad)

msp – major surface protein gene

ORFs – Open Reading Frame's (Otwarte Ramki Odczytu)

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reakcja Łańcuchowa Polimerazy)

pz – par zasad

RC – reticulate

spp. – species (gatunki w liczbie mnogiej)

Cele pracy i hipotezy badawcze

Cele:

- Określenie prevalencji bakterii *Anaplasma phagocytophilum* wśród dziko żyjących i hodowlanych gatunków zwierząt kopytnych: jelen szlachetny (*Cervus elaphus*), sarna europejska (*Capreolus capreolus*), daniel zwyczajny (*Dama dama*), dzik euroazjatycki (*Sus scrofa*), łoś euroazjatycki (*Alces alces*) i żubr europejski (*Bison bonasus*) w Polsce.
- Porównanie poziomu prevalencji między zwierzętami dzikimi, a hodowlanymi wśród dwóch gatunków: jelen szlachetny i daniel zwyczajny.
- Charakterystyka molekularna izolowanych szczepów *A. phagocytophilum* z zastosowaniem trzech markerów genetycznych: 16S rDNA, *groEL* i *ankA*.
- Porównanie tkanek obwodowych pochodzących ze śledziony i wątroby pod względem użyteczności tych organów jako odpowiedniego źródła materiału biologicznego do badań nad prevalencją *A. phagocytophilum* wśród zwierząt kopytnych w Polsce.

Hipotezy badawcze:

- *Anaplasma phagocytophilum* jest powszechnie występującym pasożytem bakteryjnym wśród zwierząt kopytnych w Polsce.
- Zwierzęta kopytne występujące w Polsce, są nosicielami i naturalnymi rezerwuarami, potencjalnie chorobotwórczych dla ludzi szczepów *A. phagocytophilum*.
- Dziko żyjące zwierzęta łowne częściej są nosicielami *A. phagocytophilum* niż zwierzęta hodowlane.
- Śledziona, jako tkanka obwodowa, jest bardziej wydajnym materiałem biologicznym do detekcji *A. phagocytophilum*, niż wątroba.

Cykl publikacji będący podstawą rozprawy doktorskiej

1. **Myczka A.W.**, Szewczyk T., Laskowski Z. The Occurrence of Zoonotic *Anaplasma phagocytophilum* Strains, in the Spleen and Liver of Wild Boars from North-West and Central Parts of Poland. *Acta Parasitol.* 2021 Sep;66(3):1082-1085. doi: 10.1007/s11686-021-00368-6.
Wskaźnik Impact Factor: 1.440; Punkty MEiN: 40
2. **Myczka A.W.**, Steiner-Bogdaszewska Ż., Filip-Hutsch K., Ołoś G., Czopowicz M., Laskowski Z. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Wild and Farmed Cervids in Poland. *Pathogens.* 2021 Sep 14;10(9):1190. doi: 10.3390/pathogens10091190.
Wskaźnik Impact Factor: 4.066; Punkty MEiN: 100
3. **Myczka A.W.**, Kaczor S., Filip-Hutsch K., Czopowicz M., Plis-Kuprianowicz E., Laskowski Z. Prevalence and Genotyping of *Anaplasma phagocytophilum* Strains from Wild Animals, European Bison (*Bison bonasus*) and Eurasian Moose (*Alces alces*) in Poland. *Animals.* 2022; 12(9):1222. doi.org/10.3390/ani12091222.
Wskaźnik Impact Factor: 2.942; Punkty MEiN: 100

Streszczenie

Anaplasma phagocytophilum to powszechnie występujący wewnątrzkomórkowy pasożyt bakteryjny z rzędu Rickettsiales. Ta Gram – ujemna bakteria, bytująca głównie w granulocytach obojętnochłonnych wywołuje stany patologiczne u ludzi i zwierząt. Te mikroorganizmy mogą być przenoszone między żywicielami przez transmisję wektorową, za którą głównie odpowiadają kleszcze z rodzaju *Ixodes*. Stałą obecność i krążenie *A. phagocytophilum* w środowisku naturalnym, zapewniają naturalne rezerwuary tych bakterii, do których należą m.in. dziko żyjące zwierzęta kopytne.

Badania przedstawione w cyklu trzech publikacji wchodzących w skład niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczą określenia prewalencji i genotypowania *A. phagocytophilum* wśród populacji dzikich kopytnych: jeleni szlachetnych (*Cervus elaphus*), saren europejskich (*Capreolus capreolus*), danieli zwyczajnych (*Dama dama*), dzików euroazjatyckich (*Sus scrofa*), łosi euroazjatyckich (*Alces alces*) i żubrów europejskich (*Bison bonasus*); oraz zwierząt fermowych: jeleni szlachetnych i danieli zwyczajnych.

Pierwsza publikacja, otwierająca cykl prac, dotyczyła wykrywania bakterii *Anaplasma phagocytophilum* u dzików euroazjatyckich. Wykazano obecność bakterii u 20% badanych osobników. Genotypowanie oraz analiza filogenetyczna trzech markerów genetycznych: 16S rDNA, *groEL* i *ankA* pozwoliła na stwierdzenie, że *A. phagocytophilum* izolowane od dzików euroazjatyckich są potencjalnie chorobotwórcze dla ludzi i należą do ekotypu i klastra I. **W drugim artykule** opisano występowanie *A. phagocytophilum* wśród jeleniowatych. U saren i jeleni prewalencja wyniosła ponad 50%, u łosi było to 18%, a u danieli zwyczajnych nie wykryto obecności bakterii z rodzaju *Anaplasma*. W badanej grupie fermowych jeleni i danieli tylko u pierwszego gatunku wykryto obecność *A. phagocytophilum*. Opisano 3 haplotypy fragmentu 16S rDNA, dwa z nich notowano już wcześniej, a trzeci został opisany po raz pierwszy. Ostatnia z cyklu, **trzecia publikacja**, dotyczyła genotypowania i prewalencji szczepów *A. phagocytophilum* izolowanych od dwóch gatunków największych dzikich przeżuwaczy, to jest żubra europejskiego i łosia euroazjatyckiego. Prewalencja wśród żubrów wyniosła 24%, a przebadanie dodatkowych dwóch osobników łosi euroazjatyckich, uzupełniła dane z publikacji

drugiej i prewalencja u tego gatunku wyniosła ponad 30%. Analiza amplifikowanych markerów genetycznych z izolatów *A. phagocytophilum* od żubrów europejskich scharakteryzowała te szczepy jako należące do ekotypu I i klastra IV, a izolaty od łośi euroazjatyckich do dwóch ekotypów – I i II i do klastra I. Wszystkie trzy markery genetyczne: *groEL*, *ankA* i 16S rDNA, zarówno od łośi jak i żubrów, są identyczne lub grupują się ze szczepami HGA, oznacza to, że wykryte szczepy *Anaplasma phagocytophilum* mogą być potencjalnie chorobotwórcze dla ludzi.

Aby kompleksowo opisać problematykę podjętą w rozprawie, dołączono niepublikowane wyniki z genotypowania szczepów *A. phagocytophilum* od jeleni szlachetnych i saren europejskich. Genotypowanie szczepów od jeleni wykazało, że obecne u tych gospodarzy bakterie *A. phagocytophilum* należą do ekotypu i klastra I. Większą różnorodnością wykazały izolaty od saren europejskich, które przypisano do ekotypu I i II i do klastra I i II.

Podsumowując, przebadano 305 osobników z 6 gatunków zwierząt kopytnych. Wszystkie bakterie wykryte, metodami molekularnymi, należały do jednego gatunku bakterii – *Anaplasma phagocytophilum*. Analiza sekwencji genu 16S rDNA oraz analiza filogenetyczna genów *ankA* i *groEL*, pozwoliła na potwierdzenie, że zwierzęta kopytne w Polsce są naturalnymi rezerwuarami *A. phagocytophilum* oraz że są wśród nich szczepy potencjalnie zoonotyczne.

Summary

Anaplasma phagocytophilum is a common intracellular bacterial parasite of the order Rickettsiales. This Gram-negative bacterium, demonstrating tropism to neutrophils causes pathological conditions in humans and animals. These microorganisms can be transferred between hosts by vector transmission by ticks from *Ixodes* genus. The constant presence and circulation of *A. phagocytophilum* in the natural environment is provide by natural reservoirs of these bacteria, which include e.g. wild ungulates.

Studies presented in three publications included in this dissertation concern the determination of the prevalence and genotyping of *A. phagocytophilum* strains among Polish populations of wild ungulates: red deer (*Cervus elaphus*), roe deer (*Capreolus capreolus*), fallow deer (*Dama dama*), wild boar (*Sus scrofa*), Eurasian moose (*Alces alces*) and European bison (*Bison bonasus*); and in farm animals: red deer and fallow deer.

The first publication, opening the series of works, concerned the detection of *Anaplasma phagocytophilum* in wild boars. The presence of bacteria was found in 20% of the tested animals. Genotyping and phylogenetic analysis of three partial genetic markers: 16S rDNA, *groEL* and *ankA* allowed to prove that *A. phagocytophilum* isolated from wild boars are potentially pathogenic for humans, belong to ecotype and cluster I. **The second article** describes the presence of *A. phagocytophilum* in cervids. In roe deer and red deer, the prevalence was over 50%, in moose it was 18%, and in fallow deer no bacteria of the genus *Anaplasma* were detected. In the studied group of farmed red and fallow deer, the presence of *A. phagocytophilum* was detected only in the first species. Additionally, 3 haplotypes of the 16S rDNA partial gene has been described, two of them has been previously noted, and the third one is new. The last of the series, **the third publication**, concerned the genotyping and prevalence of *A. phagocytophilum* strains isolated from two species of the largest wild ruminants: European bison and Eurasian moose. Prevalence in bison was 24%, and the examination of two additional moose specimens supplemented the data from the second publication and the prevalence in this species was over 30%. Analysis of amplified genetic markers from *A. phagocytophilum* isolates from European bison characterized these strains as ecotype I and cluster IV, isolates from Eurasian moose to two ecotypes - I and II and to

cluster I. All three genetic markers: *groEL*, *ankA* and 16S rDNA, from moose and bison, are identical or grouped with HGA strains, means that detected *Anaplasma phagocytophilum* strains may be potentially pathogenic to humans.

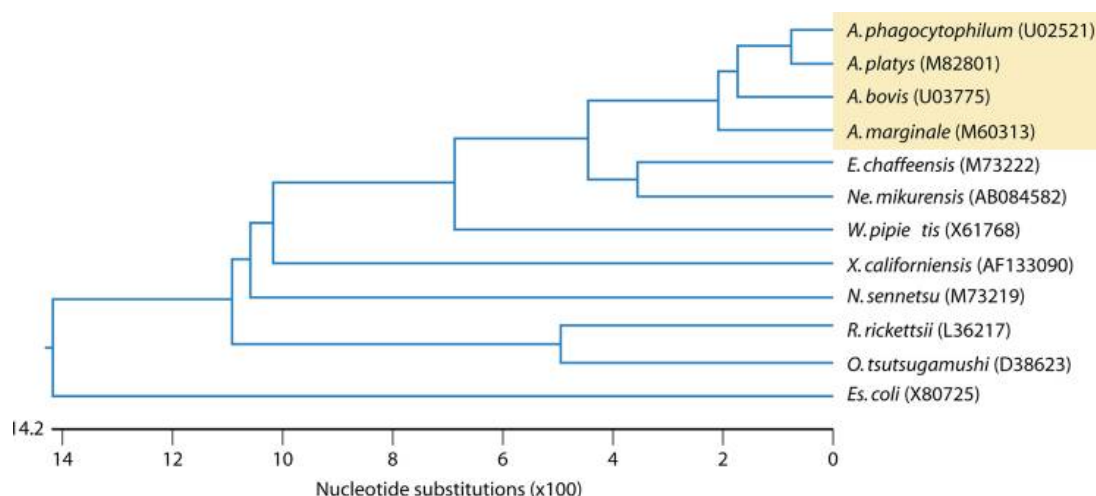
To comprehensively describe the issues dispute in the dissertation, unpublished results of genotyping of *A. phagocytophilum* strains from red deer and roe deer are attached. Genotyping of a red deer strains showed that the *A. phagocytophilum* bacteria present in these hosts belong to the ecotype and cluster I. More various were strains isolated from roe deer individuals. These strains were assigned to ecotypes I and II and to clusters I and II.

In summary, 305 individuals of ungulates from 6 species were examined. All bacteria detected by molecular methods belonged to one species – *Anaplasma phagocytophilum*. Sequence analysis of the partial 16S rDNA gene and phylogenetic analysis of the *ankA* and *groEL* partial genes allowed to confirm that ungulates in Poland are natural reservoirs of *A. phagocytophilum* and there are strains potentially zoonotic for humans among them.

Wstęp

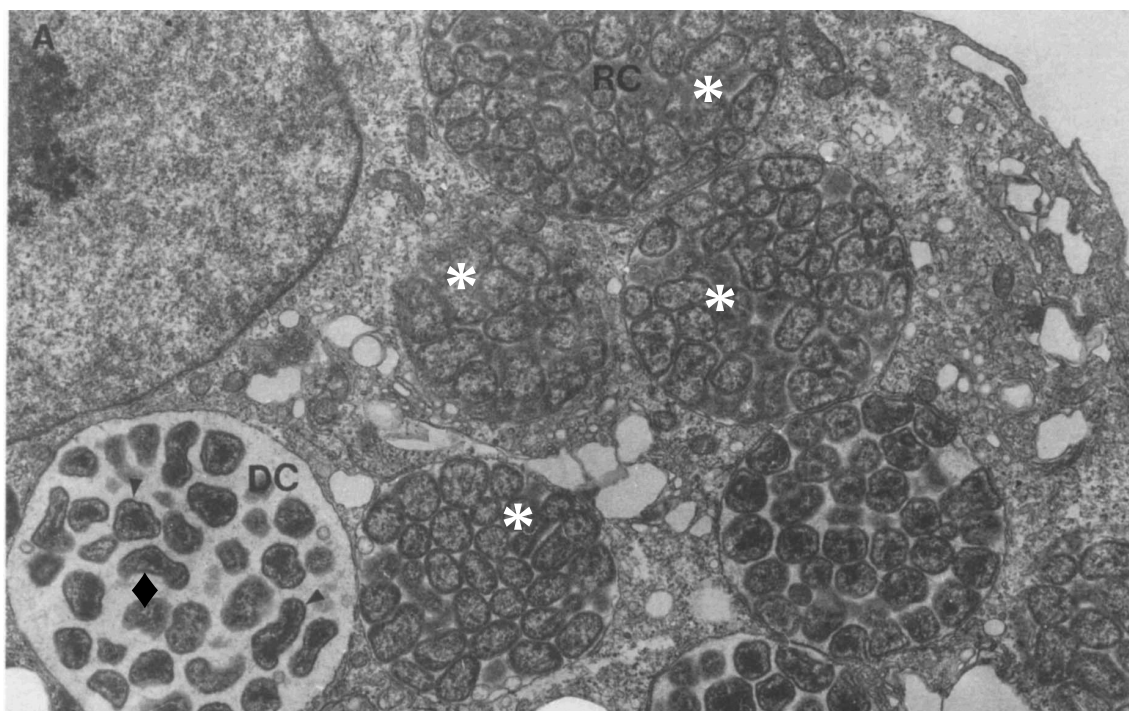
Anaplasma phagocytophilum

Anaplasma spp. to Gram-ujemne wewnątrzkomórkowe bakterie o charakterystycznej, podwójnej błonie komórkowej. Należą one do klasy Alphaproteobacteria, rzędu Rickettsiales i rodziny Anaplasmataceae (Dumler i wsp., 2001; Rikihisa, 2011) (Ryc. 1). Do rodziny Anaplasmataceae należy pięć szczegółowo opisanych rodzajów bakterii: *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia*, *Aegyptianella* i *Wolbachia* oraz trzy gatunki niedawno zaproponowane jako prawdopodobnie nowe: *Candidatus* *Neoehrlichia*, *Candidatus* *Cryptoplasma* oraz *Candidatus* *Xenohalotis* (Rikihisa, 2011; Eschoo i wsp., 2015). W rodzaju *Anaplasma* wyróżnia się 10 gatunków bakterii: *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *A. capra*, *A. mesaeterum*, *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *A. bovis*, *A. caudatum*, *A. odocoilei* (Approved Lists of Bacterial Names, 1989; Dumler i wsp., 2001; Tate i wsp., 2013; Yang i wsp., 2017). Pierwsze doniesienie o *A. phagocytophilum* zostało opublikowane w latach 30 XX wieku i dotyczyło zachorowań owiec hodowlanych (*Ovis aries*) w Szkocji, których przyczyną miała być bakteria *Cytoecetes phagocytophila* (Gordon i wsp., 1932). U ludzi, bakterię *A. phagocytophilum* po raz pierwszy opisano w 1994 roku w USA jako *Ehrlichia* sp. (Chen i wsp., 1994). Do czasu ujednolicenia nazewnictwa bakterie te były nazywane m.in.: *Cytoecetes phagocytophila*, *Ehrlichia phagocytophila* czy *E. equi* (Severo i wsp., 2012). Nowa klasyfikacja opisana w 2001 roku, zaliczyła wszystkie te bakterie do jednego gatunku – *A. phagocytophilum*, na podstawie badań genetycznych i analizie filogenetycznej genu 16S rDNA (Dumler i wsp., 2001).



Rycina 1. Drzewo filogenetyczne rodziny Rickettsiales z wyróżnionym rodzajem *Anaplasma* według Rikihisa, 2011

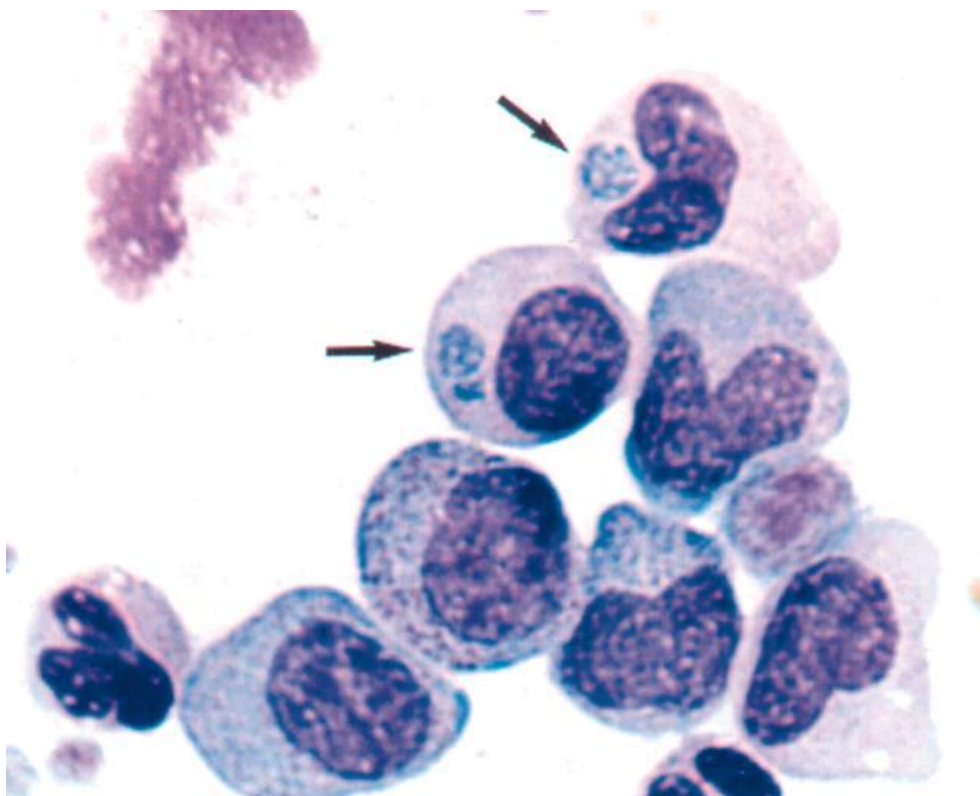
Anaplasma phagocytophilum to gatunek bakterii charakteryzujący się dużym pleomorfizmem, ich kształt można przyrównać do nieregularnego ziarniaka (Rikihisa i wsp., 1997; Popov i wsp., 1998). W rzędzie bakterii Rickettsiales tylko rodzina Anaplasmataceae, w tym *A. phagocytophilum*, rozwinęła bardzo charakterystyczną, dla tej rodziny wewnątrzkomórkowych bakterii, podwójną membranę. Zewnętrzna błona, z powodu swojego nieregularnego kształtu tworzy wokół bakterii przestrzeń peryplazmatyczną, przez co nie można określić dokładnego i jednoznacznego wyglądu bakterii *A. phagocytophilum* (Rikihisa, 2011). Rozmiar waha się od 0,4 μm do 1,3 μm , jednak notowano również bakterie osiągające do 2 μm średnicy. Wyróżnia się dwa morfotypy moruli bakterii: RC (reticulate) i DC (dense-core). RC to forma o siateczkowatej budowie, większa niż DC, którą wyróżnia duże zagęszczenie protoplazmy wewnątrz komórki (Popov i wsp., 1998) (Ryc. 2).



Rycina 2. Ultrastruktura bakterii *Anaplasma* sp. w histiocycie psa. Na zdjęciu zaznaczono dwie formy budowy morfologicznej. * - forma RC, ◆ - forma DC (według Popov i wsp., 1998)

W przeciwieństwie do innych bakterii z rzędu Rickettsiales, które replikują się w cytoplazmie gospodarza, bakterie z rodzaju *Anaplasma* wykształciły zdolność do replikacji i podziału w błonie komórki układu odpornościowego. W przypadku bakterii *A. phagocytophilum* są to granulocyty obojętnochłonne – neutrofile, co do których bakterie wykazują bardzo silny tropizm (Ryc. 3) (Bayard-McNeeley i wsp., 2004). Fizjologiczny aspekt bytowania *A. phagocytophilum* w komórkach krwi, asygnuje krew

jako nominalny materiał biologiczny do badań diagnostycznych tych bakterii. Innym, bardzo użytecznym materiałem do tego typu analiz jest śledziona. Ten swoisty filtr krwi zatrzymuje wszystkie komórki wykazujące patologiczne zmiany, m.in. granulocyty obojętnochłonne zainfekowane bakteriami *A. phagocytophilum*, dlatego w śledzionie koncentracja tych bakterii może być wyższa niż w innych organach czy tkankach. Genom, najlepiej poznanego ludzkiego szczepu, *A. phagocytophilum* ma wielkość 1,47 Mb (1,471,282 pz) z czego ponad 12% to geny powtórzone (Rikihisa i wsp., 1997) i zawiera ponad 1300 otwartych ramek odczytu (ORFs – **O**pen **R**eadin**G** **F**rame's) (Dunning Hotopp i wsp., 2006). W porównaniu do bakterii *Escherichia coli*, genom *A. phagocytophilum*, jest dużo mniejszy i stanowi około 1/4 genomu *E. coli* (Dunning Hotopp i wsp., 2006). Również zawartość par G-C w genomie *A. phagocytophilum* (~ 41%) jest niższa niż u modelowych bakterii *E. coli* (~ 50%), ale w obrębie rzędu Rickettsiales notuje się niższe wartości par G-C na przykład genom *Rickettsia prowazekii* zawiera tych par niecałe 30% (Andersson i wsp., 1998).



Rycina 3. Zdjęcie rozmazu krwi ludzkiej barwionej metodą Wrighta. Na zdjęciu widać granulocyty obojętnochłonne wewnątrz których znajdują się inkluzje komórek *A. phagocytophilum* (zaznaczone strzałkami) (Bayard-McNeeley i wsp., 2004)

W badaniach molekularnych do analizy *A. phagocytophilum* najczęściej wykorzystywanymi markerami genetycznymi są:

- ***msp2*** (Kazimírová i wsp., 2018; Jaarsma i wsp., 2019; Stigum i wsp., 2019; Adamska, 2020; Grassi i wsp., 2021),
- ***msp4*** (de la Fuente i wsp., 2005; Silaghi i wsp., 2011; Blaňarová i wsp., 2014; Hornok i wsp., 2018),
- **16S rDNA** (Dumler i wsp., 2001; Hapunik i wsp., 2011; Masuzawa i wsp., 2011; Veronesi i wsp., 2011; Adaszek i wsp., 2012; Stuenkel i wsp., 2013; Blaňarová i wsp., 2014; Víchová i wsp., 2014; Matsuo i wsp., 2017; Silaghi i wsp., 2020; Cafiso i wsp., 2021),
- ***groEL*** (Petrovec i wsp., 2003; Alberti i wsp., 2005; Jahfari i wsp., 2014; Kazimírová i wsp., 2018; Remesar i wsp., 2020),
- ***ankA*** (Michalik i wsp., 2009; Scharf i wsp., 2011; Huhn i wsp., 2014; Jouglin i wsp., 2017).

Gen *msp2*, koduje białko powierzchniowe p44 (Rikihsia, 2011). Jest on najczęściej wykorzystywany do detekcji molekularnej tych bakterii, ponieważ można amplifikować jego krótki fragment (77 pz) (Kazimírová i wsp., 2018; Jaarsma i wsp., 2019; Stigum i wsp., 2019). Dodatkowo jest to gen, który w genomie *A. phagocytophilum* powtarza się ponad 100 razy, co zwiększa prawdopodobieństwo wykrycia DNA bakterii w badanym materiale (Dunning Hotopp i wsp., 2006). Marker genetyczny *msp4*, koduje główne białko powierzchniowe 4 i charakteryzuje się dużą stabilnością genetyczną niezależnie od fazy cyklu życiowego *A. phagocytophilum* (de la Fuente i wsp., 2005; Matei i wsp., 2019). Analiza markera *mps4*, klasyfikuje szczepy *A. phagocytophilum* do genotypu (Matei i wsp., 2019). Gen 16S rDNA, charakteryzuje się niską zmiennością (podobieństwo wewnątrz rodziny ok. 96%), w porównaniu do genów *groEL* i *ankA*. Na podstawie analizy sekwencji tego genu zunifikowano gatunek *A. phagocytophilum*. Marker genetyczny 16S rDNA jednoznacznie określa gatunek i pozwala na odróżnienie *A. phagocytophilum* od innych bakterii z rodziny Anaplasmataceae (Dumler i wsp., 2001). Gen *groEL*, kodujący białko szoku cieplnego, pozwala na podział szczepów *A. phagocytophilum* na cztery ekotypy (Jahfari i wsp., 2014; Jaarsma i wsp., 2019; Adamska, 2020). Warianty I i II mają różnych żywicieli: ekotyp I jest powiązany m.in. z kozami (*Capra hircus*), jeżem zachodnim (*Erinaceus europaeus*), sarną europejską

(*Capreolus capreolus*) oraz człowiekiem, a ekotyp II jest związany głównie z przeżuwaczami. Ekotypy III i IV mają wyraźnie określonych żywicieli, tj. ekotyp III jest powiązany z gryzoniami, a IV z ptakami. (Jahfari i wsp., 2014; Jouglin i wsp., 2017). Wszystkie cztery ekotypy występują w wektorach z rodzaju *Ixodes* (Bown i wsp., 2009; Stigum i wsp., 2019). Gen *ankA*, koduje cytoplazmatyczne białko antygenowe i na podstawie analizy jego sekwencji szczepy *A. phagocytophilum* można podzielić na pięć klastrow, przy czym każdy klastrow jest skorelowany z gatunkiem gospodarza (Massung i wsp., 2000; von Loewenich i wsp., 2003; Scharf i wsp., 2011). Klastrow I obejmuje szczepy związane z ludźmi, zwierzętami towarzyszącymi i hodowanymi. Klastrow II i III jak do tej pory powiązane z tylko sarnami, a IV z grupą zwierząt klasyfikowanych ogólnie jako przeżuwacze np.: owca (*Ovis aries*), żubr europejski (*Bison bonasus*) czy krowa (*Bos taurus taurus*). Ostatni klastrow V występuje wśród gryzoni (Massung i wsp., 2000; von Loewenich i wsp., 2003; Scharf i wsp., 2011; Majazki i wsp., 2013; Jouglin i wsp., 2017).

Występowanie oraz żywiciele

Anaplasma phagocytophilum jest powszechnym wewnątrzkomórkowym pasożytem bakteryjnym, notowanym prawie na całym świecie u wielu gatunków gospodarzy (Tab. 1). Co ciekawe w Australii notowano przypadki występowania bakterii z rodzaju *Anaplasma* (Gofton i wsp., 2015), jednak jak do tej pory nie zanotowano szczepów *A. phagocytophilum* na tym kontynencie (Dehghani i wsp., 2019).

