

Sveučilište u Zagrebu
Veterinarski fakultet

Valentina Kolak

Učestalost bakterija iz porodice *Chlamydiaceae* u Dinarske i Karpatske
populacije risa (*Lynx lynx*)

Zagreb, 2025.

Ovaj rad je izrađen u Zavodu za lovstvo i divlje životinje Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Magde Sindičić i dr. sc. Liče Lozice i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2024./2025.

Sadržaj

Uvod	1
Hipoteza i ciljevi	2
Materijali i metode	3
Rezultati	7
Rasprava	10
Zaključak.....	12
Popis literature.....	13
Sažetak	16
Summary	17

Uvod

Bakterije iz porodice *Chlamydiaceae*, rod *Chlamydia*, su obligatni unutarstanične, pleomorfne, nepokretne bakterije, a veličina i oblik ovise o stadiju razvojnog ciklusa. Obilježava ih unutarstanični način razmnožavanja koji predstavlja i infekcijski ciklus te uzrokuju infekcije koje se nazivaju klamidioza (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

Rod *Chlamydia* je jedini rod unutar porodice (BAVOIL i sur., 2013.), a prema dosadašnjim saznanjima obuhvaća 14 vrsta koje su u većini slučajeva vrsno specifične, te imaju veću ili manju specifičnost za pojedinog nositelja. Određene vrste imaju zoonotski potencijal te je mogući prelazak sa životinja na ljude i obrnuto (HENG i sur., 2019.). Ovisno o vrsti bakterije i domaćina, infekcija zahvaća različite organske sustave – oči, dišni, reproduktivni ili koštani sustav. Javljaju se simptomi poput letargije, gubitka apetita, otežanog disanja, iscjetka iz nosa, konjunktivitisa, artritisa i pobačaja. Tako se kod ptica javljaju respiratorne infekcije uzrokovane vrstom *Chlamydia psittaci*, dok se kod domaćih mačaka (*Felis catus*) javlja veterinarima dobro poznata infekcija bakterijom *Chlamydia felis*, koja se očituje akutnim do kroničnim konjunktivitisom s blefarospazmom, kemozom, seroznim do mukopurulentnim iscjetkom i rinitisom, no rijetko može uzrokovati pneumoniju (HOOVER, 1978.; SYKES 2005.). Obolijevaju sve dobne skupine mačaka, ali češće mačići. Prenosi se direktnim i indirektnim kontaktom, oronazalno inhalacijom ili ingestijom okulonazalnog iscjetka, kontaminiranim okolišem. Kao i domaća mačka, euroazijski ris (*Lynx lynx*) također pripada porodici *Felidae*, no zbog skrovitog načina života u prirodi, te kompliciranih metoda prikupljanja uzoraka, pojavnost klamidioze kod risa je gotovo potpuno nepoznata.

Euroazijski ris, kako mu i samo ime nalaže, nastanjuje područje Europe i Azije - točnije područje središnje Azije i Rusiju, dok Europu nastanjuje ukupno devet populacija od kojih je nekoliko izoliranih populacija prisutno u zapadnoj i jugozapadnoj Europi te na području Fenoskandinavije, Baltika i Karpata (KACZENSKY i sur., 2013.). U Hrvatskoj, risovi obitavaju u planinskim, šumom pokrivenim područjima Dinarida, od hrvatsko – slovenske granice na sjeverozapadu, do hrvatsko - bosanskohercegovačke granice na jugoistoku. Područja Primorsko-goranske i Ličko-senjske županije, južni dio Karlovačke te sjeveroistočni dio Zadarske županije s ukupnom površinom od 7200 km² njihovo su stalno stanište (GOMERČIĆ i sur., 2021.). U Hrvatskoj je ris zakonom zaštićena vrsta, ugrožena zbog parenja u srodstvu (SINDIČIĆ i sur., 2013.) koje utječe na sposobnost preživljavanja, uključujući

imunitet (FRANKHAM i sur., 2002.), stoga su podaci o zdravstvenom statusu od izrazite važnosti za očuvanje populacije.