Tabela 1. Zestawienie przykładowych rekordów z bazy GenBank (NCBI) sekwencji nukleotydowych *A. phagocytophilum*

Kontynent	Gospodarz	Kraj	Numer sekwencji w bazie GenBank
EUROPA	Lis rudy (<i>Vulpes vulpes</i>)	Szwajcaria	KX180948.1
		Polska	MH328211.1
	Pies (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Chorwacja	KY114936.1
		Niemcy	JX173651.1
	Owca (<i>Ovis aries</i>)	Norwegia	CP015376.1
	Jeleń szlachetny (<i>Cervus elaphus</i>)	Słowenia	KM215243.1
	Sarna europejska (<i>Capreolus capreolus</i>)	Hiszpania	MN170723.1
		Estonia	MW922755.1
		Białoruś	HQ629915.1
	Kleszcz (<i>Ixodes ricinus</i>)	Austria	JX173652.1
	Muchówki (<i>Haematopota pluvialis</i>)	Polska	MH844585

	Borsuk europejski (<i>Meles meles</i>)	Polska	MH328211	
	Dzik euroazjatycki (<i>Sus scrofa</i>)	Polska	MT510541.1	
	Nornica ruda (<i>Myodes glareolus</i>)	Wielka Brytania	AY082656.1	
	Jeż zachodni (<i>Erinaceus europaeus</i>)	Niemcy	FN390878.1	
		Austria	KT454992.1	
	Człowiek (<i>Homo sapiens</i>)	Belgia	KM259921.1	
AFRYKA	Pies (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Republika Południowej Afryki (RPA)	MK814406.1	
	Myszorówka natalska (<i>Mastomys natalensis</i>)	RPA	MK814411.1	
AMERYKA PÓŁNOCNA	Kleszcz	<i>Ixodes pacificus</i>	Stany Zjednoczone Ameryki (USA)	KP276588.1
		<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Meksyk	KP844665.1
	Lama andyjska (<i>Lama glama</i>)	USA	AF241532.1	
	Koń (<i>Equus ferus caballus</i>)	USA	AF172166.1	
	Kojot preriowy (<i>Canis latrans</i>)	USA	AF170728.1	
	Człowiek (<i>Homo sapiens</i>)	USA	AF093788.1	
	Jeleń wirginijski (<i>Odocoileus virginianus</i>)	Meksyk	MH487660.1	
AMERYKA POŁUDNIOWA	Koń (<i>Equus ferus caballus</i>)	Chile	MH159218	
	Pies (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Brazylia	HQ670750.1	
		Paragwaj	MT975643.1	
	Kleszcz	<i>Ixodes tapirus</i>	Panama	MW677508.1
AZJA	Kleszcz	<i>Ixodes persulcatus</i>	Rosja	HM366584.1
		<i>Ixodes ricinus</i>	Turcja	FJ172530.1
		<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Chiny	KF569908
			Korea Południowa	GU064898
	Nornica rudogrzbieta (<i>Myodes rutilus</i>)	Rosja	HQ630622.1	
	Pies (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Irak	MN453475.1	
		Japonia	LC334014.1	
	Jenot azjatycki (<i>Nyctereutes procyonoides</i>)	Korea Południowa	KY458557.1	
	Myszarka polna (<i>Apodemus agrarius</i>)	Korea Południowa	KR611719.1	
		Chiny	GQ412337 DQ342324	
	Kot (<i>Felis catus</i>)	Korea Południowa	KR021165.1	
	Krowa (<i>Bos taurus taurus</i>)	Turcja	KP745629.1	
	Koza (<i>Capra hircus</i>)	Chiny	KF569909.1	
	Człowiek (<i>Homo sapiens</i>)	Korea Południowa	KP306520.1	

Dziko żyjące kopytne, stanowią dużą grupę zwierząt, u których notuje się *A. phagocytophilum*. Stanowią one powszechnie występujący rezerwuar bakterii z rodzaju *Anaplasma*. Grupę tę, należy uważnie monitorować, jeśli chodzi

o występowanie bakterii *A. phagocytophilum*, ponieważ szczepy, których są nosicielami mogą być zagrożeniem dla ludzi oraz zwierząt towarzyszących i hodowlanych. Dodatkowo ekologiczne i ekonomiczne aspekty gospodarki leśnej i hodowlanej zwiększają zapotrzebowanie i znaczenie monitoringu nad bakteriami z rodzaju *Anaplasma*, w celu ograniczenia strat w tych branżach (Hornok i wsp., 2018). Potencjał zagrożenia dodatkowo zwiększa brak możliwości zwalczania tych bakterii w środowisku naturalnym oraz brak kontroli nad dzikimi zwierzętami. W rozprawie, podjęto problematykę występowania *A. phagocytophilum* u dziko żyjących zwierząt kopytnych takich jak: jeleń szlachetny (*Cervus elaphus*), sarna europejska (*Capreolus capreolus*), daniel zwyczajny (*Dama dama*), żubr europejski (*Bison bonasus*), łось euroazjatycki (*Alces alces*), dzik euroazjatycki (*Sus scrofa*) oraz dwóch gatunków zwierząt fermowych, tj.: jeleń szlachetny i daniel zwyczajny. W ostatnich latach, liczebność populacji wyżej wymienionych zwierząt, w Polsce i Europie, stale zwiększa się (Burbaité i Csányi, 2009, 2010; Massei i wsp., 2015). Jednak biorąc pod uwagę tylko Polskę, trendy populacyjne tych gatunków różnią się. Bardzo znaczącą różnicę zanotowano w populacji dzika euroazjatyckiego. W latach 2010-2015 populacja dzika w polskich lasach wahała się od 250-270 tysięcy osobników. Jednak Afrykański Pomór Świń (African Swine Fever – ASF) szerzący się od 2018 roku w Polsce (Szymańska i Dziwulaki, 2022), spowodował drastyczny spadek populacji dzika i w latach 2019-2020 notowano już tylko około 75 tysięcy osobników (Rocznik Statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej 2021, Główny Urząd Statystyczny). Populacje: jelenia szlachetnego (276 tys.), sarny europejskiej (885 tys.) i daniela zwyczajnego (29,3 tys.), utrzymują ogólny trend wzrostowy, lecz w ostatnich latach, występują niewielkie wahania spadkowe wśród populacji saren oraz danieli (Rocznik Statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej 2021, GUS). Łось euroazjatycki i żubr europejski to gatunki zwierząt, które w Polsce są objęte różnymi formami ochrony gatunkowej. Łось, podobnie jak inne duże dzikie jeleniowate, jest klasyfikowany jako zwierzyzna łowna, jednak od 2001 r., gdy liczba osobników tego gatunku była bardzo niska (ok. 2 tys.), wprowadzono zakaz polowania na ten gatunek zwierząt, tzw. moratorium (Dz. U. z 2001 r. Nr 43, poz. 488). Od tego czasu stan populacji łosia euroazjatyckiego poprawia się, a populację szacuje się obecnie na około 28-30 tys. osobników (Wawrzyniak, 2016; Rocznik Statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej 2021, GUS). Żubr europejski jest objęty ścisłą ochroną gatunkową (Dz.U. 2005 nr 48 poz. 459, Dz.U. 2004 nr 92 poz. 880). Po Pierwszej i Drugiej Wojnie Światowej, rozpoczęto narodowy

program restytucji żubra do polskich lasów (Kraśński, 2015). Obecnie dwie największe populacje żubrów, żyjących na wolności, znajdują się w Polsce i żyją na terenie Białowieskiego Parku Narodowego i jego otulin (województwo podlaskie) oraz w Bieszczadach (województwo podkarpackie) (Klich i wsp., 2021). Od 2010 do 2020 roku populacja żubra europejskiego w Polsce podwoiła się i obecnie wynosi około 2300 osobników (Rocznik Statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej 2021, GUS). W rozprawie wzięto również pod uwagę zwierzęta fermowe, tych samych gatunków co zwierzęta dzikie, czyli jelenia szlachetnego oraz daniela zwyczajnego. Analiza próbek od zwierząt fermowych stanowi bardzo dobre porównanie w stosunku do próbek zwierząt dzikich, ponieważ zwierzęta fermowe żyją w kontrolowanych warunkach, są regularnie odrobaczane, karmione oraz odizolowane od potencjalnych drapieżników. Te aspekty hodowli sprawiają, że zwierzęta są w dobrej kondycji życiowej i w teorii powinny być bardziej odporne na zarażenie bakteriami czy pasożytami. W ostatnich latach nastąpił wzrost liczby ferm jeleniowatych w odpowiedzi na zwiększony popyt na dziczyznę (Daszkiewicz i wsp., 2015). Według Europejskiej Federacji Związków Hodowców Jeleniowatych (Federation of European Deer Farmers Associations, FEDFA) szacuje się, że w Polsce działa co najmniej 200 ferm jeleniowatych. W Europie najczęściej fermowo hoduje się dwa gatunki jeleniowatych i są to: jeleń szlachetny i daniel zwyczajny (Kudrnáčová i wsp., 2018). Choć hodowla jest w Polsce wciąż stosunkowo nowym trendem, to jesteśmy czołowym producentem dziczyzny hodowlanej w Europie (Kuba i wsp., 2015). We wszystkich populacjach tych zwierząt stwierdza się obecność *A. phagocytophilum*, w Polsce (Hapunik i wsp., 2011; Michalik i wsp., 2012; Adaszek i wsp., 2012; Rymaszewska, 2014; Dzięgiel i wsp., 2015; Karbowski i wsp., 2015; Teodorowski i wsp., 2020) i na świecie (Petrovec i wsp., 2003; Nahayo i wsp., 2014; Silaghi i wsp., 2014; Pûarité i wsp., 2015; Dugat i wsp., 2016; Matsuo i wsp., 2017; Malmsten i wsp., 2019; Ojeda-Chi i wsp., 2019; Stigum i wsp., 2019; Silaghi i wsp., 2020; Razanske i wsp., 2021). Wśród zwierząt, bakterie *A. phagocytophilum*, mogą wywoływać anaplazmozę granulocytarną (Granulocytic Anaplasmosis – GA). Nieklinicznymi objawami zakażenia mogą być: mniejsza ilość udoju mleka, zmniejszenie masy ciała oraz ogólne otępienie zwierzęcia. Wśród objawów klinicznych wymienia się: wysoką gorączkę, anemię oraz leuko- i trombocytopenię (Stuen i wsp., 2013a; Razanske i wsp., 2019). Notowano również kilka przypadków śmiertelnych wśród: owiec, saren oraz łosi (Jenkins i wsp., 2011; Stuen i wsp., 2013b). Powszechne występowanie *A. phagocytophilum* wśród zwierząt, powodowane jest przez wektory,

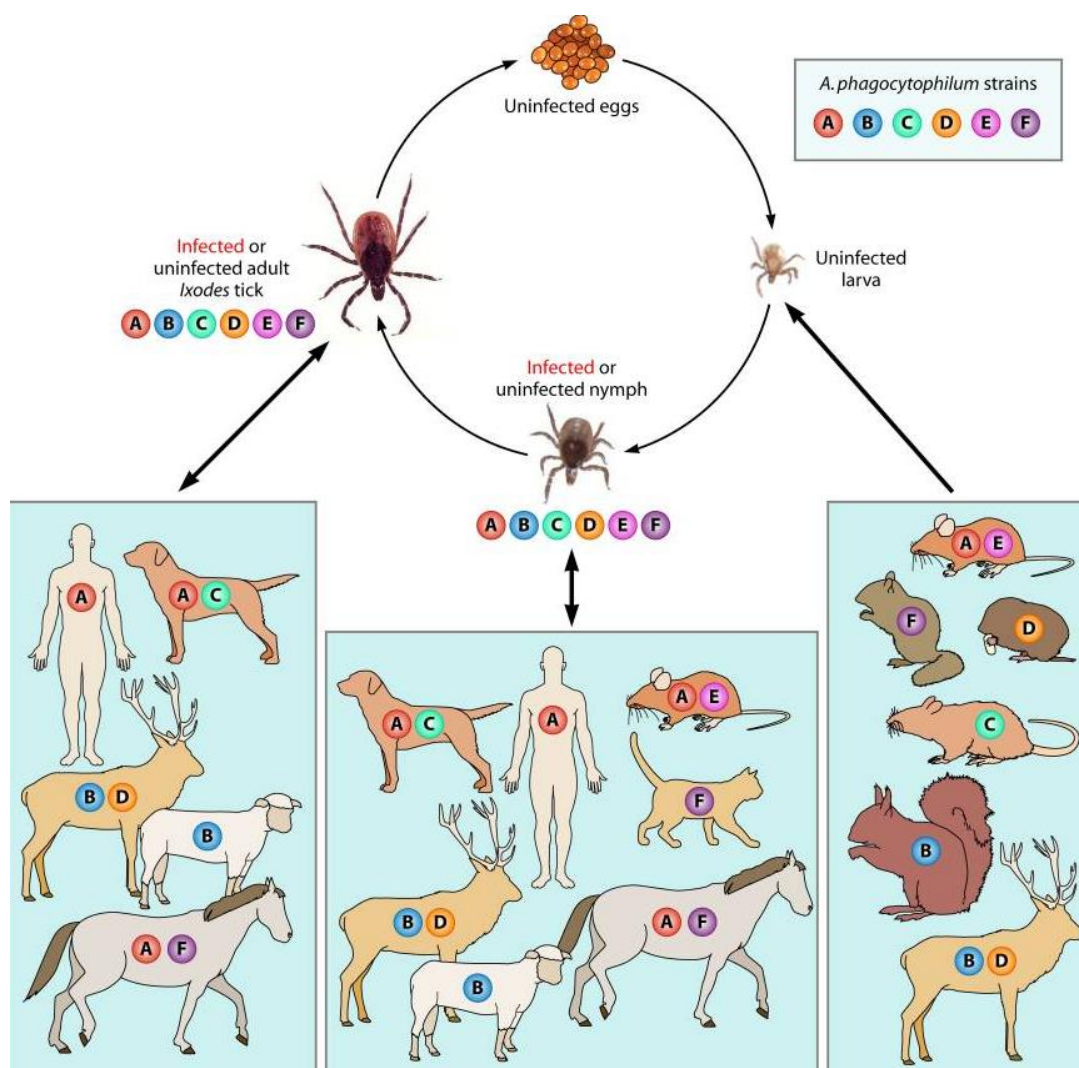
głównie kleszcze, które swobodnie przenoszą tę bakterię między różnymi osobnikami zwierząt oraz między zwierzętami a ludźmi (Rikihsia, 2011; Karbowski i wsp., 2016).

Wektory

Bakterie z rodzaju *Anaplasma* są przenoszone przez kilka gatunków kleszczy z rodzaju: *Ixodes* (*I. ricinus*, *I. pacificus*, *I. scapularis*, *I. persulcatus*, *I. tapirus*) (Karbowski i wsp., 2016; Bermúdez C. i wsp., 2021) i *Dermacentor* (*D. reticulatus*, *D. albipictus*) (Wirtgen i wsp., 2011; Jaarsma i wsp., 2019). Najpowszechniejszym z wektorów są kleszcze z rodzaju *Ixodes* (Honig i wsp., 2017). Ostatnie doniesienia, dotyczące detekcji *A. phagocytophilum*, wśród owadów pokazują, że muchówki z rodziny Tabanidae: *Haematopota pluvialis*, *Tabanus bromius* i *T. distinguendus*, również są nosicielami tych wewnątrzkomórkowych pasożytów, jednak ich rola, jako potencjalnych wektorów nie została jeszcze potwierdzona (Werszko i wsp., 2019). Cykl życiowy oraz krążenie bakterii *A. phagocytophilum* w środowisku są oparte na wektorach. Jak do tej pory, nie ma dowodów na transowarialne przenoszenie się bakterii z rodzaju *Anaplasma* wśród kleszczy, dlatego powszechnie uważa się, że larwy i nimfy kleszczy, same nabywają bakterie *A. phagocytophilum* żywiąc się krwią małych ssaków, a następnie jako wektory, przenoszą te pasożyty do innych żywicieli (Ryc. 4) (Ogden i wsp., 1998; Rar i Golovljova, 2011; Rikihsia, 2011; Stuen i wsp., 2013a; Karbowski i wsp., 2016). Wektory, tak jak między zwierzętami, mogą przenosić *A. phagocytophilum* ze zwierząt na ludzi.

HGA i projekt „One Health”

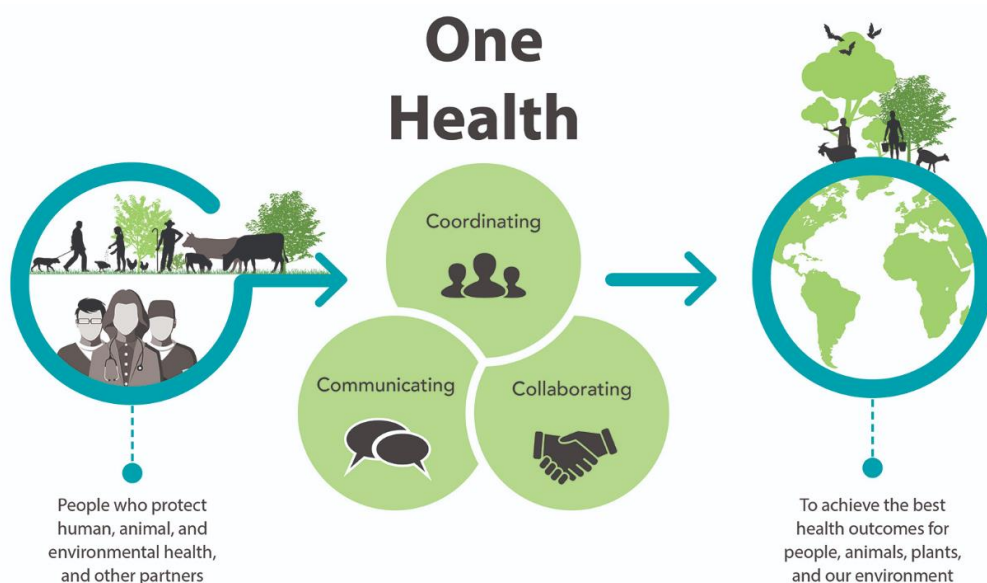
Ludzka Anaplazmoza Granulocytarna (**H**uman **G**ranulocytic **A**naplasmosis – HGA), jest chorobą odzwierzęcą powodowaną zakażeniem bakteriami *Anaplasma phagocytophilum* (Alberti i wsp., 2005). Objawy choroby to: gorączka, ból głowy, dreszcze, a w obrazie klinicznym obserwuje się małopłytkowość, leukopenię oraz zwiększoną aktywność enzymów wątrobowych. Wszystkie te objawy są na tyle mało specyficzne, że bez kierunkowej informacji na temat ukąszenia kleszcza, diagnozowanie anaplazmozy jest bardzo trudne (Bakken i Dumler, 2008; Tylewska-Wierzbanowska i Chmielewski, 2010). Pierwszy przypadek anaplazmozy w Polsce zdiagnozowano w 2001 roku. Z powodu niecharakterystycznych objawów, chorobę początkowo pomyłono z boreliozą z Lyme, jednak wyniki badań krwi nie odpowiadały boreliozie.



Rycina 4. Schemat cyklu życiowego oraz różnorodność szczepów w zależności od gospodarza, bakterii *Anaplasma phagocytophilum* (wg. Rikhsia, 2011)

Zakażenie bakteriami *A. phagocytophilum* w końcu zdiagnozowano, jednak z powodu późnego rozpoznania, choroba miała ciężki, zagrażający życiu przebieg (Tylewska-Wierzbanowska i Chmielewski, 2010). W ostatnich latach (2018-2019) zanotowano 13 riketsjoz, a od rozpoczęcia pandemii wirusa SARS – CoV – 19, liczba przypadków spadła do zera (Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce. Biuletyn Roczny. 2019, 2020). W Europie szczepy *A. phagocytophilum* wydają się być bardziej wirulentne wśród zwierząt niż wśród ludzi (Scharf i wsp., 2011). Wyższą wirulencję, u ludzi, wykazują szczepy *A. phagocytophilum* występujące w Ameryce Północnej, głównie w USA, gdzie w 2019 roku zdiagnozowano ponad 5500 przypadków anaplazmozy, a w Europie było ich tylko około 300 (Centers for Disease Control and Prevention – CDC, Matei i wsp., 2019). Duża liczba przypadków anaplazmozy w USA pozwoliła na potwierdzenie powiązania zwiększonej aktywności

kleszczy od wiosny do jesieni ze zwiększoną liczbą przypadków anaplazmozy wśród ludzi. Szczyt zachorowań w latach 2000-2019 przypadał w miesiącach czerwiec i lipiec, średnio w roku w tych miesiącach diagnozowano około 1000 przypadków (CDC – Anaplasmosis). W USA notuje się HGA, nabytą w drodze transfuzji krwi lub transplantacji, jednak to tylko kilka przypadków w ostatnim dwudziestoleciu (CDC; Townsend i wsp., 2014; Fiecek i wsp., 2020). Dodatkowo z uwagi na to, że nie notuje się transowarialnego przenoszenia *A. phagocytophilum* w populacji kleszczy (Ogden i wsp., 1998; Rar i Golovljova, 2011; Rikhsia, 2011; Stuen i wsp., 2013; Karbowski i wsp., 2016), można przypuszczać, że większość przypadków HGA jest powodowane transmisją wektorową bezpośrednio od zwierząt. W świetle przedstawionych faktów, bardzo ważny jest monitoring dziko żyjących zwierząt pod względem prevalencji *Anaplasma phagocytophilum*, ponieważ bezpośrednio przekłada się to na zdrowie publiczne. W szerszej perspektywie opisuje to projekt Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization – WHO) „One Health” (w tłum. „Jedno Zdrowie”). Przedstawia on powiązanie i oddziaływanie między sobą ekosystemów: ludzi, zwierząt oraz roślin. W dobie rosnącej globalizacji, światowej mobilności i zmian klimatu, współzależności tych ekosystemów dowodzi, że świat jako złożony system naczyń połączonych jest tak silny jak jego najsłabsze ogniwo (Ryc. 5).



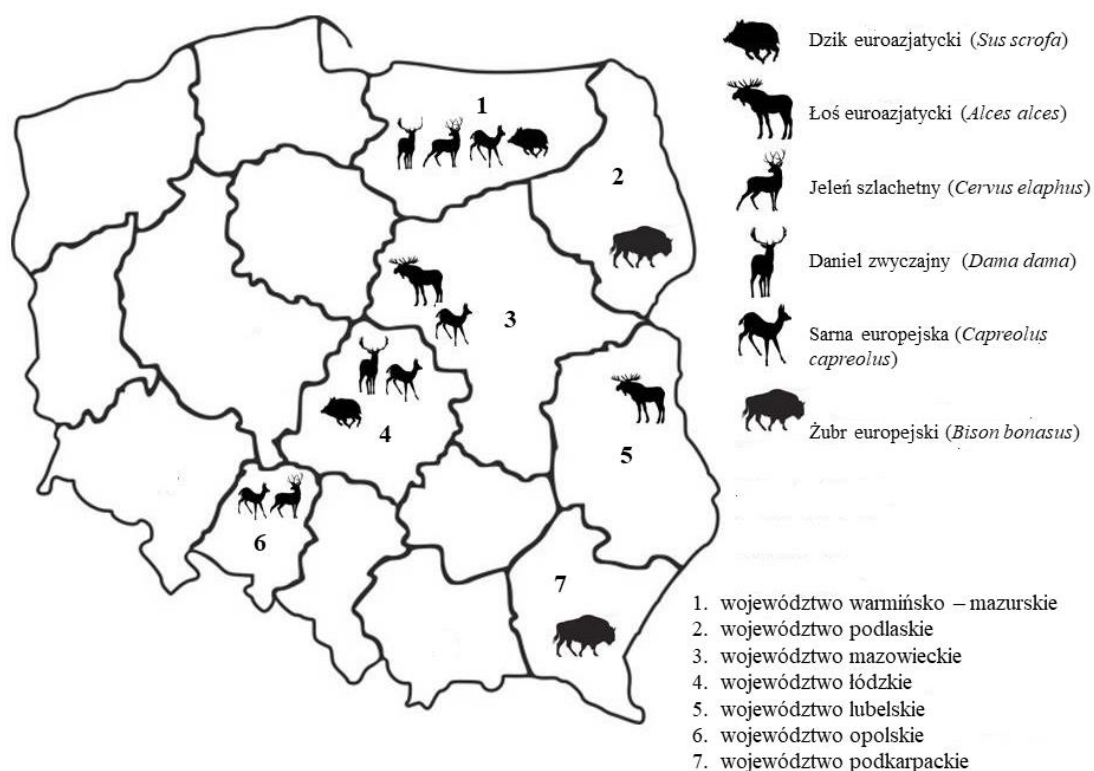
Rycina 5. Grafika prezentująca założenia projektu OneHealth (CDC)

Materiały

Materiał do badań to wycinki z organów: śledziony i wątroby. Próby zbierano w trakcie polowań w sezonach łowieckich od 2017 do 2020 roku. Zebrano materiały biologiczne od czterech gatunków zwierząt: jeleń szlachetny, sarna europejska, daniel zwyczajny oraz dzik euroazjatycki. Od 2018 roku zbiór prób biologicznych od dzików euroazjatyckich nie był możliwy z powodu ASF. Materiał biologiczny od łosi kolekcjonowano w latach 2018-2021. Ponieważ polowania na łosie są w Polsce zawieszone (moratorium), wszystkie próby, zostały pobrane od osobników, które poniosły śmierć w wyniku wypadków komunikacyjnych lub od martwych zwierząt znalezionych w lasach przez pracowników lasów i parków narodowych. Próby od żubra europejskiego pobierano w latach 2021-2022. Wycinki organów pobrano od znalezionych martwych osobników (n=5) lub legalnie wyeliminowanych (n=24) przez pracowników parków narodowych lub leśników. Próby od żubrów w Bieszczadach pobrano od osobników wyeliminowanych z powodów sanitarno-epidemiologicznych, zgodnie z decyzją Generalnej Dyrekcji Ochrony Środowiska. Próby biologiczne od zwierząt fermowych pochodzą ze Stacji Badawczej Instytutu Parazytologii im. Witolda Stefańskiego Polskiej Akademii Nauk w Kosewie Górnym i pobrano je podczas uboju zwierząt w 2018 roku. Materiał biologiczny, od zwierząt dzikich, był kolekcjonowany w siedmiu województwach:

- lubelskie – Poleski Park Narodowy
- łódzkie – Puszcza Bolimowska (obszary Koła Łowieckiego nr 9 „Knieja” z Warszawy)
- mazowieckie – Kampinoski Park Narodowy, Lasy Miejskie Warszawa
- opolskie – Nadleśnictwo Turawa
- podkarpackie – Nadleśnictwo Lesko, Nadleśnictwo Baligród, Nadleśnictwo Cisna, Nadleśnictwo Lutowiska, Nadleśnictwo Komańcza
- podlaskie – Białowieski Park Narodowy, Puszcza Białowieska i ich otuliny
- warmińsko-mazurskie – Puszcza Piska (Nadleśnictwo Strzałowo) (Ryc. 6).

Łącznie zebrano materiał biologiczny od 305 osobników, z 6 gatunków zwierząt (Tab. 2).



Rycina 6. Mapa Polski przedstawiająca rozmieszczenie geograficzne miejsc poboru prób

Tabela 2. Zestawienie informacji na temat liczebności badanych 305 osobników

Gatunek	n (% populacji badanej)	Kategoria wiekowa	n (% osobników danego gatunku)	Płeć	n (% dorosłych)
Jeleń	90 (29,5%)	Młode	33 (36,7%)	-	-
		Dorosłe	57 (63,3%)	Samica	49 (86,0%)
Sarna	70 (22,9%)	Młode	14 (20,0%)	-	-
		Dorosłe	56 (80,0%)	Samica	49 (87,5%)
Łoś	13 (4,3%)	Młode	7 (53,9%)	-	-
		Dorosłe	6 (44,1%)	Samica	3 (50,0%)
Daniel	36 (11,8%)	Młode	5 (13,9%)	-	-
		Dorosłe	31 (86,1%)	Samica	9 (29,0%)
Żubr	29 (9,5%)	Młode	1 (3,5%)	-	-
		Dorosłe	28 (96,5%)	Samica	9 (32,1%)
Dzik	67 (22,0%)	-	-	-	-

Zwierzęta dziko żyjące to 263 osobniki, a fermowe – 42.

Zgody na pobieranie materiału biologicznego od zwierząt objętych różnymi formami ochrony gatunkowej:

- Żubr europejski (województwo podkarpackie) - Generalna Dyrekcja Ochrony Środowiska (DZP-WG.6401.2.2021.EB), Regionalna Dyrekcja Ochrony Środowiska w Rzeszowie (WPN.6401.1.94.2021.RN.2);
- Żubr europejski (województwo podlaskie) - Białowiecki Park Narodowy (PN.51.10.2021.AK);
- Łoś euroazjatycki (województwo mazowieckie) – Porozumienie między Instytutem Parazytologii im. Witolda Stefańskiego Polskiej Akademii Nauk, a Kampinoskim Parkiem Narodowym (DE 0604/27/16), Porozumienie między Instytutem Parazytologii im. Witolda Stefańskiego Polskiej Akademii Nauk, a Miastem Stołecznym Warszawa (dokument z dnia 04.06.2019);
- Łoś euroazjatycki (województwo lubelskie) – Poleski Park Narodowy (zezwolenie nr 3/2017 i 2/2018).

Metody

Izolacja DNA

Do izolacji DNA wykorzystano ok. 20-25 mg próby. Procedurę izolacji przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego kitu (DNA Mini Kit, Syngen, Polska) według instrukcji załączonej przez producenta. Otrzymany materiał genetyczny zawieszano w dwóch wariantach: w załączonym płynie do elucji oraz w wodzie destylowanej. Wyizolowane DNA przechowywano w temperaturze -20 °C do dalszych analiz.

Reakcja Łańcuchowa Polimerazy (Polymerase Chain Reaction – PCR)

Molekularne analizy opierały się na detekcji bakterii z rodzaju *Anaplasma*, a następnie klasyfikacji do gatunku *Anaplasma phagocytophilum*. Wszystkie reakcje PCR wykonywano przy użyciu termocyklera DNA Engine T100 Thermal Cycler (BioRad, USA).

• 16S rDNA

Do detekcji fragmentu genu 16S rDNA, bakterii *Anaplasma* spp. opracowano startery:

- A500F 5'-CGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTA-3',
- A520F 5'-GGGCATGTAGGCGGTTCGGT-3',
- A900R 5'-CCATGCAGCACCTGTGCGAG-3'.

Pary starterów do reakcji PCR (A500F i A900R) i semi nested-PCR (A520F, A900R) zostały zaprojektowane w Zakładzie Ekologii i Ewolucji Pasożytnictwa Instytutu Parazytologii im. Witolda Stefańskiego Polskiej Akademii Nauk. Reakcja PCR i semi nested-PCR, przebiegała w następujących warunkach:

92°C 3 min

95°C 10 s
60°C 10 s
72° C 30 s

} x 34

72°C 5 min

12°C ∞.

Piśmiennictwo:

Werszko J, Szewczyk T, Steiner-Bogdaszewska Ż, Laskowski Z, Karbowski G. Molecular Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Blood-Sucking Flies (Diptera: Tabanidae) in Poland. J Med Entomol. 2019 Apr;16;56(3):822-827. doi: 10.1093/jme/tjy217.

Szewczyk T, Werszko J, Myczka AW, Laskowski Z, Karbowski G. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in wild carnivores in north-eastern Poland. Parasit Vectors. 2019 Oct;7;12(1):465. doi: 10.1186/s13071-019-3734-y.

• *groEL*

Do detekcji markera genetycznego *groEL* wykorzystano startery literaturowe z publikacji:

Alberti A, Zobba R, Chessa B, Addis MF, Sparagano O, Pinna Parpaglia ML, Cubeddu T, Pintori G, Pittau M. Equine and canine *Anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States. Appl Environ Microbiol. 2005 Oct;71(10):6418-22. doi: 10.1128/AEM.71.10.6418-6422.2005.

Reakcja PCR oraz nested-PCR została przeprowadzona zgodnie z opisem autorów w/w pracy.

• *ankA*

Do detekcji markera genetycznego *ankA*, w materiale genetycznym wyizolowanym z prób od: jeleni szlachetnych, łosi euroazjatyckich, dzików euroazjatyckich oraz żubrów europejskich, wykorzystano startery literaturowe z publikacji:

Massung RF, Levin ML, Munderloh UG, Silverman DJ, Lynch MJ, Gaywee JK, Kurti TJ. Isolation and propagation of the Ap-Variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophilum* in a tick cell line. J Clin Microbiol. 2007 Jul;45(7):2138-43. doi: 10.1128/JCM.00478-07.

Reakcja PCR oraz nested-PCR została przeprowadzona zgodnie z opisem autorów w/w pracy.

Do detekcji markera genetycznego *ankA*, w materiale genetycznym wyizolowanym z prób od saren europejskich, opracowano startery:

PCR:

- ankAF1a 5'-TGCTGTAAATGAAGAAATTACAACCTC-3'
- ankAF1b 5'-TGGTGTAAATGAAGAAATTACAACCTC-3'
- ankARC 5'-GCCTTTAGTAGTACTCTACATGC-3'.

Reakcja PCR przebiegała w następujących warunkach:

95°C 2 min

95°C 10 s	}	x 34
53°C 20 s		
72° C 45 s		

72°C 5 min

12°C ∞.

Nested-PCR:

- ankAF2a 5'-CTGACCGCTGAAGCACTAA-3'
- ankAR1a 5'-GAAGCCAGATGCAGTAACGA-3'
- ankAR1b 5'-GAAGCAAGATGCAGTAACGA-3'

Reakcja PCR przebiegała w następujących warunkach:

95°C 2 min

95°C 10 s	}	x 34
53°C 20 s		
72° C 45 s		

72°C 5 min

12°C ∞.

Startery do reakcji PCR i nested-PCR zostały zaprojektowane w Zakładzie Ekologii i Ewolucji Pasożytnictwa Instytutu Parazytologii im. Witolda Stefańskiego Polskiej Akademii Nauk.