U znanstvenoj literaturi nema puno podataka o klamidiozi kod divljih pripadnika porodice mačaka iz Europe. Serološki istraživanje provedeno na 26 jedinki iberijskog risa iz Španjolske, utvrdilo je prisutnost protutijela kod 2 jedinke, što upućuje da su iberijski risovi bili u kontaktu s ovom bakterijom no bez potvrde kliničkog oboljenja (MILLAN i sur. 2009.). U Španjolskoj su također provedena istraživanja na divljoj mački (*Felis silvestris*) te su protutijela za bakteriju *Chlamydia* sp. utvrđena u 27% od 22 istražena seruma (MILLAN i RODRIGUEZ, 2009.), dok su CANDELA i sur. (2019.) utvrdili prisutnost DNK *C. felis* u brisevima sluznica no nisu u serumu utvrdili protutijela kod 2 od 9 analiziranih divljih mačaka. U Škotskoj je provedeno istraživanje na 120 slobodnoživućih mačaka, među kojima su bile 24 domaće te 96 hibrida domaće i divlje mačke, te je DNK *C. felis* utvrđena kod 2.61% pretraženih briseva sluznica (McDONALD i sur., 2023.).

Jedini dokaz kliničke manifestacije klamidioze kod divljih pripadnika porodice *Felidae* u Europi dolazi iz Švicarske, gdje je 2017. uhvaćena ženka odraslog risa, dobrog gojnog i općeg stanja, koja je imala znakove konjunktivitisa na lijevom oku (MARTI i sur., 2019.). Nije bilo vidljivih ozljeda očnih struktura, ali bile su prisutne dvije ogrebotine na njušci što je upućivalo na moguću nedavnu ozljedu. PCR analizom brisa oka utvrđena je prisutnost bakterije *Chlamydia felis* dok je za ostale uzročnike analizirane u brisu oka te krvi (*Herpesvirus* -1, *Mycoplasma felis*, *Calicivirus*, *Parvovirus*, *Coronavirus*...) nalaz bio negativan. Životinja je liječena ketoprofenom i oksitetraciklinom tijekom 8 dana te je bris ponovno uzet nakon 14 dana. Simptomi su se povukli, a nalaz PCR-a bio je negativan. Nakon 3 mjeseca fotozamkom je uhvaćena fotografija ove životinje gdje se moglo vidjeti da nema znakova konjunktivitisa na očima što je potvrdilo uspješnost terapije.

Hipoteza i ciljevi

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učestalost infekcija bakterijama iz porodice *Chlamydiaceae* u brisevima oka euroazijskog risa iz dinarske i karpatske populacije. Hipoteza istraživanja je da kod asimptomatskih jedinki neće biti utvrđena prisutnost bakterija, te da će zbog oslabljenog imuniteta uslijed parenja u srodstvu učestalost biti veća kod jedinki iz reintroducirane dinarske, nego kod autohtone karpatske populacije.

Materijali i metode

Prikupljanje uzoraka

Istraživanje je provedeno na 34 uzorka brisa oka risa iz Rumunjske (21), Slovačke (7) i Hrvatske (6). Sve uzorkovane životinje su bile odrasle, osim 3 jednogodišnjaka, te je uzorkovano 28 mušjaka i 6 ženki. Uzorci su prikupljeni u razdoblju 2018. – 2025. godine, tijekom provedbe međunarodnih projekata „Spašavanje dinarske i jugoistočne alpske populacije risa od izumiranja“ (LIFE Lynx) (LIFE16 NAT/SI/000634) i „Lynx Thuringia - Connecting lynx populations across Europe“, te u sklopu praćenja smrtnosti populacije risa u Hrvatskoj kojeg provodi Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Brisovi su prikupljeni na živim životinjama koje su hvatane u Slovačkoj i Rumunjskoj s ciljem naseljavanja u Hrvatsku, Sloveniju (projekt LIFE lynx) i Njemačku (projekt Lynx Thuringia). U Hrvatskoj su uzorci prikupljeni na tri žive životinje koje su uhvaćene s ciljem praćenja uspješnosti naseljavanja u sklopu LIFE Lynx projekta, na jednom živom mladuncu koji je pronađen kao siročće bez majke (ris L33 Karlo) te na svježim lešinama 3 risa koja su pronađeni mrtvi u prirodi. Risovi su hvatani pomoću kaveznih zamki, nakon čega su kemijski imobilizirani sukladno protokolu (KUBALA i sur., 2018.). Doktor veterinarske medicine je zatim napravio osnovni klinički pregled životinje, izvagao i izmjerio tjelesne mjere, nakon čega su uzeti uzorci krvi, dlake, izmeta te brisevi svih sluznica. Bris oka je prikupljen pomoću sterilnog drvenog štapića s vatom, a uzorak je zatim pohranjen u epruvetu te smrznut na -20°C do daljnje obrade.