Produkty reakcji PCR rozdzielano na 1,2% żelu agarozowym (Promega, USA) z dodatkiem barwnika SimplySafe (EURx, Polska). Jako punkt odniesienia i określenia wielkości otrzymanych produktów reakcji PCR użyto markera genetycznego DNA Marker 100bp LOAD DNA ladder (Syngen, Polska). Po przeprowadzeniu elektroforezy wyniki wizualizowano za pomocą ChemiDoc, MP Lab software (Imagine, BioRad, USA). Otrzymane produkty oczyszczano z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych zestawów (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Niemcy; DNA Clean – up, Syngen, Polska) zgodnie z zaleceniami producenta. Wybrane produkty reakcji PCR były wysyłane do sekwencjonowania, usługę wykonywała firma zewnętrzna Genomed S.A. (Warszawa, Polska).

Analiza sekwencji

Otrzymane sekwencje nukleotydowe były odczytywane i składane przy użyciu ContigExpress, Vector NTI Advance v.11.0 (Invitrogen Life Technologies, USA), następnie porównane z sekwencjami z bazy internetowej GenBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI, USA) w celu identyfikacji bakterii i markerów genetycznych. Sekwencje przycinano i porównywano między sobą za pomocą programu GeneDoc v. 2.7.0.0 (Nicholas i wsp., 1997) i deponowano w bazie internetowej GenBank (NCBI, USA) Drzewa filogenetyczne zostały skonstruowane z wykorzystaniem wnioskowania bayesowskiego (BI) w oprogramowaniu MrBayes w wersji 3.2.0 (Ronquist i Huelsenbeck, 2001). Modele ewolucji do analiz filogenetycznych sekwencji nukleotydowych fragmentów genów *groEL* oraz *ankA*, określano przy użyciu oprogramowania JModelTest w wersji 2.1.10 (Guindon i Gascuel, 2003; Darriba i wsp., 2012). Drzewa filogenetyczne wizualizowano za pomocą oprogramowania TreeView (S&N Genealogy Supplies, Wielka Brytania).

Analiza statystyczna

Zmienne jakościowe opisano za pomocą liczby (n) oraz odsetka (%) osobników, dla których dana zmienna przyjmowała określoną wartość, w grupie lub w całej badanej populacji. Do porównania odsetków osobników dla których dana zmienna przyjmowała określoną wartość między grupami niezależnymi wykorzystywano test G najwyższej

wiarygodności lub dokładny test Fishera, w zależności od oczekiwanej liczebności w komórkach tabeli kontyngencji, a między grupami zależnymi – test McNemary. Przedziały ufności dla poziomu ufności równego 95% (95% PU) dla odsetków liczono za pomocą metody Wilsona (Altman i wsp., 2000). Zgodność między wynikami uzyskanymi przy badaniu różnych materiałów biologicznych (próbki śledziony i wątroby) liczono uwzględniając poprawkę na zgodność przypadkową (ang. agreement beyond chance, chance-corrected agreement) z zastosowaniem współczynnika zgodności kappa Cohena i współczynnika zgodności AC1 Gweta (Gwet, 2002). Interpretację jakościową współczynników zgodności oparto na klasyfikacji wg. Landis i Koch (1977). We wszystkich analizach przyjęto poziom istotności (α) równy 0,05 co oznaczało, że wartość p testu statystycznego niższa od 0,05 wskazywała na istnienie statystycznie istotnej różnicy. Analizę wykonano w programie TIBCO Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, USA).

The Occurrence of Zoonotic *Anaplasma phagocytophilum* Strains, in the Spleen and Liver of Wild Boars from North-West and Central Parts of Poland

Anna W. Myczka

Tomasz Szewczyk

Zdzisław Laskowski

Wkład doktorantki w publikację:

Zbiór materiału biologicznego, wykonanie badań z zakresu biologii molekularnej (część izolacji DNA, PCR, nested-PCR), część analiz filogenetycznych, przygotowanie i redagowanie tekstu.



The Occurrence of Zoonotic *Anaplasma phagocytophilum* Strains, in the Spleen and Liver of Wild Boars from North-West and Central Parts of Poland

Anna W. Myczka¹ · T. Szewczyk¹ · Z. Laskowski¹

Received: 22 October 2020 / Accepted: 4 March 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

Purpose The *Anaplasma* genus includes a Gram-negative bacterium infecting the blood cells of wild and domestic mammals, causing tick-borne fever. Infection with pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* strains may cause Human Granulocytic Anaplasmosis. Wild boars (*Sus scrofa*) may act as natural wild reservoir hosts for potentially zoonotic *A. phagocytophilum* strains; however, there is still little data to confirm this statement. The aim of this study was to verify whether wild boars can be classified as natural reservoirs of *Anaplasma* spp. and to compare the suitability of spleen and liver samples for such analysis.

Methods Liver and spleen samples were collected from 59 wild boars (2017–2019). The organs were tested for *Anaplasma phagocytophilum* using short (partial) fragments of three markers: 16S rRNA, *groEL*, *ankA*.

Results *Anaplasma* spp. DNA was detected in 12 out of 59 samples, with a prevalence of 20.34%. The presence of *A. phagocytophilum* was confirmed by sequencing of the partial 16S rRNA gene. Positive individuals were tested for the characteristic markers: *groEL* and *ankA*. The analysis of the nucleotide sequences of 16S rRNA, *groEL* and *ankA*, indicated that the strains of *A. phagocytophilum* detected in these studies are potentially zoonotic for humans.

Conclusion Wild boars from Poland can be classified as a natural reservoir of the zoonotic strain of *Anaplasma phagocytophilum*. Both the spleen and the liver tissues were found to be suitable materials for the detection of *A. phagocytophilum*.

Keywords *Anaplasma phagocytophilum* · *Sus scrofa* · Tick-borne disease · *groEL* · *ankA*

Introduction

The causative agent of Human Granulocytic Anaplasmosis (HGA), tick-borne fever (TBF) and granulocytic anaplasmosis in wild, domestic and farm animals is the parasitic bacterium *Anaplasma phagocytophilum* [1, 2]. *Anaplasma* spp. are gram-negative bacteria with a specific cell wall structure. *Anaplasma phagocytophilum* is an obligatory intracellular parasite that lives in neutrophils [3] and can be transmitted by ticks: *Ixodes ricinus*, *I. persulcatus*, *I. scapularis* and *Dermacentor reticulatus* [4–6]. Recent reports by Werszko et al. (2019) [7] show that the blood-sucking flies from Tabanidae family can act as carriers of *A. phagocytophilum*; however,

more research is needed to confirm whether they can act as transmission vectors. Ticks and other hematophagous ectoparasites can easily transfer such bacterial intracellular parasites between natural animal reservoirs and humans [8, 9]. The considerable climate changes observed over the past 20 years have resulted in the spread of arthropods, such as ticks and flies, carrying pathogenic bacteria into new regions. Such an increase in annual temperatures has also led to a significant increase in the number of ectoparasites already present in the area, which significantly influences the spread of intracellular bacterial parasites, including *Anaplasma* spp., in the natural environment [10]. Many wild animals, such as roe deer (*Capreolus capreolus*), red deer (*Cervus elaphus*), wild boar (*Sus scrofa*), red fox (*Vulpes vulpes*), raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) and the European badger (*Meles meles*) are infected with *A. phagocytophilum* [11, 12]. Wild boars are likely to be natural wild reservoir hosts for potentially zoonotic *A. phagocytophilum* strains; however, there is still little data to confirm this statement [11, 13].

✉ Anna W. Myczka
annamyczka@twarda.pan.pl

¹ Witold Stefański Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences, Twarda 51/55, 00-818 Warsaw, Poland

The aim of this study was to verify whether the wild boar populations in the north-east and central parts of Poland can be natural reservoirs of *A. phagocytophilum*, a bacterium potentially pathogenic to humans. It also determines which of the internal organs collected from wild boar, i.e., spleen or liver, is more suitable for the detection of *Anaplasma phagocytophilum*.

Materials and Methods

All materials were collected during the 2017/2018 hunting season in the Pisz Forest (Warmian-Masurian Voivodeship) and in the 2018/2019 hunting season in the Bolimów Forest (Łódź Voivodeship). In total, spleen and liver samples were collected from 59 adult wild boars.

DNA from both organs was isolated using a commercial DNA Mini Kit (Syngen). *Anaplasma* spp. was then detected using semi-nested PCR to amplify the partial 16S rRNA gene with primers specific to *Anaplasma* genus according to Szewczyk et al. (2019) [12]. Positive samples for *A. phagocytophilum* were additionally tested for the presence of the partial *groEL* and *ankA* genes with nested PCR according to Alberti et al. (2005), Massung et al. (2007) and Rymaszewska (2014), respectively (Table 1) [14–16]. DNA amplification was performed using the DNA Engine T100 Thermal Cycler (BioRad, USA). The PCR products were visualized on a 1.2% agarose gel (Promega, USA) stained with SimplySafe (EURx, Poland). Visualization was performed using ChemiDoc, MP Lab software (Imagine, BioRad, USA). The obtained PCR products were purified with the QIAquick Purification Kit (Qiagen, Germany). The purified products were sequenced directly using ABI BigDye™ chemistry (Applied Biosystems, USA) on an ABI Prism 373xl or an ABI Prism 3100™ automated sequencer. The obtained sequences were submitted to the GenBank.

Table 1 Primer used to amplify DNA markers of *A. phagocytophilum* in this study

Gene	Primers	References
16r RNA	A 500 F 5'-CGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTA-3'	Szewczyk et al. 2019 [19]
	A 520 F 5'-GGGCATGTAGGCGGTTCGGT-3'	
	A 900 R 5'-CCATGCAGCACCTGTGCGAG-3'	
ankA	ANK-F1 5'-GAAGAAATTACAACCTGAAG-3'	Massung et al. 2007 and Rymaszewska 2014 [15, 16]
	ANK-R1 5'-CAGCCAGATGCAGTAACGTG-3'	
	ANK-F2 5'-TTGACCGCTGAAGCACTAAC-3'	
	ANK-R2 5'-ACCATTGCTTCTTGAGGAG-3'	
groEL	EphplgroEL569 F 5'-ATGGTATGCAGTTTGATCGC-3'	Alberti et al. 2005 [14]
	EphplgroEL1193 R 5'-TCTACTCTGTCTTGCGTTC-3'	
	EphgroEL1142 R 5'-TTGAGTACAGCAACACCACCGGAA-3'	

Results and discussion

Of the 59 wild boar from which spleen and liver samples were taken, DNA of *Anaplasma* spp. were detected in 12 individuals, i.e., a prevalence of 20.34%. *Anaplasma* spp. genetic material was detected in seven individuals in the spleen samples, and in six individuals in the liver samples (Table 2). All positive samples were obtained from boars in the Pisz Forest; no positive samples were found in the Bolimów Forest. Four positive samples were selected for sequencing, and the results indicated the presence of *A. phagocytophilum*.

A number of studies in various countries have been performed on wild boars with the aim of identifying natural reservoirs of zoonotic strains of *A. phagocytophilum* [2, 17, 18]. Most of these tests are based on analyses of blood and spleen samples [1, 2, 17, 19, 20] and, very rarely, liver samples [18, 21]. Although some individual studies have used both the spleen and liver [21, 22] none indicate which is more suitable for this type of analysis. Our findings clearly show that, in wild boars, both these tissues are suitable (Table 2). However, as only one examined individual demonstrated positive results for both organs (1/59), it is advisable that both organs should be sampled to maximize the detection possibilities when there is no access to blood, which is the best material for this type of analysis [23].

The prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in wild boars varies across Europe and elsewhere, ranging from 0.97% in Belgium [24] to 44.8% in France [13]. In addition, one study reports that genetic material of *A. phagocytophilum* was not detected in the tested wild boar in Slovakia [25].

Table 2 The presence of *Anaplasma* spp. molecular markers in wild boars

Biological material	gene	SPLEEN	LIVER	SPLEEN and LIVER	Total
16S rRNA		7/59	6/59	1/59	12/59
ankA		2/59	2/59	0/59	4/59
groEL		2/59	2/59	1/59	3/59
ankA and groEL		2/59	1/59	0/59	3/59

Although the prevalence of *A. phagocytophilum* identified in wild boars in the present study (20.34%) is consistent with the results of those carried out in Germany (12.5%) [26], Czech Republic and Japan (14.3%) [22, 27], Slovakia (28.2%) [2] and Hungary (39.2%) [1]; however, it is nevertheless one of the higher rates. By comparison, *A. phagocytophilum* was found to be present in 12% (39/325) of wild boars examined in west-central Poland (Mazovian Voivodeship) in 2012 [18].

Comparing the prevalence of *A. phagocytophilum* in wild boars in three regions of Poland, it can be seen that it is much more widespread in the west-central (12%) [18] and north-central (20.34%) regions than in the central (no positive samples) region (this study). The higher prevalence in the west-central and north-central regions may be due to the high afforestation density [28], which favors an increased incidence of ticks, these being known vectors of *A. phagocytophilum* [29]. The presence of increased numbers of vectors in an environment enables a faster spread of *A. phagocytophilum* among hosts. A similar correlation between geographic distribution and an increase in host prevalence has been shown by Szewczyk et al. [12].

Our sequencing of selected positive 16S rRNA partial gene samples ($n=4$) confirmed the presence of *A. phagocytophilum* in the tested wild boars (MT510541). The identified nucleotide sequences are 100% identical to each other and to the 16S rRNA gene sequence of *A. phagocytophilum* isolates from various wild animals including carnivores (*Vulpes vulpes* MH328211, *Meles meles* MH328207, *Nyctereutes procyonoides* MH328209), wild boar (KM215225), cervids (*Capreolus capreolus* MN170723, *Cervus elaphus* KM215243) and small rodents (*Apodemus agrarius* KR611718, *Myodes glareolus* KC583437), as well as tick and flies (*Ixodes ricinus* HQ629922, JX173651, *Haematopota pluvialis* MH844585, *Tabanus distinguendus* MH844584), farm animals (*Bos taurus taurus* KP745629, *Equus caballus* AY527212), domestic animals (*Canis lupus familiaris* MN453474, MK814406) and humans (Belgium KM259921, Austria KT454992, USA AF093788, South Korea KP306518).

The two most common markers used to describe the genetic diversity of *A. phagocytophilum* strains are the *groEL* and *ankA* genes [10]. Based on our analysis of the *groEL* gene sequences (MT731760, MT731761, MT731762) the detected strains of *A. phagocytophilum* were classified into ecotype I [10, 30]. In the *groEL* gene, one nucleotide sequence (MT731760) showed 100% similarity to a *groEL* sequence from the human strain of *A. phagocytophilum* (AF033101), while another two (MT731761, MT731762) showed only 99.78%. However, despite the point change observed in the latter two sequences, all three encode the same protein as in human strains of *A. phagocytophilum*. Regarding *ankA*, two sequences (MT534241, MT731758), obtained from two wild boar individuals,

are 100% complementary to human isolates (AF100886, AF100887, GU236800). The third isolate from wild boar (MT731759) showed 99.4% similarity to human markers. From all obtained *ankA* gene sequences, only two of them (MT534241 and MT731758) encode the same protein as human *A. phagocytophilum* strains: the third one (MT731759) is significantly different from the protein detected in humans. The analysis of the nucleotide sequences of 16S rRNA, *groEL* and *ankA* indicates that the strains of *A. phagocytophilum* detected in samples in this study can be classified as potentially zoonotic for humans.

Conclusion

Our findings suggest that wild boars from Poland can be classified as a natural reservoir of the zoonotic *Anaplasma phagocytophilum* strains. In addition, both the spleen and liver were found to be suitable for the detection of *A. phagocytophilum*. However, further research is needed in other areas of Poland to comprehensively analyze the issues of *A. phagocytophilum* natural reservoirs throughout the country, and such studies should include other animals, which may demonstrate different tissue predilection than wild boars.

Acknowledgements The authors would like to thank the management and staff of Strzałowo Forest District and Hunting Club No. 9 “Knieja” from Warsaw.

Author contributions All authors contributed to the study conception and design. Material preparation was performed by: AWM, TS, data collection was performed by: AWM, TS, ZL and analysis were performed by: AWM, ZL. The first draft of the manuscript was written by AWM and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding The authors received no financial support for the research, authorship, and publication of this article.

Data availability The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Informed consent All authors consent to the publication.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source,

provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Hornok S, Sugar L, Fernandez IG et al (2018) Tick- and fly-borne bacteria in ungulates: the prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, haemoplasmas and rickettsiae in water buffalo and deer species in Central Europe. Hungary Vet Res 14:98. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1403-6>
- Kazimirova M, Hamsikova Z, Spitalska E et al (2018) Diverse tick-borne microorganisms identified in free-living ungulates in Slovakia. Parasites Vectors 11:495. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3068-1>
- Lin M, Rikihisa Y (2003) *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* Lack Genes for Lipid A Biosynthesis and Incorporate Cholesterol for Their Survival. Infect Immun 1(9):5324–5331. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.5324-5331.2003>
- Karbowiak G, Vichová B, Slivinska K et al (2014) The infection of questing Dermacentor reticulatus ticks with Babesia canis and *Anaplasma phagocytophilum* in the Chernobyl exclusion zone. Vet Parasitol 204(3–4):372–375. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.030>
- Karbowiak G, Biernat B, Stańczak J et al (2016) The role of particular ticks developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens in Central Europe. 4. Anaplasmataceae. Ann Parasitol. 62(4):267–284. <https://doi.org/10.17420/ap6204.62>
- Wirtgen M, Nahayo A, Linden A (2011) Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in *Dermacentor reticulatus* ticks. Vet Rec 168(7):195. <https://doi.org/10.1136/vr.d1053>
- Werszko J, Szewczyk T, Steiner-Bogdaszewski Z, Laskowski Z, Karbowiak G (2019) Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in blood-sucking flies (Diptera: Tabanidae) in Poland. J Med Entomol 56(3):822–827. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy217>
- Andersson MO, Marga G, Banu T et al (2018) Tick-borne pathogens in tick species infesting humans in Sibiu County, central Romania. Parasitol Res 117:1591–1597. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5848-0>
- Atif FA (2015) *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: Rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. Parasitol Res 114:3941–3957. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4698-2>
- Matei IA, Estrada-Pena A, Cutler SJ et al (2019) A review on the eco-epidemiology and clinical management of human granulocytic anaplasmosis and its agent in Europe. Parasites Vectors 12:599. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3852-6>
- Adamska M (2020) The role of different species of wild ungulates and *Ixodes ricinus* ticks in the circulation of genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in a forest biotope in north-western Poland. Ticks Tick Borne Dis 11(5):101465. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101465>
- Szewczyk T, Werszko J, Myczka AW et al (2019) Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in wild carnivores in north-eastern Poland. Parasites Vectors 12:465. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3734-y>
- Dugat T, Zanella G, Véran L et al (2016) Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis potentially reveals the existence of two groups of *Anaplasma phagocytophilum* circulating in cattle in France with different wild reservoirs. Parasit Vectors 9(1):596. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1888-4>
- Alberti A, Zobba R, Chessa B et al (2005) Equine and canine *Anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States. Appl Environ Microbiol 71(10):6418–6422. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6418-6422.2005>
- Massung RF, Levin M, Munderloh UG et al (2007) Isolation and Propagation of the Ap-Variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophilum* in a tick cell line. J Clin Microbiol 45(7):2138–2143. <https://doi.org/10.1128/JCM.00478-07>
- Rymaszewska A (2014) Genotyping of *Anaplasma phagocytophilum* strains from Poland for selected genes. Folia Biol (Krakow) 62(1):37–48. https://doi.org/10.3409/fb62_1_37
- Masuzawa T, Uchishima Y, Fukui T et al (2011) Detection of *Anaplasma phagocytophilum* from wild boars and deer in Japan. Jpn J Infect Dis 64:333–336
- Michalik J, Stanczak J, Cieniuch S et al (2012) Wild boars and hosts of human-pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* variants. Emerg Infect Dis 18(6):998–1001. <https://doi.org/10.3201/eid1806.110997>
- Reiterová K, Špilovská S, Blaňarová L et al (2016) Wild boar (*Sus scrofa*)—reservoir host of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Anaplasma phagocytophilum* in Slovakia. Acta Parasitol 61(2):255–260. <https://doi.org/10.1515/ap-2016-0035>
- Strasek Smrdel K, Bidovec A, Malovrh T (2009) Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in wild boar in Slovenia. Clin Microbiol Infect 15(Suppl 2):50–52. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02174.x>
- Kiss T, Cadar F, Krupaci FA et al (2014) Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in European wild boar (*Sus scrofa*) population from Transylvania. Romania Epidemiol Infect 142:246–250. <https://doi.org/10.1017/S0950268813000812>
- Petrovec M, Sixl W, Schweiger R et al (2003) Infections of wild animals with *Anaplasma phagocytophilum* in Austria and Czech Republic. Ann N Y Acad Sci 990:103–106. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07345.x>
- Rikihisa Y (2011) Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. Clin Microbiol Rev 24(3):469–489. <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-10>
- Nahayo A, Bardiau M, Volpe R et al (2014) Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in wild boar (*Sus scrofa*) in Belgium. BMC Vet Res 10:80. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-80>
- Stefanidesova K, Kocianova E, Boldis V et al (2008) Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia helvetica* infection in free-ranging ungulates in central Slovakia. Eur J Wildl Res 54:519–524. <https://doi.org/10.1007/s10344-007-0161-8>
- Silaghi C, Pfister K, Overzier E (2014) Molecular investigation for bacterial and protozoan tick-borne pathogens in wild boars (*Sus scrofa*) from southern Germany. Vector Borne Zoonotic Dis 14(5):371–373. <https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1495>
- Matsuo K, Moribe J, Abe N (2017) Molecular Detection and Characterization of *Anaplasma* Species in Wild Deer and Boars in Gifu Prefecture, Japan. Jpn J Infect Dis 70(3):354–356. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2016.368>
- Statistical Yearbook of Forest (2019) Statistic Poland
- Welc-Fałęciak R, Kowalec M, Karbowiak G (2014) Rickettsiaceae and Anaplasmataceae infections in *Ixodes ricinus* ticks from urban and natural forested areas of Poland. Parasit Vectors 24(7):121. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-121>
- Jahfari S, Coipan EC, Fonville M et al (2014) Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. Parasites Vectors 7:365. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-365>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Oświadczenia współautorów publikacji

Oświadczenie współautora

Warszawa 19.05.2022 r.

(miejscowość, data)

Dr Tomasz Szewczyk

Zakład Ekologii i Ewolucji Pasożytnictwa

Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego

Polska Akademia Nauk

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt.:

Myczka A.W., Szewczyk T., Laskowski Z. The Occurrence of Zoonotic *Anaplasma phagocytophilum* Strains, in the Spleen and Liver of Wild Boars from North-West and Central Parts of Poland. Acta Parasitol. 2021 Sep;66(3):1082-1085. doi: 10.1007/s11686-021-00368-6.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na *: przeprowadzeniu części analiz molekularnych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez mgr. Annę Myczkę jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, opublikowanych w czasopismach naukowych.

Tomasz Szewczyk

podpis osoby składającej oświadczenie

* należy szczegółowo przedstawić opis wykonanych prac współautora, w w/w publikacji

Oświadczenie współautora

19.05.2022 Warszawa

(miejscowość, data)

Dr hab. Zdzisław Laskowski prof. IP PAN

Zakład Ekologii i Ewolucji Pasożytnictwa

Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego

Polska Akademia Nauk

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt.:

Myczka A.W., Szewczyk T., Laskowski Z. The Occurrence of Zoonotic *Anaplasma phagocytophilum* Strains, in the Spleen and Liver of Wild Boars from North-West and Central Parts of Poland. Acta Parasitol. 2021 Sep;66(3):1082-1085. doi: 10.1007/s11686-021-00368-6.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na *: zaprojektowaniu i przeprowadzeniu części badań molekularnych, przeprowadzeniu analizy filogenetycznej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez mgr. Annę Myczkę jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, opublikowanych w czasopismach naukowych.


podpis osoby składającej oświadczenie

* należy szczegółowo przedstawić opis wykonanych prac współautora, w w/w publikacji

Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Wild and Farmed Cervids in Poland

Anna W. Myczka

Żaneta Steiner-Bogdaszewska

Katarzyna Filip-Hutsch

Grzegorz Ołoś

Michał Czopowicz

Zdzisław Laskowski

Wkład doktorantki w publikację:

Pobieranie materiału biologicznego, wykonanie badań z zakresu biologii molekularnej (izolacja DNA, PCR, nested-PCR), część analiz filogenetycznych, część analiz statystycznych przygotowanie i redagowanie tekstu.

Article

Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Wild and Farmed Cervids in Poland

Anna W. Myczka ^{1,*}, Żaneta Steiner-Bogdaszewska ¹, Katarzyna Filip-Hutsch ¹, Grzegorz Ołoś ², Michał Czopowicz ³ and Zdzisław Laskowski ¹

¹ Witold Stefański Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences, Twarda 51/55, 00-818 Warsaw, Poland; zaneta.steiner@gmail.com (Ż.S.-B.); katarzyna.filip@twarda.pan.pl (K.F.-H.); laskowz@gmail.com (Z.L.)

² Institute of Environmental Engineering and Biotechnology, University of Opole, Kardynała B. Kominka 6, 6a, 45-032 Opole, Poland; golos@uni.opole.pl

³ Division of Veterinary Epidemiology and Economics, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW, Nowoursynowska 159c, 02-776 Warsaw, Poland; mczopowicz@gmail.com

* Correspondence: annamyczka@twarda.pan.pl; Tel.: +48-22-697-89-68



Citation: Myczka, A.W.; Steiner-Bogdaszewska, Ż.; Filip-Hutsch, K.; Ołoś, G.; Czopowicz, M.; Laskowski, Z. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Wild and Farmed Cervids in Poland. *Pathogens* **2021**, *10*, 1190. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091190>

Academic Editors: Lawrence S. Young and David Rodríguez-Lázaro

Received: 24 June 2021

Accepted: 10 September 2021

Published: 14 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: The role of cervids in the circulation of *A. phagocytophilum* has not yet been clearly determined; however, several species of wild and farm cervids may be a natural reservoir of this bacteria. Methods: Spleen and liver tissue samples were taken from 207 wild (red deer, roe deer, fallow deer and moose) and farmed cervids (red deer and fallow deer) from five geographical areas. These were tested for the *A. phagocytophilum* 16S rDNA partial gene by nested PCR. Results: *Anaplasma* spp. were detected in 91 of 207 examined cervids (prevalence 43.9%). Three different variants of 16S rDNA partial gene were reported, one for the first time. *Anaplasma phagocytophilum* was more often detected in young specimens than in adults and more often in the spleen than in the liver. Conclusions: Cervids from the four sites across Poland were found to be major natural reservoirs of various strains of *A. phagocytophilum*. This is the first study to use spleen and liver as biological material to detect *A. phagocytophilum* in moose in Poland.

Keywords: *Anaplasma phagocytophilum*; 16S rDNA; wild cervids; farm animals

1. Introduction

Anaplasma phagocytophilum is a Gram-negative, obligate intracellular bacterium that lives mainly in neutrophils. It is a causative agent of HGA (Human Granulocytic Anaplasmosis), TBF (Tickborne Fever) in domestic animals and livestock, and GA (Granulocytic Anaplasmosis) in wild animals [1]. In animals, it was first discovered in sheep (*Ovis aries*) in Scotland, as *Cytoecetes phagocytophila* [2], while it was first reported in humans as *Ehrlichia* spp. in the USA in 1994 [3]. In wild and domestic ruminants, infection with *Anaplasma phagocytophilum* is asymptomatic and does not significantly affect the condition of the animals. However, in severe disease, the symptoms usually include weight loss, reduced milk yield, anorexia and apathy [4,5], with few fatal cases reported in sheep, roe deer (*Capreolus capreolus*) and moose (*Alces alces*) [6,7]. In humans, the symptoms are headache, dizziness, fever, abdominal pain and diarrhea [8]. In both humans and animals, the symptoms are not very specific, which makes it difficult to diagnose anaplasmosis correctly. Since the first cases over 90 years ago, *A. phagocytophilum* has been the subject of interest in both human and veterinary medicine.

The bacteria *Anaplasma phagocytophilum* is transmitted by several tick species, including those of *Ixodes* (*I. ricinus*, *I. pacificus*, *I. scapularis*, *I. persulcatus*) [9,10] and *Dermacentor* spp. (*D. reticulatus*, *D. albipictus*) [11,12]. An infected tick can transmit *A. phagocytophilum* to a range of vertebrate hosts including small mammals, wild cervids and carnivores, wild boars, horses, cattle and domestic animals [1,13–19]. The role of wildlife in the circulation of *A. phagocytophilum* is yet to be clearly determined, but several species of wild ruminants are thought to be important reservoirs [12].

The population of red deer (*Cervus elaphus*), roe deer (*Capreolus capreolus*), fallow deer (*Dama dama*) and other game animals continues to increase in Poland and Europe [20–23]. Moose (*Alces alces*), like other large wild cervids, had also been classified as game animals until 2001, when the government imposed a ban on hunting; since then the moose population has recovered and the population is currently estimated to be approximately 28,000 individuals [24]. The past few years have also seen a rise in the number of deer farms in response to increased demand for venison [25], and according to the Federation of European Deer Farmers Associations, at least 200 deer farms are believed to be in operation in Poland [FEDFA accessed on 08 March 2021]. In Europe, the most common species of farmed deer are red deer and fallow deer [26]. While such farming is still a relatively new trend in Poland, the country is a leading producer of farmed venison in Europe [27]. As such, the growing ecological and economic aspects of forest and livestock management have increased the need for molecular research of pathogens [28].

Detection and genotyping of *Anaplasma phagocytophilum* can lead to determining which strains of this bacterium may or may not be pathogenic for animals and humans and additionally how *A. phagocytophilum* circulates and spreads in the environment [29]. The most common genetic markers used for genotyping *A. phagocytophilum* are: *msp4*, 16S rDNA, *groEL* and *ankA* [30]. In this study, to detect *Anaplasma phagocytophilum* in samples from wild and farmed cervids, 16S rDNA marker was used. The aim of this study was detection of *Anaplasma phagocytophilum* in farmed and wild populations of cervids in Poland. It examines the significance of sex and age on the occurrence of *A. phagocytophilum* infection, and determines whether the spleen or liver is a more appropriate tissue for detection.

2. Results

2.1. Prevalence of *Anaplasma* spp.

Out of 207 examined cervids (165 wild, 42 farmed), evidence of infection with *Anaplasma* spp. was detected in 91 individuals, with a prevalence of 43.9% (44.0%, CI 95%: 37.4%, 50.8%). No positive samples were detected in fallow deer (0/36, 6 wild, 27 farmed). Among the 90 tested red deer (75 wild, 15 farmed), genetic material of *Anaplasma* spp. was detected in 50 individuals: 47 wild animals and three farmed animals. The total prevalence among all red deer was therefore 55.6% (CI 95%: 44.1%, 66.8%): 62.8% (CI 95%: 51.4%, 72.7%) for wild ones and 20% (CI 95%: 7.0%, 45.2%;) for farmed red deer. In addition, *Anaplasma* spp. DNA was detected in 39 of the 70 examined roe deer (39/70, 55.7%) and in two of 11 moose (2/11, 18.2%) (Tables 1 and 2).

Table 1. The prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in age classes.

Species	Young ¹		Adults		p-Value
	No. of Positive Animals/No. of All Young Animals	Prevalence (CI 95%)	No. of Positive Animals/No. of All Adult Animals	Prevalence (CI 95%)	
Red deer (n = 90)	22/33	66.7 (49.6, 80.2)	28/57	49.1 (36.6, 61.7)	0.104
Roe deer (n = 70)	8/14	57.1 (32.6, 78.6)	31/56	55.4 (42.4, 67.6)	0.904
Fallow deer (n = 36)	0/5	0 (0, 43.4)	0/31	0 (0, 11.0)	>0.999
Moose (n = 11)	2/5	40.0 (11.8, 76.9)	0/6	0 (0, 39.0)	0.182
Overall (n = 207)	32/57	56.1 (43.3, 68.2)	59/150	39.3 (31.9, 47.3)	0.030 *

* Difference significant at $\alpha = 0.05$. ¹ Age of animals judged by hunters and based on evidence of animals in Research Station in Kosewo Górne.