Izolacija DNK i dokaz klamidija

Izolacija DNK iz brisa oka je provedena korištenjem QIAamp DNA Mini Kit (Quiagen, Hilden, Njemačka) prema uputama proizvođača. Izdvojena DNK čuvana je na -20°C. Identifikacija porodice *Chlamydiaceae* provedena je pomoću lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR), dok je identifikacija vrste *C. felis* provedena standardnim PCR-om. Za dokaz porodice *Chlamydiaceae*, svaka reakcijska smjesa sadržavala je 10 µl Universal Mastermix 2X (Promega, Madison, WI, SAD), 0,5 µl 25 µM svake početnice, 2 µl 1 µM probe, 1,8 µl vode slobodne od nukleaza, 0,2 µl boje ROX i 5 µl DNK, te je ukupan volumen iznosio 20 µl. Svaki uzorak, pozitivna i negativna kontrola su analizirani u duplikatu. Uzorci su analizirani uređajem Mx3005P (Stratagene, SAD) prema sljedećem protokolu: aktivacija na 95°C tijekom 15 sekundi, zatim 50 ciklusa denaturacije pri 95°C tijekom 15 sekundi i vezanja pri 60°C tijekom 60 sekundi. Rezultati su

očitanu na temelju Ct vrijednosti. Uzorci s Ct vrijednosti do 38 smatrali su se pozitivnima te su dalje analizirani u svrhu identifikacije vrste.

Za dokaz vrste, pripremljena je reakcijska smjesa koja je sadržavala 7,5 µl GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, SAD), 0,6 µl 10 µM svake početnice, 4,3 µl vode slobodne od nukleaza i 2 µl DNK, a ukupan volumen iznosio je 15 µl. Uzorci su analizirani uređajem 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, SAD) prema protokolu koji su opisali Harley i sur. (2007.): aktivacija na 95°C tijekom 15 sekundi, zatim 35 ciklusa denaturacije pri 95°C tijekom 20 sekundi, vezanja pri 60°C tijekom 20 sekundi i elongacije pri 72°C tijekom 60 sekundi te posljednji korak na 72°C tijekom 15 minuta. Korištene početnice i probe prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Prikaz početnica i proba korištenih za identifikaciju.

	Gen	Početnice	Proba	Veličina PCR produkta (bp)	Izvor
<i>Chlamydiaceae</i>	23S rRNK	F: 5'- CTGAAACCAGTA GCTTATAAGCGG T-3' R: 5'- ACCTCGCCGTTTA ACTTAACTCC-3'	FAM: 5'- CTCATCATGCAA AAGGCACGCCG-3'	-	Ehricht i sur., 2006.
<i>Chlamydia felis</i>	<i>pmp9</i>	F: 5'- GCGATTTCATGTA GCAGCAAA-3' R: 5'- GTCCAGCTTCCTT GATACCC-3'	-	632	Harley i sur., 2007.

Za vizualizaciju dobivenih PCR produkata (Slika 1.), pripremljen je 1,5%-tni agarozni gel (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, SAD) s Midori Green Advance bojom (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren, Njemačka). Duljina PCR umnožaka određena je pomoću BenchTop 100 bp DNA ladder-a (Promega, Madison, WI, SAD). Elektroforeza je provedena na 70 V tijekom 55 minuta, a očekivana veličina produkata bila je 632 bp.



Slika 1. Aplikacija PCR umnožaka na agarozni gel (izvor: dr. sc. Liča Lozica)

Izolacija i pročišćavanje DNK umnožaka za sekvenciranje

U svrhu dobivanja dovoljne količine DNK za sekvenciranje umnožaka pozitivnih uzoraka, ponovljen je PCR s reakcijskom smjesom većeg volumena, koja se sastojala od 25 μ l GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, SAD), 2 μ l 10 μ M svake početnice, 16 μ l vode slobodne od nukleaza i 5 μ l DNK, a ukupan volumen iznosio je 50 μ l. Izolacija i pročišćavanje DNK umnožaka iz agaroznog gela provedeni su korištenjem ReliaPrep DNA Clean-up Concentration System kita (Promega, Madison, WI, SAD) prema uputama proizvođača. Koncentracija i čistoća DNK određeni su pomoću BioDrop uređaja (BioDrop Ltd., Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo), nakon čega su uzorci sekvencirani Sangerovom metodom u servisu Macrogen Inc., Amsterdam, Nizozemska.

Analiza sekvenci

Sekvence su obrađene pomoću programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3 (Hall, 1999), nakon čega je korišten online alat Basic local alignment search tool (BLAST) za pretragu i analizu nukleotidnih i aminokiselinskih sljedova pohranjenih u bazi podataka GenBank - National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Altschul i sur., 1990.)