The statistical analysis did not show any significant difference in the prevalence of *A. phagocytophilum* between red deer and roe deer ($p = 0.989$). Prevalence was significantly lower in fallow deer than in red deer ($p < 0.001$), roe deer ($p < 0.001$) and moose ($p = 0.001$). Moreover, prevalence in red deer and roe deer were significantly higher than in moose ($p = 0.019$ and 0.021 , respectively) (Table 2). Prevalence did not differ significantly between young and adult individuals of any species ($p = 0.104$ for red deer, $p = 0.904$ for roe deer,

$p > 0.999$ for fallow deer, and $p = 0.182$ for moose), however it was significantly higher in young individuals when all species were analyzed together ($p = 0.030$) (Table 1). No statistically significant differences were found between male and female adults, neither when analyzed separately for each species ($p = 0.470$ for red deer, $p = 0.117$ for roe deer, $p > 0.999$ for fallow deer, and $p > 0.999$ for moose) nor for all adult animals together ($p = 0.069$).

Table 2. The prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in adult animals.

Species	Females		Males		p-Value
	No. of Positive Animals/No. of Females	Prevalence (CI 95%)	No. of Positive Animals/No. of Males	Prevalence (CI 95%)	
Red deer (n = 57)	23/49	46.9 (33.7, 60.6)	5/8	62.5 (30.6, 86.3)	0.470
Roe deer (n = 56)	25/49	51.0 (37.5, 64.4)	6/7	85.7 (48.7, 97.4)	0.117
Fallow deer (n = 31)	0/9	0 (0, 29.9)	0/22	0 (0, 14.9)	>0.999
Moose (n = 6)	0/3	0 (0, 56.2)	0/3	0 (0, 56.2)	>0.999
Overall (n = 150)	48/110	43.6 (34.7, 53.0)	11/40	27.5 (16.1, 42.8)	0.069

2.2. Agreement between Spleen and Liver Samples

Of 172 animals in which both spleen and liver samples were tested, 81 (47.1%) of the animals tested positive in at least one material; however, only 23 animals (28.4% of 81 positive) were positive in both materials. *A. phagocytophilum* was significantly more often isolated from the spleen (66/172; 38.4%) than from the liver (38/172; 22.1%; $p < 0.001$). The agreement beyond chance between results obtained on the spleen and liver samples was moderate (Gwet's AC₁: 41.7%; CI 95%: 29.5%, 53.9%).

2.3. 16S rDNA *Anaplasma phagocytophilum*

Sequences of *A. phagocytophilum* 16S rDNA were obtained from three species: red deer, roe deer and moose. Nine of the obtained sequences submitted to GenBank were identical to each other and were obtained from all three species (*Cervus elaphus*: MZ314415, MZ317900, MZ317903, MZ317901; *Capreolus capreolus*: MZ317898, MZ317904, MZ317899; *Alces alces*: MZ317902, MZ317897). These sequences were found to have 100% similarity to many *Anaplasma phagocytophilum* submissions across: Europe, Asia, North America and Africa from various hosts: tick, domestic animals, farm animals, wild animals (ungulates and carnivores), rodents and humans (Table 3). Three sequences obtained from roe deer (MZ314417, MZ319389, MZ319390) were identical (100% similarity) to only one sequence of *A. phagocytophilum* from roe deer in Spain (MN170723.1) (Table S2). Altogether these four sequences from roe deer may belong to the newly described *A. phagocytophilum* Roe deer strain (reference sequence MZ314417). Moreover, from red deer, one sequence of *A. phagocytophilum*, was found without 100% similarity to any submission in GenBank (high score Percent Identity was 99.75% to *A. phagocytophilum* MN170723.1) and presented a two nucleotide difference of *A. phagocytophilum* reference sequence (NR_044762.1) (Table S2). The sequence was submitted to GenBank with accession number MZ314416. All sequences submitted to GenBank are included in Table 4. Variable sites in 16S rDNA partial gene sequences can be seen in Table S2.

Table 3. Examples of *A. phagocytophilum* sequences with 100% similarity from the NCBI GenBank.

Continent	Host	Country	GenBank No.	
EUROPE	Red fox (<i>Vulpes vulpes</i>)	Switzerland	KX180948.1	
		Poland	MH328211.1	
	Dog (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Croatia	KY114936.1	
		Germany	JX173651.1	
	Sheep (<i>Ovis aries</i>)	Norway	CP015376.1	
	Red deer (<i>Cervus elaphus</i>)	Slovenia	KM215243.1	
	Roe deer (<i>Capreolus capreolus</i>)	Spain	MN170723.1	
	Tick (<i>Ixodes ricinus</i>)	Estonia	MW922755.1	
		Belarus	HQ629915.1	
		Austria	JX173652.1	
	European badger (<i>Meles meles</i>)	Poland	MH328211	
	Wild boar (<i>Sus scrofa</i>)	Poland	MT510541.1	
	Bank vole (<i>Clethrionomys glareolus</i>)	United Kingdom	AY082656.1	
	European hedgehog (<i>Erinaceus europaeus</i>)	Germany	FN390878.1	
	Human (<i>Homo sapiens</i>)	Austria	KT454992.1	
		Belgium	KM259921.1	
AFRICA	Dog (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Republic of South Africa (RSA)	MK814406.1	
	Natal multimammate mouse (<i>Mastomys natalensis</i>)	RSA	MK814411.1	
NORTH AMERICA	Tick (<i>Ixodes pacificus</i>)	United States of America (USA)	KP276588.1	
	Llama (<i>Lama glama</i>)	USA	AF241532.1	
	Horse (<i>Equus ferus caballus</i>)	USA	AF172166.1	
	Coyote (<i>Canis latrans</i>)	USA	AF170728.1	
	Human (<i>Homo sapiens</i>)	USA	AF093788.1	
ASIA	Tick	<i>Ixodes persulcatus</i>	Russia (Irkutsk region)	HM366584.1
		<i>Ixodes ricinus</i>	Turkey	FJ172530.1
		<i>Haemaphysalis longicornis</i>	China	KF569908
			South Korea	GU064898
	Northern red-backed vole (<i>Myodes rutilus</i>)	Russia (Sverdlovsk region)	HQ630622.1	
	Dog (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Iraq	MN453475.1	
		Japan	LC334014.1	
	Raccoon dog (<i>Nyctereutes procyonoides</i>)	South Korea	KY458557.1	
		South Korea	KR611719.1	
	Black-striped field mouse (<i>Apodemus agrarius</i>)	China	GQ412337	
			DQ342324	
	Cat (<i>Felis catus</i>)	South Korea	KR021165.1	
	Cow (<i>Bos taurus taurus</i>)	Turkey	KP745629.1	
	Goat (<i>Capra hircus</i>)	China	KF569909.1	
	Human (<i>Homo sapiens</i>)	South Korea	KP306520.1	

Table 4. Accessions numbers and descriptions of nucleotide sequences submitted to GenBank from this study.

GenBank No.	Host	Sample	Isolation Source	GenBank No.	Region of Origin
MZ314415	Red deer	J23	Spleen	MZ314415	Pisz Forest
MZ317900	Red deer	J28	Spleen	MZ317900	Pisz Forest
MZ317903	Red deer	J75	Liver	MZ317903	Pisz Forest
MZ317901	Red deer	J80	Liver	MZ317901	Pisz Forest
MZ314416	Red deer	J70	Spleen	MZ314416	Pisz Forest
MZ317902	Moose	L9	Liver	MZ317902	Warsaw Urban Forest
MZ317897	Moose	L6	Spleen	MZ317897	Warsaw Urban Forest
MZ314417	Roe deer	S63	Spleen	MZ314417	Strobawa–Turawa Forest
MZ317898	Roe deer	S36	Spleen	MZ317898	Bolimów Forest
MZ317904	Roe deer	S24	Liver	MZ317904	Pisz Forest
MZ317899	Roe deer	S42	Spleen	MZ317899	Pisz Forest
MZ319389	Roe deer	S7	Liver	MZ319389	Pisz Forest
MZ319390	Roe deer	S8	Spleen	MZ319390	Pisz Forest

3. Discussion

Studies performed across Europe on the potential of free-living and farmed cervids as natural reservoirs of *Anaplasma phagocytophilum* have shown these reservoirs to vary depending on the geographical region [5,18,28]. In this study, positive samples for *Anaplasma* spp. were detected in at least one of the analyzed species from four geographical areas in Poland. Only in individuals from Polesie National Park (Lublin Voivodeship) non positive samples were found.

The infection rate of *A. phagocytophilum* in all cervids was shown to be lower than in other European countries [4,18,28,30–33], lower rates, compared to the results of this study were recorded only in Spain, Czech Republic and Italy [31,34–36]. Outside Europe, *A. phagocytophilum* has been detected in deer from Japan, with a prevalence ranging from 15.6 to 75.4%; our results lie in the middle of this range [37,38]. However, in Poland, the prevalence is usually lower [39–42] or at a similar level [43,44].

Genetic marker 16S rDNA is most commonly used to detect *Anaplasma phagocytophilum* among wild and farm animals [17,18,36,39,44]. In this study, three different variants of partial 16S rDNA genetic marker were found (Table S2). One genotype from this group (MZ317901) is very common in the natural environment and on the analyzed fragment is identical with the reference sequence of 16S rDNA *A. phagocytophilum* (NR_044762.1) and with many other *A. phagocytophilum* sequences from various hosts and geographical regions (Table 3). The second variant of described sequences, detected from three roe deer (MZ314417, MZ319389, MZ319390) has one nucleotide change according to reference sequence of 16S rDNA *A. phagocytophilum* (Table S2). Additionally, these three sequences of partial 16S rDNA genetic marker were 100% identical to the sequence from roe deer in Spain (MN170723) [45]. According to our results (Table 4) and the results of Remesar et al. (2020), this strain of *A. phagocytophilum* was detected in three different geographical regions from one animal species—roe deer. This may lead to the conclusion that this strain of *A. phagocytophilum* can be characteristic for bacteria isolated from roe deer. However, to confirm this fact more roe deer samples should be examined.

In the present study, the prevalence of *A. phagocytophilum* in farmed red deer was 20%. Although this rate is significantly lower than that previously reported by Hapunik et al. (2011) [44] in Poland, it is similar to the rate observed in farmed red deer from Germany [18]. In fallow deer, the lack of detection of *A. phagocytophilum* may be due to the fact that the majority (27/36, 75%) of the tested samples came from farmed animals, where the prevalence was typically relatively low [40,44]. In China, a similar study about the

prevalence of *Anaplasma* spp. in wild and farmed cervids reported a lack of positive samples of *A. phagocytophilum* in 68 tested farmed deer [46]. Such a low prevalence, or lack of detection, of *A. phagocytophilum* in farmed animals may be due to the fact, that unlike wild animals, these animals have regular and constant access to feed and are regularly dewormed (twice a year to ectoparasites and endoparasites), which strengthens their condition and makes them less susceptible to infection by *Anaplasma phagocytophilum*. They are much less exposed to tick attacks than wild animals, by regular mowing pastures, minimal contact with wild forest animals (mainly the presence of small and medium-sized rodents is noted), lack of forest coverage and low density of farmed animals (about 8–10 individuals/10,000 m²). The lower number of vectors in the environment may also reduce the prevalence of *A. phagocytophilum* among these animals [44].

Only one previous report has examined the prevalence of *A. phagocytophilum* in moose in Poland. Karbowiak et al. (2015) [41] reported one infected individual (1/7, 14.3%) based on blood samples. In comparison, the present study examined samples that were from the spleen and liver. Our findings indicated that *A. phagocytophilum* was present in both tissues (2/11, 18.18%), and this is the first confirmation of the presence of *A. phagocytophilum* in peripheral tissues in moose in Poland. Comparing results from this study with results from Karbowiak et al. (2015) [41], all types of samples (spleen, liver, blood) are suitable for detection of *A. phagocytophilum*.

Anaplasma phagocytophilum was more than twice as likely to be isolated and detected in the spleen compared to the liver. However, from 91 individuals that tested positive, 19 samples were only from liver samples (without positive result from spleen or lack of spleen sample) and 19 out of 91 positive samples regarded for more than 20% of all positive samples. Therefore, when carrying out this type of analysis with the use of peripheral tissue, based on the obtained results, it is suggested, if possible, to use a larger number and variety of samples than only one from one individual. In Poland the most frequently chosen material for this type of research was blood [39–41,44,47], although sometimes spleen tissue was used to detect *A. phagocytophilum* in Poland [42]. However, recent reports by Hornok et al. (2018) [28] and Kazimirova et al. (2018) [48] showed that more positive samples with *Anaplasma phagocytophilum* detected in wild cervids species came from spleen samples than from whole blood samples.

In the present study, wild red deer and roe deer more frequently tested positive for *Anaplasma phagocytophilum* than the other species, viz wild fallow deer, moose, farmed red deer and farmed fallow deer. In contrast to previous studies, where no differences in *Anaplasma phagocytophilum* infection rate were reported between male and female cervids [18,33,49], our present findings identified a difference at the borderline of statistical significance, suggesting that *A. phagocytophilum* may be more common in females. In addition, a higher prevalence was noted in young individuals, which is in line with reports from Germany [18,33,49]. The regularity of the higher incidence of *Anaplasma phagocytophilum* among young individuals was observed in the analysis of all samples (all cervids) examined in this study. Higher prevalence of *A. phagocytophilum* among young individuals than in adults may be due to the fact that young cervids can have an underdeveloped immune system, which may facilitate the development and maintenance of *Anaplasma phagocytophilum* in their organisms. Additionally, a similar correlation between the higher prevalence of parasites among juveniles was observed in cervids with nematodes from the Protostrongylidae family [50].

4. Materials and Methods

4.1. Materials

Spleen and liver samples from free-ranging red deer, roe deer, moose and fallow deer (n = 207, 165 wild, 42 farmed) were collected in years 2017–2020 in five geographical areas: Pisz Forest (Warmian-Masurian Voivodeship), Bolimów Forest (Łódź Voivodeship), Kampinos National Park (Masovian Voivodeship), Warsaw Urban Forest (Masovian Voivodeship), Polesie National Park (Lublin Voivodeship) and Stobrawa-Turawa Forest

(Opolskie Voivodeship) (Figure 1). Samples from wild game animals were collected during hunting season. Samples from moose (protected animal), were secured on an ongoing basis when there was an opportunity to collect this material and were collected from road kill animals or those found dead by forest and national park employees. In addition, spleen and liver materials were collected from farmed red deer and fallow deer from the Research Station of the Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences in Kosewo Górne (Warmian-Masurian Voivodeship) (Table S1). Demographic characteristics of the study population are presented in Table 5.

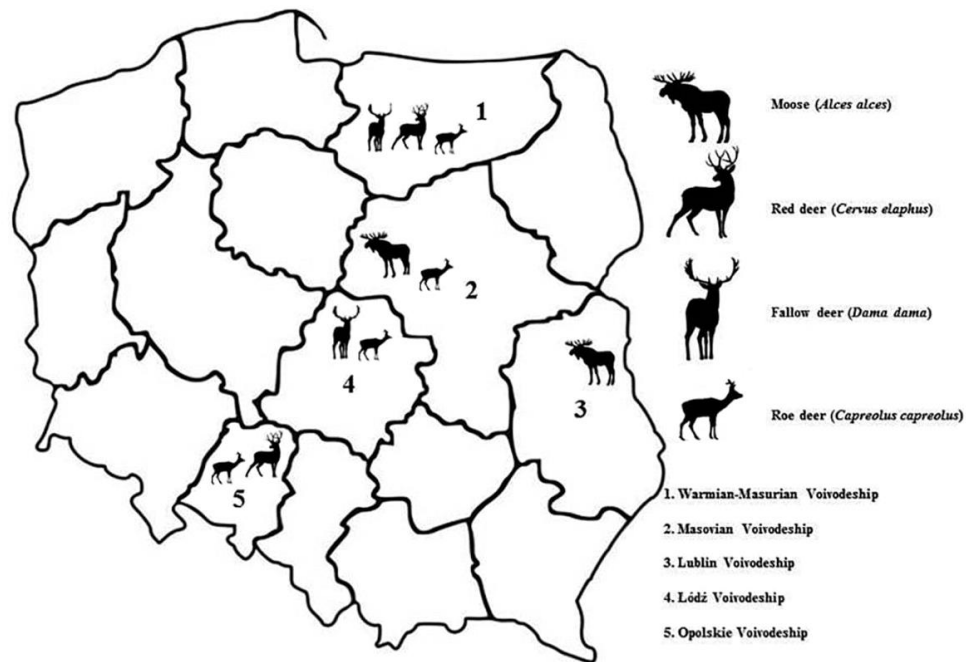


Figure 1. Geographical distribution of the collected samples in Poland.

Table 5. Demographic characteristics of the study population. The numbers of farmed cervids presented in parentheses.

Species	Adults ¹		Young ¹	Total
	Males	Females		
Red deer	8 (0)	49 (15)	33 (0)	90 (15)
Fallow deer	22 (20)	9 (2)	5 (5)	36 (27)
Roe deer	7	49	14	70
Moose	3	3	5	11

¹ Age of animals judged by hunters and based on evidence of animals in Research Station in Kosewo Górne.

4.2. Molecular Methods

DNA from spleen and liver was isolated using a commercial DNA Mini Kit (Syn- gen, Poland) according to the manufacturer's protocol. *Anaplasma* spp. was detected using semi-nested PCR to amplify the partial 16S rDNA gene with specific primers: for the primary reaction: A500 F 5'-CGTTGTTCGGAATTATTGGGCGTA-3', A900 R 5'-CCATGCAGCACCTGTGCGAG-3' and for the semi-nested reaction: A520 F 5'-GGCATGTAGGCGGTTCGGT-3', A900 R 5'-CCATGCAGCACCTGTGCGAG-3' [17]. DNA isolated from wild boar (*Sus scrofa*) infected with *A. phagocytophilum* (MT510541.1) was used as a positive control [19]. Nuclease-free water was added to the PCR mix as a negative control. The PCR products were visualized on a 1.2% agarose gel (Promega, Madi-

son, WI, USA) stained with SimplySafe (EURx, Gdańsk City, Poland) and a size-marked DNA Marker 100 bp LOAD DNA ladder (Syngen, Wrocław, Poland). Visualization was performed using ChemiDoc, MP Lab software (Imagine, BioRad, Hercules, CA, USA). The obtained PCR products were purified with the DNA clean-up Kit (Syngen, Wrocław, Poland). The purified products were sequenced by Genomed (Warsaw, Poland) and assembled using ContigExpress, Vector NTI Advance v.11.0 (Invitrogen Life Technologies, New York, NY, USA). The obtained sequences were compared with sequences from GenBank in BLAST (NCBI, Bethesda, MD, USA) and submitted to GenBank.

4.3. Statistical Analysis

Categorical variables were presented as counts and percentages. Percentages were compared between groups using the maximum likelihood G test or Fisher's exact test (if the expected count in any cell of the contingency table <5) for unpaired groups and McNemar's test for paired groups. The 95% confidence intervals (CI 95%) for percentages were calculated using the Wilson score method [51]. The agreement beyond chance between results obtained on different biological materials was assessed using Gwet's AC₁ coefficient [52] and classed according to Landis and Koch (1977) [53]. A significance level (α) was set at 0.05 and all statistical tests were two-tailed. The statistical analysis was performed in TIBCO Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).

5. Conclusions

Anaplasma phagocytophilum infection seems to be common in red deer and roe deer in Poland. It occurs more often in free-living than in farm red deer. *A. phagocytophilum* is more likely to be detected in spleen than in liver samples, and results obtained on these two types of samples are only moderately consistent. The prevalence of infection seems to be lower than in previous studies, but it is still high in the natural environment. To our knowledge, this is the first study using spleen and liver as biological material to detect *A. phagocytophilum* in moose in Poland.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens10091190/s1>, Table S1: Geographical origin and the number of deer samples, Table S2: Variable sites in 16S rDNA partial gene sequences from *Anaplasma phagocytophilum* aligned with reference sequence derived from GenBank. Nucleotide position numbering is based on the *A. phagocytophilum* 16S rDNA gene sequence, GenBank Accession no. NR_044762.1. In bold sequence changes found in these studies according to reference sequence.

Author Contributions: A.W.M. and Z.L. designed the study; A.W.M., Z.L. and M.C. working on methodology; A.W.M., Z.S.-B., K.F.-H. and G.O. collected biological samples; A.W.M. and Z.L. performed PCR, sequencing and analyzed sequence data; A.W.M. and M.C. conducted statistical analysis; A.W.M. wrote the first draft of the manuscript. All authors read, contributed to and approved the final manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: All wild deer examined in this study were legally hunted in hunting season in Poland by lawfully permitted hunters. Biological samples from farm animals were collected post-mortem. Moose biological samples were collected from animals killed in road accidents or found dead by the forests' staff.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, upon reasonable request.

Acknowledgments: The authors would like to thank: the management and staff of Strzałowo Forest District, Hunting Club No. 9 “Knieja” from Warsaw, the management and staff of the Polesie National Park, Kampinos National Park and Warsaw Urban Forest. The authors also would like to thank DVM Aneta Gralak for helping collected samples. This study is part of a PhD thesis concerning detection *Anaplasma phagocytophilum* in ungulates in Poland.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Woldehiwet, Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet. Parasitol.* **2010**, *167*, 108–122. [\[CrossRef\]](#)
2. Gordon, W.S.; Brownlee, A.; Wilson, D.R.; MacLeod, J. Tick-borne fever (a hitherto undescribed disease of sheep). *J. Comp. Pathol.* **1932**, *45*, 301–307. [\[CrossRef\]](#)
3. Chen, S.M.; Bakken, J.S.; Walker, D.H. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J. Clin. Microbiol.* **1994**, *32*, 589–595. [\[CrossRef\]](#)
4. Stuenkel, S.; Granquist, E.G.; Silaghi, C. *Anaplasma phagocytophilum*-a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2013**, *3*, 31. [\[CrossRef\]](#)
5. Razanske, I.; Rosef, O.; Radzijevska, J.; Bratichikov, M.; Gricuviene, L.; Paulauskas, A. Prevalence and co-infection with tick-borne *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* spp. in red deer (*Cervus elaphus*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) in Southern Norway. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* **2019**, *8*, 127–134. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Jenkins, A.; Handeland, K.; Stuenkel, S.; Schouls, L.; van de Pol, I.; Meen, R.T.; Kristiansen, B.E. Ehrlichiosis in a moose calf in Norway. *J. Wildl. Dis.* **2001**, *37*, 201–203. [\[CrossRef\]](#)
7. Stuenkel, S.; Pettersen, K.S.; Granquist, E.G.; Bergström, K.; Bown, K.J.; Birtles, R.J. *Anaplasma phagocytophilum* variants in sympatric red deer (*Cervus elaphus*) and sheep in southern Norway. *Ticks Tick Borne Dis.* **2013**, *4*, 197–201. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Tylewska-Wierzbanowska, S.; Chmielewski, T. Zoonozy przenoszone przez kleszcze na terenie Polski. *Post. Mikrobiol.* **2010**, *49*, 191–197. (In Polish)
9. Rikihisa, Y. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2011**, *24*, 469–489. [\[CrossRef\]](#)
10. Karbowiak, G.; Biernat, B.; Stańczak, J.; Werszko, J.; Wróblewski, P.; Szewczyk, T.; Sytykiewicz, H. The role of particular ticks developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens in Central Europe. 4. *Anaplasmatidae*. *Ann. Parasitol.* **2016**, *62*, 267–284. [\[CrossRef\]](#)
11. Wirtgen, M.; Nahayo, A.; Linden, A.; Losson, B.; Garigliany, M.; Desmecht, D. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Dermacentor reticulatus ticks. *Vet. Rec.* **2011**, *168*, 195. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Jaarsma, R.I.; Sprong, H.; Takumi, K.; Kazimirova, M.; Silaghi, C.; Mysterud, A.; Rudolf, I.; Beck, R.; Földvári, G.; Tomassone, L.; et al. *Anaplasma phagocytophilum* evolves in geographical and biotic niches of vertebrates and ticks. *Parasit. Vectors* **2019**, *12*, 328. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Granick, J.L.; Armstrong, P.J.; Bender, J.B. *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs: 34 cases (2000–2007). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2009**, *234*, 1559–1565. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Michalik, J.; Stańczak, J.; Cieniuch, S.; Racewicz, M.; Sikora, B.; Dabert, M. Wild boars as hosts of human-pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* variants. *Emerg. Infect. Dis.* **2012**, *18*, 998–1001. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Dziegiel, B.; Adaszek, L.; Kalinowski, M.; Winiarczyk, S. Equine granulocytic anaplasmosis. *Res. Vet. Sci.* **2013**, *95*, 316–320. [\[CrossRef\]](#)
16. Matei, I.A.; D’Amico, G.; Ionică, A.M.; Kalmár, Z.; Corduneanu, A.; Sándor, A.D.; Fiț, N.; Bogdan, L.; Gherman, C.M.; Mihalca, A.D. New records for *Anaplasma phagocytophilum* infection in small mammal species. *Parasit Vectors* **2018**, *11*, 193. [\[CrossRef\]](#)
17. Szewczyk, T.; Werszko, J.; Myczka, A.W.; Laskowski, Z.; Karbowiak, G. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in wild carnivores in north-eastern Poland. *Parasit Vectors* **2019**, *12*, 465. [\[CrossRef\]](#)
18. Silaghi, C.; Fröhlich, J.; Reindl, H.; Hamel, D.; Rehbein, S. *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* Species of Sympatric Roe Deer (*Capreolus capreolus*), Fallow Deer (*Dama dama*), Sika Deer (*Cervus nippon*) and Red Deer (*Cervus elaphus*) in Germany. *Pathogens* **2020**, *9*, 968. [\[CrossRef\]](#)
19. Myczka, A.W.; Szewczyk, T.; Laskowski, Z. The Occurrence of Zoonotic *Anaplasma phagocytophilum* Strains, in the Spleen and Liver of Wild Boars from North-West and Central Parts of Poland. *Acta Parasitol.* **2021**, *66*, 1082–1085. [\[CrossRef\]](#)
20. Burbaitė, L.; Csányi, S. Roe deer population and harvest changes in Europe. *Est. J. Eco.* **2009**, *58*, 169–180. [\[CrossRef\]](#)
21. Burbaitė, L.; Csányi, S. Red deer population and harvest changes in Europe. *Acta Zool. Litu.* **2010**, *20*, 179–188. [\[CrossRef\]](#)
22. Massei, G.; Kindberg, J.; Licoppe, A.; Gačić, D.; Šprem, N.; Kamler, J.; Baubet, E.; Hohmann, U.; Monaco, A.; Ozoliņš, J.; et al. Wild boar populations up, numbers of hunters down? A review of trends and implications for Europe. *Pest Manag. Sci.* **2015**, *71*, 492–500. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Statistic Poland. *Statistical Yearbook of Forest*; Statistic Poland: Warsaw, Poland, 2020; p. 28.
24. Wawrzyniak, P. Population dynamics, its impact upon the habitat and necessity of management the moose (*Alces alces*) population in Poland. In Proceedings of the Conference “Zarządzanie Populacjami Zwierząt”, Warsaw, Poland, 5 August 2016; Łowiec Polski: Warsaw, Poland, 2016; pp. 17–27. (In Polish).