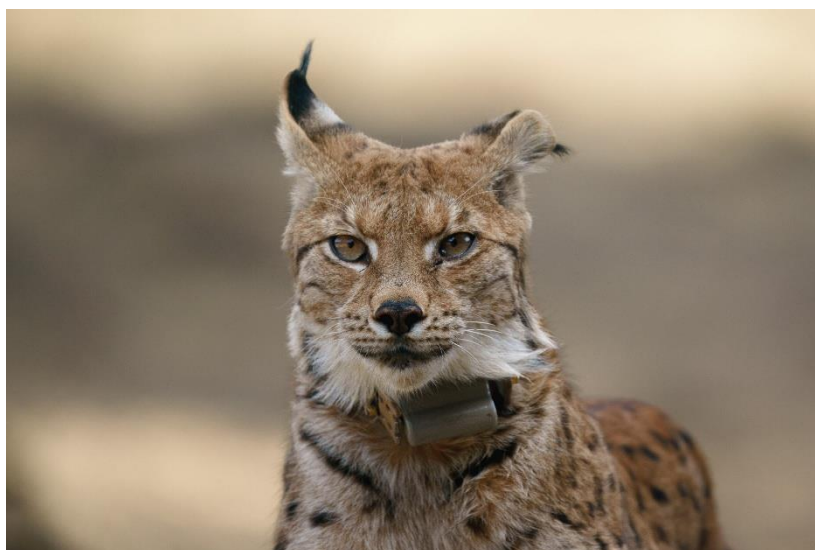
Rezultati

Umnažanjem gena 23S rRNK pomoću qPCR-a, u jednom od 34 istraženih uzorka brisa oka risa dokazana je prisutnost bakterije iz porodice *Chlamydiaceae* (Ct vrijednost 34,57) (Tablica 3). U tom uzorku su zatim pomoću konvencionalnog PCR-a umnožena dva gena - *pmp9* i *ompA*, te je analiza potvrdila da dobivene sekvence pripadaju vrsti *C. felis*. Sekvenca gena *pmp9* pokazala je najveći stupanj podudarnosti (99,6%) i 100%-tnu podudarnost sa sekvencama s GenBank pristupnim brojevima AP006861.1 (AZUMA, 2006.) i DQ652581.1 (HARLEY i sur., 2007), izdvojenima iz domaćih mački iz Japana i Velike Britanije.

Pozitivan uzorak pripada odraslom mužjaku oznake R012 Kras, koji je uhvaćen u Rumunjskoj 19.1.2023. U trenutku hvatanja Kras je imao 23 kg, na temelju zubala je procijenjena dob od 2 godine. Praćenje zdravstvenog statusa u sklopu provedbe projekta reintrodukcije uključivalo je PCR dokaz virusa mačje imunodeficijencije (FIV), mačje leukemije (FeLV), psećeg parvovirusa 2 (CPV-2), virusa mačje panleukopenije (FPLV) i mačjeg herpesvirusa 1, te su svi nalazi bili negativni (SINDIČIĆ i sur., 2023.). Nakon hvatanja, ris je prevezen u objekt registriran za provedbu karantene divljih životinja, gdje je 23.1.2023. uočeno crvenilo desnog oka sa prisutnim iscjetkom u medijalnom očnom kutu, te je jednokratno apliciran gentamicin sulfat, nakon čega su se simptomi povukli. Životinja je 20.3.2023., za vrijeme boravka u karanteni, kemijski imobilizirana, kako bi se izvršio klinički pregled prije transporta u zemlju ispuštanja i kako bi bila postavljena telemetrijska ogrlica za praćenje aktivnosti i kretanja. Potvrđeno je dobro zdravstveno stanje i nisu uočeni simptomi konjunktivitisa. Kras je proveo 64 dana u Rumunjskoj u karanteni, a zatim je prevezen u Hrvatsku i ispušten u Nacionalni park Plitvička jezera 24.03.2023. Nakon potrage za slobodnim područjem, ris Kras uspostavio je životni prostor na području Gorskog kotara gdje je praćen pomoću telemetrijske ogrlice i automatskih kamera. Njegova fotografija je posljednji put zabilježena u lipnju 2024.



Slika 2. Ris Kras na ispuštanju u Nacionalnom parku Plitvička jezera, 24.03.2023. (Autor fotografije: Lucija Rade)



Slika 3. Ris Kras na ispuštanju u Nacionalnom parku Plitvička jezera, 24.03.2023. (Autor: Marko Matešić)

Tablica 2. Podatci o risovima uključenima u istraživanje te rezultat umnažanja bakterija iz porodice *Chlamydiaceae* u brisu oka.

	Lynx (ris) ID	Datum hvatanja/ uzorkovanja	Zemlja podrijetla	Živa životinja/lešina	Spol	Starost (mlad/ odrasli)	Rezultat
1.	R02 Doru	27.2.2019.	Rumunjska	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	negativan
2.	R03 Catalin	16.1.2020.	Rumunjska	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	negativan
3.	R04 Alojzije	20.1.2020.	Rumunjska	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	negativan
4.	R05 Boris	25.1.2020.	Rumunjska	Živa životinja	Mužjak	Mlad	negativan
5.	Pino (Hron)	25.3.2020.	Slovačka	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	negativan
6.	R06 Tris	22.1.2021.	Rumunjska	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	negativan
7.	R07	24.1.2021.	Rumunjska	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	negativan
8.	R08	27.1.2021.	Rumunjska	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	negativan
9.	R09 Aida	13.2.2021.	Rumunjska	Živa životinja	Ženka	Odrasli	negativan
10.	Emil	26.2.2021.	Slovačka	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	negativan
11.	R10 Zois	9.3.2021.	Rumunjska	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	negativan
12.	Julia (Motka)	11.3.2021.	Slovačka	Živa životinja	Ženka	Odrasli	negativan
13.	Lenka	18.3.2021.	Slovačka	Živa životinja	Ženka	Odrasli	negativan

14.	R011 Blisk	24.2.2022.	Rumunjska	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	negativan
15.	R012 Kras	19.1.2023.	Rumunjska	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	pozitivan
16.	Lukaš	26.1.2023.	Slovačka	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	negativan
17.	L29 Josip	4.2.2022.	Hrvatska	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	negativan
18.	L31 Pandoru	30.3.2022.	Hrvatska	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	negativan
19.	Ljubo (Luboš)	10.4.2022.	Slovačka	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	negativan
20.	L33 Karlo	1.10.2022.	Hrvatska	Živa životinja	Mužjak	Mlad	negativan
21.	RO13 Jago	23.2.2023.	Rumunjska	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	negativan
22.	RO14 Talia	27.2.2023.	Rumunjska	Živa životinja	Ženka	Odrasli	negativan
23.	Sneška (Erika)	14.3.2023.	Slovačka	Živa životinja	Ženka	Odrasli	negativan
24.	LCRO23	6.9.2023.	Hrvatska	Lešina	Mužjak	Odrasli	negativan
25.	LCRO24	20.10.2023.	Hrvatska	Lešina	Mužjak	Odrasli	negativan
26.	LCRO25	23.10.2023.	Hrvatska	Lešina	Mužjak	Mlad	negativan
27.	R015		Rumunjska	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	negativan
28.	R016		Rumunjska	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	negativan

29.	R017		Rumunjska	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	negativan
30.	R018		Rumunjska	Živa životinja	Ženka	Odrasli	negativan
31.	R019		Rumunjska	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	negativan
32.	R020		Rumunjska	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	negativan
33.	R021		Rumunjska	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	negativan
34.	R022		Rumunjska	Živa životinja	Mužjak	Odrasli	negativan

Tablica 3. Ct vrijednosti za porodicu *Chlamydiaceae*.

	Ct vrijednost <i>Chlamydiaceae</i>
Pozitivan uzorak (ris Kras)	34, 57
Pozitivna kontrola	25, 35
Negativna kontrola	-

Rasprava

Uspostava, razvoj i provedba praćenja zdravlja divljih životinja globalni je prioritet i izazov unutar pristupa "Jedno zdravlje" (engl. *One Health*). Pri tome se koriste dva pristupa – opće ili pasivno praćenje, te aktivno ili ciljano praćenje koje uključuje proaktivno uzorkovanje uginulih ili živih divljih životinja radi otkrivanja određene bolesti ili patogena (BARROSO i sur., 2024.). No proaktivno uzorkovanje je vrlo veliki izazov kod mnogih vrsta divljih životinja, uključujući risa. Ris koristi velike životne prostore te izbjegava kontakt sa čovjekom. Većina europskih populacija je niske gustoće, ugrožena zbog više čimbenika te zakonom zaštićena, a to sve značajno otežava hvatanje živih životinja i pronalazak mrtvih. To je jedan od najvažnijih razloga zašto je u znanstvenoj literaturi dostupno malo podataka o učestalosti zaraznih i nezaraznih bolesti kod risa, kao i o uzrocima uginuća (BEHNKE i WALZER, 2019.). Stoga je

važno prilikom svake manipulacije s risovima iskoristiti mogućnost te prikupiti što veći broj bioloških uzoraka koji mogu biti predmet znanstvenih istraživanja i temelj za prikupljanje zdravstvenih spoznaja o europskim populacijama risa. Uzorci za ovo istraživanje su prikupljeni u sklopu dva projekta naseljavanja risa iz autohtone populacije u Karpatima u reintroduciranje i ugrožene populacije u Dinaridima i njemačkoj pokrajini Thuringia. To je ujedno i velika prednost ovog istraživanja, budući uključuje uzorke iz tri države (Rumunjske, Slovačke i Hrvatske) te dvije populacije.