25. Daszkiewicz, T.; Hnatyk, N.; Dąbrowski, D.; Janiszewski, P.; Gugolek, A.; Kubiak, D.; Śmiecińska, K.; Winarski, R.; Koba-Kowalczyk, M. A comparison of the quality of the Longissimus lumborum muscle from wild and farm-raised fallow deer (*Dama dama* L.). *Small Rumin. Res.* **2015**, *129*, 77–83. [\[CrossRef\]](#)
26. Kudrnáčová, E.; Bartoň, L.; Bureš, D.; Hoffman, L.C. Carcass and meat characteristics from farm-raised and wild fallow deer (*Dama dama*) and red deer (*Cervus elaphus*): A review. *Meat Sci.* **2018**, *141*, 9–27. [\[CrossRef\]](#)
27. Kuba, J.; Landete-Castillejos, T.; Udała, J. Red deer farming: Breeding practice, trends and potential in Poland-A Review. *Ann. Anim. Sci.* **2015**, *15*, 591–599. [\[CrossRef\]](#)
28. Hornok, S.; Sugár, L.; Fernández de Mera, I.G.; de la Fuente, J.; Horváth, G.; Kovács, T.; Micsutka, A.; Gönczi, E.; Flaisz, B.; Takács, N.; et al. Tick- and fly-borne bacteria in ungulates: The prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, haemoplasmas and rickettsiae in water buffalo and deer species in Central Europe, Hungary. *BMC Vet. Res.* **2018**, *14*, 98. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Rymaszewska, A. Genotyping of *Anaplasma phagocytophilum* strains from Poland for selected genes. *Folia Biol.* **2014**, *62*, 37–48. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Stigum, V.M.; Jaarsma, R.I.; Sprong, H.; Rolandsen, C.M.; Mysterud, A. Infection prevalence and ecotypes of *Anaplasma phagocytophilum* in moose *Alces alces*, red deer *Cervus elaphus*, roe deer *Capreolus capreolus* and *Ixodes ricinus* ticks from Norway. *Parasit Vectors* **2019**, *12*, 1. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Petrovec, M.; Sixl, W.; Schweiger, R.; Mikulasek, S.; Elke, L.; Wüst, G.; Marth, E.; Strasek, K.; Stünzner, D.; Avsic-Zupanc, T. Infections of wild animals with *Anaplasma phagocytophilum* in Austria and the Czech Republic. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2003**, *990*, 103–106. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Dugat, T.; Zanella, G.; Véran, L.; Lesage, C.; Girault, G.; Durand, B.; Lagrée, A.C.; Boulouis, H.J.; Haddad, N. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis potentially reveals the existence of two groups of *Anaplasma phagocytophilum* circulating in cattle in France with different wild reservoirs. *Parasit Vectors* **2016**, *9*, 596. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Kauffmann, M.; Rehbein, S.; Hamel, D.; Lutz, W.; Heddergott, M.; Pfister, K.; Silaghi, C. *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* spp. In roe deer (*Capreolus capreolus*), fallow deer (*Dama dama*) and mouflon (*Ovis musimon*) in Germany. *Mol. Cell Probes.* **2017**, *31*, 46–54. [\[CrossRef\]](#)
34. Veronesi, F.; Galuppi, R.; Tampieri, M.P.; Bonoli, C.; Mammoli, R.; Piergili Fioretti, D. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in fallow deer (*Dama dama*) and feeding ticks from an Italy preserve. *Res. Vet. Sci.* **2011**, *90*, 40–43. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. García-Pérez, A.L.; Oporto, B.; Espí, A.; del Cerro, A.; Barral, M.; Povedano, I.; Barandika, J.F.; Hurtado, A. Anaplasmataceae in wild ungulates and carnivores in northern Spain. *Ticks Tick Borne Dis.* **2016**, *7*, 264–269. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Díaz-Cao, J.M.; Adaszek, Ł.; Dzięciel, B.; Paniagua, J.; Caballero-Gómez, J.; Winiarczyk, S.; Winiarczyk, D.; Cano-Terriza, D.; García-Bocanegra, I. Prevalence of selected tick-borne pathogens in wild ungulates and ticks in southern Spain. *Transbound Emerg. Dis.* **2021**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Masuzawa, T.; Uchishima, Y.; Fukui, T.; Okamoto, Y.; Muto, M.; Koizumi, N.; Yamada, A. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* from Wild Boars and Deer in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **2011**, *64*, 333–336.
38. Matsuo, K.; Moribe, J.; Abe, N. Molecular Detection and Characterization of *Anaplasma* Species in Wild Deer and Boars in Gifu Prefecture, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **2017**, *70*, 354–356. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Michalik, J.; Stańczak, J.; Racewicz, M.; Cieniuch, S.; Sikora, B.; Szubert-Kruszyńska, A.; Grochowalska, R. Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in wild cervids and feeding *Ixodes ricinus* ticks from west-central Poland. *Clin. Microbiol. Infect.* **2009**, *2*, 81–83. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Adaszek, Ł.; Klimiuk, P.; Skrzypczak, M.; Górna, M.; Zietek, J.; Winiarczyk, S. The identification of *Anaplasma* spp. Isolated from fallow deer (*Dama dama*) on a free-range farm in eastern Poland. *Pol. J. Vet. Sci.* **2012**, *15*, 393–394. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Karbowiak, G.; Vichová, B.; Werszko, J.; Demiaszkiewicz, A.W.; Pyziel, A.M.; Sytykiewicz, H.; Szewczyk, T.; Pet'ko, B. The infection of reintroduced ruminants-Bison bonasus and Alces alces-with *Anaplasma phagocytophilum* in northern Poland. *Acta Parasitol.* **2015**, *60*, 645–648. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Teodorowski, O.; Radzki, R.; Kalinowski, M.; Winiarczyk, S.; Garcia Bocanegra, I.; Winiarczyk, D.; Adaszek, Ł. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in roe deer (*Capreolus capreolus*) in eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2020**, *27*, 702–705. [\[CrossRef\]](#)
43. Skotarczak, B.; Adamska, M.; Sawczuk, M.; Maciejewska, A.; Wodecka, B.; Rymaszewska, A. Coexistence of tick-borne pathogens in game animals and ticks in western Poland. *Vet. Med.* **2008**, *53*, 668–675. [\[CrossRef\]](#)
44. Hapunik, J.; Vichová, B.; Karbowiak, G.; Wita, I.; Bogdaszewski, M.; Pet'ko, B. Wild and farm breeding cervids infections with *Anaplasma phagocytophilum*. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2011**, *18*, 73–77.
45. Yang, J.; Liu, Z.; Niu, Q.; Luo, J.; Wang, X.; Yin, H. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in wild cervids and hares in China. *J. Wildl. Dis.* **2017**, *53*, 420–423. [\[CrossRef\]](#)
46. Remesar, S.; Díaz, P.; Prieto, A.; García-Dios, D.; Fernández, G.; López, C.M.; Panadero, R.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P. Prevalence and molecular characterization of *Anaplasma phagocytophilum* in roe deer (*Capreolus capreolus*) from Spain. *Ticks Tick Borne Dis.* **2020**, *11*, 101351. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Adamska, M. The role of different species of wild ungulates and *Ixodes ricinus* ticks in the circulation of genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in a forest biotope in north-western Poland. *Ticks Tick Borne Dis.* **2020**, *11*, 101465. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

48. Kazimírová, M.; Hamšíková, Z.; Špitalská, E.; Minichová, L.; Mahříková, L.; Caban, R.; Sprong, H.; Fonville, M.; Schnittger, L.; Kocianová, E. Diverse tick-borne microorganisms identified in free-living ungulates in Slovakia. *Parasit Vectors* **2018**, *11*, 495. [[CrossRef](#)]
49. Silaghi, C.; Hamel, D.; Thiel, C.; Pfister, K.; Passos, L.M.; Rehbein, S. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in wild caprine and cervid ungulates from the Alps in Tyrol, Austria. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2011**, *11*, 355–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Ball, M.C.; Lankester, M.W.; Mahoney, S.P. Factors affecting the distribution and transmission of *Elaphostrongylus rangiferi* (Protostrongylidae) in caribou (*Rangifer tarandus caribou*) of Newfoundland, Canada. *Can. J. Zool.* **2011**, *79*, 1265–1277. [[CrossRef](#)]
51. Altman, D.G.; Machin, D.; Bryantm, T.N.; Gardner, M.J. *Statistics with Confidence*, 2nd ed.; BMJ Books: Bristol, UK, 2000.
52. Gwet, K.L. Computing inter-rater reliability and its variance in the presence of high agreement. *Br. J. Math. Stat. Psychol.* **2008**, *61 Pt 1*, 29–48. [[CrossRef](#)]
53. Landis, J.R.; Koch, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* **1977**, *33*, 159–174. [[CrossRef](#)]

Oświadczenia współautorów publikacji

Oświadczenie współautora

Kosewo Górne, 14.06.2021

(miejscowość, data)

Mgr Żaneta Steiner - Bogdaszewska

Stacja Badawcza

Instytutu Parazytologii im. Witolda Stefańskiego

Polska Akademia Nauk

w Kosewie Górnym

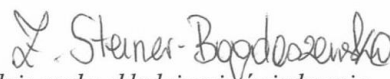
OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt.:

Myczka A.W., Steiner-Bogdaszewska Ż., Filip-Hutsch K., Ołoś G., Czopowicz M., Laskowski Z. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Wild and Farmed Cervids in Poland. Pathogens. 2021 Sep 14;10(9):1190. doi: 10.3390/pathogens10091190.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na *: pobraniu i zabezpieczeniu części próbek materiału biologicznego od zwierząt.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez mgr Annę Myczkę jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, opublikowanych w czasopiśmie naukowym.


podpis osoby składającej oświadczenie

* należy szczegółowo przedstawić opis wykonanych prac współautora, w w/w publikacji

Oświadczenie współautora

WARSZAWA 7.06.2022 r.

(miejscowość, data)

Dr Katarzyna Filip - Hutsch

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt.:

Myczka A.W., Steiner-Bogdaszewska Ż., Filip-Hutsch K., Ołoś G., Czopowicz M., Laskowski Z. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Wild and Farmed Cervids in Poland. Pathogens. 2021 Sep 14;10(9):1190. doi: 10.3390/pathogens10091190.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na *: pobraniu i zabezpieczeniu części próbek materiału biologicznego od zwierząt oraz redagowaniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez mgr. Annę Myczkę jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, opublikowanych w czasopiśmie naukowym.

Katarzyna Filip-Hutsch
podpis osoby składającej oświadczenie

* należy szczegółowo przedstawić opis wykonanych prac współautora, w w/w publikacji

Oświadczenie współautora

Opole, 10.06.2022

(miejscowość, data)

Mgr Grzegorz Ołoś

Instytut Inżynierii Środowiska i Biotechnologii

Uniwersytet Opolski

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt.:

Myczka A.W., Steiner-Bogdaszewska Ż., Filip-Hutsch K., Ołoś G., Czopowicz M., Laskowski Z. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Wild and Farmed Cervids in Poland. Pathogens. 2021 Sep 14;10(9):1190. doi: 10.3390/pathogens10091190.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na *: pobraniu i zabezpieczeniu części próbek materiału biologicznego od zwierząt.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez mgr Annę Myczkę jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, opublikowanych w czasopismach naukowych.


podpis osoby składającej oświadczenie

* należy szczegółowo przedstawić opis wykonanych prac współautora, w w/w publikacji

Oświadczenie współautora

Warsawa 1.06.2022

(miejscowość, data)

Dr hab. Michał Czopowicz, prof. SGGW

Samodzielny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

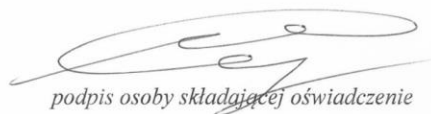
OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt.:

Myczka A.W., Steiner-Bogdaszewska Ż., Filip-Hutsch K., Ołoś G., Czopowicz M., Laskowski Z. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Wild and Farmed Cervids in Poland. Pathogens. 2021 Sep 14;10(9):1190. doi: 10.3390/pathogens10091190.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na *: wykonaniu analiz statystycznych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez mgr Annę Myczkę jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, opublikowanych w czasopismach naukowych.



podpis osoby składającej oświadczenie

* należy szczegółowo przedstawić opis wykonanych prac współautora, w w/w publikacji

Oświadczenie współautora

19.05.2022 Warszawa

(miejscowość, data)

Dr hab. Zdzisław Laskowski prof. IP PAN

Zakład Ekologii i Ewolucji Pasożytnictwa

Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego

Polska Akademia Nauk

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt.:

Myczka A.W., Steiner-Bogdaszewska Ż., Filip-Hutsch K., Ołoś G., Czopowicz M., Laskowski Z. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Wild and Farmed Cervids in Poland. Pathogens. 2021 Sep 14;10(9):1190. doi: 10.3390/pathogens10091190.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na *: zaprojektowaniu starterów do badań molekularnych, przeprowadzeniu analizy filogenetycznej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez mgr. Annę Myczkę jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, opublikowanych w czasopismach naukowych.

Zdzisław Laskowski
podpis osoby składającej oświadczenie

* należy szczegółowo przedstawić opis wykonanych prac współautora, w w/w publikacji

Prevalence and Genotyping of *Anaplasma phagocytophilum* Strains from Wild Animals, European Bison (*Bison bonasus*) and Eurasian Moose (*Alces alces*) in Poland

Anna W. Myczka

Stanisław Kaczor

Katarzyna Filip-Hutsch

Michał Czopowicz

Elwira Plis-Kuprianowicz

Zdzisław Laskowski

Wkład doktorantki w publikację:

Wykonanie badań z zakresu biologii molekularnej (izolacja DNA, PCR, nested-PCR), część analiz filogenetycznych, część analiz statystycznych przygotowanie i redagowanie tekstu.

Article

Prevalence and Genotyping of *Anaplasma phagocytophilum* Strains from Wild Animals, European Bison (*Bison bonasus*) and Eurasian Moose (*Alces alces*) in Poland

Anna W. Myczka ^{1,*} , Stanisław Kaczor ², Katarzyna Filip-Hutsch ³, Michał Czopowicz ⁴ ,
Elwira Plis-Kuprianowicz ⁵ and Zdzisław Laskowski ¹ 

¹ Witold Stefański Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences, Twarda 51/55, 00-818 Warsaw, Poland; laskowz@twarda.pan.pl

² District Veterinary Inspectorate, Młynarska 45, 38-500 Sanok, Poland; kaczor2007@op.pl

³ Department of Food Hygiene and Public Health Protection, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences—SGGW, Nowoursynowska 159, 02-776 Warsaw, Poland; katarzyna_filip-hutsch@sggw.edu.pl

⁴ Division of Veterinary Epidemiology and Economics, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences—SGGW, Nowoursynowska 159c, 02-776 Warsaw, Poland; mczopowicz@gmail.com

⁵ Białowieża National Park, Park Pałacowy 11, 17-230 Białowieża, Poland; elwira.plis@bpn.com.pl

* Correspondence: annamyczka@twarda.pan.pl



Citation: Myczka, A.W.; Kaczor, S.; Filip-Hutsch, K.; Czopowicz, M.; Plis-Kuprianowicz, E.; Laskowski, Z. Prevalence and Genotyping of *Anaplasma phagocytophilum* Strains from Wild Animals, European Bison (*Bison bonasus*) and Eurasian Moose (*Alces alces*) in Poland. *Animals* **2022**, *12*, 1222. <https://doi.org/10.3390/ani12091222>

Academic Editor: Rita Tinoco Torres

Received: 25 April 2022

Accepted: 6 May 2022

Published: 9 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: The populations of bison and moose, the largest wild ruminants in Poland, are growing every year. These animals return to Polish forests after many years of risk of extinction or, as in the case of European bison, are reintroduced step by step. Unfortunately, they are still rare and require close health surveillance and monitoring. One serious threat to their health and life is the bacterial parasite *Anaplasma phagocytophilum*. Moose and bison can also be sources of pathogenic bacteria for humans, which can be transferred through tick bites. In line with the World Health Organization (WHO) “OneHealth” program, indicating that animal health affects human health and vice versa, the following study examines the occurrence of *Anaplasma phagocytophilum* bacteria in European bison and Eurasian moose populations using molecular biology tools. Our results provide useful data regarding *Anaplasma phagocytophilum* that could be used in future strategies for the diagnosis and treatment of people and animals.

Abstract: Wild large ungulates, like European bison (*Bison bonasus*) and Eurasian moose (*Alces alces*), form an important part of the circulation of *Anaplasma phagocytophilum*, a Gram-negative, intracellular, tick-transmitted bacterium, in the natural environment. Bison and moose tissue samples were subjected to 16S rDNA, *groEL* and *ankA* partial gene marker amplification with specific primers using various variants of PCR. Out of 42 examined individuals, *Anaplasma* sp. were detected in 4/13 Eurasian moose (31%) and 7/29 European bison (24%). In addition, 12 *groEL* and 5 *ankA* partial gene positive samples were obtained from the examined animals. The phylogenetic analysis of the *groEL* partial gene classified samples from European bison to ecotype I, and samples from Eurasian moose to ecotype I and II; the analysis of the *ankA* partial gene assigned the samples to clusters I and IV. This study extends knowledge about *A. phagocytophilum* in wild large ungulates in Poland. This is the first report about the occurrence of *Anaplasma* sp. in one of the largest populations of free living European bison in the world. Our findings confirm that strains of *A. phagocytophilum* from *Bison bonasus* and *Alces alces* may constitute a natural reservoir of pathogenic HGA *Anaplasma* strains.

Keywords: *Anaplasma phagocytophilum*; 16S rDNA; *groEL*; *ankA*; *Bison bonasus*; *Alces alces*

1. Introduction

Anaplasma phagocytophilum is a Gram-negative, intracellular, tick-transmitted bacterium from the Anaplasmataceae family known as the causative agent of anaplasmo-

sis [1,2]. The first report of *A. phagocytophilum* was published in the 1930s [3]. Since then, it has been known as *Cytoecetes phagocytophila*, *Ehrlichia phagocytophila* and *E. equi*. [2]. Finally, in the early 2000s, the species were unified into *A. phagocytophilum* [4].

The new classification of *Anaplasma phagocytophilum* in 2001 [4] was based on the genetic analysis of the 16S rDNA gene, and since then this genetic marker, full or partial, has been used for detection and phylogenetic analysis [5–9]. In addition, the genes *groEL*, *ankA*, *msp2* and *msp4* are frequently used for identifying *A. phagocytophilum* strains [10–12]. *Anaplasma phagocytophilum* has been divided into four ecotypes circulating in the environment based on the *groEL* heat-shock operon gene [6,11,13]. Of these, ecotypes III and IV have clearly defined hosts, i.e., ecotype III is associated with rodents and VI with birds, while variants I and II have a range of varied hosts: ecotype I has been associated with goats (*Capra hircus*), hedgehogs (*Erinaceus europaeus*), roe deer (*Capreolus capreolus*) and humans, and ecotype II with ruminants [11,14]. All ecotypes occur in various vectors from the *Ixodes* genus [12,15]. Based on the analysis of the *ankA* gene, *A. phagocytophilum* strains can be divided into five clusters, with each strain being correlated with a host species [1,16–18]. Cluster I includes strains associated with humans, companion and farm animals, while cluster II and III are associated with roe deer and cluster IV with various ruminants, including sheep (*Ovis aries*), European bison (*Bison bonasus*) and cows (*Bos taurus taurus*). Cluster V is associated with rodents [1,14,16–18].

The Eurasian moose (*Alces alces*) (IUCN—least concern LC) and European bison (IUCN—near threatened NT) are under protected status in Poland (Dz.U. 2005 nr 48 poz. 459, Dz.U. 2004 nr 92 poz. 880). A ban on hunting moose has been in place since 2001 (suspension of hunting/moratorium), and the European bison is under strict protection. Both species were progressively reintroduced in Poland following WW I and WW II [19,20]. The strains of *Anaplasma phagocytophilum* identified in Europe are more virulent for wild and farm animals, especially cattle and ruminants, than humans [1,9]. However, more than 5000 human granulocytic anaplasmosis (HGA) cases were reported in 2019 in the USA (Centers for Disease Control and Prevention—CDC) compared to around 300 in Europe [21]. Although the European bison and Eurasian moose populations in Poland have stabilized relatively recently, both species remain rare and demand close supervision and health monitoring.

The aim of this study was to detect *Anaplasma phagocytophilum* in tissues from wild European bison and Eurasian moose, and to genotype and characterize the detected strains with the use of 16S rDNA, *groEL* and *ankA* genetic markers. The conducted analysis will be used to provide a classification of *A. phagocytophilum* into ecotypes and clusters. This study is the first *groEL* and *ankA* marker-based genetic characterization of *A. phagocytophilum* strains in Eurasian moose in Poland.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

The tissue samples from the moose were collected in the period 2018 to 2021 from two localizations in Poland: the Kampinos National Park ($n = 5$), Warsaw Urban Forests ($n = 6$) in Mazovian Voivodeship (D) and the Polesie National Park ($n = 2$) in the Lublin Voivodeship (B) (Figure 1). As hunting for moose is illegal in Poland, all samples were collected from road kill specimens or animals found dead by forest and national park employees. The samples from the European bison were collected in the years 2021 to 2022, also in two locations: the Bieszczady Mountains (Subcarpathian Voivodeship) (C) and the Białowieża Primeval Forest (Podlaskie Voivodeship) (A) (Figure 1). In the Białowieża Primeval Forest, the tissue samples were taken from specimens that were found dead ($n = 5$) or had been legally eliminated ($n = 4$) by employees of the Białowieża National Park. Any spleen or liver samples from European bison in the Bieszczady Mountains were collected from individuals ($n = 20$) culled according to the decision of the General Directorate for Environmental Protection (DZP-WG.6401.2.2021.EB). Spleen and liver samples were collected with the approval of the Regional Directorate for Environmental Protection in Rzeszów.

2.2. Molecular Methods

DNA was isolated from the spleen and liver using a commercial DNA Mini Kit (Syn- gen, Wrocław, Poland) according to the manufacturer's protocol. *Anaplasma* spp. was de- tected using semi-nested PCR to amplify the partial 16S rDNA according to Szewczyk et al. (2019) [22]. Positive samples were additionally tested for the partial *groEL* and *ankA* genes with nested PCR according to Alberti et al. (2005) [10] and Massung et al. (2007) [23], respectively. DNA amplification was performed using the DNA Engine T100 Thermal Cy- clier (BioRad, Hercules, CA, USA). DNA isolated from wild boar (*Sus scrofa*) infected with *A. phagocytophilum* (MT510541.1) was used as a positive control [24]. The PCR prod- ucts were visualized on a 1.2% agarose gel (Promega, Madison, WI, USA) stained with SimplySafe (EURx, Gdańsk, Poland) and a size-marked DNA Marker 100 bp LOAD DNA ladder (Syn- gen, Wrocław, Poland). Visualization was performed using ChemiDoc, MP Lab software (Imagine, BioRad, Hercules, CA, USA). The obtained PCR products were purified with the DNA clean-up Kit (Syn- gen, Wrocław, Poland). Products were sequenced by Genomed (Warsaw, Poland) and assembled using ContigExpress, Vector NTI Advance v.11.0 (Invitrogen Life Technologies, New York, NY, USA). The obtained sequences were compared with those from GenBank in BLAST (NCBI, Bethesda, MD, USA) and submitted to GenBank. Phylogenetic trees were constructed using Bayesian inference (BI), as imple- mented in the MrBayes version 3.2.0 software [25]. The HKY + G for *groEL* and GTR + I + G for *ankA* model was chosen as the best-fitting nucleotide substitution model using JModelTest version 2.1.10 software [26,27]. The analysis was run for 1,000,000 generations, with 250,000 generations discarded as burn-in. The phylogenetic trees were visualized using the TreeView software (S&N Genealogy Supplies, Chilmark, UK).

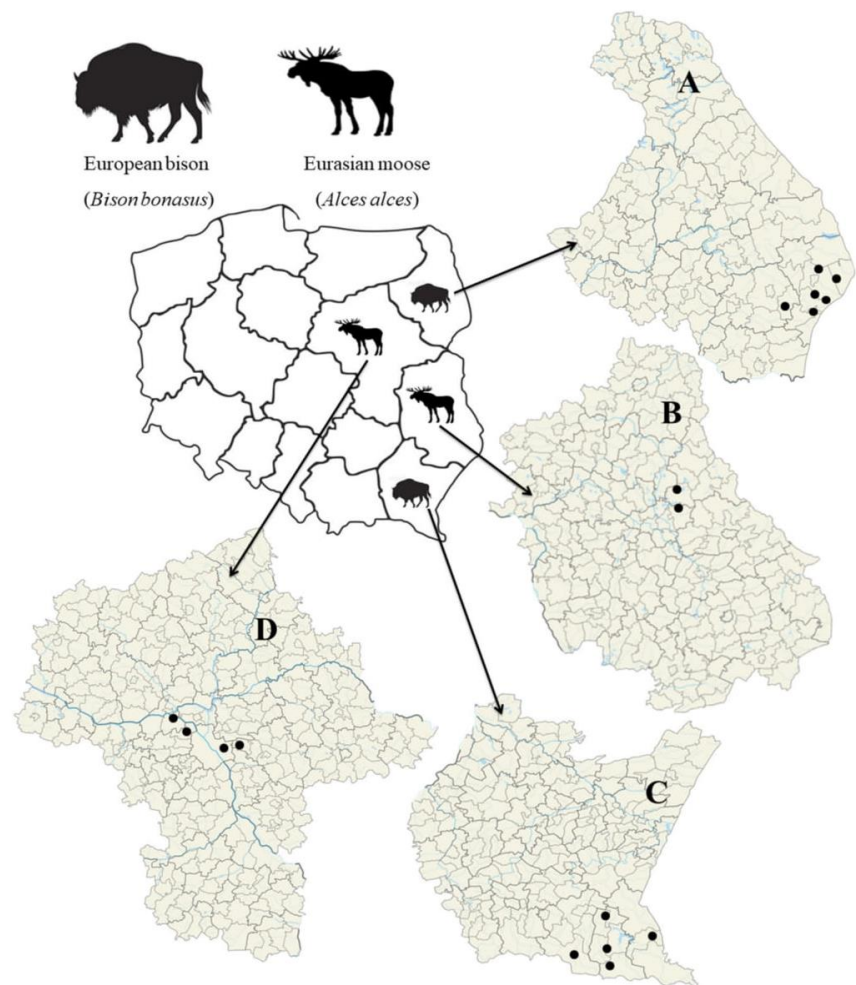


Figure 1. Sampling location in western and central parts of Poland. A—Podlaskie Voivodeship; B—Lublin Voivodeship; C—Subcarpathian Voivodeship; D—Masovian Voivodeship.

2.3. Statistical Methods

Categorical variables were presented as counts and percentages, and compared between groups using Fisher's exact test. The 95% confidence intervals (CI 95%) for percentages were calculated using the Wilson score method [28]. A significance level (α) was set at 0.05, and all statistical tests were two-tailed. The statistical analysis was performed in TIBCO Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).

3. Results

3.1. Prevalence

In total, samples collected from 42 animals, i.e., 13 moose and 29 European bison, were tested. Some of the findings regarding the detection of *Anaplasma* sp. in Eurasian moose have been published previously [9]. In the spleen samples, *Anaplasma* sp. 16S rDNA partial gene was detected in four moose and six bison. In the liver samples, 16S rDNA was detected in three moose and one bison. In total, 11 animals tested positive for *Anaplasma* spp. (26%; CI 95%: 15%–41%)—four of 13 Eurasian moose (31%; CI 95%: 13%–58%) and seven of 29 European bison (24%; CI 95%: 12%–42%). By region, the prevalence of *Anaplasma*

spp. in the European bison population was 44% (CI 95%: 19%–73%; 4/9) in the Bi-ałowieża Primeval Forest, and only 15% (CI 95% 5%–36%; 3/20) in the Bieszczady Mountain ($p = 0.158$).

3.2. 16S rDNA

A random selection of samples found to be positive for *Anaplasma* spp. 16S rDNA partial gene were sent for sequencing. The sequences from *Bison bonasus* (ON007214, ON025953) were identical to each other, and both demonstrated a 100% similarity with a common strain of *Anaplasma phagocytophilum*. Among the moose (*Alces alces*), one of the identified 16S rDNA sequence variants was previously described in Myczka et al. (2021a) [9]. All sequences from European bison and Eurasian moose were found to be identical to each other; they were also identical to many submissions (Table 1) from Europe, Asia and North America associated with various hosts: carnivores, ungulates, humans, small mammals, insects and ticks.

Table 1. Examples of *Anaplasma phagocytophilum* 16S rDNA sequences with 100% similarity to our 16S rDNA sequences, from the NCBI GenBank.

Hosts Group	Host	Country	Gen Bank No.	
Carnivores	Red fox (<i>Vulpes vulpes</i>)	Switzerland	KX180948.1	
		Poland	MH328211.1	
		Croatia	KY114936.1	
	Dog (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Germany	JX173651.1	
		Republic of South Africa (RSA)	MK814406.1	
		Iraq	MN453475.1	
		Japan	LC334014.1	
	European badger (<i>Meles meles</i>)	Poland	MH328211	
	Coyote (<i>Canis latrans</i>)	United States of America (USA)	AF170728.1	
	Raccoon dog (<i>Nyctereutes procyonoides</i>)	South Korea	KY458557.1	
Cat (<i>Felis catus</i>)	South Korea	KR021165.1		
Humans	European polecat (<i>Mustela putorius</i>)	Poland	MH328208.1	
		Homo sapiens	Austria	KT454992.1
			Belgium	KM259921.1
			USA	AF093788.1
			South Korea	KP306520.1
Small mammals	Bank vole (<i>Clethrionomys glareolus</i>)	United Kingdom	AY082656.1	
	Natal multimammate mouse (<i>Mastomys natalensis</i>)	RSA	MK814411.1	
	Northern red-backed vole (<i>Myodes rutilus</i>)	Russia (Sverdlovsk region)	HQ630622.1	
	Black-striped field mouse (<i>Apodemus agrarius</i>)	South Korea	KR611719.1	
		China	GQ412337	
			DQ342324	
	European hedgehog (<i>Erinaceus europaeus</i>)	Germany	FN390878.1	

Table 1. Cont.

Hosts Group	Host	Country	Gen Bank No.
Insect	<i>Ixodes ricinus</i>	Estonia	MW922755.1
		Belarus	HQ629915.1
		Austria	JX173652.1
		Turkey	FJ172530.1
	<i>Ixodes pacificus</i>	USA	KP276588.1
	<i>Ixodes persulcatus</i>	Russia (Irkutsk region)	HM366584.1
	<i>Ixodes tapirus</i>	Panama	MW677508.1
	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	China	KF569908
		South Korea	GU064898
Ungulates	<i>Haematopota pluvialis</i>	Poland	MH844585.1
	Sheep (<i>Ovis aries</i>)	Norway	CP015376.1
	Red deer (<i>Cervus elaphus</i>)	Slovenia	KM215243.1
	Roe deer (<i>Capreolus capreolus</i>)	Spain	MN170723.1
	Wild boar (<i>Sus scrofa</i>)	Poland	MT510541.1
	Llama (<i>Lama glama</i>)	USA	AF241532.1
	Horse (<i>Equus ferus caballus</i>)	USA	AF172166.1
	Cow (<i>Bos taurus taurus</i>)	Turkey	KP745629.1
	Goat (<i>Capra hircus</i>)	China	KF569909.1

3.3. groEL

In total, 12 *groEL* partial gene positive samples were obtained from the spleen and liver samples. Seven randomly chosen samples, i.e., three from Eurasian moose and four from European bison, were sequenced. The obtained sequences (OM835683–OM835689), together with GenBank data, were used to build a phylogenetic tree (Figure 2). The phylogenetic analysis placed most of the sequences into ecotype I. Only one sequence from *Alces alces* (OM835683) was classified to ecotype II, according to Jahfari et al. (2014) [11].

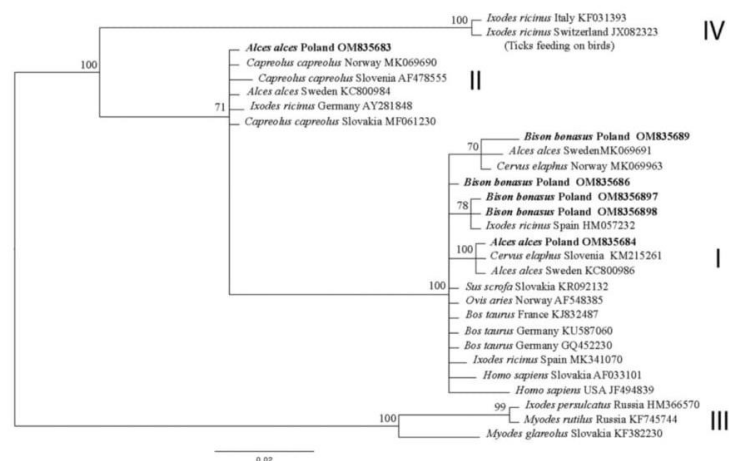


Figure 2. Phylogenetic tree of *groEL* partial gene (528 bp) haplotypes from *Anaplasma phagocytophilum*, constructed by Bayesian inference (BI) analysis using MrBayes version 3.2. The HKY + G model was chosen as the best-fitting nucleotide substitution model using JModelTest version 2.1.10 software. The scale bars are proportional to the number of substitutions per site. In bold, sequences from this study. I–IV ecotype of *A. phagocytophilum* according to Jahfari et al. (2014) [11].

3.4. ankA

Of the 11 positive individuals, five partial *ankA* genes were obtained: two from bison and three from moose. This marker was only successfully amplified from spleen samples in European bison, but from both tissues from Eurasian moose. Only one moose demonstrated the *ankA* gene in both tissue samples. The obtained sequences have been deposited in the GenBank database under accession numbers: OM835678–OM835682. Our *ankA* partial gene nucleotide sequence was assigned to three groups (Figure 3).

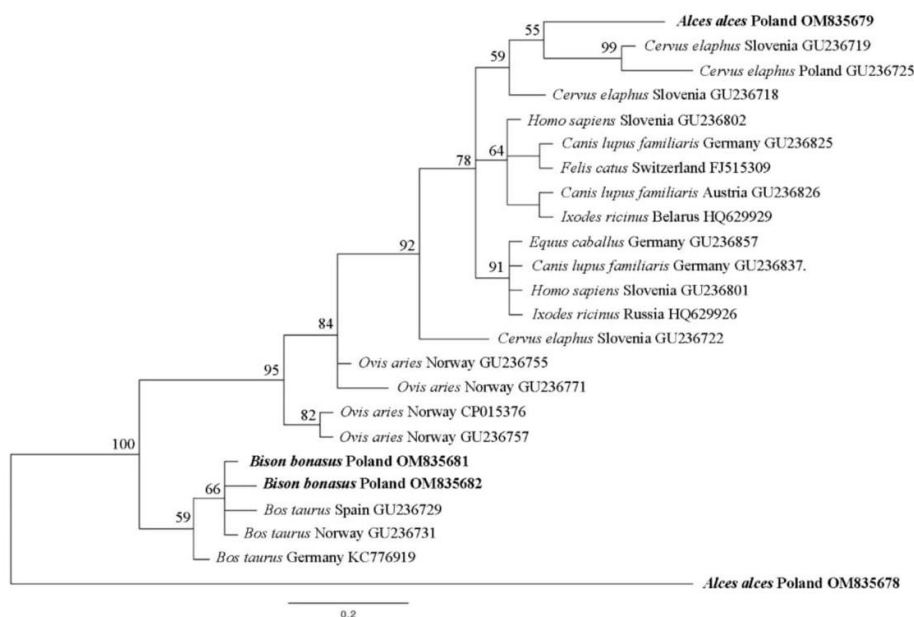


Figure 3. Phylogenetic tree of *ankA* partial gene (630 bp) haplotypes from *Anaplasma phagocytophilum*, constructed by Bayesian inference (BI) analysis using MrBayes version 3.2. The GTR + I + G model was chosen as the best-fitting nucleotide substitution model using JModelTest version 2.1.10 software. The scale bars are proportional to the number of substitutions per site. In bold, sequences from this study.

3.5. Statistical Analysis

Our present findings do not indicate any statistically significant difference in the number of animals infected with *Anaplasma* spp., neither in European bison nor in Eurasian moose, with regard to sex or age, nor any difference with regard to the test used (detailed results not shown). Although clear differences in prevalence can be seen between the sample collection areas for the European bison, insufficient samples were taken from Białowieża Primeval Forest to determine whether the difference was statistically significant.

4. Discussion

Knowledge of the role and circulation of *Anaplasma phagocytophilum* in the natural environment continues to grow, with increasing numbers of studies being concerned not only with the detection and prevalence of *A. phagocytophilum* bacteria, but also with their phylogenetic relationships based on the use of genetic markers such as *ankA* and *groEL*. Our present findings extend current knowledge on the prevalence and genetic characteristics of *A. phagocytophilum* strains in Eurasian moose (*Alces alces*) and European bison (*Bison bonasus*): two large wild ruminant species currently under protection in Poland.

Out of 42 examined wild ruminants, 11 tested positive for *Anaplasma* sp., with a prevalence of 26%. While only a few studies have confirmed the presence of *Anaplasma*

phagocytophilum, the causative agent of bovine anaplasmosis, in *Bison bonasus* in Europe, all samples were obtained from bison in the Białowieża Primeval Forest. Matsumoto et al. (2009) [29] found the prevalence to be 20%; however, the study only included five animals. Later, Scharf et al. (2011) [1] reported a prevalence of 57.5%, while Dzięgiel et al. (2015) [5] found this rate to be 18.34%, and Karbowski et al. (2015) [30] found it to be 66.57%. In the present study, the overall prevalence of *A. phagocytophilum* in European bison was found to be 24%, which, despite being a little low, is nevertheless in line with previous reports. By region, the prevalence of *Anaplasma* spp. was found to be 44% (4/9) in the Białowieża Primeval Forest but only 15% (3/20) in the Bieszczady Mountain population, although the difference in prevalences was not statistically significant, likely due to the small number of animals enrolled in the study. In North America, bovine anaplasmosis, caused by *A. marginale*, can also occur in American bison (*Bison bison*), an animal closely related to the European bison. In one study, de la Fuente et al. (2003) [31] report the prevalence of *Anaplasma* spp. to be 88% and 100% among two American bison populations from the USA and Canada. Both rates are significantly higher than any reported in European bison [1,5,29,30], including our present findings. The present study is the first report about the occurrence of *Anaplasma phagocytophilum* in a European bison population from the Bieszczady Mountains, the second largest population of free-living European bison in the world [32,33]. In the Eurasian moose (*Alces alces*), our findings indicate a significantly lower prevalence (31%) than that reported in Norway (41.4–70%) [12,34,35] and Sweden (82%) [36] in Europe. In Poland, in only one report, the prevalence showed a lower rate (20%) [30]. In North America, moose are also subject to infection by *Anaplasma* spp. Its presence was confirmed in Eastern moose (*Alces alces americana*) with a prevalence of 54% [37], which is markedly higher than our present findings.

Our phylogenetic analysis of the partial *groEL* gene allowed the detected *Anaplasma phagocytophilum* strains to be assigned to two of the four ecotypes proposed by Jahfari et al. (2014) [11]. The obtained sequences of the *groEL* gene belong to five haplotypes. Of these, four haplotypes, viz. OM835683, OM835684, OM835686 and OM835687, had already been reported in the GenBank database, while another sequence, OM835689, is new; in addition, OM835687 and OM835688 are identical to each other. All samples of the *groEL* partial gene from European bison were found to be ecotype I. So far, no reports exist on the division of *A. phagocytophilum* strains obtained from European bison into ecotypes based on the *groEL* marker. Although a previous report from Slovakia did employ a partial *groEL* gene sequence, it was too short to assign the detected *A. phagocytophilum* strain to any particular ecotype [38]. However, some reports have described the amplification of a partial *groEL* gene in samples from cattle, the group of animals most closely related to *Bison bonasus*. A comparison of our samples of *groEL* (Figure 2) with representative sequences of *A. phagocytophilum* strains detected in cattle from Germany (KU587056, KU587060, GQ452230) and France (KJ832487, KJ832483) revealed that the identified *A. phagocytophilum* strains were ecotype I, like in the *Bison bonasus* samples [11,39,40]. The samples from *Alces alces* tested in the present study were classified to ecotypes I and II [11]. The presence of both ecotypes in the tested moose is in line with previous reports from Norway and Sweden [12,41]. Interestingly, both our samples of *Alces alces* from Poland (Mazovian Voivodeship) (Figure 1) and *Alces alces* from Norway and Sweden were collected in small areas, in which two different ecotypes of *A. phagocytophilum* strains were among a single species of animal [9,12,41].

The genetic marker *ankA* was able to divide *Anaplasma phagocytophilum* strains into clusters. Sequences from European bison (OM835681, OM835682) were placed within cluster IV [1] together with various bovine hosts (Figure 3). One of the *ankA* genes from moose (OM835679) was found to share cluster I with sequences from humans, dogs, red deer and horses, among others (Figure 3); this is in line with reports from Scharf et al. (2011) [1]. None of the detected *ankA* haplotypes were identical. Only one haplotype from *Bison bonasus* (OM835681) had a 100% match with sequences from the GenBank database (KJ832243, GU236731); the other sequences of the *ankA* partial gene (OM835678, OM835679,

OM835680, OM835682) are new haplotypes not reported before. This is the first report of *ankA* gene sequences identified in Eurasian moose.

An important consideration in research about *Anaplasma phagocytophilum* in wild animals is whether the detected strains may be potentially pathogenic to humans. Wild and game animals can be potential reservoirs of pathogenic *A. phagocytophilum* strains [24,42,43]. The present study used three genetic markers for analysis, viz. 16S rDNA, *groEL* and *ankA*, which are also suitable for identifying HGA *A. phagocytophilum* strains [1,43]. The 16S rDNA partial gene described in European bison and Eurasian moose in the present study, and in Myczka et al. (2021a) [9], is 100% identical to *A. phagocytophilum* samples from humans in Europe (Austria, Belgium), North America (USA) and Asia (South Korea) (Table 1). In addition, most of the *groEL* genes detected in the present study were classified to ecotype I (Figure 2), which is also home to various HGA strains [11]. While the partial *ankA* gene from *Bison bonasus* was placed in cluster IV, which does not include any pathogenic *A. phagocytophilum* strains, the sequence from *Alces alces* was classified into cluster I, with the *ankA* gene from humans (Figure 3). Based on these findings and the phylogenetic analysis, it cannot be clearly confirmed whether the detected strains of *A. phagocytophilum* from bison and moose are potentially pathogenic for humans. However, the fact that the tested strains and their markers can be grouped with known HGA strains suggests that the animals tested in this study may constitute a natural reservoir of pathogenic *A. phagocytophilum*.

5. Conclusions

This study extends current knowledge about *Anaplasma phagocytophilum* in wild large ungulates in Poland. Our findings constitute the first report of the occurrence of *Anaplasma* spp. in free-living European bison from the Bieszczady Mountains, one of the largest populations in the world. They include the first genotyping of *A. phagocytophilum* strains from moose (*groEL*, *ankA*) in Poland and the first record of the *ankA* partial gene from Eurasian moose in the world. They also confirm that the detected strains from *Bison bonasus* and *Alces alces* may constitute a natural reservoir of strains of *A. phagocytophilum* pathogenic for humans.

Author Contributions: A.W.M. and Z.L. designed the study, A.W.M., Z.L. and M.C. worked on methodology, K.F.-H., S.K. and E.P.-K. collected biological samples, A.W.M. and Z.L. performed PCR, sequencing and analyzed sequence data. A.W.M. and M.C. conducted the statistical analysis, A.W.M. wrote the first draft of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Eurasian moose biological samples were collected from animals killed in road accidents or found dead by forest staff. European bison samples were collected from legally eliminated individuals or individuals found dead (DZP-WG.6401.2.2021.EB, PN.51.10.2021.AK, WPN6401.1.194.2021.RN.2). For both species samples, in Poland, ethics committee approval was not required.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, upon reasonable request.

Acknowledgments: The authors would like to thank: the management and staff of the District Veterinary Inspectorate in Sanok and Białowieża National Park for coordinating the European bison samples collection, and the management and staff of the Polesie National Park, Kampinos National Park and Warsaw Urban Forest for coordinating the Eurasian moose samples collection. This study is part of a PhD thesis concerning the detection of *Anaplasma phagocytophilum* in ungulates in Poland.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Scharf, W.; Schauer, S.; Freyburger, F.; Petrovec, M.; Schaarschmidt-Kiener, D.; Liebisch, G.; Runge, M.; Ganter, M.; Kehl, A.; Dumler, J.S.; et al. Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum* ankA gene clusters. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 790–796. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Severo, M.S.; Stephens, K.D.; Kotsyfakis, M.; Pedra, J.H. *Anaplasma phagocytophilum*: Deceptively simple or simply deceptive? *Future Microbiol.* **2012**, *7*, 719–731. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Gordon, W.S.; Brownlee, A.; Wilson, D.R.; MacLeod, J. Tick-borne fever (a hitherto undescribed disease of sheep). *J. Comp. Pathol.* **1932**, *45*, 301–307. [\[CrossRef\]](#)
- Dumler, J.S.; Barbet, A.F.; Bekker, C.P.; Dasch, G.A.; Palmer, G.H.; Ray, S.C.; Rikihisa, Y.; Rurangirwa, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: Unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and ‘HGE agent’ as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2001**, *51* Pt 6, 2145–2165. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Dzięgiel, B.; Adaszek, Ł.; Krzysiak, M.; Skrzypczak, M.; Adaszek, M.; Furmaga, B.; Winiarczyk, S. The occurrence of *Anaplasma phagocytophilum* in wild bison from the Białowieża Primeval Forest in Eastern Poland. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **2015**, *128*, 310–314. [\[PubMed\]](#)
- Jaarsma, R.I.; Sprong, H.; Takumi, K.; Kazimirova, M.; Silaghi, C.; Mysterud, A.; Rudolf, I.; Beck, R.; Földvári, G.; Tomassone, L.; et al. *Anaplasma phagocytophilum* evolves in geographical and biotic niches of vertebrates and ticks. *Parasit. Vectors* **2019**, *12*, 328. [\[CrossRef\]](#)
- Remesar, S.; Díaz, P.; Prieto, A.; García-Dios, D.; Fernández, G.; López, C.M.; Panadero, R.; Díez-Baños, P.; Morrondo, P. Prevalence and molecular characterization of *Anaplasma phagocytophilum* in roe deer (*Capreolus capreolus*) from Spain. *Ticks Tick Borne Dis.* **2020**, *11*, 101351. [\[CrossRef\]](#)
- Cafiso, A.; Bazzocchi, C.; Cavagna, M.; di Lorenzo, E.; Serra, V.; Rossi, R.; Comazzi, S. Molecular Survey of *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in Roe Deer from a Wildlife Rescue Center in Italy. *Animals* **2021**, *11*, 3335. [\[CrossRef\]](#)
- Myczka, A.W.; Steiner-Bogdaszewska, Z.; Filip-Hutsch, K.; Ołoś, G.; Czopowicz, M.; Laskowski, Z. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Wild and Farmed Cervids in Poland. *Pathogens* **2021**, *10*, 1190. [\[CrossRef\]](#)
- Alberti, A.; Zobba, R.; Chessa, B.; Addis, M.F.; Sparagano, O.; Pinna Parpaglia, M.L.; Cubeddu, T.; Pintori, G.; Pittau, M. Equine and canine *Anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 6418–6422. [\[CrossRef\]](#)
- 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.; et al. Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. *Parasit. Vectors* **2014**, *7*, 365. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Stigum, V.M.; Jaarsma, R.I.; Sprong, H.; Rolandsen, C.M.; Mysterud, A. Infection prevalence and ecotypes of *Anaplasma phagocytophilum* in moose *Alces alces*, red deer *Cervus elaphus*, roe deer *Capreolus capreolus* and *Ixodes ricinus* ticks from Norway. *Parasit. Vectors* **2019**, *12*, 1. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Adamska, M. The role of different species of wild ungulates and *Ixodes ricinus* ticks in the circulation of genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in a forest biotope in north-western Poland. *Ticks Tick Borne Dis.* **2020**, *11*, 101465. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jouglin, M.; Chagneau, S.; Faille, F.; Verheyden, H.; Bastian, S.; Malandrin, L. Detecting and characterizing mixed infections with genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in roe deer (*Capreolus capreolus*) by developing an ankA cluster-specific nested PCR. *Parasit. Vectors* **2017**, *10*, 377. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bown, K.J.; Lambin, X.; Ogden, N.H.; Begon, M.; Telford, G.; Woldehiwet, Z.; Birtles, R.J. Delineating *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in coexisting, discrete enzootic cycles. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 1948–1954. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Massung, R.F.; Owens, J.H.; Ross, D.; Reed, K.D.; Petrovec, M.; Bjoersdorff, A.; Coughlin, R.T.; Beltz, G.A.; Murphy, C.I. Sequence analysis of the ank gene of granulocytic ehrlichiae. *J. Clin. Microbiol.* **2000**, *38*, 2917–2922. [\[CrossRef\]](#)
- Von Loewenich, F.D.; Baumgarten, B.U.; Schröppel, K.; Geissdörfer, W.; Röllinghoff, M.; Bogdan, C. High diversity of ankA sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among *Ixodes ricinus* ticks in Germany. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 5033–5040. [\[CrossRef\]](#)
- Majazki, J.; Wüppenhorst, N.; Hartelt, K.; Birtles, R.; von Loewenich, F.D. *Anaplasma phagocytophilum* strains from voles and shrews exhibit specific ankA gene sequences. *BMC Vet. Res.* **2013**, *9*, 235. [\[CrossRef\]](#)
- Kraśniński, Z.A. *Żubr Puszczy Imperator*; Wydawnictwo BPN: Białowieża, Poland, 2005; pp. 1–24. (In Polish)
- Wawrzyniak, P. Population dynamics, its impact upon the habitat and necessity of management the moose (*Alces alces*) population in Poland. In Proceedings of the Conference “Zarządzanie Populacjami Zwierząt”, Warsaw, Poland, 5 August 2016; Łowiec Polski: Warsaw, Poland, 2016; pp. 17–27. (In Polish).
- Matei, I.A.; Estrada-Peña, A.; Cutler, S.J.; Vayssier-Taussat, M.; Varela-Castro, L.; Potkonjak, A.; Zeller, H.; Mihalca, A.D. A review on the eco-epidemiology and clinical management of human granulocytic anaplasmosis and its agent in Europe. *Parasit. Vectors* **2019**, *12*, 599. [\[CrossRef\]](#)
- Szewczyk, T.; Werszko, J.; Myczka, A.W.; Laskowski, Z.; Karbowiak, G. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in wild carnivores in north-eastern Poland. *Parasit. Vectors* **2019**, *12*, 465. [\[CrossRef\]](#)
- Massung, R.F.; Levin, M.L.; Munderloh, U.G.; Silverman, D.J.; Lynch, M.J.; Gaywee, J.K.; Kurtti, T.J. Isolation and propagation of the Ap-Variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophilum* in a tick cell line. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 2138–2143. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

24. Myczka, A.W.; Szewczyk, T.; Laskowski, Z. The Occurrence of Zoonotic *Anaplasma phagocytophilum* Strains, in the Spleen and Liver of Wild Boars from North-West and Central Parts of Poland. *Acta Parasitol.* **2021**, *66*, 1082–1085. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Ronquist, F.; Huelsenbeck, J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **2003**, *19*, 1572–1574. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Guindon, S.; Gascuel, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* **2003**, *52*, 696–704. [\[CrossRef\]](#)
27. Darriba, D.; Taboada, G.L.; Doallo, R.; Posada, D. jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 772. [\[CrossRef\]](#)
28. Altman, D.G.; Machin, D.; Bryant, T.N.; Gardner, M.J. *Statistics with Confidence*, 2nd ed.; BMJ Books: London, UK, 2000.
29. Matsumoto, K.; Grzeszczuk, A.; Brouqui, P.; Raoult, D. *Rickettsia raoultii* and *Anaplasma phagocytophilum* in *Dermacentor reticulatus* ticks collected from Białowieża Primeval Forest European bison (*Bison bonasus bonasus*), Poland. *Clin. Microbiol. Infect.* **2009**, *15*, 286–287. [\[CrossRef\]](#)
30. Karbowski, G.; Vichová, B.; Werszko, J.; Demiaszkiewicz, A.W.; Pyziel, A.M.; Sytykiewicz, H.; Szewczyk, T.; Peťko, B. The infection of reintroduced ruminants—*Bison bonasus* and *Alces alces*—with *Anaplasma phagocytophilum* in northern Poland. *Acta Parasitol.* **2015**, *60*, 645–648. [\[CrossRef\]](#)
31. De la Fuente, J.; Golsteyn Thomas, E.J.; van den Bussche, R.A.; Hamilton, R.G.; Tanaka, E.E.; Druhan, S.E.; Kocan, K.M. Characterization of *Anaplasma marginale* isolated from North American bison. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 5001–5005. [\[CrossRef\]](#)
32. Raczyński, J. *European Bison Pedigree Book*; Wydawnictwo BPN: Białowieża, Poland, 2020.
33. Klich, D.; Lopucki, R.; Perlińska-Teresiak, M.; Lenkiewicz-Bardzińska, A.; Olech, W. Human-Wildlife Conflict: The Human Dimension of European Bison Conservation in the Bieszczady Mountains (Poland). *Animals* **2021**, *11*, 503. [\[CrossRef\]](#)
34. Pūraitė, I.; Rosef, O.; Paulauskas, A.; Radzijeuskaja, J. *Anaplasma phagocytophilum* infection in moose (*Alces alces*) in Norway. *Microbes Infect.* **2015**, *17*, 823–828. [\[CrossRef\]](#)
35. Razanske, I.; Rosef, O.; Radzijeuskaja, J.; Krikstolaitis, R.; Paulauskas, A. Impact of tick-borne *Anaplasma phagocytophilum* infections in calves of moose (*Alces alces*) in southern Norway. *Folia Parasitol.* **2021**, *68*, 023. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Malmsten, J.; Dalin, A.M.; Moutailler, S.; Devillers, E.; Gondard, M.; Felton, A. Vector-Borne Zoonotic Pathogens in Eurasian Moose (*Alces alces alces*). *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2019**, *19*, 207–211. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Elliott, J.A.; Dickson, C.C.; Kantar, L.; O’Neal, M.R.; Lichtenwalner, A.; Bryant, A.; Jakubas, W.J.; Pekins, P.J.; de Urioste-Stone, S.M.; Kamath, P.L. Prevalence and risk factors of *Anaplasma* infections in Eastern moose (*Alces alces americana*) and winter ticks (*Dermacentor albipictus*) in Maine USA. *J. Wildl. Dis.* **2021**, *57*, 844–855. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Vichová, B.; Majláthová, V.; Nováková, M.; Stanko, M.; Hviščová, I.; Pangráčová, L.; Chrudimský, T.; Čurlík, J.; Petko, B. *Anaplasma* infections in ticks and reservoir host from Slovakia. *Infect. Genet. Evol.* **2014**, *22*, 265–272. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Chastagner, A.; Dugat, T.; Vourc’h, G.; Verheyden, H.; Legrand, L.; Bachy, V.; Chabanne, L.; Joncour, G.; Maillard, R.; Boulouis, H.J.; et al. Multilocus sequence analysis of *Anaplasma phagocytophilum* reveals three distinct lineages with different host ranges in clinically ill French cattle. *Vet. Res.* **2014**, *45*, 114. [\[CrossRef\]](#)
40. Silaghi, C.; Nieder, M.; Sauter-Louis, C.; Knubben-Schweizer, G.; Pfister, K.; Pfeffer, M. Epidemiology, genetic variants and clinical course of natural infections with *Anaplasma phagocytophilum* in a dairy cattle herd. *Parasit. Vectors* **2018**, *11*, 20. [\[CrossRef\]](#)
41. Malmsten, J.; Widén, D.G.; Rydevik, G.; Yon, L.; Hutchings, M.R.; Thulin, C.G.; Söderquist, L.; Aspan, A.; Stuen, S.; Dalin, A.M. Temporal and spatial variation in *Anaplasma phagocytophilum* infection in Swedish moose (*Alces alces*). *Epidemiol. Infect.* **2014**, *142*, 1205–1213. [\[CrossRef\]](#)
42. Masuzawa, T.; Uchishima, Y.; Fukui, T.; Okamoto, Y.; Muto, M.; Koizumi, N.; Yamada, A. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* from Wild Boars and Deer in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **2011**, *64*, 333–336. [\[CrossRef\]](#)
43. Kazimírová, M.; Hamšíková, Z.; Špitalská, E.; Minichová, L.; Mahříková, L.; Caban, R.; Sprong, H.; Fonville, M.; Schnittger, L.; Kocianová, E. Diverse tick-borne microorganisms identified in free-living ungulates in Slovakia. *Parasit. Vectors* **2018**, *11*, 495. [\[CrossRef\]](#)

Oświadczenia współautorów publikacji

Oświadczenie współautora
Powiatowy Inspektorat Weterynarii
w Sanoku
38-500 SANOK, ul. Młynarska 45
tel. 13 46 45 500, fax. 13 46 45 505

SANOK, 27.05.2022r.

(miejscowość, data)

lek. wet. Stanisław Kaczor

Powiatowy Inspektorat Weterynarii
w Sanoku

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt.:

Myczka A.W., Kaczor S., Filip-Hutsch K., Czopowicz M., Plis-Kuprianowicz E.,
Laskowski Z. Prevalence and Genotyping of *Anaplasma phagocytophilum* Strains from
Wild Animals, European Bison (*Bison bonasus*) and Eurasian Moose (*Alces alces*) in
Poland. Animals. 2022; 12(9):1222. <https://doi.org/10.3390/ani12091222>

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na *: pobraniu i zabezpieczeniu części
próbek materiału biologicznego od zwierząt.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez mgr Annę
Myczkę jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów,
opublikowanych w czasopiśmie naukowym.



podpis osoby składającej oświadczenie

* należy szczegółowo przedstawić opis wykonanych prac współautora, w w/w publikacji

Oświadczenie współautora

WARSZAWA, 7.06.2022 r.

(miejscowość, data)

Dr Katarzyna Filip - Hutsch

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt.:

Myczka A.W., Kaczor S., Filip-Hutsch K., Czopowicz M., Plis-Kuprianowicz E., Laskowski Z. Prevalence and Genotyping of *Anaplasma phagocytophilum* Strains from Wild Animals, European Bison (*Bison bonasus*) and Eurasian Moose (*Alces alces*) in Poland. Animals. 2022; 12(9):1222. <https://doi.org/10.3390/ani12091222>

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na *: pobraniu i zabezpieczeniu części próbek materiału biologicznego od zwierząt.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez mgr. Annę Myczkę jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, opublikowanych w czasopismach naukowych.

Katarzyna Filip-Hutsch
podpis osoby składającej oświadczenie

* należy szczegółowo przedstawić opis wykonanych prac współautora, w w/w publikacji

Oświadczenie współautora

Warszawa, 1.06.2022

(miejscowość, data)

Dr hab. Michał Czopowicz, prof. SGGW

Samodzielny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt.:

Myczka A.W., Kaczor S., Filip-Hutsch K., Czopowicz M., Plis-Kuprianowicz E., Laskowski Z. Prevalence and Genotyping of *Anaplasma phagocytophilum* Strains from Wild Animals, European Bison (*Bison bonasus*) and Eurasian Moose (*Alces alces*) in Poland. *Animals*. 2022; 12(9):1222. <https://doi.org/10.3390/ani12091222>

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na *: wykonaniu analiz statystycznych

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez mgr Annę Myczkę jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, opublikowanych w czasopismach naukowych.


podpis osoby składającej oświadczenie

* należy szczegółowo przedstawić opis wykonanych prac współautora, w w/w publikacji

Oświadczenie współautora

Białowieża, 24.05.2022

(miejscowość, data)

lek. wet. Elwira Plis – Kuprianowicz

Białowiecki Park Narodowy

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt.:

Myczka A.W., Kaczor S., Filip-Hutsch K., Czopowicz M., Plis-Kuprianowicz E., Laskowski Z. Prevalence and Genotyping of *Anaplasma phagocytophilum* Strains from Wild Animals, European Bison (*Bison bonasus*) and Eurasian Moose (*Alces alces*) in Poland. *Animals*. 2022; 12(9):1222. <https://doi.org/10.3390/ani12091222>

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na *: pobraniu i zabezpieczeniu części próbek materiału biologicznego od zwierząt.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez mgr. Annę Myczkę jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, opublikowanych w czasopismach naukowych.

Elwira Plis-Kuprianowicz

podpis osoby składającej oświadczenie

* należy szczegółowo przedstawić opis wykonanych prac współautora, w w/w publikacji

Oświadczenie współautora

19.05.2022 Warszawa

(miejscowość, data)

Dr hab. Zdzisław Laskowski prof. IP PAN

Zakład Ekologii i Ewolucji Pasożytnictwa

Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego

Polska Akademia Nauk

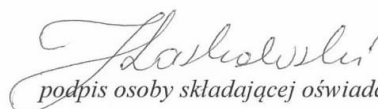
OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że jestem współautorem publikacji pt.:

Myczka A.W., Kaczor S., Filip-Hutsch K., Czopowicz M., Plis-Kuprianowicz E., Laskowski Z. Prevalence and Genotyping of *Anaplasma phagocytophilum* Strains from Wild Animals, European Bison (*Bison bonasus*) and Eurasian Moose (*Alces alces*) in Poland. *Animals*. 2022; 12(9):1222. <https://doi.org/10.3390/ani12091222>

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na *: zaprojektowaniu części starterów do badań molekularnych, przeprowadzeniu analizy filogenetycznej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionej pracy przez mgr. Annę Myczkę jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, opublikowanych w czasopismach naukowych.


podpis osoby składającej oświadczenie

* należy szczegółowo przedstawić opis wykonanych prac współautora, w w/w publikacji

Najważniejsze wyniki i wnioski

Publikacja numer 1

Najważniejsze wyniki

W badanym materiale biologicznym od dzików euroazjatyckich (*Sus scrofa*) wykryto DNA bakterii *Anaplasma* spp. u 12 osobników, prevalencja wyniosła 20,34% (12/59). Materiał genetyczny *Anaplasma* spp. wykryto w 7 próbkach ze śledziony i 6 próbkach z wątroby, tylko u jednego osobnika obie te tkanki obwodowe dały pozytywny wynik. Sekwencje nukleotydowe genu 16S rDNA (n=4), otrzymane w tych badaniach, były 100% identyczne na analizowanym fragmencie (MT510541). Analiza sekwencji genu 16S rDNA pozwoliła na zaklasyfikowanie wykrytych bakterii do gatunku *Anaplasma phagocytophilum*. Pozytywny wynik amplifikacji fragmentu genu *groEL* uzyskano u 3 osobników, a w przypadku genu *ankA* były to 4 osobniki.

Najważniejsze wnioski

To pierwsze doniesienie na temat bakterii *Anaplasma phagocytophilum* wśród dzików euroazjatyckich na terenach północno-wschodniej Polski (województwo warmińsko-mazurskie). Analiza sekwencji genu 16S rDNA *A. phagocytophilum*, na badanym fragmencie wykazała, że jest to powszechnie notowany szczep. Identyczne sekwencje genu 16S rDNA notowano w: Azji (Irak, Japonia, Korea Południowa), Afryce (RPA), Europie (Norwegia, Polska, Belgia, Austria) oraz Ameryce Północnej (USA). Na podstawie analizy filogenetycznej fragmentu genu *groEL*, wykazano, że wykryte szczepy *A. phagocytophilum* należą do ekotypu I. Wykryto dwa haplotypy genu *groEL*, jeden z nich (MT731760) notowano już wcześniej, drugi (MT731761, MT731762) został wykryty po raz pierwszy. W przypadku markera genetycznego *ankA* również wykryto dwa haplotypy. Pierwszy z nich, reprezentowany przez dwie sekwencje (MT534241, MT731758), był już notowany wcześniej i wykazuje 100% podobieństwa, na analizowanym fragmencie, między innymi do szczepów izolowanych od ludzi, psów, koni i kleszczy. Drugi haplotyp (MT731759) został wykryty po raz pierwszy. Analiza filogenetyczna fragmentu genu *ankA* wykazała, że wszystkie opisane w tej pracy szczepy *A. phagocytophilum* należą do klastra I. Na podstawie analiz sekwencji fragmentu genu 16S rDNA oraz analizach filogenetycznych genów *groEL* i *ankA*, które wykazywały 100% identyczności z sekwencjami *A. phagocytophilum* od

ludzi lub grupowały się w tych samych ekotypach i klastrach jak ludzkie szczepy HGA, można wnioskować, że dziki euroazjatyckie mogą być nosicielami patogennych dla ludzi szczepów *A. phagocytophilum*. Przedstawione badania pokazują, że oba organy tj. śledziona i wątroba, są odpowiednie do detekcji bakterii *A. phagocytophilum* u dzików.

Publikacja numer 2

Najważniejsze wyniki

Przebadano 207 osobników kopytnych przeżuwaczy z czterech gatunków: jelen szlachetny (*Cervus elaphus*), sarna europejska (*Capreolus capreolus*), daniel zwyczajny (*Dama dama*) oraz łoś euroazjatycki (*Alces alces*). 165 osobników to zwierzęta dziko żyjące, a 42 to osobniki hodowlane z dwóch gatunków: jelen szlachetny (15) i daniel zwyczajny (27). Na cztery badane gatunki zwierząt, u trzech wykryto DNA *Anaplasma* spp., wszystkie próby od danieli zwyczajnych były ujemne. Amplifikowany fragment (480 pz) genu 16S rDNA *Anaplasma* spp. wykryto u 91 osobników zwierząt i prewalencja wyniosła 43,9%. Przetestowano 90 jeleni szlachetnych, wśród których wykryto 50 osobników pozytywnych (47 osobniki dzikie, 3 osobniki fermowe). Wśród 70 testowanych saren europejskich DNA *Anaplasma* spp. wykryto w 39 osobnikach. Badano 11 osobników łośi euroazjatyckich, dwa z nich dały pozytywny wynik testu na obecność *Anaplasma* spp.. Ze wszystkich pozytywnych prób fragmentu genu 16S rDNA, 13 zsekwencionowano. Otrzymane sekwencje porównano z danymi z bazy danych NCBI GenBank i ustalono, że wszystkie analizowane sekwencje można sklasyfikować jako fragment genu 16S rDNA *Anaplasma phagocytophilum*. Z 13 otrzymanych sekwencji, 9 było identycznych (jelen szlachetny: MZ314415, MZ317900, MZ317903, MZ317901; sarna europejska: MZ317898, MZ317904, MZ317899; łoś euroazjatycki: MZ317902, MZ317897). Wykryto trzy inne, ale identyczne ze sobą, sekwencje od saren (MZ314417, MZ319389, MZ319390) i jedną od jelenia szlachetnego (MZ314416), która nie była, w 100%, podobna do innych otrzymanych w tej pracy sekwencji, ani do żadnych dostępnych w bazie GenBank. Ta pojedyncza sekwencja, od jelenia szlachetnego, wykazywała najwyższe podobieństwo do szczepu *A. phagocytophilum* wyizolowanego z sarny (Hiszpania) o numerze MN170723. W testowanych śledzionach wykryto 72 próby pozytywne, a w wątrobach 42. Tylko u 23 osobników oba organy dały pozytywny wynik testu detekcji fragmentu genu 16S rDNA.