Jedini objavljeni podatci o bakterijama iz porodice *Chlamydiaceae* kod euroazijskog risa su opis slučaja infekcije oka risa u Švicarskoj (MARTI i sur., 2019.) te serološka analiza na 5 uzoraka krvi risa iz Rusije, bez pozitivnog nalaza (NAIDENKO i sur., 2019.). Ovo istraživanje donosi novi opis kliničkog slučaja klamidioznog konjuktivitisa risa dokazanog DNK sekvencom uzročnika, kao i analizu prisutnosti bakterija u brisevima oka 34 asimptomatskih životinja.

Slučaj konjuktivitisa opisan kod risa iz Švicarske očitovao je izraženiju kliničku sliku nego životinja iz našeg istraživanja, a simptomi su uključivali hiperemiju, izraženu kemozu i žućkasti, mutni, mukopurulentni iscjedak oka, bez vidljivih ozljeda očnih struktura. Kod životinje u našem istraživanju, za vrijeme karantene je uočena hiperemija odnosno crvenilo desnog oka sa prisutnim iscjetkom u medijalnom očnom kutu. U oba slučaja nije bilo moguće potvrditi kako je došlo do zaraze risa, no MARTI i sur. (2019.) pretpostavljaju da je u njihovom slučaju infekcija posljedica kontakta sa zaraženom domaćom ili europskom divljom mačkom budući su na njušci bile prisutne dvije ogrebotine. Klamidioza se prenosi direktnim kontaktom, pri čemu sekret oka ima ključnu ulogu (SEKI i sur., 2016.). Risovi u međusobni direktni kontakt dolaze rijetko, uglavnom je to kontakt životinja suprotnog spola tijekom razmnožavanja. No, budući da se hrane živim plijenom, što može uključivati i divlje i domaće mačke (JOBIN i sur., 2000.), kontakt s njima može biti izvor zaraze. U slučaju opisanom u ovom istraživanju, moguće je da je do zaraze došlo prije hvatanja s obzirom da inkubacija traje 3 do 10 dana (AIELLO i MOSES, 2016.).

Ukupno 78 sekvenci u bazi podataka GenBank pokazalo je visok stupanj podudarnosti (99,4-99,79%), ali su samo dvije sekvence imale i 100%-tnu pokrivenost, a time i najveću sličnost s analiziranom sekvencom. Uzimajući u obzir navedeno, može se zaključiti da gen *pmp9* ne posjeduje dovoljno varijabilne regije koje bi omogućile detaljniju filogenetsku analizu, ali se svakako može koristiti za dokaz vrste *C. felis*.

Činjenica da su jedina dva slučaja klamidioze oka kod risa opisana na životinjama uhvaćenima za projekte reintrodukcije, naglašava važnost provedbe detaljnog zdravstvenog pregleda i karantene životinja uključenih u ove projekte, ali i podsjeća kako uzorci prikupljeni tijekom takvih projekata mogu imati dodanu vrijednost ako ih se uključi u aktivno, ciljano praćenje određenih bolesti i patogena.

Zaključci

1. Bakterije porodice *Chlamydiaceae* mogu uzrokovati klinička oboljenja oka kod euroazijskog risa (*Lynx lynx*).
2. Učestalost bakterije *C. felis* kod jedinki risa iz autohtonih i reintroduciranih populacija je vrlo niska.
4. Aktivna istraživanja i zdravstveni nadzor pospješuje zaštitu ugroženih populacija risa i raniju detekciju potencijalnih zoonoza.

Literatura

AIELLO, S. E., M. A. MOSES (2016): The Merck Veterinary Manual. 11th ed. Merck & Co., Inc.