Najważniejsze wnioski

Porównując prewalencję *Anaplasma phagocytophilum* u zwierząt dzikich i hodowlanych, można jednoznacznie stwierdzić, że prewalencja w pierwszej grupie

(88/165; 53,3%) jest o wiele wyższa niż w drugiej (3/42; 7,1%). Wśród danieli zwyczajnych nie wykryto żadnej próby w której zidentyfikowano by bakterie *Anaplasma* spp.. Taki stan rzeczy może wynikać z tego, że większość prób od danieli pochodziła od zwierząt fermowych, gdzie według przedstawionych badań oraz światowych doniesień prewalencja jest zawsze niższa niż u zwierząt dzikich. Według danych zdeponowanych w bazie GenBank, 9 z 13 sekwencji, które były identyczne ze sobą, reprezentuje szczep *A. phagocytophilum* powszechnie występujący w: Europie, Azji, Ameryce Północnej i Afryce; wśród różnorodnych gospodarzy: kleszcze, muchówki, gryzonie, zwierzęta (dzikie, fermowe, towarzyszące) oraz człowiek. Pozostałe sekwencje od saren europejskich, miały jeden odpowiednik w bazie GenBank i była to sekwencja *A. phagocytophilum*, również od sarny, z Hiszpanii (MN170723). Próby pochodziły z różnych regionów (MZ314417 – woj. opolskie, MZ319389 i MZ319390 – woj. warmińsko – mazurskie, MN170723 - Hiszpania) co przemawia za tym, że nie chodzi o lokalną mutację z jednego regionu, tylko że wśród saren występuje osobny i unikatowy szczep *A. phagocytophilum*, który wstępnie w tych badaniach określono jako „*Anaplasma phagocytophilum* roe deer strain”. Analizując wyniki wykrywalności *A. phagocytophilum* w poszczególnych organach, można stwierdzić, że wśród przeżuwaczy, śledziona jest bardziej efektywnym materiałem do tego typu analiz. W próbach ze śledziony uzyskano prawie 2 razy więcej wyników pozytywnych niż w próbach z wątroby. Na podstawie analizy statystycznej stwierdzono, że szczepy *A. phagocytophilum* częściej notuje się wśród młodych osobników, a wartość graniczna porównania występowania tych bakterii wśród samic i samców, może sugerować, że to wśród samic bakterie *Anaplasma phagocytophilum* są bardziej powszechne.

Publikacja numer 3

Najważniejsze wyniki

W przedstawionych badaniach przebadano 29 osobników żubra europejskiego i 13 osobników łośa euroazjatyckiego, łącznie przeanalizowano próby od 42 osobników i wykryto 11 prób pozytywnych w kierunku *Anaplasma* spp.. Wśród żubrów europejskich prewalencja wyniosła 24,14% (7/29), a wśród łośi euroazjatyckich 30,76% (4/13). Sekwencjonowane próby wykazały obecność materiału genetycznego fragmentu genu 16S rDNA *A. phagocytophilum*. Ten marker genetyczny wykryto u żubrów europejskich w 6 próbach ze śledzion i 1 próbce z wątroby. Sekwencje nukleotydowe, fragmentu genu 16S rDNA, od łośi euroazjatyckich zostały opisane w Publikacji nr 2. Fragment genu *groEL*, amplifikowano od 5 osobników żubra europejskiego i 4 osobników łośa euroazjatyckiego. Fragment genu *ankA*, amplifikowano w 5 próbkach, od 2 osobników żubra europejskiego i 3 osobników łośa euroazjatyckiego.

Najważniejsze wnioski

Sekwencje nukleotydowe genu 16S rDNA (ON007214, ON025953) od żubrów europejskich reprezentują grupę powszechnie występujących bakterii z gatunku *Anaplasma phagocytophilum*. Sekwencje wykazują 100% identyczność do rekordów z bazy GenBank od: saren, jeleni, lisów, psów, kotów, myszy, jeży, kleszczy, dzików, owiec, koni oraz ludzi. Otrzymane sekwencje fragmentu genu *groEL* należą do 5 haplotypów, tylko dwie sekwencje OM835687 i OM835688 są identyczne. Cztery z pięciu haplotypów, reprezentowanych przez sekwencje: OM835683, OM835684, OM835686 i OM835687, były już wcześniej notowane i mają swoje odpowiedniki w bazie internetowej NCBI GenBank. Ostatni piąty haplotyp OM835689 nie był nigdy wcześniej notowany. Przedstawione wyniki genotypowania szczepów *A. phagocytophilum* od żubrów europejskich z wykorzystaniem genu *groEL* to pierwsze tego typu sekwencje na świecie, dzięki którym można przypisać wykryte szczepy *A. phagocytophilum* do konkretnego ekotypu – należą one do ekotypu I. Próbkę od łośi euroazjatyckich po analizie filogenetycznej fragmentu genu *groEL* zaklasyfikowano do dwóch grup: ekotyp I i II. Otrzymane sekwencje fragmentu genu *ankA* należą do 5 haplotypów. Tylko jeden z nich – OM835681 był notowany wcześniej, pozostałe 4: OM835678, OM835679, OM835680 i OM835682, są nowe. Żaden z otrzymanych

haplotypów genu *ankA* nie był taki sam, a większa część nigdy nie była notowana, co sugeruje wyższy poziom zmienności genetycznej tego genu niż w przypadku genów *groEL* czy *16S rDNA*. Analiza filogenetyczna fragmentu genu *ankA* *A. phagocytophilum* od żubrów europejskich wykazała, że wykryte szczepy bakterii należy przypisać do klastra II, do którego należą haplotypy genu *ankA* *A. phagocytophilum* izolowane od hodowlanych przeżuwaczy. Jedna z sekwencji genu *ankA* od łosia na podstawie analizy filogenetycznej została przypisana do klastra I gdzie grupują się szczepy m.in. od: koni, psów, kleszczy i ludzi. Przedstawione wyniki to pierwsze w Polsce, dane na temat genotypowania szczepów *A. phagocytophilum*, z wykorzystaniem genów *groEL* i *ankA* wyizolowanych od łosi euroazjatyckich. W przypadku genu *ankA* jest to pierwsze notowanie na świecie. Również po raz pierwszy badano żubry europejskie z populacji Bieszczadzkiej pod względem występowania *A. phagocytophilum*, wszystkie wcześniejsze doniesienia naukowe w tym temacie dotyczyły tylko populacji Białowieskiej. Wszystkie trzy markery genetyczne: *groEL*, *ankA* i *16S rDNA*, zarówno od łosi jak i żubrów, są identyczne albo grupują się w ekotypach lub klastrach ze szczepami HGA, co z wysokim prawdopodobieństwem oznacza, że wykryte szczepy *A. phagocytophilum* opisane w publikacji mogą być potencjalnie chorobotwórcze dla człowieka. Na podstawie tych informacji możemy wnioskować, że dwa gatunki największych dzikich przeżuwaczy w Polsce, stanowią rezerwuár zoonotycznych szczepów *Anaplasma phagocytophilum*.

Genotypowanie szczepów *Anaplasma phagocytophilum* izolowanych od saren europejskich (*Capreolus capreolus*) i jeleni szlachetnych (*Cervus elaphus*)

Jeleń szlachetny i sarna europejska to dwa gatunki, najpowszechniej i najbardziej licznie występujących w Polsce, dzikich przeżuwaczy. Bogate tradycje gospodarki łowieckiej oraz rosnące zapotrzebowanie na dziczyznę w branży gastronomicznej sprawia, że ludzie mają stały kontakt z tymi zwierzętami. Oba opisywane w tym rozdziale gatunki są nosicielami szczepów *Anaplasma phagocytophilum* (Publikacja nr. 2). Aby kompleksowo omówić temat szczepów bakterii *A. phagocytophilum* wśród saren i jeleni, wykonano analizy markerów genetycznych *groEL* i *ankA*. Przedstawione wyniki pozwolą na lepsze poznanie badanych szczepów oraz poszerzenie, już dostępnej, wiedzy na temat krążenia i znaczenia bakterii *A. phagocytophilum* w środowisku naturalnym.

Wyniki

groEL

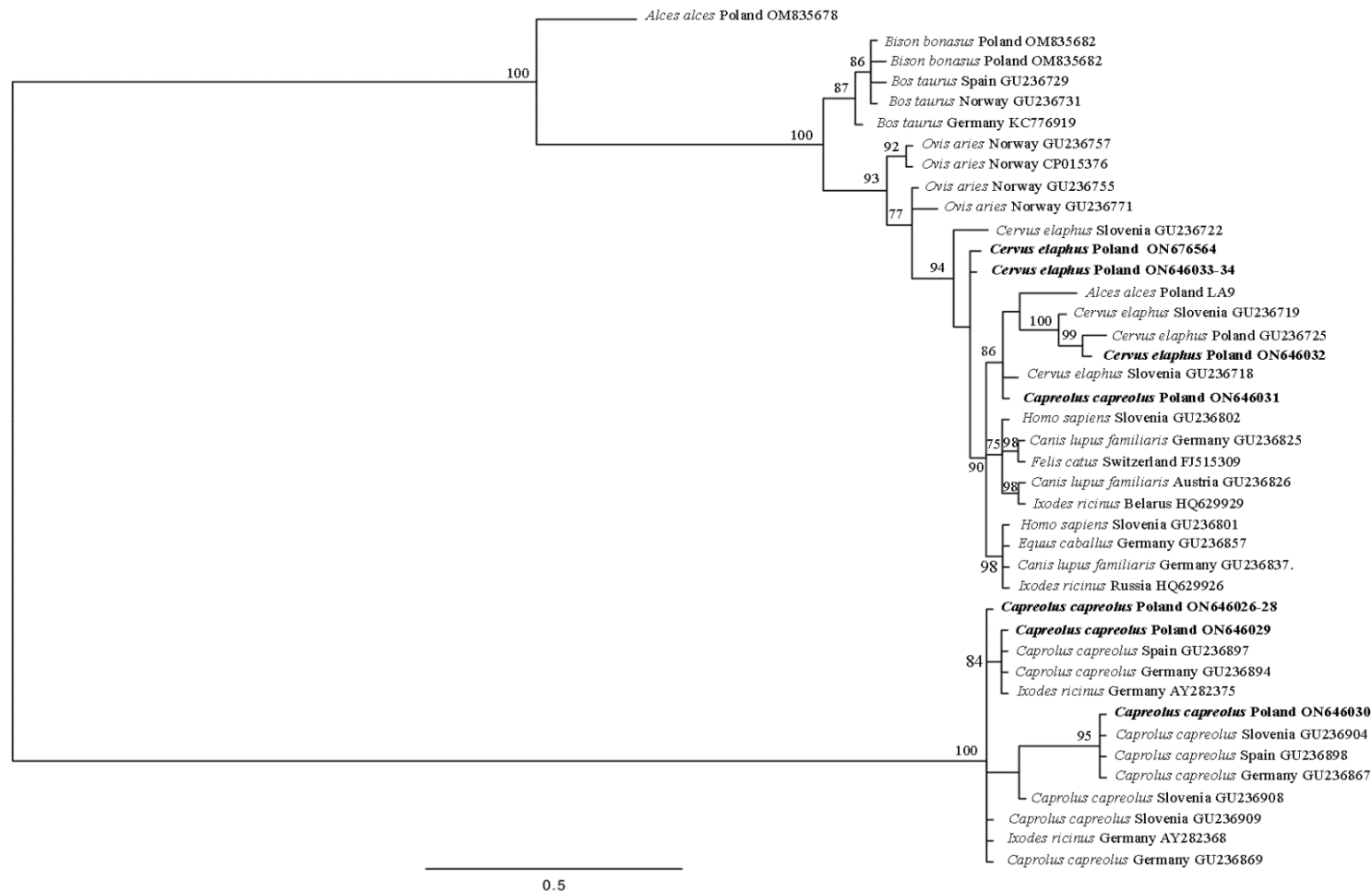
Otrzymane sekwencje nukleotydowe fragmentu genu *groEL* reprezentują 5 haplotypów. W badanej grupie zwierząt nie wykryto nowych haplotypów, wszystkie sekwencje były już notowane i w bazie internetowej GenBank mają swoje odpowiedniki. Sekwencje nukleotydowe genu *groEL* *A. phagocytophilum* z izolatów, od jeleni szlachetnych były identyczne (ON604852 – ON604857). Fragmenty genu *groEL* amplifikowane z materiałów pobranych od saren europejskich należą do 4 haplotypów (ON604846, ON604848, ON604849, ON604850). Analiza filogenetyczna markera genetycznego *groEL* pozwoliła ustalić, że izolaty *A. phagocytophilum* od jeleni szlachetnych należą do ekotypu I, a od saren europejskich do ekotypu I i II (Ryc.7).



Rycina 7. Drzewo filogenetyczne fragmentu genu *groEL* (486 pz) *A. phagocytophilum*, skonstruowane metodą analizy wnioskowania bayesowskiego (BI). Model ewolucji HKY + I. Analiza została przeprowadzona dla 2 000 000 pokoleń, przy czym 500 000 pokoleń odrzucono jako „wypalenie”. Wsparcie węzłowe jest wskazywane jako prawdopodobieństwo bayesowskie a posteriori. Słupki skali są proporcjonalne do liczby podstawień na miejsce. Haplotypy opisywane w niniejszym rozdziale zostały wytłuszczone. I-IV - ekotypy według Jahfari et al., 2014

ankA

Otrzymane sekwencje nukleotydowe fragmentu genu *ankA* reprezentują 7 haplotypów. Wśród sekwencji uzyskanych od saren europejskich 3 izolaty były identyczne (ON646026, ON646027, ON646028). Tylko jeden haplotyp (ON646031) nie był nigdy wcześniej notowany, pozostałe o różnej sekwencji (ON646029, ON646030, ON646026) mają odpowiedniki w bazie GenBank. Wykryto 3 haplotypy fragmentu genu *ankA* ze szczepów *A. phagocytophilum* od jeleni szlachetnych. Tylko jeden haplotyp (ON646032) był notowany wcześniej, pozostałe dwa reprezentowane przez sekwencje ON646033 i ON676564, są nowe. Od dwóch różnych osobników jeleni szlachetnych uzyskano identyczne sekwencje fragmenty genu *ankA* (ON646033, ON646034). Na podstawie analizy filogenetycznej szczepy izolowane od saren europejskich należą do klastra I i II, a wszystkie izolaty od jeleni szlachetnych należą do klastra I (Ryc. 8).



Rycina 8. Drzewo filogenetyczne fragmentu genu *ankA* (633 pz) *A. phagocytophilum*, skonstruowane metodą analizy wnioskowania bayesowskiego (BI). Model ewolucji GTR + I + G. Analiza została przeprowadzona dla 2 000 000 pokoleń, przy czym 500 000 pokoleń odrzucono jako „wypalenie”. Wsparcie węzłowe jest wskazywane jako prawdopodobieństwo bayesowskie a posteriori. Słupki skali są proporcjonalne do liczby podstawień na miejsce. Haplotypy opisywane w niniejszym rozdziale zostały wytłuszczone

Dyskusja

W badanej grupie jeleni szlachetnych i saren europejskich zidentyfikowano pięć różnych haplotypów fragmentu genu *groEL*. Analiza sekwencji *groEL* w programie internetowym NCBI BLAST wykazała, że wszystkie haplotypy można zaklasyfikować jako europejskie ekotypy. Mimo występowania w bazie danych GenBank sekwencji genu *groEL* z Azji (MT010579.1, KY379956.1, MN989864.1, MH722253.1, MH722254.1), Ameryki Północnej (AY219849.1, AF383227.1, JF494840.1, DQ680012.1) i Ameryki Południowej (MW699686.1, MW699687.1), uzyskane w tych badaniach haplotypy nie wykazały 100% identyczności z żadnym z tych przykładowych rekordów. Haplotypy ON604852-ON604857, ON604849 i ON604850 należą do ekotypu I (Ryc. 7). Sekwencje nukleotydowe fragmentu genu *groEL* *A. phagocytophilum* od saren europejskich (ON604849, ON604850) wykazują wyższy procent zgodności z izolatami od jeleni szlachetnych – zgodność na poziomie 99%, niż z izolatami od saren europejskich – zgodność ok. 95%. Sekwencje ON604849 i ON604850, nie charakterystyczne dla sarniego gospodarza są notowane powszechnie w Europie m.in. w: Niemczech (kleszcz pospolity AY281823.1), Francji (krowa KJ832474), Szwajcarii (koza GQ452227.2), Czechach (jeź wschodni MW013536.1) oraz Norwegii (łoś euroazjatycki MK069949.1, jelen szlachetny MK069696.1, kleszcz pospolity MK069797.1). Istotnym jest fakt, że sekwencja ON604849 (izolat z sarny S36) był notowany tylko w Norwegii i żadnym z gospodarzy nie była sarna. U jelenia szlachetnego zidentyfikowano jeden haplotyp fragmentu genu *groEL* *A. phagocytophilum*, który notuje się wśród: jeleni szlachetnych (MK069963.1, KU712106.1), koni (KJ832471), owiec (MZ348280) oraz kleszczy (MK069889, MW732493.1, KF312358.1). W badaniach opisano jeszcze dwa haplotypy fragmentu genu *groEL* uzyskanych od saren europejskich (grupa I: ON604846, ON604847, ON604851, grupa II: ON604848) (Tab. 3). Te dwa haplotypy należą do ekotypu II (Ryc. 7) i równie powszechnie, jak wcześniej opisane haplotypy, występują w całej Europie jednak notuje się je tylko u trzech gatunków gospodarzy: sarny europejskiej, łośa euroazjatyckiego i kleszczy z rodzaju *Ixodes*. Przypisanie wyżej opisanych haplotypów od jeleni szlachetnych i saren europejskich do ekotypu I oraz haplotypów od saren europejskich do ekotypu II, jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami na temat podziału szczepów *Anaplasma phagocytophilum* na ekotypy (Jahfari i wsp., 2014).

Tabela 3. Haplotypy fragmentu genu *groEL* z izolatów *A. phagocytophilum* od saren europejskich i jeleni szlachetnych i identyczne do nich w 100% sekwencje z bazy GenBank, z podziałem na ekotypy

EKOTYP	GOSPODARZ	HAPLOTYPY (numer sekwencji GenBank)	HAPLOTYPY zgodne w 100% (numer sekwencji GenBank)	GOSPODARZ	KRAJ
I	jeleń szlachetny	ON604852-87	MK069963	jeleń szlachetny	Norwegia
			KU712106		Austria
			KJ832471	koń	Francja
			MZ348280	owca	Niemcy
			MK069889		Norwegia
			MW732493	kleszcz pospolity	W. Brytania
			KF312358		Polska
	sarna europejska	ON604849	MK069949	łoś euroazjatycki	
			MK069696	jeleń szlachetny	Norwegia
		ON604850	MK069797	kleszcz pospolity	
			AY281823	kleszcz pospolity	Niemcy
			KJ832474	krowa	Francja
			GQ452227.2	koza	Szwajcaria
			MW013536.1	jeź wschodni	Czechy
			MN093177.1	kleszcz pospolity	Holandia
II	sarna europejska	ON604846-47 ON6048451	KU712112.1	sarna europejska	Niemcy
			KC800984.1	łoś euroazjatycki	
		ON604848	AY220467.1	sarna europejska	Austria
			KF031380.1	kleszcz	Włochy
			HQ629905.1	pospolity	Estonia
			MK069774.1	łoś euroazjatycki	Norwegia
			GQ988754.1		Austria
			KU712121.1	sarna europejska	Niemcy

W badanej grupie jeleni szlachetnych i saren europejskich zidentyfikowano siedem różnych haplotypów fragmentu genu *ankA* *A. phagocytophilum*. Trzy haplotypy izolowane od saren europejskich (ON646026, ON646029, ON646030) notuje się w trzech Europejskich krajach: Hiszpania, Niemcy, Słowenia, tylko u saren europejskich (GU236905.1, GU236879.1, GU236900.1) i kleszczy z rodzaju *Ixodes* (AY282386.1). Analiza filogenetycznej fragmentu genu *ankA* *A. phagocytophilum* od saren europejskich potwierdza ścisłą korelację sekwencji genu *ankA* z gospodarzem (Massung i wsp., 2000; von Loewenich i wsp., 2003; Scharf i wsp., 2011; Majazki i wsp., 2013; Jouglin i wsp., 2017). Haplotypy ON646026, ON646029, ON646030

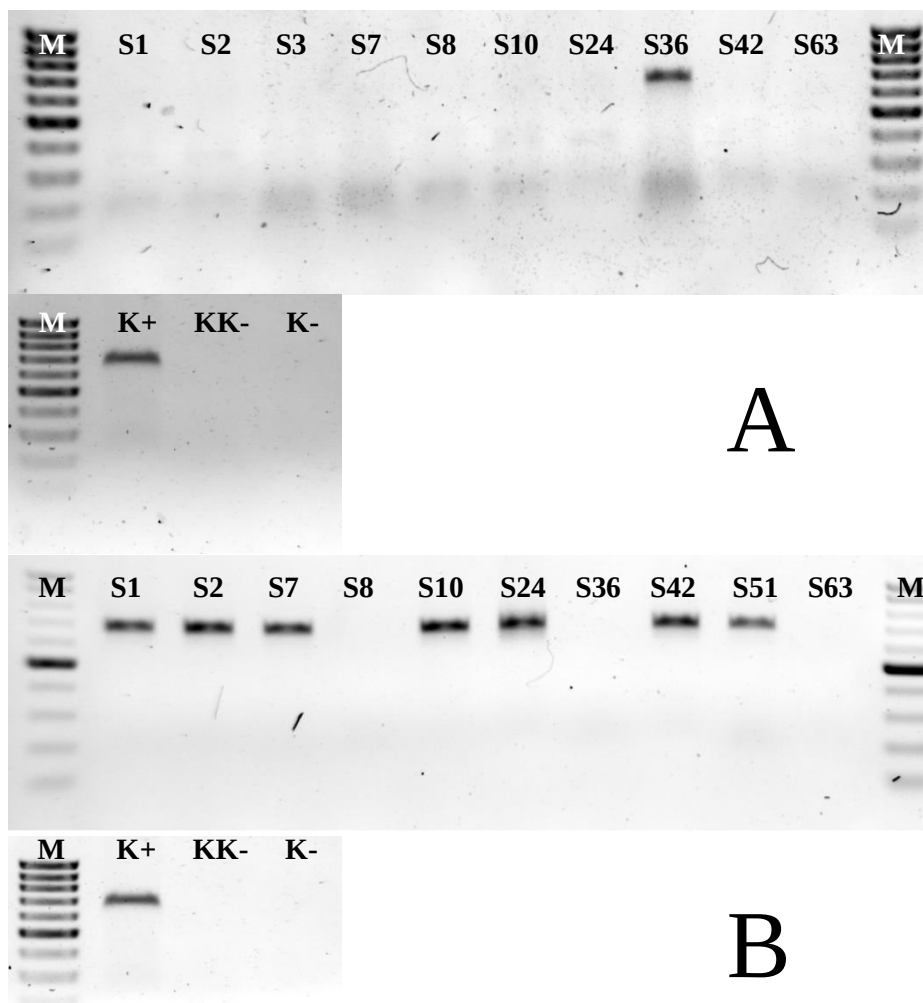
grupują się do klastra II (Ryc. 8) co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi, że to głównie w tym klastrze, grupują się szczepy *A. phagocytophilum* od saren europejskich (Scharf i wsp., 2011). Jeden haplotyp ON646031 (izolat z sarny S36), nie ma swojego odpowiednika w bazie GenBank, a najwyższą identyczność (99,83%) wykazywał do haplotypu *ankA* *A. phagocytophilum* od jelenia szlachetnego ze Słowenii (GU236718.1). Ten haplotyp sklasyfikowano do klastra I (Ryc. 8), gdzie również notuje się obecność izolatów *A. phagocytophilum* od saren europejskich. Wspólna analiza fragmentów genów *ankA* i *groEL* dla izolatu *A. phagocytophilum* od sarny europejskiej S36 sugeruje, że ten osobnik był nosicielem nie charakterystycznego dla sarny europejskiej szczepu *A. phagocytophilum*. Wszystkie 3 haplotypy fragmentu genu *ankA* *A. phagocytophilum* od jeleni szlachetnych należą do klastra I (Ryc. 8), gdzie zgodnie z doniesieniami literaturowymi przypisuje się szczepy *A. phagocytophilum* izolowane od jeleni szlachetnych (Massung i wsp., 2000; von Loewenich i wsp., 2003; Scharf i wsp., 2011; Majazki i wsp., 2013; Jouglin i wsp., 2017). Haplotyp reprezentowany przez sekwencje ON646033 nie ma odpowiednika w bazie GenBank. Najwyższe podobieństwo (99,69%) wykazuje do sekwencji fragmentu genu *ankA* od: psów (KJ832286.1), kleszczy (HQ629928.1), koni (GU236863.1), owiec (GU236791.1) i człowieka (GU236805.1, AF100888.1). Dwa pozostałe haplotypy ON646032 i ON676564 nie są identyczne, ale wykazują najwyższe podobieństwo do sekwencji fragmentu genu *ankA* *A. phagocytophilum* od jeleni szlachetnych. Haplotyp ON646032 ma jeden odpowiednik w bazie GenBank, jest on w 100% identyczny do sekwencji genu *ankA* *A. phagocytophilum* od jelenia szlachetnego (GU236718), a haplotyp ON676564 do tej samej sekwencji z bazy GenBank wykazuje podobieństwo na poziomie 99,68%.

Analiza sekwencji i analiza filogenetyczna fragmentów genów: 16S rDNA, *groEL* i *ankA*, wykazała, że wyizolowane szczepy *A. phagocytophilum* od jeleni szlachetnych mają identyczne sekwencje lub grupują się w ekotypach i klastrach z bakteriami *A. phagocytophilum* izolowanych od ludzi. Dlatego też istnieje prawdopodobieństwo, że jelenie szlachetne mogą stanowić naturalny rezerwuuar potencjalnie chorobotwórczych szczepów *A. phagocytophilum* dla człowieka.

Szczepy *A. phagocytophilum* od saren europejskich, te które są charakterystyczne dla tego gospodarza, nie wykazują podobieństw do szczepów zoonotycznych. Jednak z uwagi na to, że sarny mogą być nosicielami nie

specyficznych, dla gatunku, szczepów *A. phagocytophilum* (jak sarna S36) to nie można wykluczyć, że wśród saren europejskich będzie się wykrywać zoonotyczne szczepy *A. phagocytophilum*.

Do amplifikacji fragmentu genu *ankA* *A. phagocytophilum* w próbach izolowanych od saren europejskich, zaprojektowano nowe startery (rozdział Metody). Zmiana starterów była spowodowana bardzo niską skutecznością amplifikacji genu *ankA* w DNA wyizolowanym od saren europejskich z wykorzystaniem starterów literaturowych (Massung i wsp., 2007). W początkowej fazie badań wybrano te startery literaturowe, ponieważ wiele zespołów badawczych z całego świata wykorzystywało te startery do amplifikacji fragmentu genu *ankA* od wielu różnych gospodarzy, w tym od saren europejskich (Massung i wsp., 2007, Scharf i wsp., 2011, Rymaszewska 2014; Lee i wsp., 2020). W badaniach przedstawionych w tej rozprawie z sukcesem amplifikowano gen *ankA* *A. phagocytophilum* z wykorzystaniem starterów literaturowych od: dzików euroazjatyckich, żubrów europejskich, łosi euroazjatyckich i jeleni szlachetnych. Jednak w przypadku saren europejskich po przebadaniu prób DNA od 25 osobników wykryto tylko jedną próbę dodatnią (S36) (1/25, 4%). W późniejszych analizach wykazano, że ta jedna pozytywna próba z sarny S36 reprezentuje szczep *A. phagocytophilum*, nie charakterystyczny dla populacji gospodarzy jakim są sarny europejskie. Zmiana starterów pozwoliła na amplifikację fragmentu genu *ankA* *A. phagocytophilum* z DNA izolowanego od saren europejskich na poziomie około 70%. Poniżej przedstawiono zestawienie zdjęć żeli po rozdziale elektroforetycznym produktów reakcji nested-PCR amplifikacji fragmentu genu *ankA* *A. phagocytophilum* od tych samych osobników saren europejskich z wykorzystaniem: (A) starterów literaturowych, (B) nowych starterów, zaprojektowanych w IP PAN (Ryc. 9).



Rycina 9. Zdjęcia żeli agarozowych, po elektroforezie produktów reakcji nested-PCR amplifikacji fragmentu genu *ankA* *A. phagocytophilum* izolowanych od saren europejskich z wykorzystaniem (A) starterów literaturowych, (B) starterów zaprojektowanych w IP PAN. (M)- marker, (S1-S63)- próby badane, (K+)- kontrola dodatnia (izolat środowiskowy z łosia euroazjatyckiego, numer sekwencji w bazie GenBank OM835679), (K-) – kontrola ujemna (KK-)- kontrola kontroli ujemnej z pierwszej reakcji

Podsumowanie

- Przebadano 305 osobników z 6 gatunków zwierząt z 7 województw.
- Bakterie *Anaplasma* spp. wykryto u 112 osobników i prewalencja wyniosła 36,7%. To pierwsze tak powszechne badanie dziko żyjących zwierząt łownych w Polsce. Określono prewalencję bakterii z rodzaju *Anaplasma* u: jelenia szlachetnego (55,6%), sarny europejskiej (55,7%), łośa euroazjatyckiego (30,8%), żubra europejskiego (24,1%), dzika euroazjatyckiego (20,34%).
- Nie wykryto prób dodatnich w kierunku *Anaplasma* spp. wśród danieli zwyczajnych.
- Wszystkie zsekwencjonowane, losowo wybrane, próby genu 16S rDNA pozwoliły na klasyfikacje izolatów do gatunku *Anaplasma phagocytophilum*.
- Wykryto 3 haplotypy genu 16S rDNA, dwa notowane wcześniej (haplotyp 1: ON025953, MZ314415, MZ317898, MZ317902; haplotyp 2: MZ314417, MZ319389) i jeden nowy (MZ314416).
- Otrzymano 12 różnych haplotypów genu *groEL*, dwa z nich wykryto po raz pierwszy (MT731761, OM835689). W sumie, w bazie GenBank zdeponowano 22 sekwencje nukleotydowe fragmentu genu *groEL*.
- Analiza filogenetyczna genu *groEL* wykazała, że izolaty *A. phagocytophilum* od badanych zwierząt należą do dwóch z czterech opisanych w literaturze ekotypów tj. ekotypu I i II. Szczepy klasyfikujące się do ekotypu I wykryto w każdym z gatunków badanych zwierząt, a ekotyp II identyfikowano u saren europejskich i łośi euroazjatyckich.
- Otrzymano 15 różnych haplotypów genu *ankA*, 8 z nich wykryto po raz pierwszy (MT731759, OM835678, OM835679, OM835690, OM835682, ON646031, ON646033, ON676564). W sumie, w bazie GenBank zdeponowano 18 sekwencji nukleotydowych fragmentu genu *ankA*.
- Analiza filogenetyczna genu *ankA* wykazała, że izolaty *A. phagocytophilum* od badanych zwierząt należą do trzech z pięciu opisanych w literaturze klastrow tj. klastra I, II i IV. Szczepy klasyfikujące się do klastra I wykryto wśród: jeleni szlachetnych, saren europejskich, dzików euroazjatyckich i łośi euroazjatyckich. Bakterie *A. phagocytophilum* z klastra II zidentyfikowano u saren europejskich, a szczepy od żubrów europejskich należą do klastra IV.