ALTSCHUL, S. F., W. GISH, W. MILLER, E. W. MYERS, D. J. LIPMAN (1990.): Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215(3):403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

AZUMA, Y., H. HIRAKAWA, A. YAMASHITA, Y. CAI, M. A. RAHMAN, H. SUZUKI, S- MITAKU, H. TOH, S. GOTO, T. MURAKAMI, K. SUGOI, H. HAYASHI, H. FUKASHI, M. HATTORI, S. KUHARA, M. SHIRAI (2006): Genome sequence of the cat pathogen, *Chlamydophila felis*. DNA Res. 13(1):15-23 <https://doi.org/10.1093/dnares/dsi027>

BARROSO, P., J.R. LOPEZ-OVLERA, T. KILUBA WA KILUBA, C. GORTAZAR (2024): Overcoming the limitations of wildlife disease monitoring. Research Directions: One Health. 2:e3. <https://doi.org/10.1017/one.2023.16>

BAVOIL, P., B. KALTENBOECK, G. GREUB (2013): In *Chlamydia veritas*. Path. Dis. 67, 89–90. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12026>

BEHNKE, R., C. WALZER (2019). Health, Husbandry and Management of Eurasian lynx (*Lynx lynx*) – Vet Handbook and Husbandry Guidelines. 3Lynx Project, 127 pp.

CANDELA, M.G., X. PARADAVILA, N. ORTEGA, A. LAMOSA, JG. MANGAS, C. MARTINEZ-CARRASCO (2019): Canine distemper virus may affect European wild cat populations in Central Spain. Mamm Biol. 97(1):9-12. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2019.04.006>.

EHRICHT, R., P. SLICKERS, S. GOELLNER, H. HOTZEL, K. SACGSE (2006): Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. Mol. Cell. Probes. 2006;20(1):60-63. <https://doi.org/10.5772/3194610.1016/j.mcp.2005.09.003>

FRANKHAM, R, BALLOU JD, BRISCOE DA (2002): Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge

GOMERČIĆ, T., I. TOPLIČANEC, V. SLIJEPCHEVIĆ, S. BLAŠKOVIĆ, I. SELANEC, I. BUDINSKI, J. TOMAIĆ, J. KUSAK, G. IVANOV, M. SINDIČIĆ (2021): Rasprostranjenost

i najmanja veličina populacije euroazijskog risa (*Lynx lynx*) u Hrvatskoj u razdoblju 2018.-2020. Šum. list 11-12: 525-533.

HARLEY, R., A. HERRING, K. EGAN, P. HOWARD, T. GRUFFYDD-JONES, Y. AZUMA, M. SHIRAI, C. HELPS (2007): Molecular characterisation of 12 *Chlamydophila felis* polymorphic membrane protein genes. Vet. Microbiol. 124(3-4):230-238.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.022>

HENG, C. C., C. Y. Q. LEE, Y. Y. CHEOK, G. M. Y. TAN, C. Y. LOOI, W. F. WONG (2019): *Chlamydiaceae*: Diseases in Primary Hosts and Zoonosis. Microorganisms 24, 7 (5), 146. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050146>

HOOVER, E. A., D. E. KAHN and J. M. LANGLOSS (1978): Experimentally induced feline chlamydial infection (feline pneumonitis). Am. J. Vet. Res. 39, 541-547

JOBIN, A, P. MOLINARI, U. BREITENMOSER (2000): Prey spectrum, prey preference and consumption rates of Eurasian lynx in the Swiss Jura Mountains. Acta Theriol. 45:243–252.

KACZENSKY, P. G. CHAPRON, M. VON ARX, D. HUBER, H. ANDRÉN, J. LINNELL (2013): Status, Management and Distribution of Large Carnivores - Bear, Lynx, Wolf and Wolverine in Europe. Part 1. IUCN/SSC Large Carnivore Initiative for Europe.

KUBALA, J., M. SINDIČIĆ, M. BELAK (2018): Protocol for Eurasian lynx (*Lynx lynx*) capture, narcosis, transport, and quarantine in the Slovak Carpathians. LIFE lynx project. 28 p

MARTI, I., S. R. R. PISANO, M. WEHRLE, M. L. MELI, R. HOFMANN-LEHMANN, M.-P. RYSER-DEGIORGIS (2019): Severe Conjunctivitis Associated with *Chlamydia felis* Infection in a Free-ranging Eurasian Lynx (*Lynx lynx*). J. Wildl. Dis. 1 ; 55 (2): 522–525.
<https://doi.org/10.7589/2018-05-142>

MCDONALD, R.A., K KILISHAW, D.A. HETHERINGTON, E.C. HALLIWELL, A. W. SAINSBURY (2023): Epidemiology of a Hybrid Swarm: Evidence of 11 Feline Infectious Agents Circulating in a Population of Sympatric European Wildcat Hybrids and Free-Living Domestic Cats, in Scotland. Vet. Med. Int.:6692514. <https://doi.org/10.1155/2023/6692514>.

MILLAN, J., A. RODRIGUEZ (2009.): A serological survey of common feline pathogens in free-living European wildcats (*Felis silvestris*) in central Spain. Eur. J. Wildl. Res. ;55(3):285-291. <https://doi.org/10.1007/s10344-008-0246-z>.

- MILLAN, J., M.G. CANDELA, F. PALOMARES, M. J. CUBERO, A. RODRIGUEZ, M. BARRAL, J. DE LA FUENTE, S. ALMERIA, L. LEON-VIZCAINO (2009.): Disease threats to the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Vet. J.* 182(1):114-124. [https://doi: 10.1016/j.tvjl.2008.04.005](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.04.005).
- NAIDENKO, S. V., J. A. HERNANDEZBLANCO, M. N. EROFEEVA M. N. LITVINOV, V. V. ROZHNOV (2019): Serum prevalence to nonviral pathogens in wild felids of Southern Primorye, Russia. *Nat. Conserv. Res.* 4(1), 99–105.
- PRUKNER-RADOVČIĆ, E. (2010): Bolesti ptica kućnih ljubimaca. Medicinska naklada. Zagreb, Hrvatska.
- SEKI, M.C., M.R. ANDREM A. O. T. CARRASCO, R- Z- MACHADO, A. A. PINTO (2016): Detection of *Chlamydomphila felis* and feline herpesvirus type-1 in non-domestic felids in Brazil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 53:169–176
- SINDIČIĆ, M. (2023): Health surveillance during the LIFE Lynx project Technical report. LIFE Lynx project, 20 p.
- SINDIČIĆ, M., POLANC, P., GOMERČIĆ, T. (2013): et al. Genetic data confirm critical status of the reintroduced Dinaric population of Eurasian lynx. *Conserv. Genet.* 14, 1009–1018. <https://doi.org/10.1007/s10592-013-0491-x>
- SYKES, J. E. (2005): Feline chlamydiosis. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 20, 129-134.

Učestalost bakterija iz porodice *Chlamydiaceae* u dinarske i karpatske populacije risa (*Lynx lynx*)

Sažetak

Euroazijski ris (*Lynx lynx*) najveća je europska mačka. Ujedno je i treći najveći predator u Hrvatskoj te je ugrožena i zakonom zaštićena vrsta. Risovi su, kao i druge mačke, prijemljivi na infekcije uzrokovane bakterijama iz porodice *Chlamydiaceae* koje uzrokuje različita klinička oboljenja kod životinja i ljudi. Klamidioza se kod domaćih mačaka najčešće očituje konjunktivitisom uzrokovanim bakterijom *Chlamydia felis*. No, koliko dobro je istražena kod domaćih mačaka toliko je ova bolest kod divljih felida, uključujući risova ostala nepoznanica. Cilj ovoga istraživanja bilo je utvrditi prisutnost bakterija porodice *Chlamydiaceae* u obrisku oka risova dinarske i karpatske populacije. Na ukupno 34 uzoraka jedinki iz Hrvatske, Rumunjske i Slovačke, pomoću PCR-a umnožena su 2 gena – 23S rRNK i *pmp9*. Kod mužjaka risa Krasa, koji je nakon hvatanja u Rumunjskoj očitovao znakove konjunktivitisa, dokazana je *C. felis*. Rezultati ukazuju na važnost zdravstvenog nadzora i aktivnog praćenja riseva i njihovih patogena radi očuvanja ove ugrožene vrste životinja.

Ključne riječi: ris, *Lynx lynx*, *Chlamydiaceae*, *Chlamydia felis*, konjunktivitis

***Chlamydiaceae* Prevalence in Dinaric and Carpathian Populations of the Eurasian Lynx (*Lynx lynx*)**

Summary

The Eurasian lynx (*Lynx lynx*) is the largest wild cat in Europe and the third-largest predator in Croatia. It is an endangered species protected by law. Like other cats, lynxes are susceptible to infections caused by bacteria from the family *Chlamydiaceae*, which can lead to various clinical diseases in both animals and humans. In domestic cats, chlamydiosis most commonly manifests as conjunctivitis caused by *Chlamydia felis*. While the disease is relatively well studied in domestic cats, it remains largely unknown in wild felids, including lynxes. The aim of this study was to determine the presence of *Chlamydiaceae* in eye swabs taken from lynxes in the Dinaric and Carpathian populations. A total of 34 samples from individuals in Croatia, Romania, and Slovakia were analyzed. Two genes were analysed using PCR - 23S rRNA and *pmp9*. In the male lynx "Kras", who showed signs of conjunctivitis after being captured in Romania, the presence of *C. felis* was confirmed. These results highlight the importance of health monitoring and active surveillance of lynxes and their pathogens to help preserve this endangered species.

Keywords: lynx, *Lynx lynx*, *Chlamydiaceae*, *Chlamydia felis*, conjunctivitis