- Wśród 5 gatunków analizowanych zwierząt, na podstawie analizy trzech markerów genetycznych: 16S rDNA, *groEL* i *ankA* stwierdzono występowanie szczepów bakterii *A. phagocytophilum*, które mają sekwencje w 100% identyczne na analizowanych fragmentach genów lub według analizy filogenetycznej grupują się ze szczepami *A. phagocytophilum* wykrytymi u człowieka.

Wnioski

- Potwierdzono, że bakterie *Anaplasma phagocytophilum* powszechnie występują wśród badanych dzikich kopytnych zwierząt w Polsce.
- Zwierzęta kopytne w Polsce są nosicielami potencjalnie zoonotycznych szczepów *A. phagocytophilum*.
- Potwierdzono, że prewalencja *A. phagocytophilum* jest znacznie wyższa u zwierząt dzikich niż u hodowlanych.
- Śledziona, jako tkanka obwodowa w badaniach prewalencji *A. phagocytophilum*, stanowi bardziej wydajne źródło materiału biologicznego do detekcji DNA tych bakterii niż wątroba. Obecność DNA *Anaplasma* spp. wykrywano istotnie częściej w próbkach ze śledziony niż z wątroby (ok. 2-krotnie).
- Analiza statystyczna wykazała, że bakterie *A. phagocytophilum* częściej występują u osobników młodych niż u dorosłych.
- Analiza statystyczna występowania *A. phagocytophilum*, u dorosłych osobników, wykazała wyższą prewalencję u samic niż u samców.
- Stworzenie dużej i różnorodnej bazy danych markerów genetycznych dotyczącej szczepów *A. phagocytophilum* oraz porównanie otrzymanych wyników z dostępną literaturą, pozwala na postawienie nowej hipotezy, że gatunek sarny europejskiej (*Capreolus capreolus*) jest gospodarzem szczepu *A. phagocytophilum* charakterystycznego tylko dla tego gatunku (*Anaplasma phagocytophilum* roe deer strain) lub nowego szczepu bakterii z rodzaju *Anaplasma* tymczasowo nazwanego *Anaplasma capreolus*.

Piśmiennictwo

1. Adamska M. The role of different species of wild ungulates and *Ixodes ricinus* ticks in the circulation of genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in a forest biotope in north-western Poland. Ticks Tick Borne Dis. 2020 Sep;11(5):101465. doi: 10.1016/j.ttbdis.2020.101465.
2. Adaszek L, Klimiuk P, Skrzypczak M, Górna M, Zietek J, Winiarczyk S. The identification of *Anaplasma* spp. isolated from fallow deer (*Dama dama*) on a free-range farm in eastern Poland. Pol J Vet Sci. 2012 15(2):393-4. doi: 10.2478/v10181-012-0060-0.
3. Alberti A, Zobba R, Chessa B, Addis MF, Sparagano O, Pinna Pargaglia ML, Cubeddu T, Pintori G, Pittau M. Equine and canine *Anaplasma phagocytophilum* strains isolated on the island of Sardinia (Italy) are phylogenetically related to pathogenic strains from the United States. Appl Environ Microbiol. 2005 Oct;71(10):6418-22. doi: 10.1128/AEM.71.10.6418-6422.2005.
4. Altman DG, Machin D, Bryant TN, Gardner MJ, Statistics with Confidence, 2nd ed.; BMJ Books: London, UK, 2000.
5. Andersson SG, Zomorodipour A, Andersson JO, Sicheritz-Pontén T, Alsmark UC, Podowski RM, Näslund AK, Eriksson AS, Winkler HH, Kurland CG. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. Nature. 1998 Nov;396(6707):133-40. doi: 10.1038/24094.
6. Bakken JS, Dumler S. Human granulocytic anaplasmosis. Infect Dis Clin North Am. 2008 Sep;22(3):433-48, viii. doi: 10.1016/j.idc.2008.03.011.
7. Bayard-Mc Neeley M, Bansal A, Chowdhury I, Girao G, Small CB, Seiter K, Nelson J, Liveris D, Schwartz I, Mc Neeley DF, Wormser GP, Aguero-Rosenfeld ME. In vivo and in vitro studies on *Anaplasma phagocytophilum* infection of the myeloid cells of a patient with chronic myelogenous leukaemia and human granulocytic ehrlichiosis. J Clin Pathol. 2004 May;57(5):499-503. doi: 10.1136/jcp.2003.011775.
8. Bermúdez C SE, Félix ML, Domínguez A L, Kadoch N, Muñoz-Leal S, Venzal JM. Molecular screening for tick-borne bacteria and hematozoa in *Ixodes* cf. *boliviensis* and *Ixodes tapirus* (Ixodida: Ixodidae) from western highlands of Panama. Curr Res Parasitol Vector Borne Dis. 2021 Jun;3;1:100034. doi: 10.1016/j.crvbd.2021.100034.

9. Blaňarová L, Stanko M, Carpi G, Miklisová D, Víchová B, Mošanský L, Bona M, Derdáková M. Distinct *Anaplasma phagocytophilum* genotypes associated with *Ixodes trianguliceps* ticks and rodents in Central Europe. Ticks Tick Borne Dis. 2014 Oct;5(6):928-38. doi: 10.1016/j.ttbdis.2014.07.012.
10. Bown KJ, Lambin X, Ogden NH, Begon M, Telford G, Woldehiwet Z, Birtles RJ. Delineating *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in coexisting, discrete enzootic cycles. Emerg Infect Dis. 2009 Dec;15(12):1948-54. doi: 10.3201/eid1512.090178.
11. Burbaitė L, Csányi S, Roe deer population and harvest changes in Europe. Est. J. Eco. 2009 58, 169–180. doi: 10.3176/eco.2009.3.02.
12. Burbaitė L.; Csányi, S. Red deer population and harvest changes in Europe. Acta Zool. Litu. 2010 20, 179–188. doi: 10.2478/v10043-010-0038-z.
13. Cafiso A, Bazzocchi C, Cavagna M, Di Lorenzo E, Serra V, Rossi R, Comazzi S. Molecular Survey of *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in Roe Deer from a Wildlife Rescue Center in Italy. Animals (Basel). 2021 Nov 22;11(11):3335. doi: 10.3390/ani11113335.
14. Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. J Clin Microbiol. 1994 Mar;32(3):589-95. doi: 10.1128/jcm.32.3.589-595.1994.
15. Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nat Methods. 2012 Jul;30;9(8):772. doi: 10.1038/nmeth.2109.
16. Daszkiewicz T, Hnatyk N, Dąbrowski D, Janiszewski P, Gugolek A, Kubiak D, Śmiecińska K, Winarski R, Koba-Kowalczyk M. A comparison of the quality of the *Longissimus lumborum* muscle from wild and farm-raised fallow deer (*Dama dama* L.). Small Rumin. Res. 2015 129, 77–83. doi: 10.1016/j.smallrumres.2015.05.003.
17. de la Fuente J, Torina A, Caracappa S, Tumino G, Furlá R, Almazán C, Kocan KM. Serologic and molecular characterization of *Anaplasma* species infection in farm animals and ticks from Sicily. Vet Parasitol. 2005 Nov;5;133(4):357-62. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.05.063.
18. Dehghani M, Kazemi Shariat Panahi H, Holmes EC, Hudson BJ, Schloeffel R, Guillemin GJ. Human Tick-Borne Diseases in Australia. Front Cell Infect Microbiol. 2019 Jan;28;9:3. doi: 10.3389/fcimb.2019.00003.
19. Dugat T, Zanella G, Vérant L, Lesage C, Girault G, Durand B, Lagrée AC, Boulouis HJ, Haddad N. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis potentially

- reveals the existence of two groups of *Anaplasma phagocytophilum* circulating in cattle in France with different wild reservoirs. *Parasit Vectors*. 2016 Nov;22;9(1):596. doi: 10.1186/s13071-016-1888-4.
20. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001 Nov;51(Pt 6):2145-2165. doi: 10.1099/00207713-51-6-2145.
 21. Dunning Hotopp JC, Lin M, Madupu R, Crabtree J, Angiuoli SV, Eisen JA, Seshadri R, Ren Q, Wu M, Utterback TR, Smith S, Lewis M, Khouri H, Zhang C, Niu H, Lin Q, Ohashi N, Zhi N, Nelson W, Brinkac LM, Dodson RJ, Rosovitz MJ, Sundaram J, Daugherty SC, Davidsen T, Durkin AS, Gwinn M, Haft DH, Selengut JD, Sullivan SA, Zafar N, Zhou L, Benahmed F, Forberger H, Halpin R, Mulligan S, Robinson J, White O, Rikihisa Y, Tettelin H. Comparative genomics of emerging human ehrlichiosis agents. *PLoS Genet*. 2006 Feb;2(2):e21. doi: 10.1371/journal.pgen.0020021.
 22. Dziegiel B, Adaszek Ł, Krzysiak M, Skrzypczak M, Adaszek M, Furmaga B, Winiarczyk S. The occurrence of *Anaplasma phagocytophilum* in wild bison from the Białowieża Primeval Forest in Eastern Poland. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 2015 Jul-Aug;128(7-8):310-4.
 23. Eshoo MW, Carolan HE, Massire C, Chou DM, Crowder CD, Rounds MA, Phillipson CA, Schutzer SE, Ecker DJ. Survey of *Ixodes pacificus* Ticks in California Reveals a Diversity of Microorganisms and a Novel and Widespread Anaplasmataceae Species. *PLoS One*. 2015 Sep;16;10(9):e0135828. doi: 10.1371/journal.pone.0135828.
 24. Ficek B, Matławska M, Gołąb E, Chmielewski T. Ryzyko transmisji chorób zakaźnych przenoszonych przez kleszcze poprzez transfuzję krwi. *Post. Mikrobiol*. 2020 59, 2, 129-137. doi: 10.21.307/PM-2020.59.2.010.
 25. Gofton AW, Doggett S, Ratchford A, Oskam CL, Paparini A, Ryan U, Irwin P. Bacterial Profiling Reveals Novel "Ca. *Neoehrlichia*", *Ehrlichia*, and *Anaplasma* Species in Australian Human-Biting Ticks. *PLoS One*. 2015 Dec;28;10(12):e0145449. doi: 10.1371/journal.pone.0145449.

26. Gordon WS, Brownlee A, Wilson DR, MacLeod J. Tick-borne fever (a hitherto undescribed disease of sheep). J. Comp. Pathol. 1932 45, 301–307. doi: 10.1016/S0368-1742(32)80025-1.
27. Grassi L, Franzo G, Martini M, Mondin A, Cassini R, Drigo M, Pasotto D, Vidorin E, Menandro ML. Ecotyping of *Anaplasma phagocytophilum* from Wild Ungulates and Ticks Shows Circulation of Zoonotic Strains in Northeastern Italy. Animals (Basel). 2021 Jan;26;11(2):310. doi: 10.3390/ani11020310.
28. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol. 2003 Oct;52(5):696-704. doi: 10.1080/10635150390235520.
29. Gwet KL. Computing inter-rater reliability and its variance in the presence of high agreement. Br J Math Stat Psychol. 2008 May;61(Pt 1):29-48. doi: 10.1348/000711006X126600.
30. Hapunik J, Víchová B, Karbowiak G, Wita I, Bogdaszewski M, Pet'ko B. Wild and farm breeding cervids infections with *Anaplasma phagocytophilum*. Ann Agric Environ Med. 2011 18(1):73-7.
31. Honig V, Carolan HE, Vavruskova Z, Massire C, Mosel MR, Crowder CD, Rounds MA, Ecker DJ, Ruzek D, Grubhoffer L, Luft BJ, Eshoo MW. Broad-range survey of vector-borne pathogens and tick host identification of *Ixodes ricinus* from Southern Czech Republic. FEMS Microbiol Ecol. 2017 Nov;1;93(11):fix129. doi: 10.1093/femsec/fix129.
32. Hornok S, Sugár L, Fernández de Mera IG, de la Fuente J, Horváth G, Kovács T, Micsutka A, Gönczi E, Flaisz B, Takács N, Farkas R, Meli ML, Hofmann-Lehmann R. Tick- and fly-borne bacteria in ungulates: the prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, haemoplasmas and rickettsiae in water buffalo and deer species in Central Europe, Hungary. BMC Vet Res. 2018 Mar;20;14(1):98. doi: 10.1186/s12917-018-1403-6.
33. Huhn C, Winter C, Wolfspurger T, Wüppenhorst N, Strašek Smrdel K, Skuballa J, Pfäffle M, Petney T, Silaghi C, Dyachenko V, Pantchev N, Straubinger RK, Schaarschmidt-Kiener D, Ganter M, Aardema ML, von Loewenich FD. Analysis of the population structure of *Anaplasma phagocytophilum* using multilocus sequence typing. PLoS One. 2014 Apr;3;9(4):e93725. doi: 10.1371/journal.pone.0093725.
34. Jaarsma RI, Sprong H, Takumi K, Kazimirova M, Silaghi C, Myserud A, Rudolf I, Beck R, Földvári G, Tomassone L, Groenevelt M, Everts RR, Rijks JM, Ecke F,

- Hörnfeldt B, Modrý D, Majerová K, Votýpka J, Estrada-Peña A. *Anaplasma phagocytophilum* evolves in geographical and biotic niches of vertebrates and ticks. *Parasit Vectors*. 2019 Jun;28;12(1):328. doi: 10.1186/s13071-019-3583-8.
35. Jahfari S, Coipan EC, Fonville M, van Leeuwen AD, Hengeveld P, Heylen D, Heyman P, van Maanen C, Butler CM, Földvári G, Szekeres S, van Duijvendijk G, Tack W, Rijks JM, van der Giessen J, Takken W, van Wieren SE, Takumi K, Sprong H. Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. *Parasit Vectors*. 2014 Aug;15;7:365. doi: 10.1186/1756-3305-7-365.
 36. Jenkins A, Handeland K, Stuen S, Schouls L, van de Pol I, Meen RT, Kristiansen BE. Ehrlichiosis in a moose calf in Norway. *J Wildl Dis*. 2001 Jan;37(1):201-3. doi: 10.7589/0090-3558-37.1.201.
 37. Jouglin M, Chagneau S, Faille F, Verheyden H, Bastian S, Malandrin L. Detecting and characterizing mixed infections with genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in roe deer (*Capreolus capreolus*) by developing an *ankA* cluster-specific nested PCR. *Parasit Vectors*. 2017 Aug;7;10(1):377. doi: 10.1186/s13071-017-2316-0.
 38. Karbowski G, Víchová B, Werszko J, Demiaszkiewicz AW, Pyziel AM, Sytykiewicz H, Szewczyk T, Peřko B. The infection of reintroduced ruminants - *Bison bonasus* and *Alces alces* - with *Anaplasma phagocytophilum* in northern Poland. *Acta Parasitol*. 2015 Dec;60(4):645-8. doi: 10.1515/ap-2015-0091.
 39. Karbowski G, Biernat B, Stańczak J, Werszko J, Wróblewski P, Szewczyk T, Sytykiewicz H. The role of particular ticks developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens in Central Europe. 4. Anaplasmataceae. *Ann Parasitol*. 2016 62(4):267-284. doi: 10.17420/ap6204.62.
 40. Kazimírová M, Hamšíková Z, Špitalská E, Minichová L, Mahríková L, Caban R, Sprong H, Fonville M, Schnittger L, Kocianová E. Diverse tick-borne microorganisms identified in free-living ungulates in Slovakia. *Parasit Vectors*. 2018 Sep;3;11(1):495. doi: 10.1186/s13071-018-3068-1.
 41. Klich D, Łopucki R, Perlińska-Teresiak M, Lenkiewicz-Bardzińska A, Olech W. Human-Wildlife Conflict: The Human Dimension of European Bison Conservation in the Bieszczady Mountains (Poland). *Animals (Basel)*. 2021 Feb;15;11(2):503. doi: 10.3390/ani11020503.
 42. Krasieński ZA. Żubr Puszczy Imperator; Wydawnictwo BPN: Białowieża, Poland, 2005 pp. 1–24.

43. Kuba J, Landete-Castillejos T, Udała J. Red deer farming: breeding practice, trends and potential in Poland – A Review. *Annals of Animal Science* 2015 vol.15, no.3, pp.591-599. doi: 10.1515/aoas-2015-0033.
44. Kudrnáčová E, Bartoň L, Bureš D, Hoffman LC. Carcass and meat characteristics from farm-raised and wild fallow deer (*Dama dama*) and red deer (*Cervus elaphus*): A review. *Meat Sci.* 2018 Jul;141:9-27. doi: 10.1016/j.meatsci.2018.02.020.
45. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977 Mar;33(1):159-74.
46. Lee SH, Shin NR, Kim CM, Park S, Yun NR, Kim DM, Jung DS. First identification of *Anaplasma phagocytophilum* in both a biting tick *Ixodes nipponensis* and a patient in Korea: a case report. *BMC Infect Dis.* 2020 Nov;11;20(1):826. doi: 10.1186/s12879-020-05522-5.
47. Majazki J, Wüppenhorst N, Hartelt K, Birtles R, von Loewenich FD. *Anaplasma phagocytophilum* strains from voles and shrews exhibit specific *ankA* gene sequences. *BMC Vet Res.* 2013 Nov;28;9:235. doi: 10.1186/1746-6148-9-235.
48. Malmsten J, Dalin AM, Moutailler S, Devillers E, Gondard M, Felton A. Vector-Borne Zoonotic Pathogens in Eurasian Moose (*Alces alces alces*). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2019 Mar;19(3):207-211. doi: 10.1089/vbz.2018.2277.
49. Massei G, Kindberg J, Licoppe A, Gačić D, Šprem N, Kamler J, Baubet E, Hohmann U, Monaco A, Ozoliņš J, Cellina S, Podgórski T, Fonseca C, Markov N, Pokorný B, Rosell C, Náhlik A. Wild boar populations up, numbers of hunters down? A review of trends and implications for Europe. *Pest Manag Sci.* 2015 Apr;71(4):492-500. doi: 10.1002/ps.3965.
50. Massung RF, Owens JH, Ross D, Reed KD, Petrovec M, Bjoersdorff A, Coughlin RT, Beltz GA, Murphy CI. Sequence analysis of the *ank* gene of granulocytic ehrlichiae. *J Clin Microbiol.* 2000 Aug;38(8):2917-22. doi: 10.1128/JCM.38.8.2917-2922.2000.
51. Masuzawa T, Uchishima Y, Fukui T, Okamoto Y, Muto M, Koizumi N, Yamada A. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* from Wild Boars and Deer in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2011 64(4):333-6. doi: 10.7883/yoken.64.333.
52. Matei IA, Estrada-Peña A, Cutler SJ, Vayssier-Taussat M, Varela-Castro L, Potkonjak A, Zeller H, Mihalca AD. A review on the eco-epidemiology and clinical management of human granulocytic anaplasmosis and its agent in Europe. *Parasit Vectors.* 2019 Dec;21;12(1):599. doi: 10.1186/s13071-019-3852-6.

53. Matsuo K, Moribe J, Abe N. Molecular Detection and Characterization of *Anaplasma* Species in Wild Deer and Boars in Gifu Prefecture, Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2017 May;24;70(3):354-356. doi: 10.7883/yoken.JJID.2016.368.
54. Michalik J, Stańczak J, Racewicz M, Cieniuch S, Sikora B, Szubert-Kruszyńska A, Grochowalska R. Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in wild cervids and feeding *Ixodes ricinus* ticks from west-central Poland. *Clin Microbiol Infect.* 2009 Dec;15 Suppl 2:81-3. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02240.x.
55. Michalik J, Stańczak J, Cieniuch S, Racewicz M, Sikora B, Dabert M. Wild boars as hosts of human-pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* variants. *Emerg Infect Dis.* 2012 Jun;18(6):998-1001. doi: 10.3201/eid1806.110997.
56. Nahayo A, Bardiau M, Volpe R, Pirson J, Paternostre J, Fett T, Linden A. Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in wild boar (*Sus scrofa*) in Belgium. *BMC Vet Res.* 2014 Apr;2;10:80. doi: 10.1186/1746-6148-10-80.
57. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce. *Biuletyn Roczny.* 2019.
58. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce. *Biuletyn Roczny.* 2020.
59. Nicholas HB, Nicholas D, Deerfield D. GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. *EMBNEW News.* 1997 4, 14.
60. Ogden NH, Bown K, Horrocks BK, Woldehiwet Z, Bennett M. Granulocytic *Ehrlichia* infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K. *Med Vet Entomol.* 1998 Oct;12(4):423-9. doi: 10.1046/j.1365-2915.1998.00133.x.
61. Ojeda-Chi MM, Rodriguez-Vivas RI, Esteve-Gasent MD, Pérez de León A, Modarelli JJ, Villegas-Perez S. Molecular detection of rickettsial tick-borne agents in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus yucatanensis*), mazama deer (*Mazama temama*), and the ticks they host in Yucatan, Mexico. *Ticks Tick Borne Dis.* 2019 Feb;10(2):365-370. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.11.018.
62. Petrovec M, Sixl W, Schweiger R, Mikulasek S, Elke L, Wüst G, Marth E, Strasek K, Stünzner D, Avsic-Zupanc T. Infections of wild animals with *Anaplasma phagocytophila* in Austria and the Czech Republic. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Jun;990:103-6. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07345.x.

63. Popov VL, Han VC, Chen SM, Dumler JS, Feng HM, Andreadis TG, Tesh RB, Walker DH. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. J Med Microbiol. 1998 Mar;47(3):235-51. doi: 10.1099/00222615-47-3-235.
64. Pūraitė I, Rosef O, Paulauskas A, Radzijeuskaja J. *Anaplasma phagocytophilum* infection in moose (*Alces alces*) in Norway. Microbes Infect. 2015 Nov-Dec;17(11-12):823-8. doi: 10.1016/j.micinf.2015.09.013.
65. Rar V, Golovljova I. *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and "Candidatus *Neoehrlichia*" bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. Infect Genet Evol. 2011 Dec;11(8):1842-61. doi: 10.1016/j.meegid.2011.09.019.
66. Razanske I, Rosef O, Radzijeuskaja J, Krikstolaitis R, Paulauskas A. Impact of tick-borne *Anaplasma phagocytophilum* infections in calves of moose (*Alces alces*) in southern Norway. Folia Parasitol (Praha). 2021 Oct;13;68:2021.023. doi: 10.14411/fp.2021.023.
67. Razanske I, Rosef O, Radzijeuskaja J, Bratchikov M, Gričiuvienė L, Paulauskas A. Prevalence and co-infection with tick-borne *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* spp. in red deer (*Cervus elaphus*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) in Southern Norway. Int J Parasitol Parasites Wildl. 2019 Jan;14;8:127-134. doi: 10.1016/j.ijppaw.2019.01.003.
68. Remesar S, Díaz P, Prieto A, García-Dios D, Fernández G, López CM, Panadero R, Díez-Baños P, Morondo P. Prevalence and molecular characterization of *Anaplasma phagocytophilum* in roe deer (*Capreolus capreolus*) from Spain. Ticks Tick Borne Dis. 2020 Mar;11(2):101351. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.101351.
69. Rikihisa Y, Zhi N, Wormser GP, Wen B, Horowitz HW, Hechemy KE. Ultrastructural and antigenic characterization of a granulocytic ehrlichiosis agent directly isolated and stably cultivated from a patient in New York state. J Infect Dis. 1997 Jan;175(1):210-3. doi: 10.1093/infdis/175.1.210.
70. Rikihisa Y. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. Clin Microbiol Rev. 2011 Jul;24(3):469-89. doi: 10.1128/CMR.00064-10.
71. Rocznik Statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej. Główny Urząd Statystyczny. 2021.
72. Rymaszewska A. Genotyping of *Anaplasma phagocytophilum* strains from Poland for selected genes. Folia Biol (Krakow). 2014 62(1):37-48. doi: 10.3409/fb62_1.37.
73. Scharf W, Schauer S, Freyburger F, Petrovec M, Schaarschmidt-Kiener D, Liebisch G, Runge M, Ganter M, Kehl A, Dumler JS, Garcia-Perez AL, Jensen J, Fingerle V,

- Meli ML, Ensser A, Stuen S, von Loewenich FD. Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum ankA* gene clusters. J Clin Microbiol. 2011 Mar;49(3):790-6. doi: 10.1128/JCM.02051-10.
74. Severo MS, Stephens KD, Kotsyfakis M, Pedra JH. *Anaplasma phagocytophilum*: deceptively simple or simply deceptive? Future Microbiol. 2012 Jun;7(6):719-31. doi: 10.2217/fmb.12.45.
 75. Silaghi C, Hamel D, Thiel C, Pfister K, Passos LM, Rehbein S. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in wild caprine and cervid ungulates from the Alps in Tyrol, Austria. Vector Borne Zoonotic Dis. 2011 Apr;11(4):355-62. doi: 10.1089/vbz.2010.0051.
 76. Silaghi C, Pfister K, Overzier E. Molecular investigation for bacterial and protozoan tick-borne pathogens in wild boars (*Sus scrofa*) from southern Germany. Vector Borne Zoonotic Dis. 2014 May;14(5):371-3. doi: 10.1089/vbz.2013.1495.
 77. Silaghi C, Fröhlich J, Reindl H, Hamel D, Rehbein S. *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* Species of Sympatric Roe Deer (*Capreolus capreolus*), Fallow Deer (*Dama dama*), Sika Deer (*Cervus nippon*) and Red Deer (*Cervus elaphus*) in Germany. Pathogens. 2020 Nov;20;9(11):968. doi: 10.3390/pathogens9110968.
 78. Stigum VM, Jaarsma RI, Sprong H, Rolandsen CM, Mysterud A. Infection prevalence and ecotypes of *Anaplasma phagocytophilum* in moose *Alces alces*, red deer *Cervus elaphus*, roe deer *Capreolus capreolus* and *Ixodes ricinus* ticks from Norway. Parasit Vectors. 2019 Jan;3;12(1):1. doi: 10.1186/s13071-018-3256-z.
 79. Stuen S, Pettersen KS, Granquist EG, Bergström K, Bown KJ, Birtles RJ. *Anaplasma phagocytophilum* variants in sympatric red deer (*Cervus elaphus*) and sheep in southern Norway. Ticks Tick Borne Dis. 2013a Apr;4(3):197-201. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.11.014.
 80. Stuen S, Granquist EG, Silaghi C. *Anaplasma phagocytophilum*--a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. Front Cell Infect Microbiol. 2013b Jul;22;3:31. doi: 10.3389/fcimb.2013.00031.
 81. Szewczyk T, Werszko J, Myczka AW, Laskowski Z, Karbowiak G. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in wild carnivores in north-eastern Poland. Parasit Vectors. 2019 Oct;7;12(1):465. doi: 10.1186/s13071-019-3734-y.
 82. Szymańska EJ, Dziwulaki M. Development of African Swine Fever in Poland. Agriculture, 2022 vol. 12, issue 1, 1-19. doi: 10.3390/agriculture12010119.

83. Tate CM, Howerth EW, Mead DG, Dugan VG, Luttrell MP, Sahara AI, Munderloh UG, Davidson WR, Yabsley MJ. *Anaplasma odocoilei* sp. nov. (family Anaplasmataceae) from white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). Ticks Tick Borne Dis. 2013 Feb;4(1-2):110-9. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.09.005.
84. Teodorowski O, Radzki R, Kalinowski M, Winiarczyk S, Garcia Bocanegra I, Winiarczyk D, Adaszek L. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in roe deer (*Capreolus capreolus*) in eastern Poland. Ann Agric Environ Med. 2020 Dec;22;27(4):702-705. doi: 10.26444/aaem/124902.
85. Townsend RL, Moritz ED, Fialkow LB, Berardi V, Stramer SL. Probable transfusion-transmission of *Anaplasma phagocytophilum* by leukoreduced platelets. Transfusion. 2014 Nov;54(11):2828-32. doi: 10.1111/trf.12675.
86. Tylewska-Wierzbanowska S, Chmielewski T. Zoonozy przenoszone przez kleszcze na terenie Polski. Post. Mikrobiol. 2010 49, 3, 191-197.
87. Wawrzyniak, P. Population dynamics, its impact upon the habitat and necessity of management the moose (*Alces alces*) population in Poland. In Proceedings of the Conference “Zarządzanie Populacjami Zwierząt”, Warsaw, Poland, 5 August 2016; Łowiec Polski: Warsaw, Poland, 2016 pp. 17–27.
88. Werszko J, Szewczyk T, Steiner-Bogdaszewska Ż, Laskowski Z, Karbowski G. Molecular Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Blood-Sucking Flies (Diptera: Tabanidae) in Poland. J Med Entomol. 2019 Apr;16;56(3):822-827. doi: 10.1093/jme/tjy217.
89. Wirtgen M, Nahayo A, Linden A, Losson B, Garigliany M, Desmecht D. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in *Dermacentor reticulatus* ticks. Vet Rec. 2011 Feb;19;168(7):195. doi: 10.1136/vr.d1053.
90. Veronesi F, Galuppi R, Tampieri MP, Bonoli C, Mammoli R, Piergili Fioretti D. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in fallow deer (*Dama dama*) and feeding ticks from an Italy preserve. Res Vet Sci. 2011 Feb;90(1):40-3. doi: 10.1016/j.rvsc.2010.05.019.
91. Víchová B, Majláthová V, Nováková M, Stanko M, Hviščová I, Pangrácová L, Chrudimský T, Čurlík J, Petko B. *Anaplasma* infections in ticks and reservoir host from Slovakia. Infect Genet Evol. 2014 Mar;22:265-72. doi: 10.1016/j.meegid.2013.06.003.
92. von Loewenich FD, Baumgarten BU, Schröppel K, Geissdörfer W, Röllinghoff M, Bogdan C. High diversity of *ankA* sequences of *Anaplasma phagocytophilum*

among *Ixodes ricinus* ticks in Germany. J Clin Microbiol. 2003 Nov;41(11):5033-40. doi: 10.1128/JCM.41.11.5033-5040.2003.

93. Yang J, Liu Z, Niu Q, Liu J, Han R, Guan G, Hassan MA, Liu G, Luo J, Yin H. A novel zoonotic *Anaplasma* species is prevalent in small ruminants: potential public health implications. Parasit Vectors. 2017 May;30;10(1):264. doi: 10.1186/s13071-017-2182-9.

Strony internetowe:

1. Approved Lists of Bacterial Names (www.bacterio.net/text/approved-lists).
2. Centers for Disease Control and Prevention (www.cdc.gov).
3. Centers for Disease Control and Prevention – Anaplasmosis (www.cdc.gov/anaplasmosis).
4. Federation of European Deer Farmers Associations (www.fedfa.com).
5. Główny Urząd Statystyczny (www.stat.gus.pl).
6. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny (www.pzh.gov.pl).
7. World Health Organization (www.who.int).